



**PASTIRMADAN ENTEROKOKLARIN
İZOLASYONU/İDENTİFİKASYONU
VE KARAKTERİZASYONU**

Özlem ERTEKİN

**Doktora Tezi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Prof. Dr. Mürkerrem KAYA
2016**

Her Hakkı Saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**PASTIRMADAN ENTEROKOKLARIN
İZOLASYONU/İDENTİFİKASYONU VE KARAKTERİZASYONU**



Özlem ERTEKİN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2016**

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

PASTIRMADAN ENTEROKOKLARIN İZOLASYONU/İDENTİFİKASYONU
VE KARAKTERİZASYONU

Prof. Dr. Mükerrerem KAYA danışmanlığında, Özlem ERTEKİN tarafından hazırlanan bu çalışma 22/01/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (5/5)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Mükerrerem KAYA

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON

İmza :

Üye : Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Güzin KABAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu **04.../02.../2016** tarih ve **..6.../....43.....** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Tübitak 1002-Hızlı Destek, projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 1150030

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

PASTIRMADAN ENTEROKOKLARIN İZOLASYONU/İDENTİFİKASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Özlem ERTEKİN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mükerrerem KAYA

Araştırmada 20 farklı firmadan temin edilen pastırma örneklerinden toplam 271 enterokok izolatu bazı fenotipik özellikler yönünden (farklı sıcaklıklarda gelişme, glukozdan gaz üretimi, farklı pH değerlerinde gelişme, pigmentasyon, piruvat aktivitesi, hareket, hemoliz) test edilmiş ve seçilen 100 izolat fenotipik (VITEK 2GP) ve genotipik (16S rRNA) olarak tanımlanmıştır. Bu 100 suş antagonistik aktivite yönünden de test edilmiştir. Ayrıca pastırma örnekleri mikrobiyolojik (laktik asit bakterileri, *Enterococcus*, *Micrococcus/Staphylococcus*, maya-küf, Enterobacteriaceae) sayımlar ile pH ve nem analizlerine de tabi tutulmuştur. Örneklerde dominant florayı genellikle *Micrococcus/Staphylococcus* oluşturmuştur. Laktik asit bakteri ve maya-küf sayıları sırasıyla 10^3 - 10^8 kob/g, 10^2 - 10^6 kob/g arasında değişmiştir. Enterobacteriaceae ise dört örnek hariç saptanabilir sınırın altında tespit edilmiştir. Enterokok sayısı ise örneklerin %35'inde 1×10^2 - 1×10^4 kob/g aralığında yer alırken diğer %35'lik kısım ise 10^6 kob/g'dan daha yüksek sayılar vermiştir. Pastırma örneklerinde dominant türün *E. faecium* olduğu belirlenmiştir. Tanımlanmış 100 izolattan sadece 9'u kuyu difüzyon testinde *L.monocytogenes*'e karşı antagonistik aktivite göstermiştir. Suşlar *S.aureus* ve *E.coli* O157:H7'ye karşı ise antagonistik aktivite sergilememiştir.

2016, 77 sayfa

Anahtar Kelimeler: Pastırma, Enterokok, İdentifikasyon, Starter Kültür, Antagonistik Aktivite

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

CHARACTERISATION AND IDENTIFICATION/ISOLATION OF *ENTEROCOCCUS* FROM PASTIRMA

Özlem ERTEKİN

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor : Prof. Dr. Mükerrerem KAYA

A total of 271 *Enterococcus* isolates obtained from pastırma samples from 20 different firms were tested for some phenotypic properties (growth at different temperatures, gas production from glucose, growth under different pH values, pigmentation, pyruvate activity and hemolysis) and 100 selected isolates were identified as phenotypic (VITEK 2GP) and genotypic (16S rRNA). These 100 strains were also tested for antagonistic activity. In addition, pastırma samples were also subjected to microbiological (lactic acid bacteria, *Enterococcus*, *Micrococcus/Staphylococcus*, yeast-mold, Enterobacteriaceae) counts and pH and moisture analyses. In general, dominant flora in the samples was constituted by *Micrococcus/Staphylococcus*. Lactic acid bacteria and yeast-mold counts were varied between 10^3 - 10^8 kob/g and 10^2 - 10^6 kob/g, respectively. Except for four samples, Enterobacteriaceae were determined to be under the detectable level. *Enterococcus* counts were found to be in 1×10^2 - $<1 \times 10^4$ kob/g in range 35% of the samples while another 35% were counted to be greater than 10^6 kob/g. It was determined that the dominant species in pastırma samples was *E. faecium*. Only 9 of the 100 identified isolates showed antagonistic activity against *L.monocytogenes* in well diffusion test. No antagonistic activity against *S.aureus* and *E.coli* O157:H7 were observed.

2016, 77 pages

Keywords: Pastırma, *Enterococcus*, Identification, Starter Culture, Antagonistic Activity

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçların yorumlanmasında bilimsel bilgisi ve sonsuz desteği ile her türlü yardım ve kolaylığı gösteren, fikir ve düşüncelerini rehber edindiğim ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mükerrerem KAYA'ya içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında yardım ve ilgisi ile her zaman yanımda olan, bilgi ve katkısını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Güzin KABAN'a teşekkür ederim.

Tez kapsamında gerçekleştirdiğimiz her aşamada bilimsel yönden çalışmayı destekleyen tez izleme komitesi hocalarımdan Sayın Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR'a teşekkür ederim.

Çalışmayı “Pastırmadan Enterokokların İzolasyonu/İdentifikasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı ve 115O030 no'lu proje ile “TÜBİTAK 1002- Hızlı Destek Projesi” kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca, çalışmamın başlangıcından sonuna kadar attığım her adımda sabırla yanımda olan, güvenini ve manevi desteğini her zaman üzerimde hissettiğim çok değerli sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özlem ERTEKİN

Ocak 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	14
3.1. Materyal	14
3.2. Yöntem.....	14
3.2.1. Örneklerin analizlere hazırlanması	14
3.2.2. pH değerinin belirlenmesi	14
3.2.3. Nem değerinin belirlenmesi	14
3.2.4. Mikrobiyolojik analizler.....	15
3.2.5. Enterokokların izolasyonu, fenotipik ve moleküler tanımlaması	16
3.2.6. Antagonistik aktivite testleri	20
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	22
4.1. Pastırma Örneklerinin pH ve Nem Değerleri ile Mikrobiyolojik Özellikleri	22
4.1.1. Pastırma örneklerinin <i>Enterococcus</i> sayıları.....	27
4.2. İzolatların Fenotipik Özelliklerine Ait Sonuçlar.....	30
4.2.1. VITEK GP ile fenotipik tanımlama	46
4.3. Genotipik İdentifikasyona Ait Sonuçlar.....	51
4.4. Antagonistik Aktivite Sonuçları.....	56
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR	67
EKLER.....	74
EK 1.....	74
ÖZGEÇMİŞ	78

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
a_w	Su aktivitesi
°C	Santrigrat Derece
cfu	Koloni Oluşturan Birim
dk	Dakika
g	Gram
kob	Koloni Oluşturan Birim
log	Logaritma
ml	Mililitre
mg	Miligram
ppm	Milyonda Kısım
sp.	Species
subsp.	Subspecies
µg	Mikrogram

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Pastırma örneklerinin enterokok sayılarına ait frekans dağılımı (EA: <i>Enterococcus</i> Agar, S: Slanetz-Bartley Agar, KF: KF <i>Streptococcus</i> Agar).....	28
---	----



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Farklı firmalardan temin edilen pastırma örneklerinin bazı mikrobiyolojik özellikleri ile pH ve %nem değerlerine ait analiz sonuçları.....	26
Çizelge 4.2. Farklı firmalara ait pastırma örneklerinin farklı besiyerinde belirlenen <i>Enterococcus</i> sayıları (log kob/g)	27
Çizelge 4.3. Pastırmadan elde edilen enterokok izolatlarının bazı fenotipik özellikleri	34
Çizelge 4.4. VITEK sonuçları.....	48
Çizelge 4.5. Genotipik tanımlama	52
Çizelge 4.6. İzolatların genotipik ve fenotipik identifikasyon oranları	55
Çizelge 4.7. Slanetz-Bartley Agar, <i>Enterococcus</i> Agar, KF <i>Streptococcus</i> Agar'dan izole edilen suşların agar spot ve kuyu difüzyon testleri ile <i>E.coli</i> O157:H7, <i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i> 'e karşı antagonistik aktivitesinin belirlenmesi.....	59

1. GİRİŞ

Pastırma, ülkemizde yaygın olarak kurutma teknolojisi uygulanarak üretilen kürlenmiş geleneksel kuru bir et ürünüdür (Gökalp vd 1999; Aksu and Kaya 2005; Uğuz *et al.* 2010; Kaban 2013). Pastırmanın üretiminde hammadde seçimi, hammaddenin hazırlanması, kürlenme, presleme, kurutma ve çemenleme önemli proses aşamalarıdır. Bu ürünün en önemli özelliği üretimde herhangi bir ısıtma işlemi ve tütülenme uygulanmamasıdır (Kaban 2013). “Lachschenken”, “Rohschinken”, “lacon”, “raw ham”, “prosciutto di Parma”, “country style ham”, “jambon de Savoie”, “dry cured pork shoulder” gibi parça halde işlenen et ürünleri ise benzer şekilde tuzlama veya kürlenme uygulanarak dayanıklı hale getirilen et ürünleridir (Kaya ve Kaban 2014).

Pastırma kullanılan hammaddenin geldiği bölgelere bağlı olarak şekerpare, kuşgözü, bohça, kürek ve sırt gibi farklı isimlerle adlandırılmaktadır. Pastırmanın fizikokimyasal, tekstürel ve mikrobiyolojik özellikleri hammaddenin elde edildiği karkas bölgesine bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir (Gökalp vd 1994). Pastırma üretimi kullanılan hammaddenin büyüklüğüne ve proses şartlarına bağlı olarak 3-4 hafta sürebilmektedir (Tekinşen ve Doğruer 2000; Aksu ve Kaya 2001a). Pastırmada %nem değerinin Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği (Anonim 2012) ve Türk Standartları Enstitüsü Pastırma Standardına (TSE 2002) göre %50’yi geçmemesi gerekmektedir. Pastırmada tam bir laktik asit fermentasyonu söz konusu olmadığından son üründe pH değeri 5,5’in altına düşmemektedir. Diğer taraftan pastırmada aşırı bir kuruma ürünün duyu özellikleri açısından arzu edilmemektedir (Leistner 1988; Kaban 2009; Kaya ve Kaban 2014). Pastırma üretiminin son aşamasında uygulanan çemenleme işlemi ürünün aşırı derecede kurummasını önlemekte ve ayrıca ürünün lezzet ve aromasına katkıda bulunmaktadır (Gökalp vd 1999; Yetim *et al.* 2006). Ayrıca çemen mikrobiyal kontaminasyona karşı da koruyucu özellik göstermektedir (Tekinşen ve Doğruer 2000; Öztürk 2015).

Pastırma gerek üretim sırasında kullanılan tuzun etkisiyle, gerekse uygulanan kurutma işlemleri nedeni ile daha düşük su aktivitesi (a_w) değerine sahip olup orta nemli et ürünleri içerisinde sınıflandırılmaktadır (Aksu and Kaya 2002a; Kaban 2009; Öztürk 2015).

Et endüstrisinde istenilen mikroorganizmalardan ürünü iyileştirmek, ürün güvenliğini sağlamak, ürüne duyuşal özellikler kazandırmak ve sağlığı yararlı etkiler sağlamak amacıyla yararlanılmaktadır (Lücke 2000; Kaya ve Kaban 2014).

Pastırmada starter kültür kullanımına yönelik olarak çok sayıda çalışma yapılmış ve starter kültür kullanımının ürünün kalitatif özelliklerinde olumlu etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur (Katsaras *et al.* 1996; Aksu ve Kaya 2001a; Aksu ve Kaya 2002a, 2002b; Aktaş *et al.* 2005). Laktik asit bakterileri ve koagülaz negatif stafilkoklar, pastırma üretiminde önem arz eden iki önemli mikroorganizma grubudur. Koagülaz negatif stafilkoklar çoğunlukla dominant florayı oluşturmaktadır. Bu mikroorganizmalar, nitrat redüktaz, katalaz, lipolitik ve proteolitik aktivitelerinden dolayı pastırma ve benzeri kür edilmiş kurutulmuş et ürünlerinde rengin oluşumu ve stabilitesi, oksidasyonun geciktirilmesi ve aroma oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Kaya ve Kaban 2014). Diğer taraftan, LAB, duyuşal ve tekstürel özelliklerin gelişiminde büyük önem taşımaktadır (Aktaş vd 2005; Kaban 2009).

LAB, bazı gıdaların üretim ve olgunlaştırılmasında önemli fonksiyonel özelliklere sahip olmaları, doğada çokça bulunmaları, çeşitli gıda maddelerinde çoğunlukla bozulmalara sebep olmaları nedeniyle gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadır. Gıda hammaddelerinin LAB ile fermentasyonu en eski gıda muhafaza yöntemlerinden biri olarak da bilinmektedir (Andersson 1989; Mayra-Makinen and Bigret 1993; Sağdıç ve Arıcı 2010).

LAB içerisinde yer alan enterokoklar, ısıya karşı gösterdikleri direnç ile ekstrem pH ve yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilme veya canlılıklarını sürdürebilme özellikleri nedeni ile et ürünlerinde de bulunabilmektedir. Son yıllarda enterokoklar, gıdaların

organoleptik özelliklerine katkıda bulunmaları, patojenlere karşı bakteriyosin üretme yetenekleri ve probiyotik özellikleri nedeniyle bazı gıdaların üretiminde starter veya biyokoruyucu kültür olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak bu LAB'nin GRAS (Generally Recognised as Safe) mikroorganizmalar olarak düşünülmesi hala tartışılmaktadır. Buna rağmen, gıdalardan izole edilen enterokok suşlarının koruyucu kültür olarak kullanılabileceği pek çok araştırmada belirtilmektedir (Callewaert *et al.* 2000; Franz *et al.* 2001; Sarantinopoulos *et al.* 2001; Franz *et al.* 2003; Leroy *et al.* 2003; Työppönen *et al.* 2003; Khan *et al.* 2010).

Enterokoklar, Gram-pozitif, spor oluşturmeyen, pseudo-katalaz reaksiyonu gösteren bazı suşları olan, çoğunlukla katalaz negatif, oksidaz negatif, fakültatif anaerob, genellikle hareketsiz, kok şeklinde bakterilerdir. Enterokoklar, homo-fermentatif karakterde olup optimum gelişme sıcaklıkları 35°C olmakla birlikte 10-45°C aralığında, %6,5 NaCl ve pH 9,6'da çoğalabilmekte ve 60°C'de 30 dakikalık ısıtılarda canlılıklarını sürdürebilmektedir. Enterokoklara toprak, yüzey suları, bitki ve sebzelerde sıklıkla rastlanabilmektedir. Bu bakteriler et, fermente et ürünleri, süt ürünleri gibi gıdalardan da izole edilebilmektedir (Franz *et al.* 1999; Franz *et al.* 2003; Klein 2003; Foulque Moreno *et al.* 2006). Önceleri *Streptococcus* cinsi içinde yer alan “fokal streptokoklar” veya Lancefield serolojik D grubu streptokoklar olarak adlandırılan bakteriler, daha sonra yapılan kemotaksonomik ve filogenetik çalışmalar sonucunda enterokok olarak adlandırılmış ve *Enterococcus* cinsi içerisinde 22 tür tanımlanmıştır (Franz *et al.* 2003). 16S rRNA dizilimine göre enterokoklar 4 gruba ayrılmaktadır. “*faecium*” grubunda *E. faecium*, *E. hirae*, *E. mundtii*, “*avium*” grubunda *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus* ve *E. pseudoavium*, “*gallinarum*” grubunda *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* bulunmakta ve *E. columbae* ve *E. cecorum* da dördüncü grup içerisinde yer almaktadır. *E. faecalis*, *E. dispar*, *E. flavescens*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfurous* ve *E. seriolicida* enterokoklar ise bireysel olarak değerlendirilmektedir (Franz *et al.* 1999).

Pek çok *Enterococcus* suşu, enterosinler olarak adlandırılan bakteriyosinleri üretmektedir. Bu suşlar, bu özelliklerinden dolayı gıda kaynaklı patojenler ile

bozulmaya neden olan bakterilere karşı antagonistik aktivite gösterebildiklerinden gıda endüstrisi açısından ayrı bir önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalar enterokokların starter ve yardımcı kültür olarak kullanımlarının yaygınlaştığını göstermektedir. Ayrıca bazı ülkelerde enterokoklardan probiyotik olarak da faydalanılmaktadır (De Vuyst *et al.* 2003, Foulque Moreno *et al.* 2006). Ancak bazı enterokokların enfeksiyonlara neden olduğu da bilinmektedir. Özellikle bu enterokoklardan *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının fırsatçı patojen olduğu bildirilmektedir. Bu bakterilerin patojenitesi antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç ve taşıdıkları virülens genleri ile ilişkilidir (Franz *et al.* 1999; Franz *et al.* 2003; Peters *et al.* 2003; Sustackova *et al.* 2004; Foulque Moreno *et al.* 2006). Bu sebeple gıdalardan izole edilen enterokokların kazanılmış antibiyotik dirençlilik ve taşıdıkları virülens genleri özellikleri yönünden incelenmesi gerekmektedir (Eaton and Gasson 2001; Franz *et al.* 2001; Semedo *et al.* 2003; Foulque Moreno *et al.* 2006).

Enterokoklar, hastalık yapıcı gıda patojenleri olarak değerlendirilirken aynı zamanda gıdalardaki yararlı ve önemli rolleriyle dikkat çekmektedir. Enterokoklar, ısı işlem görmüş et ürünlerinde canlılığını sürdürebilmekte ve dolayısıyla bozulmaya da neden olabilmektedir. Diğer taraftan gıda orijinli bazı enterokoklar ürettiği bakteriyosinlerle antilisteriyal aktivite gösterebilmektedir. Enterokoklar insan ve hayvanların bağırsaklarında mikrobiyel dengeyi sağlayarak probiyotik özellik de gösterebilmektedir (Franz *et al.* 2003). Enterokokların bu etkilerinin yanı sıra hastane kaynaklı patojenler arasında önemli bir yere sahip olduğu özellikle de *E. faecalis* ve *E. faecium*'un fırsatçı patojen olduğu, bakteriyemi ve endokarditisin yanında üriner sistemde merkezi sinir sistemi gibi dokularda enfeksiyona neden olabildiği rapor edilmektedir (Toğay ve Temiz 2011). Enterokokların patojenitelerinde vankomisin gibi bazı antibiyotiklere direnç özellikleri ile virulans faktörlerinin önemli rolü olduğu bildirilmektedir. Bu mikroorganizmaların antibiyotik direnci doğal ve kazanılmış direnç olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. Sitolizin, agregasyon materyalleri, jelatinaz ve hücre dışı yüzey proteini enterokokların virülans faktörlerine tipik örneklerdir (Franz *et al.* 2003; Toğay ve Temiz 2011). Diğer taraftan gıdaların vankomisin dirençli enterokoklara kaynak oluşturabileceği ve bu nedenle çok iyi incelenmesi gerektiği belirtilmektedir (Franz *et*

al. 2003). Ayrıca gıdalardan izole edilen enterokok suşlarının potansiyel virülans faktörleri açısından da detaylı bir şekilde incelenmesi büyük önem arz etmektedir (Toğay ve Temiz 2011).

Geleneksel bir et ürünü olan pastırmadan enterokokların izolasyonu ve identifikasyonuna yönelik kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Pastırmada LAB üretim koşullarına bağlı olarak 10^2 ile 10^8 kob/g arasında değişebilmektedir (Özdemir vd 1999; Aksu ve Kaya 2001a; Kaban ve Kaya 2006; Kaban 2013). Pastırma ve benzeri ürünlerde her ne kadar gerçek bir laktik asit fermentasyonu sözkonusu olmasa da LAB rekabet edici özellikleri ile bakteriyosin üretebilme yeteneklerinden dolayı büyük önem arz etmektedir (Lücke 1986; Jessen 1995; Hugas *et al.* 2003). Son yıllarda yapılan araştırmalarda gıdalardan ve et ürünlerinden izole edilen enterokokların özellikle de *E. faecium*'un klinik suşlara göre daha düşük patojenite potansiyeline sahip olduğunun belirlenmesi enterokoklara olan ilgiyi artırmıştır (Hugas *et al.* 2003). Diğer taraftan LAB'nin lipolitik ve proteolitik aktiviteleriyle aroma oluşumunda da rol oynadıkları bilinmektedir (Lücke 1986; Jessen 1995). Pastırma üretiminde starter kültür kullanımına yönelik araştırmalarda kullanılan LAB suşlarının ürünün duyuşal özellikleri ile güvenliğine önemli katkılar sağladığı belirtilmektedir (Aksu ve Kaya 2001a; Aksu ve Kaya 2002c; Aksu *et al.* 2008, Gönülalan *et al.* 2009).

