



**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GIDA KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
BAZİ GÜVENİLİRLİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Ebru DEMİR

BURDUR, 2019

**T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GIDA KAYNAKLI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
BAZI GÜVENİLİRLİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Ebru DEMİR

Danışman: Doç. Dr. Gülden BAŞYIĞIT KILIÇ

BURDUR, 2019

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

Ebru DEMİR tarafından Doç. Dr. Gül den BAŞYİĞİT KILIÇ yönetiminde hazırlanan “Gıda Kaynaklı Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Güvenilirlik Özelliklerinin Belirlenmesi” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

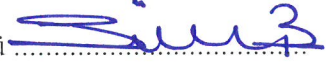
Tez Savunma Tarihi: 08/03/2019

Doç. Dr. Gül den BAŞYİĞİT KILIÇ

(Danışman)

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi,

Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

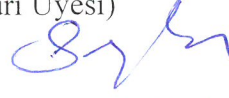


Doç. Dr. Seyhan ULUSOY

(Jüri Üyesi)

Süleyman Demirel Üniversitesi,

Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

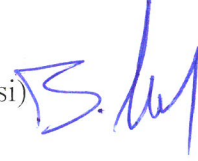


Dr. Öğr. Üyesi Büşra AKTAŞ

(Jüri Üyesi)

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi,

Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü



ONAY

Bu Tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nun _____ Tarih ve _____ Sayılı Kararı ile Kabul Edilmiştir.

.....
Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **“Gıda Kaynaklı Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Güvenilirlik Özelliklerinin Belirlenmesi”** başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

08/03/2019

Ebru DEMİR

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim sürecinde, araştırmamın planlanmasından sonuçlanmasına kadar geçen süreç içerisinde, bilimsel çalışma anlayışını model aldığım, problem çözme ve sorunlarla başa çıkamamda gerek bilimsel deneyim ve birikimini gerekse manevi destek, yardım ve tavsiyelerini esirgemeyen, yol gösterici, paylaşımcı, bilimsel düşünme stilini öğreten, her koşulda sürekli ilgi, anlayış ve sabır gösteren değerli Danışman Hocam **Doç. Dr. Gülden BAŞYİĞİT KILIÇ**'a teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm laboratuvar arkadaşım Sedef YÜCE'ye ve deneylerim sırasında karşılaştığım güçlükleri aşmam konusunda uygulama deneyimlerini benimle paylaşan Uzman Biyolog Orhan YAVUZ'a teşekkür ederim.

0462-YL-17 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen **Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü**'ne teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, manevi ve maddi desteklerini hep hissettiğim annem Muteber DEMİR, babam Hüsnü DEMİR ve kardeşlerimle birlikte ailemin tüm bireylerine sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Mart, 2019

Ebru DEMİR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGE DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET	viii
SUMMARY	x
1. GİRİŞ	11
2. GENEL BİLGİLER	14
2.1. LAB ve Genel Özellikleri.....	14
2.2. LAB'nin Güvenilirlik Özellikleri.....	16
2.2.1. Hemolitik Aktivite.....	18
2.2.2. Jelatinaz Üretimi.....	18
2.2.3. DNaz Üretimi	19
2.2.4. Biyofilm Oluşumu	20
2.2.5. Proteolitik Enzim Aktivitesi	21
2.2.6. Aminoasit Dekarboksilaz Aktivitesi.....	22
2.2.7. LAB'nin Virülans ve Amino Asit Dekarboksilaz Gen Profilleri	23
2.2.8. LAB'nin Antibiyotik Direnç Profilleri	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal.....	30
3.1.1. Çalışmada Kullanılan LAB	30
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Primerler	32
3.2. Yöntem	33
3.2.1. LAB'nin Aktifleştirilmesi	30
3.2.2. Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi.....	34
3.2.3. Jelatinaz Üretiminin Belirlenmesi.....	34
3.2.4. DNaz Aktivitesinin Belirlenmesi	34
3.2.5. İzolatların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Araştırılması.....	35
3.2.6. İzolatların Ekstraselüler Proteaz Üretiminin Belirlenmesi	35
3.2.7. Suşların Dekarboksilaz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	36
3.2.8. Moleküler Tekniklerle Virülans, Amino Asit Dekarboksilaz ve Antibiyotik Gen Bölgelerinin Tespiti.....	36
3.2.8.1. LAB'nden Genomik DNA İzolasyonu	35
3.2.8.2. Virülans ve Amino Asit Dekarboksilaz Gen Bölgelerinin Tespiti.....	36
3.2.8.3. Antibiyotik Gen Bölgelerinin Tespiti.....	36
3.2.9. İstatistiksel Analizler.....	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	44
4.1. Hemolitik Aktivitenin Değerlendirilmesi.....	44
4.2. Jelatinaz Üretiminin Değerlendirilmesi.....	46
4.3. DNaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	47
4.4. İzolatların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Araştırılması	49
4.5. İzolatların Ekstraselüler Proteaz Üretiminin Tespiti	51

4.6. Suşların Dekarboksilaz Aktivite Sonuçları	52
4.7. LAB İzolatlarında PZR ile Virülans ve Amino Asit Dekarboksilaz Direnç Geni Tarama Sonuçları	55
4.8. LAB İzolatlarında PZR ile Antibiyotik Direnç Geni Tarama Sonuçları.....	64
5. SONUÇ.....	79
KAYNAKLAR.....	82
EKLER	106
ÖZGEÇMİŞ.....	119



ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

- Şekil 3.1. Deneyde kullanılan defibrine at kanları 34
- Şekil 3.2. İzolatların biyofilm oluşturma özelliklerinin tespiti için hazırlanan mikropilaka 35
- Şekil 4.1. LAB'nin hemolitik aktivite değerlendirilmesinde zon oluşumu..... 44
- Şekil 4.2. LAB'nin jelatinaz üretimi deneyinde 48 saat inkübasyon süresi sonunda +4 °C'de 1 saat bekletildikten sonraki görüntüleri 46
- Şekil 4.3. LAB'nin DNaz aktivite değerlendirilmesinde zon görüntüleri..... 48
- Şekil 4.4. Biyofilm testi sonucunda biyofilm oluşturan ve oluşturmayan izolatlara ait mikropilaka görüntüsü 50
- Şekil 4.5. LAB'nin proteolitik aktivite deneyinde 48 saat sonrası oluşturdukları zon görüntüleri 52
- Şekil 4.6. LAB'nin dekarboksilaz aktivite değerlendirilmesinde zon görüntüleri..... 53
- Şekil 4.7. LAB izolatlarının *gelE* gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bç DNA marker, 1: *L. bulgaricus* PLa2B, 2: *L. rhamnosus* PLc23B(A), 3: *L. bulgaricus* PLa19E, 4: *L. bulgaricus* PLr27A, 5: *L. lactis* PLr31C(B), 6: *L. bulgaricus* PLr42B1, 7: *L. bulgaricus* PLj27B, 19: negatif kontrol) 55
- Şekil 4.8. LAB izolatlarının *cylA* gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bç DNA marker, 8: *L. bulgaricus* PLr3C, 9: *L. bulgaricus* YLa27B, 10: *L. bulgaricus* YLj25B, 11: *L. bulgaricus* YLj38C, 14: negatif kontrol) 56
- Şekil 4.9. LAB izolatlarının *esp* gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bç DNA marker, 1: *L. bulgaricus* PLa4A, 2: *L. rhamnosus* PLc23B(A), 4: *L. bulgaricus* PLa24B, 5: *L. bulgaricus* PLa27C, 6: *L. bulgaricus* PLa36C, 7: *L. bulgaricus* Lb10A2, 8: *L. bulgaricus* PLc3A, 9: *L. fermentum* PLc35A, 10: PLr31A, 12: *L. fermentum* YLa27A, 13: *L. fermentum* YLc12B, 15: *L. fermentum* *L. bulgaricus* YLc20A, 16: *E. faecium* YLj25A, 17: negatif kontrol) 58
- Şekil 4.10. LAB izolatlarının *hyl* gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bç DNA marker, 11: *L. bulgaricus* PLj23B, 13: *L. rhamnosus* PLj14A, 19: negatif kontrol)..... 59
- Şekil 4.11. LAB izolatlarının *efaA* gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bç DNA marker, 2: *L. fermentum* PLc27E, 3: *L. fermentum* PLc35A, 4: *L. lactis* PLr31C(B), 5: *L. bulgaricus* PLr42B1, 6: *L. bulgaricus* PLj1C(A), 8: *L. lactis* PLj24C(A), 9: *L. fermentum* YLa13B, 10: *L. fermentum* YLa22A, 11: *L. fermentum* YLc4A, 13: *L. fermentum* YLc23B, 14: *L. fermentum* YLc24C, 15: *L. fermentum* PLc23A1, 16: *L. fermentum* PLc23A2, 17: *L. fermentum* PLc27B, 18: *L. lactis* PLj27A, 19: *L. fermentum* YLa18B, 12: negatif kontrol) 59
- Şekil 4.12. LAB izolatlarının *hdc* gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bç DNA marker, 4: *L. bulgaricus* PLj35B(A), 15: *L. bulgaricus* YLj21C, 21: negatif kontrol)..... 60
- Şekil 4.13. LAB izolatlarının *ermA* antibiyotik gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bç DNA marker, 5: *L. rhamnosus* PLj14A, 14: negatif kontrol) 65

Şekil 4.14. LAB izolatlarının *ermB* antibiyotik gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bç DNA marker, 1: *L. fermentum* YLa22A, 2: *L. fermentum* YLc23B, 4: *L. fermentum* YLc35B, 5: *L. fermentum* YLr12A, 6: *L. fermentum* YLr15A, 7: *L. fermentum* PLc23A1, 8: *L. fermentum* PLc23A2, 9: *L. fermentum* PLc31A, 10: *L. fermentum* PLr1D, 14: negatif kontrol) 66

Şekil 4.15. LAB izolatlarının *vanB* antibiyotik gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bç DNA marker, 1: *E. faecium* YLj25A, 2: *L. fermentum* YLa22B, 3: *L. fermentum* YLc24C, 4: *L. fermentum* PLc27B, 5: *L. fermentum* PLc38D, 14: negatif kontrol)..... 67



ÇİZELGE DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan 87 LAB izolatının sekans kodları ve cins tür isimleri ...	30
Tablo 3.2. Çalışmanın moleküler aşamasında araştırılan genler, primerler ve genlerin boyutları	32
Tablo 3.3. Virülans ve amino asit dekarboksilaz genlerinin PZR reaksiyon karışımları ...	37
Tablo 3.4. Virülans ve amino asit dekarboksilaz direnç genlerinin PZR reaksiyon koşulları	37
Tablo 3.5. Antibiyotik direnç genleri için kullanılan PZR karışımı	40
Tablo 3.6. Antibiyotik direnç genlerinin PZR reaksiyon koşulları.....	40
Tablo 4.5. Virülans, amino asit dekarboksilaz ve antibiyotik gen taraması sonucunda pozitif sonuç veren LAB suşları	73
Tablo 4.6. LAB'nin hemolitik aktivite, jelatinaz üretimi, DNaz üretimi, amino asit dekarboksilaz üretimi, biyofilm oluşumu, ekstraselüler proteaz aktivitesi, virülans, amino asit dekarboksilaz ve antibiyotik gen taraması sonuçlarına göre güvenilir kabul edilen izolatlar	75
EK 1-Tablo 4.1. LAB'nin Jelatinaz Üretimini Değerlendirilmesi	106
EK 2-Tablo 4.2. LAB'nde Biyofilm Oluşumunun Değerlendirilmesi	108
EK 3-Tablo 4.3. LAB'nin Ekstraselüller Proteaz Üretimi Zon Çapları (mm)	110
EK 4-Tablo 4.4. LAB'nin Dekarboksilaz Aktivite Değerlendirilme Sonuçları	113

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>aac(6')-aph(2'')</i>	: Gentamisin Geni
<i>ace</i>	: Kolajen Bağlayıcı Protein Geni
<i>asa1</i>	: Agregasyon Maddesi Geni
<i>bç</i>	: Baz Çifti
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
<i>cat</i>	: Kloramfenikol Asetiltransferaz Geni
CFU	: Koloni Oluşturan Birim
<i>cylA</i>	: Sitolizin Geni A
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Dinükleotittrifosfatlar
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
<i>efaA</i>	: Endokardit Antijeni Geni
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
<i>ermA</i>	: Eritromisin Geni A
<i>ermB</i>	: Eritromisin Geni B
<i>ermC</i>	: Eritromisin Geni C
<i>esp</i>	: Enterokokal Yüzey Proteini Geni
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
FEEDAP	: Hayvan Beslemede Kullanılan Ürünler ve Katkı Maddeleri
g	: Gram
GC	: Guanin-Sitozin
<i>gelE</i>	: Jelatinaz Geni
GI	: Gastrointestinal
GRAS	: Güvenli Olarak Kabul Edilen
<i>hdc</i>	: Histidin Geni
<i>hyl</i>	: Hiyalüronidaz Geni
kb	: Kilobaz
LAB	: Laktik Asit Bakterisi
M	: Molarite
mg	: Miligram
MIK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
QPS	: Kalifiye Emniyet Varsayım
<i>tdc</i>	: Tirozin Geni
<i>tet</i>	: Tetrasiklin Gen Grubu
<i>tetK</i>	: Tetrasiklin Geni K
<i>tetL</i>	: Tetrasiklin Geni L
<i>tetM</i>	: Tetrasiklin Geni M
<i>tetQ</i>	: Tetrasiklin Geni Q
<i>tetS</i>	: Tetrasiklin Geni S
<i>vanA</i>	: Vankomisin Geni A
<i>vanB</i>	: Vankomisin Geni B
<i>vanC</i>	: Vankomisin Geni C
<i>vanX</i>	: Vankomisin Geni X
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Gıda Kaynaklı Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Güvenilirlik Özelliklerinin Belirlenmesi

Ebru DEMİR

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gülden BAŞYİĞİT KILIÇ

Mart, 2019

Laktik asit bakterileri (LAB)'nin güvenilirlik özelliklerini belirlemek amacıyla peynir ve yoğurt örneklerinden daha önceki çalışmalarda izole edilmiş, 16S rRNA sekans analizi ile genetik tanısı yapılmış ve bazı teknolojik özellikleri belirlenmiş 87 adet LAB materyal olarak kullanılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda LAB'nin 48'inin jelatinaz aktivitesine sahip olduğu ve 19'unun biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. LAB'nin biyojen oluşturma özellikleri incelendiğinde; 16 adet *L. fermentum*, 3 adet *L. bulgaricus* ve 1'er adet *L. lactis*, *L. paracasei* ve *L. plantarum* suşlarının araştırılan histidin, fenilalanin, tirozin, ornitin, triptofan ve lizin dekarboksilaz enzimlerinin tamamı belirlenmiştir.

Bakterilerde hemoliz ve DNaz aktivitesi tespit edilmemiştir. Ekstraselüler proteaz üretimi skim milk, süt agar ve kazein agarda incelenmiştir. Bakterilerin 64 adedi skim milk agarda, 27 adedi süt agarda, 84 adedi ise kazein agarda zon oluşumu göstermiştir. Ayrıca 87 adet suşun 25 adedi üç besiyerlerinde zon oluşturmuştur. Her üç besiyerinde de zon oluşturmayan suş tespit edilmemiştir.

Yapılan araştırma sonucunda farklı süt ve yoğurt örneklerinden daha önce izole edilmiş olan 87 adet LAB'nden 9 adet *L. bulgaricus* (PLa18B, PLa23B, PLc36A, YLa12B, YLa27C, YLa31A, YLj15C(A), YLj22A, YLr26A(B)), 4 adet *L. fermentum* (PLc27B(A), PLr2B, YLa16C YLa37B), 4 adet *L. rhamnosus* (PLc23B(A), PLc36A(A), PLj6B, PLj6B1), 1'er adet *P. acidilactici* PLr8D(A2), *L. lactis* PLr7A(A), *L. plantarum* PLj18A1 suşları olmak üzere toplam 20 bakteride hemolitik aktivite, jelatinaz, DNaz ve amino asit dekarboksilaz üretimi, biyofilm oluşumu ve ekstraselüler proteaz aktivitesi belirlenmemiştir. Bu bakterilerde aynı zamanda virülans genlerden *gel*, *hyl*, *asa1*, *esp*, *cylA*, *efaA*, *ace*, amino asit dekarboksilaz için; *hdc* ve *tdc* genleri ve antibiyotik direncinin belirlenmesi için ise araştırılan *ermA*, *ermB*, *ermC*, *aac(6')* *aph(2'')*, *cat*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetS*, *tetQ*, *tetX*, *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanX* gen bölgeleri de tespit edilmemiştir. İncelen tüm bu parametreler açısından bu LAB güvenilir olarak yorumlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: LAB, güvenilirlik, virülans, antibiyotik, risk

Hazırlanan bu Yüksek Lisans Tezi Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 0462-YL-17 proje numarası ile desteklenmiştir.

SUMMARY

M.Sc. Thesis

Determination of Some Safety Characteristics of Foodborne Lactic Acid Bacteria

Ebru DEMİR

**Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering**

Supervisor: Asst. Prof. Gülden BAŞYİĞİT KILIÇ

March, 2019

A total of 87, previously described for their technological properties and identified by 16S rRNA sequence analysis, lactic acid bacteria (LAB) isolated from cheese and yogurt were used in this study to determine the safety characteristics of LAB. The results showed that 48 LAB tested had gelatinase activity and 19 LAB had biofilm formation capability. 22 LAB strains (16 *L. fermentum*, 3 *L. bulgaricus*, 1 *L. actis*, 1 *L. paracasei* and 1 *L. plantarum*) have found to produce all of the biogenic amine tested which were histidine, tyrosine, ornithine, tryptophan, phenylalanine, and lysine decarboxylase enzymes

None of the isolates showed hemolytic activity or DNase production. 64 isolates had extracellular protease activity on skim milk agar, whereas 27 and 84 strains showed zone formation on milk agar and casein agar, respectively. In addition, 25 of the 87 strains formed zones on all three media. There was no strain having a zone-negative result for all of the media tested.

As a result, a total of 20 LAB out of 87 LAB isolated from different milk and yogurt samples (*L. bulgaricus* PLa18B, PLa23B, PLc36A, YLa12B, YLa27C, YLa31A, YLj15C (A), YLj22A, and YLr26A (B); *L. fermentum* PLc27B(A), PLr2B, YLa16C, and YLa37B; *L. rhamnosus* PLc23B(A), PLc36A(A), PLj6B, and PLj6B1; 1 *P. acidilactici* PLr8D(A2); 1 *L. lactis* PLr7A(A); 1 *L. plantarum* PLj18A1) have found to be negative for hemolytic activity, gelatinase, DNase, and amino acid decarboxylase production, biofilm formation, and extracellular protease activity. These strains are also negative for the genes involved in virulence; *hyl*, *asa1*, *esp*, *cylA*, *efaA*, and *ace*, in amino acid decarboxylase; *hdc* and *tdc*, and in antibiotic resistance; *ermB*, *ermC*, *aac(6')* *aph(2'')*, *cat*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetS*, *tetQ*, *tetX*, *vanA*, *vanB*, *vanC*, and *vanX*. In terms of all these parameters examined, these LAB have been interpreted as reliable.

Keywords: LAB, safety, virulence, antibiotic, risk

The present M.Sc. Thesis was supported by Coordinatorship of Scientific Research Projects of Burdur Mehmet Akif Ersoy University under the Project number of 0462-YL-17.

1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB), Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından uzun zaman önce Güvenli Olarak Kabul Edilen (GRAS) ve Kalifiye Emniyet Varsayım (QPS) durumlarını destekleyen fermente gıda üretiminde ve tüketiminde uzun bir güvenli kullanım geçmişine sahiptir. LAB, süt endüstrisinde ve biyoteknolojik uygulamalarda çok önemli bir yer tutmaktadır. Bu bakteriler fermente süt ürünleri üretiminde başlatıcı kültür olarak, insan ve hayvan sağlık ürünlerinde ve ayrıca hayvan yemi katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Birçok rapor geleneksel fermente gıdaların probiyotik özelliklere sahip zengin LAB kaynakları olduğunu göstermiştir (Liu vd., 2011; Favaro vd., 2014; Palomino vd., 2015). Probiyotikler; insanların veya hayvanların doğal mikroflorasına ait özellikleri geliştiren, belirli dozlarda kullanıldıkları zaman ağızda, gastrointestinal (GI) sistemde, üst solunum yollarında ya da ürogenital kanallarda yararlı etkileri ile konakçının sağlığında iyileşmeye sebep olan tek veya karışık canlı mikroorganizma kültürleridir (Colombo, 2017; Todorov vd., 2017). Probiyotikler çok uzun süreden beri özellikle süt ürünlerinde güvenli bir şekilde kullanılsalar da, günümüzde bazı probiyotiklerin güvenli olmadıkları ile ilgili farklı araştırmalar bulunmaktadır. Probiyotikler üzerine yapılan çalışmalarda güvenlik ile ilgili kısımların yeterince araştırılmadığı görülmektedir (Doron ve Snyderman, 2015).

Dünya genelinde otoriteler gıda güvenliğinin sağlanması için kısıtlamalar getirmekte ve yeni düzenlemeler yapmaktadırlar. Söz konusu kısıtlamalar ve düzenlemelere ek olarak, artan toplumsal kaygılar nedeniyle sürecin sürekli takip edilmesi, üretici ve tüketicilerin korunması gerekmektedir. Yapılan yeni araştırmalarla, yararlı kültürlerin seçiminde ve karakterizasyonunda, tüketici sağlığına olan faydalarına odaklanılarak önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Mohammadi vd., 2012). Bu bakterilerin, insan tüketiminde kullanılacak olan olumlu özelliklerinin yanı sıra, olumsuz etkiler de gösterebilme riski sebebiyle güvenilirliğinin değerlendirilmesi önemlidir. Virülans mekanizmalarından dolayı, transfer veya genetik mutasyon yoluyla bakteriler arasında geçiş meydana gelebileceği için kültürler, suşların potansiyel virülans özelliklerine göre analiz edilmelidir. Virülans çalışmaları, gıda endüstrisinde kullanılan kültürlerin güvenilirliği hakkındaki bilgileri desteklemektedir. Bakteriler tarafından kullanılan birçok patojenik mekanizma, insan konakçılarda hastalığa neden olmaktadır (Sanders vd., 2010;

van Reenen ve Dicks, 2011). Bu patojenler, konakçı hücrelere bağlanan ve böylece farklı tepkileri uyaran çok çeşitli molekülleri ifade eder. LAB'nin gıdalardan izole edilebilmesine rağmen genellikle bazı genlerin konjugatif plazmidler içinde yer alması ve genetik transfer riski nedeniyle, *Lactobacillus* spp.'nin virülans faktörlerinin biyomoleküler prosedürlerle doğrulanması gereklidir (Todorov vd., 2017).

LAB, GRAS organizmalar olarak düşünülse de, antibiyotik dirençlerini patojenik bakterilere transfer etme potansiyeli veya biyojenik aminler olarak toksik bileşikler üretme ihtimalleri bulunmaktadır. Son zamanlarda birçok araştırmacı LAB dahil olmak üzere kommensal bakterilerin insan patojenlerinde bulunanlara benzer antibiyotik direnç genleri rezervuarları olarak görev yapabileceklerini öne sürmüşlerdir. Bu bakterilerle ilişkili ana tehdit, direnç genlerini patojenik bakterilere aktarabilmeleridir. *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* ve fermente et ve süt ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus* türlerinde direnç kazanan genlerden tetrasiklin, eritromisin ve vankomisine saptanmış ve karakterize edilmiştir. Dünya çapında çeşitli kuruluşlar tarafından, başlangıç kültürlerinin ve probiyotik mikroorganizmaların biyogüvenlik kaygılarına değinmek için yakın zamanda bir dizi girişim başlatılmıştır. Yapılacak çalışmalar ile süt başlatıcı mikroorganizmalarının, antibiyotik dirençli genlerin bağırsak mikroorganizmalarına ve gıdaya bağlı patojenik bakterilere yatay transferinde oynadığı rolün daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir (Palmer vd., 2010; Davies ve Davies, 2010).

LAB ile ilgili yapılan çalışmalar, bu bakterilerin teknolojik, endüstriyel, fonksiyonel ve güvenilirlik özelliklerinin gıda endüstrisinde önemini ortaya koymaktadır. LAB'nin GRAS kabul edilmesinden dolayı güvenilirlik özellikleri ile ilgili araştırmaların yeni olduğu ve ülkemizde bu konu ile ilgili henüz az sayıda araştırmanın yapıldığı belirlenmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda LAB ile ilgili riskler henüz net değildir. Mikroorganizmaların potansiyel virülansının belirlenmesi, GRAS kabul edilen bir grup bakteri arasında bile güvenilirliğin ortaya konması için gereklidir (Araya vd., 2002). Bu nedenle LAB'nin güvenilirliği üzerine yapılan çalışmaların artırılarak, bu bilgilerin tüketicilerle paylaşılması önemlidir. LAB'nin bir hastalığın tedavisi veya önlenmesi amacıyla kullanılabilmesi için daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır.

Tamamlanan bu tezde farklı süt ve yoğurt örneklerinden daha önce izole edilmiş olan 87 adet LAB'nin biyogüvenilirlik özelliklerini belirlemek amacıyla; hemolitik, deoksiribonükleaz (DNaz) aktiviteleri, jelatinaz üretimi, amino asit dekarboksilaz üretimi, izolatların biyofilm oluşturma özellikleri, ekstraselüler proteaz üretimleri, virülans genlerden jelatinaz, hiyaluronidaz, agregasyon maddesi, enterokokal yüzey proteini,

sitolizin, endokardit antijeni, kolajen bağlayıcı protein, amino asit dekarboksilazları için; histidin dekarboksilaz ve tirozin dekarboksilaz genleri, antibiyotik direnç genleri için ise; eritromisin, gentamisin, kloramfenikol, tetrasiklin, vankomisin ile ilgili gen bölgeleri uygun primerler kullanılarak bakteriler; virülans, amino asit dekarboksilaz ve antibiyotik direnç genlerinin varlığı açısından incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. LAB ve Genel Özellikleri

Lactobacillaceae familyasına ait LAB Gram pozitif, DNA'sı %55'in altında G+C oranında, fakültatif anaerob, *Sporolactobacillus inulinus* hariç sporsuz, asit toleran türleri içeren, insanlar ve hayvanların GI sistemleri ve gıdalar gibi geniş bir ekolojik yelpazede doğal olarak bulunan, glukozu homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere iki şekilde katabolize eden heterojen bir mikroorganizma grubunu temsil eder (Mathur ve Singh, 2005; Evren vd., 2011). Bu bakteriler mutlak fermentatifler ve asil fermentasyon ürünü olarak laktik asit üretir, sitokrom içermez ve elektron taşıma sistemleri yoktur. Bu nedenle LAB'nde enerji eldesi yalnızca substrat düzeyinde fosforilasyon ile gerçekleştirilmektedir. Heterofermentatif türleri yan ürün olarak asetik asit, formik asit, etanol ve karbondioksit üretebilmektedir. Morfolojik olarak kısa veya uzun çomak veya kok şekilli gibi çok değişken özellik gösteren LAB, fizyolojik açıdan oldukça benzer özellik göstermektedirler. Katalaz negatif (düşük oranda şeker ihtiva eden ortamda pseudokatalaza sahip suşlar görülebilir), *Pediococcus* cinsi hariç tek düzlemde bölünen hareketsiz, çubuk veya kok şeklinde bakteriler olarak tanımlanmaktadır (König ve Fröhlich, 2017). Bitkisel ve hayvansal hammaddelerin fermentasyonunda endüstriyel başlatıcı kültür olarak kullanılan bu bakteriler; *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* olarak adlandırılan 14 cins içermektedir (Sağlam ve Karahan, 2017; Mokoena, 2017). *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* en yaygın türlerdir ve yaklaşık 125 tür içerir. Bu bakteriler ağırlıklı olarak mezofiliktir ve genellikle yüksek sıcaklığa dayanamazlar (De Vuyst ve Leroy, 2007; Messaoudi vd., 2013).

LAB, doğada çok yaygın bulunmaları, çeşitli gıda maddelerinde sıkça rastlanılan bozulmalara neden olmaları ve bazı gıdaların üretim ve olgunlaştırılmasında teknolojik açıdan önemli rol oynamaları nedeni ile gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadır (Alvarez-Sieiro vd., 2016). LAB, teknolojik özellikleri nedeniyle, genellikle fermente ürünler üretmek için kullanılan başlangıç/destek kültürler gıda endüstrileri için önemlidir (Lahtinen vd., 2011). LAB'nin seçilmiş kültürleri süt endüstrisi tarafından büyük ölçekte

kullanılmış ve son üründe mikrobiyolojik güvenlik, stabilite ve kalite avantajları sağlamıştır (Ringo vd., 2018). Son zamanlarda yapılan bir araştırmada, Hollanda tipi peynir ürünlerinin üretiminde heterofermentatif *Lactobacillus* spp. kullanımının, son ürünün kalitesini, güvenliğini ve raf ömrünü olumsuz yönde etkileyen teknolojik olarak zararlı mikroorganizma popülasyonlarını azalttığı tespit edilmiştir (Aljewicz ve Cichosz, 2017). LAB ile bakteriyosin ve laktik asit üretimi ile patojenik bakteriler üzerinde inhibe edici etkiye sahiptir (Coelho vd., 2014; Favaro vd., 2015). Ayrıca, LAB'nin süt ürünlerine eklenmesi, teknolojik özelliklere ve aynı zamanda fonksiyonel özelliklere katkıda bulunabilir (Favaro vd, 2014). Tüm dünyada LAB fermente et, süt, tahıl, meyve ve sebze ürünlerinin hazırlanması ve muhafaza edilmesinde kullanılmaktadır (Başyigit Kılıç vd., 2006; Can ve Çoban, 2012; Holzapfel ve Wood, 2012; Wood, 2012; Ghanbari vd., 2013). Dünyada asidik gıda fermantasyonlarının yaygınlaşması ve endüstriyel üretimin başlamasıyla, başlatıcı LAB'nin kullanımı büyük önem taşımaya başlamıştır. Başlatıcı LAB; mikrobiyal güvenliği sağlama, daha iyi organoleptik özellik gösterme, şeker polimerleri, tatlandırıcılar, aromatik bileşenler, vitaminler ve yararlı enzimler üretme gibi teknolojik anlamda faydaları ile besin değerini artırıcı ve probiyotik özellik göstermesi gibi avantajlarıyla önem taşımaktadır. Bazı araştırmacılar, çeşitli LAB'nin, patojenik mikroorganizmaların gelişmesini inhibe etme özelliklerini, mikotoksinleri bozma kabiliyetlerini, probiyotik özelliklerini ve farklı kaynaklardan LAB izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır (Todorov, 2009; Başyigit Kılıç vd., 2013; Mokoena, 2017). Bu bakterilere karşı endüstriyel ilgi, bu bakterilerin endüstriyel ve tıbbi alandaki uygulamaları her geçen gün hızla artmaktadır (Başyigit Kılıç vd., 2006; Salminen vd., 2006; De Vuyst ve Leroy, 2007; Başyigit Kılıç vd., 2009; Xiong vd., 2012; Kaya, 2013).

Birçok çalışma geleneksel fermente gıdaların probiyotik özelliklere sahip zengin LAB kaynakları olduğunu göstermiştir (Liu vd., 2011; Favaro vd., 2014; Palomino vd., 2015). *Lactococcus* spp. Avrupa Gıda Güvenliği Ajansı (2007) tarafından GRAS olarak tanınma ve QPS statüsü için uygun olma avantajına sahiptir. Gıda üretiminde önemli teknolojik özelliklerine ilave olarak, çeşitli çalışmalar LAB'nin konak için yararlı katkılar sağladığını göstermiştir (Rodríguez vd., 2017). *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* cinsleri içerisinde yer alan bakteriler mide-bağırsak florasının önemli popülasyonunu oluşturmaktadır (Başyigit Kılıç ve Karahan, 2010; Gülgör ve Özçelik, 2014). Laktobasillerin belirli üyeleri çoğunlukla probiyotik mikroorganizmalar olarak kullanılmaktadır (LeBlanc vd., 2011; Yıldırım vd., 2015).

2.2. LAB'nin Güvenilirlik Özellikleri

Gıda endüstrisinde kullanılacak bakteri kültürlerinin seçiminde güvenilirlik özelliklerinin belirlenmesi önemlidir. “Gıda güvenliği” kelimesi, gıda kontaminasyonunun kimyasaldan biyolojik etkisine kadar her yönünü kapsar (Akbar ve Anal, 2011). Gıda ürünlerinde yoğun olarak kullanılan bakteriler arasında LAB başlatıcı, koruyucu ve probiyotik kültür olarak akla gelmektedir. FAO/WHO'ya göre, ticari probiyotiklerin geliştirilmesi, taksonomik tanımlamalarının yanı sıra *in vitro* ve *in vivo* fonksiyonel karakterizasyonları ve güvenlik değerlendirmelerini gerektirmektedir. Faydalı kültürler, beslenme ve tıp alanında büyük öneme sahiptir. Bununla birlikte, bu mikroorganizmaların gıdalardan izolasyonu, karakterizasyonu, güvenliği ve uygulanması ile ilgili özel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bileşiklerin istenen yararları teşvik etmedeki etki mekanizmaları hakkında kesin çalışmalar bulunmamaktadır. Ayrıca, bu şekilde karakterize edilen faydalı kültürler, suşların potansiyel virülans özelliklerine göre analiz edilmelidir.

Probiyotik potansiyele sahip olan suşların; antibiyotik direnç modellerinin ve metabolik aktivitelerin belirlenmesi, D-laktat üretimi, safra tuzu dekonjugasyonu gibi yan etkilerinin değerlendirilmesi, bilinen bir memeli toksini üreticisi olan bir türe ait ise, toksin üretimi açısından incelenmesi, bilinen hemolitik potansiyele sahip bir türe ait ise de hemolitik aktivitesinin belirlenmesi, lesitinaz aktivitesi, toksin genleri gibi bazı olası virülans genler ve hareketli genetik elementlerin varlığı açısından farklı ortamlarda gelişiminden sonraki sitotoksik ve sitopatolojik özellikleri hücre hattında belirlenmelidir gerekmektedir (Araya vd., 2002; Huys vd., 2013). Ayrıca, probiyotiklerin güvenilirliğinin değerlendirilmesinde ele alınması gereken diğer faktörler; patojenitesi, immünolojik yan etkilerinin değerlendirilmesi ve metabolik aktivite özelliklerini içermektedir. Probiyotiklerin gıdalarda kullanılabilmesi için; bakterilerin fenotipik ve genotipik yöntemlerle cins, tür ve suş düzeyinde tanımlanması ve uluslararası kabul gören bir kültür koleksiyonuna verilmesi ilk önemli basamaktır. Kültürlerin güvenirliliği önce *in vitro* çalışmalar ve daha sonra hayvan ve insan deneyleri ile belirlenmelidir (FAO/WHO, 2002).

LAB arasında virülans dirençli türlerin belirlenmesi, gıda üretiminde dirençli genlerin patojenlere transfer edilebilmesi riskini açığa çıkarmıştır (Fraqueza, 2015; Doron ve Snyderman, 2015). EFSA'ya göre probiyotik olarak kullanılan kültürlerin birçoğu güvenilirdir ve nadiren yan etkileri bulunmaktadır. Ancak yine de probiyotik nitelikli

gıdalardaki saf kültürlerde antibiyotik direnç genlerinin varlığının izlenmesi gerektiği bildirilmiştir. Nitekim gıda zincirindeki probiyotikler ile ilgili Avrupa Birliği'nde bu ürünlerdeki transfer edilebilen direnç genlerinin elimine edilebilmesine dair aktif bir politika bulunmamaktadır (Gueimonde vd., 2013).

LAB'nin az sayıda da olsa endokardit, kan zehirlenmesi ve idrar yolları enfeksiyonlarına yatkın oldukları bildirilmiştir. Enterokokal olmayan, bazı endokardit durumlarında *L. rhamnosus*, *Lc. lactis*, *Leuconostoc* türleri ve *L. casei (paracasei)*'nin tespit edildiği belirlenmiştir. Laktobasil enfeksiyonları, sağlıklı nüfusta, yüzyılı aşkın bir sürede yaklaşık 1/10 milyon insan altında çok düşük bir oranda görülmüştür (Fraqueza, 2015).

Gasser (1994)'e göre, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. salivarius*, *L. lactis* ve *Leu. mesenteroides* bakteriyel endokarditte tespit edilmiştir. *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *Leu. mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *B. eriksonii* ve *B. adolescentis* kan dolaşımı ve birçok lokal enfeksiyonlardan izole edilmişlerdir.

Mikroorganizmalar tarafından üretilen katalaz, koagülaz, hyaluronidaz gibi enzimler hem bakterilerin biyokimyasal tanımlamalarında ayırt edici özellik olarak kullanılmakta, hem de bu bakterilerin önemli birer patojenite özelliği olarak karşımıza çıkmaktadır. Penisilinaz enzimleri penisilinin beta-laktam halkasını parçalayarak penisiline dirençliliği sağlamaktadır. LAB; DNaz, termonükleaz, hyoluronidaz, lipaz ve ekstraselüler proteaz gibi patojenite ile ilgili enzimlere de sahiptir.

Enterokoklar, düşük virülanslı mikroorganizmalar olmalarına rağmen insan kaynaklı ve hastane kaynaklı enfeksiyonlarda önemli etkenlerdir. *Enterococcus* türlerinin birden fazla insan enfeksiyonu ile ilişkisi nedeniyle güvenliği konusunda artan kaygılar bulunmaktadır (Moreno vd., 2006; Brandao vd., 2010). Carlos vd. (2010) *Enterococcus* türlerinde birçok virülans faktör ve etkilerini belirlemişlerdir. Farklı patojenitelere ek olarak, antimikrobiyal dirençli genlerin varlığına ilişkin çeşitli faktörler tehlikeli olarak bildirilmiştir (Bautista-Gallego vd., 2013). Bu tehlikeler GI sistemde gen değişimi induksiyonu, insan sağlığı ve veteriner hekimlikte, hayvan ıslahında uzun yıllardır antibiyotiklerin rastgele kullanımından kaynaklanmaktadır (van Reenen ve Dicks, 2011; Munoz vd., 2014). Bu faktörler halk sağlığı açısından önemli bir risk oluşturmaktadır. Bu sebeple, gıda zincirine giren bakterilerin yayılma direncini önlemek ve insanlar/hayvanlar için virülans riskine yol açması sebebiyle, daha fazla araştırılması gerekmektedir (van Reenen ve Dicks, 2011).

2.2.1. Hemolitik Aktivite

Hemoliz, dokulara oksijen verilmesinden sorumlu kırmızı kan hücreleri olan eritrositlerin parçalanması ve hemoglobinin ortama salınmasıdır. Bakteriyel kolonilerin hemolize neden olma kabiliyetine hemolitik aktivite denir ve hemolitik özelliklerini belirlemek için kanlı agar besiyeri kullanılır (Gülel, 2014).

LAB'nin hemolitik aktivitesinin belirlenmesi önemli bir kriterdir. Gıda endüstrisinde başlatıcı kültür olarak kullanım potansiyeli olan mikroorganizmaların, hemolize neden olmayan gama-hemolitik (γ -hemoliz) suşlar olması gerekmektedir (Maragkoudakis vd., 2006; Anas vd., 2008). LAB'de hemolitik aktivite genellikle *Streptococcaceae* familyasına ait *Streptococcus*, *Lactococcus* ve *Enterococcus* cinsi bakterilerde görülebilmektedir (Kılıç, 2004). Probiyotik seçiminde patojenik ve invaziv özellik göstermemeleri güvenli probiyotiklerin seçimi için önemlidir (Sharma vd., 2017). Mikroorganizmaların hemolitik aktiviteleri, kullanılan kan türüne, agarın kalınlığına ve aynı zamanda kültür koşullarına göre değişebilir. Hemolitik aktivite 3 şekilde gerçekleşmektedir. Bunlar α -hemoliz (alfa-hemoliz), β -hemoliz (beta-hemoliz) ve gama-hemoliz'dir. Alfa-hemoliz, hemoglobinin, bakterilerin ürettiği hidrojen peroksit ile methemoglobine oksidasyonudur. Kırmızı kan hücrelerinin hücre zarı bozulmadan kaldığından, gerçek lizis olarak kabul edilmez. Beta-hemoliz, streptolizin enziminin neden olduğu eritrositlerin tamamen parçalanması olarak tanımlanır ve bu özelliğe sahip olan türlere beta-hemoliz denir. Gama-hemoliz hiçbir hemolitik reaksiyonu ifade etmez. Kanlı agar ortamında üretildiklerinde koloni etrafında şeffaf zon oluşturanlar beta-hemolitik, koloni çevresinde tam olmayan, yeşilimsi bir hemoliz yapanlar alfa-hemolitik ve hemoliz yapmayan bakteriler gama-hemolitikdir (Gülel, 2014).

