

ÇİĞ SÜTTEN İZOLE EDİLEN ENTEROSİN B ÜRETİCİSİ *ENTEROCOCCUS FAECALIS* MYE58 SUŞUNUN GÜVENLİK DEĞERLENDİRMESİ

Merve Tuncer, Banu Özden Tuncer, Yasin Tuncer*

Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta

Geliş tarihi / Received: 21.03.2014

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 17.06.2014

Kabul tarihi / Accepted: 19.06.2014

Özet

Bu çalışmada, çiğ süttten izole edilen bakteriyosin üreticisi *Enterococcus faecalis* MYE58'de enterosin, virülens faktör ve vankomisin direnç genlerinin varlığını araştırdık. Ayrıca, bu suşun hemolitik aktivite, jelatinaz üretimi ve antibiyotik dirençlilik özelliklerini de test ettik. MYE58 suşunun *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus* gibi Gram pozitif bakterileri inhibe ettiği belirlenmiştir. MYE58 suşunda enterosin B yapısal geninin (*entB*) varlığı tespit edilmiştir. MYE58 suşu hemoliz ve jelatinaz aktivitesi göstermemiştir. MYE58 suşunda *gelE* ve *espfs* genlerinin varlığı tespit edilmiş fakat *agg*, *ace*, *efaAfs*, *ccf*, *cob*, *cpd*, *cat*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *vanA* ve *vanB* genlerinin varlığı tespit edilmemiştir. MYE58 suşu streptomisin ve tetrasikline dirençli bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, enterosin B üreticisi *E. faecalis* MYE58 suşunun starter kültür olarak kullanılmasının tüketici sağlığı açısından risk teşkil edebileceğini göstermiştir. Ancak, MYE58 suşu tarafından üretilen enterosin B'nin saflaştırılmış veya kısmi saflaştırılmış preparatlarının *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı gıda muhafazasında kullanılabilme potansiyeli vardır.

Anahtar kelimeler: *Enterococcus faecalis*, enterosin B, antibiyotik dirençlilik, virülens faktör, çiğ süt

SAFETY EVALUATION OF ENTEROCIN B PRODUCER *ENTEROCOCCUS FAECALIS* MYE58 STRAIN ISOLATED FROM RAW MILK

Abstract

In this study, we investigated the occurrence of enterocin, virulence factor and vancomycin resistance genes in bacteriocin producer *Enterococcus faecalis* MYE58 isolated from raw milk. We also tested hemolytic activity, gelatinase production and antibiotic resistance of this strain. It was determined that MYE58 strain inhibited Gram-positive bacteria, such as *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. The presence of enterocin B structural gene (*entB*) was detected in MYE58 strain. MYE58 strain did not exhibit haemolysis and gelatinase activity. In MYE58 strain, the presence of *gelE* and *espfs* genes were detected, but *agg*, *ace*, *efaAfs*, *ccf*, *cob*, *cpd*, *cat*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *vanA* and *vanB* genes were not detected. MYE58 was found resistant to streptomycin and tetracycline. The results of this study showed that enterocin B producer *E. faecalis* MYE58 strain used as starter culture could pose a risk to consumer health. However, purified or semi-purified enterocin B produced by MYE58 strain may have a potential to use for food preservation against *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, enterocin B, antibiotic resistance, virulence factor, raw milk

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ yasintuncer@sdu.edu.tr,

☎ (+90) 246 211 1713,

☎ (+90) 246 237 0437

GİRİŞ

Laktik asit bakterilerinin (LAB) bir grubu olan enterokoklar, pastörizasyon sıcaklıklarına dirençli olmalarının yanı sıra, farklı substrat ile düşük ve yüksek sıcaklık, ekstrem pH ve tuz konsantrasyonları gibi gelişme koşullarına da kolay adapte olma yetenekleri nedeniyle süt ve et gibi çiğ materyallerden üretilen hayvansal gıdalardan özellikle fermente sosisler ve peynirlerden sıklıkla izole edilmektedirler (1-4). *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus durans* çiğ süt ve süt ürünlerinde en sık rastlanılan enterokok türlerini oluşturmaktadır. Süt kökenli enterokok suşları laktik asit üretimi, proteolitik aktivite, lipolitik aktivite ve sitrat metabolizması yetenekleri ile geleneksel peynirlerin olgunlaşması sırasında tat ve aromanın oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar (5).