Pastırmadan LAB izolasyonuna ve identifikasyonuna yönelik araştırma sayısı oldukça azdır. Bu araştırmalarda izolasyon amacıyla kullanılan besiyerleri enterokoklara spesifik olmadığından *Enterococcus* cinsi bakteriler ya izole edilememiş ya da sınırlı oranda izole edilmiştir (Özdemir ve Sırken 1997; Dinçer ve Kıvanç 2012; Sınmaz 2013; Çınar 2014). Mevcut bu çalışmada LAB bakteri florası içerisinde daha düşük oranlarda yer aldığı düşünülen enterokoklar için selektif üç farklı besiyeri kullanılmıştır. Çalışma bu yönüyle daha önce yapılan çalışmalardan farklılık göstermektedir. Sucuk gibi fermente et ürünlerinde enterokokların izolasyonu ve identifikasyonuna yönelik pek çok çalışma varken (Laukova *et al.* 1999; Herranz *et al.* 2001; Ammor *et al.* 2005; Ruiz-Moyano *et al.* 2008; Sparo *et al.* 2008; Barbosa *et al.* 2009; Ben-Belgacem *et al.* 2010; Jen-Tu *et al.* 2010) pastırma gibi parça halinde işlenen küredilmiş kurutulmuş et ürünlerinde bu

kapsamda yapılan araştırma sayısı oldukça azdır (Peters *et al.* 2003; Sanchez-Valenzuela *et al.* 2009; Jahan *et al.* 2013).

Mevcut bu çalışmanın amacı, pastırmadan enterokokların izolasyonunu gerçekleştirmek, elde edilen izolatların fenotipik ve genotipik identifikasyonunu yapmak, tanımlanan izolatların antagonistik aktivitelerini belirlemek ve böylelikle bu izolatların starter ve/veya koruyucu kültür olarak kullanılabilme potansiyelini ortaya çıkarmaktır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Geleneksel bir et ürünü olan pastırmadan enterokokların izolasyonu ve identifikasyonuna yönelik kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak pastırmadan laktik asit bakterilerinin izolasyonuna ve identifikasyonuna yönelik literatürde birkaç çalışma mevcuttur (Özdemir ve Sırıken 1997; Dinçer ve Kıvanç 2012; Sımmaz 2013; Çınar 2014).

Özdemir ve Sırıken (1997) tarafından değişik firmalardan temin edilen pastırma örneklerinden laktik asit bakteri izolasyonuna yönelik yapılan bir çalışmada, 40 izolat *Lactobacillus sakei*, 9 izolat *L. carnis*, 8 izolat *L. curvatus*, 8 izolat *L. divergens*, 7 izolat *L. alimentarius*, 6 izolat *L. casei* spp. *rhamnosus*, 6 izolat *L. confusus*, 5 izolat *L. plantarum* ve 5 izolat da *L. viridescens* olarak tanımlanmıştır.

Eskişehir ilinden temin edilen pastırma örnekleri üzerinde yürütülen bir araştırmada fenotipik identifikasyon sonucunda *Lactobacillus plantarum*'un dominant tür olduğu, genotipik identifikasyonda ise ayrıca *L. sakei*, *E. faecium* and *Pediococcus acidilactici* türlerinin de bulunduğu belirtilmiştir (Dinçer ve Kıvanç 2012).

Farklı firmalardan temin edilen pastırma örnekleri üzerinde yürütülen diğer bir araştırmada ise 106 laktik asit bakteri izolatu izole edilmiş ve 16S rDNA dizi analizi ile yapılan tanılama işlemi sonucunda, izotların %27,4'ü *L. sakei*, %24,5'i *Weisella cibaria* ve %19,8'i *Weisella confusa* olarak identifiye edilmiştir. Ayrıca araştırmada, *Pediococcus pentosaceus* (%5,7), *P. acidilactici* (%4,7), *Leuconostoc carnosum* (%3,77), *Weisella hellenica* (%2,83), *L. plantarum* (%1,88), *L. paraplantarum* (%1,88), *L. curvatus* (%1,88), *Weisella halotolerans* (%1,88), *L. graminis* (%0,94), *L. carnosus* (%0,94), *Leuconostoc citreum* (%0,94), *Leuconostoc mesenteroides* (%0,94) suşları da izole edilmiştir (Sımmaz 2013).

Çinar (2014) tarafından iki farklı kürlenme sıcaklığı (4°C veya 10°C) ve iki farklı kürlenme ajanı (150 ppm sodyum nitrit veya 300 ppm potasyum nitrat) uygulanarak üretilen pastırma örnekleri üzerinde yapılan araştırmada, toplam 87 LAB suşu tanımlanmış ve dört farklı pastırma grubunda dominant türün *Pediococcus pentasaceus* olduğunu belirlenmiştir. Ayrıca pastırma örneklerinden *P. acidilactici*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. collinoides*, *Leu. mesenteroides* de izole edilmiştir.

Gomes *et al.*(2008) yaptıkları çalışmada, Brezilya’da süt, et ürünleri, peynir ve sebze gibi bazı gıdalardan izole edilen *Enterococcus* spp. suşlarının gentamisin, tetrasiklin ve eritromisine direnç gösteren *E. faecalis* suşlarının sayısının *E. faecium*’dan daha fazla olduğunu ve bu antibiyotiklere çoklu direnç gösteren *E. faecalis* izolatlarının bulunduğunu tespit etmişlerdir. Vankomisine direnç gösteren *E. faecium* suşlarının ise *vanA* ve *van B* genlerini taşımadıklarını bildirmişlerdir.

Eaton and Gasson (2001) yaptıkları çalışmada, starter kültür, klinik ve gıda kaynaklı *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* suşlarının virülans genlerini bulundurma oranlarını araştırmışlardır. Klinik *E. faecalis* suşlarının, gıda kaynaklı suşlara göre virülans genlerini daha fazla taşıdıklarını, starter kültür suşlarının ise gıda kaynaklı suşlardan virülans gen yönünden daha güvenli olduğunu belirlemişlerdir. *E. faecalis* suşlarının çoklu virülans genleri bulundurduğu da tespit edilmiştir. Buna karşılık *E. faecium* suşlarının ise genellikle virülans genleri yönünden güvenli olduğu ifade edilmiştir. Semedo *et al.* (2003) çalışmalarında 164 enterokok izolatını (Gıda ve klinik izolatlar, insan ve veteriner orijinli) virülans genler yönünden değerlendirmişler ve starter ve probiyotik kültürlerin virülans genleri taşımaları ve aktarımı yönüyle daha dikkatli kontrol edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Gıdalardan izole edilen *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının virülans faktörlerini taşıma oranının araştırıldığı bir çalışmada, *E. faecium* suşlarının %10,4’ünün, *E. faecalis* suşlarının ise %78,8’inin virülans faktörlerden birini ya da daha fazlasını bulundurduğu tespit edilmiştir (Franz *et al.* 2001). Konu ile ilgili diğer bir çalışmada ise hayvansal

kaynaklı gıdalardan elde edilen enterokok izolatlarının araştırılan virülans genlerini ağırlıklı olarak taşıdığı bildirilmiştir (Sanchez-Valenzuela *et al.* 2009).

Enterokokların ürettiği bakteriyosinlerin, fermente sosisler ile dilimlenmiş-vakum ambalajlanmış pişirilmiş et ürünlerinde *Listeria monocytogenes*'e karşı koruyucu kültür olarak kullanımına yönelik bir araştırmada, enterosinlerin ve enterosin oluşturan enterokokların kimyasal koruyuculara alternatif olarak et ürünlerinde patojenlerin kontrolünde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Hugas *et al.* 2003).

Avrupa'da pek çok geleneksel fermente et ürününde *Enterococcus* sayısı genellikle 10^2 - 10^5 kob/g civarındadır. Asit üretme kapasiteleri oldukça düşük olan bu mikroorganizmalar yüksek pH'lı fermente sosislerde canlılıklarını sürdürebilmekte ve çoğalabilmektedir (Kaya ve Kaban 2014). Geleneksel Türk sucuğu üzerinde yapılan bir çalışmada ise incelenen örneklerin %41'inin 10^4 kob/g düzeyinde enterokok içerdiği tespit edilmiştir (Sırıken *et al.* 2006).

Tunus'da Gueddid olarak adlandırılan kuru fermente bir sosis üzerinde yapılan bir çalışmada, 24 izolat moleküler yöntemler ile *E. faecium* olarak tanımlanmış ve bu izolatların tamamının *S. aureus* ile *Listeria* spp., *Enterococcus* türlerine karşı inhibitör aktivite gösteren bakteriyosinleri ürettiği tespit edilmiştir. Ayrıca araştırmada bir *E. faecium* izolatının *E. coli* CECT 877'ye karşı antagonistik aktivite gösterdiği ve izolatların çoğunun erythromycin, rifampicin, ciprofloxacin, lavofloxacin ve nitrofurantoin'e dirençli olduğu belirlenmiştir (Ben-Belgacem *et al.* 2010).

Salpicao de vinhais, Chouriça de vinhais, Alheira adı verilen fermente sosisler üzerinde yapılan bir araştırmada örneklerden izole edilen 1060 izolat fenotipik ve genotipik olarak tanımlanmıştır ve sonuçta bu izolatlardan 76 izolat *E. faecalis*, 44 izolat *E. faecium*, 1 izolat *Enterococcus casseliflavus* ve 61 izolat *Enterococcus* spp. olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan bu izolatlar ampicillin, penicillin G, ciprofloxacin, chloramphenicol, erythromycin, nitrofurantoin, rifampicin, tetracycline ve vancomycin'e dirençleri yönünden de incelenmiştir (Barbosa *et al.* 2009).

Et orijinli olmayan iki farklı *Enterococcus* izolatının (*E. faecium* CCM4231 ve *E. faecium* RZSC13) fermente sosis üretiminde starter kültür olarak kullanım imkanlarının araştırıldığı bir çalışmada, her iki izolatın da fermantasyon süresince *Listeria*'nın gelişimini önemli bir şekilde engellediği belirtilmiş ve enterokokların gıda güvenliği açısından yardımcı kültür olarak kullanılması önerisinde bulunulmuştur (Callewaert *et al.* 2000).

Yapılan bir çalışmada, geleneksel kuru sosislerden izole edilen 88 izolat fenotipik ve genotipik olarak tanımlanmıştır. Fenotipik olarak 36 izolat *L. sakei*, 27 izolat *E. faecium*, 14 izolat *E. seriolicida*, 10 izolat *E. faecalis* ve 1 izolat *Leuconostoc mesenteroides* olarak tanımlanmıştır. Çalışmada fenotipik ve genotipik tanımlama sonuçları karşılaştırılmış ve sonuçlar arasında iyi bir korelasyon olduğu ortaya konulmuştur (Ammor *et al.* 2005).

İspanya kuru fermente sosisinden izole edilen *E. faecium* P21 suşunun *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens* ve *Clostridium botulinum*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve bu suşun içerdiği bakteriyosinin sınıf II bakteriyosinler grubuna girdiği belirlenmiştir (Herranz *et al.* 2001).

E. faecalis CECT 7121 izolatının kuru fermente sosis üretiminde starter kültür olarak denendiği bir çalışmada pH değerini 5,1'e kadar düşürdüğü, bu suşun Enterobacteriaceae, *S. aureus*, *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör aktivite gösterdiği ve sonuç olarak bu suşun fermente sosis üretiminde alternatif biyokoruyucu olarak değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Sparo *et al.* 2008).

'Ham' ve diğer hayvansal kaynaklı gıdalardan elde edilen 25 suş değerlendirilmeye alınmış ve bu suşların 9'u *E. faecalis*, 16'sı *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan suşlar bakteriyosin aktivitesi, antibiyotiklere direnç ve virülans faktörler için çalışılmıştır. Suşların 6'sı bakteriyosin üretirken suşların çoğunun birkaç antibiyotiğe direnç gösterdiği ve virülans özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir (Sanchez-Valenzuela *et al.* 2009).

'Ham' ve hayvansal orijinli diğer örneklerle yapılan bir çalışmada PCR temelli ölçümlerle hedeflenen 16S rRNA bölgesi alınarak enterokokların belirlenmesine çalışılmıştır. Çalışmada 29 enterokok suşunun 15'i *E. faecalis*, 13'ü *E. faecium* ve 1'i *E. gallinarum* olarak tanımlanmıştır. Bu enterokokların 12 farklı antibiyotiğe direnci test edilmiştir. En yüksek direnç clindamycin'e (%89,6) karşı bulunurken bunu sırasıyla tetracycline hydrochloride (%65,5), tylosin (%62), erythromycin (%45), streptomycin ve neomycin (%17), chloramphenicol (%10,3), penicilin (%10,3), ciprofloxacin (%10,3) ve gentamicin (%3,4) izlemiştir. Suşların hiçbirisi klinik olarak önem taşıyan vancomycin ve ampicillin'e direnç göstermemiştir. 29 suşun 17'si 3 ile 8 antibiyotiğe direnç gösterirken suşların çoğu birden fazla antibiyotiğe direnç göstermiştir. Çalışmada moleküler metotların enterokok türleri için çoklu ilaç direncinin belirlenmesinde yararlı olacağı belirtilmiştir (Jahan *et al.* 2013).

Hayvansal kaynaklı gıdalar (sosis, ham, kıyma ve peynir) üzerinde yürütülen bir araştırmada, örneklerden 416 enterokokal suş izole edilmiş ve bunların 299'u *E. faecalis*, 54'u *E. faecium*, 24'ü *E. hirae/ E. durans*, 22'si *E. casseliflavus*, 9'si *E. avium* ve 8'i *E. gallinarum* olarak tanımlanmıştır. Araştırmada ayrıca 118 *E. faecalis* ve *E. faecium* suşu antibiyotik (ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, avilamycin, chloramphenicol, enrofloxacin, erythromycin, flavomycin, gentamicin, penicillin, quinupristin/dalfopristin, teicoplanin, tetracycline ve vancomycine) duyarlılığı yönünden test edilmiş ve suşların ampicillin ve clavulanic acide karşı hassas olduğu tespit edilmiştir (Peters *et al.* 2003).

Güçlü antilisterial aktiviteye sahip bakteriyosinjenik *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 (Bac⁺) suşu veya bu suşun bakteriyosini olan Enterosin 416K1'nin İtalyan tipi bir fermente sosis çeşidi olan 'Cacciatore'de *Listeria monocytogenes* NCTC10888'e karşı etkisinin incelendiği bir araştırmada, Enterosin 416 K1'in kontrol grubuna göre *L. monocytogenes* sayısında önemli bir redüksiyona neden olduğu, ancak *L. monocytogenes*'in eliminasyonunun sadece *E. casseliflavus* IM416K1 Bac⁺ varlığında gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Sabia *et al.* 2003).

Fermente kuru sosis, kuru küredilmiş ham ve fermente edilmemiş kuru sosis hamurundan elde edilen enterokok izolatlarının fenotipik ve genotipik identifikasyonunu da içeren bir araştırmada 29 izolat fenotipik (API 20) ve 25 izolat genotipik (16S rRNA) olarak identifiye edilmiş ve izolatların %51,7'si *E. faecalis* ve %44,8'i *E. faecium* ve %3,4'ü *E. gallinarum* olarak tanımlanmıştır. Araştırmada fenotipik ile genotipik arasında tam bir uyum olduğu da rapor edilmiştir (Jahan *et al.* 2013).

Fermente et ürünlerinde *Listeria monocytogenes*'in kontrolü açısından enterosinler önemli bir faktör olarak görülebilmektedir. Kuru fermente bir sosis çeşidi olan 'Hornad Salami' üzerinde yapılan bir çalışmada enterocin CCM4231'in *L. monocytogenes*'e karşı antagonistik etkisi hem işletme hem de laboratuvar koşullarında incelenmiştir. Araştırma sonucunda bakteriyosin kullanılan örneklerde bir haftalık olgunlaştırma sonrasında kontrol grubuna göre *L. monocytogenes* sayısının 3 logaritmik birim daha az olduğu, olgunlaştırmanın ikinci ve üçüncü haftalarında ise kontrol grubunda *L. monocytogenes* sayısının yüksek düzeylerde olduğu buna karşın bakteriyosinin etkisinin devam ettiği belirlenmiştir (Laukova *et al.* 1999).

*E. faecalis*A-48-32 suşu tarafından üretilen enterosin AS-48'in fermente sosislerde *S. aureus*'a karşı antagonistik aktivitesi model sistemde incelenmiş ve 30 ve 40 µg/g düzeylerinde kullanılan bakteriyosinin *S. aureus* sayısında sırasıyla 2,00 ve 5,31 logaritmik birimlik bir redüksiyona neden olduğu belirlenmiştir. Söz konusu araştırmada ayrıca bakteriyosin mevcudiyetinin laktik asit bakterileri üzerinde kısmi bir negatif etki gösterdiği, bakteriyosin üretici suşun model sistemde iyi bir gelişme sergilediği, stafilokokların gelişiminin kontrol altına alınabilmesi için AS-48 kodlu bakteriyosinin yeterli miktarlarda kullanılması gerektiği ve en iyi sonucun bakteriyosinjenik suşun 10^7 kob/g düzeyinde kullanılması durumunda elde edildiği belirlenmiştir (Ananou *et al.* 2005).

Doğu himalayalarında geleneksel et ürünleri (lang kargyong, yak kargyong, faak kargyong, lang satchu ve suka ko masu) üzerinde yapılan bir çalışmada, ürünlerden *E.*

faecium da dahil pek çok LAB izole ve identifiye edilmiştir. Teknolojik açıdan önem arz eden *Debaryomyces hansenii* de örneklerden izole edilmiştir. Ayrıca izole edilen LAB'nin bazı özellikleri de çalışılmış ve suşların hiçbirinin biyojen amin üretmediği bildirilmiştir (Rai *et al.* 2010).

Devriese *et al.* (1995) hayvansal orjinli taze ve işlenmiş gıdalardan enterokokların izolasyonuna yönelik bir çalışmada, başlıca tanımlanan suşların *E. faecium* ve *E. faecalis* olduğu, kabuklulardan sıklıkla *E. faecalis* izole edildiği, et ve hazırlanmış et karışımlarında *E. faecium* ve *E. faecalis*'in nadiren de *E. hirae*/*E. durans*'ın bulunduğu, hindi eti içeren ürünlerden ise *E. gallinarum* içerdiği tespit edilmiştir.

Brezilyada vakum ambalajlanmış et ürünlerinden alınan örnekler, bakteriyosin üreten laktik asit bakterileri yönünden incelenmiş ve 3 izolatın (*Enterococcus* sp. 18 *Leuconostoc* sp. 20 ve *Lactobacillus sakei* 29) bakteriyosinogenik özellikte olduğu belirlenmiştir. Ancak suşların *Brocthothrix thermosphacta*, *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp. veya *E. coli*'ye karşı antagonistik aktivite göstermediği belirtilmiştir (De Martinis and Freitas 2003).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmada, Kayseri, Afyon, Erzurum, Sivas, Kahramanmaraş, Elazığ ve İstanbul piyasalarından 20 farklı firmadan temin edilen pastırma örnekleri materyal olarak kullanılmıştır. Pastırma örnekleri farklı zaman dilimlerinde şansa bağlı olarak alınmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin analizlere hazırlanması

Pastırma örneklerinden mikrobiyolojik analizler için steril stomacher torbalarına, diğer analizler için küçük cam kavanozlara ve özel plastik kaplara analiz numuneleri alınmıştır.

3.2.2. pH değerinin belirlenmesi

Pastırma örneklerinden 10'ar gram paralelli olarak tartılıp üzerine 100 ml saf su ilave edilerek Ultra-Turrax (IKA Werk T 25, Germany) ile 1 dk homojenize edildikten sonra pH değerleri pH-metre (ATI ORION 420, MA 02129, USA) kullanılarak belirlenmiştir (Gökalp vd 1999).