2.2.2. Jelatinaz Üretimi

Jelatinaz üretiminin tespiti bakteri identifikasyonunda önemli bir testtir. Jelatin hayvansal kollojen türevi olan bir proteindir. Jelatin jelatinaz enzimi tarafından hidrolize edilir. Bu enzimin bakteride belirlenmesi identifikasyonda kullanılan önemli testlerden biridir (Seçkin ve Dostbil, 2018).

Hücre dışı bir proteaz olan jelatinazın özellikle *E. faecalis*'in patojenitesinde rol aldığı bilinmektedir ve klinik izolatların yaklaşık %60'ı tarafından sentezlendiği tespit edilmiştir (Galloway-Pena vd., 2011). Jelatinaz biyofilm oluşumunun ilk aşamalarında gereklidir ve kollajen, fibrinojen, fibrin, endotelin-1, bradikinin, LL-37 ve tamamlayıcı

bileşenler C3 ve C3a gibi konak substratlarını hidrolize ederek virülansa katkıda bulunur (Thurlow vd., 2010; Perez vd., 2015). Enfeksiyon etkeni olan klinik izolatlar arasında *Enterococcus*'ların %45'inde farklı düzeylerde jelatinaz aktivitesi tespit edilmiştir (Birri vd., 2013).

Jelatinaz üretiminin *gelE* geni ile arasındaki ilişkiyi araştıran Zhu vd. (2010) endodontik tedavi yetersizliği olan hastaların tükürük ve kök kanallarından izole ettikleri farklı *E. faecalis* suşlarının hepsinde *gelE* geninin tespit ettiklerini, ancak *E. faecalis* suşlarının jelatin, kazein, insülin, fibrinojen ve jelatinaz enzimini üretmediğini belirtmişlerdir. Bunun sonucu olarak, *gelE* geni ile jelatinaz enzimi üretimi arasında doğrudan ilişkili olmadığı düşünülmüştür (Barbosa vd., 2010; Wang vd., 2011). *E. faecalis* yapısında *gelE* geni bulundursa bile jelatinaz üretemeyeceğini belirtmiştir (Güneşer, 2013).

2.2.3. DNaz Üretimi

Deoksiribonükleaz, deoksiribonükleik asidin (DNA) omurgasındaki fosfodiester bağının hidrolizini katalize eden bir enzim sınıfıdır. Mikroorganizmaların DNaz üretme kabiliyetine DNaz aktivitesi denir. DNazların ana rollerinden biri, hücreyi yabancı DNA'ların saldırıdan korumaktır. DNaz, test agar plak yöntemi ile veya DNaz besiyeri kullanılarak belirlenir. DNaz test agar; triptoz, DNA ve sodyum klorür içeren bir kültür ortamıdır. Triptozdan türetilen peptitler, karbon ve azot kaynakları olarak görev yapar, substrat olarak DNA ve sodyum klorür ozmotik dengeyi sağlar. Test edilecek bakteri kültürü saf bir şekilde test agarının yüzeyine çizilerek aşılanmaktadır. Çizgiler yaklaşık 2 cm uzunluğunda ve 5 mm genişliğindedir. Aşılanan plakalar, 48 saat boyunca 37°C'de inkübe edilir ve daha sonra besiyeri üzerine 1N HCl ile damlatılır. DNaz test agarındaki DNA hedef mikroorganizma tarafından hidrolize edilmezse, asit ilavesiyle çökelir ve opak bölgeler oluşturur. Öte yandan, eğer DNA hidrolize edilirse, asit oligonükleotitleri çözer ve kolonilerin etrafında şeffaf bölgeler meydana gelir (Gülel, 2014).

Ekstraselüler DNaz, DNA hidrolizi ile nükleotidlerin miktarını artırarak patojenlere gelişme avantajı sağlar ve iltihabın sınıvlaştırılmasıyla patojenlerin yayılmasına yardım eder. DNaz nötrofil hücre dışı etkileri parçalayarak doğuştan gelen immün tepkinin bozulmasına neden olmaktadır (Hasegawa vd., 2010). Bu enzimi üreten probiyotik bir mikroorganizmanın herhangi bir ilaç ve gıda/yem endüstrisinde probiyotik olarak kullanılamayacağı ifade edilmiştir (Syal ve Vohra, 2013). Caso ve Suarez (1997) *L. plantarum* için DNaz aktivitesinin varlığını bildirmişlerdir.

2.2.4. Biyofilm Oluşumu

Biyofilm; biyolojik bir oluşumdur ve değişime uğramış, yüzeye ya da birbirine tutunarak, matriks ya da hücre dışı polimerik madde (EPS) içine gömülmüş olan planktonik hücrelerden; çoğalma, genetik yapı ve protein sentezi açısından tamamen değişik yapıda olan mikroorganizmalardan oluşmaktadır (Kankaya vd., 2017). Biyofilm üretimini bakterilerin yapıştıkları yüzeydeki besin elementleri, pH ve sıcaklık gibi ortam koşulları etkilemektedir. Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan EPS'nin ana bileşeni polisakkarittir ve yüksek seviyede su içermekle birlikte yapısında hidrofobik ya da hidrofilik kısımlar bulunmaktadır (Demir vd., 2017).

Biyofilmler, gıda ürünlerinin patojenite ve bozulma mikroorganizmaları ile potansiyel kontaminasyonlara sebep oldukları için gıda endüstrisinde bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Biyotik veya abiyotik yüzeylerde bakteri rezervuarı haline gelerek biyofilmler oluşabilmektedir. Biyofilmler, mikroorganizmaların temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerine karşı direnç kazanmasına sebep olurlar. Örneğin, ekipmanın biyofilm ile kontaminasyonu, Fransa'da araştırılan gıda kaynaklı hastalıkların %59'una sebep olan bir faktör olmuştur (Midelet ve Carpentier, 2004).

Bazı LAB türlerinde biyofilm oluşumu bildirilmiştir ve birçok çalışma yapılaşma veya biyofilm oluşumundan sorumlu genleri tanımlamıştır (Lebeer vd., 2007). Landeta vd. (2013)'nin çalışmasında, *L. sakei* suşlarının %43'ü biyofilm oluşumu göstermiştir.

Gıda zincirinde dirençli patojen bakterilerin ortaya çıkması dezenfeksiyon için çeşitli alternatiflerin araştırılması fikrini güçlendirmektedir. Özellikle gıda endüstrisinde, yüzeyler ve ekipmanlarla ilişkili patojenlerin kalıcılığını kontrol etmek amacıyla doğal ürünlerin kullanılabilmesi için yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, gıdalarda, tarım ürünlerinde veya memelilerin GI sistemlerinde bulunan ve gıda üretiminde başlatıcı kültür olarak kullanılan LAB tarafından oluşturulan biyofilmler, patojenik biyofilm oluşumunun inhibe edilebilmesi için oldukça önemlidir (Winkelströter vd., 2013).

Biyofilm oluşumunun kontrol altına alınabilmesi için, rekabetçi dışlama ilkesine dayanarak diğer bakteri türlerinin çoğalmasını önlemek için sert yüzeylerde koloni oluşturmak amacıyla probiyotiklerin kullanılmasıdır (Falagas ve Makris, 2009; Hibbing vd., 2010). Bu ilke kullanılarak LAB, yemeye hazır kümes hayvanı işleme tesisindeki *Listeria monocytogenes* suşunu başarıyla azaltmış ve biyofilm oluşturma özelliğine sahip laktobasiller, *L. monocytogenes*'i abiyotik yüzeylerde kontrol edilebilmiştir (Zhao vd.,

2013; Perez-Ibarreche vd., 2014). Çeşitli çalışmalar, bakteriyosin üreten LAB'nin, biyositlerin bakteriyel biyofilmler üzerindeki bakterisit etkisini arttırdığını göstermiştir (Lobos vd., 2009; Gomez vd., 2012).

Biyofilm oluşumunun inhibisyonu ve biyofilmlere gömülü hücrelerin öldürülmesi için bakteriyosinlerin veya bunların üretici suşlarının uygulanması yeni bir araştırma alanıdır. Gomez vd. (2016) farklı fermente Brezilya ürünlerinden izole edilen bakteriyosinogenik *L. lactis* VB69, *L. lactis* VB94, *L. sakei* MBSa1, *L. curvatus* MBSa3 ve bakteriyosinogenik olmayan *L. lactis* 368, *L. helveticus* 354, *L. casei* 40, *Weissella viridescens* 113'ün potansiyel probiyotik özelliklerini ve bunların *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ve *S. Typhimurium*'un biyofilm oluşumuna karşı inhibe edici etkilerini değerlendirmişler ve probiyotik bakterilerin biyofilm üretiminde kullanımı, gıda endüstrisinde patojenik biyofilm oluşumunu azaltmak için alternatif bir yaklaşım olabileceğini belirtmişlerdir.

Yapılan çoğu çalışma ile *esp*⁺ izolatların biyofilm oluşturduğu, *esp*⁻ izolatlarda ise biyofilm oluşumunun gözlenmediği tespit edilmiştir (Anderson vd., 2016; Rahimi vd., 2018).

2.2.5. Proteolitik Enzim Aktivitesi

Proteazlar konağa ait savunma mekanizmalarını bozarak dokulara yayılmada rol oynarlar. Proteazlar konak proteinlerini yıkarak, yaygın doku tahribatına neden olurlar. Proteaz salınımı, mikrobiyal üreme için gerekli besinlerin oluşumunu sağlar ve stafilokok enfeksiyonlarının daha şiddetli olmasına sebep olur (Sharma vd., 2015).

Mitokondriyal iç zar proteazları, elektron taşıma zinciri aktivitesi, mitokondriyal iç zar proteostazı bakımı ve mitokondriyal dinamikleri içeren temel işlevleri düzenler (Anand vd., 2013; Quiros vd., 2015). Bu proteazların aktivitesindeki dengesizlikler patolojik mitokondriyal fonksiyonlarında bozulmalara neden olabilir ve birçok hastalığın başlangıcında ve patolojisinde rol oynar (Rugarli ve Langer, 2012). Dolayısıyla, mitokondriyal iç zar proteazları, mitokondriyal proteolitik aktiviteyi spesifik hücresel taleplere ve çevresel zorluklara uyarlamak için düzenlenmelidir (Rainbolt vd., 2016).

Farklı laktobasil türlerinde bulunan proteolitik enzimler, farklı proteaz aktivitelerini ve doğada, hücre lokasyonunda farklılık gösterebilen karmaşık endopeptidaz ve ekzopeptidazlar sistemini ortaya koymuştur (Stamatova vd., 2007).

2.2.6. Aminoasit Dekarboksilaz Aktivitesi

Biyojen aminler gıdalardaki aminoasitlerin, bazı mikroorganizmaların dekarboksilaz enzimleri ile dekarboksilasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Amino asit dekarboksilasyon, gıdalardaki aminlerin en yaygın sentezlenme şeklidir ve aromatik aminler, gıdaları zehirli hale getirebilir (Doğu ve Sarıçoban, 2015; Erdem vd., 2017).

Biyojen aminler alerjik ve karsinojenik etkiye sahip olmaları ve gıdalarda kalite indikatörü olarak kullanılmaları sebebiyle önemlidir. Biyojen aminler proteince zengin ve fermente gıda maddelerinin üretimi, işlenmesi ve depolanması sırasında oluşabilen ve gıdalarla çok fazla miktarlarda alınıp çok yüksek konsantrasyonlarda absorbe edilirse baş ağrısı, baş dönmesi ve bir dizi alerjik reaksiyona sebep olurlar (Ladero vd., 2010; Collins vd., 2011; Poveda vd., 2015; Işık, 2015). Biyojen aminler kalite indikatörü olarak da kullanıldıklarından, yüksek düzeyde biyojen amin içeren gıda ürünleri düşük kaliteli olarak tanımlanır (Stadnik ve Dolatowski, 2010).

En sık gıda kaynaklı intoksikasyona neden olan biyojen amin histamindir. Gıdalardaki histaminin sınır değeri 10-100 mg/kg gıda olarak belirlenmiştir. Bu sınır şarap için 2-10 mg/L olarak ifade edilmiştir. Ton balığı için 50 mg/kg histaminin toksik seviye olduğu FDA tarafından bildirilmiştir. Bu sınır Avrupa Birliği yönetmeliğinde 100 mg/kg'dır ve Almanya'da balık ve balık ürünleri için 200 mg/kg olarak belirlenmiştir (Özdestan ve Üren, 2012; Düz ve Fidan, 2016). Ülkemizde balıkta belirlenen yasal histamin miktarı taze ve soğutulmuş balıklar için 100 mg/kg, dondurulmuş balıklar için 100 mg/kg, işlenmiş balıklar için 200 mg/kg ve konserve balıklar için 100 mg/kg olarak sınırlandırılmıştır (Özdestan ve Üren, 2012). 5-10 mg histaminin alımı bazı hassas kişiler için riskli kabul edilirken, 10 mg alım ise tolere edilebilir limit, 100 mg alım toksik ve 1000 mg alım ise aşırı toksik olarak kabul edilmektedir (Parente vd., 2001; Doğu ve Sarıçoban, 2015).

Mikroorganizmaların gelişimini etkileyen sıcaklık, pH, su aktivitesi gibi faktörler mikrobiyal gelişimle ilişkili biyojen amin oluşumunda etkilemektedir (Zaman vd., 2009). Biyojen amin oluşumu ortamın pH'sını yükselterek mikroorganizmayı asidik ortam etkisinden korumaktadır. Birçok araştırmacı, farklı bakteri suşlarının biyojen amin ürettiğini ortaya koymuştur. Aminoasit dekarboksilaz, mikroorganizmalarda çoğunlukla bulunmasına rağmen, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ve *Streptococcus* gibi LAB ile, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*,

Photobacterium gibi türlerin, çeşitli gıdalarda yüksek oranda biyojen amin ürettiğini kanıtlayan pek çok çalışma mevcuttur (Galgano vd., 2009; Doğu ve Sarıçoban, 2015). Biyojenik aminler, belirli LAB suşları tarafından üretilebildiği için, potansiyel probiyotik özelliklere sahip olan suşlardaki dekarboksilaz aktivitesini karakterize etmek önemlidir (da Silva Ferrari vd., 2016). Biyojen amin pozitif LAB, başlatıcı kültürün veya ilave kültürün bir parçası olabilir. Bu nedenle başlatıcı kültür olarak kullanılacak suşların biyojen amin üretme yeteneği olmayan suşlardan seçilmesi güvenli üretim açısından oldukça önemlidir (Papageorgiou vd., 2017). *L. curvatus* ve *L. buchneri* suşları histidin dekarboksilaz pozitif olarak tanımlanırken, *Lc. lactis* ve *L. brevis* ise tiramin üreticisi türler olarak belirlenmiştir (Fernandez vd., 2007). Farklı peynir türlerinde mikrobiyel dekarboksilasyon ile oluşan biyojen amin varlığını tespit etmek amacıyla yapılan çalışmalarda, en yaygın olarak bulunan biyojen aminin kadaverin olduğu bildirilmektedir (Restuccia vd., 2011; Mayr ve Schieberle, 2012; Palermo vd., 2013). Türkiye’de otlu peynir örneklerinde yapılan çalışmada 1844,5 mg/kg ile oldukça yüksek bir oranda kadaverin konsantrasyonu tespit edilmiştir. Tiramin alımının etkileri, bu biyojen aminin çok yüksek konsantrasyonlara ulaşabildiği peynir tüketimi ile ilişkili olduğu için "peynir reaksiyonu" olarak bilinmektedir. 125 mg/kg'dan fazla tiramin alımının sağlıklı bireylerde olumsuz etkilere yol açtığı saptanmıştır (Andiç vd., 2010). 7 farklı cins Avusturya peynirinde ise, 2-748,2 mg/kg düzeylerinde kadaverin olduğu bildirilmiştir (Mayr ve Schieberle, 2012).

2.2.7. LAB'nin Virülans ve Amino Asit Dekarboksilaz Gen Profilleri

Mikroorganizmaların hastalık yapıcı etkisini arttıran efektör moleküller virülans faktörler olarak isimlendirilmektedir. Plazmitler çoğunlukla bakterinin metabolik aktivitesi için gerekli enzimleri kodlayan genleri taşırlar. Ancak bazı türler bu genlerin yanı sıra çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştirmeyi sağlayan genleri taşıyan plazmitleri de içerirler. Bu bakteriler çeşitli gıda ürünlerinde değişik amaçlar için kullanıldığında potansiyel direnç taşıyıcı ve aktarıcı olarak iş görebilirler (Gögebakan, 2003).

Sitolizin enfeksiyon modellerinde bakteri virülansına katkı sağlayan ekstraselüler ürünün üretimine yol açar (Koch vd., 2004; Clewell, 2007). Sitolizinler *cylR1*, *cylR2*, *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA* ve *cylI* olarak tanımlanan sekiz genin kontrolünde üretilirler (Lu vd., 2015). Sitolizin diğer Gram pozitif bakteriler üzerinde bakterisidal etkiye sahipken, insanlarda beta-hemolitik özellik göstermektedir. Hemolizine daha çok,

hem ökaryotik hem de prokaryotik hücreleri içeren geniş hedef hücre aralığının sitolizi nedeni olmaktadır. Günümüze kadar sitolizin hala enterokoklarda en çok çalışılan virülans özelliklerinden biridir (Perin vd., 2014; Mete vd., 2017). Sitolizin üretiminin, insanlarda olduğu kadar hayvan modellerinde enterokokal hastalığın şiddetine katkıda bulunduğu dair çalışmalar vardır (Celebi vd., 2010). Bu çalışmalar, enfeksiyon bölgelerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarının %60'ının sitolizin ürettiğini göstermiştir. Sitolizin fare modelinde %50 ölümcül dozunu düşürdüğü ve deneysel endokardit ve endoftalmiste toksisiteye katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Beken vd., 2013; Harima-Mizusawa vd., 2014).

Hiyalüronidaz virülans geni kromozomal *hyl* geni üzerinde kodlanmıştır. Hiyalüronik asit üzerine etkili yıkıcı bir enzim olan hiyalüronidaz doku hasarına neden olmaktadır. Hiyalüronidaz dokulardaki mukopolisakkaritleri parçalayarak enterokokların ve toksinlerinin konak hücrede yayılmasını kolaylaştırmaktadır (Kayaoglu ve Ørstavik, 2004; Kankaya vd., 2017).

esp geni tarafından kodlanan hücre dışı yüzey proteini (*esp*), hücre duvarı ile ilişkili bir proteindir. *esp* geni, bakteriyemi, endokarditis ve üriner sistem enfeksiyonları ile ilişkili enterokoklarda yüksek oranda bulunmaktadır (Poeta vd., 2006).

asal virülans geni sistemik enfeksiyonların gelişmesini kolaylaştıran bakterilerin ökaryot yüzeylere bağlanmasına izin veren bir virülans faktörüdür (Sava vd., 2010). *asal* tarafından kodlanan kolajen protein adezinin, ökaryotik hücrelere yapışma, plazmid konjugasyonu ve biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001; Chuang-Smith vd., 2010). Konak dokuya bağlılık, dokuya yayılmaya katkıda bulunmasından ötürü virülans özelliği olarak kabul edilse de, GI sistemin kolonizasyonu, dokulara bağlanabilme özelliğine de bağlıdır. Ek olarak, biyofilm oluşturuvcu bakteriler her zaman istenmeyen mikroorganizmalar değildir ve bazı araştırmacılar gıda bozulmalarını ve kontaminasyonu önlemek için yararlı LAB tarafından oluşturulan koruyucu biyofilmlerin kullanımını bildirmişlerdir (Aoudia vd., 2016).

Jelatin, kollajen ve hemoglobini hidrolize eden hücre dışı bir çinko endopeptidazını kodlayan *gelE* geni kromozomal DNA üzerinde kodludur ve hücre yoğunluğuna bağlı olarak regüle edilmektedir (Fisher ve Phillips, 2009). Kromozomal gen *gelE*, hayvan modellerinde endokardit ciddiyetinin artması ile ilişkili olan kolajen, jelatin ve küçük peptitleri hidrolize eden bir ekstraselüler endopeptidaz olan jelatinazın üretimini kodlar (Vankerckhoven vd., 2004). Bununla birlikte, jelatinaz proteolitik aktiviteye katkıda bulunabilir. Ayrıca, *gelE* geni sıklıkla süt ve et ürünlerinden izole

edilen proteolitik suşlarda bulunur (Lopes vd., 2006; Ahmadova vd., 2011). *Enterococcus* spp. suşlarında virülans genlerinin kontrol edilmesi kritiktir çünkü *Enterococcus* türlerinin ekstrakromozomal elementleri elde etmek, biriktirmek ve paylaşmak için doğal bir yeteneğe sahip oldukları iyi bilinmektedir (Vankerckhoven vd., 2004; Ahmadova vd., 2011; van Tyne ve Gilmore, 2014; Anderson vd., 2016).

Ruiz-Moyano vd. (2009) *E. faecium* suşlarında *efaA* geninin varlığını bildirirken, başka bir enterokokal adezinlerin (*esp* ve *ace*) belirleyicileri herhangi bir suşta tespit edilememiştir. Yiyeceklerden izole edilen *E. faecium*'da birkaç virülans geninin yokluğu Fisher ve Phillips (2009) tarafından da tanımlanmıştır. Araştırmacılar, *agg*'i kodlayan genin *E. faecium* izolatlarında bulunmadığını ve *esp* geninin süt izolatlarında tespit edilmediğini, ancak klinik izolatlarda mevcut olduğunu ve *esp* geninin patojenitesi ile ilişkili olabileceğini belirtmiştir. *cytA* geninde, aynı yazarlar, *E. faecium* suşunu klinik izolatlarda (%33), gıda izolatlarında %6'ya kıyasla daha yüksek bir insidans bildirilmiştir (Fisher ve Phillips., 2009).

Biyojen amin üretimi genel olarak suşa özgü bir özelliktir (Ladero vd., 2010). Biyojen amin üretimi için histidin dekarboksilaz (*hdc*), tirozin dekarboksilaz (*tdc*), lizin dekarboksilaz (*ldc*) ve ornitin dekarboksilaz (*odc*) genleri farklı bakteri suşlarında tespit edilmiştir. Biyojen amin üretimi için gerekli genler bazı durumlarda plazmit üzerinde kodlanırken, bazı durumlarda yatay gen transferi ile de kazanılmış olabilmektedir. Fadhlaoui-Zid vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada dondurulmuş sardalya ve uskumrudan izole edilen *E. durans* suşlarının tiramin üreticisi olup, *tdc* genine sahip oldukları belirtilmiştir.

2.2.8. LAB'nin Antibiyotik Direnç Profilleri

LAB, patojenik aktivite göstermemeli, antibiyotik direnci kodlayan genleri bulunmamalı ve hücrel genlerin bütünlüğü sağlanmalıdır. LAB'nin antibiyotik dirençleriyle ilgili yapılan çalışmaların çoğu, gıda mikroorganizmaları arasında farklı bir yere sahip olan *Enterococcus* cinsinin üyeleri üzerine yoğunlaşmıştır (Clementi ve Aquilanti, 2011).

LAB'nin antimikrobiyallere duyarlılıkları kadar direnç genlerini bulundurmaları ve bu genleri aktarmaları incelenen izolat ve antimikrobiyale göre değişmektedir (Ouoba vd., 2008). Fermente gıdalar tüketildiğinde, insan vücuduna oldukça fazla miktarda canlı bakteri girmektedir. Bu durumda bu bakteriler kommensal yada patojen bakterilere taşınabilir, antibiyotik direncini aktarabilirler (Hummel vd., 2007a). Antibiyotikler

yemlerde, ziraat ve veteriner uygulamalarında yanlış ve aşırı kullanımından dolayı daha zararlı bir hale gelmiştir (Nawaz vd., 2011). Gıda bakterilerinin antibiyotik direnç genlerinin kaynağı olarak rol oynayabileceği ile ilgili bazı görüşler ileri sürülmüştür (Fraqueza, 2015).

Lactobacillus, *Pediococci*, *Leuconostoc* ve bazı diğer Gram pozitif bakteriler doğal olarak vankomisine yüksek direnç göstermektedir (Hamilton-Miller ve Shah, 1998). Genetik kaynaklı direnç; kromozomal (kendiliğinden oluşan mutasyonlar) veya kromozom dışı elemanlara (plazmid, transpozon ve integron gibi genetik elemanlar) bağlı olabilir. Plazmitler bakterilerde antibiyotik uygulamasından önce de var olan ve kromozomdan bağımsız olarak replike olabilen ekstrakromozomal DNA parçacıklarıdır (Shao vd., 2015). LAB'nin antibiyotik duyarlılığının değerlendirilmesi, plazmidlerin ve transpozonların dahil olduğu yatay gen transferi ile direnci yayma potansiyelleri nedeniyle önemlilerdir. Bu hareketli öğeler, genetik materyalin tür içi ve türler arası transferinden çoğunlukla sorumlu antibiyotik genlerini içerir (van Reenen ve Dicks, 2011; Gueimonde vd., 2013). Fermente ürünlerde ve GI sistemde çok sayıda LAB, mutasyon yoluyla farklı direnç mekanizmalarının varlığını desteklemektedir. Kazanılmış direnç ana hücreden yavru hücreye aktarılabildiği gibi farklı türdeki bakteriler arasında da gerçekleşebilir (Madhavan ve Sowmiya, 2011). Çapraz direnç kromozomal veya ekstrakromozomal orjinli olabilir (Demir vd., 2018). Bu mekanizmalar spesifik bakteri türleri arasında antibiyotiğin doğasına, konaktaki hedef bölgeye, bakteri türüne ve plazmit yada kromozomal mutasyonla ilişkili olup olmadığına bağlı olarak etki gösterirler (Sharma vd., 2014). Bakterilerde direnç mekanizmasının oluşması antibiyotiğin hedefi olan molekülün değişiminden, hücre duvarı geçirgenliğinin azalmasından, antibiyotiğin enzimatik yıkımından ve değişik metabolik yolların gelişmesinden ortaya çıkar. Yemlerde ve gıdalarda en yaygın şekilde bulunan/eklenen LAB türleri için mikrobiyolojik antibiyotik sınır değerlerinin dikkatli bir şekilde saptanması gerektiği belirtilmiştir (Clementi ve Aquilanti, 2011). LAB'den oluşan geniş çaplı kültür koleksiyonlarında, çok çeşitli antibiyotiklerle yapılan "sınır değer" taramaları gıda güvenlik kriterleri açısından önem arz etmektedir. Bu sınır değerlerinin açıkça tanımlanması gerekmektedir. Doğal ve kazanılmış direnç arasındaki ayrım da önemlidir ki, bu durum farklı kaynaklardan izole edilen pek çok LAB ve bifidobakteri türlerindeki antimikrobiyal direnç örneklerinin karşılaştırılmasını gerektirir. Antibiyotik sınır değerleri bakteri suşlarındaki kazanılmış ve aktarılma riski taşıyan direncin tanımlanmasında önemlidir (Mathur ve Singh, 2005; Ammor vd., 2007).

Gıdaların üretiminde başlatıcı kültür olarak kullanılan bakterilerin, muhtemel antibiyotik direnç genleri taşıdığı düşünülmüştür (Danielsen ve Wind, 2003). Başlatıcı ve probiyotik özellikleri ile gıda sanayide büyük öneme sahip olan LAB'nin, direnç genlerini taşımaları ilk aşamada istenilen bir özellik gibi değerlendirilse de, bu genlerin diğer LAB'ne ve patojenlere aktarılabilirdiği yapılan çalışmalar ile ispatlanmıştır (Courvalin, 2006). Fermente gıda ürünlerinin hazırlanmasında kullanılan çeşitli başlatıcı kültürler yardımıyla insan vücuduna çok sayıda direnç genlerinin taşınması mümkün görülmektedir (Jose vd., 2015). İlk defa 1998 yılında, çevreden, insanlardan, gıda üretimi ve tarımsal süreçlerden patojenik olmayan antibiyotiğe dirençli bakterilerin seçilmesi ve yayılmasının engellenmesi ile ilgili çalışmaların desteklenmesi amacıyla Antibiyotik Direnç Ağı (Reservoirs of Antibiotic Resistance) projesi [<http://www.apua.org>] oluşturulmuştur (Mathur ve Singh, 2005).

Leuconostoc spp., *Micrococcus* spp. ve bir çok *Lactobacillus* türü vankomisine doğal olarak dirençlidir (Mathur ve Singh, 2005). *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* türlerinin, doğal olarak yüksek düzeyde vankomisin direncine sahip oldukları bildirilmiştir (Çelik vd., 2016). *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinslerine özgü vankomisin direnci bunların peptidoglukan yapısında D-Ala-D-Ala peptidi yerine D-Ala-D-Laktat bulunmasından dolayıdır. Bu tür direnç pekçok LAB türüne özgüdür (DeLisle ve Perl, 2003). LAB'nin çoğu durumda antibiyotik direnci genellikle aktarılabilir türde değildir. Aktarılamaz antibiyotik dirençleri olan *Lactobacillus* suşları genellikle bir güvenlik endişesi oluşturmazlar.

Çeşitli antibiyotiklere karşı direnç şekli, kromozomal veya ekstra kromozomal kaynaklı olabilmektedir. *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp. ve *Lactobacillus* spp. türlerinin sefoksitine yüksek dirençlilik gösterdikleri belirlenmiştir. Yapılan birçok çalışma eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve vankomisine dirençli *Lactobacillus* türlerinin, peynir, yoğurt, fermente içecekler gibi farklı süt ürünlerinde ve et ürünlerinde bulunduğunu göstermiştir (Hummel vd., 2007b; Ammor vd., 2008a; Comunian vd., 2010; Devirgilis vd., 2011).

LAB'de potansiyel olarak taşınabilir genler tanımlanmış ve bu bakterilerde en sık bulunan iki direnç geni; *tetM* ve *ermB* olarak tespit edilmiştir. Bu direnç sırasını *cat* genleri takip eder (Çataloluk ve Göğebakan, 2004). Tetrasiklin genleri, gıda hayvanı ve gıda kaynaklı antibiyotiğe dirençli enterokoklar arasında yaygındır (Ahmadova vd., 2011). Stine vd. (2007) bir hayvan besleme tesisinden domuz ortamları örnekleyerek yüksek *tetM* (%85) ve *tetS* (%50) oluşumu bildirmişlerdir. *tetM* geni tetrasiklin

direncinde ribozomal korumadan sorumlu ve laktobasillerde yaygın iken, *tetL* geni efflux pompası ile ilgilidir. *tetL* geni plazmidde (pLS55) kodlanır ve bir *L. sakei* suşunda (Ammor vd., 2008b) ve ayrı bir çalışmada *L. salivarius*, *L. fermentum* ve *L. plantarum* suşlarında saptanmıştır (Thumu ve Halami, 2012).

Tannock (1987), Igimi (1996), Hugas vd. (2003) ve Ouoba vd. (2008) gibi araştırmacıların yaptıkları çalışmalar, antibiyotik dirençlilik faktörlerinin gıdalarda bulunabilen bakterilerden, *Enterococcus* gibi potansiyel patojenik türlere aktarılabildiğini göstermektedir (Korhonen, 2010). Önemli bir diğer nokta ise, bağırsakta bulunan bakterilerin bağırsaktan geçen bakterilerle etkileşime girip, onlara taşınabilir antibiyotik direnç genlerini aktarabilmeleridir (Pan vd., 2011; Sharma vd., 2014).

LAB'nin antibiyotik direnci ile ilgili yapılan son çalışmalara göre antibiyotik direnç genlerini araştırmak için mikroarraylerin ya da Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) temelli tekniklerin dirençli LAB suşlarını tanılamakta oldukça güçlü araçlar olduğu ortaya konulmuştur (Clementi ve Aquilanti, 2011).

Bilimsel yayınlarda, gıda ve yem mikroorganizmalarının antibiyotik direnciyle ilgili pek çok yeni verinin ortaya çıkması için Avrupa'daki farklı kurumlar tarafından sürekli revize edilen raporların ortaya konması gerekmektedir. İnsan sağlığı ve veteriner tıp alanında kullanılan antibiyotiklere dirençli bakterilerin güvenliğini değerlendirmek için Hayvan Beslenme Bilim Kurulu (Scientific Committee on Animal Nutrition, SCAN) tarafından 2001 yılında çeşitli kriterler oluşturulmuş ve 2003 yılında revize edilmiştir. Bu kriterler 2005 ve 2007 yıllarında EFSA tarafından düzenlenen Hayvan Beslemede Kullanılan Ürünler ve Katkı Maddeleri (FEEDAP) panelinde iki kez güncellenmiştir (EFSA, 2005; EFSA, 2007).

Antibiyotik direnci ile ilgili çalışmalar incelendiğinde, *L. sakei* gibi kuru fermente sosislerden izole edilen baskın türlerin, %12-70'lik tetrasiklin direncine sahipken, *L. plantarum*'un %75-80'lik sıklık gösterdiği belirtilmiştir (Landeta vd., 2013; Federici vd., 2014; Fraqueza, 2015).

Zonenschain vd. (2009)'nin yaptıkları çalışmada, kuru fermente sosislerden elde edilen LAB izolatlarında saptanan en yaygın direnç genlerini, tetrasiklin *tetM*, *tetW*, *tetS* genleri ile eritromisin direnci için *ermB* ve *ermC* olarak belirtmişlerdir. *L. sakei* için, tetrasikline dirençli fermente sosislerden izole edilen *L. alimentarius* ve *L. plantarum* suşlarının, bir plazmid içinde konumlanıp ve bir *tetM* genini barındırdığı belirtilmiştir (Fraqueza, 2015).

Kuru fermente sosislerden elde edilen LAB'nin kloramfenikole direnci hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (Aymerich vd., 2006). Bununla birlikte, Hummel vd. (2007b) kloramfenikol asetiltransferazı kodlayan *cat* geninin, kuru fermente sosislerden *Lactobacillus*'da eksprese olmadığı bildirmişlerdir. Aksine, bu gen farklı gıdalardan izole edilen *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. johnsonii* ve *L. plantarum*'da tespit edilmiştir (Hummel vd., 2007a; Mayrhofer vd., 2011). Özellikle, bazı *E. faecalis* suşlarında *ermB*, *aac(69)-Ie-aph(299)*, *tetM* ve *vanA* genleri tespit edilmiştir (Ribeiro vd., 2009).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2014 yılında antimikrobiyal direncin küresel gözetimine ilişkin raporunda, özellikle gıda üretiminde kullanılan hayvanlarda uygulanan antimikrobiyal ilaçların kullanımının bilinçsiz bir şekilde artmasıyla, patojenlerde direncin ortaya çıkması arasında bir bağlantı kurmuştur. Bu durumun hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların tedavisi için bir risk oluşturduğu, insan sağlığı açısından önemi bir sorun haline geldiği belirtilmiştir (Fraqueza, 2015).

Avrupa Birliği'nde, 2006 yılında hayvanlarda büyümenin teşviki için antibiyotik kullanımı yasaklanmıştır (Cantas vd., 2013). Birçok ülke antimikrobiyal kullanım için zorunlu kısıtlamaları benimsemiştir ve bu ilaçları gıda hayvanlarında kullanabilmek için veteriner reçetesi zorunluluğu getirilmiştir (Maron vd., 2013; Fico seco vd., 2018).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan LAB

Tamamlanan projede, MAKÜ-0294-YL-16 numaralı proje kapsamında bazı teknolojik özellikleri belirlenmiş olan peynir ve yoğurt örneklerinden izole edilmiş olan 40 *L. bulgaricus*, 30 *L. fermentum*, 5 *L. rhamnosus*, 5 *L. lactis*, 2'şer adet *E. faecium*, *L. paracasei* ve 1'er adet, *L. plantarum*, *P. acidilactici*, *L. casei* toplam 87 adet LAB'nin (Tablo 3.1) araştırılmamış olan güvenilirlik özellikleri ayrıntılı olarak araştırılmıştır.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan 87 LAB izolatının sekans kodları ve cins tür isimleri

Sıra	Örnek Adı	Bakteri Cins Tür	Sıra	Örnek Adı	Bakteri Cins Tür
1	PLa2B	<i>L. bulgaricus</i>	45	PLc27B	<i>L. fermentum</i>
2	PLa4A	<i>L. bulgaricus</i>	46	PLc27B(A)	<i>L. fermentum</i>
3	PLa18B	<i>L. bulgaricus</i>	47	PLc27E	<i>L. fermentum</i>
4	PLa19E	<i>L. bulgaricus</i>	48	PLc31A	<i>L. fermentum</i>
5	PLa23B	<i>L. bulgaricus</i>	49	PLc35A	<i>L. fermentum</i>
6	PLa24B	<i>L. bulgaricus</i>	50	PLc38D	<i>L. fermentum</i>
7	PLa27C	<i>L. bulgaricus</i>	51	PLr1D	<i>L. fermentum</i>
8	PLa29B	<i>L. bulgaricus</i>	52	PLr2B	<i>L. fermentum</i>
9	PLa31D	<i>L. bulgaricus</i>	53	YLa13B	<i>L. fermentum</i>
10	PLa36C	<i>L. bulgaricus</i>	54	YLa16C	<i>L. fermentum</i>
11	PLb10A2	<i>L. bulgaricus</i>	55	YLa18B	<i>L. fermentum</i>
12	PLb19A	<i>L. bulgaricus</i>	56	YLa22A	<i>L. fermentum</i>
13	PLc3A	<i>L. bulgaricus</i>	57	YLa22B	<i>L. fermentum</i>
14	PLc10A	<i>L. bulgaricus</i>	58	YLa27A	<i>L. fermentum</i>
15	PLc29A	<i>L. bulgaricus</i>	59	YLa37B	<i>L. fermentum</i>
16	PLj1C(A)	<i>L. bulgaricus</i>	60	YLc12A	<i>L. fermentum</i>
17	PLj23B	<i>L. bulgaricus</i>	61	YLc12B	<i>L. fermentum</i>
18	PLj27B	<i>L. bulgaricus</i>	62	YLc20A	<i>L. fermentum</i>

Sıra	Örnek Adı	Bakteri Cins Tür	Sıra	Örnek Adı	Bakteri Cins Tür
19	PLj29E(B)	<i>L. bulgaricus</i>	63	YLc23B	<i>L. fermentum</i>
20	PLj35A	<i>L. bulgaricus</i>	64	YLc24C	<i>L. fermentum</i>
21	PLj35B(A)	<i>L. bulgaricus</i>	65	YLc35B	<i>L. fermentum</i>
22	PLr3C	<i>L. bulgaricus</i>	66	YLc37C	<i>L. fermentum</i>
23	PLr27A	<i>L. bulgaricus</i>	67	YLc4A	<i>L. fermentum</i>
24	PLr31A	<i>L. bulgaricus</i>	68	YLr12A	<i>L. fermentum</i>
25	PLr42B1	<i>L. bulgaricus</i>	69	YLr15A	<i>L. fermentum</i>
26	PLr46B	<i>L. bulgaricus</i>	70	YLr16A	<i>L. fermentum</i>
27	YLa12B	<i>L. bulgaricus</i>	71	PLc36A(A)	<i>L. rhamnosus</i>
28	YLa27B	<i>L. bulgaricus</i>	72	PLc23B(A)	<i>L. rhamnosus</i>
29	YLa27C	<i>L. bulgaricus</i>	73	PLj6B	<i>L. rhamnosus</i>
30	YLa31A	<i>L. bulgaricus</i>	74	PLj6B1	<i>L. rhamnosus</i>
31	YLj15C(A)	<i>L. bulgaricus</i>	75	PLj14A	<i>L. rhamnosus</i>
32	YLj21C	<i>L. bulgaricus</i>	76	PLr7A(A)	<i>L. lactis</i>
33	YLj22A	<i>L. bulgaricus</i>	77	PLr31C (B)	<i>L. lactis</i>
34	YLj25B	<i>L. bulgaricus</i>	78	PLj24C(A)	<i>L. lactis</i>
35	YLj27C	<i>L. bulgaricus</i>	79	PLj27A	<i>L. lactis</i>
36	YLj31E	<i>L. bulgaricus</i>	80	YLj63	<i>L. lactis</i>
37	YLj38C	<i>L. bulgaricus</i>	81	PLj29C(A)	<i>L. paracasei</i>
38	YLr26A	<i>L. bulgaricus</i>	82	YLj14A(A)	<i>L. paracasei</i>
39	YLr26A(B)	<i>L. bulgaricus</i>	83	YLj25A	<i>E. faecium</i>
40	YLr31A	<i>L. bulgaricus</i>	84	PLj35B(A1)	<i>E. faecium</i>
41	PLa31B(B)	<i>L. fermentum</i>	85	PLr8D(A2)	<i>P. acidilactici</i>
42	PLc4A	<i>L. fermentum</i>	86	PLj18A1	<i>L. plantarum</i>
43	PLc23A1	<i>L. fermentum</i>	87	PLr35B	<i>L. casei</i>
44	PLc23A2	<i>L. fermentum</i>			

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Primerler

Çalışmada jelatinaz (*gelE*), hiyalüronidaz (*hyl*), agregasyon maddesi (*asaI*), enterokokal yüzey proteini (*esp*), sitolizin (*cylA*), endokardit antijeni (*efaA*), kolajen bağlayıcı protein (*ace*), amino asit dekarboksilazlar için; histidin dekarboksilaz (*hdc*) ve tirozin dekarboksilaz (*tdc*), antibiyotik direnç genleri için ise; eritromisin (*ermA*, *ermB*, *ermC*), gentamisin (*aac(6')-aph(2'')*), kloramfenikol (*cat*), tetrasiklin (*tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetS*, *tetQ*), vankomisin (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanX*) ile ilgili gen bölgeleri uygun primerler kullanılarak, PZR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Çalışmada kullanılan genler, primerler ve genlerin boyutları Tablo 3.2’te verilmiştir.