Son yıllarda tüketici talebinin kimyasal katkı maddesi içermeyen doğal ürünler yönünde artış göstermesi gıda endüstrisini yeni ve alternatif gıda muhafaza yöntemleri bulmaya itmektedir (6). Gıda muhafazasında kimyasal gıda koruyucularına alternatif olarak kullanılabilir doğal antimikrobiyel maddelerin başında LAB tarafından üretilen bakteriyosinler gelmektedir (7). Yapılan çalışmalar pek çok enterokok suşunun enterosin olarak isimlendirilen, gıda kaynaklı patojen veya gıdalarda bozulmaya neden olan bakterilere karşı inhibitör etki gösteren çeşitli bakteriyosinler ürettiğini göstermiştir. Bu özelliklerinden dolayı enterosin üreticisi enterokok suşlarının gıda muhafazasında kullanılabilirliği belirtilmektedir (3, 8). Enterokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler Franz ve ark. (9) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre dört ana grup altında toplanmıştır. Sınıf I, lantibiyotik enterosinleri (sitolizin); sınıf II, küçük, lantibiyotik olmayan enterosinleri; sınıf III, siklik enterosinleri (enterosin AS-48) ve sınıf IV, büyük proteinleri (enterolisin A) içermektedir. Ayrıca, sınıf II üyesi bakteriyosinler 3 alt gruba ayrılmıştır. Sınıf II.1 alt grubu, pediosin benzeri bakteriyosinleri (enterosin A), sınıf II.2 alt grubu, lider peptid olmadan sentezlenen enterosinleri (enterosin L50) ve sınıf II.3 alt grubu, ise doğrusal pediosin benzeri olmayan enterosinleri (enterosin B) içermektedir. Enterokok suşları tarafından sıklıkla üretildiği tespit edilen bakteriyosinler ise enterosin A, B, P, AS-48, L50A, L50B, 1071A, 1071B, Q ve X'dir (10).

Bazı enterokok suşları fırsatçı insan patojenidir. Bu bakteriler bakteriyemi, endokarditis ve üriner sistem enfeksiyonları gibi nozokomiyal (hastane kaynaklı) enfeksiyonlarda yaygın görülen bakteriler arasında yer alır (3). Enterokokların antibiyotik direnci bu bakterilerin patojenitesine katkıda bulunan faktörlerden biridir. Özellikle vankomisin dirençli enterokok suşları, insan enfeksiyonlarının tedavisinde en önemli problemlerden biridir. Vankomisin, çoklu antibiyotik direnç özelliği olan enterokokların tedavisinde başvurulan son çare olarak nitelendirilir (5, 11). Antibiyotik direnç özelliğinin dışında hemolizin/sitolizin (*cylM*, *cylB* ve *cylA*), agregasyon maddesi (*agg*), enterokokal yüzey proteini (*esp*), jelatinaz (*gelE*), seks feromonları (*cpd*, *cob*, *ccf* ve *cad*) ve hücre duvarı adhezini (*efaA*) gibi çeşitli virülens faktör genleri enterokoklarda tanımlanmıştır (1, 3, 12, 13).

Bu çalışmada, Isparta ilinden temin edilen çiğ süt örneklerinden bakteriyosin (enterosin) üreticisi enterokok suşlarının izolasyonu, 16S rDNA dizi analizi ile tür düzeyinde tanısı ve enterosin yapısal genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tespiti amaçlanmıştır. Ayrıca, çalışma kapsamında enterosin B üreticisi olduğu tespit edilen *Enterococcus faecalis* MYE58 suşunun antibiyotik dirençlilik, hemolitik aktivite ve jelatinaz aktivitesinin yanı sıra virülens faktör (12 adet) ve vankomisin direnç (*vanA* ve *vanB*) genlerinin varlığı da araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Enterokok suşlarının izolasyonu

Muhtemel enterokok suşlarının izolasyonu için kullanılan toplam 15 adet çiğ süt örneği Isparta ilinde bulunan yerel üreticilerden temin edilmiştir. Enterokok suşlarının izolasyonu Kanamycin Esculin Azide agar (KAA) (Merck, Almanya) besiyerinde yapılmıştır. Seçilen muhtemel enterokok izolatları de Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS, Merck) besiyeri ortamında 37 °C'de 24 saat geliştirilmiştir. İzolatlara Gram boyama ve katalaz testi uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan bakteriler % 20 oranında steril gliserol ilave edilerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Antibakteriyel aktivite

Enterokok izolatlarının antibakteriyel aktivite özellikleri van Belkum ve ark. (14) tarafından önerilen yönteme göre test edilmiştir. Antibakteriyel aktivite denemelerinde *Bacillus cereus* LMG2732, *B. cereus* ATCC10876, *Listeria monocytogenes* ATCC15813, *L. monocytogenes* ATCC19115, *L.*

innocua LMG2813, *Staphylococcus aureus* ATCC6538P, *S. aureus* ATCC29213, *Enterococcus faecalis* LMG2602, *E. faecalis* LMG2708, *E. faecalis* ATCC29212, *Lactococcus lactis* LMG2911, *Lc. lactis* LMG2910, *Lc. lactis* LMG2909, *Lc. lactis* LMG3113, *Pediococcus pentosaceus* LMG2001, *Escherichia coli* LMG3083 ve *Salmonella* Typhimurium SL1344 test bakterileri olarak kullanılmıştır.

Proteolitik enzim uygulaması

İzolatlar tarafından üretilen antibakteriyel maddenin protein doğası (bakteriyosin) proteolitik enzim uygulaması ile test edilmiştir. Denemelerde son enzim konsantrasyonu 50 mg/mL olacak şekilde hazırlanan pepsin (pH 3.0 Sigma Chem. Co., ABD), proteinaz K (pH 7.0 Amresco, Solon, Ohio, ABD), α -kemotripsin (pH 7.0 Sigma) ve tripsin (pH 7.0 Sigma) enzim solüsyonları kullanılmıştır (15).