3.2.3. Nem değerinin belirlenmesi

Örneklerin nem miktarları nikel kaplarda tartılan 10 g analiz numunesinin 105°C'de kurutma dolabında sabit tartım elde edilinceye kadar kurutulması ile belirlenmiştir (Gökalp vd 1999).

3.2.4. Mikrobiyolojik analizler

Pastırma örneğinden 25 g steril plastik torbaya tartılarak, üzerine 225 ml steril fizyolojik su (%0,85 NaCl, Merck) ilave edilerek Stomacher'de (Lab Stomacher Blander 400-BA 7021, Sewardmedical, England) 1,5 dk homojenize edilmiştir. Daha sonra bu homojenizattan steril serum fizyolojik (%0,85 NaCl) kullanılarak uygun dilüsyonlar hazırlanmış ve aşağıda belirtilen sayımlar yapılmıştır.

Laktik asit bakteri sayımı: MRS Agar (Merck) besiyeri kullanılmış, yüzeye yayma yöntemiyle ekim yapılmış ve anaerobik jar içinde 30°C'de 2 günlük anaerobik inkübasyondan sonra, katalaz (-) koloniler dikkate alınarak LAB sayısı saptanmıştır.

***Micrococcus/Staphylococcus* sayımı:** *Micrococcus/Staphylococcus* sayımı için, MSA (Merck) besiyeri kullanılarak, yayma yöntemi ile ekim yapılmış, ekimi yapılan plaklar 30°C'de 2 gün aerobik olarak inkübe edilerek ve katalaz (+) koklar dikkate alınarak sayı hesaplanmıştır.

Enterobacteriaceae sayımı: Uygun dilüsyonlardan VRBD Agar (Merck) plaklarına 0,1'er ml aktararak yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve petri plakları anaerobik jar içinde 30°C'de 2 gün anaerobik şartlarda inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonucunda 1mm'den büyük koloniler sayılarak Enterobacteriaceae sayısı tespit edilmiştir.

Enterokok sayımı: *Enterococcus* Agar (Merck), KF *Streptococcus* Agar (Merck) ve Slanetz-Bartley Agar (Oxoid) besiyerlerine yayma yöntemine göre ekim yapılmış ve ekimi yapılan petri kutuları 37°C'de 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Inkübasyondan sonra doğrulama test sonuçları da (Gram boyama, morfolojik yapı, katalaz, %6,5 NaCl'de gelişme, safra eskulin ve PYR (L-pyrrolidonyl-beta-naphthylamide) hidrolizi dikkate alınarak enterokok sayısı belirlenmiştir.

Maya ve küf sayımı: Rose Bengal Agara (Merck) yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve petripler 25°C de 3-5 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Mislivic *et al.* 1992).

3.2.5. Enterokokların izolasyonu, fenotipik ve moleküler tanımlaması

Enterococcus Agar, KF *Streptococcus* Agar ve Slanetz-Bartley Agar besiyerlerinde gelişen ve sayımı gerçekleştirilen koloniler alınıp geliştirilerek eppendorf tüplerinde stoklanmıştır. Her bir besiyerinde gelişen kolonilerden en az beş koloni seçilmiştir. Daha sonra saflaştırma için her bir izolat, BHI Broth'da geliştirilerek ve BHI Agar'da tek koloni düşürme yöntemine göre çizimleri yapılmıştır. Bu işleme saf tek koloniler elde edilene kadar devam edilmiştir. Belli sayıda alınan koloniler doğrulama ve identifikasyon çalışmaları için BHI Broth'da geliştirilerek eppendorf tüplerinde buzdolabında -20°C'de saklanmıştır. İzole edilen muhtemel enterokok izolatlarına doğrulama testleri olarak Gram boyama (Benson 1983), katalaz (Koneman *et al.*1992), safra- eskulin (Koneman *et al.*1992), %6,5 luk NaCl' de üreme (Bilgehan 1995), PYR - L-pyrrolidonyl-beta-naphthylamide-hidroлиз (Gordon *et al.* 1987) uygulanarak *Enterococcus* spp. olarak cins düzeyinde adlandırılmıştır (Barrow and Feltham 1995; Facklam and Sahm 1995). İzolatlar farklı sıcaklıklarda gelişme, glukozdan gaz üretimi, farklı pH değerlerinde gelişme, pigmentasyon, piruvat, hareket, hemoliz testlerine de tabi tutulmuştur. Bu testlere tabi tutulan suşlardan 100 adedi VITEK 2GP (bioMérieux Inc. Ref 21 342, France) ile fenotipik identifikasyona tabi tutulmuştur. Değerlendirme ise bioMérieux VITEK 2 Compact (Lab. Equipment bioMérieux, Inc, 100 Radolphe, Street Durham, North Carolina 27712, USA) sistemi ile yapılmıştır. Moleküler tanımlama işlemi, Macrogen firmasından hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca suşların antagonistik aktiviteleri agar spot ve kuyu difüzyon (Schillinger and Lücke 1989) testleri ile tespit edilmiştir.

Gram boyama

İzolatların 18-24 saatlik genç kültürleri Benson (1983)'e göre test edilmiştir ve menekşe renkli koloniler Gram (+) olarak değerlendirilmiştir.

Katalaz testi

Brain Heart Infusion Agar'da üretilmiş 24 saatlik saf bakteri kültüründen öze ile lam üzerine konulmuştur. Lam üzerine bir damla %3'lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) damlatılmıştır. Hava kabarcıkları oluşturmayan suşlar katalaz negatif olarak değerlendirilmiş ve çalışmaya alınmıştır (Koneman *et al.*1992).

Safra- eskülin testi

Bu test için hazır olarak temin edilen Bile-Esculin-Agar (Oxoid) kullanılmıştır. Bu besiyerine saf bakteri kültüründen ekim yapılmıştır. 35°C de 24-48 saatlik inkübasyon sonunda besiyerinde üreyen ve eskülini hidrolize ederek siyah renk oluşturan suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Koneman *et al.* 1992).

%6,5 luk NaCl' li besiyerinde gelişme

Kolonilerden öze ile %6,5 NaCl içeren BHI sıvı besiyerine ekim yapılarak 35°C de 24-72 saat inkübe edilmiştir. Sıvı besiyerinde gelişme sonucu bulanıklık oluşturan suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bilgehan 1995).

PYR (L-pyrrolidonyl-beta- naphthylamide) hidroliz testi

PYR emdirilmiş filtre kağıdı üzerine 24 saatlik saf bakteri kültüründen bir-iki koloni alınarak tek koloni ekimi yapılmıştır ve 35°C'de 10 dk. inkübe edildikten sonra bir damla PYR ayıracı (%0,015 p-dimetylaminocinnamaldehyde) damlatılarak 2 dakika beklenmiştir. Pembe-kiraz kırmızısı parlak renk veren suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Gordon *et al.* 1987).

Glukozdan gaz üretimi testi

Sitrat içermeyen MRS Broth içine ters çevrilmiş durham tüpleri koyulmuştur. Suşlar ile aşılana sıvı besiyeri 37°C de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda Durham tüplerinde görülen gaz oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Schillinger and Lücke 1987).

Hareket testi

%1'lik trifenil tetrazolium kloride (TTC) (Merck) solusyonu ilave edilen Motility Test Medium (Sigma) kullanılmıştır. 24 saatlik saf bakteri kültüründen bir-iki koloni iğne uçlu öze ile dik olarak besiyerine (tüplere) ekildikten sonra 37°C'de 24 saat aerobik atmosferde inkübe edilmiştir. Hareket pozitif olan suşlar trifenil tetrazolimu (TTC) indirgeyerek ekim hattı dışına doğru yayılma göstermiştir. Hareket negatif olan suşların sadece ekim hattı boyunca ürediği belirlenmiştir (Bilgehan 2002).

Pigmentasyon testi

Enterokok suşlarının pigment yapımı Triptik Soy Agar'a (Merck) ekilerek araştırılmıştır. Ekilen besiyerleri 37°C'de 24 saat aerobik atmosferde inkübe edilmiştir. Steril svapla kolonilerin pigmentasyonuna bakılmıştır. Sarı renk veren suşlar pozitif, krem, beyaz renk veren suşlar negatif olarak değerlendirilmiştir (Facklam and Collins 1989).

Piruvat testi

1 lt distile suya Tryptone 10g, Yeast extract 5 g, K₂HPO₄ 5 g, NaCl 5 g, Sodium salt of pyruvic acid 10 g, Bromthymol blue 0,04 g kimyasal maddeler kullanılarak piruvatlı besiyeri hazırlanmıştır ve pH'sı 7,2 -7,4'e ayarlanmıştır. 118°C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir. 24 saatlik saf bakteri kültüründen bir-iki koloni piruvatlı besiyerine

süspanse edilip 35°C'de 16-18 saat inkubasyona bırakılmıştır. Normalde yeşil renkli olan besiyerinin sarı renge dönüşmesi pozitif olarak, aynı kalması negatif olarak değerlendirilmiştir (Gross *et al.* 1975).

Hemoliz testi

İncelenecek suş kültürleri defibrine %7 lik koyun kanlı Blood Agar Base (Merck) üzerine yayılmıştır. 1-2 gün 37°C'de inkübe edilmiştir. Besiyerinde gelişen koloniler etrafındaki hemoliz zonu yönüyle incelemeye alınmıştır (Eaton and Gasson 2001).

Farklı pH değerlerinde gelişme

3,0 ve 9,6 pH'ya sahip 3,0 ml broth besiyerine öze ile aşılama yapılarak ve 37°C de 4-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bulanıklık oluşan tüplerde gelişme pozitif olarak değerlendirilmiştir (G-Allegria *et al.* 2004).

Farklı sıcaklıklarda gelişme

Broth besiyerine inokülasyon yapılarak 10°C için 7-10 gün, 45°C için 37 saat inkübasyona bırakılmış ve bu sürenin sonunda oluşan bulanıklık dikkate alınarak değerlendirme yapılmıştır (Drosinos *et al.* 2005).

VITEK ile tanımlama

Doğrulama ve diğer testlere tabi tutulan suşlardan 100 suş seçilmiş ve VITEK 2GP (bioMerieux Inc. Ref 21 342, France) sistemi ile identifiye edilmiştir. VITEK 2GP Gram pozitif koklar için kullanılan bir kittir. Bu kit ile suşlar D-Amigdalın, Fosfatidil inositol fosfolipaz C, D-Ksiloz, Arjinin dihidrolaz1, β-Galaktosidaz, Alfa-Glukosidaz, Ala-Phe-Pro Arilamidaz, Siklodekstrin, L-Aspartate arilamidaz, Beta Galaktopiranozidaz, Alfa Mannoizidaz, Fosfataz, Lösin Arilamidaz, L-Proline

Arilamidaz, β -Glukoronidaz, Alfa Galaktosidaz, L-Prolidonil Arilamidaz, Beta Glukoronidaz, Alanin Arilamidaz, Tirozin Arilamidaz, D-Sorbitol, Üreaz, Polimiksin B dirençlilik, D-Galaktoz, D-Riboz, L-Laktat alkalizasyonu, Laktoz, N-Asetil-D-Glukozamin, D-Maltoz, Basitrasin dirençlilik, Novobiosin dirençlilik, %6,5 NaCl'de gelişme, D-Mannitol, D-Mannoz, Metil-B-D-Glukopiranosidaz, Pullulan, D-Rafinoz, O/129 dirençlilik (comp.vibrio), Salisin, Sukroz, D-Trehaloz, arjinin dihidrolaz 2, Optokin dirençlilik yönünden test edilebilmektedir. Değerlendirme ise bioMerieux VITEK2 Compact (Lab. Equipment bioMerieux, Inc,100 Radolphe, Street Durham, North Carolina 27712, USA) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Moleküler tanımlama

Moleküler tanımlama işlemi, Macrogen firmasından hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Macrogen firmasından gelen DNA dizi analizi sonuçları, BIOEDIT programı vasıtasıyla değerlendirilmiş ve baz dizilimi çıkarıldıktan sonra BLAST yapılarak bakterinin tanımlanması sağlanmıştır.

3.2.6. Antagonistik aktivite testleri

İzole ve identifiye edilen suşlardan her bir örneği temsil edecek şekilde toplam 100 suş seçilmiştir. Seçilen suşların *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894'e karşı antagonistik aktiviteleri Schillinger ve Lücke (1989) tarafından verilen metodun agar spot ve kuyu difüzyon testleri kullanılarak belirlenmiştir. Agar spot testinde, test edilecek suşların 1 gecelik kültüründen 0,5 mikrolitre alınarak %1,2 agar içeren katı BHI besiyeri plağına aktarılmış ve anaerobik şartlarda 37°C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Yaklaşık 5×10^7 indikatör mikroorganizma hücresi (optik dansiteye göre belirlenerek) BHI yarı-katı besiyerinin 7 ml'sine aşılanmış ve denenecek üretici suşun daha önceden geliştirildiği plaklar üzerine ikinci katman olarak dökülmüştür. Besiyeri katılaştıktan sonra plaklar 37°C'de 24 saat anaerobik şartlarda inkübe edilmiş ve denenen suşun kolonileri etrafındaki çoğalma olmayan berrak alanlar ölçülmüştür.

Agar spot testinde pozitif sonuç veren suşlardan Schillinger ve Lücke (1989) tarafından uygulanarak hücresiz süpernatant elde edilmiş ve kuyu difüzyon testinde kullanılmıştır. Kuyu difüzyon testi için 7 ml yarı-katı BHI Agar'a indikatör suşun 1 gecelik kültüründen 0,3 ml aşlanarak ve bir gün önceden hazırlanan BHI plakları üzerine dökülmüştür. Hazırlanan agar plakları üzerine 3 mm çaplı kuyular açılmış ve her bir kuyuya potansiyel üretici suşun kültür süpernatantından 0,3 ml aktarılmıştır. Plaklar 37°C de 24 saat anaerobik şartlarda inkübe edildikten sonra kuyu çevresindeki inhibisyon zonu ölçülmüştür.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Pastırma Örneklerinin pH ve Nem Değerleri ile Mikrobiyolojik Özellikleri

Piyasadan temin edilen farklı firmalara ait 20 pastırma örneğinin LAB, *Micrococcus/Staphylococcus* ve Enterobacteriaceae sayıları ile pH ve %nem değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Örneklerin 10^3 - 10^8 kob/g düzeyinde LAB, 10^4 - 10^8 kob/g düzeyinde *Micrococcus/Staphylococcus* içerdikleri tespit edilmiştir. Enterobacteriaceae sayısı, 6, 11, 15, 17 ve 19 no’lu firmalara ait örnekler hariç diğer firmaların örneklerinde saptanabilir sınırın altında bulunmuştur. Maya-küf sayısı ise 4 firmaya ait örnekte (5, 9, 10, 14 no’lu firmalar) saptanabilir sınırın altında bulunurken diğer firma örneklerinde 10^2 - 10^6 kob/g düzeyinde bulunmuştur.

Pastırma örneklerinde pH değeri 4,77-6,49 arasında değişim göstermiştir. En düşük değer 6 no’lu firmaya ait örnekte en yüksek değer ise 5 no’lu firmada tespit edilmiştir. Pastırmaların nem değerleri ise %34,92-55,40 arasında bulunmuştur. Nem değeri açısından en düşük değer 2 no’lu firmaya ait örnekte bulunurken en yüksek değer ise 15 no’lu firmaya ait örneklerde tespit edilmiştir. Pastırmanın pH değerinin Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği’ne göre 6’yı aşmaması gerekmektedir (Anonim 2012). Buna göre incelenen örneklerin pH değeri genellikle bu sınırı aşmamaktadır. Leistner (1988) ise kaliteli bir pastırmada pH’nın 5,5’un altına düşmemesi gerektiğini bildirmiştir. Mevcut bu çalışmada incelenen örneklerin sadece 4’ünde (6, 8, 11ve 17 no’lu firmalara ait örnekler) pH değeri 5,5’in altında bulunmuştur. Çakıcı *et al.* (2014) tarafından yapılan bir araştırmada sırt, kuşgözü, şekerpare ve bohça örneklerinde pH değerinin sırasıyla 5,46-6,21, 5,68-6,39, 5,71-6,47 ve 5,68-6,34 arasında olduğu tespit edilmiştir. Yüksek pH değerine (pH>6) sahip firmalarda hammadde seçiminin dikkatli bir şekilde yapılmadığı veya üretim sırasında proteoliz derecesinin oldukça yüksek olduğu sonucuna varılmaktadır. Mevcut bu araştırmada 2 firmaya ait örnekte pH 6,02, 1 firmada ise 6,49 olarak belirlenmiştir.

Parça halinde işlenen kuru kür edilmiş pastırmanın üretiminde tuzlama ve kurutma işlemleri iki önemli basamaktır. Üretim sırasında süre ilerledikçe ürünün kurumasına bağlı olarak nem ve su aktivitesi değerleri düşüş göstermektedir. İncelenen pastırma örneklerinde %34,92 gibi düşük nem değerleri ile karşılaşılabildiği gibi %55,40 gibi yüksek değerler de söz konusu olmuştur. Yüksek nem değerine sahip pastırmalar tüketici sağlığı açısından risk arz edebilmektedir. Doğruer vd (1995) tarafından Konya piyasasından temin edilen pastırma örnekleri üzerinde yapılan araştırmada da nem değerinin geniş bir varyasyon (%34,4-56,0) gösterdiği bildirilmiştir. Çakıcı *et al.* (2014) tarafından yapılan bir çalışmada ise sırt, kuşgözü, şekerpare ve bohça örneklerinde %nem değerleri sırasıyla 40,81-58,43, 35,13-49,73, 38,29-55,05, 37,74-56,00 arasında tespit edilmiştir. Mevcut bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Pastırmada ürün güvenliği açısından su aktivitesi önemli bir engel etkidir (Leistner 1988). Bu nedenle pastırmada nem kriterinin yerine su aktivitesinin kullanılması büyük önem arz etmektedir. Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliğine (Anonim 2012) göre nem oranının %50'yi geçmemesi gerekmektedir. Buna göre mevcut bu çalışma incelenen firmaların önemli bir kısmında bu kritere uygun üretim yapılmadığını göstermektedir. Türk Standartları Enstitüsü Pastırma Standartında (TSE 2002) da pastırmada maksimum nem oranı %50 olarak verilmiştir.

Pastırmada dominant florayı genellikle mikrokok ve stafilokoklar oluşturmaktadır. Piyasadan temin edilen pastırma örnekleri üzerinde yapılan araştırmalarda da genellikle *Micrococcus/Staphylococcus* sayısı diğer mikroorganizma gruplarına göre daha yüksek sayılar vermiştir. Aksu ve Kaya (2001b) tarafından yapılan araştırmada bu mikroorganizma grubunun sayısının 4,00-7,45 log kob/g arasında değiştiği belirlenmiştir. Benzer sonuçlar Kaban ve Kaya (2006) ile Özdemir vd (1999) tarafından da belirlenmiştir. Farklı pastırma tiplerinin incelendiği bir araştırmada da mikrokok ve stafilokokların dominant florayı oluşturduğu rapor edilmiştir (Çakıcı *et al.* 2014). Mevcut bu araştırmada elde edilen sonuçlar genellikle söz konusu literatürlerle uyum göstermiştir.

Bazı pastırma örneklerinde LAB diğer mikroorganizma gruplarına göre daha yüksek sayılar vermiştir. Bu sonuçlar muhtemelen kullanılan hammaddenin mikrobiyolojik özellikleri ile üretim koşullarından kaynaklanmaktadır. LAB'nin kürelemede kullanılan nitritten güçlü bir şekilde etkilendiği ve küreleme sıcaklıklarının bu mikroorganizmaların gelişimi üzerinde etkili olduğu konuyla ilgili diğer bir araştırmada da ortaya konulmuştur (Hazar 2014). Piyasadan temin edilen pastırma örnekleri üzerinde yapılan araştırmalarda da LAB sayısında önemli farklılıklar dikkat çekmektedir. El-Khateib *et al.* (1987) 4,78-6,00 log kob/g, Aksu ve Kaya (2001b) 3,75-7,89 log kob/g arasında değişen LAB sayıları belirlemişlerdir. Özdemir vd (1999), Kaban ve Kaya (2006) ve Sınmaz (2013) ise piyasadan temin ettikleri örneklerde LAB sayısını sırasıyla 10^4 - 10^8 kob/g, 3,92-6,01 log kob/g ve 3,30-7,90 log kob/g olarak tespit etmişlerdir. Çakıcı *et al.* (2014) ise LAB sayısının piyasadan temin edilen sırt, kuşgözü, şekerpare ve bohça örneklerinde sırasıyla 3,78-8,83 log kob/g, 2,95-8,17 log kob/g, 3,00-7,45 log kob/g ve 3,00-8,00 log kob/g arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Mevcut bu araştırma ve literatürde yer alan verilere göre pastırmada LAB geniş bir varyasyon gösterebilmektedir.