Primer çiftleri BM Yazılım Danış. ve Lab. Sis. Ltd. Şti. (Ankara) tarafından sentezlenmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmanın moleküler aşamasında araştırılan genler, primerler ve genlerin boyutları

Direnç Geni Primeri (5'-3')	Amplikasyon (bp)	Referans
<i>gelE</i> Fw TATGACAATGCTTTTTGGGA <i>gelE</i> Rev AGATGCACCCGAAATAATATA	213	Vankerckhoven vd., 2004
<i>esp</i> Fw AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG <i>esp</i> Rev AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510	Vankerckhoven vd., 2004
<i>asaI</i> Fw GCACGCTATTACGAACTATGA <i>asaI</i> Rev TAAGAAAGAACATCACCACGA	375	Vankerckhoven vd., 2004
<i>cylA</i> Fw ACTCGGGGATTGATAGGC <i>cylA</i> Rev GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688	Vankerckhoven vd., 2004
<i>hyl</i> Fw ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG <i>hyl</i> Rev GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	276	Vankerckhoven vd., 2004
<i>ace</i> Fw GAATTGAGCAAAAAGTTCAATCG <i>ace</i> Rev GTCTGTCTTTCACTTGTTTC	1008	Ben Omar vd., 2004
<i>efaA</i> Fw GCCAATTGGGACAGACCCTC <i>efaA</i> Rev CGCCTTCTGTTCCTTCTTTGGC	688	Creti vd., 2004
<i>hdc</i> Fw AGATGGTATTGTTTCTTATG <i>hdc</i> Rev AGACCATAACCCATAACCTT	367	De las Rivas vd., 2005
<i>tdc</i> Fw GAYATNATNGGNATNGGNYTNGAYCAR <i>tdc</i> Rev CCRTARTCNGGNATAGCRAARTCNTRTG	924	De las Rivas vd., 2005
<i>ermA</i> Fw TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA <i>ermA</i> Rev CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT	645	Sutcliffe vd., 1996

Direnç Geni Primeri (5'-3')	Amplikasyon (bp)	Referans
<i>ermB</i> Fw GAAAAGGTA CTCAACCAAATA <i>ermB</i> Rev AGTAACCGTACTTAAATTGTTTAC	639	Sutcliffe vd., 1996
<i>ermC</i> Fw TCAAAACATAATATAGATAAA <i>ermC</i> Rev GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	934	Liu vd., 2009
<i>aac(6')</i> <i>aph(2'')</i> Fw CCAAGAGCAATAAGGGCATA <i>aac(6')</i> <i>aph(2'')</i> Rev CACTATCATAACCACTACCG	220	Rojo-Bezares vd., 2006
<i>cat</i> Fw CATATCAAATGAACTTTAATA <i>cat</i> Rev CGTTTTGTGAAGTAGTACACT	718	Çataloluk ve Gogebakan, 2004
<i>tetK</i> Fw CAATACCTACGATATCTA <i>tetK</i> Rev TTGAGCTGTCTTGTTCA	352	Klare vd., 2007
<i>tetL</i> Fw TGGTCCTATCTTCTACTCATT <i>tetL</i> Rev TTCCGATTTCGGCAGTAC	385	Werner vd., 2003
<i>tetM</i> Fw GGTGAACATCATAGACACGC <i>tetM</i> Rev CTTGTTGAGTTCCAATGC	401	Werner vd., 2003
<i>tetS</i> Fw ATCAAGATATTAAGGAC <i>tetS</i> Rev TTCTCTATGTGGTAATC	573	Gevers vd., 2003a
<i>tetQ</i> Fw AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG <i>tetQ</i> Rev CGGAGTGCAATGATATTGCA	169	Aminov vd., 2001
<i>vanA</i> Fw TTGCTCAGAGGAGCATGACG <i>vanA</i> Rev TCGGGAAGTGCAATACCTGC	957	Klein vd., 2000
<i>vanB</i> Fw TTATCTTCGGCGGTTGCTCG <i>vanB</i> Rev GCCAATGTAATCAGGCTGTC	957	Klein vd., 2000
<i>vanC</i> Fw CAGTGTCCTAACCTCAGCAGCCG <i>vanC</i> Rev TAGGATAACCCGACTTCCGCCA	934	Liu vd., 2009
<i>vanX</i> Fw CACTTCCCAGGCTCATTGACCGCTTGATCG <i>vanX</i> Rev CCGAAAGAGGTACCTTATATAGTTTGTCCG	740	Özteber, 2013

3.2. Yöntem

3.2.1. LAB'nin Aktifleştirilmesi

Çalışılan LAB'nin -20°C'de stok kültürleri MRS sıvı besiyerinde 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra MRS sıvı besiyerine ikinci kez aktifleştirilen kültürler 37°C'de 18 saat inkübe edildikten sonra kullanılmıştır.

3.2.2. Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi

Hemolitik aktivitenin belirlenmesi için, %5'lik defibrine at kanı ilave edilmiş Columbia Blood Agar üzerine mikroorganizmalar öze ile sürüldükten sonra besiyeri 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Kolonilerin etrafındaki yeşil zonlar alfa-hemolitik, beyaz zonlar beta-hemolitik aktivite ve hiçbir etki göstermeyenler gama-hemolitik olarak değerlendirilmiştir (Vankerckhoven, 2004).



Şekil 3.1. Deneyde kullanılan defibrine at kanları

3.2.3. Jelatinaz Üretiminin Belirlenmesi

Jelatinaz testi için %10-15 jelatin (Oxoid) içeren 0,1x Nutrient Broth (Merck) sıvı besiyeri ortamı kullanılmıştır. Aktifleştirilmiş kültürler hazırlanan besiyeri ortamına inoküle edilmiş ve 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örnekler 1 saat +4°C'de buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda tüplerde katılaşma olup olmadığı gözlemlenmiştir. Tüplerde katılaşma jelatinaz testi için negatif, sıvı görünüm ise pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Cappucino ve Sherman, 2007).

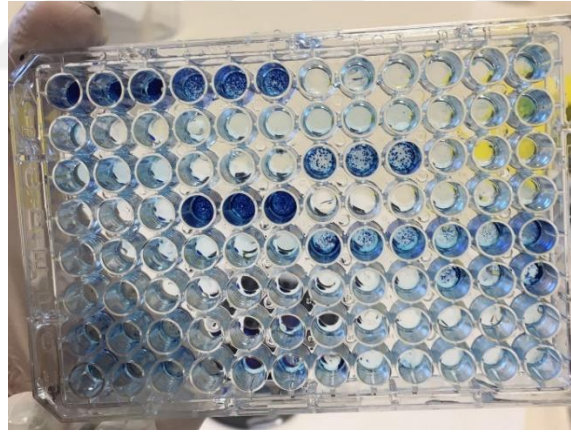
3.2.4. DNaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Suşların DNaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla bakteriler DNaz test agar (Merck) besiyerine spotlama yöntemiyle inoküle edilerek 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda besiyerinin yüzeyine 1 N HCl (Merck) çözeltisi damlatılarak kolonilerin etrafında meydana gelecek şeffaf zon DNaz aktivitesi olarak değerlendirilmiştir (Onishi, 1983).

Pozitif kontrol olarak EKY 5/4 kodlu *Staphylococcus aureus* suşu kullanılmıştır (Yavuz vd., 2015).

3.2.5. İzolatların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Araştırılması

Biyofilm testi için MRS agar'da 37°C'de 18 saat geliştirilen bakterilerden steril eküvyon ile alınmış, 10 ml %0,9 (w/v) NaCl içerisinde çözündürülerek konsantrasyonu densitometre (Den-1 Densitometer, Biosan, Letonya) ile 0,5 McFarland'a ayarlanmıştır. 96-kuyucuklu mikropklara (Greiner CELLSTAR® 96 well plates, Sigma, ABD) 180 µl besiyeri ve 20 µl bakteri süspansiyonu eklenerek plakalar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda mikropklara boşaltılarak ve 3 defa 200 µl PBS ile yıkanmıştır. Böylelikle tutunmayan bakteriler uzaklaştırılmıştır. Tutunan bakteriler 200 µl metanol ile 15 dakika fikse edilmiştir. Metanol döküldükten sonra 55°C'de 1 saat kurutulan mikropklara yüzeyine tutunan bakteriler 200 µl kristal viyole ile boyanmıştır. 5 dakika sonra boya dökülerek, boya kalıntıları bol çeşme suyu ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.2). Mikropklara kurutulduktan sonra tutunan boya 200 µl %33'lük asetik asit ile çözündürülmüş OD₅₉₀'da mikropklara okuyucusu (Thermo Multiskan Go) kullanarak belirlenmiştir. OD₅₉₀ değeri >0,5 bulunan bakteriler biyofilm pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2. İzolatların biyofilm oluşturma özelliklerinin tespiti için hazırlanan mikropklara

3.2.6. İzolatların Ekstraselüler Proteaz Üretiminin Belirlenmesi

İzolatların proteaz üretme yetenekleri skim milk agar (Nutrient agar (NA) + %1(w/v) skim milk), kazein agar ve süt agar (NA + %10(v/v) UHT süt) kullanılarak tespit edilmiştir (Sudagidan vd., 2008; Sudagidan ve Aydın, 2010). Aktifleştirilen kültürlerden spotlama yöntemi ile 3 farklı besiyerlerine inokülasyon yapılmıştır. Petriler 37°C'de 2-3 gün inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda skim milk ve süt agar

besiyerlerinde, ekim alanları çevresinde oluşan zonlar ekstraselüler enzim üretimi olarak değerlendirilmiştir.

3.2.7. Suşların Dekarboksilaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Kültürlerin dekarboksilaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla bazal (MRS) besiyeri histidin (Merck), tirozin (Fluka), lizin (Merck), ornitin (Sigma), fenilalanin (Merck), triptofan (Sigma) amino asitlerince %2 düzeyinde zenginleştirilmiştir. Aktifleştirilmiş saf kültür hazırlanan besiyeri ortamına inoküle edilerek 37°C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Kolonilerin etrafında meydana gelen pembe halka pozitif olarak değerlendirilmiştir (Joosten ve Northolt, 1989).

3.2.8. Moleküler Tekniklerle Virulans, Amino Asit Dekarboksilaz ve Antibiyotik Gen Bölgelerinin Tespiti

3.2.8.1. LAB'nden Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak yapılmıştır. %20 gliserol içerisinde -20°C'de muhafaza edilen bakteri stoklardan 5 mL MRS (Merck) broth içerisine inoküle edilerek 37°C'de 48 saat bekletilmiştir. Kültürlerden %1 oranında alınarak tekrar 5 ml MRS broth içerisine aşılama yapıp 37°C'de 18 saat bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında üreme olan kültürlerden 1600 µL steril ependorf tüplerine alınarak 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış, dipte kalan pellet 180 µL lizis buffer içerisinde pipetaj ile homojenize edilmiştir (**EK-5**). Örnekler 37°C'de 45 dakika su banyosunda bekletildikten sonra 200 µL lizis solüsyon eklenerek pipetaj yapılmıştır. Örneklerin üzerine 20 µL Proteinaz K eklenerek ~10-15 saniye vorteksleme yapılmış ve 56°C'de 60 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 20 µL RNaz ilave edilerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. %50'lik etanolden 400 µL eklenerek vorteksleme ile homojenize edilmiştir. Örneklerden ~800 µL alınarak kitin içerisinde bulunan kolonlara aktarma yapıldıktan sonra, kolonlar 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak kolonun üzerine 500 µL Wash buffer I eklenmiştir. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenen örneklerden süpernatant tekrar atılmış ve kolon üzerine 500 µL Wash buffer II eklenmiştir. 12000 rpm'de 4 dakika santrifüjlenen örneklerden süpernatant tekrar atılmıştır. Kolonun alt kısmına steril ependorf konularak kolon içine 40 µL Elution buffer eklenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 2 dakika bekletildikten sonra 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiş ve bu işlem tekrarlanmıştır. Elde edilen DNA 80 µL

yıkama çözeltisi içerisinde toplanmıştır. DNA örneklerinin saflıkları ve miktarları nanodrop (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek, ABD) kullanılarak 260 ve 280 nm'de ölçülerek tespit edilmiş ve izole edilen DNA'lar kullanılabildiği kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.8.2. Virülans ve Amino Asit Dekarboksilaz Gen Bölgelerinin Tespiti

Çalışmamızda kullandığımız LAB'nin virülans ve amino asit dekarboksilaz direnç genlerinin varlığı PZR yöntemiyle araştırılmıştır. PZR için kullanılan virülans ve amino asit dekarboksilaz direnç genlerinin PZR reaksiyon karışımları Tablo 3.3'te ve reaksiyon koşulları Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.3. Virülans ve amino asit dekarboksilaz genlerinin PZR reaksiyon karışımları

Reaktifler (Konsantrasyon)	<i>gelE, esp, cylA, hyl, ace</i>	<i>asaI, hdc</i>	<i>efaA</i>	<i>tdc</i>
PCR buffer (10x, +KCl, -MgCl ₂)	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µL	2 µL	1,5 µL	1,5 µL
dNTP(10 mM)	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
Primer F (20 pMol)	0,5 µL	1 µL	0,5 µL	2 µL
Primer R (20 pMol)	0,5 µL	1 µL	0,5 µL	2 µL
Taq Polimeraz (5U/µL)	0,12 µL	0,2 µL	0,12 µL	0,12 µL
Steril distile su	16,9 µL	15,3 µL	14,4 µL	13,9 µL
DNA (20ng/µL)	2,5 µL	2,5 µL	5 µL	2,5 µL
TOPLAM:	25 µL			

Tablo 3.4. Virülans ve amino asit dekarboksilaz direnç genlerinin PZR reaksiyon koşulları

Araştırılan Genler

		Sıcaklık	Süre	
<i>gelE</i> (Jelatinaz)	Başlangıç	95°C	15 dakika	30 döngü
	Denatürasyonu:	94°C	1 dakika	
	Primer Bağlanma:	52°C	1 dakika	
	Zincir Uzama:	72°C	1 dakika	
	Son Uzama:	72°C	10 dakika	

<i>esp</i> (Enterokokal yüzey proteini)		Sıcaklık	Süre	
	Başlangıç Denatürasyonu:	95°C	15 dakika	
	Denatürasyon:	94°C	1 dakika	30 döngü
	Primer Bağlanma:	53°C	1 dakika	
	Zincir Uzama:	72°C	1 dakika	
Son Uzama:	72°C	10 dakika		
<i>cylA</i> (Sitolizin)		Sıcaklık	Süre	
	Başlangıç Denatürasyonu:	95°C	15 dakika	
	Denatürasyon:	94°C	1 dakika	30 döngü
	Primer Bağlanma:	54°C	1 dakika	
	Zincir Uzama:	72°C	1 dakika	
Son Uzama:	72°C	10 dakika		
<i>hyl</i> (Hyalüronidaz)		Sıcaklık	Süre	
	Başlangıç Denatürasyonu:	95°C	15 dakika	
	Denatürasyon:	94°C	1 dakika	30 döngü
	Primer Bağlanma:	57°C	1 dakika	
	Zincir Uzama:	72°C	1 dakika	
Son Uzama:	72°C	10 dakika		
<i>ace</i> (Kolajen bağlayıcı protein)		Sıcaklık	Süre	
	Başlangıç Denatürasyonu:	94°C	2 dakika	
	Denatürasyon:	94°C	60 saniye	35 döngü
	Primer Bağlanma:	53°C	60 saniye	
	Zincir Uzama:	72°C	2 dakika	
Son Uzama:	72°C	5 dakika		
<i>asa1</i> (Agregasyon maddesi)		Sıcaklık	Süre	
	Başlangıç Denatürasyonu:	95°C	15 dakika	
	Denatürasyon:	94°C	1 dakika	30 döngü
	Primer Bağlanma:	56°C	1 dakika	
	Zincir Uzama:	72°C	1 dakika	
Son Uzama:	72°C	10 dakika		
<i>hdc</i> (Histidin dekarboksilaz)		Sıcaklık	Süre	
	Başlangıç Denatürasyonu:	95°C	10 dakika	
	Denatürasyon:	94°C	30 saniye	30 döngü
	Primer Bağlanma:	53°C	30 saniye	
	Zincir Uzama:	72°C	2 dakika	
Son Uzama:	72°C	10 dakika		

		Sıcaklık	Süre	
<i>efaA</i> (Endokardit antijeni)	Başlangıç Denatürasyonu:	95°C	5 dakika	
	Denatürasyon:	95°C	30 saniye	30 döngü
	Primer Bağlanma:	58°C	30 saniye	
	Zincir Uzama:	72°C	30 saniye	
	Son Uzama:	72°C	5 dakika	
		Sıcaklık	Süre	
<i>tdc</i> (Tirozin dekarboksilaz)	Başlangıç Denatürasyonu:	95°C	10 dakika	
	Denatürasyon:	94°C	30 saniye	30 döngü
	Primer Bağlanma:	52°C	30 saniye	
	Zincir Uzama:	72°C	2 dakika	
	Son Uzama:	72°C	10 dakika	

PZR reaksiyonları 0,2 mL'lik tüplerde hazırlanarak, her bir direnç geni için belirtilen PZR koşulları Thermal döngü cihazında (Bio-Rad, T100™ Thermal Cycler, ABD) programlanmıştır. Her reaksiyon için bir adet negatif kontrol tüpü hazırlanmıştır.

PZR ürünlerinden, 10 µL alınarak üzerine 2 µL 6X yükleme tamponu eklenmiş ve örnekler, %5 µL SafeView™ Classic (Applied Biological Materials, Inc.) içeren, %1,5'lük agaroz (Sigma, ABD) jelde 1XTAE buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA) içerisinde hazırlanarak yatay elektroforez sisteminde (Bio-Rad, PowerPac™ Basic, Singapore), 75 voltta, 45–70 dakika yürütülmüştür (**EK-5**). Baz büyüklüğü tespiti için, 100 bp DNA ladder (Fermentas SM0242) ve 1 kb DNA ladder (Fermentas SM0311) kullanılmıştır (Şekil 3.4). Toksik olmayan GelRed (Biotium) boyası ile boyanan jel, görüntüleme sisteminde (Bio-Rad, Gel Doc™ Ez Imager, ABD) görüntülenmiştir.

3.2.8.3. Antibiyotik Gen Bölgelerinin Tespiti

Çalışılan LAB'nin antibiyotik direnç genlerini belirlemek için kullanılan PZR reaksiyon karışımı Tablo 3.5'de gösterilmiştir. PZR reaksiyonları 0,2 mL'lik tüplerde hazırlanarak her bir direnç geni için belirtilen PZR koşulları için Thermal döngü cihazı (Bio-Rad, T100™ Thermal Cycler, ABD) programlanmıştır. Her reaksiyon için bir adet negatif kontrol tüpü hazırlanmıştır. PZR için kullanılan antibiyotik direnç genlerinin PZR reaksiyon koşulları Tablo 3.6'te verilmiştir.

Tablo 3.5. Antibiyotik direnç genleri için kullanılan PZR karışımı.

Reaktifler (Konsantrasyon)	Hacim
PCR buffer (10x, +KCl, -MgCl ₂)	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL
dNTP(10 mM)	1,5 µL
Primer F (20 pMol)	1 µL
Primer R (20 pMol)	1 µL
Taq Polimeraz (5U/µL)	0,2 µL
Steril distile su	14,3 µL
DNA (20ng/µL)	2,5 µL
TOPLAM:	25 µL

Tablo 3.6. Antibiyotik direnç genlerinin PZR reaksiyon koşulları

Araştırılan Genler

		Sıcaklık	Süre	Döngü
<i>ermA</i> (Eritromisin)	Başlangıç Denatürasyonu:	95°C	5 dakika	30 döngü
	Denatürasyon:	95°C	30 saniye	
	Primer Bağlanma:	52°C	45 saniye	
	Zincir Uzama:	72°C	2 dakika	
	Son Uzama:	72°C	5 dakika	
<i>ermB</i> (Eritromisin)	Başlangıç Denatürasyonu:	95°C	5 dakika	30 döngü
	Denatürasyon:	95°C	30 saniye	
	Primer Bağlanma:	52°C	45 saniye	
	Zincir Uzama:	72°C	2 dakika	
	Son Uzama:	72°C	5 dakika	
<i>ermC</i> (Eritromisin)	Başlangıç Denatürasyonu:	95°C	5 dakika	30 döngü
	Denatürasyon:	95°C	30 saniye	
	Primer Bağlanma:	52°C	45 saniye	
	Zincir Uzama:	72°C	2 dakika	
	Son Uzama:	72°C	5 dakika	

			Sıcaklık	Süre	Döngü
<i>aac(6') aph(2'')</i> (Gentamisin)	Başlangıç Denatürasyonu:		95°C	5 dakika	30 döngü
	Denatürasyon:		95°C	30 saniye	
	Primer Bağlanma:		60°C	45 saniye	
	Zincir Uzama:		72°C	2 dakika	
	Son Uzama:		72°C	5 dakika	
<i>cat</i> (Kloramfenikol)	Başlangıç Denatürasyonu:		94°C	5 dakika	30 döngü
	Denatürasyon:		94°C	60 saniye	
	Primer Bağlanma:		52°C	60 saniye	
	Zincir Uzama:		72°C	2 dakika	
	Son Uzama:		72°C	7 dakika	
<i>tetK</i> (Tetrasiklin)	Başlangıç Denatürasyonu:		95°C	1 dakika	30 döngü
	Denatürasyon:		94°C	30 saniye	
	Primer Bağlanma:		50°C	30 saniye	
	Zincir Uzama:		72°C	30 saniye	
	Son Uzama:		72°C	4 dakika	
<i>tetL</i> (Tetrasiklin)	Başlangıç Denatürasyonu:		94°C	5 dakika	35 döngü
	Denatürasyon:		94°C	30 saniye	
	Primer Bağlanma:		54°C	30 saniye	
	Zincir Uzama:		72°C	1 dakika	
	Son Uzama:		72°C	5 dakika	
<i>tetM</i> (Tetrasiklin)	Başlangıç Denatürasyonu:		95°C	5 dakika	25 döngü
	Denatürasyon:		95°C	45 saniye	
	Primer Bağlanma:		52°C	45 saniye	
	Zincir Uzama:		72°C	45 saniye	
	Son Uzama:		72°C	7 dakika	
<i>tetS</i> (Tetrasiklin)	Başlangıç Denatürasyonu:		94°C	5 dakika	30 döngü
	Denatürasyon:		94°C	60 saniye	
	Primer Bağlanma:		55°C	60 saniye	
	Zincir Uzama:		72°C	2 dakika	
	Son Uzama:		72°C	10 dakika	

			Sıcaklık	Süre	Döngü
<i>tetQ</i> (Tetrasiklin)	Başlangıç	Denatürasyonu:	94°C	5 dakika	25 döngü
		Denatürasyon:	94°C	30 saniye	
		Primer Bağlanma:	63°C	30 saniye	
		Zincir Uzama:	72°C	30 saniye	
		Son Uzama:	72°C	7 dakika	
<i>vanA</i> (Vankomisin)	Başlangıç	Denatürasyonu:	94°C	3 dakika	40 döngü
		Denatürasyon:	94°C	30 saniye	
		Primer Bağlanma:	65°C	2 dakika	
		Zincir Uzama:	72°C	2 dakika	
		Son Uzama:	72°C	6 dakika	
<i>vanB</i> (Vankomisin)	Başlangıç	Denatürasyonu:	94°C	3 dakika	40 döngü
		Denatürasyon:	94°C	30 saniye	
		Primer Bağlanma:	65°C	2 dakika	
		Zincir Uzama:	72°C	2 dakika	
		Son Uzama:	72°C	6 dakika	
<i>vanC</i> (Vankomisin)	Başlangıç	Denatürasyonu:	95°C	5 dakika	30 döngü
		Denatürasyon:	95°C	30 saniye	
		Primer Bağlanma:	64°C	45 saniye	
		Zincir Uzama:	72°C	1,5 dakika	
		Son Uzama:	72°C	5 dakika	
<i>vanX</i> (Vankomisin)	Başlangıç	Denatürasyonu:	95°C	5 dakika	30 döngü
		Denatürasyon:	95°C	30 saniye	
		Primer Bağlanma:	60°C	30 saniye	
		Zincir Uzama:	72°C	1 dakika	
		Son Uzama:	72°C	10 dakika	

PZR ürünleri 3.2.8.2’de belirtildiği şekilde hazırlanarak yürütülmüştür.

3.2.9. İstatistiksel Analizler

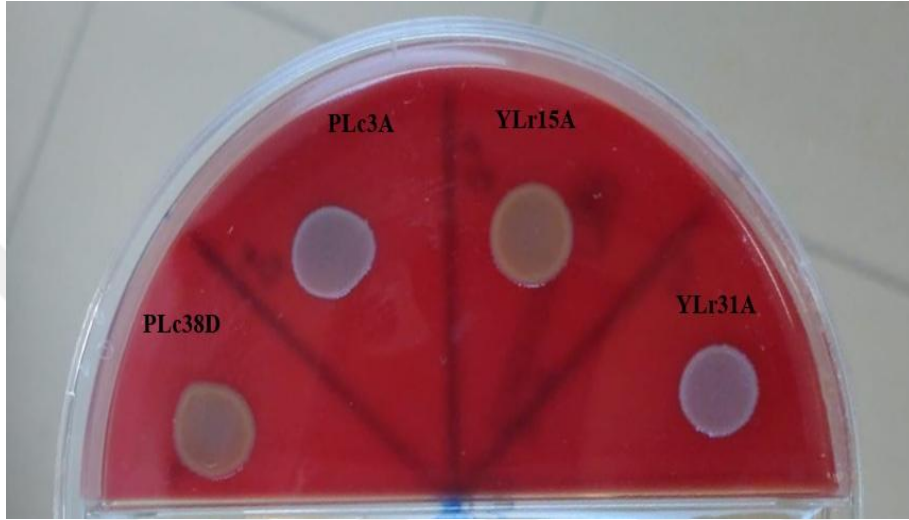
Araştırılan yöntemlerden LAB'nin ekstraselüler proteaz üretimi zon çaplarını (mm) belirlemek amacıyla varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Bu amaçla The SAS System for Windows 9.0 (Şikago, ABD) istatistiksel analiz paket programı kullanılmıştır. Ortalamalar arasındaki farklılıklar $p < 0,05$ düzeyinde test edilmiş olup, araştırma üçer tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Çalışılan LAB izolatlarının hemolitik aktivite, jelatinaz üretimi, DNaz aktivitesi, amino asit dekarboksilaz aktivitesi ve biyofilm oluşturma özelliklerinin araştırılmasında sonuçlar pozitif/negatif olarak değerlendirilmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Hemolitik Aktivitenin Değerlendirilmesi

Süt ürünlerinde kullanılan başlatıcı kültürler için hemolitik aktivitenin bulunmaması önemli bir kriterdir (da Silva Ferrari vd., 2016). Bizim çalışmamızda, tüm izolatlarda hemolitik aktivite negatif olarak bulunmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. LAB'nin hemolitik aktivite değerlendirilmesinde zon oluşumu

Maragkoudakis vd. (2006) yaptıkları çalışmada *L. casei*, *L. delbrueckii* ve *L. lactis*'in gama-hemoliz gösterdiği tespit edilmiştir. Anas vd. (2008) ise bizim sonuçlarımızla benzer şekilde Cezayir'de çiğ keçi sütünden izole edilen 64 *Lactobacillus* suşunun hemolitik aktivitesinin olmadığını belirlemişlerdir. Baylan vd. (2011) *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarında hemolizin üretimini %11,1 ve Domingos-Lopes vd. (2017) çiğ inek sütünden yapılan Pico peynirlerinden *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* olmak üzere 114 LAB izolatının %93'ünün alfa-hemolitik ve %3,5'inin beta-hemolitik aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Adimpong vd. (2012), Afrika'da yerli 3 farklı fermente gıda ürününden izole ettikleri 33 LAB suşların hiçbirinde beta-hemolitik aktivite bulunmadığını ve 6 *L. salivarius*, 2 *W. confusa* ve 1 *L. delbrueckii* suşunda alfa-hemolitik aktivitenin olduğunu rapor etmişlerdir. Bassyouni vd. (2012) Mısır'da farklı süt ürünlerinden homofermentatif LAB izole ederek hemolitik aktivite için test etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar tüm LAB'nin insan kullanımı için güvenli olduğunu doğrulayacak şekilde hemoliz negatif tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, Kumar ve Murugalatha (2012)'nin çalışması ve Sandra vd. (2012)'nin 15 LAB'den hiçbirinin beta-hemolitik olmadığı

raporu ile uyumludur. Ryu ve Chang (2013), Korelilerin severek tükettikleri Kimchi'den izole edilen 10 adet LAB'nin hemolitik aktivite göstermediğini tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar bizim çalışmamız ile uyumludur.

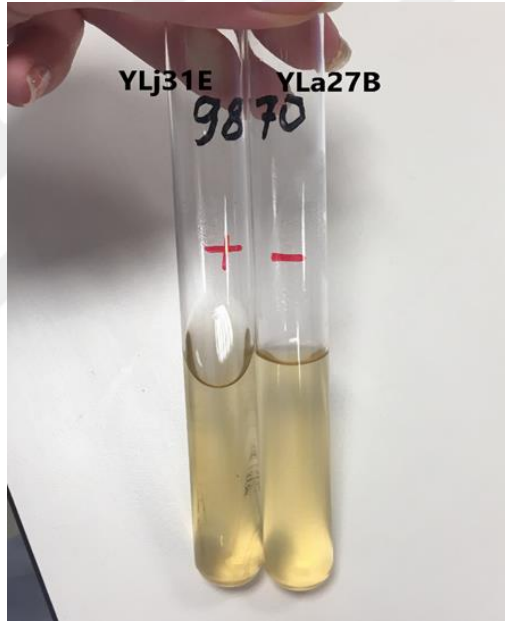
Fernandes ve Dhanashree (2013) 84'ü (%56) *E. faecalis*, 51'i (%34) *E. faecium* ve 15'i (%10) *Enterococcus* spp. olan toplam 150 adet *Enterococcus* izolatının 123 (%82)'ünün hemolitik aktiviteye sahip olduğu ve 61 (%40,6)'inin jelatinaz ürettiğini tespit etmişlerdir. Amina vd. (2014) Cezayir'de çığ deve sütlerinden izole ettikleri 50 izolattan probiyotik özellik gösteren 1 suş *L. plantarum* DU10'nun seçilerek güvenliğini araştırmış ve *L. plantarum*'un pozitif hemoliz etkinliği göstermediğini tespit etmişlerdir. Bir başka çalışma, *L. casei*, *L. delbrucekii* ve *L. lactis*'in gama-hemolitik olduğunu, *L. koagulans* ve *L. rhamnosus*'un ise alfa-hemolitik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Hawaz, 2014). de Almeida Junior vd. (2015)'nin araştırmasında Brezilya'da keçi sütünden izole edilen 50 LAB'nin virülans faktörlerinin karakterizasyonunda, incelenen suşlar at kanı içeren agarda gama-hemolitik aktivite göstermiştir. Keçi sütünden izole edilen 4 adet LAB suşunda sadece bir suşunda beta-hemoliz belirlenmiştir (da Silva Ferrari vd., 2016).

Quilodran-Vega vd. (2016) 10 domuz sütü örneğinden LAB izolasyonu yapmıştır. Araştırma sonucunda *L. curvatus* TUCO-5E'nin alfa ve beta-hemolitik aktivite göstermediği ve jelatinaz üretimi olmadığı belirlenmiştir. Bu bakteriler yetişkin farelere verildikten sonra herhangi bir yan etki görülmediği, bu sebeple bu suşun güvenli olduğu kabul edilmiştir.

Bennani vd. (2017) Fas'ın Oujda bölgesinden toplanan çığ inek sütlerinden 280 LAB izole ederek LAB4 suşu dışında suşların hiçbirinin koyun kanlı agarlarında alfa-hemolitik ve beta-hemolitik aktivite göstermediğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlar, Sahnouni vd. (2012)'nin raporu ve Abushelaibi (2017)'nin deve sütünden izole ettiği LAB izolatlarından 2 izolatın beta-hemolitik ve 1 izolatında alfa-hemolitik aktiviteyi gösterdiği sonuçları ile uyumludur. Mete vd. (2017) fenotipik olarak enterokokların %38,4'ünün hemolizin ürettiğini belirlemişlerdir. Channaiah vd. (2018) *E. faecalis* izolatlarının %2,9'unu beta-hemoliz pozitif bulmuşlardır. Masalam vd. (2018) tarafından Suudi Arabistan'da ham ve fermente sütlerden elde edilen 46 LAB suşunun hiçbiri hemolitik aktivite göstermemiştir. Bu sonuçlar, Chahad vd. (2012) ve Bozoudi vd. (2015)'nin sonuçları ile uyumludur. Bu özellik, bu LAB'nin gıda uygulamalarında güvenle kullanılabilceğini göstermektedir.

4.2. Jelatinaz Üretiminin Değerlendirilmesi

FAO/WHO'nun probiyotiklerin değerlendirilmesine ilişkin kılavuzlarına göre, probiyotikler için hemoliz ve jelatinaz aktivitesinin olmaması, önerilen özelliklerden birisidir (FAO/WHO, 2002). Jelatinaz, ekstraselüler çinko içeren metalloproteinazdır ve konak dokusunu yıkıma uğratarak bakteriye besin sağlar. Aynı zamanda, biyofilm oluşumunda fonksiyonu vardır (Qin vd., 2000). Bizim çalışmamızda fenotipik olarak 48 izolatta jelatinaz üretimi pozitif bulunmuştur (Şekil 4.2). Jelatinaz üretimi sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde 40 adet *L. bulgaricus* suşunun 29'u, 29 adet *L. fermentum*'un 8'i, 2 adet *E. faecium* suşunun ise ikisi pozitif bulunmuştur. Jelatinaz üretimine ait sonuçlar **EK 1** (Tablo 4.1)'de verilmiştir.



Şekil 4.2. LAB'nin jelatinaz üretimi deneyinde 48 saat inkübasyon süresi sonunda +4 °C'de 1 saat bekletildikten sonraki görüntüleri

Coque vd. (1995) jelatinaz üretimini endokardit örneklerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarının %54'ünde, diğer kan kültür izolatlarının ise %68'nde tespit etmişlerdir. Baylan vd. (2011) jelatinaz üretimini *E. faecalis* suşlarında %22, *E. faecium*'da ise %3,2 olarak bulmuşlardır. Fernandes ve Dhanashree (2013) ise çalışmalarında inceledikleri 123 adet LAB izolatının %40,6'sının jelatinaz aktivitesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ribeiro vd. (2014) Portekiz'de Pico peynirinden izole edilen 1 adet *Lc. lactis* ve 7 adet *E. faecalis* olmak üzere, toplam 8 adet LAB suşundan *Lc. lactis* L1A21M1 ve 3 *E. faecalis* L3A21M3, L3A21M8 ve L3A1M6 suşlarında

jelatinaz üretimini pozitif belirlemişlerdir. Al-Talib vd. (2015) 222 enterokok izolatında jelatinaz üretimini *E. faecalis* suşlarında %76,5 ve *E. faecium*'da %66,7 olarak tespit etmişlerdir. Mete vd. (2017) jelatinaz üretimini enterokoklarda %40,6, kan örneklerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarında %63, *E. faecium* suşlarında %23,1 olarak bulunmuştur. Domingos-Lopes vd. (2017) *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* türlerinden oluşan 114 adet LAB suşunun jelatinaz aktivitesi %49,1 oranında pozitif sonuç vermiştir ve bu oran enterokoklar arasında %64'e kadar çıkmıştır. Araştırmada *L. lactis* e L3A21M11 ve *L. plantarum* e L3C1E8 suşları jelatinaz üretirken, *Leuconostoc* suşlarının hiçbiri jelatinaz aktivitesi göstermemiştir.

Channaiah vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada ise enterokoklar %3,4 jelatinaz aktivitesi göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise jelatinaz üretimi %55,2 oranında pozitif sonuç vermiştir.

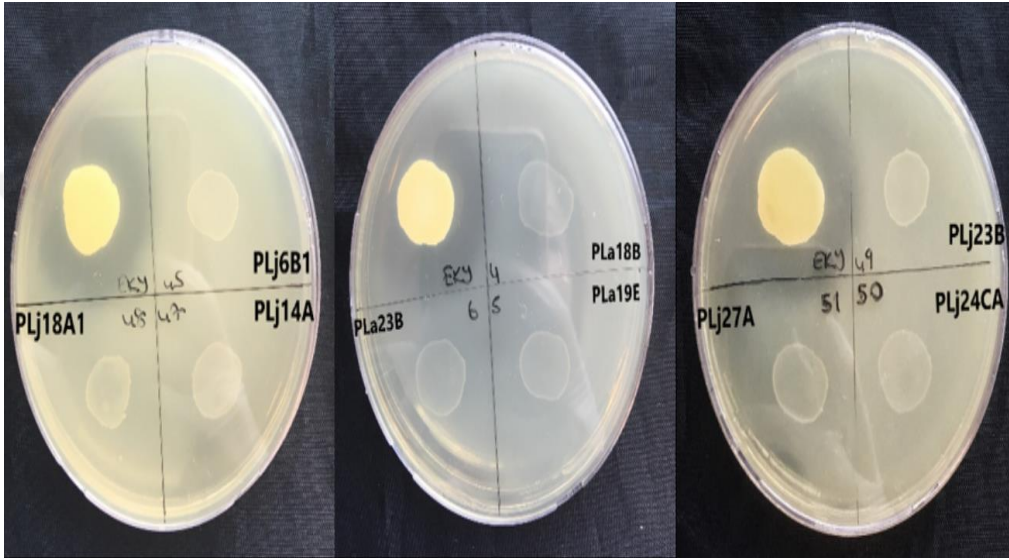
Kalui vd. (2008) tarafından yapılan çalışmada Kenya'nın geleneksel fermente mısır lapası olan İkii'den izole edilen *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* suşları hemolitik aktivite ve jelatinaz üretimi göstermemiştir. Amina vd. (2014) Cezayir'de çiğ deve sütünden izole edilen *L. plantarum* DU10'un jelatinaz aktivitesi göstermediğini, dolayısıyla gıda ve fermantasyon endüstrisinde güvenli probiyotik olarak daha fazla kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar Wambuğu (2015)'nin fermente hindistan cevizi şarabı Mnazi'den elde edilen 15 adet LAB suşunun hemolitik ve jelatinaz aktivitesi açısından negatif olduğu belirttikleri sonuçları ile uyumludur.