Genomik DNA izolasyonu

Enterosin üreticisi enterokok izolatından genomik DNA izolasyonu Cancilla ve ark. (16) tarafından önerilen yöntemle yapılmıştır. Genomik DNA örneğinin elektroforezi % 0.7 agaroz oranı ile hazırlanan jelde 85 voltta 1.5 saat süreyle yapılmıştır. Elektroforez sonrası jel 0.2 μ g/mL etidyum bromit içeren çözeltide 30 dakika boyanmıştır. Boyama işleminin sonunda jel fotoğrafı UviTec DBT-08 (İngiltere) jel görüntüleme sisteminde çekilmiştir.

Enterosin üreticisi izolatın 16S rDNA dizi analizi ile tür düzeyinde tanısı

Enterosin üreticisi enterokok izolatında 16S rDNA bölgesinin PZR ile çoğaltılması toplam 50 μ L PZR karışımı kullanılarak Techne TC3000 (İngiltere)

termal döngü cihazında yapılmıştır. PZR denemesinde; 94 °C'de 2 dakika başlangıç denatürasyonu (1 döngü), 94 °C'de 30 saniye / 55 °C'de 1 dakika / 72 °C'de 1.5 dakika çoğaltma (30 döngü) ve 72 °C'de 10 dakika son uzama (1 döngü) aşamalarından oluşan protokol uygulanmıştır. Enterokok izolatının 16S rDNA bölgesinin çoğaltılmasında Edwards ve ark. (17) tarafından önerilen pA (ileri) 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' ve pE' (geri) 5'- CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3' genel bakteri primerleri kullanılmıştır. Çoğaltılan 16S rDNA PZR fragmentinin elektroforezi % 1 agaroz içeren jelde yapılmış ve fragmentin büyüklüğü O'GeneRuler™ 100-bç DNA marker (Fermentas #SM1153, Litvanya) kullanılarak hesaplanmıştır. PZR ürününün DNA dizi analizi ABI PRISM 3730XL (Perkin Elmer, ABD) otomatik gen sekans cihazı kullanılarak REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti. (ODTÜ, Teknokent, Ankara/Türkiye)'inde yaptırılmıştır. 16S rDNA dizi benzerliği National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST programı kullanılarak tespit edilmiştir.

Enterosin genlerinin aranması

E. faecalis MYE58 suşunda enterosin yapısal genlerinin PZR ile araştırılmasında kullanılan primerler, bağlanma sıcaklıkları ve ürün büyüklükleri Çizelge 1'de verilmiştir. PZR denemesinde; 94 °C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu (1 döngü), 94 °C'de 1 dakika / uygun bağlanma sıcaklığında 1 dakika / 72 °C'de 40 saniye çoğaltma (35 döngü) ve 72 °C'de 10 dakika son uzama (1 döngü) aşamalarından oluşan protokol uygulanmıştır. Denemelerde *E. faecium*

Çizelge 1. Enterosin genlerinin tespitinde kullanılan PZR primerleri, bağlanma sıcaklıkları ve ürün büyüklükleri
Table 1. PCR primers, annealing temperatures and product sizes for detection of enterocin genes

Gen Gene	Primer sekansları (5' - 3') Primer sequences (5' - 3')	Bağlanma sıcaklığı (°C) Annealing temperature (°C)	Ürün büyüklüğü (bç) Product size (bp)
<i>entA</i>	f: AAATATTATGGAATGGAGTGTAT r: GCACTTCCTGGAATTGCTC	56	126
<i>entB</i>	f: GAAAATGATCACAGAATGCCTA r: GTTGCAATTTAGAGTATACATTTG	50	162
<i>entP</i>	f: TATGGTAATGGTGTATTGTAAT r: ATGTCCCATACCTGCCAAAC	50	120
<i>entL50A/B</i>	f: TGGGAGCAATCGCAAATTAG r: ATTGCCCATCCTTCTCCAAT	52	98
<i>bac31</i>	f: TATTACGGAAATGGTTTATATTGT r: TCTAGGAGCCCAAGGGCC	50	123
<i>entAS48</i>	f: GAGGAGTTTCATGATTTAAAGA r: CATATTGTTAAATTACCAAGCAA	50	340
<i>entQ</i>	f: TGAATTTTCTTCTTAAAAATGGTATCGCA r: TTAACAAGAAATTTTTCCCATGGCAA	56	105
<i>ent1071A/B</i>	f: CCTATTGGGGGAGAGTCGGT r: ATACATTCTCCACTTATTTTT	51	343

EYT39 (enterosin A ve B üreticisi) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. PZR ürünlerinin elektroforezi % 1.5 agaroz içeren jelde yapılmıştır (3).

Hemolitik aktivite

E. faecalis MYE58 suşunun hemolitik aktivite özelliği % 5 koyun kanı ilave edilmiş Columbia agar (Laboratorios Conda, İspanya) besiyeri ortamında test edilmiştir (1). Denemede α hemolitik *E. faecium* EYT21 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (2).