Pastırma örneklerinde Enterobacteriaceae sayısı ise genellikle saptanabilir sınırın altında bulunmuştur. Bu sonuca göre düşük pH ve a_w değerlerine hassas bu mikroorganizmalar pastırma üretim koşullarında gelişme gösterememektedir. Diğer taraftan maya ve küf sayısı genellikle 10^3 kob/g düzeyinde bulunmaktadır. Ancak bazı örneklerde 10^5 - 10^6 kob/g sayılarına da rastlanmıştır. Bunun yanı sıra 4 örnekte sayı saptanabilir sınırın altında bulunmuştur. Bazı araştırmacılar ise Enterobacteriaceae sayısının pastırmada oldukça düşük olduğunu belirtmişlerdir (<2,00-2.45 log cfu/g) (Kaban ve Kaya 2006; Kaban 2009). Özdemir vd (1999) pastırmalarda Enterobacteriaceae sayısını $<2,0 \times 10^2$ - 10^4 cfu/g tespit etmişlerdir. Aksu ve Kaya (2001b) Erzurum piyasasında tüketime sunulan pastırmalarla ilgili yapılan çalışmada 48 pastırma örneğinin 36'sında Enterobacteriaceae sayısı saptanabilir sayının altında bulunmuştur (<2,0 log kob/g). Pastırma üzerinde yapılan diğer bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (El-Khateib 1987). Diğer taraftan mevcut bu araştırma da olduğu gibi Sınmaz (2013)

tarafından incelenen piyasa örneklerinin bazılarında yüksek Enterobacteriaceae sayıları ile karşılaşılmıştır.

Aksu ve Kaya (2001a) tarafından yapılan bir çalışmada pastırmalarda maya-küf sayıları $<4,00-5,53$ log cfu/g arasında değişmiştir. Mevcut bu çalışmada maya-küf sayısı 10^2-10^6 kob/g aralığında bulunmuştur ve çalışma verileriyle uyum göstermektedir.



Çizelge 4.1. Farklı firmalardan temin edilen pastırma örneklerinin bazı mikrobiyolojik özellikleri ile pH ve % nem değerlerine ait analiz sonuçları

Firma	Mikroorganizma Sayısı (log kob/g)					
	Laktik Asit Bakteri	<i>Micrococcus /Staphylococcus</i>	Enterobacteriaceae	Maya-Küf	pH	%Nem
1	3,82	8,63	<2,00	3,93	5,81	40,45
2	4,17	8,08	<2,00	3,97	6,02	34,92
3	6,04	7,92	<2,00	3,32	5,81	36,87
4	5,32	6,83	<2,00	2,60	5,83	39,20
5	3,60	7,11	<2,00	<2,00	6,49	51,01
6	7,47	5,30	5,41	6,60	4,77	51,83
7	5,32	5,89	<2,00	2,48	5,86	54,00
8	7,20	4,84	<2,00	5,41	5,19	50,27
9	4,88	4,88	<2,00	<2,00	5,97	51,07
10	6,85	7,20	<2,00	<2,00	5,99	48,20
11	7,95	8,00	3,72	6,90	5,36	54,24
12	5,17	5,67	<2,00	3,69	6,02	52,20
13	6,77	6,51	<2,00	3,69	5,69	50,20
14	5,60	6,97	<2,00	<2,00	5,71	52,60
15	7,30	7,36	2,60	5,23	5,95	55,40
16	6,39	7,04	<2,00	2,69	5,75	52,93
17	7,32	8,18	5,00	3,63	5,16	46,70
18	5,41	6,49	<2,00	3,41	5,84	52,70
19	7,36	7,92	3,46	3,89	5,93	54,80
20	8,41	6,99	<2,00	5,15	5,52	45,73

4.1.1. Pastırma örneklerinin *Enterococcus* sayıları

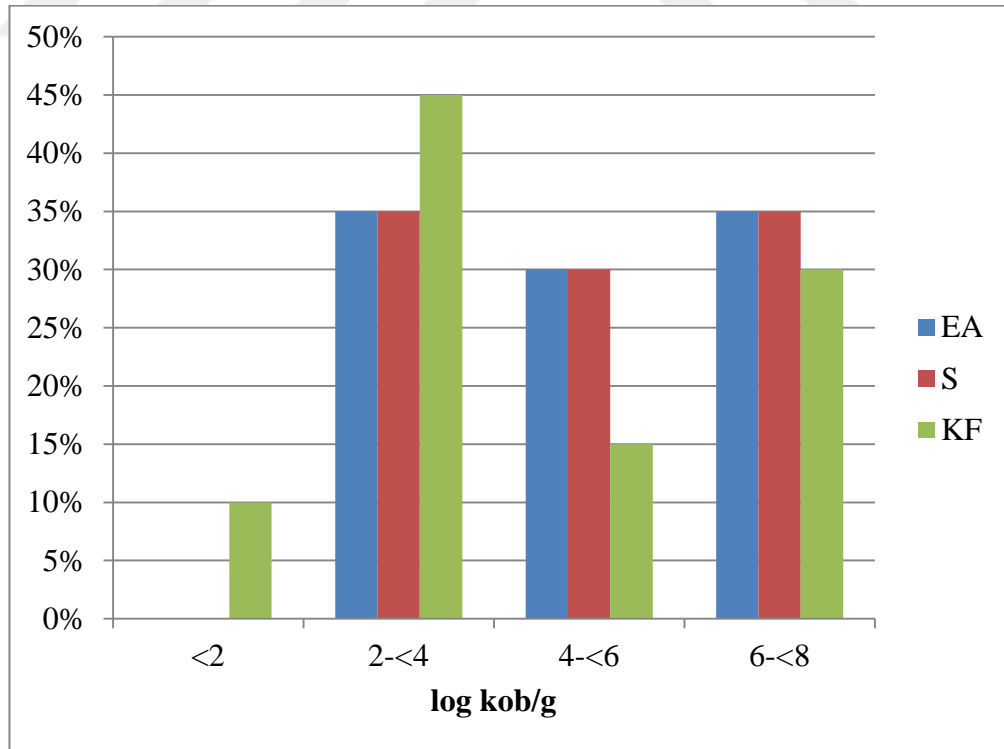
Pastırma örneklerinin *Enterococcus* sayısını belirlemek amacıyla üç farklı besiyeri kullanılmıştır. Herbir besiyerinde gelişen tipik koloniler sayılmış ve tipik kolonileri temsil edecek sayıda koloni (5-10) seçilmiştir. Seçilen koloniler doğrulama testlerine (Gram boyama, morfolojik görünüm, katalaz, PYR-testi, bile-esculin, %6,5 tuz) tabi tutulmuş ve çıkan sonuçlara göre *Enterococcus* sayıları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü üzere KF *Streptococcus* Agar kullanılarak yapılan sayımda sadece iki firmaya ait örneklerde *Enterococcus* sayısı saptanabilir sınıırın altında bulunmuştur. Diğer firmaların örneklerinde ise kullanılan besiyerlerine ait sayılar arasında bir uyumluluk söz konusu olmuştur. Bu sonuçlara göre pastırmada enterokoklar 10^7 kob/g seviyesine dahi çıkabilmektedir.

Çizelge 4.2. Farklı firmalara ait pastırma örneklerinin farklı besiyerinde belirlenen *Enterococcus* sayıları (log kob/g)

Firma	<i>Enterococcus</i> Agar	Slanetz-Bartley Agar	KF <i>Streptococcus</i> Agar*
1	3,26	3,57	2,00
2	2,60	3,00	2,85
3	5,32	5,20	3,90
4	3,34	3,28	2,78
5	4,08	3,94	3,79
6	6,90	6,82	6,84
7	4,90	5,43	5,34
8	7,00	6,80	6,84
9	3,99	4,23	3,61
10	4,15	4,28	3,78
11	6,08	6,88	5,36
12	2,95	3,15	3,04
13	6,58	6,41	6,70
14	3,78	3,70	<2,00
15	5,48	3,88	<2,00
16	5,00	5,86	5,08
17	6,61	6,72	6,36
18	3,43	4,28	3,04
19	6,76	6,90	6,62
20	7,63	7,81	7,81
Ortalama	4,99	5,11	4,76

*KF *Streptococcus* Agarda 14 ve 15 no’lu örneklere ait sonuçlar ortalamaya dahil edilmemiştir.

Pastırma örneklerinin *Enterococcus* sayılarına ait frekans dağılımı Şekil 4.1’de verilmiştir. Firmaların sadece iki tanesinde (%10) KF *Streptococcus* Agar kullanılması durumunda sayı saptanabilir sınırın altında bulunmuştur. *Enterococcus* Agar ile Slanetz-Bartley Agar besiyerlerine ait sonuçlar birbirine oldukça yakın çıkmış ve Şekil 4.1’den de görüldüğü üzere sözkonusu besiyerleri aynı yüzdeleri göstermiştir. Bu sonuç *Enterococcus* sayımı için bu iki besiyerinin daha uygun olduğunu göstermektedir. Ancak genel bir değerlendirme yapıldığında KF *Streptococcus* Agar ile de diğer besiyerlerinde yakın sonuçlar elde edilmiştir. *Enterococcus* Agar ve Slanetz- Bartley Agar sonuçlarına göre pastırma örneklerinin %35’inde sayı 1×10^2 - $<1 \times 10^4$ kob/g aralığında yer alırken diğer %35’lik kısım ise 10^6 kob/g’den daha yüksek sayılar vermiştir. Pastırmada *Enterococcus* sayısının geniş bir varyasyon göstermesi işletme şartlarının birbirlerinden oldukça farklı olduğunu göstermektedir. Bugün hala pastırma üretiminde geleneksel yöntemlerin uygulandığı ve üretimde çok farklı uygulamalara yer verildiği bilinmektedir.



Şekil 4.1. Pastırma örneklerinin enterokok sayılarına ait frekans dağılımı
 *(EA: *Enterococcus* Agar, S: Slanetz-Bartley Agar, KF: KF *Streptococcus* Agar)

Starter kültürlerin pastırma üretiminde kullanılabilme imkanlarının araştırıldığı bir çalışmada *Enterococcus* sayımı için besiyeri olarak CATC Agar kullanılmış ve *Enterococcus* sayısı saptanabilir sınırın altında bulunmuştur (Aksu ve Kaya 2001a). Özdemir vd (1999) tarafından yapılan çalışmada ise piyasadan temin edilen 80 adet pastırma örneğinin enterokok sayısını belirlemek için Slanetz-Bartley Medium kullanılmış ve genellikle sayının 10^2 - 10^3 kob/g düzeyinde bulunduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar örneklerin %25'inde sayının 2×10^2 kob/g'dan daha düşük değerler gösterdiğini, sadece 4 örnekte ise enterokok sayısının 10^4 kob/g düzeyinde olduğunu da belirtmişlerdir.

Pastırma üretiminde *Enterococcus* sayısında üretim aşamasına bağlı olarak değişiklikler gözlenebilmektedir. Nitekim Aksu ve Kaya (2002d) tarafından yapılan çalışmada, hammaddede saptanabilir sınırın altında olan *Enterococcus* sayısının 1. ve 2. kurutma aşamalarında artış gösterdiği ancak çemenlemenin etkisiyle sayının azalarak son ürünlerde genellikle saptanabilir sınırın altına düştüğü bildirilmiştir.

Sığır, domuz, tavuk gibi taze etlerde *Enterococcus* sayısının genellikle 10^2 ile 10^4 kob/g arasında değiştiği belirtilmektedir (Hugas *et al.* 2003). Fermente et ürünlerinde ise uygulanan prosese bağlı olarak *Enterococcus* sayısı farklılık gösterebilmektedir. Hugas *et al.* (2003) tarafından rapor edildiğine göre Yunanistan'da 3 farklı işletmede fermente sosis hamurlarında enterokok sayısı 10^2 - 10^3 kob/g olarak belirlenmiş ve bu işletmelerin ikisinde enterokoklar fermentasyon ve olgunlaşma sırasında gelişme göstermiş ve 28. günden sonra sayı 10^4 kob/g olarak saptanmıştır. Diğer işletmede ise olgunlaşmanın ilk haftasında herhangi bir çoğalma görülmemiş ve üretimin sonunda alınan örneklerde enterokoklara rastlanmamıştır (Metaxopoulos *et al.* 2001). Diğer taraftan Alman ve İtalyan fermente sosislerinde yapılan bir çalışmada starter kültürlü ve starter kültürsüz fermente sosislerde olgunlaşma sonunda enterokok sayısı 10^3 - 10^5 kob/g olarak belirlenmiştir (Marchesino *et al.* 1992) İspanya'nın kuzey-doğusunda çeşitli süpermarketlerinden toplanan 31 geleneksel fermente sosiste ise enterokok sayısı 1,3 ile 4,48 log kob/g arasında bulunmuştur (Martin *et al.* 2001). Mevcut bu çalışmada da

Enterococcus sayısında geniş bir varyasyon tespit edilmiştir. Kullanılan her üç besiyerinde de 10^3 - 10^7 kob/g aralığında değişen sayılara rastlanmıştır.

Çok çeşitli faktörlere karşı dayanıklılık gösteren enterokoklar bu özellikleri nedeniyle canlılıklarını sürdürebilmektedir. Kotzekidou ve Lazorides (1991) inceledikleri örneklerde 6°C'de 15 hafta muhafaza sonunda bile *Enterococcus* sayısında azalma olmadığını bildirmişlerdir.

4.2. İzolatların Fenotipik Özelliklerine Ait Sonuçlar

Yirmi farklı işletmeden temin edilen toplam 20 pastırma örneğinin her birisinden materyal ve metot kısmında belirtildiği üzere *Enterococcus* Agar, Slanetz-Bartley Agar, KF *Streptococcus* Agar besiyerlerine ekim yapılmış ve inkübasyondan sonra 5-10 koloni alınarak tanımlama için Sinton *et al.* (1993) ve Harwood *et al.* (2004) tarafından belirtilen Gram boyama, morfolojik görünüm, katalaz, safra-eskulin, PYR, %6,5 tuzda gelişme testleri uygulanmıştır. Bu doğrulama testleri sonucunda incelenen 352 izolattan 271 (%76,99) izolatin enterokok olduğu tespit edilmiştir. Bu 271 izolata farklı sıcaklıklarda gelişme, glukozdan gaz üretimi, farklı pH değerlerine gelişme, pigmentasyon, piruvat, hareket, hemoliz testleri uygulanmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3'den de görüldüğü üzere enterokok izolatlarının tümü test edilen sıcaklıklarda (10°C ve 45°C) gelişme göstermiştir ki bu özellik enterokokların genel karakteristik bir özelliğidir. Enterokoklardan *E. faecium* ve *E. faecalis* en fazla çalışılan türlerdir. Her iki türde hem 10°C'de hem de 45°C'de gelişme göstermektedir. *E. gallinarum* ve *E. hirea* da yine bu sıcaklıklarda gelişebilen türlerdir. Ancak *E. dispar*, *E. malodoratus* ve *E. moraviensis* gibi enterokok türleri 45°C'lik sıcaklıkta gelişmemektedir (Domig *et al.* 2003). Enterokokların gelişme sıcaklıkları onların ısıl dirençleri üzerinde etkili olabilmektedir. Konu ile ilgili bir araştırmada *E. faecium* ve *E. faecalis*'in farklı sıcaklıklarda gelişme durumlarının ısıl dirençlerine etkileri incelenmiş ve 45°C'de geliştirilen logaritmik fazdaki suşların 37°C'de geliştirilen suşlara göre ısıl işleme daha dirençli oldukları tespit edilmiştir (Ahmad *et al.* 2003). Diğer taraftan başka

bir araştırmada ise 71°C'lik bir ısıl işlem normunda enterokokların sayısında 6 logaritmik birimden daha fazla bir redüksiyon olduğu, ancak 65°C'de 10 dakikalık bir ısıl işlem uygulamasında redüksiyon oranının 5 logaritmik birime düştüğu ve ayrıca *E. faecium* suşlarının *E. faecalis* suşlarına göre daha dirençli olduğu belirtilmiştir (Panagea and Chadwick 1996).

Gıda endüstrisinde farklı gıdaların üretilebilmesi ve depolanabilmesi için mikroorganizmaların gelişme sıcaklıkları oldukça önem arz etmektedir. Starter kültür olarak kullanılacak LAB'nin de gıdaların üretim şartlarının belirlenmesinde önemi büyüktür. Starter kültür olarak asidik fermente gıdalarda kullanılacak suşların 15°C'de gelişebilme özelliği göstermeleri yeterli kabul edilebilmektedir (Ertekin 2007).

LAB grubu içerisinde yer alan enterokokların diğer bir özellikleri homofermentatif karakter göstermeleridir (Franz *et al.* 2003; Domig *et al.* 2003). Mevcut araştırmada da izolatların glukozdan gaz üretme özellikleri incelenmiş ve hiçbir izolatın gaz üretmediği tespit edilmiştir. Enterokokların diğer bir özelliği ise pH 9,6'da dahi gelişebilme özellikleridir. Pastırmadan elde edilen izolatların tamamı pH 9,6'da gelişme gösterebilmiştir. Ancak hiçbir izolat pH 3,0'da zayıf bir gelişme dahi gösterememiştir. Bununla beraber starter kültür ve/veya koruyucu kültür olarak kullanılacak mikroorganizmaların aside dayanıklılıkları önemli bir faktör olarak ön plana çıkmaktadır.

Araştırmada incelenen izolatların hiçbirisi pigment oluşturmamıştır. Hayvansal orijinli gıdalar üzerinde yapılan bir çalışmada ise *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae*/*E. durans* ve *E. gallinarum*/*E. faecium* gruplarının pigment oluşturmadığı, ancak *E. mundtii*/*E. casseliflavus*'un pigment açısından pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir (Devriese *et al.* 1995).

Enterokokların tanımlanmasında piruvat testine de yer verilmektedir. Mevcut çalışmada Çizelge 4.3'den de görüldüğu üzere piruvat testinde 11, 16 ve 19 no'lu firmaya ait izolatlar hariç (EA₁₁₋₃₋₁, EA₁₁₋₃₋₂, S₁₁₋₄₋₂, S₁₁₋₄₋₃, S₁₁₋₄₋₄, S₁₁₋₄₋₇, KF₁₁₋₃₋₁, KF₁₁₋₃₋₂, KF₁₁₋₃₋₃,

KF₁₁₋₃₋₄, EA₁₆₋₄₋₃, EA₁₆₋₄₋₄, EA₁₆₋₄₋₅, S₁₆₋₄₋₁, S₁₆₋₄₋₇, S₁₆₋₄₋₁₀, KF₁₆₋₄₋₁, KF₁₆₋₄₋₄, EA₁₉₋₅₋₃, EA₁₉₋₅₋₄, EA₁₉₋₅₋₅, EA₁₉₋₅₋₆, EA₁₉₋₅₋₇, EA₁₉₋₅₋₈, EA₁₉₋₅₋₁₀, S₁₉₋₅₋₁, S₁₉₋₅₋₂, S₁₉₋₅₋₃, S₁₉₋₅₋₄, S₁₉₋₅₋₅, S₁₉₋₅₋₇, S₁₉₋₅₋₉, S₁₉₋₅₋₁₀, KF₁₉₋₅₋₁, KF₁₉₋₅₋₂, KF₁₉₋₅₋₃, KF₁₉₋₅₋₅, KF₁₉₋₅₋₆, KF₁₉₋₅₋₇, KF₁₉₋₅₋₈, KF₁₉₋₅₋₉, KF₁₉₋₅₋₁₀) diğ er izolatların tümü pozitif sonuç vermiştir. Piruvat testi de türlerin ayırt edilmesinde önemli bir testtir (Gross *et al.* 1975).