4.3. DNaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Enzim niteliğindeki DNaz DNA'yı hidrolize eder (Bilgehan, 2000). Yapılan analiz sonucunda 87 adet bakteriden hiçbirinde kullanılan besiyerinde zon oluşumu gözlenmemiştir. Bu sebeple sonuçlar tüm bakteriler için negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.3).

Singh vd. (2014) bebek dışkılarından izole ettikleri sekiz adet *L. reuteri* suşunun güvenilirliğini incelemiş ve suşların hiçbirinin DNaz enzimi üretmediğini tespit etmişlerdir. Ribeiro vd. (2014) tarafından Portekiz'de Pico peynirinden elde edilen ve bakteriyosin üreten 1 adet *Lc. lactis* L3A21M1 suşu hemoliz, histamin ve DNaz üretimi için negatif sonuç vermiştir. Bu sonuçlar, *Lc. lactis*'in GRAS durumuna ek olarak, bu izolatı gıdalarda koruyucu kültür olarak güvenli bir aday olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. de Almeida Junior vd. (2015) Brezilya'da keçi sütünden izole edilen 50 LAB izolatının virülans faktörlerinin karakterizasyonunda, incelenen tüm suşların DNaz

negatif olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, da Silva Ferrari vd. (2016) keçi sütlerinden izole ettikleri LAB suşlarının hiçbirinde fenotipik testlerle DNaz aktivitesi tespit etmemişlerdir. Bu sonuçlar Ribeiro vd. (2014)'nin sonuçları ile uyumludur. Aspri vd. (2015) eşek sütünden *E. faecium*, *E. faecalis*, *Leu. mesenteroides*, *L. paracasei/casei*, *Str. macedoniensis*, *Enterococcus* spp.'ye ait 79 adet LAB izole ederek bu bakterilerin DNaz, jelatinaz üretimi göstermediklerini ve 79 suştan 2'sinde beta-hemoliz ve 1 suşunda alfa-hemoliz görüldüğünü bildirmişlerdir.

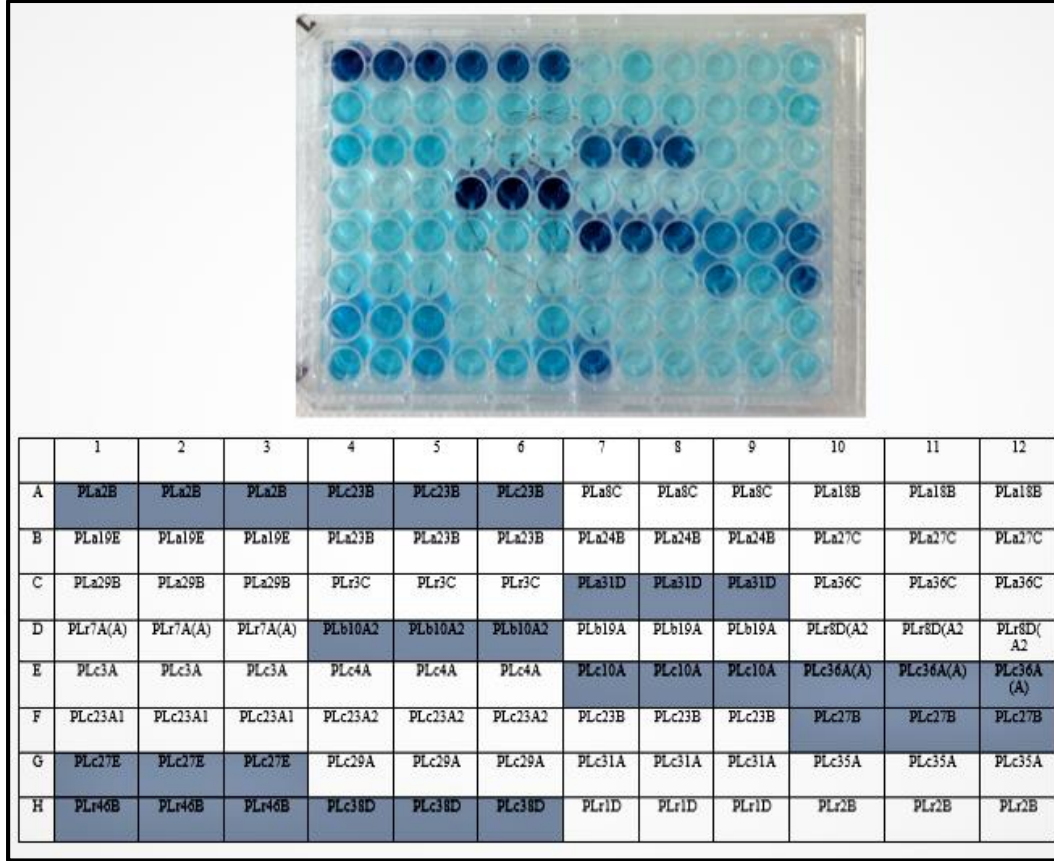


Şekil 4.3. LAB'nin DNaz aktivite değerlendirilmesinde zon görüntüleri

Shuhadha vd. (2017)'nin araştırmasında, Kandy bölgesinden 9 adet inek/manda sütü kullanılarak yapılan lor peynirinden elde edilen 7 adet LAB izolatının hepsi gama-hemoliz özellik sergilerken, hiçbiri DNaz aktivitesi göstermemiştir. Sharma vd. (2017) Hindistan'ın Himachal Pradesh eyaletinden toplanan sütlerden izole ettikleri *L. paraplantarum* KM0'nun (KX671558) suşunun probiyotik potansiyelini değerlendirmek için DNaz, hemolitik aktivite ve jelatinaz üretimini araştırmışlardır. *L. paraplantarum* KM0 DNaz, hemolitik ve jelatinaz aktivitesi göstermemiştir. Bu sonuçlar gelecekteki uygulamalar için *L. paraplantarum* KM0 suşunun güvenli bir şekilde kullanılabilme ihtimalinin olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Domingos-Lopes vd. (2017) Portekiz'de geleneksel çiğ inek sütünden yapılan Pico peynirlerinden *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* türlerini içeren 114 adet LAB izole etmişler ve bu bakterilerin histamin ve DNaz üretmediklerini tespit etmişlerdir.

4.4. İzolatların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Araştırılması

Biyofilm, mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, bakterilerin yüzeye yapışmasını sağlayan mikroorganizmanın içine gömülü olarak bulunduğu ekstraselüler polimerik matrikstir (Donlan, 2002). Çevrenin zararlı etkilerinden korunmak, besin elde etme, yeni genetik özelliklerin kazanılması gibi faktörler mikroorganizmaların biyofilm oluşturmalarına sebep olmaktadır (Dıanı vd., 2016). Mikrobiyal proteazlar mikroorganizmaların sebep olduğu çok sayıda hastalıkta virülans faktör olarak ekstraselüler enzim olarak görev yaparlar Proteazlar pek çok patolojik olayda önemli rol oynarlar. Hücre dışına salınan proteazlar; konağın immün sistemi ile etkileşime girerek enfeksiyon gelişimine sebep olabilirler. Ekstraselüler proteinlerin biyofilm oluşumu, biyofilm yapısına katılma ve çoğunluğu algılama fonksiyonun da görevleri olabileceği belirtilmiştir (Flemming vd., 2010). Bakteriler doğada, biyofilm oluşumu gibi çevresel streslere karşı çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmiştir. Biyofilmlerin varlığı, gıda ürünlerinin patojen ve bozulmaya sebep olan mikroorganizmalar ile potansiyel kontaminasyonu nedeniyle gıda endüstrisinde önemli bir risk faktörüdür. Biyofilm oluşturan bakterilerin kistikfibrozis, endokardit, periodondit, kronik yara enfeksiyonları gibi birçok hastalığa yol açtığı belirlenmiştir (Gupta vd., 2015). Yapılan bu çalışmada çalışılan 87 adet LAB suşunun 19'u (%21,8) biyofilm oluştururken, 68'inde (%78,2) OD₅₉₀ değeri <0,5 bulunan bakteriler biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.4). Sonuçlara genel olarak bakıldığında 9 adet *L. bulgaricus* (PLa2B, PLa4A, PLa31D, PLb10A2, PLc10A, PLj27B, PLj35A, PLr46B, YLr26A) ve 6 adet *L. fermentum* (PLc27B, PLc27E, PLc38D, YLc35B, Ylc37C, YLr12A) suşunda biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Sonuçlar **EK 2** (Tablo 4.2) 'de gösterilmiştir. Peynir örneklerinden izole edilen bakterilerin %26,9'u ve yoğurt örneklerinden izole edilen bakterilerin %14,3'ünde biyofilm oluşumu gözlenmiştir.



Şekil 4.4. Biyofilm testi sonucunda biyofilm oluşturan ve oluşturmeyen izolatlara ait mikropilaka görüntüsü

Hancock ve Perego (2004) bakterilerin yüzeye yapışmasında jelatinazın önemli olduğunu, jelatinaz oluşumunun engellenmesiyle enterokokların cam veya plastik gibi hidrofobik yüzeylere yapışmayacağı ve böylece biyofilm oluşumunun da önüne geçilebileceğini belirtmiştir. Di Rosa vd. (2006) *esp* ve jelatinazın biyofilm sürecine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, biyofilm oluşumunda enterokokal yüzey proteini ve jelatinazın etkisinin bulunmadığını ancak sinerjistik etkileriyle enfeksiyonu hızlandırdıklarını belirtmişlerdir. Kubota vd. (2008) *L. plantarum*, *L. brevis* ve *L. fructivorans* suşlarında biyofilm oluşumunu inceledikleri çalışmada, *L. plantarum*'un incelenen diğer türler arasında daha iyi biyofilm ürettiğini ve üretilen biyofilmin büyük bir direnç gösterdiğini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, Landeta vd. (2013)'nin çalışmasında *L. plantarum* Al-148, *L. coryniformis* Al-127 ve *L. paracasei* Al-120 suşları biyofilm oluşturma kapasitesi göstermiştir.

Bigeç (2015) Ankara'da tüketime sunulan 100 balık örneğinden izole edilen 150 *Enterococcus* izolatının, 19'u (%12,7) jelatinaz, 128'i (%85,3) DNaz ve 3'ü (%2) hemoliz pozitif bulunmuştur. *Enterococcus* izolatlarının mikropilaka kullanılarak yapılan biyofilm

değerlendirmesinde; Tryptic Soy Broth (TSB)'da 24 saat inkübasyon sonrası izolatların % 18,7'si kuvvetli pozitif, %52,7'si orta derecede pozitif, %24'ü zayıf pozitif ve %1,3'ü negatif biyofilm oluşumu göstermiştir. Gomez vd. (2016) Brezilya'da çeşitli gıdalardan izole ettikleri *L. lactis* VB69, *L. lactis* VB94, *L. sakei* MBSa1, *L. curvatus* MBSa3, *L. lactis* 368, *L. helveticus* 354, *L. casei* 40 ve *W. viridescens* 113 suşlarının *W. viridescens* 113 hariç güçlü biyofilm ürettiklerini tespit etmişlerdir. 1'in üzerinde en yüksek değerler *L. lactis* 368 (1,65), *L. helveticus* 352 (1,38) ve *L. lactis* 94 (1,10) için gözlenmiştir. Suşların geri kalanı için değerler 1'in altında belirlenmiştir.

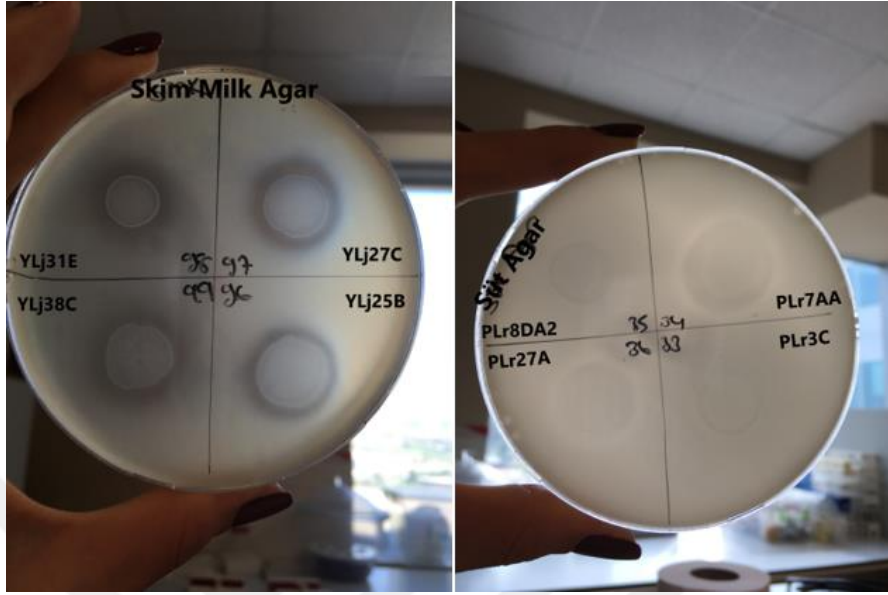
4.5. İzolatların Ekstraselüler Proteaz Üretimini Tespiti

Mikrobiyal proteazlar mikroorganizmaların sebep olduğu çok sayıda hastalıkta virülans faktör olarak ekstrasellüler enzim olarak görev yaparlar. Proteazlar pek çok patolojik olayda önemli rol oynarlar. Hücre dışına salınan proteazlar; konağın immün sistemi ile etkileşime girerek enfeksiyon gelişimine sebep olabilirler. Ekstraselüler proteinlerin biyofilm oluşumu, biyofilm yapısına katılma ve çoğunluğu algılama fonksiyonun da görevleri olabileceği belirtilmiştir (Flemming vd., 2010). İzolatların ekstraselüler proteaz üretimini skim milk agarda, süt agarda ve kazein agarda gösterdikleri sonuçlar **EK-3** (Tablo 4.3)'de verilmiştir (Şekil 4.5). Araştırmamızda incelenen izolatların 64 adedi skim milk agarda, 27 adedi süt agarda, 84 adedi ise kazein agarda zon oluşumu göstermiştir. Kazein agarda 28 tane suş 10 mm'den az, 56 tane suş ise 10-20 mm arası zon oluşturmuştur. Ölçülen zon çapları skim milk agarda 1,7-10,2, süt agarda 1,4-9,6 ve kazein agarda ise 1,6-20,6 mm arasında tespit edilmiştir. İncelenen 87 adet suşundan 25 adet *L. bulgaricus* (Pla29B, Pla31D, PLb10A2, PLb19A, PLc10A, PLc29A, PLj27B, PLj29E(B), PLr27A, YLa27B, YLj25B, YLj27C, YLj31E, YLj38C), 5 adet *L. fermentum* (PLc4A, PLc27E, YLa13B, YLa22A, YLa27A), 3 adet *L. lactis* (PLj24C(A), PLj27A, YLj63), *E. faecium* PLj35B(A), *L. casei* PLr35, *L. paracasei*(YLj14(A)) suşları her üç besiyerinde de zon oluşturmuştur. Her üç besiyerinde de zon oluşturmayan suş tespit edilmemiştir.

Çıtak vd. (2005) yapmış oldukları bir çalışmada, çiğ süt ve beyaz peynirden izole edilen *E. faecalis* suşlarının 7°C'de %91,8'i, 25°C'de %60,7'si, *E. faecium* suşlarının 7°C'de %71'i, 25°C'de %52,6'sı ve *E. durans* suşlarının 7°C'de %72,2'si, 25°C'de %38,9'u proteolitik aktivite göstermiştir.

Thapa vd. (2006)'nin çalışmasında ise, incelenen LAB izolatlarının proteaz, amilaz ve lipaz aktiviteleri araştırılmıştır. Bu izolatlar Doğu Himalayaların geleneksel

işlenmiş balık ürünlerinden izole edilmiştir. İzole edilen bütün suşların 2 mm'den fazla zon çapı ile yaklaşık 0,5-1,3 U/mL arasında proteolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.5. LAB'nin proteolitik aktivite deneyinde 48 saat sonrası oluşturdukları zon görüntüleri

Udomsil vd. (2010)'nin araştırmasında balık sosu püresinden izole edilen 74 halofilik LAB izolatından 7 tanesi %25 NaCl konsantrasyonunda proteolitik aktivite göstermiştir. Sahnouni vd. (2012) kıyı balıklarının mide bağırsak kanallarından izole edilmiş 67 LAB suşunun tümünün kazeini hidrolize edebildiklerini rapor etmişlerdir.

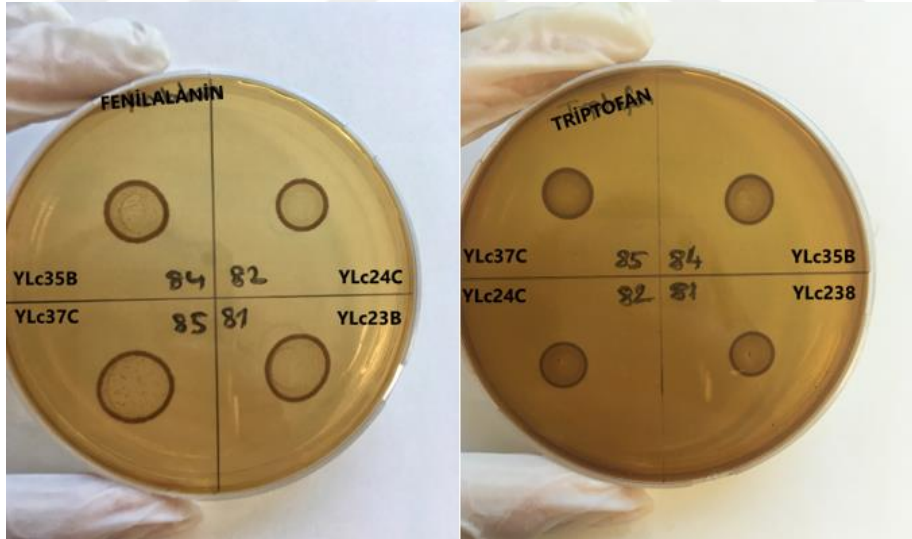
Bigeç (2015) Ankara'da tüketime sunulan 100 balık örneğinden izole edilen 150 *Enterococcus* izolatı'nın 4°C'de, 24 (%16)'ü kuvvetli pozitif, 73 (%48,7)'ü orta derecede pozitif, 26 (%17,3)'sı zayıf pozitif proteolitik aktivite, 20°C'de 31 (%20,7)'i kuvvetli pozitif, 13 (%8,7)'ü orta derecede pozitif, 4 (%2,7)'ü zayıf pozitif proteolitik aktivite, 37°C'de 42 (%28)'si kuvvetli pozitif, 42 (%28)'si orta derecede pozitif, 38 (%25,3)'i zayıf pozitif proteolitik aktiviteye sahip olduğunu tespit etmiştir.

4.6. Suşların Dekarboksilaz Aktivite Sonuçları

Mikroorganizmalardan dekarboksilaz aktivitesine sahip olanlar, gıdalarda bulunan amino asitleri enzimatik olarak dekarboksile ederek biyojen amin oluştururlar (Halasz vd., 1994). Fermente gıdalarda, amino asitlerin histidin, tirozin, lisin veya ornitin bakteriyel dekarboksilasyonu ile oluşan biyojenik aminler, son üründe istenmeyen lezzete yol açar ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir (Rajkovic ve Jokovica,

2015). Çalışmamızda 87 LAB suşunun 48 (%55,2) adet histidin ve fenilalanin, 53 (%60,9) adet tirozin, 50 (%57,5) adet ornitin, 46 (%52,9) adet triptofan ve 49 (%56,3) adet lizin dekarboksilaz aktivitesi göstermiştir. LAB'nin biyojen oluşturma özellikleri incelendiğinde; 16 adet *L. fermentum* (PLa31B(B), PLc23A1, PLc23A2, PLc27B, PLc27E, PLc31A, PLc38D, PLr1D, YLa22A, YLc12A, YLc23B, YLc24C, YLc35B, YLr12A, YLr15A, YLr16A), 3 adet *L. bulgaricus* (PLc29A, PLr46B, YLa27B) ve 1'er adet *L. lactis* PLr31C(B), *L. paracasei* PLj29C(A), *L. plantarum* PLj18A1 suşlarında araştırılan histidin, fenilalanin, tirozin, ornitin, triptofan ve lizin dekarboksilaz enzimlerinin tamamı belirlenmiştir. Araştırmada incelenen 29 adet *L. fermentum* suşunun 16 adedinin tüm biyojen aminlerde pozitif sonuca sahip olması dikkat çekicidir.

Bu sonuçların aksine *L. bulgaricus* (PLa2B, PLc19E, PLa24B, PLj27B, PLr27A, PLr31A, YLj15C(A), YLj25B), *L. lactis* PLr7A(A), *L. fermentum* (PLc4A, PLc35A, YLa13B, YLa37B), *P. acidilactici* PLr8D(A2) ornitin, histidin, tirozin, triptofan, fenilalanin ve lizini dekarboksile edememiştir. Bu bakterilerin biyojen amin üretimi açısından güvenilir olduğu söylenebilir (Şekil 4.6). Sonuçlar **EK-4** (Tablo 4.4)'de verilmiştir.



Şekil 4.6. LAB'nin dekarboksilaz aktivite değerlendirilmesinde zon görüntüleri

Sahnouni vd. (2012) kıyı balıklarının mide bağırsak kanallarından izole ettikleri 67 adet LAB suşunda sadece *L. lactis* subsp. *diacetylactis* BL10 hariç lizin, ornitin, histidin ve tirozin pozitif bulunmuştur. Bu sonuçlar bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

Drosinos vd. (2007) Yunanistan'ın güneyinde yer alan iki orta ölçekli işletmenin ürettiği fermente sosislerden 300 LAB suşu izole ederek 1 *L. sakei* suşunun lizin, tirozin, ornitin ve histidine karşı dekarboksilaz aktivitesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

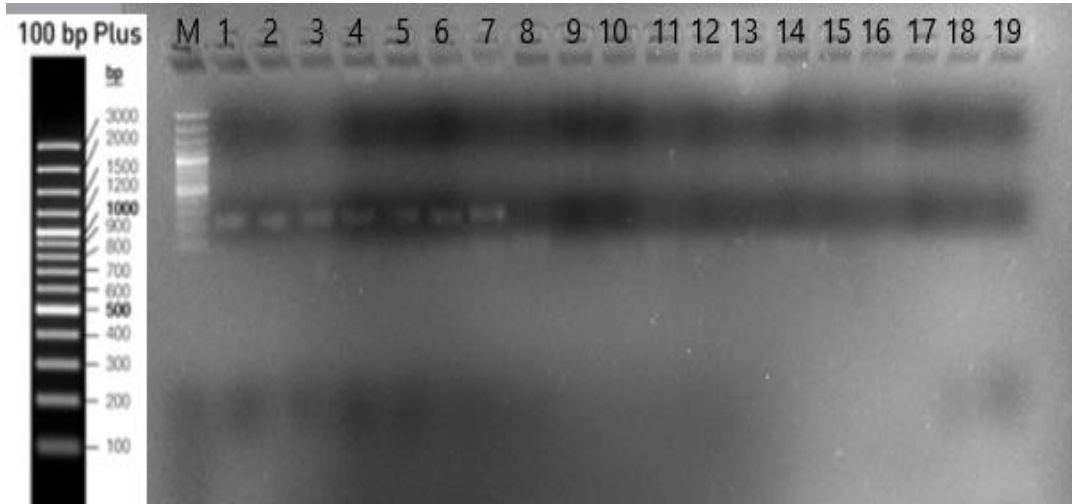
Ertürkmen ve Öner (2015), çiğ süttten üretilmiş beyaz peynirden izole edilen *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp. ve *Lactobacillus* spp. olmak üzere 77 LAB izolatlarının histidin, tirozin, lizin, ornitin, fenilalanin, triptofan dekarboksilaz aktiviteleri araştırmıştır. Çalışmada sadece, *Lactococcus* spp. PeLb58 izolatı tirozin aminoasidinin, PeLb62 izolatı ise triptofan aminoasidinin bulunduğu besiyerinde kırmızı kahve renk meydana getirmiş ve PeE26 izolatı tirozin aminoasidinin bulunduğu besiyerinde berrak zon oluşturmuştur. Ertürkmen vd. (2015) tarafından yapılan başka bir araştırmada ise, 20 peynir örneğinden izole edilen 161 LAB izolatının dekarboksilaz aktiviteleri incelenmiş, 59 *E. spp.*'nin 37'sinin (%62,71), 47 *Lc. spp.*'nin 4'ünün (%8,51), 55 *L. spp.*'nin 4'ünün (%7,27) tirozinden tiramin ve 55 *L. spp.*'nin 3'ünün (%5,45) triptofandan triptamin ürettiği belirlenmiştir. Araştırmacılar tarafından incelenen 108 suşun hiçbiri (%70,19) ornitin, histidin, tirozin, triptofan, fenilalanin ve lizini dekarboksile edememiştir. Bu izolatların peynir endüstrisi için uygun başlatıcı kültür olduğu düşünülmektedir.

da Silva Ferrari vd. (2016) keçi sütünden izole edilen 290 adet LAB izolatından farklı test sonuçlarına göre 4 tane suş seçilmiş ve tüm suşların triptofan, histidin, ornitin, lizin, fenilalanin, sistein, tirozin, arginin dekarboksilaz aktivitesine sahip olmadığı bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları; LAB'nin güvenilirliğinin belirlenmesinde suşların virülans faktörlerinin yanı sıra, biyojen amin üretim özelliklerinin dikkate alınmasının önemli olduğunu göstermektedir. Başlangıç kültürleri olarak dekarboksilaz aktivitesi gösteren suşların kullanımı, fermantasyon ürünleri üzerinde gıda güvenliği için dikkatli bir değerlendirme yapılmasını gerektirir. Halk sağlığı açısından dolayı, biyojen aminlerin konsantrasyonlarını ve oluşumlarını azaltma yollarını belirlemek önemlidir. Türkiye'de balık dışında gıdalarda biyojen aminler hakkında belirlenmiş yasal limitler bulunmamaktadır. Fakat, Hollanda, Avusturya, İsveç ve ABD gibi ülkelerde gıdaların biyojen amin üst sınırları belirlenmiştir. Biyojen aminlerin insan sağlığı üzerine olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak ve/veya azaltmak için ülkemizde günlük diyetle sıkça tüketilen gıdaların biyojen amin kompozisyonları araştırılıp, yasal düzenlemeler yapılmalıdır (Ercan vd., 2017).

4.7. LAB İzolatlarında PZR ile Virülans ve Amino Asit Dekarboksilaz Direnç Geni Tarama Sonuçları

LAB'nin virülans ve amino asit dekarboksilaz gen taraması sonucunda 20 adet *L. bulgaricus* (PLa2B, PLa4A, PLa19E, PLa24B, PLa27C, PLa36C, PLb10A2, PLc3A, PLj1C(A), PLj23B, PLj27B, PLj35B(A), PLr27A, PLr3C, PLr31A, PLr42B1, YLa27B, YLj21C, YLj25B, YLj38C), 3 adet *L. lactis* (PLj24C(A), PLj27A, PLr31C(B)), 14 adet *L. fermentum* (PLc23A1, PLc23A2, PLc27B, PLc27E, PLc35A, YLa13B, YLa18B, YLa22A, YLa27A, YLc4A, YLc12B, YLc20A, YLc23B, YLc24C), 2 adet *L. rhamnosus* (PLc23B(A), PLj14A) ve *E. faecium* YLj25A suşlarında gen bölgeleri bulunmuştur (Tablo 4.5).

Jelatinaz üretimini kodlayan *gelE* primerleri kullanılarak yapılan taramada, 87 adet LAB izolatlarının 7 tanesinde *gelE* bölgesi saptanmıştır. Tespit edilen bu gen bölgesi sadece peynir örneklerinden izole edilen LAB'da fiksasyon vermiştir. Saptanan bu *gelE* bölgelerinin 5 tanesi *L. bulgaricus* (PLa2B, PLa19E, PLr27A, PLr42B1, PLj27B), 1'eri ise *L. rhamnosus* PLc23B(A) ve *L. lactis* PLr31C(B) suşlarına aittir. *gelE* primeri yaklaşık 213 bp uzunluğundadır. PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.7'de verilmiştir.



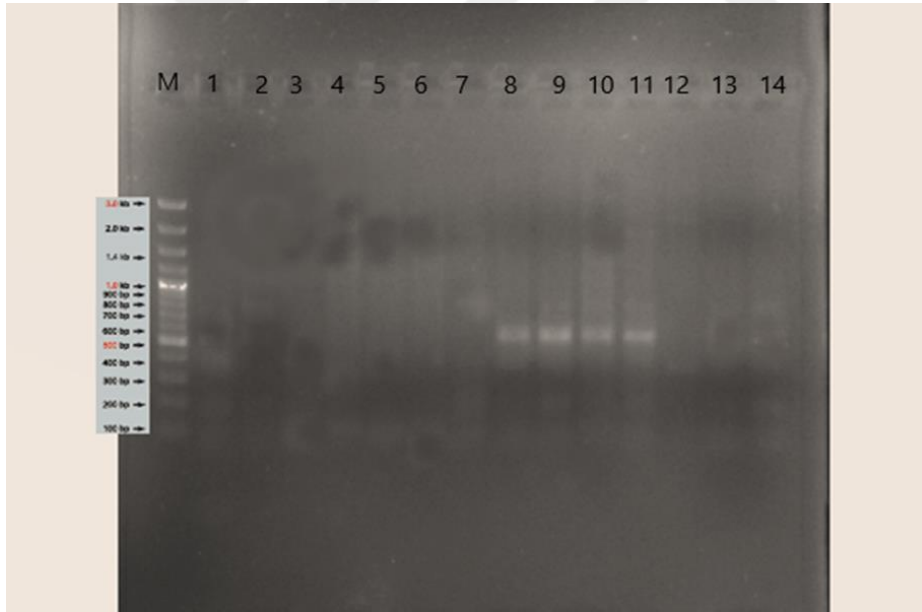
Şekil 4.7. LAB izolatlarının *gelE* gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bp DNA marker, 1: *L. bulgaricus* PLa2B, 2: *L. rhamnosus* PLc23B(A), 3: *L. bulgaricus* PLa19E, 4: *L. bulgaricus* PLr27A, 5: *L. lactis* PLr31C(B), 6: *L. bulgaricus* PLr42B1, 7: *L. bulgaricus* PLj27B, 19: negatif kontrol)

Fenotipik olarak jelatinaz üretimi gösteren 48 izolatın 7 adedinde genotipik olarak *gelE* geni saptanmıştır. Konakçı dokuları bozarak biyofilm oluşumunda rol oynayan

bakterilere besin sağladığı düşünülen *gelE* geninin diğer pozitif bakterilerde tespit edilememesinin, bu çalışmada analiz edilen suşlarda bulunan düşük biyofilm oluşumu insidansı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. *L. rhamnosus* PLc23B suşunda besiyeri ortamında jelatinaz aktivitesi tespit edilmezken, *cylA* gen pozitif bulunmuştur.

Zou vd. (2011) 117 adet *E. faecalis* izolatında *gelE* genini en yaygın virulans geni olarak bulurken, Çopur vd. (2016) *Enterococcus*'larda *gelE* genini %12,9, Mete vd. (2017) *gelE* genini %7,9 olarak tespit etmişlerdir. Van Kerckhoven vd. (2004) ise çalışmalarında LAB'nde *gelE* genini tespit edememişlerdir. Bizim çalışmamızda ise *gelE* geni %8,0 olarak bulunmuştur.

Sitolizin gen bölgesini kodlayan *cylA* primerleri kullanılarak yapılan taramada, çalışılan izolatların dört tanesinde *cylA* bölgesi saptanmıştır. Saptanan bu *cylA* gen bölgelerinin 4 tanesinde *L. bulgaricus* (PLr3C, YLa27B, YLj25B, YLj38C) suşlarına aittir. *cylA* primeri yaklaşık 688 bp uzunluğundadır. PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8. LAB izolatlarının *cylA* gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bp DNA marker, 8: *L. bulgaricus* PLr3C, 9: *L. bulgaricus* YLa27B, 10: *L. bulgaricus* YLj25B, 11: *L. bulgaricus* YLj38C, 14: negatif kontrol)

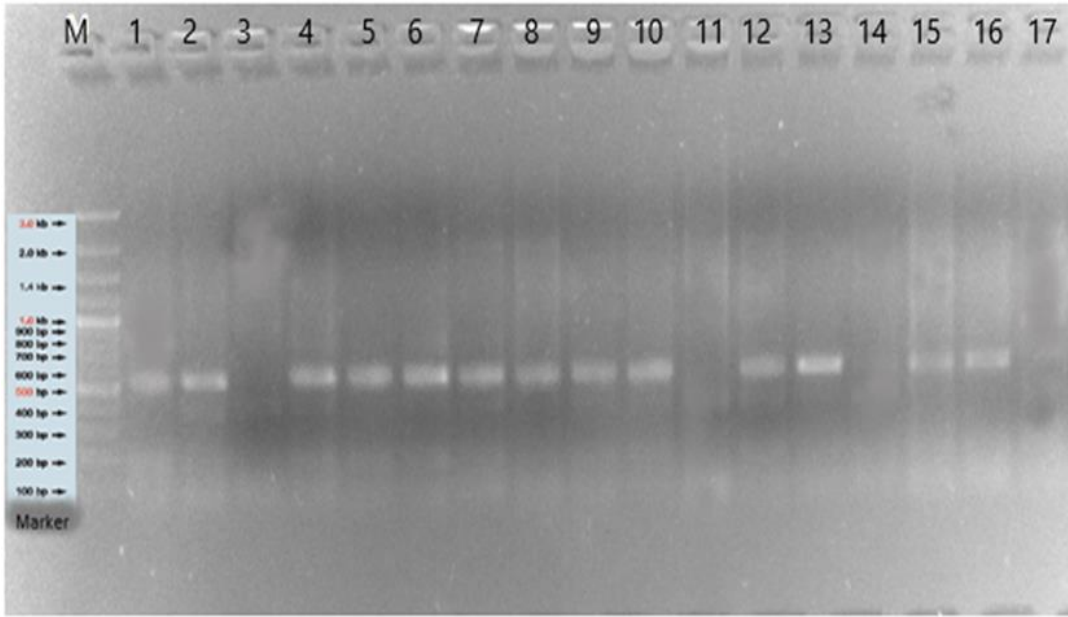
Sitolizini (hemolizin) kodlayan *cylA* gen bölgesi, karakterize edilen en önemli enterokok virulans faktörlerinden biridir. Gıdalarda istenmeyen beta-hemolitik özelliklere sahip kültürlerin ve gıda fermantasyonunda başlangıç kültür olarak kullanılması önerilmez (Fifadara vd., 2003). Sitolizinler bağışıklık hücreleri de dahil olmak üzere

ökaryotik hücrelerde çeşitli türlere karşı litik aktiviteye sahiptir. *E. faecalis* sitolizini ile ilgili birçok çalışma, bu molekülün insan ve model sistemlerde enfeksiyonu şiddetlendirdiğini göstermektedir (Van Tyne vd., 2013).

Gomez vd. (2008) *E. faecalis* suşlarında %88 ile yüksek *cylA* gen insidansı tespit ederken, Hussein (2013) %25 ile daha düşük insidans tespit etmiştir. Yoğurt örneklerinde *cyclA* geninin sırasıyla %16,7 ve *E. faecalis* ve *E. faecium*'da %57,1 oranında tespit edildiği bulunmuştur. Abd El Tawab vd. (2016) yoğurt örneklerinden elde edilen *E. faecalis*'de *cyclA* genini tespit edememiştir (Shafeek vd., 2018). Bizim çalışmamızda %4,6 *cylA* geni tespit edilmiştir. İncelenen 2 adet *E. faecium* suşunda *cylA* geni tespit edilmemiştir.

Semedo vd. (2003) hemolitik aktivite ve virülans *cyl* genlerinin varlığını 26 referans suş, insan ve veteriner kökenli 42 klinik izolat, 96 koyun peyniri/süt izolatlarından *Enterococcus* cinsine ait 20 farklı türden 164 adet suş kullanarak incelenmişlerdir. Araştırmacılar spesifik primerler kullanılarak *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA* genlerini taramışlardır. 10 türde beta-hemolitik ve 14 türde *cyl* genleri pozitif bulunmuştur. beta-hemolitik aktivite, 26 (%23) referans suşun 6'sında, 42 (%33) klinik izolatın 14'ünde ve 96 (%6) gıda izolatının 6'sında tespit edilmiştir. *cyl* genleri ise, 26 (%58) referans suşun 15'inde, 42 (%88) klinik izolatın 37'sinde ve 96 (%70) gıda izolatının 67'sinde bulunmuştur. Araştırmacıların elde ettikleri bu veriler, gıda izolatlarında virülans potansiyelin belirlenmesi için güvenlik değerlendirmesi amacıyla yapılan çalışmalara duyulan ihtiyacı güçlendirmektedir. Klinik ve gıda izolatları karşılaştırıldığında, klinik izolatlarda belirgin bir şekilde daha yüksek beta-hemolitik ve *cyl* genotipi bulunmuştur. Bu sonuçlar literatürdeki diğer çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir (Elsner vd., 2000; Franz vd., 2001). Bununla birlikte, gıda izolatlarında gözlenen *cyl* genlerinin yüksek sıklığı (%70), virülans potansiyellerine ve güvenlik değerlendirme ihtiyacına işaret etmektedir.

Enterokokal yüzey proteinini kodlayan *esp* primerleri kullanılarak yapılan taramada, çalışılan izolatların on üç tanesinde *esp* bölgesi saptanmıştır. Saptanan bu *esp* gen bölgelerinin 7 tanesi *L. bulgaricus* (PLa4A, PLa24B, PLa27C, PLa36C, PLb10A2, PLc3A, PLr31A), 4 tanesi *L. fermentum* (PLc35A, YLa27A, YLc12B, YLc20A), 1'er tanesi ise *L. rhamnosus* PLc23B(A) ve *E. faecium* YLj25A suşlarına aittir. *esp* primeri yaklaşık 510 bp uzunluğundadır. PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.9'da verilmiştir.