Jelatinaz aktivitesi

E. faecalis MYE58 suşunun jelatinaz aktivitesi % 3 jelatin ilave edilmiş olan Todd-Hewitt agar (Liofilchem, İtalya) ortamında test edilmiştir (12). Denemelerde jelatinaz aktivitesine sahip olan *E. faecalis* NYE16 pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (13).

Virülens genlerin aranması

E. faecalis MYE58 suşunda 12 adet virülens faktör geninin varlığı araştırılmıştır. Virülens genlerin tespitinde kullanılan PZR primerleri ve ürün büyüklükleri Çizelge 2'de verilmiştir. PZR denemesinde; 95 °C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu (1 döngü), 95 °C'de 30 saniye / 54 °C (agg geni için 56 °C)'de 30 saniye / 72 °C'de 1 dakika çoğaltma (35 döngü) ve 72 °C'de 10 dakika son uzama (1 döngü) aşamalarından oluşan protokol uygulanmıştır (18). PZR ürünlerinin elektroforezi % 1.5 agaroz içeren jelde yapılmıştır. Denemelerde *E. faecalis* ATCC29212 (agg, cpd, cop, ccf, cad, efaAfs, gelE, cylM, cylA ve espfs) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Antibiyotik dirençliliğin belirlenmesi

Enterosin B üreticisi *E. faecalis* MYE58 suşunda antibiyotik dirençlilik disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Denemelerde Oxoid Ltd. (İngiltere)'den temin edilen ampicilin (10 µg), kloramfenikol (30 µg), eritromisin (15 µg), gentamisin (120 µg), norfloksasin (10 µg), penisilin G (10 U), streptomisin (300 µg), tetrasiklin (30 µg), sülfametoksazol/trimetoprim (1.25 + 23.75 µg) ve vankomisin (30 µg) içeren antibiyotik diskleri kullanılmıştır. MYE58 suşunun antibiyotik duyarlılık düzeyi Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI M100-S21) (19) kılavuzuna göre değerlendirilmiştir. Denemelerde *E. faecalis* ATCC29212 referans bakteri olarak kullanılmıştır.

vanA ve vanB genlerinin aranması

E. faecalis MYE58 suşunda vankomisin direnç genlerinin (vanA ve vanB) aranmasında Dutka-

Çizelge 2. Virülens genlerin tespitinde kullanılan PZR primerleri ve ürün büyüklükleri

Table 2. PCR primers and product sizes for detection of virulence genes

Gen	Primer sekansları (5' - 3')	Ürün büyüklüğü (bp)
Gene	Primer sequences (5' - 3')	Product size (bp)
gelE	ACCCCGTATCATTGGTTT ACGCATTGCTTTTCCATC	419
efaAfs	GACAGACCCTCACGAATA AGTTCATCATGCTGTAGTA	705
cpd	TGGTGGGTTATTTTTCAATTC TACGGCTCTGGCTTACTA	782
cob	AACATTTCAGCAACAAGC TTGTCATAAAGAGTGGTCAT	1405
ccf	GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG AGCCGCTAAAATCGGTAATAAT	543
cad	TGCTTTGTCATTGACAATCCG ACTTTTTCCCAACCCCTCAA	1299
ace	AAAGTAGAATTAGATCCACAC TCTATCACATTGGTTGCG	350
espfs	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	933
agg	AAGAAAAGAAGTAGACCAAC AAACGGCAAGACAAGTAAATA	1553
cylM	CTGATGGAAAGAAGATAGTAT TGAGTTGGTCTGATTACATTT	742
cylB	ATTCTACCTATGTTCTGTTA AATAAACTCTTTTTCCAAC	843
cylA	TGGATGATAGTATAGGAAGT TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	517

Malen ve ark. (20) tarafından önerilen primer setleri kullanılmıştır. PZR denemesinde; 94 °C'de 2 dakika başlangıç denatürasyonu (1 döngü), 94 °C'de 1 dakika / 54 °C'de 1 dakika / 72 °C'de 1 dakika çoğaltma (30 döngü) ve 72 °C'de 10 dakika son uzama (1 döngü) aşamalarından oluşan protokol uygulanmıştır. PZR ürünleri % 1.5 oranında agaroz içeren jelde analiz edilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, Isparta ilinden toplanan 15 adet çiğ süt örneğinden toplam 60 adet muhtemel enterokok suşu izole edilmiştir. Gram boyama ve katalaz testi sonucu izolatların tamamının Gram pozitif, katalaz negatif ve kok morfolojisine sahip oldukları belirlenmiştir. Antibakteriyel aktivite testleri sonucu, izolatlar arasından 2 adedinin (MYE18 ve MYE58) çeşitli test bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu 2 izolattan MYE18 kodlu izolatın sadece *Listeria innocua* LMG2813 suşuna karşı 3 mm çaplı inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir. MYE58 kodlu izolatın ise *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*'un da arasında bulunduğu, denemede kullanılan bütün Gram pozitif test bakterilerine karşı çeşitli çaplarda

inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3). Proteolitik enzim uygulaması sonucu, MYE18 izolatu tarafından üretilen antibakteriyel maddenin proteolitik enzim uygulamasından etkilenmediği buna karşın MYE58 izolatu tarafından üretilen antibakteriyel maddenin ise proteinaz K ve tripsin uygulamalarından etkilendiği belirlenmiştir. Bakteriyosinlerin tümünde antibakteriyel etkinlik ana protein yapıdan kaynaklanmaktadır. LAB tarafından üretilen bakteriyosinler proteinaz K, pepsin, tripsin ve α -kemotripsin gibi proteolitik enzimlerle muamele edilmeleri sonucu aktivitelerini ya tamamen ya da kısmen kaybetmektedirler (21). MYE58 izolatu tarafından üretilen antibakteriyel maddenin proteolitik enzim uygulaması sonucu aktivitesini kaybetmesi bu maddenin bakteriyosin olduğunun kanıtı olarak değerlendirilmiştir. Enterokok suşları tarafından üretilen bakteriyosinler genellikle *Listeria* türlerine karşı güçlü antibakteriyel etkiye sahiptirler (3, 22, 23). Bu çalışmada da MYE58 izolatu tarafından üretilen bakteriyosinin *L. innocua* LMG2813, *L. monocytogenes* ATCC15813 ve *L. monocytogenes* ATCC19115 suşlarına karşı güçlü antibakteriyel aktivite göstermesi bu bulguyu desteklemektedir. Çalışmanın ilerleyen aşamalarında bakteriyosin üreticisi MYE58 izolatu kullanılmıştır.

Bu çalışma kapsamında, çiğ süttten izole edilen bakteriyosin üreticisi MYE58 izolatının tanısında 16S rDNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır. MYE58 izolatında 16S rDNA bölgesine spesifik primerler kullanılarak çoğaltılan PZR fragmentinin moleküler büyüklüğü yaklaşık 900 bp bulunmuştur. PZR ile çoğaltılan 16S rDNA gen bölgesinin DNA dizisinin BLAST programında analiz edilmesi sonucu, *Enterococcus faecalis* genomundaki bölge ile % 99 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Spesifik enterosin primerleri kullanılarak yapılan PZR denemesi sonucu, *E. faecalis* MYE58 suşu genomunda enterosin B yapısal genine özgü 162 bp'lik bir bölgenin çoğaltıldığı tespit edilmiştir (Şekil 1). MYE58 suşunun çalışmada kullanılan diğer bakteriyosinlere ait (enterosin A, P, Q, AS-48, L50A/B, 1071A/B ve bakteriyosin 31) spesifik primerler ile bir amplifikasyon vermediği belirlenmiştir. PZR sonuçları *E. faecalis* MYE58 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin enterosin B olduğunu işaret etmektedir. Bu çalışmaya benzer olarak Pangallo ve ark. (24) tarafından yapılan çalışmada da *E. faecalis* PV3/2 suşunda sadece entB geninin varlığı tespit edilmiştir. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda ise gıda kökenli enterokok izolatları arasında özellikle *E. faecium*

Çizelge 3. MYE58 izolatının aktivite spektrumu
Table 3. Activity spectrum of MYE58 isolate

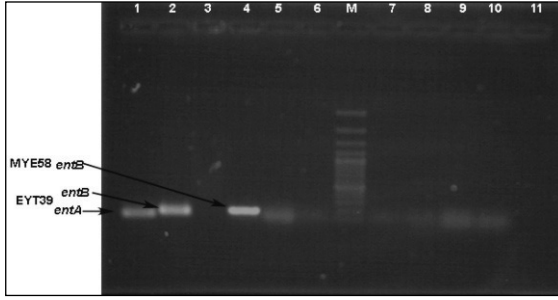
Test bakterileri Test bacteria	İnhibisyon zonu (Ø mm) Inhibition zone (Ø mm)
	MYE58
<i>B. cereus</i> LMG2732	14
<i>B. cereus</i> ATCC10876	13
<i>L. monocytogenes</i> ATCC15813	14
<i>L. monocytogenes</i> ATCC19115	17
<i>L. innocua</i> LMG2813	17
<i>S. aureus</i> ATCC6538P	14
<i>S. aureus</i> ATCC29213	12
<i>E. faecalis</i> LMG2602	12
<i>E. faecalis</i> LMG2708	16.5
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	12
<i>Lc. lactis</i> LMG2911	14
<i>Lc. lactis</i> LMG2910	13
<i>Lc. lactis</i> LMG2909	11
<i>Lc. lactis</i> LMG3113	12
<i>P. pentosaceus</i> LMG2001	14
<i>E. coli</i> LMG3083	-
<i>S. Typhimurium</i> SL1344	-

suşlarında tekli ve çoklu enterosin yapısal genlerinin varlığı gösterilmiştir (3, 23, 25).