Hareket edebilme yeteneğ i enterokok türlerinin tanımlanmasında kullanılan diğ er bir testtir. *Enterococcus gallinarum* ve *E. casseliflavus* hareket edebilme yeteneğ ine sahipken diğ er türler böyle bir özellik gösterememektedir (*E.faecium*, *E .faecalis*, *E. hirae*, *E. durans*). Araştırmada 11 (EA_{11 -3-1}, EA_{11 -3-2}, S₁₁₋₄₋₂, S₁₁₋₄₋₃, S₁₁₋₄₋₄, S₁₁₋₄₋₇, KF₁₁₋₃₋₁, KF₁₁₋₃₋₂, KF₁₁₋₃₋₃, KF₁₁₋₃₋₄) ve 16 no'lu(EA₁₆₋₄₋₃, EA₁₆₋₄₋₄, EA₁₆₋₄₋₅, S₁₆₋₄₋₁, S₁₆₋₄₋₇, S₁₆₋₄₋₁₀, KF₁₆₋₄₋₁, KF₁₆₋₄₋₄) firma örneklerinden elde edilen izolatların tamamı hareket edebilme yeteneğ i sergilemiştir. Hareket edebilme yeteneğ ine sahip suşların, genellikle enfeksiyon oluşturabilme özelliğ ine de sahip olduğ u bildirilmektedir (Van Horn *et al.* 2002).

Pastırmadan elde edilen izolatlara koyun kanlı agarda hemoliz testi uygulanmış ancak beta-hemoliz reaksiyonu veren izolata rastlanılmamıştır. Araştırmada 4 no'lu (EA₄₋₂₋₁, EA₄₋₂₋₂, EA₄₋₂₋₃, EA₄₋₂₋₄, S₄₋₂₋₂, S₄₋₂₋₃, KF₄₋₂₋₁, KF₄₋₂₋₂, KF₄₋₂₋₃), 7 no'lu (EA₇₋₄₋₁, EA₇₋₄₋₂, EA₇₋₄₋₃, S₇₋₄₋₁, S₇₋₄₋₂, S₇₋₄₋₃, S₇₋₄₋₅, KF₇₋₄₋₁, KF₇₋₄₋₃, KF₇₋₄₋₅)ve 10 no'lu (EA₁₀₋₃₋₁, EA₁₀₋₃₋₂, EA₁₀₋₃₋₄, EA₁₀₋₃₋₅, S₁₀₋₃₋₁, S₁₀₋₃₋₂, S₁₀₋₃₋₃, S₁₀₋₃₋₄, S₁₀₋₃₋₅, KF₁₀₋₃₋₁, KF₁₀₋₃₋₂, KF₁₀₋₃₋₃, KF₁₀₋₃₋₄) firma örneklerinden elde edilen izolatlarda gama reaksiyonu, geriye kalan tüm firma örneklerinde ise alfa reaksiyon göstermiştir. Ben Omar *et al.*(2004) tarafından yapılan bir çalışmada farklı gıdalardan izole edilen enterokokların değ iş ik özellikleri incelenmiş ve hiçbir izolata hemolitik aktivite göstermediğ i tespit edilmiştir.

Enterokokların yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilme özellikleri bu cinse ait türlerin doğrulanmasında kullanılan önemli bir kriterdir. Araştırmada doğrulama testlerinde tuz oranı olarak %6,5 seçilmiş ve tüm izolatların bu tuz seviyesinde gelişme gösterdiğ i tespit edilmiştir. Geleneksel Yunan tipi kuru fermente salamdan izole edilen

enterokokların %8'lik NaCl ortamında sadece %43'ünün geliştii rapor edilmiştir (Samelis *et al.* 1998).

Pastırma üretiminde %5-10 oranında NaCl kullanılmaktadır. Bu şartlarda gelişebilen mikroorganizmaların ürün özelliklerinin gelişimi açısından oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. Bundan dolayı starter kültür ve/veya koruyucu kültür olarak seçilecek mikroorganizmaların tuza dayanıklılığı önemli bir faktördür. Yukarıda da belirtildiği gibi incelenen suşların tamamı %6,5 NaCl varlığında gelişme gösterebilmiştir.



Çizelge 4.3.. Pastırmadan elde edilen enterokok izolatlarının bazı fenotipik özellikleri

Firma	İzolat No	Fenotipik Özellikler								
		10°C	45°C	GGU*	pH 3,0	pH 9,6	Pigment	Piruvat	Hareket	Hemoliz
1	EA ₁₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₋₂₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₋₂₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
2	EA ₂₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₂₋₂₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₂₋₂₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₂₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₂₋₂₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₂₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₂₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₂₋₂₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₂₋₂₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
3	EA ₃₋₄₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₃₋₄₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₃₋₄₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₃₋₄₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₃₋₄₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₃₋₄₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₃₋₃₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₃₋₃₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₃₋₃₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
KF ₃₋₃₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa	

Çizelge 4.3. (devam)

Firma	İzolat No	Fenotipik Özellikler								
		10°C	45°C	GGU	pH 3,0	pH 9,6	Pigment	Piruvat	Hareket	Hemoliz
4	EA ₄₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	EA ₄₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	EA ₄₋₂₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	EA ₄₋₂₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	S ₄₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	S ₄₋₂₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	KF ₄₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	KF ₄₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	KF ₄₋₂₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
5	EA ₅₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₅₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₅₋₂₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₅₋₂₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₅₋₂₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₅₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₅₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₅₋₂₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₅₋₂₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₅₋₂₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₅₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₅₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₅₋₂₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₅₋₂₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₅₋₂₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa

Çizelge 4.3. (devam)

Firma	İzolot No	Fenotipik Özellikler								
		10°C	45°C	GGU	pH 3,0	pH 9,6	Pigment	Piruvat	Hareket	Hemoliz
6	EA ₆₋₅₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₆₋₅₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₆₋₅₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₆₋₅₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₆₋₅₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₆₋₅₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₆₋₅₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₆₋₅₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₆₋₅₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₆₋₅₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₆₋₅₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
7	EA ₇₋₄₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	EA ₇₋₄₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	EA ₇₋₄₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	S ₇₋₄₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	S ₇₋₄₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	S ₇₋₄₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	S ₇₋₄₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	KF ₇₋₄₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	KF ₇₋₄₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	KF ₇₋₄₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama

Çizelge 4.3. (devam)

Firma	İzolot No	Fenotipik Özellikler								
		10°C	45°C	GGU	pH 3,0	pH 9,6	Pigment	Piruvat	Hareket	Hemoliz
8	EA ₈₋₅₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₈₋₅₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₈₋₅₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₈₋₅₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₈₋₅₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₈₋₅₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₈₋₅₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₈₋₅₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₈₋₅₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₈₋₅₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₈₋₅₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
KF ₈₋₅₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa	
9	EA ₉₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₉₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₉₋₂₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₉₋₂₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₉₋₂₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₉₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₉₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₉₋₂₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₉₋₂₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₉₋₂₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₉₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₉₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa

Çizelge 4.3. (devam)

Firma	İzolot No	Fenotipik Özellikler								
		10°C	45°C	GGU	pH 3,0	pH 9,6	Pigment	Piruvat	Hareket	Hemoliz
9	KF ₉₋₂₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₉₋₂₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₉₋₂₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
10	EA ₁₀₋₃₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	EA ₁₀₋₃₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	EA ₁₀₋₃₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	EA ₁₀₋₃₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	S ₁₀₋₃₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	S ₁₀₋₃₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	S ₁₀₋₃₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	S ₁₀₋₃₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	S ₁₀₋₃₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	KF ₁₀₋₃₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	KF ₁₀₋₃₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	KF ₁₀₋₃₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	KF ₁₀₋₃₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Gama
	11	EA ₁₁₋₃₋₁	+	+	-	-	+	-	-	+
EA ₁₁₋₃₋₂		+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa
S ₁₁₋₄₋₂		+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa
S ₁₁₋₄₋₃		+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa
S ₁₁₋₄₋₄		+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa
S ₁₁₋₄₋₇		+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa
KF ₁₁₋₃₋₁		+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa

Çizelge 4.3. (devam)

Firma	İzolot No	Fenotipik Özellikler								
		10°C	45°C	GGU	pH 3,0	pH 9,6	Pigment	Piruvat	Hareket	Hemoliz
11	KF ₁₁₋₃₋₂	+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa
	KF ₁₁₋₃₋₃	+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa
	KF ₁₁₋₃₋₄	+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa
12	EA ₁₂₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₂₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₂₋₂₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₂₋₂₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₂₋₂₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₂₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₂₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₂₋₂₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₂₋₂₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₂₋₂₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₂₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₂₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₂₋₂₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₂₋₂₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
13	EA ₁₃₋₃₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₃₋₃₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₃₋₃₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₃₋₃₋₆	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₃₋₃₋₇	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₃₋₄₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₃₋₄₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa

Çizelge 4.3. (devam)

Firma	İzolat No	Fenotipik Özellikler								
		10°C	45°C	GGU	pH 3,0	pH 9,6	Pigment	Piruvat	Hareket	Hemoliz
13	S ₁₃₋₄₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₃₋₄₋₆	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₃₋₄₋₈	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₃₋₄₋₉	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₃₋₄₋₁₀	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₃₋₄₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₃₋₄₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₃₋₄₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₃₋₄₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₃₋₄₋₆	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₃₋₄₋₇	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₃₋₄₋₈	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₃₋₄₋₉	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₃₋₄₋₁₀	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₃₋₄₋₁₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
KF ₁₃₋₄₋₁₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa	
KF ₁₃₋₄₋₁₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa	
KF ₁₃₋₄₋₁₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa	
14	EA ₁₄₋₃₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₄₋₃₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₄₋₃₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₄₋₃₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₄₋₃₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₄₋₃₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₄₋₃₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa

Çizelge 4.3. (devam)

Firma	İzolot No	Fenotipik Özellikler								
		10°C	45°C	GGU	pH 3,0	pH 9,6	Pigment	Piruvat	Hareket	Hemoliz
15	EA ₁₅₋₃₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₅₋₃₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₅₋₃₋₇	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₅₋₃₋₈	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₅₋₃₋₉	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₅₋₃₋₁₀	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₅₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₅₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₅₋₂₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₅₋₂₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₅₋₂₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
16	EA ₁₆₋₄₋₃	+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa
	EA ₁₆₋₄₋₄	+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa
	EA ₁₆₋₄₋₅	+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa
	S ₁₆₋₄₋₁	+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa
	S ₁₆₋₄₋₇	+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa
	S ₁₆₋₄₋₁₀	+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa
	KF ₁₆₋₄₋₁	+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa
	KF ₁₆₋₄₋₄	+	+	-	-	+	-	-	+	Alfa
17	EA ₁₇₋₅₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₇₋₅₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₇₋₅₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₇₋₅₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₇₋₅₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa

Çizelge 4.3. (devam)

Firma	İzolat No	Fenotipik Özellikler								
		10°C	45°C	GGU	pH 3,0	pH 9,6	Pigment	Piruvat	Hareket	Hemoliz
17	EA ₁₇₋₅₋₆	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₇₋₅₋₇	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₇₋₅₋₈	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₇₋₅₋₉	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₁₇₋₅₋₁₀	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₇₋₅₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₇₋₅₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₇₋₅₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₇₋₅₋₆	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₇₋₅₋₇	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₇₋₅₋₉	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₇₋₅₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₇₋₅₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₇₋₅₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₇₋₅₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₇₋₅₋₆	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₇₋₅₋₇	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₇₋₅₋₈	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₇₋₅₋₉	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₇₋₅₋₁₀	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
18	EA ₁₈₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₈₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₈₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₈₋₂₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₁₈₋₂₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa

Çizelge 4.3. (devam)

Firma	İzolot No	Fenotipik Özellikler								
		10°C	45°C	GGU	pH 3,0	pH 9,6	Pigment	Piruvat	Hareket	Hemoliz
18	S ₁₈₋₂₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₈₋₂₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₈₋₂₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₈₋₂₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₈₋₂₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₁₈₋₂₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
19	EA ₁₉₋₅₋₃	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	EA ₁₉₋₅₋₄	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	EA ₁₉₋₅₋₅	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	EA ₁₉₋₅₋₆	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	EA ₁₉₋₅₋₇	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	EA ₁₉₋₅₋₈	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	EA ₁₉₋₅₋₁₀	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	S ₁₉₋₅₋₁	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	S ₁₉₋₅₋₂	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	S ₁₉₋₅₋₃	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	S ₁₉₋₅₋₄	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	S ₁₉₋₅₋₅	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	S ₁₉₋₅₋₇	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	S ₁₉₋₅₋₉	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	S ₁₉₋₅₋₁₀	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	KF ₁₉₋₅₋₁	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	KF ₁₉₋₅₋₂	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	KF ₁₉₋₅₋₃	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa

Çizelge 4.3. (devam)

Firma	İzolot No	Fenotipik Özellikler								
		10°C	45°C	GGU	pH 3,0	pH 9,6	Pigment	Piruvat	Hareket	Hemoliz
19	KF ₁₉₋₅₋₅	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	KF ₁₉₋₅₋₆	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	KF ₁₉₋₅₋₇	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	KF ₁₉₋₅₋₈	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	KF ₁₉₋₅₋₉	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
	KF ₁₉₋₅₋₁₀	+	+	-	-	+	-	-	-	Alfa
20	EA ₂₀₋₅₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₂₀₋₅₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₂₀₋₅₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₂₀₋₅₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₂₀₋₅₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₂₀₋₅₋₆	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₂₀₋₅₋₇	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₂₀₋₅₋₈	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₂₀₋₅₋₉	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	EA ₂₀₋₅₋₁₀	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₂₀₋₅₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₂₀₋₅₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₂₀₋₅₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₂₀₋₅₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₂₀₋₅₋₅	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₂₀₋₅₋₆	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₂₀₋₅₋₇	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₂₀₋₅₋₈	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa

Çizelge 4.3. (devam)

Firma	İzolat No	Fenotipik Özellikler								
		10°C	45°C	GGU	pH 3,0	pH 9,6	Pigment	Piruvat	Hareket	Hemoliz
20	S ₂₀₋₅₋₉	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	S ₂₀₋₅₋₁₀	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₂₀₋₅₋₁	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₂₀₋₅₋₂	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₂₀₋₅₋₃	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₂₀₋₅₋₄	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₂₀₋₅₋₇	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₂₀₋₅₋₈	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₂₀₋₅₋₉	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa
	KF ₂₀₋₅₋₁₀	+	+	-	-	+	-	+	-	Alfa

*GGU: Glukozdan gaz üretimi

4.2.1. VITEK GP ile fenotipik tanımlama

Pastırmadan izole edilen ve 10°C ve 45°C’de gelişme, glukozdan gaz üretimi, pH 3,0, pH 9,6’da gelişme, pigmentasyon, piruvat, hareket, hemoliz, testleri uygulanarak özellikleri belirlenen 271 izolattan, 100 izolat seçilmiş ve VITEK 2GP sistemi ile tanımlanmıştır. VITEK sistemi sonuçları Çizelge 4.4’de verilmiştir. İncelenen 100 suşun tamamı bu sistem ile tanımlanmıştır. Enterokok identifikasyonunun VITEK sistemi ile gerçekleştirildiği diğer bir çalışmada da 369 nosokomiyal enterokokal izolatın %98,1’i VITEK ile tanımlanabilmiştir (Sader *et al.* 1995). Yapılan diğer bir çalışmada da 132 enterokok izolatının %99,2’si cins düzeyinde %91,7’si ise tür düzeyinde tanımlanmış ve 31 izolatın *E. faecalis*, 62 izolatın *E. faecium*, 11 izolatın *E. casseliflavus*, 17 izolatın *E. gallinarum* olduğu bildirilmiştir (Fang *et al.* 2012). Mevcut araştırma sonuçlarımıza göre 100 izolatın %70’i *E. faecium*, %8’i *E. faecalis* ve %22’si *E. gallinarum* olarak tanımlanmıştır. Buna göre pastırmada enterokoklardan sadece 3 tür bulunmaktadır. Dominant tür *Enterococcus faecium* olup bunu *Enterococcus gallinarum* izlemektedir (Çizelge 4.4). Ancak hayvansal orijinli gıdalarda çok daha fazla tür izole edilebilmektedir. Nitekim fermente sosis, sosis, ham, kıyma ve peynir gibi farklı gıdalardan izole edilen 416 enterokok suşun 299’unun *E. faecalis* (%72), 54’ünün *E. faecium* (%13), 24’ünün *E. durans/E. hirae* (%6), 22’sinin *E. casseliflavus* (%5), 9’unun *E. avium* suşu (%2) ve 8’inin *E. gallinarum* (%2) olduğu tespit edilmiştir (Peters *et al.* 2003).

Gıdalardaki enterokokların ekolojisi, ürün özellikleri ile oldukça ilişkilidir. Taze etlerde *E. faecium* genellikle, *E. faecalis* sıklıkla, *E. durans/E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. mundtii* ise nadiren karşılaşılan türlerdir. Taze sosislere ise *E. faecium*’a genellikle bozulmuş örneklerde rastlanmaktadır. Gerek sığır gerekse sığır kıymalarında rastlanılan en yaygın tür *E. faecalis*’dir. *E. faecium* ve *E. faecalis*’in izolasyonu gıdalarda sıklıkla fekal kontaminasyonun göstergesi olarak kabul edilmektedir. Gıdada ve çevrede canlılıklarını sürdürebilmeleri ve ayrıca pH değişimleri ile yüksek tuz konsantrasyonlarına hassasiyet göstermemeleri bu mikroorganizmaların indikatör mikroorganizma olarak değerlendirilmelerinde önemli rol oynamaktadır. Ancak son yıllardaki çalışmalara göre enterokoklar floranın bir parçası olarak

değerlendirilmektedir. Diğer bir ifade ile enterokoklar sadece hijyenik kalitenin yetersizliğinin bir göstergesi olarak değerlendirilmemelidir (Klein 2003).