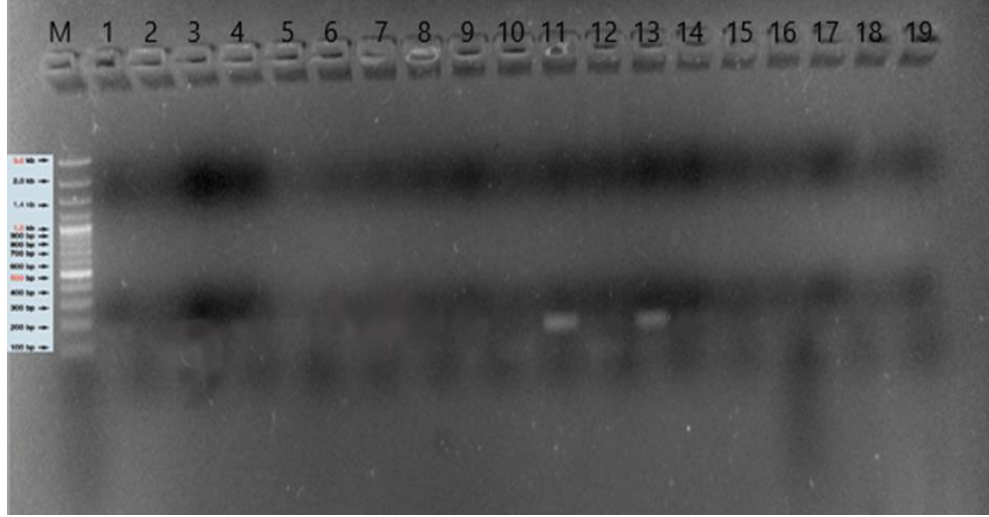


Şekil 4.9. LAB izolatlarının *esp* gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bç DNA marker, 1: *L. bulgaricus* PLa4A, 2: *L. rhamnosus* PLc23B(A), 4: *L. bulgaricus* PLa24B, 5: *L. bulgaricus* PLa27C, 6: *L. bulgaricus* PLa36C, 7: *L. bulgaricus* Lb10A2, 8: *L. bulgaricus* PLc3A, 9: *L. fermentum* PLc35A, 10: PLr31A, 12: *L. fermentum* YLa27A, 13: *L. fermentum* YLc12B, 15: *L. fermentum* *L. bulgaricus* YLc20A, 16: *E. faecium* YLj25A, 17: negatif kontrol)

Archimbaud vd. (2002) endokardit ve bakteriyemi izolatlarında *esp*'nin varlığını bildirmişlerdir. Al-Talib vd. (2015) Malezya'da yaptıkları çalışmada 222 enterokok izolatında *esp* genini araştırmışlar ve tüm izolatlarda %45,5 pozitiflik tespit etmişlerdir. Strateva vd. (2016) kan zehirlenmesi ile seyreden klinik örneklerden izole edilen *E. faecalis* izolatlarında *esp* genini %33,3, invaziv olmayan örneklerde ise %54,3 olarak bulmuşlardır. Çopur vd. (2016) ise LAB'nde *esp* genini tüm izolatlarda %78,4, Mete vd. (2017) ise %32,3 olarak saptamışlardır.

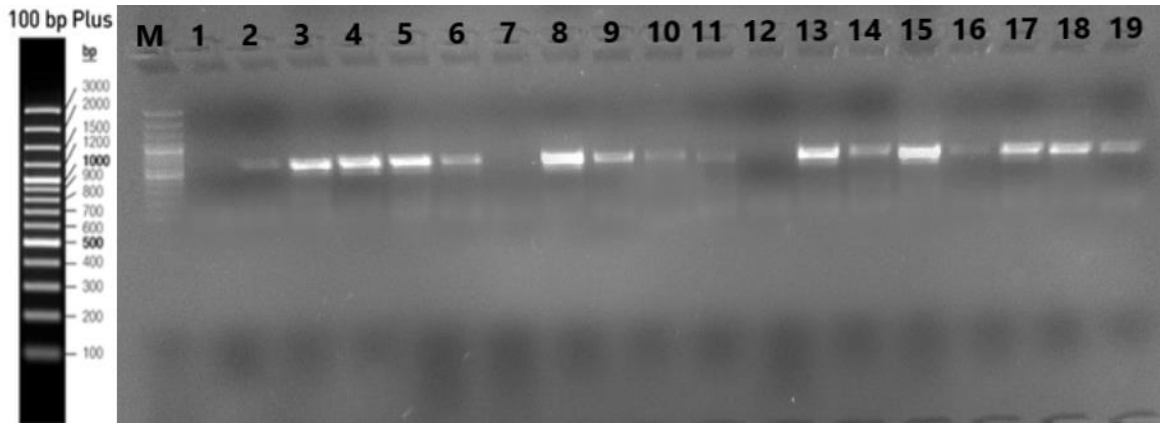
Creti vd. (2004) endokardit izolatlarında *esp* ve *cylA*'yı kodlayan genleri bulamamış ancak, *esp* geninin idrar yolu enfeksiyonu ve bakteriyemi izolatları arasında bir olduğunu belirtmişlerdir.

Araştırmamızda hiyalüronidaz enzimini kodlayan *hyl* primerleri kullanılarak yapılan taramada, çalışılan izolatların 2 adedinde *hyl* bölgesi saptanmıştır. Saptanan bu *hyl* gen bölgeleri *L. bulgaricus* PLj23B ve *L. rhamnosus* PLj14A suşlarına aittir. *hyl* primeri yaklaşık 276 bç uzunluğundadır. PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.10'da verilmiştir.



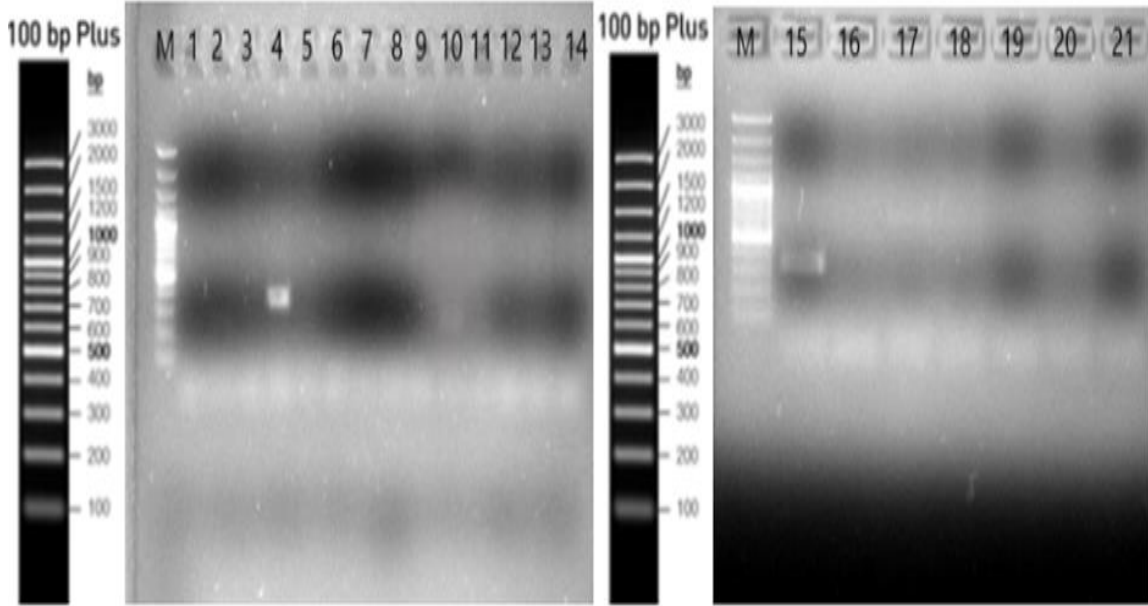
Şekil 4.10. LAB izolatlarının *hyl* gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bç DNA marker, 11: *L. bulgaricus* PLj23B, 13: *L. rhamnosus* PLj14A, 19: negatif kontrol)

Endokardit antijenini kodlayan *efaA* primerleri kullanılarak yapılan taramada, çalışılan izolatların 16 adedinde *efaA* bölgesi saptanmıştır. Saptanan bu *efaA* gen bölgesinin 11 adedi *L. fermentum* (PLc23A1, PLc23A2, PLc27B, PLc27E, PLc35A, YLa13B, YLa18B, YLa22A, YLc4A, YLc23B, YLc24C), 3 adedi *L. lactis* (PLr31C(B), PLj24C(A), PLj27A) ve 2 adedi *L. bulgaricus* (PLr42B1, PLj1C(A)) suşlarına aittir. *efaA* primeri yaklaşık 688 bç uzunluğundadır. PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.11’da verilmiştir.



Şekil 4.11. LAB izolatlarının *efaA* gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bç DNA marker, 2: *L. fermentum* PLc27E, 3: *L. fermentum* PLc35A, 4: *L. lactis* PLr31C(B), 5: *L. bulgaricus* PLr42B1, 6: *L. bulgaricus* PLj1C(A), 8: *L. lactis* PLj24C(A), 9: *L. fermentum* YLa13B, 10: *L. fermentum* YLa22A, 11: *L. fermentum* YLc4A, 13: *L. fermentum* YLc23B, 14: *L. fermentum* YLc24C, 15: *L. fermentum* PLc23A1, 16: *L. fermentum* PLc23A2, 17: *L. fermentum* PLc27B, 18: *L. lactis* PLj27A, 19: *L. fermentum* YLa18B, 12: negatif kontrol)

Histidin dekarboksilaz amino asidini kodlayan *hdc* primerleri kullanılarak yapılan taramada, çalışılan izolatların 2 adedinde *hdc* bölgesi saptanmıştır. Saptanan bu *hdc* gen bölgesi *L. bulgaricus* PLj35B(A) ve YLj21C suşlarına aittir. *hdc* primeri yaklaşık 367 bp uzunluğundadır. PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. LAB izolatlarının *hdc* gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bp DNA marker, 4: *L. bulgaricus* PLj35B(A), 15: *L. bulgaricus* YLj21C, 21: negatif kontrol)

Tirozin dekarboksilaz amino asidini kodlayan *tdc*, kolajen bağlayıcı proteini *ace* ve agregasyon maddesini kodlayan *asaI* gen bölgeleri çalışılan 87 adet LAB'nin hiçbirinde tespit edilememiştir.

Zonenschain vd. (2009) Kuzey İtalya'nın Piacenza eyaletinde üretilen fermente kuru sosislerden izole edilen 312 laktobasil kolonisinden 7 *Lactobacillus* türüne ait *L. sakei*, *L. curvatus* ve *L. plantarum* türlerine ait 60 farklı LAB suşunda %45 *tetM*, %16,6 *tetW*, %1,6 *tetS*, %38,3 *ermB* ve %3,3 *ermC* genleri bulunmuştur. Tüm suşlarda *tetL* geni negatiftir. Tetrasikline dirençli izolatlarda *tetM*'nin yüksek insidansı, bu genin fermente edilmiş kuru sosislerden (Gevers vd., 2003b) izole edilen ve doğrudan domuz etinden (Garofalo vd., 2007) ekstrakte edilen DNA'daki *Lactobacillus* spp. (Klare vd., 2007) arasındaki geniş dağılımı ile uyumludur. Zou vd. (2011), 2007 ve 2009 yılları arasında Çin'de farklı domuz çiftliklerinden alınan 502 klinik örneklerden izole edilen toplam 117 adet *E. faecalis* izolatında *gelE* (%69,23), *ace* (%48,72), *efaA* (%15,38), *asaI* (%7,69) ve

esp (%6,84) virülans genlerini tespit etmişlerdir. İzolatların hiçbirinde *cylA* ve *hyl* genleri tespit edilmemiştir. Creti vd. (2004) klinik izolatlardan, sağlıklı bireylerden ve çevreden *E. faecalis* suşlarını izole ederek, virülans faktör genlerini taramışlardır. Tüm suşlarda %44,6 *esp*, %23 *cylA*, %63,5 *asaI*, %74,3 *gelE* geni bulunurken, tüm suşlarda *ace* ve *efaA* genleri pozitif belirlenmiştir. *gelE* pozitif izolatlar, klinik ve gıda hayvanı izolatlarında, Dupre vd. (2003), Martin-Platero vd. (2009) ve Belgacem vd. (2010) tarafından yapılan araştırmalarla uyumludur. Bununla birlikte, diğer virülans genleri *efa*, *esp* ve *asaI* gen bölgeleri ile ilgili bulunan sonuçlar diğer araştırmacılar tarafından klinik ve hayvansal gıda izolatları üzerinde rapor edilen verilere zıttır (Creti vd., 2004; De Marques ve Suzart 2004; Martin vd., 2005; Hallgren vd., 2009; Martin-Platero vd., 2009; Valenzuela vd., 2009). Hayvansal gıda izolatları üzerinde yapılan başka bir çalışmada bildirildiği üzere, tüm izolatlarda *cylA* ve *hyl* genleri tespit edilmemiştir (Martin vd., 2005). Virülans genler ve antimikrobiyal direnç, gıda kaynaklı enterokok enfeksiyonlarda rapor edilmiş olsa da, gıda suşlarına aktarılabilme ihtimalleri bulunmaktadır (Valenzuela vd., 2009). Omar vd. (2004) İspanya’da farklı gıdalardan izole ettikleri enterokokların hemolitik, jelatinaz, DNaz aktiviteleri göstermediklerini ve *cylL*, *ace*, *asaI*, *esp* virülans genleri bulundurmadıkları tespit edilmiştir.

asaI virülans geni sistemik enfeksiyonların gelişmesini kolaylaştıran bakterilerin ökaryot yüzeylere bağlanmasına izin veren bir virülans faktörüdür. Hallgren vd. (2009) *E. faecalis* izolatlarında *asaI* genini %79 olarak bulmuşlar ve *E. faecium* izolatlarında pozitiflik bulamamışlardır. Baylan vd. (2011)’nin çalışmasında *asaI* gen pozitifliği *E. faecium* izolatlarında saptanmazken, *E. faecalis* izolatlarında %40,7 olarak bulunmuştur. Sharifi vd. (2013) *E. faecalis* izolatlarında *asaI* genini %69,6, *E. faecium* izolatlarında %8 olarak bulmuşlardır. Mete vd. (2017) *asaI* genini *E. faecalis* izolatlarında %58, *E. faecium* izolatlarında %25,3 olarak tespit etmişlerdir.

Moraes vd. (2012) çiğ süt ve peynirden izole ettikleri *Enterococcus* türlerinin virülans aktivitelerini araştırmışlardır. İzolatların %45’i jelatinaz üretmiştir. İzolatların %93’ü beta-hemolitik aktivite gösterirken, hiçbiri alfa-hemolitik ve DNaz aktivitesi göstermemiştir. Suşlarda *asaI* (%100), *gelE* (%93,0), *efaA* (%83,7), *esp* (%50), *cylA* (%10), *ace* (%25), *hyl* (%25), *hdcI* (%25) ve *tdc* (%55) virülans gen bölgeleri bulunmuştur. Ayrıca, 2 izolatta *vanA* ve 1 izolatta *vanB* genleri belirlenmiştir. Genel olarak, incelenen virülans faktörlerin pozitif sonuç sıklığı, gıdalardan izole edilen *Enterococcus* ile ilgili diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Gomez vd., 2008; Barbosa vd., 2010). Gıdalardan elde edilen pozitif sonuçların klinik izolatlarla yapılan

çalışmalara göre daha düşük olduğu belirtilmiştir (Barbosa vd., 2010). Fas'ın kuzeyinden toplanan çiğ keçi sütlerinden *E. hirae* türlerine ait F420 suşları tanımlanıp *asa1*, *hyl*, *cylA*, *esp*, *gelE*, *efaA* ve *ace* virülans genlerini içermedikleri tespit edilmiştir. Tüm suşlar jelatinaz üretmemiş ve hemolitik aktivite göstermemiştir. *E. hirae* F420'nin tirozin, histidin, lizin veya ornitini dekarboksile edemediği görülmüştür (Achemchem, 2012).

Landeta vd. (2013) İspanyol kuru-sertleştirilmiş sosislerden izole ettikleri LAB suşlarında *tetM*, *ace*, *gelE*, *asa1*, *esp*, *cylA*, *hyl*, *hypR*, *hdc*, *tdc*, *odc* ve *ldc* gen bölgeleri için tüm suşlar negatif bulunurken, sadece *efaA* virülans geni analiz edilen tüm suşlarda (Al-79 suşu hariç) tespit edilmiştir. Biyojen amin üretimi sonuçları, çoğu *E. faecium* suşunun ve *L. sakei* Al-142'nin tiramin ürettiğini göstermiştir. Bu enterokoklarda tiramin üretimindeki yüksek insidans, farklı araştırmacılar tarafından rapor edilen sonuçlarla uyumludur (Komprda vd., 2010). Landeta vd. (2013)'nin çalışmasında, *E. faecium* Al-74, Al-75, Al-79 ve Al-87 suşlarında tirozin dekarboksilaz geninin varlığı için pozitif (De las Rivas vd., 2006) iken, tiramin üretimi için negatif (García-Moruno vd., 2005) sonuç vermiştir. Bu anlamda, Munoz-Atienza vd. (2011) benzer şekilde, gen ekspresyonu olmaması nedeniyle tirozin dekarboksilaz genine sahip olan enterokoklarda, tiramin üretimini rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise fenotipik olarak % 60,9 tirozin üreten suşlar *tdc* geni açısından negatif bulunmuştur.

Ribeiro vd. (2014) Portekiz'de Pico peynirinden elde edilen 1 adet *Lc. lactis* ve 7 adet *E. faecalis* olmak üzere toplam 8 LAB suşunda potansiyel patojenitesini, virülans faktörlerini kodlayan dokuz genin varlığının araştırılmasıyla incelemiştir. Virülans genlerinin hiçbiri *Lc. lactis* suşunda tespit edilmemiştir. Enterokoklardan 5 suş *gelE*, 6 *asa1*, 5 *ace*, 3 *esp*, 4 *cylA*, 2 *hdc*, 4 *tdc* ve 5 *efaA* genlerini kodlayan virülans özellikler bulunmuştur. Tüm izolatlar *hyl* ve *hdcI* genleri için negatiftir. Bizim çalışmamızda ise *E. faecium* türüne ait 2 suş vardır. Bu suşlar araştırılan virülans ve amino asit dekarboksilaz direnç genlerinden hiçbiri tespit edilmemiştir.

Gomez vd. (2016) Brezilya'da çeşitli gıdalardan izole ettikleri *L. lactis* (VB69, VB94, 368), *L. sakei* MBSa1, *L. curvatus* MBSa3, *L. helveticus* 354, *L. casei* 40 ve *W. viridescens* 113'ün bazı virülans gen bölgelerini incelemiştir. *L. curvatus* MBSa3, *L. lactis* VB94, VB69 ve *L. casei* 40 suşlarında *esp* ve *efaAfm*, *L. helveticus* 352'de *Agg* ve *cpd* genleri bulunurken, *L. lactis* 368 suşunda sadece *cpd* geni amplifiye edilmiştir. *W. viridescens* 113 suşunda *efaAfm*, *cob* ve *gelE* gen bölgeleri bulunmuştur. *W. viridescens* 113 hariç tüm suşlar *gelE* için negatif bulunmuş ve suşların hiçbirinde tespit edilmemiştir. Suşlar *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA* ve *ccf* genleri için negatif bulunmuştur.

Domingos-Lopes vd. (2017) endokardit antijenini kodlayan *efaA* genini *Lactobacillus* türlerinin %68,2'sinde, 3 *Lactococcus*'un 3'ünde ve 5 *Leuconostoc*'un 4'ünde belirlemişlerdir. Bu türlere bağlı nadir endokardit vakaları bildirilmiştir (Zechini vd., 2006). *gelE*, *asaI*, *esp*, *cylA*, *ace*, *vanA* ve *vanB* virülans genleri *Lactobacillus* suşunda ve *cylA*, *asaI*, *hdc2* ve *ace* genleri *Leuconostoc* suşlarında bulunmuştur. Tüm enterokok izolatlarında, *gelE* (%77), *asaI* (%63), *efaA* (%99), *ace* (%94), *cylA* (%32), *esp* (%33) gibi virülans faktör genleri bulunmuştur. *vanA*, *vanB* ve *hdc2* dirençleri \leq %5 oranında tespit edilmiştir. Bazı araştırmacılar tarafından virülans genleri taşıyan enterokok suşlarının yüksek sıklıkta görülmesini, kültürlerin Manchego ve Brezilya geleneksel peynirlerinde bulunan mikrofloranın bir parçası oldukları için vurgulayarak tüketiciler açısından herhangi bir belirgin risk oluşturmadığına yönelik raporlar bulunmaktadır (Nieto Arribas vd., 2011; Moraes vd., 2012). Bununla birlikte, bu türlerin yaygın olarak birkaç geleneksel süt, şarap ve sebze fermantasyonları için başlangıç kültürleri olarak gıdaların mikrobiyal topluluklarında uzun süreli güvenli kullanım öyküleri vardır (EFSA, 2007). Domingos-Lopes vd. (2017)'nin çalıştıkları 114 LAB izolatu içinden 1 adet *Leu. mesenteroides* ve 5 adet *L. paracasei* subsp. *paracasei*'yi içeren sadece 6 suş tüm virülans genleri için negatif sonuç vermiştir. Bu bağlamda, bu suşlar gıda fermantasyonlarında başlangıç/yardımcı kültürler olarak güvenli kullanım için iyi birer aday olarak gösterilebilirler. Bizim çalışmamızda ise çalışılan *Lactobacillus* türlerinde *efaA* (%19,0), *esp* (%14,3), *gelE* (%8,3), *cylA* (%4,8), *hdc* (%2,4) ve *hyl* (%2,4) virülans faktör genleri bulunmuştur. *tdc*, *ace*, *asaI* genleri için ise tüm suşlarda negatif sonuç elde edilmiştir.

Mrkonjic-Fuka vd. (2017) olgunlaşma dönemlerinde çiğ süttten üretilen Istria peynirinden *E. faecium* (%53,8) ve *E. faecalis* (%42,4), *E. durans* (%2,84) ve *E. casseliflavus* (%0,95) suşları olmak üzere 588 adet *Enterococcus* izolatu tanımlamışlardır. Çok sayıda suş, tetrasiklin (%43,56), eritromisin (%35,79) ve vankomisin (%23,48) gibi kritik öneme sahip antibiyotiklere dirençli bulunmuştur. PZR ile yapılan antibiyotik gen taramasında vankomisin ve eritromisin direnç belirleyicilerin hiçbiri tanımlanmamış ancak; tetrasiklin için *tetM* geni tespit edilmiştir. Virülans direnç genlerinden *Agg*, *efaAfs*, *gelE*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *esp*, *efaAfm*, *cob* ve *cpd* özellikle *E. faecalis* suşları arasında sıklıkla tespit edilmiştir.

Todorov vd. (2017) Bulgarların geleneksel fermente edilmiş "lulanka" salamından 13 adet *L. plantarum*, 4 adet *L. brevis* ve 4 adet *L. sakei* olmak üzere toplam 21 LAB izole ederek, bu bakterilerde virülans faktörleri biyojenik amin üretimi ve vankomisin

direnci ile ilgili genlerin varlığı araştırılmıştır. Antibiyotik direnç genlerinden 21 izolattın 3'ünde *vanB* geni bulunurken, tüm suşlar *vanA* geni için negatif tespit edilmiştir. 21 LAB izolatında 1 *gelE*, 2 *hyl*, 21 *tdc*, 2 *ace* virülans genleri tespit edilirken *asaI*, *esp*, *cylA*, *efa* ve *hyl* gen bölgeleri bulunmamıştır.

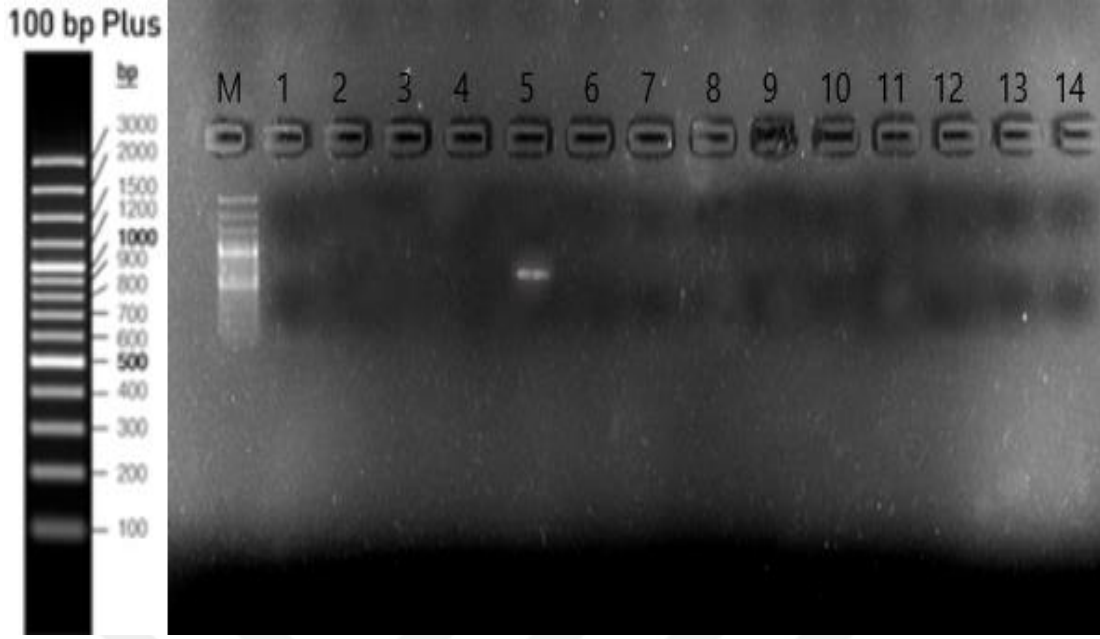
Shafeek vd. (2018)'nin araştırmasında, Mısır'daki Qena şehrinde yoğurt, Kareish peyniri, dondurma, çiğ inek sütü ve yerel olarak üretilen bazı süt ürünleri dahil olmak üzere çeşitli süt ürünleri süpermarketlerden toplanarak, 150 adet *Enterococcus* türleri izole edilmiş, bu bakteriler multipleks PZR ile bazı virülans genlerin (*gelE*, *asaI*, *esp* ve *cylA*) varlığı açısından taranmıştır. Sonuçlar *E. faecalis* izolatlarında %53,9 *gelE*, %76,9 *asaI*, %69,2 *esp* ve %30,8 *cylA*; *E. faecium* izolatlarında ise %46,9 *gelE*, %71,9 *asaI*, %53,1 *esp* ve %34,3 *cylA*'nın olduğunu göstermiştir. *asaI* ve *esp* genleri, araştırılan tüm enterokok suşları arasında en sık görülen virülans özellikleridir ve bunu *gelE* ve *cylA* genleri takip etmektedir. Bu nedenle, bu çalışmanın sonuçları, süt ve süt ürünlerinin *Enterococcus* türlerinin gıda zincirinden insan popülasyonuna virülans potansiyeli ile yayılmasında önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Channaiah vd. (2018) 6 yem değirmeni ve 2 çiftlikten toplam 108 domuz yeminden *E. casseliflavus* (%54,8), *E. gallinarum* (%17,8), *E. faecium* (%17,8), *E. hirae* (%5,8) ve *E. faecalis* (%3,8) olmak üzere toplam 208 enterokok suşu ile çalışmıştır. İzolatların *gelE* (%18,2), *esp* (%2,4) ve *cylA* (%2,4) gen bölgeleri taşıdıkları bulunmuştur.

Biscola vd. (2018) Brezilya zanaat peynirinden izole edilen *P. acidilactici* VB90, *W. viridescens* VB111 ve *E. faecalis* VB43 olmak üzere 3 LAB suşunda *asaI*, *ace*, *gelE*, *agg*, *efaA*, *hyl*, *esp*, *cylLL* ve *cylLS* virülans genlerini araştırmışlardır. *E. faecalis* VB43 suşunun *ace* ve *gelE*, *P. acidilactici* VB90 ve *W. viridescens* VB111 suşlarının ise *asaI*, *ace*, *gelE*, *agg* gen bölgeleri taşıdıkları tespit edilmiştir.

4.8. LAB İzolatlarında PZR ile Antibiyotik Direnç Geni Tarama Sonuçları

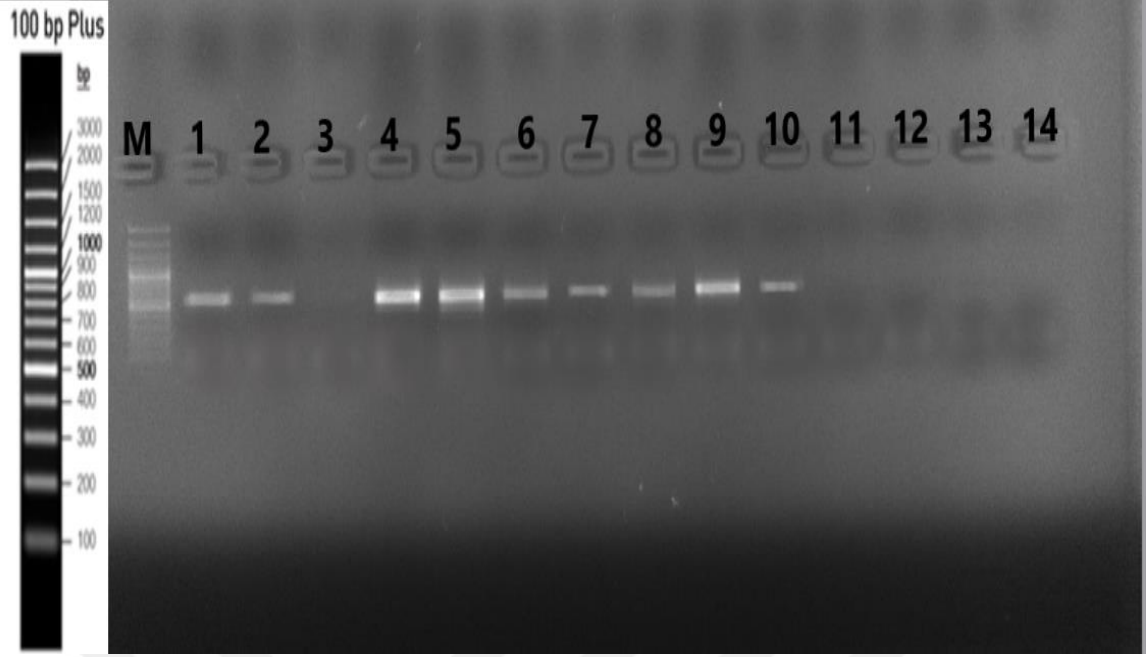
Araştırılan antibiyotik gen bölgeleri 13 adet *L. fermentum* (PLc23A1, PLc23A2, PLc27B, PLc31A, PLc38D, PLr1D, YLa22A, YLa22B, YLc23B, YLc24C, YLc35B, YLr12A, YLr15A), *L. rhamnosus* PLj14 ve *E. faecium* YLj25A suşlarında tespit edilmiştir.

Eritromisin antibiyotik genini kodlayan *ermA* primerleri kullanılarak yapılan taramada, çalışılan 87 suştan sadece *L. rhamnosus* PLj14A'da *ermA* bölgesi saptanmıştır. *ermA* primeri yaklaşık 645 bp uzunluğundadır. PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.13'de verilmiştir.



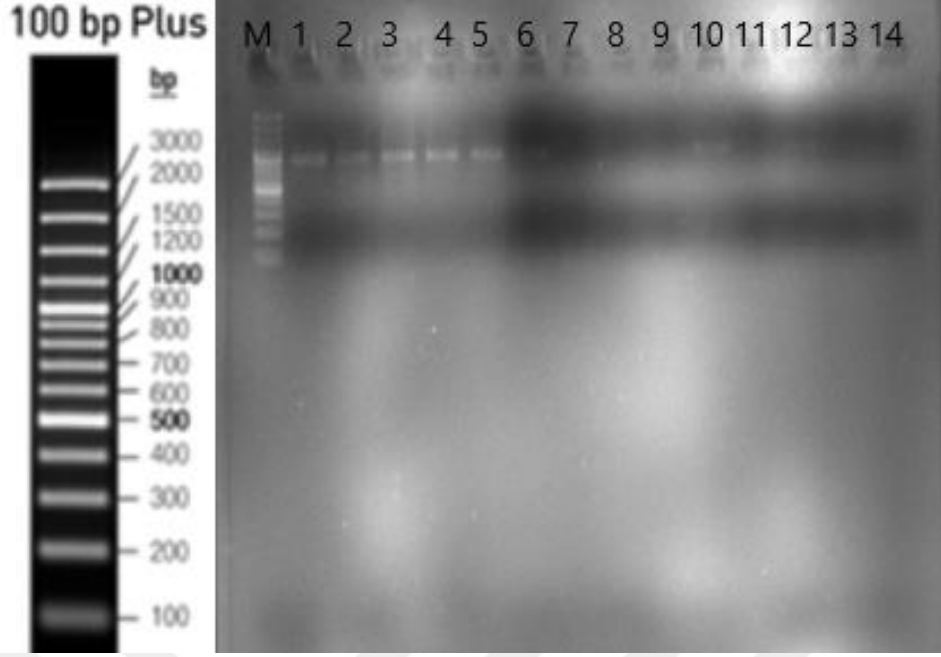
Şekil 4.13. LAB izolatlarının *ermA* antibiyotik gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bç DNA marker, 5: *L. rhamnosus* PLj14A, 14: negatif kontrol)

Eritromisin antibiyotik gen bölgesini kodlayan *ermB* primerleri kullanılarak yapılan taramada, çalışılan 87 bakterinin 9 adedinde *ermB* antibiyotik direnç gen bölgesi saptanmıştır. Saptanan bu *ermB* gen bölgesi *L. fermentum* (PLc23A1, PLc23A2, PLc31A, PLr1D, YLa22A, YLc23B, YLc35B, YLr12A, YLr15A) suşlarına aittir. *ermB* primeri yaklaşık 639 bç uzunluğundadır. PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.14. LAB izolatlarının *ermB* antibiyotik gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bç DNA marker, 1: *L. fermentum* YLa22A, 2: *L. fermentum* YLc23B, 4: *L. fermentum* YLc35B, 5: *L. fermentum* YLR12A, 6: *L. fermentum* YLR15A, 7: *L. fermentum* PLc23A1, 8: *L. fermentum* PLc23A2, 9: *L. fermentum* PLc31A, 10: *L. fermentum* PLr1D, 14: negatif kontrol)

Vankomisin antibiyotik direnç genini kodlayan *vanB* primerleri araştırıldığında ise, çalışılan 87 izolatın 5 adedinde *vanB* antibiyotik direnç gen bölgesi saptanmıştır. Saptanan bu *vanB* gen bölgesinin 4 tanesi *L. fermentum* (PLc27B, PLc38D, YLa22B, YLc24C) ve 1 tanesi ise *E. faecium* YLj25A suşlarına aittir. *vanB* primeri yaklaşık 994 bç uzunluğundadır. PZR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.15. LAB izolatlarının *vanB* antibiyotik gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması ile elde edilmiş jel görüntüsü (M: 100bç DNA marker, 1: *E. faecium* YLj25A, 2: *L. fermentum* YLa22B, 3: *L. fermentum* YLc24C, 4: *L. fermentum* PLc27B, 5: *L. fermentum* PLc38D, 14: negatif kontrol)

87 suşta *ermC*, *cat*, *aac(6')-aph(2'')*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetS*, *tetQ*, *vanA*, *vanC* ve *vanX* antibiyotik direnç gen bölgeleri taranmış olup, suşların hiçbirinde ilgili genler tespit edilmemiştir.

Çataloluk ve Gögebakan'ın 2004 yılında yaptıkları çalışmaya göre insan ve gıda orjinli laktobasillerin çoğunluğunda (%61,96) *tetM* ve *ermB* genleri yaygın bulunmuştur. Çalışmada dirençli suşlar *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri* ve *L. plantarum* olarak belirtilmiştir. Huys vd. (2004) Avrupa'daki peynirlerden izole edilen enterokoklarda tetrasiklin direncinin *tetM* geniyle ilişkili olduğunu ve izolatların aynı zamanda Tn916-Tn1545 ailesine dahil konjugatif transpozon içerdiğini belirtmişlerdir.

Kastner vd. (2006) İsviçre'de mikrobiyal gıda katkı maddelerindeki mevcut antibiyotik direnç durumunu belirlemek için 90 farklı kaynaktan alınan 74 adet *Lactobacillus*, 33 adet *Staphylococcus*, 6 adet *Bifidobacterium*, 5 adet *Pediococcus* ve 82 adet laktokok/streptokok olmak üzere 200 izolattan, et başlatıcı kültürleri olarak kullanılan 5 adet *Staphylococcus* izolatında *tetK*, probiyotik kültür olan *B. lactis* DSM 10140 ve *L. reuteri* SD 2112'de ise tetrasiklin dirençli *tetW* genini tespit etmişlerdir.

Ouoba vd. (2008)'nin Afrika ve Avrupa kökenli çeşitli LAB ve bifidobakterilerin antibiyotik dirençleri, bu direncin *in vitro* transferi ile ilgili yaptığı çalışmada, bu izolatlarda yüksek oranda fenotipik aminoglikozid direnci saptanmıştır. Avrupa

izolatlarında aminoglikozid direncini kodlayan *aac(6')-aph(2'')* ve tetrasiklin direncini kodlayan *tetS* genlerine rastlanmıştır. Aynı çalışmada Afrika izolatu *L. reuteri* L4:12002 suşunun *ermB* geni taşıdığı ve bu geni *E. faecium* JH2-2 suşuna aktarabildiği belirtilmiştir. İzolatlar *ermC*, *aac(6')-aph(2'')*, *vanA*, *vanB*, *vanX*, *tetM*, *tetL*, *tetQ*, *tetK* ve *tetO* antibiyotik direnç genleri ise tespit edilmemiştir. Egervarn vd. (2009)'nin yaptığı çalışmada ise, 28 *L. reuteri* suşunun 24'ünde *tetW* geni ve yüksek tetrasiklin MİK değerleri bulunmuştur. Ayrıca 6 suşun 4'ünde eritromisin için yüksek MİK değerleri ve *ermB*, *ermC* ve *ermT* genleri belirlenmiştir. Bunun yanında 2 adet *L. plantarum* suşunda da yüksek MİK değeri ve plazmidde kodlanan *tetM* geni bulunmuştur. Çalışmada real-time PZR ve southern blot analizleri ile *tetW* pozitif *L. reuteri* suşu ile *ermB* pozitif *L. reuteri* suşlarındaki direnç genlerinin plazmitlerin üzerinde taşındığı bildirilmiştir. Clementi ve Aquilanti (2011), laktokokların antibiyotik direnç/duyarlılık profillerini araştırmışlar ve bazı suşların *tetM* ve *ermT* genleri taşıdığı, çiğ süttten yapılan peynirden izole edilen K214 suşunun en azından 3 farklı plazmid yerleşimli kloramfenikol, tetrasiklin ve streptomisin direnç geni taşıdığı belirtilmiştir. *tetS* geninin varlığı *Leu. citreum* için bildirilmiştir. *ermB* geni *P. acidilactici*'nin üç suşunda tespit edilirken, yine aynı bakterinin bir izolatında *aac(6')-aph(2'')* geni saptanmıştır.

Frazzon vd. (2010) Brezilya'nın güneyindeki gıda örneklerinden *Enterococcus* izolasyonu yapmışlar ve bu izolatların antibiyotik dirençliliklerini araştırmışlardır. Suşların tümü vankomisine duyarlı bulunurken, yüksek oranda tetrasiklin ve eritromisin direnci belirlenmiştir. En sık rastlanan genotip ise *tetL* geni ile birlikte ya da tek başına *tetM* geni olarak bulunmuştur.

Comunian vd. (2010) farklı coğrafi bölgelerden gelen İtalyan fermente ürünlerden izole ettikleri *L. paracasei* 197 izolatının, tetrasiklin ve eritromisin duyarlılığını değerlendirmişlerdir. İzolatlar tür seviyesinde tanımlanarak genotipik olarak toplam 121 farklı suş tespit edilmiş ve bunların etken antibiyotiklere karşı direnci belirlenmiştir. Fenotipik olarak dirençli izolatlarda *ermB*, *ermC* ve *tetL*, *tetM*, *tetS*, *tetW* genlerinin varlığı PZR ile araştırılmış. Test edilen 121 suştan %77,7'si tetrasikline ve %94,2'si eritromisine duyarlı bulunmuştur. Fenotipik olarak tetrasikline dirençli suşlarda %81,4 *tetM* ve %22,2 *tetW* genleri belirlenirken *tetL* ve *tetS* genleri tespit edilememiştir. Fenotipik olarak eritromisine dirençli 7 suşun tamamında *ermB* saptanırken, izolatların hiçbirinde *ermC* geni bulunamamıştır. Çalışmada *L. paracasei*'nin tetrasiklin ve eritromisine karşı oldukça duyarlı olduğu ancak *ermB* pozitif suşların yüksek seviyede direnç gösterdiği doğrulanmıştır. Araştırmacılar *L. paracasei* izolatlarında tanımlanan

genlerin yatay olarak diğere türlere transfer edilip edilmeyeceğini analiz etmek için ileri araştırmalara ihtiyaç duyulduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise, 87 izolattan yalnızca iki tanesi *L. paracasei* türüne aitti ve bu suşta araştırılan antibiyotik direnç genlerinin hepsi negatif bulunmuştur.