Kanlı agar besiyerinde yapılan hemolitik aktivite testi sonucu MYE58 suşunun hemolitik aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Hemolizin/sitolizin, feromon bağımlı plazmid DNA veya kromozomal DNA üzerinde bulunan bir operon tarafından kodlanan bakteriyel bir toksindir (26). Hemolizin üretimi enterokok enfeksiyonlarının şiddetini arttırmaktadır. Enterokoklarda hemolizin/sitolizin üretiminden sorumlu genlerin varlığı risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (27). Bu nedenle gıdalarda β -hemolitik enterokok suşlarının varlığı istenmez ve bu suşların fermente gıdaların üretiminde starter kültür olarak kullanılmalrı önerilmez (28). MYE58 suşunun fenotipik olarak yapılan jelatinaz aktivitesi testi sonucu jelatini hidrolize edemediği tespit edilmiştir. Enterosin B üreticisi *E. faecalis* MYE58 suşunun hemolitik aktivite göstermemesi ve jelatini hidrolize edememesi bu suşun starter kültür olarak kullanılabilmesi için avantajdır.

Virülens faktörlerin araştırıldığı PZR uygulaması sonucu MYE58 suşunda jelatinaz (*gelE*) ve *E. faecalis* yüzey proteini (*espfs*) genlerinin varlığı tespit edilmiştir. Ancak, seks feromon (*cad*, *ccf*, *cpd* ve *cob*), kollojen adhezin (*ace*), *E. faecalis* hücre duvarı adhezini (*efaAfs*), agregasyon maddesi (*agg*) ve sitolizin (*cylM*, *cylB* ve *cylA*) genlerinin varlığı tespit edilmemiştir (Şekil 2).

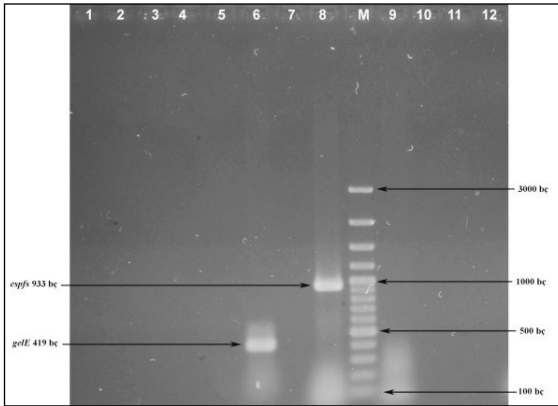
MYE58 suşunda jelatinaz geninin (*gelE*) araştırıldığı



Şekil 1. *E. faecalis* MYE58 Suşunun Genomik DNA'sında Enterosin B Gen (*entB*) Fragmentinin PZR Amplifikasyonu
1: *entA* (pozitif kontrol EYT 39); 2: *entB* (pozitif kontrol EYT39); 3: *entA*; 4: *entB*; 5: *entP*; 6: *entQ*; M: O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Fermentas); 7: AS48; 8: *bac31*; 9: *entL50A/B*; 10: *ent1071A/B*; 11: negatif kontrol

Figure 1. PCR Amplification of Enterosin B Gene (*entB*) Fragment from Genomik DNA of *E. faecalis* MYE58 Strain
1: *entA* (positive control EYT39); 2: *entB* (positive control EYT39); 3: *entA*; 4: *entB*; 5: *entP*; 6: *entQ*; M: O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Fermentas); 7: AS48; 8: *bac31*; 9: *entL50A/B*; 10: *ent1071A/B*; 11: negative control

PZR uygulamasında 419 bç'lik bir amplikon elde edilmiştir. Bu sonuç MYE58 suşunda sessiz *gelE* geninin varlığını göstermektedir. Jelatinaz üretimi gıda kökenli enterokok suşlarına nazaran fekal ve klinik izolatlarda daha sık rastlanılan bir virülens faktördür. Bunun yanı sıra, son yıllarda farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da bu



Şekil 2. *E. faecalis* MYE58 Suşunun Genomik DNA'sında Virülens Gen Fragmentlerinin PZR Amplifikasyonu
1: *ace*; 2: *agg*; 3: *cylM*; 4: *cylB*; 5: *cylA*; 6: *gelE* geninin 419 bç'lik fragmenti; 7: *efaAfs*; 8: *espfs* geninin 933 bç'lik fragmenti; M: 100-bp DNA ladder (Fermentas); 9: *cad*; 10: *ccf*; 11: *cob*; 12: *cpd*

Figure 2. PCR Amplification of Virulence Gene Fragments from Genomik DNA of *E. faecalis* MYE58 Strain
1: *ace*; 2: *agg*; 3: *cylM*; 4: *cylB*; 5: *cylA*; 6: 419 bp fragment of *gelE* gene; 7: *efaAfs*; 8: 933 bp fragment of *espfs* gene; M: 100-bp DNA ladder (Fermentas); 9: *cad*; 10: *ccf*; 11: *cob*; 12: *cpd*