Çizelge 4.4. VITEK sonuçları

Firma	İzolat No	VITEK
1	EA ₁₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>
	EA ₁₋₂₋₅	<i>E. faecium</i>
	S ₁₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>
2	EA ₂₋₂₋₂	<i>E. faecium</i>
	EA ₂₋₂₋₄	<i>E. faecium</i>
	S ₂₋₂₋₃	<i>E. faecium</i>
	KF ₂₋₂₋₂	<i>E. faecium</i>
3	EA ₃₋₄₋₄	<i>E. faecium</i>
	EA ₃₋₄₋₅	<i>E. faecium</i>
	S ₃₋₄₋₃	<i>E. faecium</i>
	KF ₃₋₃₋₁	<i>E. faecium</i>
	KF ₃₋₃₋₅	<i>E. faecium</i>
4	EA ₄₋₂₋₃	<i>E. faecium</i>
	EA ₄₋₂₋₄	<i>E. faecium</i>
	S ₄₋₂₋₂	<i>E. faecium</i>
	S ₄₋₂₋₃	<i>E. faecium</i>
	KF ₄₋₂₋₃	<i>E. faecium</i>
5	EA ₅₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>
	EA ₅₋₂₋₃	<i>E. faecium</i>
	EA ₅₋₂₋₄	<i>E. faecium</i>
	S ₅₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>
	KF ₅₋₂₋₂	<i>E. faecium</i>
6	EA ₆₋₅₋₂	<i>E. faecium</i>
	EA ₆₋₅₋₅	<i>E. faecium</i>
	S ₆₋₅₋₄	<i>E. faecium</i>
	KF ₆₋₅₋₃	<i>E. faecium</i>
	KF ₆₋₅₋₄	<i>E. faecium</i>
7	EA ₇₋₄₋₂	<i>E. faecalis</i>
	EA ₇₋₄₋₃	<i>E. faecalis</i>
	S ₇₋₄₋₂	<i>E. faecalis</i>
	KF ₇₋₄₋₃	<i>E. faecalis</i>
8	EA ₈₋₅₋₁	<i>E. faecium</i>
	EA ₈₋₅₋₅	<i>E. faecium</i>
	S ₈₋₅₋₂	<i>E. faecium</i>
	KF ₈₋₅₋₄	<i>E. faecium</i>

Çizelge 4.4. (devam)

Firma	İzolat No	VITEK
9	EA ₉₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>
	EA ₉₋₂₋₄	<i>E. faecium</i>
	S ₉₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>
	KF ₉₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>
10	EA ₁₀₋₃₋₁	<i>E. faecium</i>
	EA ₁₀₋₃₋₅	<i>E. faecium</i>
	S ₁₀₋₃₋₂	<i>E. faecium</i>
	S ₁₀₋₃₋₃	<i>E. faecium</i>
	KF ₁₀₋₃₋₁	<i>E. faecium</i>
	KF ₁₀₋₃₋₃	<i>E. faecium</i>
11	EA ₁₁₋₃₋₁	<i>E. gallinarum</i>
	EA ₁₁₋₃₋₂	<i>E. gallinarum</i>
	S ₁₁₋₄₋₂	<i>E. gallinarum</i>
	KF ₁₁₋₃₋₄	<i>E. gallinarum</i>
12	EA ₁₂₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>
	EA ₁₂₋₂₋₃	<i>E. faecium</i>
	S ₁₂₋₂₋₅	<i>E. faecium</i>
	KF ₁₂₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>
	KF ₁₂₋₂₋₅	<i>E. faecium</i>
13	EA ₁₃₋₃₋₂	<i>E. gallinarum</i>
	EA ₁₃₋₃₋₄	<i>E. gallinarum</i>
	S ₁₃₋₄₋₂	<i>E. gallinarum</i>
	S ₁₃₋₄₋₆	<i>E. gallinarum</i>
	KF ₁₃₋₄₋₅	<i>E. gallinarum</i>
14	EA ₁₄₋₃₋₁	<i>E. gallinarum</i>
	EA ₁₄₋₃₋₃	<i>E. faecium</i>
	EA ₁₄₋₃₋₅	<i>E. gallinarum</i>
	S ₁₄₋₃₋₃	<i>E. gallinarum</i>
	S ₁₄₋₃₋₄	<i>E. gallinarum</i>
	S ₁₄₋₃₋₅	<i>E. gallinarum</i>
15	EA ₁₅₋₃₋₈	<i>E. gallinarum</i>
	EA ₁₅₋₃₋₁₀	<i>E. gallinarum</i>
	S ₁₅₋₂₋₁	<i>E. gallinarum</i>
	S ₁₅₋₂₋₄	<i>E. gallinarum</i>
16	EA ₁₆₋₄₋₃	<i>E. gallinarum</i>
	EA ₁₆₋₄₋₅	<i>E. gallinarum</i>
	S ₁₆₋₄₋₁	<i>E. gallinarum</i>
	KF ₁₆₋₄₋₁	<i>E. gallinarum</i>

Çizelge 4.4. (devam)

Firma	İzolat No	VITEK
17	EA ₁₇₋₅₋₄	<i>E. faecium</i>
	EA ₁₇₋₅₋₆	<i>E. faecium</i>
	S ₁₇₋₅₋₄	<i>E. faecium</i>
	KF ₁₇₋₅₋₆	<i>E. faecium</i>
	KF ₁₇₋₅₋₁₀	<i>E. faecium</i>
18	EA ₁₈₋₂₋₁	<i>E. faecalis</i>
	S ₁₈₋₂₋₁	<i>E. faecalis</i>
	KF ₁₈₋₂₋₃	<i>E. faecalis</i>
	KF ₁₈₋₂₋₅	<i>E. faecalis</i>
19	EA ₁₉₋₅₋₃	<i>E. faecium</i>
	EA ₁₉₋₅₋₄	<i>E. faecium</i>
	EA ₁₉₋₅₋₆	<i>E. faecium</i>
	S ₁₉₋₅₋₁₀	<i>E. faecium</i>
	KF ₁₉₋₅₋₂	<i>E. faecium</i>
	KF ₁₉₋₅₋₃	<i>E. faecium</i>
20	EA ₂₀₋₅₋₂	<i>E. faecium</i>
	EA ₂₀₋₅₋₃	<i>E. faecium</i>
	EA ₂₀₋₅₋₄	<i>E. faecium</i>
	EA ₂₀₋₅₋₆	<i>E. faecium</i>
	EA ₂₀₋₅₋₇	<i>E. faecium</i>
	EA ₂₀₋₅₋₈	<i>E. faecium</i>
	EA ₂₀₋₅₋₉	<i>E. faecium</i>
	S ₂₀₋₅₋₂	<i>E. faecium</i>
	S ₂₀₋₅₋₅	<i>E. faecium</i>
	S ₂₀₋₅₋₇	<i>E. faecium</i>
	KF ₂₀₋₅₋₂	<i>E. faecium</i>
	KF ₂₀₋₅₋₄	<i>E. faecium</i>

4.3. Genotipik İdentifikasyona Ait Sonuçlar

PCR rnlerinin 16S rRNA dizi analizi sonuçları Macrogen firmasından temin edilmiş ve alınan pikler BIOEDIT programı ile değerlendirildikten sonra ve baz dizilimi ıkarılmış ve sonrasında BLAST yapılarak bakterinin tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Araştırmada 100 suştan 80'i *E. faecium*, 19'u *E. faecalis* ve 1'i ise *E. hirae* olarak tanımlanmıştır (izelge 4.5).



Çizelge 4.5. Genotipik tanımlama

Firma	İzolat No	16S rRNA	Baz	Tanımlama Yüzdesi	Aksesyon No
1	EA ₁₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>	1151	% 100	KU291269
	EA ₁₋₂₋₅	<i>E. faecium</i>	1133	% 100	KU291270
	S ₁₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>	1135	% 99	KU291271
2	EA ₂₋₂₋₂	<i>E. faecium</i>	1216	% 100	KU291272
	EA ₂₋₂₋₄	<i>E. faecium</i>	1194	% 100	KU291273
	S ₂₋₂₋₃	<i>E. faecium</i>	862	% 94	KU291274
	KF ₂₋₂₋₂	<i>E. faecium</i>	1268	% 100	KU291275
3	EA ₃₋₄₋₄	<i>E. faecalis</i>	1312	% 100	KU291276
	EA ₃₋₄₋₅	<i>E. faecium</i>	1357	% 100	KU291277
	S ₃₋₄₋₃	<i>E. faecium</i>	1232	% 99	KU291278
	KF ₃₋₃₋₁	<i>E. faecium</i>	1157	% 100	KU291279
	KF ₃₋₃₋₅	<i>E. faecium</i>	1312	% 100	KU291280
4	EA ₄₋₂₋₃	<i>E. faecium</i>	1289	% 99	KU321604
	EA ₄₋₂₋₄	<i>E. faecium</i>	1105	% 97	KU321605
	S ₄₋₂₋₂	<i>E. faecium</i>	1167	% 99	KU321606
	S ₄₋₂₋₃	<i>E. faecium</i>	1207	% 100	KU321607
	KF ₄₋₂₋₃	<i>E. faecium</i>	1175	% 99	KU321608
5	EA ₅₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>	1298	% 100	KU321609
	EA ₅₋₂₋₃	<i>E. faecium</i>	1321	% 100	KU321610
	EA ₅₋₂₋₄	<i>E. faecium</i>	1356	% 99	KU321611
	S ₅₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>	1288	% 100	KU321612
	KF ₅₋₂₋₂	<i>E. faecium</i>	1247	% 100	KU321613
6	EA ₆₋₅₋₂	<i>E. faecium</i>	1271	% 99	KU321614
	EA ₆₋₅₋₅	<i>E. faecalis</i>	1051	% 100	KU321615
	S ₆₋₅₋₄	<i>E. faecium</i>	1197	% 99	KU321616
	KF ₆₋₅₋₃	<i>E. faecium</i>	1298	% 100	KU321617
	KF ₆₋₅₋₄	<i>E. faecium</i>	1003	% 99	KU321618
7	EA ₇₋₄₋₂	<i>E. faecalis</i>	1369	% 100	KU321619
	EA ₇₋₄₋₃	<i>E. faecalis</i>	1167	% 99	KU321620
	S ₇₋₄₋₂	<i>E. faecalis</i>	1329	% 99	KU321621
	KF ₇₋₄₋₃	<i>E. faecalis</i>	1329	% 100	KU359817
8	EA ₈₋₅₋₁	<i>E. faecium</i>	1178	% 100	KU321622
	EA ₈₋₅₋₅	<i>E. faecium</i>	1305	% 100	KU321623
	S ₈₋₅₋₂	<i>E. faecium</i>	1355	% 100	KU321624
	KF ₈₋₅₋₄	<i>E. faecium</i>	1042	% 99	KU321625

Çizelge 4.5. (devam)

Firma	İzolat No	16S rRNA	Baz	Tanımlama Yüzdesi	Aksesyon No
9	EA ₉₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>	1134	%99	KU321626
	EA ₉₋₂₋₄	<i>E. faecalis</i>	1310	%100	KU321627
	S ₉₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>	1330	%99	KU321628
	KF ₉₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>	1327	%100	KU321629
10	EA ₁₀₋₃₋₁	<i>E. faecalis</i>	1404	%100	KU321630
	EA ₁₀₋₃₋₅	<i>E. faecalis</i>	1119	%99	KU321631
	S ₁₀₋₃₋₂	<i>E. faecalis</i>	1407	%100	KU321632
	S ₁₀₋₃₋₃	<i>E. faecalis</i>	1332	%100	KU321633
	KF ₁₀₋₃₋₁	<i>E. faecalis</i>	1323	%100	KU321634
	KF ₁₀₋₃₋₃	<i>E. faecium</i>	1380	%100	KU321635
11	EA ₁₁₋₃₋₁	<i>E. faecium</i>	1399	%99	KU359782
	EA ₁₁₋₃₋₂	<i>E. faecium</i>	1178	%99	KU359783
	S ₁₁₋₄₋₂	<i>E. faecium</i>	1227	%99	KU359784
	KF ₁₁₋₃₋₄	<i>E. hirae</i>	1149	%99	KU359785
12	EA ₁₂₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>	1109	%99	KU359786
	EA ₁₂₋₂₋₃	<i>E. faecalis</i>	1197	%100	KU359787
	S ₁₂₋₂₋₅	<i>E. faecium</i>	1146	%99	KU359788
	KF ₁₂₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>	1011	%100	KU359789
	KF ₁₂₋₂₋₅	<i>E. faecalis</i>	1171	%100	KU359790
13	EA ₁₃₋₃₋₂	<i>E. faecium</i>	1328	%100	KU359791
	EA ₁₃₋₃₋₄	<i>E. faecium</i>	1156	%99	KU359792
	S ₁₃₋₄₋₂	<i>E. faecium</i>	1238	%100	KU359793
	S ₁₃₋₄₋₆	<i>E. faecium</i>	1200	%99	KU359794
	KF ₁₃₋₄₋₅	<i>E. faecium</i>	1128	%99	KU359795
14	EA ₁₄₋₃₋₁	<i>E. faecium</i>	1199	%99	KU359796
	EA ₁₄₋₃₋₃	<i>E. faecium</i>	1177	%99	KU359797
	EA ₁₄₋₃₋₅	<i>E. faecium</i>	1020	%99	KU359798
	S ₁₄₋₃₋₃	<i>E. faecium</i>	1087	%99	KU359799
	S ₁₄₋₃₋₄	<i>E. faecium</i>	1062	%99	KU359800
	S ₁₄₋₃₋₅	<i>E. faecium</i>	1239	%100	KU359801
15	EA ₁₅₋₃₋₈	<i>E. faecium</i>	1216	%99	KU359802
	EA ₁₅₋₃₋₁₀	<i>E. faecium</i>	1360	%99	KU359803
	S ₁₅₋₂₋₁	<i>E. faecium</i>	1283	%99	KU359804
	S ₁₅₋₂₋₄	<i>E. faecium</i>	1193	%100	KU359805
16	EA ₁₆₋₄₋₃	<i>E. faecium</i>	1038	%95	KU359806
	EA ₁₆₋₄₋₅	<i>E. faecium</i>	1139	%99	KU359807
	S ₁₆₋₄₋₁	<i>E. faecium</i>	1318	%99	KU359808
	KF ₁₆₋₄₋₁	<i>E. faecium</i>	1392	%99	KU359809

Çizelge 4.5. (devam)

Firma	İzolat No	16S rRNA	Baz	Tanımlama Yüzdesi	Aksesyon No
17	EA ₁₇₋₅₋₄	<i>E. faecium</i>	1323	% 100	KU359810
	EA ₁₇₋₅₋₆	<i>E. faecium</i>	1270	% 99	KU359811
	S ₁₇₋₅₋₄	<i>E. faecium</i>	1347	% 99	KU359812
	KF ₁₇₋₅₋₆	<i>E. faecium</i>	1234	% 99	KU359813
	KF ₁₇₋₅₋₁₀	<i>E. faecalis</i>	1097	% 99	KU359814
18	EA ₁₈₋₂₋₁	<i>E. faecalis</i>	1124	% 99	KU359818
	S ₁₈₋₂₋₁	<i>E. faecalis</i>	1131	% 100	KU359815
	KF ₁₈₋₂₋₃	<i>E. faecalis</i>	1363	% 99	KU359819
	KF ₁₈₋₂₋₅	<i>E. faecalis</i>	1154	% 98	KU359816
19	EA ₁₉₋₅₋₃	<i>E. faecium</i>	1183	% 99	KU359820
	EA ₁₉₋₅₋₄	<i>E. faecium</i>	1320	% 99	KU359821
	EA ₁₉₋₅₋₆	<i>E. faecium</i>	1201	% 99	KU359822
	S ₁₉₋₅₋₁₀	<i>E. faecium</i>	1200	% 100	KU359823
	KF ₁₉₋₅₋₂	<i>E. faecium</i>	1043	% 99	KU359824
	KF ₁₉₋₅₋₃	<i>E. faecium</i>	995	% 98	KU359825
20	EA ₂₀₋₅₋₂	<i>E. faecium</i>	1221	% 100	KU359826
	EA ₂₀₋₅₋₃	<i>E. faecium</i>	1125	% 100	KU359827
	EA ₂₀₋₅₋₄	<i>E. faecium</i>	1229	% 100	KU359828
	EA ₂₀₋₅₋₆	<i>E. faecium</i>	1360	% 99	KU359829
	EA ₂₀₋₅₋₇	<i>E. faecium</i>	1211	% 99	KU359830
	EA ₂₀₋₅₋₈	<i>E. faecium</i>	1187	% 99	KU359831
	EA ₂₀₋₅₋₉	<i>E. faecium</i>	1241	% 99	KU359832
	S ₂₀₋₅₋₂	<i>E. faecium</i>	1224	% 99	KU359833
	S ₂₀₋₅₋₅	<i>E. faecium</i>	1166	% 99	KU359834
	S ₂₀₋₅₋₇	<i>E. faecium</i>	1387	% 100	KU359835
	KF ₂₀₋₅₋₂	<i>E. faecium</i>	1305	% 99	KU359836
	KF ₂₀₋₅₋₄	<i>E. faecium</i>	1183	% 99	KU359837

Bir, iki, dört, beş, yedi, sekiz, onsekiz, ondokuz ve yirmi numaralı örneklerden elde edilen toplam 47 izolat hem fenotipik hem de genotipik açıdan aynı sonuçları vermiştir. Bu izolatlardan 39'u *E. faecium*, 8'i ise *E. faecalis*'tir. Bu sonuçlara göre dokuz firmaya ait örneklerde dominant tür *E. faecium*'dur. Üç, altı, dokuz, on, oniki ve onyedini numaralı örneklerde toplam 9 izolat genotipik ve fenotipik identifikasyonda farklılık göstermiştir. Bu 9 izolat fenotipik identifikasyonda *E. faecium* (EA₃₋₄₋₄, EA₆₋₅₋₅, EA₉₋₂₋₄, EA₁₀₋₃₋₁, EA₁₀₋₃₋₅, S₁₀₋₃₋₂, S₁₀₋₃₋₃, KF₁₀₋₃₋₁ ve KF₁₇₋₅₋₁₀), genotipik identifikasyonda ise *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. Diğer taraftan 11, 13, 14, 15 ve 16 numaralı örneklerden izole edilen 22 izolat, fenotipik identifikasyonda *E. gallinarum* olarak tanımlanırken, genotipik identifikasyonda bu izolatlardan 21'i *E. faecium*, 1'i ise *E. hirae* olarak tanımlanmıştır. Genotipik tanımlama sonuçlarına göre izolatların %80'i *E. faecium*, %19'u *E. faecalis* ve %1'i ise *E. hirae* olarak belirlenmiştir. Fenotipik identifikasyonda ise yine *E. faecium*, yüksek bir identifikasyon oranı göstermiştir. Bu türü *E. gallinarum* (%22) ve *E. faecalis* (%8) izlemiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. İzolatların genotipik ve fenotipik identifikasyon oranları

Tür	Genotipik identifikasyon		Fenotipik identifikasyon	
	İzolat sayısı	%	İzolat sayısı	%
<i>E. faecium</i>	80	80	70	70
<i>E. faecalis</i>	19	19	8	8
<i>E. gallinarum</i>	-	-	22	22
<i>E. hirae</i>	1	1	-	-
Toplam	100	100	100	100

Fermente kuru sosis, kuru küredilmiş ham ve fermente edilmemiş kuru sosis hamurundan elde edilen enterokok izolatlarının fenotipik ve genotipik identifikasyonunu da içeren bir araştırmada 29 izolat fenotipik (API 20) ve 25 izolat genotipik (16S rRNA) olarak tanımlanmış ve izolatların %51,7'si *E. faecalis* ve %44,8'i *E. faecium* ve %3,4'ü *E. gallinarum* olarak tanımlanmıştır. Araştırmada fenotipik ile genotipik arasında tam bir uyum olduğu da rapor edilmiştir (Jahan *et al.* 2013). Fang *et al.* (2012) ise yaptıkları çalışmada 16S rRNA sekans analizine göre 132

izolatın 32'si *E. faecalis*, 63'ü *E. faecium*, 16'sı *E. casseliflavus* ve 21'i *E. gallinarum* olarak tespit etmişlerdir.

4.4. Antagonistik Aktivite Sonuçları

Tanımlanan 100 izolatın *E.coli* O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes*'e karşı antagonistik aktiviteleri agar spot ve kuyu difüzyon testleri ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü üzere 5, 9 ve 10 no'lu firmalara ait örneklerden izole edilen EA₅₋₂₋₁, EA₅₋₂₋₃, EA₅₋₂₋₄, S₅₋₂₋₁, EA₉₋₂₋₁, EA₉₋₂₋₄, S₉₋₂₋₁, KF₉₋₂₋₁, S₁₀₋₃₋₂, S₁₀₋₃₋₃, KF₁₀₋₃₋₁, KF₁₀₋₃₋₃ no'lu izolatlar sadece agar spot testinde pozitif sonuç vermiştir

EA₄₋₂₋₃, EA₄₋₂₋₄, S₄₋₂₋₂, S₄₋₂₋₃, KF₄₋₂₋₃, EA₈₋₅₋₁, EA₈₋₅₋₅, S₈₋₅₋₂, KF₈₋₅₋₄ no'lu izolatlar ise hem kuyu difüzyon hem de agar spot testi ile *Listeria monocytogenes*'e karşı antagonistik aktivite göstermiştir. Ancak kuyu difüzyon testlerinde kuvvetli bir inhibisyon zonu ile karşılaşılmamıştır. Buna karşın konu ile ilgili diğer bir çalışmada fermente bir sosis çeşidinden izole edilen ve moleküler olarak tanımlanan *Enterococcus faecium* suşlarının tamamının *Listeria* türleri ile *S. aureus*'a karşı antagonistik aktivite gösterdiği ve bu suşların aynı zamanda diğer *Enterococcus* türlerine karşı da etkin olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca çalışmada bir izolatın *E.coli*'ye karşı antagonistik aktivite gösterdiği de ileri sürülmüştür (Ben-Belgacem *et al.* 2010). Diğer taraftan et orijinli olmayan iki farklı *Enterococcus* izolatının (*Enterococcus faecium* CCM4231 ve *Enterococcus faecium* RZSC13) fermente sosis üretiminde starter kültür olarak kullanım imkanlarının araştırıldığı bir çalışmada, her iki izolatın da fermantasyon süresince *Listeria*'nın gelişimini önemli bir şekilde engellediği belirtilmiştir (Callewaert *et al.* 2000). Yine yapılan benzer bir çalışmada İspanya kuru fermente sosisinden izole edilen *E. faecium* P21 suşunun *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens* ve *Clostridium botulinum*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Herranz *et al.* 2001). Leroy *et al.* (2003) da yaptıkları çalışmada doğal peynirden izole edilen *Enterococcus faecium* RZS C5'in ürettiği bakteriyosinin *Listeria monocytogenes* üzerinde güçlü bir aktivite gösterdiğini açıklamışlardır.