Pan vd. (2011) 11 tane Çin fermente gıdasından LAB izolasyonu yaparak, bu izolatlarda kloramfenikol, kanamisin, tetrasiklin, siprofloksasin, ampisilin, klindamisin ve eritromisin olmak üzere klinik açıdan önemli 7 antibiyotiğe karşı direnci araştırmışlardır. Antibiyotiğe dirençli 200 LAB izolatu içinde 14'nün 7 antibiyotiğe karşı MİK'leri araştırılmıştır. Birden çok direnç gözlenen bu 14 suşta PZR yöntemi ile direnç genleri aranmıştır. *tetM* ve *ermB* genlerinin her ikisinde plazmidik ya da kromozomal bulunurken, *aphA3* geni sadece plazmidik, *mefA* geni ise sadece kromozomal olarak bulunmuştur. Bunun dışında *gyrA*, *blaZ* ve *catIP501* genleri bulunamamıştır. Sonuçlar, LAB'nin antibiyotik dirençliliğinin gıdalara ve çevreye yayılmasında büyük rol oynamadığını göstermiştir. Nawaz vd. (2011)'nin Çin'de yaptıkları başka bir çalışmada ise, LAB suşları *Lactobacillus* spp. ve *Str. thermophilus* olarak belirlenmiştir. Bütün suşlar ampisilin, basitrasin ve sefsulodine duyarlı ve *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* ve *Str. thermophilus* dışındaki suşlar nalidiksik asit, kanamisin ve vankomisine doğal dirençli bulunmuştur. Bazı suşların penisillin, eritromisin, klindamisin ve tetrasikline dirençli oldukları görülmüştür. *ermB* gen varlığı *L. fermentum*, *L. vaginalis*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. acidophilus*, *L. animalis* ve *Str. thermophilus* suşlarının her birinde gözlenmiştir. *tet* geni geleneksel gıdalardaki 12 laktobasil suşunda bulunmuş olup, ilk kez *L. brevis* ve *L. kefir*'de *tetS* genini tanımlamışlardır. *L. fermentum* NWL24 ve *L. salivarius* NWL33'deki *ermB* geninin ve *L. plantarum* NWL22 ve *L. brevis* NWL59'daki *tetM* geninin filtre yöntemi ile başarılı bir şekilde *E. faecalis* 181'e transfer edildiğini bildirmişlerdir. Zhou vd. (2012) tarafından Çin'de farklı coğrafyalardan alınan yoğurtlardan 43 LAB izole edilerek 18'inin *L. bulgaricus* ve 25'inin *Str. thermophilus* olduğu tespit edilmiştir. PZR yöntemi ile aranan direnç genleri sonucunda, 1 adet *L. bulgaricus* ve 2 adet *Str. thermophilus* izolatında *tetM*, 2 adet *L. bulgaricus* ve 2 adet *Str. thermophilus* izolatında *ant6*, 5 adet *L. bulgaricus* ve 2 adet *Str. thermophilus* izolatında ise *aph(3')-IIIa* genleri bulunmuştur. *L. bulgaricus* ve *Str. thermophilus* suşlarında ilk kez *aph(3')-IIIa* ve *ant(6)* genleri tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise *L. rhamnosus* (PLj14A) suşunda *ermA*, 9 adet *L. fermentum* (PLc23A1, PLc23A2, PLc31A, PLr1D, YLa22A, YLc23B, YLc35B, YLr12A, YLr15A) suşunda *ermB*, 4 adet *L. fermentum*

(PLc27B, PLc38D, YLa22B, YLc24C) ve 1 adet *E. faecium* YLj25A suşlarında ise *vanB* genleri tespit edilmiştir.

Thumu ve Halami (2012), farklı gıda örneklerinden eritromisine dirençli LAB'ni izole etmişlerdir. *E. durans*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *P. pentosaceus* ve *Leu. mesenteroides* türleri olarak tanımlanan 60 izolatın %88'inde *ermB* geni tespit etmişlerdir. Effluks *msrA* geni *E. faecium*, *E. durans*, *E. lactis*, *E. casseliflavus*, *P. pentosaceus* ve *L. fermentum* izolatlarında tanımlanmıştır, ayrıca *msrA* geni için yapılan sekans analizi sonucunda *msrC* geniyle homolojisi ortaya çıkmıştır. *Lactobacillus* türlerinde tetrasiklin direnci *tetM*, *tetW*, *tetO*, *tetK* ve *tetL* genlerinin biri ya da bunların kombinasyonu ile oluşmakta olduğu belirlenmiştir. *tetK* ve tetrasiklin effluks *tetL* geni olarak *P. pentosaceus* ve *Enterococcus* türlerinde bulunmuştur. Landeta vd. (2013) ise kuru kürlenmiş sosislerden izole ettikleri LAB içinden başlatıcı kültürler seçerek teknolojik ve güvenilirlikleri ile ilgili özellikleri analiz etmişlerdir. *E. faecium* antibiyotiklere karşı en dirençli suşları gösterirken, *L. sakei* en duyarlı suş olarak bulunmuştur. Virülans faktörleri ile ilgili olarak, analiz edilen *E. faecium* suşlarında da sadece *efaA* geninin varlığı saptanmıştır.

Özteber (2013) Aydın Merkez'de yer alan mandıralardan, marketlerden, halk pazarlarından ve ev üretimi olan alınan fermente süt ürünlerinden izole ettiği 168 adet LAB izolatının antibiyotik direnç profillerini araştırmıştır. *ermB* primerleri kullanılarak yapılan taramada, 94 adet *Lactobacillus* türü izolatın bir tanesinde (GLM 77) *ermB* bölgesi saptanmıştır. *tetL* primerleri kullanılarak yapılan taramada, 94 adet *Lactobacillus* türü izolatının bir tanesinde (GLM 185) *tetL* bölgesi saptanmıştır. *tetM* primerleri kullanılarak yapılan taramada, 94 adet *Lactobacillus* türü izolatın 2 tanesinde (GLM 77 ve GLM 209) *tetM* bölgesi saptanmıştır. *Lactobacillus* türü 94 izolatta *aac(6')-aph(2'')*, *cat*, *ermA*, *ermC*, *tetK*, *tetS*, *tetQ*, *vanC* ve *vanX* bölgeleri taranmış olup, hiçbirinde ilgili genler tespit edilememiştir. *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinsi toplam 11 izolatta *aac(6')-aph(2'')*, *cat*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetS*, *tetQ*, *vanA*, *vanB*, *vanC* ve *vanX* bölgelerinin hepsi taranmış olup, hiçbirinde ilgili genler tespit edilememiştir. *aac(6')-aph(2'')* primerleri kullanılarak yapılan taramada, 20 adet *Enterococcus* türü izolatın bir tanesinde (GLM 132) *aac(6')-aph(2'')* bölgesi saptanmıştır. *tetM* primerleri kullanılarak yapılan taramada ise, 20 adet *Enterococcus* türü izolatın bir tanesinde (GLM 183) *tetM* bölgesi saptanmıştır. *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* türlerine özgü olan *vanC* geni *vanC* primerleri kullanılarak 20 adet *Enterococcus* türünde aranmıştır. *E. gallinarum* GLM 129 ve GLM 157 suşlarında *vanC* bölgesi tespit edilmiştir. *Enterococcus* türü 20

izolatta *cat*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *tetK*, *tetL*, *tetS*, *tetQ*, *vanA*, *vanB* ve *vanX* bölgeleri taranmış olup, hiçbirinde ilgili genler tespit edilmemiştir. Vankomisine dirençli iki enterokok suşunda *vanC* geni saptanırken, gentamisin ve tetrasikline dirençli bulunan GLM 132 ve GLM 183 suşlarında sırasıyla *aac(6')-aph(2'')* ve *tetM* genleri bulunmuştur. 183 izolatta antibiyotik direnç genlerinin bulunma oranları %4,76 *ermB*, %0,59 *ermC*, %7,14 *tetM*, %2,38 *tetL*, %0,59 *tetK*, %5,95 *aac(6')-aph(2'')* ve %1,19 *vanC* olarak belirtilmiştir.

Ribeiro vd. (2014) çalışmalarında *vanB* genini *Enterococcus* suşlarının hiçbirinde tespit etmemiş ve *vanA* geninin varlığı için sadece üç suş pozitif sonuç göstermiştir. Terkuran vd. (2014) Adana bölgesinde gıdalardan izole edilen 51 *Enterococcus* spp. ile klinik orijinli 50 *E. faecium* türlerinin vankomisin direnç paternlerini araştırdıkları çalışmalarında, maruldan elde edilen bir izolat dışında, tüm gıda izolatlarının vankomisine dirençli olduğu ancak izolatların hiçbirinin *vanA* ve *vanB* geni taşımadığı saptanmıştır. Klinik izolatların ise tamamının vankomisine dirençli olduğu, %84'ünün *vanA*, %2'sinin *vanB* genlerini taşıdığı; %14'ünün ise *vanA* ve *vanB* direnç genlerini taşımadığını tespit etmişlerdir.

Federici vd. (2014) Orta İtalya'nın Marche Bölgesinde üretilen Ciauscolo salamından elde edilen 186 LAB ve laboratuvarlarına ait LAB suşlarının antibiyotik dirençlilik özelliklerini incelemişlerdir. Suşlar değişken antibiyotik dirençleri göstermelerine rağmen, test edilen tüm antibiyotikler için genel olarak direnç seviyesi %15'i aşmıştır. Ciauscolo örneklerinden izole edilen LAB'da dirençli bakterilerin değişken bir yüzdesi bulunmuştur. Özellikle, bakterilerin %88,09'u streptomisine ve %16,67'si klindamisin'e dirençli bulunmuştur. *Lactobacillus* suşları streptomisin ve gentamisin gibi aminoglikozidlere karşı yüksek direnç göstermiştir. Bununla birlikte, laktobasiller özellikle klindamisin ve eritromisin için duyarlı bulunmuştur. Streptokoklar arasında, suşların çoğunda gentamisin ve kloramfenikole karşı direnç görülmüştür. Ampisiline dirençli olan tek suş *Lc. spp.* 35380-3 olarak tespit edilmiştir. Tüm *Pediococcus* suşları ampisilin, streptomisin ve tetrasikline dirençli iken, sadece bir suşun klindamisine ve 3 suşun eritromisine duyarlı olduğu görülmüş. İzolatlar arasında direnç belirleyicileri olarak *tetM*, *tetW*, *tetK*, *tetL*, *tetS*, *ermA*, *ermB*, *vanA* ve *vanB* gen bölgeleri taranarak analiz edilen suşlar arasında 4 adet *P. pentosaceus* 34910-6, 60211-1, 29448-7, 60211-2 ve 9 adet *Lactococcus* spp. 35380-3 suşunda *tetM* geni tespit edilmiştir. *ermB* *L. johnsonii* 35156-2, *P. pentosaceus* 12971-2, *L. paraplantarum* 35156-5 ve *E. faecalis* 18156-3'te belirlenirken, laboratuvar suşları arasından *tetL* (%5) geni sadece *L.*

rhamnosus ATCC 7469'da tespit edilmiştir. Antibiyotik gen bölgelerinden *tetW*, *tetK*, *tetS*, *ermA*, *vanA* ve *vanB* gen bölgeleri hiçbir suşta bulunmamıştır. Bu veriler Ammor vd. (2007) tarafından bildirilen farklı ortamlardan izole edilen LAB ve bifidobakterilerde benzer direnç genlerinin yüzdesi (%22,5) ile uyumludur. Öte yandan, Çataloluk ve Gögebakan (2004) raporuna göre Türkiye'den izole edilen insan ve gıda orjinli laktobasillerin çoğunluğunda (%61,96) *tetM* ve *ermB* genleri yaygın bulunmuştur. Dirençli suşlar *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri* ve *L. plantarum* olarak belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ise sadece *L. fermentum* suşlarında *ermB* geni bulunmuştur.

Akgül vd. (2016) Van ili ve ilçelerinde halk elinde yetiştiriciliği yapılan tavuklardan ve Van Gölü Havzasının değişik noktalarında insanlarla ilişki halinde olan martı popülasyonlarından alınan dışkı örneklerinden 311 enterokok izole etmişlerdir. İzolatların 9 (%2,9)'u fenotipik olarak vankomisine dirençli bulunurken, 20 (%6,4)'sinde genotipik olarak vankomisin dirençlilik geni (*van*) belirlenmiştir. Bunlardan 6 *E. faecalis* 1'i tavuk, 5'i martı orijinli 6 adet *E. faecalis* ve martı orjinli 3 adet *E. faecium* suşunun *vanA*, 6 adet *E. casseliflavus/gallinarium* suşunun *vanC1* 2 tavuk, 4'ü martı orjinli 6 adet ve tavuk orjinli 5 adet *E. casseliflavus/gallinarium* suşunun ise *vanC2/3* geni taşıdığını tespit etmişlerdir. Martı izolatlarında *vanC2/3* genlerine rastlanmazken, tavuk ve martı orijinli tüm izolatlar *vanB* geni açısından negatif bulunmuştur.

Yapılan başka bir çalışmada, Tayland'ın Chiang Rai şehrinden toplam 120 Tay fermente domuz eti örneğinden 119 adet enterokok izole edilmiştir. En sık görülen türler *E. faecalis* (%68,9), *E. hirae* (%16,0), *E. faecium* (%13,4) ve *E. gallinarum* (%1,7) olarak belirlenmiştir. İzolatların *aacA-aphD*, *addE*, *ermB*, *mefA/E*, *cat*, *tetL* ve *tetM* antibiyotik direnç genlerini taşıdığı bulunmuştur. Virülans genlerden en sık amplifiye edilen *gelE* (%37,8) geni olarak bulunmuştur (Chotinantakul vd., 2018). Channaiah vd. (2018) ise enterokoklarda *tetM* (%52,8), *tetO* (%14,4), *tetK* (%1,0), *tetS* (%0,5), *ermB* (%10,6) gen bölgeleri olduğunu rapor etmişlerdir. Ledina vd. (2018) geleneksel Sırp çığ süt peynirlerinden elde edilen (Homolje, Sjenica, Zlatar) 156 adet *Lactobacillus* suşlarında tetrasiklin direncinin varlığını araştırmışlardır. Sadece bir *L. paracasei* suşu *tetM* geninin varlığını gösterirken, diğer analiz edilen *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetK*, *tetL*, *tetO* ve *tetW* genleri suşlarda tespit edilmemiştir.

LAB'nin virülans, amino asit dekarboksilaz ve antibiyotik gen taraması sonuçlarında 21 adet *L. fermentum* (PLc23A1, PLc23A2, PLc27B, PLc27E, PLc31A, PLc35A, PLc38D, PLr1D, YLa13B, YLa18B, YLa22A, YLa22B, YLa27A, YLc4A,

YLc12B, YLc20A, YLc23B, YLc24C, YLc35B, YLr12A, YLr15A), 20 adet *L. bulgaricus* (PLa2B PLa4A, PLa19E, PLa24B, PLa27C, PLa36C, PLb10A2, PLc3A, PLj1C(A), PLj23B, PLj27B, PLj35B(A), PLr3C, PLr27A, PLr31A, PLr42B1, YLa27B, YLj21C, YLj25B, YLj38C), 3 adet *L. lactis* (PLj24C(A), PLj27A, PLr31C(B)), 2 adet *L. rhamnosus* (PLc23B(A), PLj14A) ve *E. faecium* YLj25A suşunda gen bölgeleri bulunmuş; 20 adet *L. bulgaricus* (PLa18B, PLa23B, PLa29B, PLa31D, PLb19A, PLc10A, PLc29A, PLj29E(B), PLj35A, PLr46B, YLa12B, YLa27C, YLa31A, YLj15C(A), YLj22A, YLj27C, YLj31E, YLr26A, YLr26A(B), YLr31A), 9 adet *L. fermentum* (PLa31B(B), PLc4A, PLc27B(A), PLr2B, YLa16C, YLa37B, YLc12B, YLc37C, YLr16A), 3 adet *L. rhamnosus* (PLc36A(A), PLj6B, PLj6B1), 2'şer adet *L. lactis* PLr7A(A), YLj63) ve *L. paracasei* (PLj29C(A), YLj14A(A)), 1'er adet *E. faecium* PLj35B(A1), *P. acidilactici* PLr8D(A2), *L. plantarum* PLj18A1, *L. casei* PLr35B suşlarında ise araştırılan gen bölgeleri tespit edilmemiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Virülans, amino asit dekarboksilaz ve antibiyotik gen taraması sonucunda pozitif sonuç veren LAB suşları

İzolatlar	<i>gelE</i>	<i>esp</i>	<i>efaA</i>	<i>cylA</i>	<i>hyl</i>	<i>hdc</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>vanB</i>
<i>L. bulgaricus</i>									
PLa2B	+	-	-	-	-	-	-	-	-
PLa4A	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PLa19E	+	-	-	-	-	-	-	-	-
PLa24B	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PLa27C	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PLa36C	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PLb10A2	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PLc3A	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PLj1C(A)	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PLj23B	-	-	-	-	+	-	-	-	-
PLj27B	+	-	-	-	-	-	-	-	-
PLj35B(A)	-	-	-	-	-	+	-	-	-
PLr27A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
PLr3C	-	-	-	+	-	-	-	-	-

İzolatlar	<i>gelE</i>	<i>esp</i>	<i>efaA</i>	<i>cylA</i>	<i>hyl</i>	<i>hdc</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>vanB</i>
PLr31A	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PLr42B1	+	-	+	-	-	-	-	-	-
YLa27B	-	-	-	+	-	-	-	-	-
YLj21C	-	-	-	-	-	+	-	-	-
YLj25B	-	-	-	+	-	-	-	-	-
YLj38C	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i>									
PLj24C(A)	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PLj27A	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PLr31C(B)	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. fermentum</i>									
PLc23A1	-	-	+	-	-	-	-	+	-
PLc23A2	-	-	+	-	-	-	-	+	-
PLc27B	-	-	+	-	-	-	-	-	+
PLc27E	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PLc31A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PLc35A	-	+	+	-	-	-	-	-	-
PLc38D	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PLr1D	-	-	-	-	-	-	-	+	-
YLa13B	-	-	+	-	-	-	-	-	-
YLa18B	-	-	+	-	-	-	-	-	-
YLa22A	-	-	+	-	-	-	-	+	-
YLa22B	-	-	-	-	-	-	-	-	+
YLa27A	-	+	-	-	-	-	-	-	-
YLc4A	-	-	+	-	-	-	-	-	-
YLc12B	-	+	-	-	-	-	-	-	-
YLc20A	-	+	-	-	-	-	-	-	-
YLc23B	-	-	+	-	-	-	-	+	-
YLc24C	-	-	+	-	-	-	-	-	+

İzolatlar	<i>gelE</i>	<i>esp</i>	<i>efaA</i>	<i>cylA</i>	<i>hyl</i>	<i>hdc</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>vanB</i>
YLc35B	-	-	-	-	-	-	-	+	-
YLr12A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
YLr15A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>L. rhamnosus</i>									
PLc23B(A)	+	+	-	-	-	-	-	-	-
PLj14A	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>E. faecium</i>									
YLj25A	-	+	-	-	-	-	-	-	+

Farklı süt ve yoğurt örneklerinden daha önce izole edilmiş olan 87 adet LAB'nde; hemolitik aktivite, jelatinaz, DNaz, amino asit dekarboksilaz üretimi, biyofilm oluşumu, ekstraselüler proteaz aktivitesi bulunmaması ve virülans genlerden *gel*, *hyl*, *asa1*, *esp*, *cylA*, *efaA*, *ace*, amino asit dekarboksilazları için; *hdc* ve *tdc* genleri, antibiyotik direnç genleri için ise; *ermA*, *ermB*, *ermC*, *aac(6')* *aph(2'')*, *cat*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetS*, *tetQ*, *tetX*, *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanX* gen bölgelerinin tespit edilmemesine göre 20 adet LAB suşları güvenilir olarak kabul edilmektedir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. LAB'nin hemolitik aktivite, jelatinaz üretimi, DNaz üretimi, amino asit dekarboksilaz üretimi, biyofilm oluşumu, ekstraselüler proteaz aktivitesi, virülans, amino asit dekarboksilaz ve antibiyotik gen taraması sonuçlarına göre güvenilir kabul edilen izolatlar

<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>L. lactis</i>	<i>L. plantarum</i>
PLa18B	PLc27B(A)	PLc23B(A)	PLr8D(A2)	PLr7A(A)	PLj18A1
PLa23B	PLr2B	PLc36A(A)			
PLc36A	YLa16C	PLj6B			
YLa12B	YLa37B	PLj6B1			
YLa27C					
YLa31A					
YLj15C(A)					
YLj22A					
YLr26A(B)					

Munoz-Atienza vd. (2013) balık ve balık ürünlerinden 59 adet *Enterococcus* ve 40 adet *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Weissella* türlerine ait 99 adet LAB suşunu izole ederek, bu suşların güvenilirlik özelliklerini araştırmışlardır. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Weissella* ve 50 adet *Enterococcus* türüne ait izolatların hiçbiri hemolitik aktivite göstermemiştir. Jelatinaz aktivitesi *E. faecalis*'de %71 ve *E. faecium* suşlarında %11 oranında bulunurken, hemolitik aktivite *E. faecalis*'te %5 bulunmuş, *E. faecium* suşlarının ise hiçbirinde tespit edilmemiştir. *E. faecalis* suşunda %100 ve *E. faecium* suşunda %79 oranında antibiyotik direnci ve virülans faktörlerine dayanan güvenlik kaygıları tespit edilmiştir. Antibiyotik direnci ayrıca %60 *Weissella*, %44 *Pediococcus*, %33 *Lactobacillus* cinslerinde tespit edilmiş ve *Leuconostocs*, *Lactococcus* suşlarında bu genler tespit edilmemiştir. Antibiyotik direnç genleri ise %12,5 *Pediococcus* ve %6,7 *Weissella* dahil olmak üzere enterokokların % 7,5'inde bulunmuştur. *gelE*'yi barındıran 15 adet *E. faecalis* suşunda %71 pozitif jelatinaz reaksiyonu bulunmuştur. *E. faecium* suşlarında %45 *efaAfs*, %8 *agg*, %24 *gelE* tespit edilirken, suşların hiçbiri *hyl* ve *esp* virülans genlerini amplifiye etmemiştir. Araştırmada, *E. faecalis* suşlarının %95'i ve *E. faecium* suşlarının %53'ünün, *efaAf*, *jel* ve *agg* en sık tespit edilen genler olmak üzere en az bir virülans faktörünü içerdikleri belirlenmiştir. *P. pentosaceus* LPM78 ve *W. cibaria* SMA25 suşlarında eritromisin direnç genini kodlayan *mef(A/E)* tespit edilmiştir. Bununla birlikte, test edilen LAB suşlarının hiçbirinde *lnuB* geni tespit edilmemiştir. Tüm suşlarda *tetK*, *tetL*, *tetM*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *ermA*, *ermB* ve *ermC* antibiyotik direnç amplikasyonları bulunmamaktadır.

Fraga-Cotelo vd. (2013) tarafından yapılan araştırmada Nueva Helvecia, Colonia, Uruguay'da bulunan mandıra çiftliklerinin ürettiği peynirlerden, çiğ sütlerden ve ticari olmayan başlangıç kültürlerinden izole edilen 509 LAB izolatu değerlendirilmiş ve bu suşlar arasında potansiye 15 adet bakteriyosin üreticisi tanımlanmıştır. Çiğ süttten 2 adet *Lc. lactis* ve peynir örneklerinden 1 adet *L. casei* ve 2 adet *E. durans* suşu izole edilmiş, 5 suşun hemolitik ve jelatinaz aktivitesi göstermediği, vankomisine dirençli olmadıkları tespit edilmiştir. Ayrıca izolatlarda *cpd*, *cybB*, *agg* ve *gelE* virülans gen bölgeleri bulunmamaktadır.

Morandi vd. (2015) Valtellina casera peynirinden 75 (%36 *E. faecalis*, %15 *Str. thermophilus* ve %13'ü *E. faecium*) adet LAB izole etmişlerdir. Suşlar tetrasiklin direnç genleri arasından *tetS* (%58), *tetM* (%53) ve *tetL* (%42) için pozitif bulunmuştur. Tüm suşlar için *tetM*, *tetO*, *int*, *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2*, *vanC3*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *ermB*,

ermC antibiyotik direnç genleri PZR sonuçları negatiftir. Virülans belirleyicilerinin varlığı sadece *E. faecalis* suşlarında tespit edilmiştir. PZR amplifikasyonu, *efaA* (%100), *gelE* (%78), *ace* (%71), *asa1* (%55,5) ve *esp* (%55,5) genleri için yüksek oranda bulunmuştur. *cylA* geni sadece 1 adet *E. faecalis* suşunda bulunurken tüm suşlar *hyl* negatiftir. Histamin ve tiramin üretimi için amino asit dekarboksilaz genlerinin varlığı *Enterococcus* suşları arasında taranmış, *hdc* ve *tdc* genleri için amplifikasyon meydana gelmemiştir.

Colombo vd. (2017) süt ortamından 11 adet *Lactobacillus*, 2 adet *Pediococcus* ve 2 adet *Weissella* olmak üzere toplam 15 LAB'yi izole ederek hemolitik aktivite, jelatinaz üretimi, DNaz aktivitesi ve lizin, tirozin, histidin, ornitin biyojenik aminlerinin üretimi gibi virülans potansiyelleri ve antimikrobiyal dirençleri araştırmıştır. Suşların hiçbiri, hemolitik aktivite, jelatinaz, DNaz ve test edilmiş biyojenik aminlerin üretimini göstermemiştir. Virülans faktörler ile ilişkili test edilen 49 gen bölgesinden 19 gen bölgesi suşlarda tespit edilmiştir. Sonuçlar 3 suşun *vanC2*, *cpd* ve *tdc*, 2 suşun *vanA*, *tetK*, *tetS*, *ermA*, *asa1*, *ccf* ve 1 suşun *vanC1*, *ermB*, *aac(6')-le-aph(2'')-Ia* ve *hyl* için pozitif olduğunu göstermiştir. *L. fermentum* SIVGL1 ve *L. plantarum* MSI2, test edilen tüm virülans genler için negatif sonuçlar veren tek iki suş olarak belirlenmiştir. Tüm suşlarda *vanB*, *vanC-1*, *vanC2/C3*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *int-Tn*, *ermC*, *catA*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')Id*, *aph(2'')-Ic*, *aph(3')-IIIa*, *vatE*, *bcrD*, *ant(6)-Ia*, *mur-2*, *DdlE*, *faecalis*, *ace*, *cyt2*, *esp*, *efaA*, *cob*, *sprE*, *fsrA*, *fsrB*, *fsrC*, *gelE*, *odc*, *hdc1* ve *hdc2* genleri tespit edilememiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar diğer yazarlar tarafından elde edilenlerle uyumaktadır (Munoz-Atienza vd., 2013, Munoz vd., 2014; dos Santos vd., 2015). *Lactobacillus*'ta hemolitik aktivite ve biyojenik amin üretiminin olmaması, Pisano vd. (2014) tarafından bildirilen bulgularla uyumludur. Borges vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada *Pediococcus*'lar tarafından ekstraselüler enzimler ve hemolitik aktivite tespit edilmemiştir. Colombo vd. (2017)'nin incelendikleri 2 adet *W. paramesenteroides* suşu, Jeong ve Lee (2015) tarafından bildirilen bulguların aksine, güvenlik testleri için olumlu sonuçlar göstermemiştir. *W. paramesenteroides* histamin ve tiramin biyojen aminleri için pozitif belirlenmiştir. Colombo vd. (2017)'nin elde ettikleri sonuçlara dayanarak, izolatların güvenli davranışlar sunarak yardımcı kültür olarak gıda endüstrisinde kullanımlarını değerlendirmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu yorumunu yapmışlardır.

Hayvancılıkta antibiyotiklerin yaygın kullanımını ortadan kaldırmak için alternatiflerin araştırılması amacıyla yapılan araştırmalar son zamanlarda artmıştır.

Ficoseco vd. (2018)'nin çalışmasında büyükbaş hayvan yemi ortamından izole edilmiş ve daha önce potansiyel probiyotik olarak seçilen 40 adet LAB'nin güvenilirliğini incelenmiştir. Araştırma sonucunda, ampisilin (AMP, %100), gentamisin (GEN, %96,3), kanamisin (KAN, %96,3), klindamisin (CLI, %85,2), streptomisin (STR, %88,9), kloramfenikol (CHL, %92,6)'e yüksek hassasiyet ve eritromisine (ERY, %48) ve tetrasikline (TET, %79) karşı orta ve yüksek direnç tespit edilmiştir. Feedlot sığırlarından elde edilen enterokoklar ve pediokoklar CLI (%73), ERY (%100), GEN (%54,5) ve TET (%73)'e karşı yüksek direnç göstermiştir. İncelenen *bla*, *cat*, *ermB*, *ermC*, *aac(6')aph(2'')*, *aph(3'')-III*, *strA*, *strB*, *aadA*, *aadE*, *ant(6)*, *tetM*, *tetK*, *tetL*, *tetS*, *agg*, *ace*, *espA*, *ebp*, *cylA*, *hyl*, *gelE*, *sprE*, *fsrA*, *fsrB*, *fsrC*, *atpA*, *cfa1*, *mleS*, *hisD*, *groEL* olmak üzere on beş direnç geninden yedisi (*ermB*, *aph(3'')-III*, *aadA*, *ant(6)*, *bla*, *cat*, *tetS*) laktobasillerde tanımlanarak; genotipik olarak bulunan genlerin her zaman fenotipik dirençle orantılı olmadığı tespit edilmiştir. Feedlot sığırlarından izole laktobasil suşlarında %3,7 *cat* ve %7,4 *tetS* genleri tespit edilmiştir. ERY'ye fenotipik olarak dirençli altı suştan ikisini içeren izolatların %22,3'ünde *ermB* geninin varlığı, değerlendirilen antibiyotikler arasında en yüksek direnci göstermiştir. Feedlot laktobasillerinin hiçbir virülans faktör genlerini barındırmazken, enterokoklar için *ace*, *agg*, *fsrA* ve *atpA* genleri için pozitif PZR amplifikasyonu bulunmuştur.

5. SONUÇ

Bu araştırmada elde edilen sonuçlar ve öneriler;

Tamamlanan araştırmada, LAB'nin güvenilirlik özelliklerini belirlemek amacıyla peynir ve yoğurt örneklerinden daha önceki çalışmalarda izole edilmiş, 16S rRNA sekans analizi ile genetik tanısı yapılmış ve bazı teknolojik özellikleri belirlenmiş 87 adet LAB materyal olarak kullanılarak, bu mikroorganizmaların bazı güvenilirlik özellikleri araştırılmıştır.

Tamamlanan tezde çalışılan suşların hiçbiri hemolitik aktivite ve DNaz üretimi göstermemiştir.

Jelatinaz üretimi sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde 40 adet *L. bulgaricus* suşunun 29'u, 29 adet *L. fermentum*'un 8'i, 2 adet *E. faecium* suşunun ise jelatinaz ürettiği tespit edilmiştir. Besiyerinde jelatinaz aktivitesi gösteren 41 izolatta gen bölgesinin tespit edilmemesi bu özelliğin plazmitlerde kodlanmış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Yapılan bu araştırmada çalışılan 87 adet LAB'de 9 adet *L. bulgaricus* (PLa2B, PLa4A, PLa31D, PLb10A2, PLc10A, PLj27B, PLj35A, PLr46B, YLr26A) ve 6 adet *L. fermentum* (PLc27B, PLc27E, PLc38D, YLc35B, YLc37C, YLr12A) suşunda biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Ayrıca jelatinaz üretimi pozitif bulunan 48 izolatın 12'sinde biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Biyofilm yapısındaki bakterileri öldürmek zordur. Ayrıca biyofilm yapısının antibiyotiklere karşı gelişen direnç mekanizmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Biyofilm yapısındaki bakterilerin fagositoz, antikor ve antibiyotiklere karşı 1000 kata kadar daha dirençli oldukları bilinmektedir. Bu sebeple çoğu hastalığın tedavisinde, etken tamamen ortadan kaldırılamamakta ve hastalık devam etmektedir. İşte bu sorunların ortadan kaldırılması ya da azaltılması için biyofilm yapısının doğasının ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ve yapısının her yönüyle anlaşılması önemlidir.

Ekstraselüler proteaz aktivitesi incelenen 87 adet LAB'nde *L. bulgaricus* (Pla29B, Pla31D, PLb10A2, PLb19A, PLc10A, PLc29A, PLj27B, PLj29E(B), PLr27A, YLa27B, YLj25B, YLj27C, YLj31E, YLj38C), *L. lactis* (PLj24C(A), PLj27A, YLj63), *L. fermentum* (PLc4A, PLc27E, YLa13B, YLa22A, YLa27A), *E. faecium* PLj35B(A), *L. casei* PLr35 ve *L. paracasei* YLj14(A) olmak üzere 25 adet suş kazein agar, süt agar ve skim milk agar besiyerinde zon oluşturmuşlardır. Her üç besiyerinde de zon oluşturmayan suş tespit edilmemiştir.

İncelenen LAB'nde 16 adet *L. fermentum* (PLa31B(B), PLc23A1, PLc23A2, PLc27B, PLc27E, PLc31A, PLc38D, PLr1D, YLa22A, YLc12A, YLc23B, YLc24C, YLc35B, YLr12A, YLr15A, YLr16A), 3 adet *L. bulgaricus* (PLc29A, PLr46B, YLa27B), *L. lactis* PLr31C(B), *L. paracasei* PLj29C(A) ve *L. plantarum* PLj18A1 suşları araştırılan histidin, fenilalanin, tirozin, ornitin, triptofan ve lizin biyojen aminin hepsinde dekarboksilaz aktivitesi göstermiştir. Bu sonuçların aksine *L. bulgaricus* (PLa2B, PLa24B, PLc19E, PLj27B, PLr27A, PLr31A, YLj15C(A), YLj25B), *L. fermentum* (PLc4A, PLc35A, YLa13B, YLa37B), *L. lactis* PLr7A(A), *P. acidilactici* PLr8D(A2) ornitin, histidin, tirozin, triptofan, fenilalanin ve lizini dekarboksile etmemiştir.

LAB'nin virülans, amino asit dekarboksilaz ve antibiyotik gen taraması sonuçlarında 21 adet *L. fermentum* (PLc23A1, PLc23A2, PLc27B, PLc27E, PLc31A, PLc35A, PLc38D, PLr1D, YLa13B, YLa18B, YLa22A, YLa22B, YLa27A, YLc4A, YLc12B, YLc20A, YLc23B, YLc24C, YLc35B, YLr12A, YLr15A), 20 adet *L. bulgaricus* (PLa2B, PLa4A, PLa19E, PLa24B, PLa27C, PLa36C, PLb10A2, PLc3A, PLj1C(A), PLj23B, PLj27B, PLj35B(A), PLr3C, PLr27A, PLr31A, PLr42B1, YLa27B, YLj21C, YLj25B, YLj38C), 3 adet *L. lactis* (PLj24C(A), PLj27A, PLr31C(B)), 2 adet *L. rhamnosus* (PLc23B(A), PLj14A) ve *E. faecium* YLj25A suşunda gen bölgeleri bulunmuştur. Bu direnç genlerinin fırsatçı bakterilere ve insan patojenlerine transfer edilebilir olma olasılığı hastalıkların tedavisini zorlaştırabilmekte veya bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda, yaşlı ve bebeklerde hastalık şiddetini arttırabilmektedir.

Yapılan araştırma sonucunda farklı süt ve yoğurt örneklerinden daha önce izole edilmiş olan 87 adet LAB'nden 9 adet *L. bulgaricus* (PLa18B, PLa23B, PLc36A, YLa12B, YLa27C, YLa31A, YLj15C(A), YLj22A, YLr26A(B)), 4 adet *L. fermentum* (PLc27B(A), PLr2B, YLa16C, YLa37B), 4 adet *L. rhamnosus* (PLc23B(A), PLc36A(A), PLj6B, PLj6B1), 1'er adet *P. acidilactici* PLr8D(A2), *L. lactis* PLr7A(A), *L. plantarum* PLj18A1 suşları olmak üzere toplam 20 bakteride hemolitik aktivite, jelatinaz, DNaz ve amino asit dekarboksilaz üretimi, biyofilm oluşumu ve ekstraselüler proteaz aktivitesi belirlenmemiştir. Bu bakterilerde aynı zamanda virülans genlerden *gel*, *hyl*, *asa1*, *esp*, *cylA*, *efaA*, *ace*, amino asit dekarboksilaz için; *hdc* ve *tdc* genleri ve antibiyotik direncinin belirlenmesi için ise araştırılan *ermA*, *ermB*, *ermC*, *aac(6')* *aph(2'')*, *cat*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetS*, *tetQ*, *tetX*, *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanX* gen bölgeleri de tespit edilmemiştir. İncelen tüm bu parametreler açısından bu LAB güvenilir olarak yorumlanmıştır.

Yapılan araştırmalar sonucunda LAB ile ilgili risklerin henüz net bir şekilde ortaya konulmadığı tespit edilmiştir. LAB'nin güvenilirlik özellikleri ile ilgili araştırmalar ülkemizde henüz çok az sayıdadır. Tamamlanan bu tez araştırmasında, fermente gıda örneklerinde başlatıcı kültür olarak kullanılacak mikroorganizmaların fenotipik ve genotipik olarak ayrıntılı bir şekilde tanımlanmasının, virülans profillerinin araştırılmasının önemi ortaya konmuştur. Ayrıca çalışmamız sonucunda, tüketime sunulan bütün fermente ürünlerde kullanılan bakterilerin ve ürünlerin çeşitli virülans özelliklerinin *in vivo* ve *in vitro* olarak araştırılacağı daha kapsamlı araştırmaların planlanmasının önemini ortaya koymuştur.



KAYNAKLAR

- Abd El Tawab, A.A., Ammar, A.M., Abd El-Hamid, M.I., El-Dessouky, E.N., 2016. Virulence genotyping of enterococcus species isolated from meat and milk products. *Benha Veterinary Medicine Journal*, 31, 158-164.
- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N.P., Ayyash, M., 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 316-325.
- Achemchem, F., Cebrian, R., Abrini, J., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M., 2012. Antimicrobial characterization and safety aspects of the bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* F420 isolated from Moroccan raw goat milk. *Canadian Journal of Microbiology*, 58(5), 596-604.
- Adimpong, D.B., Nielsen, D.S., Sorensen, K.I., Derkx, P.M.F., Jespersen, L., 2012. Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. *BMC Microbiology*, 12, 75.
- Ahmadova, A., Dimov, S., Ivanova, I., Choiset, Y., Chobert, J.M., Kuliev, A., Haertle, T., 2011. Proteolytic and safety of use of Enterococci strains isolated from traditional Azerbaijani dairy products. *European Food Research and Technology*, 233, 131-140.
- Akbar, A., Anal, A.K., 2011. Food safety concerns and food-borne pathogens, *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Campylobacter*. *FUUAST Journal of Biology*, 1(1),5-17.
- Akgül, Ö., Gülhan, T., Güdücüoğlu, H., 2016. Tavuk ve martı kökenli enterokok türlerinin antibiyotik dirençliliğinin fenotipik ve genotipik analizi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 63, 235-244.
- Aljewicz, M., Cichosz, G., 2017. Influence of probiotic (*Lactobacillus acidophilus* NCFM, *L. paracasei* LPC37, and *L. rhamnosus* HN001) strains on starter cultures and secondary microflora in Swiss-and Dutch-type cheeses. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(6), 13253.
- Al-Talib, H., Zuraina, N., Kamarudin, B., Yean, C.Y., 2015. Genotypic variations of virulent genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from three hospitals in Malaysia. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 24(1), 121-7.
- Alvarez-Sieiro, P., Montalban-Lopez, M., Mu, D., Kuipers, O.P., 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939-2951.
- Amina, Z., Nouredine, S., Venkatesan, A., Perumal, V., Hichem, B., Asma, Z., Yamina, M., Miloud, H., Mebrouk, K., 2014. Characterization and potential probiotic attributes of *Lactobacillus plantarum* DU10 isolated from Algerian raw Camel milk. *Biotechnology*, 13(6), 282-288.