çalışmada olduğu gibi gıda kökenli enterokok suşlarında sessiz *gelE* geninin varlığı sıklıkla tespit edilmiştir (1, 3, 13, 25, 28). Enterokokal yüzey proteini (Esp) üretimi hücre hidrofobitesini, abiyotik yüzeylere tutunmayı, *in vitro* koşullarda biofilm oluşumunu arttırmakta ve üriner sistem enfeksiyonlarında kolonizasyon faktörü olarak rol oynamaktadır (29). Bunlara ilaveten, Esp'nin enterokokların konakçı bağışıklık yanıtından kurtulmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Bu sebeplerden dolayı, bu özelliğe sahip olan enterokok suşlarının gıdalarda starter kültür olarak kullanımı açıkça istenmemektedir (30). Esp'yi kodlayan genlerin gıda kaynaklı enterokok izolatlarına oranla klinik enterokok izolatlarında daha yüksek sıklıkla bulunduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda gıda kaynaklı *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında da *esp* geni bulunma sıklığı farklılık göstermektedir. *E. faecium* suşlarında *esp* genine nadiren rastlanırken, *E. faecalis* suşlarında bu oran daha yüksektir (12, 30). Bu çalışmaya benzer olarak farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da gıda kökenli *E. faecalis* suşlarında enterokokal yüzey protein (*espfs*) geninin varlığı gösterilmiştir (12, 13, 31). Enterosin B üreticisi *E. faecalis* MYE58 suşunda *espfs* geninin tespit edilmesinden dolayı bu bakterinin starter kültür olarak kullanılması tüketici sağlığı açısından risk teşkil edebilir. Seks feromonları virülens faktör olarak nitelendirilmez. Ancak, enterokoklarda seks feromonlarının üretimi virülens determinantların ve antibiyotik direnç genlerinin konjugatif feromon cevap plazmidleri aracılığı ile aktarılmasını yaygınlaştırabilir (13, 25, 27). *E. faecalis* MYE58 suşunda seks feromon genlerinin bulunmaması bir avantajdır. *E. faecalis* hücre duvarı adhezin geni (*efaAfs*) potansiyel virülens faktör olarak değerlendirilmektedir. Bu sebepten dolayı *E. faecalis* MYE58 suşunda *efaAfs* geninin bulunmaması bir avantajdır. Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda ise gıda kökenli bazı *E. faecalis* suşlarında *efaAfs* geninin varlığı tespit edilmiştir (13, 31). *E. faecalis* MYE58 suşunda olduğu gibi farklı araştırmacılar tarafından izole edilen enterokok suşlarında da *ace* geni tespit edilmemiştir (12, 25, 27). Bu çalışmanın aksine farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda *E. faecalis* suşlarında *agg* geni tespit edilmiştir (12, 13). *E. faecalis* MYE58 suşunda *ace* ve *agg* genlerinin bulunmaması bir avantajdır. Sitolizin genlerinin (*cylM*, *cylB* ve *cylA*) araştırıldığı PZR uygulaması sonucu herhangi bir amplikon tespit edilmemesi hemolitik aktivite test sonuçlarını desteklemektedir. Bu

çalışmanın aksine, hemolitik aktivite göstermeyen enterokok suşlarında sessiz sitolizin genlerinin (*cylMBA*) varlığı gösterilmiştir (12).

Disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılan antibiyotik direnç testi sonucu *E. faecalis* MYE58 suşunun denemelerde kullanılan 10 adet antibiyotikten streptomisin (300 µg) ve tetrasikline (30 µg) dirençli olduğu tespit edilmiştir. MYE58 suşunun denemelerde kullanılan diğer antibiyotiklere karşı ise duyarlı olduğu belirlenmiştir. PZR uygulaması sonucu MYE58 suşunda vankomisin direnç genleri *vanA* ve *vanB*'nin varlığı tespit edilmemiştir. Antibiyotik dirençli enterokok suşları et ürünleri, süt ürünleri ve tüketime hazır gıdalarda oldukça yaygındır. Bu sebepten dolayı gıdalardan izole edilen enterokok suşlarının klinik olarak önemli olan antibiyotiklere karşı duyarlı olmaları tüketici sağlığı açısından oldukça önemlidir (4, 6). Bu çalışmada, çiğ süttten izole edilen enterosin B üreticisi *E. faecalis* MYE58 suşunun streptomisin ve tetrasikline dirençli olması, bu suşun starter kültür olarak kullanılması için bir dezavantajdır. Diğer taraftan, MYE58 suşunun özellikle glikopeptit grubu üyesi vankomisin yanısıra denemelerde kullanılan klinik olarak önemli diğer antibiyotiklere de duyarlı olması bir avantajdır.

SONUÇ

Bu çalışmada, enterosin B üreticisi olduğu tespit edilen *E. faecalis* MYE58 suşunun *gelE* (sessiz) ve *espfs* genini taşımasının yanısıra streptomisin ve tetrasikline dirençli olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgular, MYE58 suşunun starter kültür olarak gıda üretim proseslerinde kullanılmasının tüketici sağlığı açısından risk teşkil edebileceğini göstermektedir. Diğer taraftan, *E. faecalis* MYE58 suşu tarafından üretilen enterosin B'nin *L. monocytogenes*, *B. cereus* ve *S. aureus* gibi önemli gıda patojenlerine karşı güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olması bu bakteriyosinin saflaştırılmış veya kısmi saflaştırılmış preparatlarının gıda muhafazasında kullanım potansiyeli olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Cariolato D, Andrighetto C, Lombardi A. 2008. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control*, 19, 886-892.

2. Tuncer Y. 2009. Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish tulum cheese. *Afr J Biotechnol*, 8 (24), 7008-7016.

3. Özden Tuncer B, Ay Z, Tuncer Y. 2013. Occurrence of enterocin genes, virulence factors, and antibiotic resistance 3 bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish tulum cheese. *Turk J Biol*, 37, 443-449.

4. Yogurtcu NN, Tuncer Y. 2013. Antibiotic susceptibility patterns of *Enterococcus* strains isolated from Turkish tulum cheese. *Int J Dairy Technol*, 66, 236-242.

5. Ogier JC, Seror P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int J Food Microbiol*, 126, 291-301.

6. Balciunas EM, Martinez FAC, Todorov SD, Berna Franco BDGM, Converti A, Oliveira RPS. 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, 32, 134-142.

7. Tuncer Y, Özden B. 2010. Partial biochemical characterization of nisin-like bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YBD11 isolated from Boza, a traditional fermented Turkish beverage. *Rom Biotechnol Lett*, 15 (1), 4940-4948.

8. Khan H, Flint S, Yu PL. 2010. Enterocins in food preservation. *Int J Food Microbiol*, 141, 1-10.

9. Franz CMAP, van Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H, Gálvez A. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev*, 31, 293-310.

10. Edalatian MR, Najafi MBH, Mortazavi SA, Alegr A, Delgado S, Bassami MZ, Mayo B. 2012. Production of bacteriocins by *Enterococcus* spp. isolated from traditional, Iranian, raw milk cheeses, and detection of their encoding genes. *Eur Food Res Technol*, 234, 789-796.

11. Morandi S, Brasca M, Andrighetto C, Lombardi A, Lodi R. 2006. Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from North-West Italian dairy products. *Int Dairy J*, 16, 867-875.

12. Eaton TJ, Gasson MJ. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol*, 67, 1628-1635.

13. Inoğlu ZN, Tuncer Y. 2013. Safety assessment of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from Turkish tulum cheese. *Journal of Food Safety*, 33, 369-377.
14. Van Belkum MJ, Hayema BJ, Geis A, Kok J, Venema G. 1989. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl Environ Microbiol*, 55, 1187-1191
15. Ryan MP, Rea MC, Hill C, Ross RP. 1996. An application in Cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad spectrum bacteriocin lacticin 3147. *Appl Environ Microbiol*, 62, 612-619.
16. Cancilla MR, Powell IB, Hillier AJ, Davidson BE. 1992. Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with ³²P and fluorescent labels. *Appl Environ Microbiol*, 58, 1772-1775.
17. Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Böttger EC. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 17, 7843-7853.
18. Reviriego C, Eaton T, Mart n R, Jiménez E, Fernández L, Gasson MJ, Rodríguez JM. 2005. Screening of virulence determinants of *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*, 21, 131-137.
19. CLSI M100-S21. 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 21th Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
20. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 24-27.
21. De Vuyst L, Vandamme EJ (ed). 1994. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications*. Chapman and Hall, New York, USA, 539 p.
22. Brandão A, Almeida T, Muñoz-Atienza E, Torres C, Igrejas G, Hernández PE, Cintas LM, Poeta P, Herranz C. 2010. Antimicrobial activity and occurrence of bacteriocin structural genes in *Enterococcus* spp. of human and animal origin isolated in Portugal. *Arch Microbiol*, 192, 927-936.
23. Favaro L, Basaglia M, Casella S, Hue I, Dousset X, de Melo Franco BDG, Todorov SD. 2014. Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food Microbiol*, 38, 228-239.
24. Pangallo D, Harichova J, Karellova E, Drahovská H, Chovanová K, Ferianc P, Turna J, Timko J. 2004. Molecular investigation of enterococci isolated from different environmental sources. *Biologia, Bratislava*, 56 (6), 829-837.
25. Ben Belgacem Z, Abriouel H, Ben Omar N, Lucas R, Mart nez-Canamero M, Gálvez A, Manai M. 2010. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, 21, 462-470.
26. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner C. 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*, 22, 822-830.
27. Valenzuela AS, Ben Omar N, Abriouel H, López RL, Veljovic K, Cañamero MM, Topisirovic MKL, Gálvez A. 2008. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food Chem Toxicol*, 46, 2648-2652.
28. Gomes BC, Esteves CT, Palazzo ICV, Darini AL, Felis GE, Sechi LA, Franco BD, De Martinis EC. 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol*, 25, 668-675.
29. Upadhyaya PMG, Ravikumar KL, Umaphathy BL. 2009. Review of virulence factors of *Enterococcus*: an emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27, 301-305.
30. Franz CMAP, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel WH. 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol*, 67, 4385-4389.
31. Özmen Toğay S, Çelebi Keskin A, Açık L, Temiz A. 2010. Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. *J Appl Microbiol*, 109, 1084-1092.