Enterokoklar ürettikleri bakteriyosinler ile patojen bakterilere karşı antagonistik aktivite gösterebildiği gibi homofermentatif karakterleri nedeniyle laktik asit oluşturup pH'yı düşürerek de inhibitör aktivite sergileyebilmektedir. Kuru fermente bir sosise çeşidinin üretiminde *E. faecalis* CECT 7121 suşunun starter kültür olarak kullanılabilme durumunun araştırıldığı bir çalışmada sözkonusu suşun fermentasyon sırasında ürün pH'sını 5,1'e kadar düşürdüğü ve böylelikle Enterobacteriaceae, *S. aureus*, *L. monocytogenes*'e karşı inhibitör aktivite gösterdiği vurgulanmıştır (Sparo *et al.* 2008).

İtalyan fermente sosisleri ile yapılan bir çalışmada izole edilen bakteriyosinogenik *E. casseliflavus* IM 416K1 (Bac⁺) veya onun bakteriyosinleri enterosin 416 K1 güçlü antilisterial etkisinden dolayı İtalyan fermente sosisi Cacciatore'ye inoküle edilmiş ve bu enterosinin *L. monocytogenes* NCTC 10888 üzerindeki etkisi incelenmiş ve neticede *L. monocytogenes* sayısında önemli bir redüksiyon olduğu rapor edilmiştir (Sabia *et al.* 2003). Benzer şekilde kuru fermente bir sosise çeşidi üzerinde yapılan bir çalışmada enterocin CCM 4231'nin etkisi incelenmiş ve sözkonusu bakteriyosinin *L. monocytogenes* sayısında önemli bir redüksiyona neden olduğu tespit edilmiştir (Laukova *et al.* 1999). Enterosinlerin fermente sosislerde *S. aureus*'un gelişimini inhibe ettiği de rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, kullanılan *E. faecalis* A-48-32 suşunun ürettiği enterocin AS-48'in fermente sosislerde *S. aureus*'un sayısında 2,00 ve 5,31 log kob/g arasında değişen redüksiyonlara sebep olduğu belirtilmiştir (Ananou *et al.* 2005). Khan *et al.* 2010 ise enterosinlerin çoğunun *L. monocytogenes*'e karşı antagonistik aktivite gösterdiğini rapor etmiş ve hatta bazı enterosinlerin G(-) bakterilere karşı bile aktif olduğunu ileri sürmüştür.

Diğer taraftan bacon'dan izole edilen *Enterococcus* sp. 18 izolatının *L. monocytogenes*'e karşı herhangi bir antagonistik aktivite göstermediği rapor edilmiştir. (De Martinis and Freitas 2003).

Sucuk üzerinde yapılan bir çalışmada da 4 *Pedicoccus* izolatının *Listeria. monocytogenes*'e karşı antagonistik aktivite gösterdiği ve 2 *Lactobacillus* izolatının ise

gıda kaynaklı bu patojen bakteriye karşı etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (Çon *et al.* 2001).



Çizelge 4.7. Slanetz- Bartley Agar, *Enterococcus* Agar, KF *Streptococcus* Agar'dan izole edilen suşların agar spot ve kuyu difüzyon testleri ile *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes*'e karşı antagonistik aktivitesinin belirlenmesi

Firma	İzolat No	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
		Agar spot	Kuyu difüzyon	Agar spot	Kuyu difüzyon	Agar* spot	Kuyu* difüzyon
1	EA ₁₋₂₋₁	-	-	-	-	-	-
	EA ₁₋₂₋₅	-	-	-	-	-	-
	S ₁₋₂₋₁	-	-	-	-	-	-
2	EA ₂₋₂₋₂	-	-	-	-	-	-
	EA ₂₋₂₋₄	-	-	-	-	-	-
	S ₂₋₂₋₃	-	-	-	-	-	-
	KF ₂₋₂₋₂	-	-	-	-	-	-
3	EA ₃₋₄₋₄	-	-	-	-	-	-
	EA ₃₋₄₋₅	-	-	-	-	-	-
	S ₃₋₄₋₃	-	-	-	-	-	-
	KF ₃₋₃₋₁	-	-	-	-	-	-
	KF ₃₋₃₋₅	-	-	-	-	-	-
4	EA ₄₋₂₋₃	-	-	-	-	7,0	1,5
	EA ₄₋₂₋₄	-	-	-	-	7,0	1,5
	S ₄₋₂₋₂	-	-	-	-	6,5	1,5
	S ₄₋₂₋₃	-	-	-	-	6,5	1,0
	KF ₄₋₂₋₃	-	-	-	-	6,0	1,0
5	EA ₅₋₂₋₁	-	-	-	-	3,0	-
	EA ₅₋₂₋₃	-	-	-	-	4,0	-
	EA ₅₋₂₋₄	-	-	-	-	3,0	-
	S ₅₋₂₋₁	-	-	-	-	2,0	-
	KF ₅₋₂₋₂	-	-	-	-	-	-
6	EA ₆₋₅₋₂	-	-	-	-	-	-
	EA ₆₋₅₋₅	-	-	-	-	-	-
	S ₆₋₅₋₄	-	-	-	-	-	-
	KF ₆₋₅₋₃	-	-	-	-	-	-
	KF ₆₋₅₋₄	-	-	-	-	-	-
7	EA ₇₋₄₋₂	-	-	-	-	-	-
	EA ₇₋₄₋₃	-	-	-	-	-	-
	S ₇₋₄₋₂	-	-	-	-	-	-
	KF ₇₋₄₋₃	-	-	-	-	-	-
8	EA ₈₋₅₋₁	-	-	-	-	6,0	1,0
	EA ₈₋₅₋₅	-	-	-	-	3,0	1,0
	S ₈₋₅₋₂	-	-	-	-	4,0	1,0
	KF ₈₋₅₋₄	-	-	-	-	3,0	1,0
9	EA ₉₋₂₋₁	-	-	-	-	4,0	-
	EA ₉₋₂₋₄	-	-	-	-	4,0	-
	S ₉₋₂₋₁	-	-	-	-	4,0	-
	KF ₉₋₂₋₁	-	-	-	-	4,0	-

Çizelge 4.7. (devam)

Firma	İzolat No	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
		Agar spot	Kuyu difüzyon	Agar spot	Kuyu difüzyon	Agar spot	Kuyu difüzyon
10	EA ₁₀₋₃₋₁	-	-	-	-	-	-
	EA ₁₀₋₃₋₅	-	-	-	-	-	-
	S ₁₀₋₃₋₂	-	-	-	-	6,5	-
	S ₁₀₋₃₋₃	-	-	-	-	5,0	-
	KF ₁₀₋₃₋₁	-	-	-	-	5,0	-
	KF ₁₀₋₃₋₃	-	-	-	-	6,5	-
11	EA ₁₁₋₃₋₁	-	-	-	-	-	-
	EA ₁₁₋₃₋₂	-	-	-	-	-	-
	S ₁₁₋₄₋₂	-	-	-	-	-	-
	KF ₁₁₋₃₋₄	-	-	-	-	-	-
12	EA ₁₂₋₂₋₁	-	-	-	-	-	-
	EA ₁₂₋₂₋₃	-	-	-	-	-	-
	S ₁₂₋₂₋₅	-	-	-	-	-	-
	KF ₁₂₋₂₋₁	-	-	-	-	-	-
	KF ₁₂₋₂₋₅	-	-	-	-	-	-
13	EA ₁₃₋₃₋₂	-	-	-	-	-	-
	EA ₁₃₋₃₋₄	-	-	-	-	-	-
	S ₁₃₋₄₋₂	-	-	-	-	-	-
	S ₁₃₋₄₋₆	-	-	-	-	-	-
	KF ₁₃₋₄₋₅	-	-	-	-	-	-
14	EA ₁₄₋₃₋₁	-	-	-	-	-	-
	EA ₁₄₋₃₋₃	-	-	-	-	-	-
	EA ₁₄₋₃₋₅	-	-	-	-	-	-
	S ₁₄₋₃₋₃	-	-	-	-	-	-
	S ₁₄₋₃₋₄	-	-	-	-	-	-
	S ₁₄₋₃₋₅	-	-	-	-	-	-
15	EA ₁₅₋₃₋₈	-	-	-	-	-	-
	EA ₁₅₋₃₋₁₀	-	-	-	-	-	-
	S ₁₅₋₂₋₁	-	-	-	-	-	-
	S ₁₅₋₂₋₄	-	-	-	-	-	-
16	EA ₁₆₋₄₋₃	-	-	-	-	-	-
	EA ₁₆₋₄₋₅	-	-	-	-	-	-
	S ₁₆₋₄₋₁	-	-	-	-	-	-
	KF ₁₆₋₄₋₁	-	-	-	-	-	-
17	EA ₁₇₋₅₋₄	-	-	-	-	-	-
	EA ₁₇₋₅₋₆	-	-	-	-	-	-
	S ₁₇₋₅₋₄	-	-	-	-	-	-
	KF ₁₇₋₅₋₆	-	-	-	-	-	-
	KF ₁₇₋₅₋₁₀	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.6. (devam)

Firma	İzolat No	<i>E. coli</i> O157:H7		<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
		Agar spot	Kuyu difüzyon	Agar spot	Kuyu difüzyon	Agar spot	Kuyu difüzyon
18	EA ₁₈₋₂₋₁	-	-	-	-	-	-
	S ₁₈₋₂₋₁	-	-	-	-	-	-
	KF ₁₈₋₂₋₃	-	-	-	-	-	-
	KF ₁₈₋₂₋₅	-	-	-	-	-	-
19	EA ₁₉₋₅₋₃	-	-	-	-	-	-
	EA ₁₉₋₅₋₄	-	-	-	-	-	-
	EA ₁₉₋₅₋₆	-	-	-	-	-	-
	S ₁₉₋₅₋₁₀	-	-	-	-	-	-
	KF ₁₉₋₅₋₂	-	-	-	-	-	-
	KF ₁₉₋₅₋₃	-	-	-	-	-	-
20	EA ₂₀₋₅₋₂	-	-	-	-	-	-
	EA ₂₀₋₅₋₃	-	-	-	-	-	-
	EA ₂₀₋₅₋₄	-	-	-	-	-	-
	EA ₂₀₋₅₋₆	-	-	-	-	-	-
	EA ₂₀₋₅₋₇	-	-	-	-	-	-
	EA ₂₀₋₅₋₈	-	-	-	-	-	-
	EA ₂₀₋₅₋₉	-	-	-	-	-	-
	S ₂₀₋₅₋₂	-	-	-	-	-	-
	S ₂₀₋₅₋₅	-	-	-	-	-	-
	S ₂₀₋₅₋₇	-	-	-	-	-	-
	KF ₂₀₋₅₋₂	-	-	-	-	-	-
KF ₂₀₋₅₋₄	-	-	-	-	-	-	

*İnhibisyon (mm)

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Laktik asit bakterileri içinde yer alan enterokoklar, ısıya karşı gösterdikleri direnç ekstrem pH ve yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilme ve canlılıklarını sürdürebilme özellikleri nedeni ile hem fermente ürünlerde hem de sosis ve salam gibi ısı işlem uygulanmış emülsiyon tipi et ürünlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Son yıllarda enterokokların, gıdaların organoleptik özelliklerine katkıda bulunması, patojenlere karşı bakteriyosin üretme yetenekleri ve probiyotik özellikleri nedeniyle bazı gıdaların üretiminde enterokoklar starter veya biyokoruyucu kültür olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak bu laktik asit bakterilerinin GRAS (Generally Recognised as Safe) mikroorganizmalar olarak düşünülmesi hala tartışmalıdır. Buna rağmen gıdalardan izole edilen enterokok suşlarının koruyucu kültür olarak kullanılabilmesi pek çok çalışmada belirtilmektedir. Araştırma, pastırmadan enterokokların izolasyonu-identifikasyonu ve bu suşların starter/biyokoruyucu kültür olarak kullanım potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla kurulmuş ve yürütülmüştür.

Dünyada geleneksel gıdalardan enterokokların izolasyonu ve identifikasyonuna yönelik pek çok çalışma yapılmasına rağmen ülkemizde yapılan araştırma sayısı oldukça az olup bu araştırmalar da genellikle süt ürünlerine yöneliktir. Geleneksel bir et ürünü olan pastırmada ise enterokokların izolasyonu/identifikasyonu ve karakterizasyonuna yönelik kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Mevcut bu araştırmada pastırma üretimi yapan 20 farklı firmadan temin edilen 20 pastırma örneğinde enterokokların izolasyonu gerçekleştirilip, elde edilen izolatların fenotipik ve genotipik identifikasyonu yapılmış ve tanımlanan izolatların antagonistik aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca Türkiye piyasasını temsil edecek şekilde alınan pastırma örneklerinin bazı kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri de belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan aşağıdaki genel sonuç ve öneriler çıkarılmıştır.

1. Pastırma örneklerinin 10^4 - 10^8 kob/g düzeyinde *Micrococcus/Staphylococcus* içerdikleri tespit edilmiştir. Nitrat redüktaz, katalaz ve lipolitik/proteolitik aktiviteleri ile parça halde işlenen ürünlerde teknolojik öneme sahip bu mikroorganizmalar, pastırmada

sıklıkla dominant flora olarak belirlenmektedir. Mevcut bu araştırmada da incelenen 20 örnek sonuçlarına göre bu mikroorganizmalar yine genellikle baskın florayı oluşturmaktadır.

2. Pastırma örneklerinde LAB sayısı 10^3 - 10^8 kob/g arasında bir değişim göstermiş ve bazı örneklerde bu mikroorganizmalar, *Micrococcus/Staphylococcus* ile maya-küflere göre daha yüksek sayılar vermiştir. Bu sonuçlar muhtemelen hammadde özellikleri ile uygulanan prosesten kaynaklanmaktadır. LAB, asit oluşturarak ürün güvenilirliğinin yanı sıra tekstür ve renk gibi duyuşal parametreler üzerinde de etkili olmaktadır. Diğer taraftan bakteriyosin üreten LAB, bu fonksiyonlarının yanı sıra gıda kaynaklı patojenlerin inhibisyonunda ilave bir engel etken olabilmektedir.

3. Pastırma örneklerinde maya-küf sayısı genellikle 10^2 - 10^6 kob/g düzeyinde bulunmuştur. Bu sayının önemli bir kısmını mayalar oluşturmaktadır. Nitekim pastırma çemeninde bulunan sarımsak nedeni ile ürün yüzeyinde de herhangi bir küflenme ile karşılaşılmamıştır.

4. Pastırma örneklerinde Enterobacteriaceae sayısı genellikle saptanabilir sınırın altında değerler vermiştir. Enterobacteriaceae familyasına ait mikroorganizmaların sayısı, pastırma üretim prosesi sırasında düşen su aktivitesine bağlı olarak düşüş göstermekte ve genellikle son üründe saptanabilir sınırın altında kalmaktadır. Bununla beraber yeterince kurutulmayan pastırmalarda bu familya üyelerinin farklı sayıları ile de karşılaşılabilmektedir.

5. Pastırma örneklerinde pH değeri 4,77-6,49 arasında değişim göstermiştir. Pastırmada pH değeri Türk Gıda Kodeksi Et Ürünleri Tebliği'ne göre 6'yı geçmemesi gerekmektedir. Duyusal özellikler açısından da pH değerinin 5,5'in altında olmaması gerektiği sıklıkla vurgulanmaktadır. Bu açıdan bakıldığında bazı örnekler belirtilen kriterlere uygunluk göstermemektedir.

6. Pastırmaların nem değerleri %34,92-55,40 arasında bir değişim göstermiştir. Parça halde işlenen kuru kür edilmiş bir et ürünü olan pastırmada, tuzlama ve kurutma işlemlerinin sonucu olarak ürünün nem değeri düşüş göstermektedir. Ancak bu araştırma sonuçlarından da görüldüğü üzere %55 civarında nem içeren pastırmalar da piyasada bulunabilmektedir. Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliğine göre pastırmada nem oranının %50'yi geçmemesi gerekmektedir. Mevcut çalışmada elde edilen sonuçlara göre incelenen pastırmaların az bir kısmı nem değeri açısından Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliğine uygunluk göstermemektedir.

7. Piyasa örneklerinde *Enterococcus* sayısını belirlemek amacı ile üç farklı besiyeri (*Enterococcus* Agar, Slanetz-Bartley Agar, KF *Streptococcus* Agar) kullanılmış ve ekim/inkübasyon aşamalarından sonra doğrulama testleri (Gram boyama, morfolojik görünüm, katalaz, PYR-testi, bile-esculin, %6,5 tuz) uygulanarak *Enterococcus* sayısı belirlenmiştir. *Enterococcus* agar ve Slanetz- Bartley agar sonuçlarına göre pastırma örneklerinin %35'inde sayı $1 \times 10^2 - < 1 \times 10^4$ kob/g aralığında yer alırken diğer %35'lik kısım ise 10^6 kob/g'dan daha yüksek sayılar vermiştir. KF *Streptococcus* Agar sonuçları da diğer besiyerlerine ait sonuçlara yakınlık göstermiştir. LAB grubuna dahil olan bu mikroorganizmaların sayısının geniş bir varyasyon göstermesinin hammadde özelliklerinin yanı sıra işletme şartlarından da kaynaklandığı düşünülmektedir. Enterokoklar LAB sayısı ile de uyumluluk göstermiştir. Diğer bir ifadeyle yüksek LAB sayısına sahip örneklerde enterokok sayısı da yüksek çıkmıştır.

8. Pastırma örneklerinden enterokokların izolasyonu amacı ile *Enterococcus* Agar, Slanetz-Bartley Agar, KF *Streptococcus* Agar besiyerlerinde gelişen kolonilerden 5-10 koloni alınmış ve bazı fenotipik testler (Gram boyama, morfolojik görünüm, katalaz, safra-esculin, PYR, %6,5 tuzda gelişme) uygulanmıştır. Bu testler sonucunda izole edilen 352 izolattan, 271 (%76,99) izolat enterokok olarak tespit edilmiş ve bu 271 izolata, farklı sıcaklıklarda gelişme, glukozdan gaz üretimi, farklı pH değerlerine gelişme, pigmentasyon, piruvat, hareket ve hemoliz testleri uygulanmıştır.

9. Enterokok izolatlarının tümünün test edilen sıcaklıklarda (10°C ve 45°C) gelişme gösterdikleri ve homofermantatif karakter sergilediği belirlenmiştir. İzolatların tümü pH 9,6'da ve %6,5'luk NaCl konsantrasyonunda da gelişme göstermiştir. Ancak hiçbir izolat pH 3,0'da gelişme gösterememiştir.

10. Araştırmada incelenen izolatların hiçbirisi pigment oluşturmamıştır. Piruvat testinde ise 42 izolat hariç diğer izolatlar pozitif sonuç vermiştir. Hareket edebilme yeteneği açısından ise iki firmaya ait toplam 18 izolat pozitif sonuç sergilemiştir.

11. Enterokoklarda önemli bir virulans faktörü olan hemoliz testi de izolatlarla uygulanmış ve koyun kanlı agarda beta-hemoliz reaksiyonu veren hiçbir izolata rastlanılmamıştır.

12. Pastırmadan izole edilen 271 izolattan, 100 izolat VITEK sistemi ile fenotipik olarak tanımlanmış ve izolatların %70'i *E. faecium*, %8'i *E. faecalis* ve %22'si *E. gallinarum* olarak tanımlanmıştır. Buna göre pastırmada enterokoklardan sadece 3 tür bulunmaktadır. Dominant tür *Enterococcus faecium* olup bunu *Enterococcus gallinarum* izlemektedir.

13. 16S rRNA ile genotipik tanımlaması gerçekleştirilen %80'i *E. faecium*, %19'u *E. faecalis* ve %1'i ise *E. hirae* olarak belirlenmiştir. Bir, iki, dört, beş, yedi, sekiz, onsekiz, ondokuz ve yirmi numaralı örneklerden elde edilen toplam 47 izolat hem fenotipik hem de genotipik açıdan aynı sonuçları vermiştir. Genotipik tanımlamaya göre de dominant tür *E. faecium*'dur.