- Aminov, R.I., Garrigues-Jeanjean, N., Mackie, R.I., 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 22–32.
- Ammor, M.S., Flórez, A.B., Mayo, B., 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*. *Food Microbiology*, 24, 559-570.
- Ammor, M.S., Florez, A.B., Van Hoek, H.A., de Los Reyes-Gavilan, G.C., Aarts, H.J., Margolles, A., Mayo, B., 2008a. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14, 6-15.
- Ammor, M.S., Gueimonde, M., Danielsen, M., Zagorec, M., van Hoek, A.H.A.M., De Los Reyes-Gavila'n, C.G., Mayo, B., Margolles, A., 2008b. Two different tetracycline resistance mechanisms, plasmid-carried tet(L) and chromosomally located transposon-associated tet(M), coexist in *L. sakei* rits 9. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1394-1401.
- Anand, R., Langer, T., Baker, M.J., 2013. Proteolytic control of mitochondrial function and morphogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(1), 195-204.
- Anas, M., Eddine, H.J., Mebrouk, K., 2008. Antimicrobial activity of lactobacillus species isolated from algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy, Food Sciences*, 3(2), 39-49.
- Anderson, A.C., Jonas, D., Huber, I., Karygianni, L., Weolber, J., Hellwig, E., Arweiler, N., Vach, K., Wittmeret, A., Al-Ahmad, A., 2016. *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Front Microbiology*, 6, 1534.
- Andiç, S., Genççelep, H., Tunçtürk, Y., Köse, Ş., 2010. The effect of storage temperatures and packaging methods on properties of motal cheese. *Journal of Dairy Science*, 93(3), 849-859.
- Aoudia, N., Rieu, A., Briandet, R., Deschamps, J., Chluba, J., Jegu, G., Garrido, C., Guzzo, J., 2016. Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food Microbiology*, 53, 51–59.
- Araya, M., Morelli-Reid, G., Sanders, M.E., Stanton, C., Pineiro, M., 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, London, Canada.
- Archimbaud, C., Shankar, N., Forestier, C., Baghdayan, A., Gilmore, M. S., Charbonne', F., Joly, B., 2002. *In vitro* adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Research in Microbiology*, 153, 75–80.

- Aspri, M., Tsaltas, D., Papademas, P., 2015. Lactic Acid Bacteria Isolated From Raw Donkey Milk Biodiversity, Technological Characteristics and Probiotic Potential. Department of Agricultural Sciences. Biotechnology and Food Science. 7th IDF International Symposium on Sheep, Goat and other non-Cow Milk, Limassol, Cyprus.
- Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M.C., Bover-Cid, S., Hugas, M., 2006. Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 100(1), 40–49.
- Barbosa, J., Gibbs, P.A., Teixeira, P., 2010. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the north of Portugal. *Food Control*, 21, 651–656.
- Bassyouni, R.H., Abdel-all, W.S., Abdel-all, M.G.F.S., Kamel, Z., 2012. Characterization of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Egypt as a probiotic. *Life Science Journal*, 9(4).
- Başığit Kılıç, G., Kuleaşan, H., Karahan, A.G., 2006. Viability of human derived probiotic lactobacilli in ice-cream produced with sucrose and aspartame. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 796-800. DOI: 10.1007/s10295-006-0128-x.
- Başığit Kılıç, G., Kuleaşan, H., Eralp, I., Karahan, A.G., 2009. Manufacture of Turkish Beyaz cheese added with probiotic strains. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1003-1008. DOI: 10.1016/j.lwt.2008.12.015.
- Başığit Kılıç, G., Karahan, A.G., 2010. Identification of lactic acid bacteria isolated from the fecal samples of healthy humans and patients with dyspepsia and determination of their pH, bile and antibiotic tolerance properties. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 18, 220-229. DOI: 10.1159/000319597.
- Başığit Kılıç, G., Kuleaşan, H., Sömer, V.F., Akpınar, D., 2013. Determination of potential probiotic properties of human originated *Lactobacillus plantarum* strains. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18, 479-485.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., Cocolin, L., 2013. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*, 50(1), 135-142.
- Baylan, O., Nazik, H., Bektöre, B., Cıtil, B.E., Turan, D., Ongen, B., Ozyurt, M., Açikel, C.H., Haznedaroğlu, T., 2011. Mikrobiyoloji bulteni the relationship between antibiotic resistance and virulence factors in urinary *Enterococcus* isolates. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 45(3), 430-45.
- Beken, S., Talim, B., Anlar, B., 2013. Subakut sklerozan panensefalitte demiyelinizasyon mekanizması: deneysel bir çalışma. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 5.

- Belgacem, Z.B., Abriouel, H., Omar, N.B., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Gálvez, A., 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.
- Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M., Franz, C.M., Holzapfel, W.H., Ruben, P.P., Martinez-Canamero, M., Gálvez, A., 2004. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(1), 118-130.
- Bennani, S., Mchiouer, K., Rokni, Y., Meziane, M., 2017. Characterisation and identification of lactic acid bacteria isolated from moroccan raw cow's milk. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8, 4934-4944.
- Bigeç, L., 2015. Balıklardan İzole edilen Enterococcus Türlerinin Bazı Virülans, Teknolojik Özelliklerinin ve Antibiyotik Dirençliliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Bilgehan, H., 2000. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Onuncu Baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 240-68.
- Birri, D.J., Brede, D.A., Tessema, G.T., Nes, I.F. 2013. Bacteriocin production, antibiotic susceptibility and prevalence of haemolytic and gelatinase activity in faecal lactic acid bacteria isolated from healthy ethiopian infants. *Microbial Ecology*, 65(2), 504-516.
- Biscola, V., Choiset, Y., Rabesona, H., Chobert, J.M., Haertlé, T., Franco, B.D.G.M., 2018. Brazilian artisanal ripened cheeses as sources of proteolytic lactic acid bacteria capable of reducing cow milk allergy. *Journal of Applied Microbiology*.
- Borges, S., Barbosa, J., Silva, J., Teixeira, P., 2013. Evaluation of characteristics of *Pediococcus* spp. to be used as a vaginal probiotic. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 527-538.
- Bozoudi, D., Kotzamanidis, C., Hatzikamari, M., Tzanetakis, N., Menexes, G., Litopoulou-Tzanetaki, E., 2015. A Comparison for acid production, proteolysis, autolysis and inhibitory properties of lactic acid bacteria from fresh and mature feta pdo Greek cheese, made at three different mountainous areas. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 87-96.
- Brandao, A., Almeida, T., Munoz-Atienza, E., Torres, C., Igrejas, G., Hernández, P.E., Cintas L.M., Poeta, P., Herranz, C., 2010. Antimicrobial activity and occurrence of bacteriocin structural genes in *Enterococcus* sp. of human and animal origin isolated in Portugal. *Archives of Microbiology*, 192(11), 927-936.
- Can, Ö.P., Çoban, Ö.E., 2012. vakum paketlenmenin ve zein ile kaplamanın balık filetoalarının kalite kriterleri üzerine etkilerinin karşılaştırılması. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 1, 87-91.

- Cantas, L., Shah, S.Q., Cavaco, L.M., Manaia, C.M., Walsh, F., Popowska, M., Garelick, H., Bürgmann, H., Sørum, H., 2013. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Front Microbiology*, 4, 96.
- Cappucino, J., Sherman, N., 2007. In: *Microbiology A Laboratory Manual*. Pearson Education, Printer, India.
- Carlos, A., Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, M., Tenreiro, R., 2010. Transcriptional analysis of virulence-related genes in enterococci from distinct origins. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1563–1575.
- Caso, J.L., Suárez, J.E., 1997. Detection and analysis of extra and intracellular deoxyribonuclease activities in *Lactobacillus plantarum*. *Letters in Applied Microbiology*, 25(2), 148-152.
- Celebi, S., Hacimustafaoglu, M., Demiral, M., Sinirtas, M., Demirtas, F., Ipek, K., Bayram, G., 2010. Enterococcal infections in children: results of a 8 year study/cocuklarda enterokokkal enfeksiyonlar: sekiz yıllık çalışma sonuçları. *Journal of Pediatric Infection*, 4(4), 148-152.
- Chahad, O.B., El Bour, M., Calo-Mata, P., Boudabous, A., Barros-Velazquez, J., 2012. Discovery of novel biopreservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their application to seafood products. *Research in Microbiology*, 163(1), 44-54.
- Channaiah, L.H., Subramanyam, B., Zurek, L., 2018. Molecular characterization of antibiotic resistant and potentially virulent enterococci isolated from swine farms and feed mills. *Journal of Stored Products Research*, 77, 189-196.
- Chotinantakul, K., Chansiw, N., Okada, S., 2018. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from Thai fermented pork in Chiang Rai province, Thailand. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 12, 143-148.
- Chuang-Smith, O.N., Wells, C.L., Henry-Stanley, M.J., Dunny, G.M., 2010. Acceleration of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by aggregation substance expression in an ex vivo model of cardiac valve colonization. *Public Library of Science*, 5, 15798 s.
- Clementi, F., Aquilanti, L., 2011. Recent investigations and updated criteria for the assessment of antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. *Anaerobe*, 17, 394-398.
- Clewell, D.B., 2007. Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pad1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin. *Plasmid*, 58(3), 205-27.
- Coelho, M.C., Silva, C.C.G., Ribeiro, S.C., Dapkevicius, M.L.N.E., Rosa, H.J.D., 2014. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 191, 53-59.

- Collins, J.D., Noerrung, B., Budka, H., Andreoletti, O., Buncic, S., Griffin, J., Hald, T., Havelaar, A., Hope, J., Klein, G., Koutsoumanis, K., 2011. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *European Food Safety Authority Journal*, 9(10), 2393.
- Colombo, M., Paula-Prueza, A., Luna-Alves, A., de Castilho, N.P.A., Dimitrov-Todorov, S., Augusto-Nero, L., 2017. Virulence Potential and Antimicrobial Resistance of Lactic Acid Bacteria with Benefic Potential Isolated from Dairy Systems. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, Minas Gerais, Brazil.
- Comunian, R., Daga, E., Dupre, L., Paba, A., Devirgiliis, C., Piccioni, V., Perozzi, G., Zonenschain, D., Rebecchi, A., Morelli, L., De Lorentiis, A., Giraffa, G., 2010. Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 151-156.
- Coque, T.M., Patterson, J.E., Steckelberg, J.M., Murray, B.E., 1995. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *The Journal of Infectious Diseases*, 171(5), 1223-9.
- Courvalin, P., 2006. Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics. *Digestive and Liver Disease*, 38, 261-265.
- Creti, R., Imperi, M., Bertuccini, L., Fabretti, F., Orefici, G., Di Rosa, R., Baldassarri, L., 2004. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *Journal of Medical Microbiology*, 53(1), 13-20.
- Çataloluk, O., Göğebakan, B., 2004. Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey. *FEMS Microbiology Letters*, 236, 7-12.
- Çelik, H., Durak, Y., Uysal, A., 2016. Bazı ticari ve ev yapımı yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 42(2), 149-160.
- Çıtak, S., Mendi, A., Orhan, S., 2005. Incidence, Antibiotic resistance and some technological properties of enterococcus species isolated from raw milk and white cheese samples. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 56(4), 73-96.
- Çopur, Ş.S., Şahin, F., Göçmen, J.S., 2016. Determination of virulence and multidrug resistance genes with polymerase chain reaction method in vancomycin sensitive and resistant enterococci isolated from clinical samples. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46(3), 877-91.
- Da Silva Ferrari, I., de Souza, J.V., Ramos, C.L., da Costa, M.M., Schwan, R.F., Dias, F.S., 2016. Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella Typhi* in artisanal cheese. *Food Microbiology*, 60, 29-38.

- Danielsen, M., Wind, A., 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 1-11.
- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433.
- De Almeida Junior, W.L.G., da Silva Ferrari, Í., de Souza, J.V., da Silva, C.D.A., da Costa, M.M., Dias, F.S., 2015. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Control*, 53, 96-103.
- De las Rivas, B., Marcobal, A., Carrascosa, A.V., Muñoz, R., 2006. PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *Journal of Food Protection*, 69, 2509–2514.
- De las Rivas, P., Alonso, J., Moya, J., de Giorgolas, M., Martinell, J., Fernandez Guerrero, M.L., 2005. The impact of hospital-acquired infections on the microbial etiology and prognosis of lateonset prosthetic valve endocarditis. *Chest*, 128, 764–771.
- De Marques, E. B., Suzart, S., 2004. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, 53(11), 1069-1073.
- De Vuyst, L., Leroy, F., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 194-199.
- DeLisle, S., Perl, T.M., 2003. Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest*, 123, 504–518.
- Demir, E., Kaygusuz, E., Başığit Kılıç, G., Yüce, S., Soyuçok, A., 2017. Yoğurt örneklerinden izole edilmiş laktik asit bakterilerinin moleküler yöntemlerle tanımlanması ve ekzopolisakkarit üretimlerinin belirlenmesi. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(1), 262-267.
- Demir, E., Başığit Kılıç, G., Uşan, E., 2018. Farklı gıdalardan izole edilen laktik asit bakterileri'nin antibiyotik direnç profilleri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(2), 197-204.
- Devirgilis, C., Barile, S., Perozzi, G., 2011. Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota. *Genes and Nutrition*, 6, 275-284.
- Dıanı, M., Arıafar, M.N., Akçelik, N., 2016. İnsan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturan enterokokal biyofilm yapısının doğası. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 73(1), 71– 80.
- Di Rosa, R., Creti, R., Venditti, M., D'Amelio, R., Arciola, C.R., Montanaro, L., Baldassarri, L., 2006. Relationship between biofilm formation, the enterococcal

surface protein (*esp*) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiology Letters*, 256, 145-50.

- Doğu, S.Ö., Sarıçoban, C., 2015. Balık ve balık ürünlerinde biyojen aminler ve önemi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 18(3), 19-28.
- Domingos-Lopes, M.F.P., Stanton, C., Ross, P.R., Dapkevicius, M.L.E., Silva, C.C.G., 2017. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology*, 63, 178-190.
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881.
- Doron, S., Snyderman, D.R., 2015. Risk and safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(2), 129-134.
- Dos Santos, K.M.O., Vieira, A.D.S., Buriti, F.C.A., do Nascimento, J.C.F., de Melo, M.E.S., Bruno, L.M., Borges, M.F., Rocha, C.R.C., Lopes, A.C.S., Franco, B.D.G.M., 2015. Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Dairy Science and Technology*, 95, 209-230.
- Drosinos, E.H., Paramithiotis, S., Kolovos, G., Tsikouras, I., Metaxopoulos, I., 2007. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in southern greece. *Food Microbiology*, 24(3), 260-270.
- Dupre, I., Zanetti, S., Schito, A.M., Fadda, G., Sechi, L.A., 2003. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in sardinia (Italy). *Journal of Medical Microbiology*, 52(6), 491-498.
- Düz, M., Fidan, A.F., 2016. Biyojen aminler ve etkileri. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Dergisi*, 9(2).
- Eaton, T.J. Gasson, M.J., 2001. Molecular screening of enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1628–1635.
- EFSA, 2005. QPS. Qualified Presumption of Safety of Micro-organisms in Food and Feed. EFSA Scientific Colloquium Summary Report. European Food Safety Authority Journal, 143, Parma, Italy.
- EFSA, 2007. Opinion of the scientific committee on a request from efsa on the introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assesment of selected microorganisms referred to EFSA. *European Food Safety Authority Journal*, 187, 1-16.
- Egervarn, M., 2009. Antibiotic resistance in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum*. *Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Microbiology*, 30.

- Elsner, H.A., Sobottka, I., Mack D., Claussen, M., Laufs, R., Wirth, R., 2000. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19, 39–42.
- Ercan, S.Ş., Soysal, Ç., Bozkurt, H., 2017. Gıdalarda bulunan biyojen aminlerin insan sağlığı üzerine etkileri. *Adıyaman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(2), 534-550.
- Erdem, M.E., Koral, S., Işıdan, S., 2017. Farklı paketleme yöntemlerinin tirsı (Alosa Immaculata, Bennett, 1838) marinatlarındaki mikrobiyolojik ve biyojenik. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 23(4).
- Ertürkmen, P., Turhan, İ., Öner, Z., 2015. Amino acid decarboxylase activity of some lactic acid bacteria. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(2), 89-94.
- Ertürkmen, P., Öner, Z., 2015. Beyaz peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin başlatıcı (starter) kültür özelliklerinin biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 19(3).
- Evren, M., Apan, M., Tutkun, E., Evren, S., 2011. Geleneksel fermente gıdalarda bulunan laktik asit bakterileri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 9, 11-17.
- Fadhlaoui-Zid, K., Curiel, J.A., Landeta, G., Fattouch, S., Reverón, I., de las Rivas, B., Sadok, S., Muñoz, R., 2012. Biogenic amine production by bacteria isolated from ice-preserved sardine and mackerel. *Food Control*, 25, 89-95.
- FAO/WHO Working Group Report. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada.
- Falagas, M.E., Makris, G.C., 2009. Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis. *Journal of Hospital Infection*, 71, 301–306.
- Favaro, L., Basaglia, M., Casella, S., Hue, I., Dousset, X., Franco, B.D.G.M., Todorov, S.D., 2014. Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food Microbiology*. 38, 228-239.
- Favaro, L., Penna, A.L.B., Todorov, S.D., 2015. Bacteriocinogenic LAB from cheeses application in biopreservation. *Trends in Food Science and Technology*. 41, 37-48.
- Federici, S., Ciarrocchi, F., Campana, R., Ciandrini, E., Blasi, G., Baffone, W., 2014. Identification and functional traits of lactic acid bacteria isolated from ciauscolo salami produced in central Italy. *Meat Science*, 98(4), 575-584.
- Fernandes, S.C., Dhanashree, B., 2013. Drug resistance virulence determinants in clinical isolates of *Enterococcus* species. *The Indian Journal of Medical Research*, 137(5), 981-985.

- Fernandez, M., Linares, D.M., Rodríguez, A., Alvarez, M.A., 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(6), 1400-1406.
- Ficoseco, C.A., Mansilla, F.I., Maldonado, N.C., Miranda, H., Nader-Macias, M.E.F., Vignolo, G.M., 2018. Safety and growth optimization of lactic acid bacteria isolated from feedlot cattle for probiotic formula design. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Fifadara, N., Radu, S., Hassan, Z., Beuchat, L.R., Rusul, G., 2003. Hemolytic and non-hemolytic vancomycin - resistant *Ent. faecium* isolated from beef imported to Malaysia. *Journal of Food Products*, 66, 1845-1850.
- Fisher, K., Phillips, C., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6), 1749-1757.
- Flemming, H., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633.
- Franz, C.M., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzappel, W.H., 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4385-4389.
- Fraga-Cotelo, M., Perelmuter-Schein, K., Giacaman-Salvo, S.S., Abirad, Z., Miguel, P., Carro-Techera, S.B., 2013. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from uruguayan artisan cheese. *Food Science and Technology*, 33(4), 801-804.
- Fraqueza, M.J., 2015. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 212, 76-88.
- Frazzon, A.P.G., Gama, B.A., Hermes, V., Bierhals, C.G., Pereira, R.I., Guedes, A.G., d'Azevedo, P.A. Frazzon, J., 2010. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by tetM and tetL genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in southern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 365-370.
- Galgano, F., Favati, F., Bonadio, M., Lorusso, V., Romano, P., 2009. Role of biogenic amines as index of freshness in beef meat packed with different biopolymeric materials. *Food Research International Journal*, 42(8), 1147-1152.
- Galloway-Pena, J.R., Bourgogne, A., Qin, X., Murray, B.E., 2011. Diversity of the *fsr-gelE* region of the *Enterococcus faecalis* genome but conservation in strains with partial deletions of the *fsr* operon. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(2), 442-451.
- García-Moruno, E., Carrascosa, A.V., Muñoz, R., 2005. A rapid and inexpensive method for the determination of biogenic amines from bacterial cultures by thin-layer chromatography. *Journal of Food Protection*, 68, 625-629.

- Garofalo, C., Vignaroli, C., Zandri, G., Aquilani, L., Bordoni, D., Osimani, A., Clementi, F., Biavasco, F., 2007. Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 75–83.
- Gasser, F., 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bulletin de l'Institut Pasteur (France)*, 92, 45–67.
- Gevers, D., Danielson, M., Huys, G., 2003a. Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1270–1275.
- Gevers, D., Masco, L., Baert, L., Huys, G., Debevere, J., Swings, J., 2003b. Prevalence and diversity of tetracycline resistant lactic acid bacteria and their *tet* genes along the process line of fermented dry sausages. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 277–283.
- Ghanbari, M., Jami, M., Domig, K.J., Kneifel, W., 2013. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria—a review. *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), 315–324.
- Gomez, B.C., Esteves, C.T., Palazzo, I.C., Darini, A.L. C., Felis, G.E., Sechi, L.A., Franco B.D., De Martinis, E.C., 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, 25(5), 668–675.
- Gomez, N.C., Abriouel, H., Grande, M.J., Pulido, R.P., Gálvez, A., 2012. Effect of enterocin AS-48 in combination with biocides on planktonic and sessile *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 30, 51–58.
- Gomez, N.C., Ramiro, J.M., Quecan, B.X., de Melo Franco, B.D., 2016. Use of potential probiotic lactic acid bacteria (lab) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 863.
- Gögebakan, B., 2003. Peynir ve İnsan Örneklerinden Elde Edilen *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerin Antibiyotik Dirençliliklerinin Araştırılması. Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep, Türkiye, 77.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., De losReyes-Gavilán, C.G., Margolles, A., 2013. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4(202), 1–6.
- Gupta, P., Sankar, S., Das, P., Battacharjee, S., Tribedi, B., 2015. Biofilm, pathogenesis and prevention: A journey to break the wall. *Archives of Microbiology*, 10, 1148–1160.
- Gülel, Ş., 2014. Molecular Identification and Probiotic of ‘*Lactobacillus Acidophilus* Group’ Isolates From Turkish Kefir. Master of Science in Biotechnology Department, Middle East Technical University, Ankara, Turkey.

- Gülgör, G., Özçelik, F., 2014. Bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin probiyotik amaçlı kullanımı. *Akademik Gıda*, 12(1), 63-68.
- Güneşer, M.B., 2013. İşlem Görmüş Dentin Kollajenine *Enterococcus faecalis*'in Adezyonunda Jelatinaz Enziminin Etkisi. Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Konya, Türkiye.
- Halasz, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W., 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, 5, 42-49.
- Hallgren, A., Claesson, C., Saeedi, B., Monstein, H. J., Hanberger, H., Nilsson, L.E., 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(5), 323-332.
- Hamilton-Miller, J.M.T., Shah, S., 1998. Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of *Lactobacilli*. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 153-154.
- Hancock, L.E., Perego, M., 2004. The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *Journal of Bacteriology*, 186, 5629–39.
- Harima-Mizusawa, N., Ino, T., Onodera-Masuoka, N., Kato-Nagaoka, N., Kiyoshima-Shibata, J., Gomi, A., Shibahara-Sone, H., Kano, M., Sakai, M., Miyazaki, K., Ishikawa, F., 2014. Beneficial effects of citrus juice fermented with *Lactobacillus plantarum* YIT 0132 on Japanese cedar pollinosis. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 33(4), 147-155.
- Hasegawa, T., Minami, M., Okamoto, A., Tatsuno, I., Isaka, M., Ohta, M., 2010. Characterization of a virulence-associated and cell wall located DNase of *Streptococcus pyogenes*. *Microbiology*, 186, 184-190.
- Hawaz, E., 2014. Isolation and identification of probiotic lactic acid bacteria from curd and *in vitro* evaluation of its growth inhibition activities against pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 8, 1419-25.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., Peterson, S.B., 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 15–25.
- Holzapfel, W.H.N., Wood, B.J., 2012. The Genera of Lactic Acid Bacteria (Vol. 2). Springer Science and Business Media.
- Hugas, M., Garigga, M., Aymerich, M., 2003. Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 223-233.

- Hummel, A., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., 2007a. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology*, 30, 1-7.
- Hummel, A., Hertel, C., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., 2007b. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 730–739.
- Hussein, A.N., 2013. Detection of some virulence factors of *Enterococcus faecalis* isolated from raw milk by multiplex PCR. *Journal of Al-Qadisiya for Science*, 18, 132-144.
- Huys, G., D’Haene, K., Collard, J.M., Swings, J., 2004. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1555–1562.
- Huys, G., Botteldoorn, N., Delvigne, F., De Vuyst, L., Heyndrickx, M., Pot, B., Dubois, J.J., Daube, G., 2013. Microbial characterization of probiotics—Advisory report of the Working Group “8651 Probiotics” of the Belgian Superior Health Council (SHC). *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(8), 1479-1504.
- Igimi, S., Ryu, C.H., Park, S.H., Sasaki, Y., Sasaki, T., Kumagi, S., 1996. Transfer of conjugative plasmid *pam* beta 1 from *Lactococcus lactis* to mouse intestinal bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 23, 31-35.
- Işık, A., 2015. Denizli Bölgesinde Yetişen Üzümlerden Elde Edilen Çeşitli Şaraplardaki Biyojen Aminler. Doktora Tezi. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, Türkiye.
- Jeong, D., Lee, J., 2015. Antibiotic resistance, hemolysis and biogenic amine production assessments of *Leuconostoc* and *Weissella* isolates for Kimchi starter development. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 1078-1084.
- Joosten, H.M.L.J., Northolt, M.D., 1989. Detection, growth and amine-producing capacity of *Lactobacilli* in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 2356–2359.
- Jose, N.M., Bunt, C.R., Hussain, M.A., 2015. Implications of antibiotic resistance in probiotics. *Food Reviews International*, 31(1), 52-62.
- Kalui, C.M., Mathara, J.M., Kutima, P.M., Kiiyukia, C., Wongo, L.E., 2008. Partial characterisation and identification of lactic acid bacteria involved in the production of ikii: a traditional fermented maize porridge by the Kamba of Kenya. *Journal of Tropical Microbiology and Biotechnology*, 4(1), 3-15.
- Kankaya, D.A., Tuncer, B.Ö., Tuncer, Y., 2017. Gıda kaynaklı enterokokların potansiyel risk faktörleri. *Gıda*, 42(1), 8-19.

- Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroixa, C., Meile, L., 2006. antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 145-155.
- Kaya, H.İ., 2013. Tarhana İzolatı Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosinleri ve Fermantasyonda Patojen Bakteriler Üzerine Etkisi. Mastır Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, Türkiye.
- Kayaoglu, G., Ørstavik, D., 2004. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 15, 308-320.
- Kılıç, S., 2004. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Birinci Baskı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Bornova, İzmir.
- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W., Goossens, H., 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 900–912.
- Klein, G., Hallmann, C., Casas, I.A., 2000. Exclusion of *vanA*, *vanB* and *vanC* type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 815-824.
- Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C., Huebner, J., 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*, 22, 822-830.
- Komprda, T., Sládková, P., Petirová, E., Dohnal, V., Burdychová, R., 2010. Tyrosine-and histidine-decarboxylase positive lactic acid bacteria and *Enterococci* in dry fermented sausages. *Meat Science*, 86, 870–877.
- Korhonen, J., 2010. Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria. Publication of the University of Eastern Finland, dissertations in Forestry and Natural Sciences, Department of Biosciences.
- König, H., Fröhlich, J., 2017. Lactic Acid Bacteria. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (3-41). Springer, Cham.
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., Uchiyama, H., 2008. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(4), 381-386.
- Kumar, A.M., Murugalatha, N., 2012. Isolation of *Lactobacillus plantarum* from cow milk and screening for the presence of sugar alcohol producing gene. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 4(1), 16-22.
- Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernandez, M., Alvarez, M.A., 2010. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6, 145-156.

- Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., von Wright, A., 2011. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. CRC Press.
- Landeta, G., Curiel, J.A., Carrascosa, A.V., Munoz, R., De Las Rivas, B., 2013. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. *Meat Science*, 95(2), 272-280.
- Lebeer, S., De Keersmaecker, S.C., Verhoeven, T.L., Fadda, A. A., Marchal, K., Vanderleyden, J., 2007a. Functional analysis of *luxS* in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 189(3), 860-871.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L., Vélez, M.P., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C., 2007b. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(2), 6768-6775.
- LeBlanc, E.S., O'connor, E., Whitlock, E.P., Patnode, C.D., Kapka, T., 2011. Effectiveness of primary care-relevant treatments for obesity in adults: a systematic evidence review for the us preventive services task force. *Annals of Internal Medicine*, 155(7), 434-447.
- Ledina, T., Mohar-Lorbeg, P., Golob, M., Djordjevic, J., Bogovič-Matijašić, B., Bulajic, S., 2018. Tetracycline resistance in *Lactobacilli* isolated from Serbian traditional raw milk cheeses. *Journal of Food Science and Technology*, 55(4), 1426-1434.
- Liu, C., Zhang, Z., Dong, K., Yuan, J., Guop, X., 2009. Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomedical and Environmental Sciences*, 22, 401-412.
- Liu, S., YeH., Zhijiang, Z., 2011. Lactic acid bacteria intraditional fermented chinese foods. *Food Research International*, 3, 643-651.
- Lobos, O., Padilla, A., Padilla, A., 2009. *In vitro* antimicrobial effect of bacteriocin PsVP-10 in combination with chlorhexidine and triclosan against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* strains. *Archives of Oral Biology*, 54, 230-234.
- Lopes, M.F.S., Simoes, A.P., Terneiro, R., Marques, J.J.F. Crespo, M.T.B., 2006. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy *Enterococci*. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 208-214.
- Lu, B., Zhang, J., Huang, X., Xiao, S., Zhang, M., Cai, Z., 2015. Expression of interleukin-1 β and matrix metalloproteinase-8 in cytolytic and noncytolytic *Enterococcus faecalis* induced persistent apical periodontitis: a comparative study in the rat. *Journal of Endodontics*, 41(8), 1288-1293.
- Madhavan, H.N., Sowmiy, M., 2011. Mechanisms of development of antibiotic resistance in bacteria among clinical specimens. *Journal of Clinical and Biomedical Sciences*, 1, 42-48.

- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E., 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16, 189-199.
- Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T., 2005. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1177-1190.
- Martin-Platero, A.M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., 2009. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 24-32.
- Maron, D.F., Smith, T.J., Nachman, K.E., 2013. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Global Health*, 16, 9-48.
- Masalam, B., Maged, S., Bahieldin, A., Alharbi, M.G., Al-Masaudi, S., Al-Jaouni, S.K., Harakeh, S.M., Al-Hindi, R.R., 2018. Isolation, Molecular Characterization and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria in Saudi Raw and Fermented Milk. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.
- Mathur, S., Singh, R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 281-295.
- Mayr, C.M., Schieberle, P., 2012. Development of stable isotope dilution assays for the simultaneous quantitation of biogenic amines and polyamines in foods by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3026-3032.
- Mayrhofer, S., Mair, C., Kneifel, W., Domig, K.J., 2011. Susceptibility of *Bifidobacteria* of animal origin to selected antimicrobial agents. *Chemotherapy Research and Practice*, 6.
- Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J.M., Dousset, X., 2013. *Lactobacillus salivarius*: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiol*, 36, 296-304.
- Mete, E., Kaleli, İ., Cevahir, N., Demir, M., Akkaya, Y., Satılmış, Ö.K., 2017. Enterokok türlerinin virulans faktörlerinin araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 51(2), 101-114.
- Midelet, G., Carpentier, B., 2004. Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 262-270.
- Mohammadi, R., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A.M., 2012. The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 399-409.

- Moraes, P.M., Perin, L.M., Todorov, S.D., Silva Jr, A., Franco, B.M., Nero, L.A., 2012. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 113(2), 318-328.
- Morandi, S., Silvetti, T., Miranda Lopez, J.M., Brasca, M., 2015. Antimicrobial activity, antibiotic resistance and the safety of lactic acid bacteria in raw milk Valtellina casera cheese. *Journal of Food Safety*, 35(2), 193-205.
- Moreno, M.F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1–24.
- Mokoena, M.P., 2017. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255.
- Mrkonjic-Fuka, M., Zgomba Maksimovic, A., Tanuwidjaja, I., Hulak, N., Schloter, M., 2017. Characterization of *Enterococcal* community isolated from an artisan istrian raw milk cheese: biotechnological and safety aspects. *Food technology and Biotechnology*, 55(4), 368-380.
- Munoz, M.C.C., Benomar, N., Lerma, L.L., Gálvez, A., Abriouel, H., 2014. Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented aloreña table olives throughout fermentation process. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 110-118.
- Munoz-Atienza, E., Gomez-Sala, B., Araujo, C., Campanero, C., del Campo, R., Hernandez, P., Herranz, C., Cintas, L., 2013. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol*, 13, 15.
- Munoz-Atienza, E., Landeta, G., de las Rivas, B., Gómez-Sala, B., Muñoz, R., Hernández, P. E., Cintas, L. M., Herranz, C., 2011. Phenotypic and genotypic evaluation of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 146, 212–216.
- Nawaz, M., Wang, J., Zhou, A., Ma, C., Wu, X., Moore, J.E., Millar, B.C., Xu, J., 2011. Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Curr Microbiol*, 62, 1081–1089.
- Nieto-Arribas, P., Sesena, S., Poveda, J.M., Chicon, R., Cabezas, L., Palop, L., 2011. *Enterococcus* populations in artisanal manchego cheese: biodiversity, technological safety aspects. *Food Microbiol*, 28, 891-899.
- Omar, N.B., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M., Franz, C.M., Holzapfel, W.H., Rubén, P.P., Martínez-Canãmero, M., Gálvez, A., 2004. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(1), 118-130.

- Onishi, H., Mori, T., Takeuchi, S., Tani, K., Kobayashi, T., 1983. Halophilic nuclease of moderately halophilic *Bacillus* sp.: production purification and characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 24–30.
- Ouoba, L.I., Lei, V., Jensen, L.B., 2008. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 217-224.
- Özdestandan, Ö., Üren, A., 2012. Gıdalarda biyojen aminlerle ilgili yasal düzenlemeler. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 12, 27-40.
- Özteber, M., 2013. Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Aydın, Türkiye.
- Palermo, C., Muscarella, M., Nardiello, D., Iammarino, M., Centonze, D., 2013. A multiresidual method based on ion-exchange chromatography with conductivity detection for the determination of biogenic amines in food and beverages. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(2-3), 1015-1023.
- Palmer, K.L., Kos, V.N., Gilmore, M.S., 2010. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 13(5), 632-639.
- Palomino, J.M., del Árbol, J.T., Benomar, N., Abriouel, H., Cañamero, M.M., Gálvez, A., Pulido, R.P., 2015. Application of *Lactobacillus plantarum* Lb9 as starter culture in caper berry fermentation. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 788-794.
- Pan, L., Hu, X., Wang, X., 2011. Assesment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in chinese fermented foods. *Food Control*, 22, 1316-1321.
- Papageorgiou, M., Lambropoulou, D., Morrison, C., Kłodzińska, E., Namieśnik, J., Płotka-Wasyłka, J., 2017. Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 98, 128-142.
- Parente, E., Matuscelli, M., Gadrini, F., Grieco, S., Crudele, M.A., Suzzi, G., 2001. Evolution of microbial populations and biogenic amines production in dry sausages produced in southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 882-891.
- Perez, M., Calles-Enríquez, M., del Rio, B., Ladero, V., Martín, M.C., Fernández, M., Alvarez, M.A., 2015. IS 256 abolishes gelatinase activity and biofilm formation in a mutant of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecalis* V583. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(7), 517-519.
- Perez-Ibarreche, M., Castellano, P., Vignolo, G., 2014. Evaluation of anti-*Listeria* meat borne *Lactobacillus* for biofilm formation on selected abiotic surfaces. *Meat Science*, 96, 295–303.

- Perin, L.M., Miranda, R.O., Todorov, S.D., de Melo Franco, B.D.G., Nero, L.A., 2014. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 121-126.
- Pisano, M.B., Viale, S., Conti, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Melis, M.P., Deiana, M., Cosentino, S., 2014. Preliminary evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus strains* isolated from sardinian dairy products. *BioMed Research International*, 9.
- Poeta, P., Costa, D., Klibi, N., Rodrigues, J., Torres, C., 2006. Phenotypic and genotypic study of gelatinase and β -haemolysis activities in faecal enterococci of poultry in Portugal. *Journal of Veterinary Medicine*, 53, 203-208.
- Poveda, J.M., Chicon, R., Cabezas, L., 2015. Biogenic amine content and proteolysis in manchego cheese manufactured with *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* as adjunct and other autochthonous strains as starters. *International Dairy Journal*, 47, 94-101.
- Qin, X., Singh, K.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E., 2000. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infection and Immunity*, 68(5), 2579-86.
- Quilodran-Vega, S.R., Villena, J., Valdebenito, J., Salas, M. J., Parra, C., Ruiz, A., Kitazawa, H., García, A., 2016. Isolation of lactic acid bacteria from swine milk and characterization of potential probiotic strains with antagonistic effects against swine associated gastrointestinal pathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(6), 514-524.
- Quiros, P.M., Langer, T., Lopez-Otin, C., 2015. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(6), 345.
- Rainbolt, T.K., Lebeau, J., Puchades, C., Wiseman, R.L., 2016. Reciprocal degradation of YME1L and OMA1 adapts mitochondrial proteolytic activity during stress. *Cell Reports*, 14(9), 2041-2049.
- Rahimi, N., Poursina, F., sadat Ghaziasgar, F., Sepehrpor, S., 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.
- Rajkovic, J., Jokovic, N., 2015. Probiotic properties and safety assessment of lactic acid bacteria isolated from kajmak. *Biologica Nyssana*, 6(2).
- Restuccia, D., Spizzirri, U.G., Puoci, F., Cirillo, G., Curcio, M., Parisi, O.I., Lemma, F., Picci, N., 2011. A new method for the determination of biogenic amines in cheese by LC with evaporative light scattering detector. *Talanta*, 85(1), 363-369.
- Ribeiro, S.C., Coelho, M.C., Todorov, S.D., Franco, B.D.G.M., Dapkevicius, M.L.E., Silva, C.C.G., 2014. Technological properties of bacteriocin producing lactic acid

- bacteria isolated from pico cheese an artisanal cow's milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 116(3), 573-585.
- Ribeiro, T., Oliveira, M., Fraqueza, M.J., Laukova, A., Elias, M., Tenreiro, R., Barreto, A.S., Semedo-Lemsaddek, T., 2009. Antibiotic resistance and virulence factors among enterococci isolated from chouriço, a traditional portuguese dry fermented sausage. *Journal of Periodontal Research*, 74, 465–469.
- Ringo, E., Hossein, S., Ghosh, K., Doan, H.V., Beck, B.R., Song, S., 2018. Lactic acid bacteria in finfish—an update. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1818.
- Rojo-Bezares, B., Saenz, Y., Poeta, P., 2006. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 234-240.
- Rugarli, E.I., Langer, T., 2012. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *The EMBO Journal*, 31(6), 1336-1349.
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Aranda, E., Casquete, R., Córdoba, M.G., 2009. Safety and functional aspects of preselected enterococci for probiotic use in iberian dry-fermented sausages. *Journal of Food Science*, 74, 398–404.
- Rodríguez, P.R., Cano-Vindel, A., Navarro, R.M., Medrano, L., Moriana, J.A., Aguado, C.B., Cabre, G.J., González-Blanch, C., de Investigación PsicAP, G., 2017. Impacto económico y carga de los trastornos mentales comunes en España: una revisión sistemática y crítica. *Ansiedad y Estrés*, 23(2-3), 118-123.
- Ryu, E.H., Chang, H.C., 2013. *In vitro* study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from Kimchi. *Annals of Microbiology*, 63(4), 1387-1395.
- Sağlam, H., Karahan, A.G., 2017. Laktik asit bakterilerinin plazmidleri ve bunların özellikleri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2), 243-276.
- Sahnouni, F., Matallah-Boutiba, A., Chemlal, D., Boutiba, Z., 2012. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of marine fish in the oran algeria coast. *African Journal of Microbiology Research*, 6(13), 3125-3133.
- Salminen, M.K., Rautelin, H., Tynkkynen, S., Poussa, T., Saxelin, M., Valtonen, V., Järvinen, A., 2006. *Lactobacillus* bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. *Clinical Infectious Diseases*, 42(5), 35-44.
- Sanders, M.E., Akkermans, L.M., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J.T., Hormannsperger, G., Huys, G., 2010. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*, 1(3), 164-185.
- Sandra, T.S., Barlow, J., Costabile, A., Glenn R. Ian Rowland, G., 2012. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. *Journal Anaerobe*, 18, 530-538.

- Sava, I.G., Heikens, E., Huebner, J., 2010. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clinical Microbiology Infectious*, 16(6), 533-40.
- Seçkin, H., Dostbil, N.A., 2018. Research study on the identification, characterization, and gelatinase enzyme activities of the halotolerant bacteria isolated from salinized sheep skins. *Commagene Journal of Biology*, 2(1), 25-29
- Semedo, T., Santos, M.A., Lopes, M.F., Marques, J.J.F., Crespo, M.T., Tenreiro, R., 2003. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? *Systematic and Applied Microbiology*, 26(1), 13-22.
- Shafeek, M.Y., El-Malt, L.M., Abdel Hameed, K.M., El-Zamkan, M.A., 2018. Some virulence genes of pathogenic enterococci isolated from raw milk and some milk products. *SVU-International Journal of Veterinary Sciences*, 1(1), 102-113.
- Shao, Y., Zhang, W., Gou, H., Pan, L., Zhang, H., Sun, T., 2015. Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 50, 250-258.
- Sharifi, Y, Hasani, A, Ghotaslou, R., Naghili, B., Aghazadeh, M., Milani, M., Bazmany, A., 2013. Virulence and antimicrobial resistance in enterococci isolated from urinary tract infections. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(1), 197-201.
- Sharma, A.K., Sharma, V., Saxena, J., Yadav, B., Alam, A., Prakash, A., 2015. Isolation and screening of extracellular protease enzyme from bacterial and fungal isolates of soil. *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences*, 3(9), 0334-0340.
- Sharma, K., Sharma, N., Sharma, R., 2017. An evaluation of *in vitro* potential of novel *Lactobacillus paraplantarum* KM1 (KX671558) strain isolated from milk. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 83(3), 689-699.
- Sharma, P., Tomar, S.K., Goswami, P., Sangwan, V., Singh, R., 2014. Antibiotic resistance among commercially available probiotics- a review. *Food Research International*, 57, 176-195.
- Shuhadha, M.F.F., Panagoda, G.J., Madhujith, T., Jayawardana, N.W.I.A., 2017. Evaluation of probiotic attributes of *Lactobacillus* sp. isolated from cow and buffalo curd samples collected from Kandy. *Ceylon Medical Journal*, 62(3).
- Singh, T.P., Malik, R., Kaur, K., Renuka, G., 2014. Safety assessment and evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus reuteri* strains under *in vitro* conditions. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 3(2), 335-348.
- Stadnik, J., Dolatowski, Z., 2010. Biogenic amines in meat and fermented meat products. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 9(3), 251-263.

- Stamatova, I., Meurman, J.H., Kari, K., Tervahartiala, T., Sorsa, T., Baltadjieva, M., 2007. Safety issues of *Lactobacillus bulgaricus* with respect to human gelatinases in vitro. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51(1), 194-200.
- Stine, J.E., Castellanos, I., Wood, M., Henson, J., Love, F., Davis, W.R., Jenkal, R., 2007. FreePDK: An open-source variation-aware design kit. In *Microelectronic Systems Education, 2007. MSE'07. IEEE International Conference on*, 173-174.
- Strateva, T., Atanasova, D., Savov, E., Petrova, G., 2016. Mitov incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(2), 127-33.
- Sudagidan, M., Çavuşoğlu, C., Bacakoğlu, F., 2008. Investigation of the virulence genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from biomaterial surfaces. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 42(1), 29-39.
- Sudagidan, M., Aydın, A., 2010. Virulence properties of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* food isolates encoding panton–valentine leukocidin gene. *International Journal of Food Microbiology*, 138(3), 287-291.
- Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., 1996. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 2562-2566.
- Syal, P., Vohra, A., 2013. Probiotic potential of yeasts isolated from traditional Indian fermented foods. *International Journal of Microbiology Research*, 5(2), 390-398.
- Tannock, G.W., 1987. Conjugal transfer of plasmid pam beta 1 in *Lactobacillus reuteri* and between *Lactobacilli* and *Enterococcus faecalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 2693-2695.
- Terkuran, M., Erginkaya, Z., Ünal, E., Gökmen, T., Kızılyıldırım, S., Köksal, F., 2014. Comparison of genotypic diversity and vancomycin resistance of enterococci isolated from foods and clinical sources in adana region of Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(1), 121-128.
- Thapa, N., Pal, J., Tamang, J.P., 2006. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, 107(1), 33-8.
- Thumu, S.C.R., Halami, P.M., 2012. Presence of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria from fermented foods of Indian origin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102, 541–551.
- Thurlow, L.R., Thomas, V.C., Narayanan, S., Olson, S., Fleming, S.D., Hancock, L.E., 2010. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*, 78(11), 4936-4943.
- Todorov, S.D., 2009. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*-Production genetic organization. *Journal of Microbiology*, 40, 209–221.

- Todorov, S.D., Stojanovski, S., Iliev, I., Moncheva, P., Nero, L.A., Ivanova, I.V., 2017. Technology and safety assessment for lactic acid bacteria isolated from traditional bulgarian fermented meat product “lukanka”. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), 576-586.
- Udomsil, N., Rodtong, S., Tanasupawat, S., Yongsawatdigul, J., 2010. Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 186-194.
- Valenzuela, A.S., ben Omar, N., Abriouel, H., López, R.L., Veljovic, K., Cañamero, M.M., Topisirovic, M.K.L., Gálvez, A., 2009. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control*, 20(4), 381-385.
- Van Reenen, C.A., Dicks, L.M., 2011. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? a review. *Archives of Microbiology*, 193(3), 157-168.
- Van Tyne D., Martin, M.J., Gilmore, M.S., 2013. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins*, 29(5), 895-911.
- Van Tyne, D., Gilmore, M.S., 2014. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annual Review of Microbiology*, 68, 337–356.
- Van Kerckhoven, V., van Outgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., Goossens, H., 2004. Development of a multiplex PCR for the detection of *asaI*, *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(10), 4473-9.
- Wambugu, J.N., 2015. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Coconut Wine (Mnazi) for Probiotic Potential (Doctoral dissertation, JKUAT).
- Wang, L., Dong, M., Zheng, J., Song, Q., 2011. Relationship of biofilm formation and *gelE* gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. *Journal of Endodontics*, 37, 631–636.
- Werner, G., Willems, R.J.L., Hildebrandt, B., 2003. Influence of transferable genetic determinants on the outcome of typing methods commonly used for *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1499–1506.
- Winkelströter, L.K., Reis, F.B., Silva, E.P., Alves, V., De Martins, E.C.P., 2013. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. *Microbial Ecology*, 68, 35–46.
- Wood, B.J., 2012. The Lactic Acid Bacteria: Volume 1: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Springer Science & Business Media.

- Xiong, T., Guan, Q., Song, S., Hao, M., Xie, M., 2012. Dynamic changes of lactic acid bacteria flora during chinese sauerkraut fermentation. *Food Control*, 26(1), 178-181.
- Yavuz, O., Sudağıdan, M., Aydın, A., 2015. Gıda Kaynaklı Stafilokok Suşlarının Antibiyotik Direnç Profillerinin Araştırılması. İç Anadolu Bölgesi 2. Tarım ve Gıda Kongresi Nevşehir (Poster Sunumu).
- Yıldıran, H.Y., Karahan, A.G., Başyigit Kılıç, G., 2015. Laktik asit bakterilerinde çoğunluğu algılama mekanizması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72(1), 79-90.
- Zaman, M.Z., Abdulamir, A., Bakar, F.A., Selamat, J., Bakar, J., 2009. A review: microbiological, physicochemical and health impact of high level of biogenic amines in fish sauce. *American Journal of Applied Sciences*, 6(6), 1199-1211.
- Zechini, B., Cipriani, P., Papadopoulou, S., Di Nucci, G., Petrucca, A., Teggi, A., 2006. Endocarditis caused by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* in a patient with atrial myxoma: a case report. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56, 325-328.
- Zhao, T., Podtburg, T.C., Zhao, P., Chen, D., Baker, D.A., Cords, B., 2013. Reduction by competitive bacteria of *Listeria monocytogenes* in biofilms and *Listeria* in floor drains in a ready-to-eat poultry processing plant. *Journal of Food Protection*. 74, 601-607.
- Zhou, N., Zhang, J.X., Fan, M.T., Wang, J., Guo, G., Wei, X.Y., 2012. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from chinese yogurts. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 4775-4783.
- Zhu, X., Wang, Q., Zhang, C., Cheung, G.S., Shen, Y., 2010. Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, 36, 1950-5.
- Zonenschain, D., Rebecchi, A., Morelli, L., 2009. Erythromycin- and tetracycline-resistant lactobacilli in Italian fermented dry sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1559-1568.
- Zou, L.K., Wang, H.N., Zeng, B., Li, J.N., Zhang, A.Y., Zhou, Y.S., Yang, X., Xu, C.W., Xia, Q.Q., 2011. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. *The New Microbiolgy*, 34(1), 73-80.

EKLER

EK 1-Tablo 4.1. LAB Jelatinaz Üretimini Değerlendirilmesi

Bakteri Adı	Jelatinaz Üretimi	Bakteri Adı	Jelatinaz Üretimi
<i>E. faecium</i> PLj35B(A)	+	<i>L. casei</i> PLr35B	-
<i>E. faecium</i> YLj25A	+	<i>L. fermentum</i> PLa31B(B)	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa2B	+	<i>L. fermentum</i> PLC4A	+
<i>L. bulgaricus</i> PLa4A	+	<i>L. fermentum</i> PLC23A1	+
<i>L. bulgaricus</i> PLC10A	+	<i>L. fermentum</i> PLC23A2	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa18B	+	<i>L. fermentum</i> PLC27B	+
<i>L. bulgaricus</i> PLa19E	+	<i>L. fermentum</i> PLC27E	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa23B	-	<i>L. fermentum</i> PLC31A	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa24B	+	<i>L. fermentum</i> PLC35A	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa27C	+	<i>L. fermentum</i> PLC38D	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa29B	+	<i>L. fermentum</i> PLr1D	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa31D	+	<i>L. fermentum</i> PLr2B	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa36C	-	<i>L. fermentum</i> YLa13B	-
<i>L. bulgaricus</i> PLb10A2	+	<i>L. fermentum</i> YLa16C	-
<i>L. bulgaricus</i> PLb19A	-	<i>L. fermentum</i> YLa18B	-
<i>L. bulgaricus</i> PLC3A	+	<i>L. fermentum</i> YLa22A	-
<i>L. bulgaricus</i> PLC29A	-	<i>L. fermentum</i> YLa22B	+
<i>L. bulgaricus</i> PLj1C (A)	+	<i>L. fermentum</i> YLa27A	-
<i>L. bulgaricus</i> PLj23B	+	<i>L. fermentum</i> YLa37B	+
<i>L. bulgaricus</i> PLj27B	+	<i>L. fermentum</i> YLc4A	+
<i>L. bulgaricus</i> PLj29E(B)	+	<i>L. fermentum</i> YLc12A	-
<i>L. bulgaricus</i> PLj35A	+	<i>L. fermentum</i> YLc12B	+
<i>L. bulgaricus</i> PLj35B(A)	+	<i>L. fermentum</i> YLc20A	-
<i>L. bulgaricus</i> PLr3C	-	<i>L. fermentum</i> YLc23B	-
<i>L. bulgaricus</i> PLr27A	+	<i>L. fermentum</i> YLc24C	-
<i>L. bulgaricus</i> PLr31A	+	<i>L. fermentum</i> YLc35B	-
<i>L. bulgaricus</i> PLr42B1	+	<i>L. fermentum</i> YLc37C	-
<i>L. bulgaricus</i> PLr46B	-	<i>L. fermentum</i> YLc23B	-
<i>L. bulgaricus</i> YLa12B	+	<i>L. fermentum</i> YLc24C	-

Bakteri Adı	Jelatinaz Üretimi	Bakteri Adı	Jelatinaz Üretimi
<i>L. bulgaricus</i> YLa27B	-	<i>L. fermentum</i> YLc35B	-
<i>L. bulgaricus</i> YLa27C	-	<i>L. paracasei</i> PLj29C(A)	+
<i>L. bulgaricus</i> YLa31A	-	<i>L. paracasei</i> YLj14A(A)	-
<i>L. bulgaricus</i> YLj15C(A)	+	<i>L. plantarum</i> PLj18A1	+
<i>L. bulgaricus</i> YLj21C	-	<i>L. rhamnosus</i> PLc23B	-
<i>L. bulgaricus</i> YLj22A	+	<i>L. rhamnosus</i> PLc23B(A)	+
<i>L. bulgaricus</i> YLj25B	+	<i>L. rhamnosus</i> PLc36A(A)	-
<i>L. bulgaricus</i> YLj27C	+	<i>L. rhamnosus</i> PLj6B	+
<i>L. bulgaricus</i> YLj31E	+	<i>L. rhamnosus</i> PLj6B1	-
<i>L. bulgaricus</i> YLj38C	+	<i>L. rhamnosus</i> PLj14A	+
<i>L. bulgaricus</i> YLr26A	+	<i>P. acidilactici</i> PLr8D(A2)	-
<i>L. bulgaricus</i> YLr26A(B)	-		
<i>L. bulgaricus</i> YLr31A	+		
<i>L. lactis</i> PLr7A(A)	-		
<i>L. lactis</i> PLj24C(A)	+		
<i>L. lactis</i> PLj27A	+		
<i>L. lactis</i> PLr31C (B)	+		
<i>L. lactis</i> YLj63	+		

EK 2-Tablo 4.2. LAB’nde Biyofilm Oluşumunun Değerlendirilmesi

Bakteri Adı	Biyofilm	Bakteri Adı	Biyofilm
<i>E. faecium</i> PLj35B(A)	-	<i>L. casei</i> PLr35B	-
<i>E. faecium</i> YLj25A	-	<i>L. fermentum</i> PLa31B(B)	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa2B	+	<i>L. fermentum</i> PLc4A	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa4A	+	<i>L. fermentum</i> PLc23A1	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa18B	-	<i>L. fermentum</i> PLc23A2	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa19E	-	<i>L. fermentum</i> PLc27B	+
<i>L. bulgaricus</i> PLa23B	-	<i>L. fermentum</i> PLc27E	+
<i>L. bulgaricus</i> PLa24B	-	<i>L. fermentum</i> PLc31A	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa27C	-	<i>L. fermentum</i> PLc35A	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa29B	-	<i>L. fermentum</i> PLc38D	+
<i>L. bulgaricus</i> PLa31D	+	<i>L. fermentum</i> PLr1D	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa36C	-	<i>L. fermentum</i> PLr2B	-
<i>L. bulgaricus</i> PLb10A2	+	<i>L. fermentum</i> YLa13B	-
<i>L. bulgaricus</i> PLb19A	-	<i>L. fermentum</i> YLa16C	-
<i>L. bulgaricus</i> PLc3A	-	<i>L. fermentum</i> YLa18B	-
<i>L. bulgaricus</i> PLc10A	+	<i>L. fermentum</i> YLa22A	-
<i>L. bulgaricus</i> PLc29A	-	<i>L. fermentum</i> YLa22B	-
<i>L. bulgaricus</i> PLj1C (A)	-	<i>L. fermentum</i> YLa27A	-
<i>L. bulgaricus</i> PLj23B	-	<i>L. fermentum</i> YLa37B	-
<i>L. bulgaricus</i> PLj27B	+	<i>L. fermentum</i> YLc4A	-
<i>L. bulgaricus</i> PLj29E(B)	-	<i>L. fermentum</i> YLc12A	-
<i>L. bulgaricus</i> PLj35A	+	<i>L. fermentum</i> YLc12B	-
<i>L. bulgaricus</i> PLj35B(A)	-	<i>L. fermentum</i> YLc20A	-
<i>L. bulgaricus</i> PLr3C	-	<i>L. fermentum</i> YLc23B	-
<i>L. bulgaricus</i> PLr27A	-	<i>L. fermentum</i> YLc24C	-
<i>L. bulgaricus</i> PLr31A	-	<i>L. fermentum</i> YLc35B	+
<i>L. bulgaricus</i> PLr42B1	-	<i>L. fermentum</i> YLc37C	+
<i>L. bulgaricus</i> PLr46B	+	<i>L. fermentum</i> YLr12A	+
<i>L. bulgaricus</i> YLa12B	-	<i>L. fermentum</i> YLr15A	-
<i>L. bulgaricus</i> YLa27B	-	<i>L. fermentum</i> YLr16A	-
<i>L. bulgaricus</i> YLa27C	-	<i>L. paracasei</i> PLj29C(A)	-

Bakteri Adı	Biyofilm	Bakteri Adı	Biyofilm
<i>L. bulgaricus</i> YLa31A	-	<i>L. paracasei</i> YLj14A(A)	-
<i>L. bulgaricus</i> YLj15C(A)	-	<i>L. plantarum</i> PLj18A1	-
<i>L. bulgaricus</i> YLj21C	-	<i>L. rhamnosus</i> PLc23B	-
<i>L. bulgaricus</i> YLj22A	-	<i>L. rhamnosus</i> PLc23B(A)	-
<i>L. bulgaricus</i> YLj25B	-	<i>L. rhamnosus</i> PLc36A(A)	+
<i>L. bulgaricus</i> YLj27C	-	<i>L. rhamnosus</i> PLj6B	-
<i>L. bulgaricus</i> YLj31E	-	<i>L. rhamnosus</i> PLj6B1	+
<i>L. bulgaricus</i> YLj38C	-	<i>L. rhamnosus</i> PLj14A	-
<i>L. bulgaricus</i> YLr26A	+	<i>P. acidilactici</i> PLr8D(A2)	-
<i>L. bulgaricus</i> YLr26A(B)	-		
<i>L. bulgaricus</i> YLr31A	-		
<i>L. lactis</i> PLr7A(A)	-		
<i>L. lactis</i> PLj24C(A)	-		
<i>L. lactis</i> PLj27A	+		
<i>L. lactis</i> PLr31C (B)	-		
<i>L. lactis</i> YLj63	+		

EK 3-Tablo 4.3. LAB'nin Ekstraselüler Proteaz Üretimi Zon Çapları (mm)

Bakteri Adı	Skim Milk Agar	Süt Agar	Kazein Agar
<i>E. faecium</i> PLj35B(A)	8,3±0,5	5,3±0,2	4,8±0,1
<i>E. faecium</i> YLj25A	-	-	15,5±0,1
<i>L. bulgaricus</i> PLa2B	2,9±0,1	-	4,3±0,2
<i>L. bulgaricus</i> PLa4A	2,4±1,3	-	5,4±0,1
<i>L. bulgaricus</i> PLa18B	2,1±0,5	-	1,7±0,4
<i>L. bulgaricus</i> PLa19E	-	-	8,8±0,8
<i>L. bulgaricus</i> PLa23B	3,5±0,4	-	1,9±0,3
<i>L. bulgaricus</i> PLa24B	2,6±0,6	-	6,8±0,1
<i>L. bulgaricus</i> PLa27C	-	-	17,7±0,5
<i>L. bulgaricus</i> PLa29B	3,4±0,6	2,5±0,1	17,7±0,1
<i>L. bulgaricus</i> PLa31D	2,7±0,2	1,6±0,1	14,4±0,3
<i>L. bulgaricus</i> PLa36C	-	-	1,6±0,1
<i>L. bulgaricus</i> PLb10A2	2,4±0,1	1,8±0,5	15,7±0,1
<i>L. bulgaricus</i> PLb19A	4,6±0,1	2,7±0,1	7,4±0,1
<i>L. bulgaricus</i> PLc3A	-	-	4,6±1,0
<i>L. bulgaricus</i> PLc10A	2,3±0,4	3,3±0,3	8,3±0,6
<i>L. bulgaricus</i> PLc29A	1,7±0,4	2,2±0,5	15,7±0,3
<i>L. bulgaricus</i> PLj1C (A)	-	-	16,8±0,1
<i>L. bulgaricus</i> PLj23B	4,1±0,4	-	18,4±1,4
<i>L. bulgaricus</i> PLj27B	3,1±0,5	1,7±0,1	3,9±0,8
<i>L. bulgaricus</i> PLj29E(B)	2,6±0,2	1,4±0,7	1,7±1,9
<i>L. bulgaricus</i> PLj35A	2,5±0,3	2,0±0,3	-
<i>L. bulgaricus</i> PLj35B(A)	-	-	17,5±0,1
<i>L. bulgaricus</i> PLr3C	3,3±1,6	-	18,1±0,1
<i>L. bulgaricus</i> PLr27A	2,4±0,8	2,1±0,5	15,8±0,1
<i>L. bulgaricus</i> PLr31A	6,3±0,6	-	-
<i>L. bulgaricus</i> PLr42B1	-	-	17,6±0,3
<i>L. bulgaricus</i> PLr46B	3,9±0,4	-	20,6±0,1
<i>L. bulgaricus</i> YLa12B	2,8±0,1	-	16,3±0,1
<i>L. bulgaricus</i> YLa27B	3,9±0,4	2,2±0,6	17,9±0,3

Bakteri Adı	Skim Milk Agar	Süt Agar	Kazein Agar
<i>L. bulgaricus</i> YLa27C	-	-	18,9±0,1
<i>L. bulgaricus</i> YLa31A	3,1±0,1	-	16,2±0,5
<i>L. bulgaricus</i> YLj15C(A)	-	-	18,4±0,2
<i>L. bulgaricus</i> YLj21C	-	-	17,0±0,3
<i>L. bulgaricus</i> YLj22A	2,2±0,5	-	16,5±0,1
<i>L. bulgaricus</i> YLj25B	2,7±0,1	2,4±0,5	6,0±1,3
<i>L. bulgaricus</i> YLj27C	4,2±0,2	3,6±0,2	4,1±0,2
<i>L. bulgaricus</i> YLj31E	2,9±0,5	2,9±0,5	10,6±0,3
<i>L. bulgaricus</i> YLj38C	2,4±0,1	2,4±0,4	8,1±0,7
<i>L. bulgaricus</i> YLr26A	1,9±0,1	-	14,2±0,1
<i>L. bulgaricus</i> YLr26A(B)	9,4±0,2	-	17,2±0,3
<i>L. bulgaricus</i> YLr31A	3,9±0,1	-	-
<i>L. lactis</i> PLr7A(A)	2,4±0,7	-	3,8±0,2
<i>L. lactis</i> PLj24C(A)	2,6±0,9	2,0±0,2	4,4±1,8
<i>L. lactis</i> PLj27A	4,0±0,1	4,1±0,1	17,4±1,0
<i>L. lactis</i> PLr31C (B)	3,6±0,8	-	10,9±0,2
<i>L. lactis</i> YLj63	5,2±0,3	1,7±0,1	8,7±0,3
<i>L. casei</i> PLr35B	6,5±0,5	9,6±0,2	5,4±0,5
<i>L. fermentum</i> PLa31B(B)	3,2±0,2	-	4,1±0,1
<i>L. fermentum</i> PLc4A	3,3±0,1	3,2±0,1	7,3±0,1
<i>L. fermentum</i> PLc23A1	2,9±0,4	-	15,4±0,4
<i>L. fermentum</i> PLc23A2	2,5±0,6	-	19,5±0,1
<i>L. fermentum</i> PLc27B	2,3±0,3	-	16,7±0,3
<i>L. fermentum</i> PLc27E	2,1±0,1	1,9±1,0	14,7±1,7
<i>L. fermentum</i> PLc31A	-	2,9±0,9	17,7±0,2
<i>L. fermentum</i> PLc35A	-	-	8,1±0,2
<i>L. fermentum</i> PLc38D	3,2±0,1	-	16,5±0,2
<i>L. fermentum</i> PLr1D	2,6±0,3	-	15,9±0,3
<i>L. fermentum</i> PLr2B	2,1±0,2	-	16,7±0,2
<i>L. fermentum</i> YLa13B	2,8±0,1	2,2±0,3	8,7±0,3
<i>L. fermentum</i> YLa16C	3,6±1,1	-	1,9±0,1

Bakteri Adı	Skim Milk Agar	Süt Agar	Kazein Agar
<i>L. fermentum</i> YLa18B	4,5±0,4	-	11,6±0,3
<i>L. fermentum</i> YLa22A	3,1±0,2	2,1±0,7	14,6±0,5
<i>L. fermentum</i> YLa22B	3,2±0,3	-	17,4±0,1
<i>L. fermentum</i> YLa27A	1,6±0,1	2,4±0,4	10,6±0,1
<i>L. fermentum</i> YLc4A	1,7±0,3	-	18,8±0,5
<i>L. fermentum</i> YLa37B	4,0±0,9	-	11,1±0,2
<i>L. fermentum</i> YLc12A	-	-	11,7±0,7
<i>L. fermentum</i> YLc12B	-	-	12,7±0,1
<i>L. fermentum</i> YLc20A	-	-	9,4±0,1
<i>L. fermentum</i> YLc23B	-	-	15,2±0,5
<i>L. fermentum</i> YLc24C	6,2±1,6	-	14,8±0,1
<i>L. fermentum</i> YLc35B	2,9±0,5	-	12,9±0,2
<i>L. fermentum</i> YLc37C	6,4±1,0	-	3,9±0,4
<i>L. fermentum</i> YLr12A	2,4±0,1	-	16,3±0,1
<i>L. fermentum</i> YLr15A	4,6±0,3	-	13,1±0,1
<i>L. fermentum</i> YLr16A	6,4±0,1	-	14,5±0,1
<i>L. paracasei</i> PLj29C(A)	-	-	18,5±0,1
<i>L. paracasei</i> YLj14A(A)	2,6±0,2	2,1±0,1	6,3±0,1
<i>L. plantarum</i> PLj18A1	-	-	19,4±0,1
<i>L. rhamnosus</i> PLc23B	-	-	19,4±0,3
<i>L. rhamnosus</i> PLc23B(A)	-	-	11,6±0,1
<i>L. rhamnosus</i> PLc36A(A)	-	-	17,9±0,2
<i>L. rhamnosus</i> PLj6B	10,2±0,6	-	15,1±0,1
<i>L. rhamnosus</i> PLj6B1	-	-	18,2±0,3
<i>L. rhamnosus</i> PLj14A	4,3±0,6	-	18,8±0,1
<i>P. acidilactici</i> PLr8D(A2)	4,5±0,3	-	16,7±0,2

EK 4-Tablo 4.4. LAB'nin Dekarboksilaz Aktivite Değerlendirilme Sonuçları

Bakteri Adı	Histidin	Tirosin	Ornitin	Triptofan	Fenilalanin	Lizin
<i>E. faecium</i> PLj35B(A)	+	+	-	-	-	+
<i>E. faecium</i> YLj25A	+	-	-	-	+	+
<i>L. bulgaricus</i> PLa2B	-	-	-	-	-	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa4A	-	-	-	+	-	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa18B	-	+	+	+	-	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa19E	-	-	-	-	-	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa23B	-	+	+	+	-	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa24B	-	-	-	-	-	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa27C	+	+	+	-	+	+
<i>L. bulgaricus</i> PLa29B	-	+	-	+	-	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa31D	+	+	-	-	-	-
<i>L. bulgaricus</i> PLa36C	+	+	+	+	-	-
<i>L. bulgaricus</i> PLb10A2	+	+	-	-	-	+
<i>L. bulgaricus</i> PLb19A	+	-	+	+	-	-
<i>L. bulgaricus</i> PLc3A	+	+	+	-	+	+
<i>L. bulgaricus</i> PLc10A	+	+	+	-	+	+
<i>L. bulgaricus</i> PLc29A	+	+	+	+	+	+
<i>L. bulgaricus</i> PLj1C (A)	+	-	-	-	+	+
<i>L. bulgaricus</i> PLj23B	+	+	+	-	+	+
<i>L. bulgaricus</i> PLj27B	-	-	-	-	-	-
<i>L. bulgaricus</i> PLj29E(B)	-	-	-	+	-	-
<i>L. bulgaricus</i> PLj35A	-	-	-	+	+	-
<i>L. bulgaricus</i> PLj35B(A)	+	-	+	-	+	+
<i>L. bulgaricus</i> PLr3C	-	+	+	+	+	+
<i>L. bulgaricus</i> PLr27A	-	-	-	-	-	-
<i>L. bulgaricus</i> PLr31A	-	-	-	-	-	-
<i>L. bulgaricus</i> PLr42B1	-	+	+	-	+	+
<i>L. bulgaricus</i> PLr46B	+	+	+	+	+	+
<i>L. bulgaricus</i> YLa12B	+	-	-	+	-	-
<i>L. bulgaricus</i> YLa27B	+	+	+	+	+	+

Bakteri Adı	Histidin	Tirosin	Ornitin	Triptofan	Fenilalanin	Lizin
<i>L. bulgaricus</i> YLa27C	-	+	-	-	-	-
<i>L. bulgaricus</i> YLa31A	-	-	-	+	-	-
<i>L. bulgaricus</i> YLj15C(A)	-	-	-	-	-	-
<i>L. bulgaricus</i> YLj21C	+	+	-	+	+	+
<i>L. bulgaricus</i> YLj22A	+	+	-	-	+	-
<i>L. bulgaricus</i> YLj25B	-	-	-	-	-	-
<i>L. bulgaricus</i> YLj27C	-	-	-	+	-	-
<i>L. bulgaricus</i> YLj31E	-	-	-	+	-	-
<i>L. bulgaricus</i> YLj38C	+	-	-	-	+	-
<i>L. bulgaricus</i> YLr26A	-	+	+	+	+	+
<i>L. bulgaricus</i> YLr26A(B)	+	+	+	-	+	+
<i>L. bulgaricus</i> YLr31A	-	+	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> PLr7A(A)	-	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> PLj24C(A)	-	-	-	+	+	-
<i>L. lactis</i> PLj27A	+	+	+	-	-	+
<i>L. lactis</i> PLr31C (B)	+	+	+	+	+	+
<i>L. lactis</i> YLj63	-	+	-	-	-	-
<i>L. casei</i> PLr35B	-	-	+	-	-	-
<i>L. fermentum</i> PLa31B(B)	+	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> PLc4A	-	-	-	-	-	-
<i>L. fermentum</i> PLc23A1	+	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> PLc23A2	+	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> PLc27B	+	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> PLc27E	+	-	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> PLc31A	+	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> PLc35A	-	-	-	-	-	-
<i>L. fermentum</i> PLc38D	+	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> PLr1D	+	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> PLr2B	+	+	+	-	+	+
<i>L. fermentum</i> YLa13B	-	-	-	-	-	-
<i>L. fermentum</i> YLa16C	-	-	-	+	-	-
<i>L. fermentum</i> YLa18B	-	+	+	+	+	+

Bakteri Adı	Histidin	Tirosin	Ornitin	Triptofan	Fenilalanin	Lizin
<i>L. fermentum</i> YLa22A	+	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> YLa22B	+	+	+	+	+	-
<i>L. fermentum</i> YLa27A	+	+	+	-	-	+
<i>L. fermentum</i> YLc4A	-	-	-	-	-	-
<i>L. fermentum</i> YLa37B	-	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> YLc12A	+	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> YLc12B	-	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> YLc20A	+	-	+	+	+	-
<i>L. fermentum</i> YLc23B	+	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> YLc24C	+	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> YLc35B	+	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> YLc37C	-	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> YLr12A	+	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> YLr15A	+	+	+	+	+	+
<i>L. fermentum</i> YLr16A	+	+	+	+	+	+
<i>L. paracasei</i> PLj29C(A)	+	+	+	+	+	+
<i>L. paracasei</i> YLj14A(A)	-	-	-	-	-	+
<i>L. plantarum</i> PLj18A1	+	+	+	+	+	+
<i>L. rhamnosus</i> PLc23B	-	-	+	-	-	+
<i>L. rhamnosus</i> PLc23B(A)	+	+	+	-	+	+
<i>L. rhamnosus</i> PLc36A(A)	+	+	+	-	-	+
<i>L. rhamnosus</i> PLj6B	+	+	+	-	+	+
<i>L. rhamnosus</i> PLj6B1	+	+	+	-	+	+
<i>L. rhamnosus</i> PLj14A	-	-	-	+	-	-
<i>P. acidilactici</i> PLr8D(A2)	-	-	-	-	-	-

EK 5- Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

6 X Loading Dye hazırlanışı:

4 g sukroz ve 2,5 mg bromofenol blue 6 mL TE içerisinde çözündürülür ve hacim 10 mL'ye tamamlanır.

Elektroforezde, DNA ve PZR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesinde kullanılmıştır.

dNTP karışımının hazırlanışı:

100 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP çözeltilerinden 20µL alınır sonra 920 µL ultra saf su ile karıştırılmıştır.

PZR reaksiyon karışımlarını oluştururken kullanılmıştır.

Ringer çözeltisinin hazırlanışı:

1 adet Ringer tablet 500 mL ultra saf su içerisinde çözündürülmesiyle hazırlanmıştır.

%0,9 (w/v)'luk Fizyolojik tuzlu su çözeltisi (FTS)

0,9 g NaCl (Merck)100 mL distile su içerisinde çözülür. Sterilizasyon için 121°C'de 15 dakika otoklavlanır. İzolatların biyofilm oluşturma özelliklerinin belirlenmesinde inokülumları standardize etmek için kullanılmıştır.

%1,5' luk Agaroz Jel (Sigma)

1,5 g agaroz üzerine 100 mL 1X TAE tamponu eklenir ve mikrodalga fırında ısıtılarak homojen hale getirilir. Soğutulduktan sonra 5 µL SafeView™ Classic (Applied Biological Materials, Inc.) eklenerek plaka üzerine döküldükten sonra yatay elektroforez tankına yerleştirilir. Genomik DNA'ları ve PZR ürünlerini elektroforezde görüntülemek için kullanılmıştır.

0,5 M EDTA

Disodyum EDTA.2H₂O (Fluka) 186,1 g

dH₂O 700 mL

Belirtilen miktarda disodyum EDTA.2H₂O tartılarak, 700 mL dH₂O ile çözündürülür, karıştırılmakta olan çözelti NaOH ilavesi ile pH:8,0'a ayarlanıp, son hacim dH₂O ile 1000 mL'ye tamamlanır. Çözelti otoklavlanır.

1M Tris-Cl

Tris Base (AmrescoR) 121,1 g

dH₂O 700 mL

Belirtilen miktarda tris-base tartılıp, 700 mL dH₂O ile çözüldürölüp, konsantre HCl ile pH ayarlaması yapılır ve son hacim dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanarak 1M Tris-Cl hazırlanır.

50 X TAE Stok solüsyon hazırlanışı:

242 g Tris Base (AmrescoR)

57,1 mL Glasiyal asetik asit

100 mL 0.5 M EDTA (pH 5,8) ölçölerek hacim 1 litreye tamamlanır.

Belirtilen miktarda tartılan tris base 600 mL dH₂O ile çözüldürölüp, daha sonra belirtilen miktarlarda alınan EDTA ve glasiyal asetik asit çözeltiliye eklenir. Son hacim dH₂O ile 1000 mL'ye tamamlanır.

1 X TAE hazırlanışı:

20 mL 50 X TAE stok solüsyonu balon jöjeye konulup, hacim dH₂O ile 1 litreye tamamlanır.

PZR ürünlerinin agaröz jelde görüntü alınmasında kullanılmıştır.

1 X TE Buffer (pH: 8) çözeltilisinin hazırlanışı:

0,5M EDTA (pH: 8,0) (Fluka) 0,2 mL

1M Tris-HCl 1 mL

dH₂O 1000 mL

0,5 M EDTA ve 1M Tris-Cl çözeltilerinden belirtilen miktarlarda alınarak karıştırılıp, dH₂O ile son hacim 1000 mL'ye tamamlanır.

Lizis Buffer (pH 8,0)

20 mM Tris-HCl (AmrescoR)

2 mM EDTA (Fluka)

%1,2 Triton-x-100

20 mg/mL Lizozim

Önce Tris-HCl sonra EDTA çözüölür ve üzerine Triton-x-100 ilave edilir. Son hacim 100 mL olacak şekilde distile suda çözüölür. 0,1 M NaOH ile pH 8.0'e ayarlanır. DNA izolasyonunda bakteri hücrelerini parçalamak amacıyla kullanılmıştır. Lizozim miktarı hesaplanarak kullanılmadan hemen önce hazırlanıp taze kullanılmıştır.

Kristal Viyole Boyası

Kristal viyole 2,0 g

Alkol (%95'lik) 20 mL

Amonyum oksalat 0,80 g

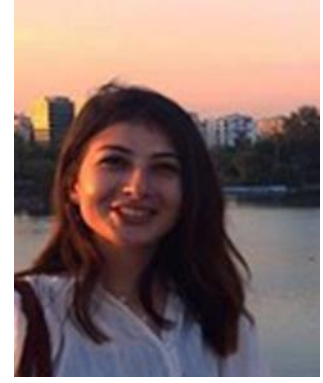
Distile su 80 mL

Kristal viyole alkolde; Amonyum oksalat distile suda çözülür ve iki çözelti karıştırılır. İzolatların biyofilm oluşturma özelliklerinde kullanılmıştır.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Ebru DEMİR
Doğum Yeri ve Yılı: Samsun, 1994



Eğitim Durumu

	<u>Yıl</u>
Lise : Bafra Kolay Lisesi (Samsun)	2008-2012
Lisans : Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü	2012-2016
Yüksek Lisans: University of Warmia and Mazury in Olsztyn	02/2018-06/2018

Çalıştığı Kurum / Kurumlar

	<u>Yıl</u>
Gezinler Gıda	2016-2017

Yayınları

- Şen, D.B., Kılıç, B., **Demir, E.**, Başyigit Kılıç, G., 2019. Et ve et ürünlerinde mikrobiyal dekontaminasyon için bazı ısıl olmayan teknolojilerin kullanımı. *GIDA/The Journal of Food*, 44(2), 202-215.
- Demir, E.**, Başyigit Kılıç, G., Uşan, E., 2018. Farklı gıdalardan izole edilen laktik asit bakterileri'nin antibiyotik direnç profilleri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(2), 197-204.
- Demir, E.**, Kaygusuz, E., Başyigit Kılıç, G., Yüce, S., Soyuçok, A., 2017. Yoğurt örneklerinden izole edilmiş laktik asit bakterilerinin moleküler yöntemlerle tanımlanması ve ekzopolisakkarit üretimlerinin belirlenmesi. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(1), 262-267.
- Demir, E.**, Başyigit Kılıç, G., 2017. Laktik Asit Bakterilerinin Biyogüvenilirlik Özellikleri. 2nd International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2017) 25-27 Ekim, Adana, Türkiye, s 449 (Sözlü Sunum).

- Demir, E.**, Uşan, E., Başığit Kılıç, G., 2017. Farklı Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Profilleri. 2nd International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2017) 25-27 Ekim, Adana, Türkiye, s 450 (Sözlü Sunum).
- Demir, E.**, Soyuçok, A., Yüce, S., Başığit Kılıç, G., 2017. Determination Of Exopolysaccharide Production Properties Of Lactic Acid Bacteria İsolated From Yogurt Samples. 6th International Congress on Food Technology 18-19 March 2017 in Athens, Greece (Poster Sunum).
- Bilecen, D., Kılıç, B., **Demir, E.**, Başığit Kılıç, G., 2017. Non-Thermal Applications Used İn Meat Technology For Microbial Decontamination. 2. Uluslararası Turizm ve Mikrobiyal Gıda Güvenliğı Kongresi, Antalya, Türkiye, s 35-36 (Poster Sunum).