14. Mevcut çalışmada, fenotipik ve genotipik identifikasyonu gerçekleştirilen 100 suşun, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*'a karşı antagonistik aktiviteleri agar spot ve kuyu difüzyon testleri ile belirlenmiştir. Hiçbir izolat *S. aureus* ve *E. coli* O157:H7'ye karşı herhangi bir antagonistik aktivite göstermemiştir. *L.monocytogenes*'e karşı ise antagonistik aktivite gösteren toplam izolat sayısı ise 21'dir. Ancak bu 21 izolattan sadece 9'u kuyu difüzyon testinde pozitif sonuç

göstermiştir. Bu 9 izolatın muhtemelen bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri metabolit üretebilme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Bu 9 izolatın daha kapsamlı şekilde incelenerek starter veya koruyucu kültür olarak kullanılabilme durumlarının ortaya çıkarılması büyük önem arz etmektedir. Bu izolatlar hem fenotipik identifikasyonda hem de genotipik identifikasyonda *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Bu *E. faecium* suşları içerisinde ise EA₄₋₂₋₃, EA₄₋₂₋₄, S₄₋₂₋₂, kodlu suşlar diğerlerine göre kuyu difüzyon testinde daha büyük zon vermiştir.

Sonuç olarak; pastırmada enterokoklar LAB içerisinde önemli bir paya sahip olup sayıları işletmeden işletmeye değişiklik göstermekle beraber 10⁷ kob/g seviyesine kadar çıkabilmektedir. Geleneksel bir et ürünü olan pastırmada enterokoklar içerisinde dominant türü *E. faecium* oluşturmaktadır. Pastırmadan izole edilen diğer önemli türler ise *E. faecalis* ve *E. gallinarum*'dur. Ayrıca antagonistik aktivite açısından sınırlı sayıda suş sadece *L.monocytogenes*'e karşı pozitif sonuç vermiştir.

KAYNAKLAR

- Ahmad, M., Smith, D.G. and Mahboob, S., 2003. Determination of heat resistance of exponential phase Enterococcal cells. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 3(3),340-346.
- Aksu, M.İ. ve Kaya, M., 2001a. Pastırma üretiminde starter kültür kullanımının son ürün özellikleri üzerine etkisi. *Turkish Journal Veterinary Animal Science*, 25, 847-854.
- Aksu, M.İ. ve Kaya, M., 2001b. Erzurum piyasasında tüketime sunulan pastırmaların bazı fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri. *Turkish Journal Veterinary Animal Science*, 25,319-326.
- Aksu, M.İ. and Kaya, M., 2002a. Effect of commercial starter cultures on the fatty acid composition of Pastırma (Turkish Dry Meat Product). *Journal of Food Science*, 67 (6), 2342-2345.
- Aksu, M.İ. ve Kaya, M., 2002b. Potasyum nitrat ve starter kültür kullanılarak üretilen pastırmaların bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri. *Turkish Journal Veterinary Animal Science*, 26, 125-132.
- Aksu, M.İ.ve Kaya, M.,2002c. Farklı kürlenme yöntemleri ve starter kültür kullanılarak pastırma üretimi. *Turkish Journal Veterinary Animal Science*, 26, 909-916.
- Aksu, M.İ. ve Kaya, M., 2002d. Ticari starter kültür preparatlarının pastırma üretiminde kullanım imkanları. *Turkish Journal Veterinary Animal Science*, 26,917-923.
- Aksu, M.İ. and Kaya, M., 2005. Effect of storage temperatures and time on shelf-life of sliced and modified atmosphere packaged pastırma, A dried meat product, produced from beef. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 85, 1305-1312.
- Aksu, M.İ.,Kaya, M.and Öz, F., 2008. Effect of *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xyloso* on the inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 in pastırma a dry-cured meat product. *Journal of Food Safety*, 28, 47-58.
- Aktaş, N., Aksu, M.İ. and Kaya, M., 2005. Changes in myofibrillar proteins during processing of pastırma (Turkish dry meat product) produced with commercial starter cultures. *Food Chemistry*, 90, 649-654.
- Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prevost, H., Dousset, H., Zagorec, M., Dufour,E., and Chevallier, I., 2005. Phenotypic and genotypic identification of Lactic Acid Bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*, 22, 373– 382.
- Ananou, S., Maqueda,M., Martinez-Bueno, M., Galvez, A. and Valdivia, E., 2005. Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by Enterocin AS-48. *Meat Science*, 71, 549-556.
- Andersson, R.,1989. Food processing, Lactic Acid Bacteria in the production of food SIK-Publication. *Food Labotatory Newsletter*, 14, 17-21.
- Anonim, 2012. Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği. Tebliğ No: 2012/74.
- Barbosa, J., Ferreira, V. and Teixeira, P., 2009. Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. *Food Microbiology*, 26, 527-532.

- Barrow, G.J and Feltham R.K.A.,1995. Cowan and Steel's of Manual Clinical Microbiology (Third edition), Cambridge University, 52-57p, London.
- Ben- Belgacem, Z., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Galvez, A.and Manai, M., 2010. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat, Food Control, 21,462-470.
- Ben-Omar, N., Castro,A., Lucas, R., Abriouel, R., Yousif, N.M.K., Franz, C.M.A.P., Holzapfel, M.H., Perez-Pulido,R., Martinez-Canamero, M. and Galvez, A., 2004. Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods, System. Appl. Microbiol., 27, 118-130.
- Benson, H.S., 1983. Microbiological applications, a laboratory manual in general microbiology (Seventh edition). Wm.C. Brown Company Publishers Dubuque, 397p, Iowa.
- Bilgehan, H., 1995. Klinik Mikrobiyolojik Tanı (2.Basım). Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 768s, İzmir.
- Bilgehan, H., 2002. Klinik Mikrobiyolojik Tanı (3.Basım). Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 622s, İzmir.
- Callewaert, R., Hugas, M. and De Vuyst,L., 2000. Competitiveness and bacteriocin production of enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages, International Journal of Food Microbiology, 57, 33-42.
- Çakıcı, N., Aksu, M.İ. and Erdemir, E., 2014. A survey of the physico-chemical and microbiological quality of different pastırma Types: A Dry-Cured Meat Product. Journal of Food, 13(2),196-203.
- Çınar, K.,2014. Farklı Kürlenme Sıcaklıkları ve Farklı Kürlenme Ajanları Kullanılarak Üretilen Pastırmaların Laktik Asit Bakteri Florası ve Diğer Bazı Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Çon, A.H., Gökalp, H.Y. and Kaya, M., 2001. Antagonistic effect on *Listeria monocytogenes* and *L.innocua* of a bacteriocin-like metabolite produced by Lactic Acid Bacteria isolated from Sucuk, Meat Science, 59, 437-441.
- De-Martinis, E.C.P. and Freitas, F.Z., 2003. Screening of Lactic Acid Bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. Food Control, 14, 197-200.
- Devriese, L.A., Pot, B., Van Damme, L., Kersters, K.and Haese Brouck, F., 1995. Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. International Journal of Food Microbiology, 26, 187-197.
- De Vuyst, L., Foulque Moreno, M.R. and Revets, H., 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in Enterococci of different origins. International Journal of Food Microbiology, 84, 299-318.
- Dinçer, E. and Kıvanç, M.,2012. Characterization of Lactic Acid Bacteria from Turkish Pastırma. Ann Microbiol, 62, 1155-1163.
- Doğruer, Y., Gürbüz, Ü. and Nizamlioğlu, M., 1995. Konya'da Tüketime Sunulan Pastırmaların Kalitesi. Veteriner Bilimleri Dergisi, 11(2), 77-81.
- Domig, K.J., Mayer, H.K. and Kneifel, W., 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2-pheno and genotypic criteria. International Journal of Food. Microbiology, 88, 165-188.

- Drosinos, E.H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F. and Metaxopoulos, J., 2005. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*, 69, 307-317.
- Eaton, T.J. and 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(4), 1628-1635.
- El-Khateib, I., Schmidt, V. and Leistner, L., 1987. Microbiologische stabilität von Türkischer Pastırma. *Fleischwirtschaft*, 67(1), 101-105.
- Ertekin, Ö., 2007. Farklı Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Nümerik Taksonomisi, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Facklam, R.R. and Collins, M.D., 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(4), 731-734.
- Facklam, R.R. and Sahn, D.F., 1995. *Enterococcus* Manual of Clinical Microbiology (6th edition). American Society for Microbiology, Washington, p 308-314.
- Fang, H., Ohlsson, A.K., Ullberg, M. and Özenci, V., 2012. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK 2 SYSTEM for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. *European Journal of Clinical Microbiology Infections Diseases*, 31, 1667.
- Foulquie Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L., 2006. The role and application of Enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. and Stiles, M.E., 1999. Enterococci at the crossroads of food safety?. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J. and Holzapfel, W.H., 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4385-4389.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. and Holzapfel, W.H., 2003. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 105-122.
- G-Allegria, E., Lopez, I., Ruiz, I.J., Saenz, J., Fernandez, E., Zarazaga, M., Dızy, M., Torres, C. and Ruiz-Larrea, F., 2004. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol, *FEMS Microbiology Letters*, 230, 53-61.
- Gomes, B.C., Esteves, C.T., Palazzo, I.C.V., Darini, A.L.C., Felis, G.E., Sechi, L.A., Franco, B.D.G.M. and De Martinis, E.C.P., 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. Isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, 25, 668-675.
- Gordon, L.P., Damm, M.A.S. and Anderson, J.D., 1987. Rapid presumptive identification of Streptococci directly from blood cultures by serologic tests and the L-pyrrolidonyl-B-naphthylamide reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 25 (2), 238-241.

- Gökalp, H.Y., Kaya, M. ve Zorba, Ö., 1994. Et Ürünleri İşleme Mühendisliği. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No: 320, Ders Kitapları Serisi No: 70, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, 468s, Erzurum.
- Gökalp, H.Y., Kaya M., Tülek Y. ve Zorba Ö., 1999. Et ve Ürünlerinde Kalite Kontrolü ve Laboratuvar Uygulama Kılavuzu: Atatürk Üniversitesi Yayınları, 320s, Erzurum.
- Gönülalan, Z., Yıldırım, Y., Ertaş, N. and Kök, F., 2009. Effects of starter culture use on some quality parameters of pastrami manufactured from water buffalo meat. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(10), 2094-2099.
- Gross, K.C., Houghton, M.P. and Senterfit, L. B., 1975. Presumptive speciation of *Streptococcus bovis* and other Group D Streptococci from human sources by using arginine and pyruvate tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 1(1), 54-60.
- Harwood, V.J., Delahoya, N.C., Ulrich, R.M., Kramer, M.F., Whitlock, J.E., Garey, J.R. and Lim, D.V., 2004. Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E.faecium* from clinical, faecal and environmental sources. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 476-482.
- Hazar, F.Y., 2014. Pastırma Üretiminde Biyojen Amin Oluşumu ve Bazı Kalitatif Özellikler Üzerine Farklı Proses Şartlarının Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Herranz, C., Casaus, P., Mukhopadhyay, S., Martinez, J.M., Rodriguez, J.M., Nes, I.F., Hernandez, P.E. and Cintas, L.M., 2001. *Enterococcus faecium* P21: A strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins Enterocin A and Enterocin B. *Food Microbiology*, 18, 115-131.
- Hugas, M., Garriga, M. and Aymerich, M.T., 2003. Functionalty of Enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 223-233.
- Jahan, M., Krause, D.O. and Holley, R.A., 2013. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species from meat and fermented meat products isolated by a PCR-based rapid screening method. *International Journal of Food Microbiology*, 163, 89-95.
- Jessen, B., 1995. Starter Cultures for meat fermentation, fermented meats, Blackie Academic and Professional, New York, USA, 130-154.
- Jen-Tu, R., YunWu, H., Shiang Lock, Y. and Ju-chen, M., 2010. Evaluation of microbial dynamics during the ripening of a traditional Taiwanese naturally fermented ham. *Food Microbiology*, 27, 460-467.
- Kaban, G. ve Kaya, M., 2006. Pastırmadan katalaz pozitif kokların izolasyonu ve identifikasyonu. Türkiye 9. Gıda Kongresi: 24-26 Mayıs 2006, Bolu.
- Kaban, G., 2009. Changes in the composition of volatile compounds and in microbiological and physicochemical parameters during pastırma processing. *Meat Science*, 82, 17-23.
- Kaban, G., 2013. Sucuk and pastırma: Microbiological changes and formation of volatile compounds. *Meat Science*, 95, 912-918.
- Katsaras, K., Leuntenschlager R. and Boschkova, K., 1996. Physikalisch-chemische Vorgänge bei der Herstellung von Pasterma. *Fleischwirtschaft*, 76, 136-142.
- Kaya, M., Kaban, G., 2014. Sayfa 157-190. Fermente et ürünleri. Gıda Biyoteknolojisi. Editör: ARAN N. İstanbul: Nobel Yayıncılık.
- Khan, H., Flint, S. and Lam-yu, P., 2010. Enterocins in food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 1-10.

- Klein, G., 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of Enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 123-131.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C., 1992. The Gram-positive cocci part II: Streptococci and *Streptococcus*-like Bacteria. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: J.B.Lippincott Company.
- Kotzekidou, P. and Lazarides, H.N., 1991. Microbial stability and survival of pathogen, in an intermediate moisture meat product *Lebensm. Wiss. Technol.*, 24, 419-423.
- Laukova, A., Czikova, S., Laczkova, S. and Turek, P., 1999. Use of Enterocin CCM 4231 to control *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated dry fermented Hornad Salami. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 115-119.
- Leistner, L., 1988. Hurden Technologie bei fleischer zeug nissen und andoren Lebens mittein Lebensmittel qualitat wissenschaft und Technik in R.stufe (Ed.), *Wissenschaftliche arbeitstagung 25 Jahre institut fur forschung und entuickeng maizera Ges, MbH., 2-bis4Marz*, 323-340p, Hellbernn.
- Leroy, F., Foulquie Monero, M.R. and De Vuyst L., 2003. *Enterococcus faecium* RZSC5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 235-240.
- Lücke, F.F., 1986. Fermented sausages, In *Microbiology of Fermented Foods*, London, Elsevier Applied Science.
- Lücke, F.K., 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, 56, 105-115.
- Marchesino, B., Bruttin, A., Romailier, N., Moreton, R.S., 1992. Microbiological events during commercial meat fermentations, *J. Appl. Bacteriol.* 73, 203– 209.
- Martin, B., Aymerich, M.T., Garriga, M., Monfort, J.M., Hugas, M., 2001. Determinación de comunidades microbianas en embutidos fermentados de baja acidez mediante técnicas de PCR, I Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Granada.
- Mayra- makinen, A. and Bigret, M., 1993. Industrial use and production of Lactic Acid bacteria . *Lactic Acid Bacteria*. Edt. Salminen, S. and von Wright, A., Marcel Dekker Inc., New York, 65-96p.
- Metaxopoulos, J., Samelis, J., Papadelli, M., 2001. Technological and microbiological evaluation of traditional processes as modified for the industrial manufacturing of dry fermented sausage in Greece, *Ital. J. Food Sci.* 1, 3– 18.
- Mislivic, P.B., Beuchat, L.R. and Cousin M.A., 1992. Vanderzant, and D. F. Splittstoesser, (eds.). *American Public Health Association Yeast and molds, in: compendium of the methods for the microbiological examinations of foods (Third Edition)*. American Public Health Association, 239-249p, Washington.
- Özdemir, H. ve Sırıken, B., 1997. Pastırmalardan izole edilen laktobasillerin bazı biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri, 10. KÜKEM Kongresi, 20, 74-75.
- Özdemir, H., Şireli, U.T., Sarımehtemioğlu, B., İnat, G., 1999. Ankara'da Tüketime Sunulan Pastırmalarda Mikrobiyal Floranın İncelenmesi. *Veterinary and Animal Sciences*, 1, 57-62.

- Öztürk, İ., 2015. Presence, changes and technological properties of yeast species during processing of pastırma, A Turkish Dry- Cured Meat Product. *Food Control*, 50, 76-84.
- Panagea, S. and Chadwick, P.R., 1996. Heat tolerance of Vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *J.Clin. Pathol.*, 49, 687-689.
- Peters, J., Mac, K., Wichmann-Schaver, H., Klein, G. and Ellerbroek, L., 2003. Species distribution and antibiotic resistance patterns of Enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 311-314.
- Rai, A.K., Tamang, J.P. and Palni, U., 2010. Microbiological studies of ethnic meat products of the Eastern Himalayas. *Meat Science.*, 85, 560-567.
- Ruiz-Moyano, S., Martin, A., Benito, M.T., Nevado, F.P. and D. Gulia Cordoba, M., 2008. Screening of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*, 80, 715-721.
- Sabia, C., De Niederhausen, S., Messi, P., Manicardi, G. and Bondi, M., 2003. Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM416K1, a natural antagonist for control of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages ("cacciatore"). *International Journal of Food Microbiology*, 87, 173-179.
- Sader, H.S., Biedenbach, D. and J.R.N., 1995. Evaluation of Vitek and API 20S for species identification of Enterococci. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 22, 315-319.
- Sağdıç, O ve Arıcı, M., 2010. Gıda Fermantasyonunda Kullanılan Mikroorganizmalar. *Gıda Mikrobiyolojisi*. Editör: Osman Erkmen. Ankara: Efil Yayınevi.
- Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlassi, M. and Pappa, A., 1998. Stability and safety of traditional Greek salami- A Microbiological Ecology Study. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 69-82.
- Sanchez-Valenzuela, A.S., Ben Omar, N., Abriouel, H., Lopez, R.L., Veigovic, K., Canamero, M.M., Topisinovic, M.K.L. and Galvez, A., 2009. Virulence factors, antibiotic resistance and bacteriocin in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control*, 20, 381-385.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G. and Tsakalidou, E., 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*, 11, 621-647.
- Semedo, T., Santos, M.A., Lopes, M.F.S., Figueiredo Marques, J.J., Crespo, M.T.B. and Tenreiro, R., 2003. Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: a common trait in the genus?. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 13-22.
- Schillinger, U. and Lücke, F.-K., 1987. Lactic Acid Bacteria on vakuüm-packaged meat and their influence of shelf life, *Fleischwirtsch* 67, 1244-1248.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat, *Applied Environmental Microbiology*, 55, 1901-1906.
- Sınmaz, E., 2013. Pastırmada Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve İdentifikasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Sırıken, B., Özdemir, M., Yavuz, H. and Pamuk, Ş., 2006. The microbiological quality and residual nitrate/nitrite levels in Turkish sausage (Soudjouck) produced in Afyon province, Turkey. *Food Control*, 17, 923-928.

- Sinton, L.N., Donnison, A.M. and Hastie, C.M., 1993. Faecal streptococci as faecal pollution indicators: A review. Part I: Taxonomy and enumeration. New Zealand Journal of Marine and Fresh Water Research, 27, 101-105.
- Sparo, M., Nunez, G.G., Castro, M., Calcagno, M.L., Garcia Allende, M.A., Ceci, M., Najle, R. and Marghi, M., 2008. Characteristics of an environmental strain, *Enterococcus faecalis* CECT 7121 and it's effects as additive on craft dry-fermented sausages. Food Microbiology, 25, 607-615.
- Sustackova, A., Mapraunikova, E. and Schlegelova, J., 2004. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. Isolates from raw beef and meat products. Folia Microbiol., 49(4), 411-417.
- Tekinşen, O.C. ve Doğruer, Y., 2000. Her Yönü ile Pastırma. Selçuk Üniversitesi Basımevi, 125s, Konya.
- Toğay, Ö.S. ve Temiz, A. 2011. Gıda kaynaklı Enterokokların gıda ve insan sağlığı yönünden önemi, Gıda, 36(5), 303-310.
- TSE 2002. Pastırma. Türk Standardı, TS 1071, ICS 67.120.10., Ankara.
- Työppönen, S., Petaja, E. and Mattila-Sandholm, T., 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. International Journal of Food Microbiology, 83, 233-244.
- Uğuz, Ş., Soyer, A. and Dalmış, Ü., 2010. Effects of different salt contents on some quality characteristics during processing of dry-cured Turkish Pastırma. Journal of Food Quality, 1745-4557.
- Van Horn , K., Toth, C., Kariyama, R., Mitsuhata, R. and Kuman, H., 2002. Evaluation of 15 motility medra and a direct microscopic method for detection of motility in Enterococci. Journal of Clinical Microbiology, 40(7), 2476-2479.
- Yetim, H., Sağdıç, O., Doğan, M. and Ockerman, H.W., 2006. Sensivity of three pathogenic bacteria to Turkish cemen paste and its ingredients. Meat Sci.74, 354-358.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında İstanbul'da doğdu. İlköğrenimini Kahramanmaraş'ta, orta ve lise öğrenimini Denizli'de tamamladı. 2000 yılında başlamış olduğu Mersin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden, 2004 yılında Fakülte Birincisi olarak mezun oldu. 2005 yılında Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı ve 2007 yılında bitirdi. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine başladı. 2009 yılından bu yana Tunceli Üniversitesinde Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır.