

# Lizozim ve Nisinin Gıda Kaynaklı *Staphylococcus aureus* Suşlarında Gelişim ve Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkileri

Mert SUDAĞIDAN<sup>1</sup>, Ali AYDIN<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 15030, Burdur  
<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, 34320 Avcılar, İstanbul

\*Sorumlu Yazar: Ali AYDIN İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı,  
34320 Avcılar, İstanbul  
e-posta: aliyaydin@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 27.07.2012

## ÖZET

*Staphylococcus aureus* gıdalarda gelişebilen ve ürettiği toksinlerle gıda zehirlenmesine yol açan en önemli patojen bakterilerdendir. Bu çalışmada, besin maddelerinde sıklıkla biyokoruyucu olarak kullanılan lizozim ve nisinin, değişik gıdalardan izole edilen 14 adet *S. aureus* suşunun gelişme ve biyofilm oluşturması üzerindeki etkileri kantitatif mikroploka yöntemi ile araştırılmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda 1, 2, 3, 4 ve 5 mg/ml konsantrasyonlardaki lizozimin, bakteri gelişmesini engelleme yönünde hiçbir etkisinin olmadığı ve tüm suşların lizozime karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir. Diğer yandan, 12,5 µg/ml konsantrasyonda nisinin bazı suşlarda % 100 inhibisyon gösterdiği saptanmış, sadece bir suшта ise (*S. aureus* SE-22C) 37,5 µg/ml konsantrasyonda uzun inkübasyon sonrasında gelişme görülmüştür. Biyofilm testleri sonucunda, lizozimin artan konsantrasyonlarının dört suшта biyofilm yapımını aktive ettiği, bir suшта ise lizozim içermeyen besiyerine göre önce azalttığı, artan lizozim konsantrasyonlarında ise biyofilm oluşumunu arttırdığı tespit edilmiştir. Diğer yandan lizozimin artan konsantrasyonlarının iki suшта biyofilm oluşumunu azalttığı görülmüştür. Nisinin artan konsantrasyonlarının dört suшта bakterilerin biyofilm oluşumunu azalttığı, diğer suşlarda ise bir değişikliğe yol açmadığı bulunmuştur. Çalışmamız neticesinde lizozimin *S. aureus* suşlarına karşı etkisiz bir biyokoruyucu olduğu, fakat biyofilm yapımını aktive edebildiği; buna karşın nisinin yüksek konsantrasyonlarda bakteri gelişmesi üzerine inhibisyon etkisinin olduğu, ancak nisine dirençli *S. aureus* suşlarının bulunabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Staphylococcus aureus*, lizozim, nisin, biyofilm, gıda

## ABSTRACT

### EFFECTS OF LYSOZYME AND NISIN ON GROWTH AND BIOFILM FORMATION OF FOODBORNE STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS

*Staphylococcus aureus* is one of the most important pathogenic bacteria in food producing toxins and causing food poisoning. In this study, the effects of biopreservatives lysozyme and nisin on growth and biofilm formation of *S. aureus* strains (n=14) isolated from different foods were examined by quantitative microplate method. On the basis of obtained data, 1, 2, 3, 4, and 5 mg/ml of lysozyme concentrations did not inhibit the growth of strains and all strains were determined as resistant to lysozyme. On the other hand, nisin at 12,5 mg/ml concentration showed 100% inhibition on most of the strains, except *S. aureus* SE-22C strain at 37,5 mg nisin/ml concentration, the growth of strain was obtained after a long incubation time. As a result of biofilm tests, in four strains increasing concentrations of lysozyme were found to activate biofilm formation. In SE-22C strain, with compared to medium without lysozyme, firstly biofilm formation was decreased then with increasing lysozyme concentrations the increased biofilm formation

was obtained. In addition, in two strains biofilm formation was decreased with increased lysozyme concentrations. Nisin reduced biofilm formation of four strains with increasing concentrations, but there was no effect of nisin on biofilm formation of the other strains. As a result of this study, lysozyme was determined as an ineffective biopreservative against *S. aureus* strains, but it can activate biofilm formation of the strains. Conversely, high concentrations of nisin had an inhibitory effect on bacterial growth, whereas the presence of nisin resistant *S. aureus* strains could exist.

**Key Words:** *Staphylococcus aureus*, lysozyme, nisin, biofilm, food

### Giriş

Bakteriyosinler, bakteri ribozomları tarafından sentezlenen ve antagonistik etkili protein yapıda bileşiklerdir ve genellikle yakın ilişkili bakterilere karşı bakteriyostatik ve bakterisidal etki göstermektedir. Bu polipeptitler, gıda bozulması ve gıda kökenli hastalık etmeni bakterilerin gelişimini engellemekte ve bu özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde büyük önem taşımaktadır (Akkoç ve ark., 2009). Ayrıca, günümüzde gıda sanayinde özellikle doğal kaynaklı antimikrobiyal komponentlerin kullanıldığı biyo-koruma metotlarına olan ilginin gün geçtikçe artması bakteriyosin (nisin) ve doğal enzimlerin (lizozim) gıdalarda kullanım potansiyelini arttırmaktadır (Davidson ve Harrison, 2002).

Lizozim, Alexander Fleming tarafından 1922 yılında keşfedilmiş ve yumurta akı albümininden tespiti yapılmış antimikrobiyal maddedir. Dünya Sağlık Örgütü ve Gıda ve Tarım Organizasyonu 1993 yılında, lizozimin toksik olmadığını bildirmiş ve Almanya, Fransa, İtalya, Japonya, Avustralya ve İngiltere gibi birçok ülke lizozimin gıdalarda kullanımına izin vermiştir. Bunun yanında lizozim, Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'nde nisin gibi 'GRAS'[Generally Recognised as Safe; (Genel Olarak Güvenli Kabul Edilebilir)] statüsünde yer almaktadır (Üstümkol, 2006).

Lizozim ticari olarak kullanım alanına sahip olan tek antimikrobiyal enzim olarak bilinmektedir. Özellikle Gram-pozitif bakterilerde, hücre zarının en önemli yapısı olan peptidoglikan tabakadaki  $\beta$ -1,4-glukozidik bağları hidrolize etmesi suretiyle, hücre zarının yapısal bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır (Gill ve Holley, 2000).

Nisin, lantibiyotik sınıfının üyesi olup, laktik asit bakterileri tarafından üretilmektedir. İlk olarak, 1928 yılında Rogers birkaç *Streptococcus* türünün diğer laktik asit bakterilerini inhibe eden doğal metabolitler ürettiğini keşfetmiştir (Parente ve Riciardi, 1999). Daha sonra, bu metabolit 1947 yılında ilk kez nisin olarak isimlendirilmiş ve 1953 yılında ticari olarak İngiltere'de satışa sunulmuştur (Akkoç ve ark., 2009). Günümüzde, Amerika ve Avrupa dahil olmak üzere yaklaşık 50 ülkede kullanımına izin verilmektedir (Koponen, 2004). Bunun yanında nisin, 1969 yılında Birleşmiş Milletler Gıda ve İlaç Dairesi tarafından, 'GRAS' statüsünde kabul edilmiştir. Günümüzde, Dünya Sağlık Örgütü tarafından gıda katkı maddesi olarak onaylanmış tek bakteriyosin olarak bilinmektedir. Nisin, 1983 yılında Avrupa gıda katkı maddeleri listesinde E234 olarak numaralandırılmış ve 1988 yılında ise Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (USFDA) tarafından peynir üretiminde kullanımına izin verilmiştir (Cotter ve ark., 2005).

Nisin, büyük ölçüde Gram pozitif bakteriler ile *Clostridium* ve *Bacillus* türlerinin sporlarına karşı bakterisidal etkili, Gram negatif bakteriler ile maya ve küflere karşı etkisizdir (Chen ve Hoover, 2003). Bakterisidal etkisini, hücre membranında değişiklik meydana getirerek, sitoplazmik komponentlerden düşük moleküler ağırlığında olanların dışarıya çıkmasına ve proton hareketinde değişime yol açmak suretiyle göstermektedir (Gill ve Holley, 2000).

Nisin, çeşitli peynir ve süt ürünlerinde, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* ve *Listeria monocytogenes* gibi Gram-pozitif patojen bakterilerin inhibisyonu amacıyla kullanılmaktadır (Pinto ve ark., 2011; Ross ve ark., 2002; Samelis ve ark., 2003). Bunun yanısıra, lizozim Avrupa'da peynir üreticileri

tarafından özellikle “edam” ve “gouda” peynirlerinde gaz oluşumuna neden olan *Clostridium tyrobutyricum*'a karşı sıklıkla kullanılmaktadır (Davidson ve ark., 2002). Ayrıca, potansiyel lizozim uygulamaları et, şarap ve yem endüstrisinde yerini almaktadır (Naidu, 2000).

*S. aureus* insanlarda ve hayvanlarda çok sayıda enfeksiyona neden olabilen, ortam şartlarına oldukça dayanıklı ve çevresel kaynaklarda yaygın olarak bulunan bir mikroorganizmadır. *S. aureus*'m gıdalarda ve gıda işletmelerinde, gıda üretiminde yer alan personel ile hastane personeli ve hastane ortamlarında da yaygın biçimde bulunması, halk sağlığı açısından oldukça önemli bir konudur. Biyofilm oluşturabilme, antibiyotikler ve dezenfektanlara karşı direnç geliştirme gibi virülans özellikleri, *S. aureus*'m öncelikli patojenler arasında yer almasına neden olmaktadır. Gıda işleme ve hazırlama tesislerinde, gıda ambalajlarında kullanılan malzeme yüzeyleri, birçok bakteriler ile birlikte *S. aureus*'ların tutunması ve biyofilm üretebilen suşların kolonize olmaları için çok elverişlidir. Biyofilm tabakası, bakterileri antimikrobiyal ajanlara karşı koruyan kalın bir kalkan görevine sahip olup biyofilm oluşturan bakteriler aynı zamanda antimikrobiyal maddelerin parçalanmasına da neden olan enzimleri üreterek bu maddeleri etkisiz hale getirebilmektedir. Stafilokokların biyofilm yapımında *icaADBC* gen lokusu tarafından kodlanan polisakkarit adhesin (PIA) en önemli rolü üstlenmektedir (Donlan, 2001; Møretrø ve ark., 2003).

Birçok çalışmada nisin ve lizozime karşı dirençli *S. aureus* suşları bildirilmiştir (Blake ve ark., 2011; Herbert ve ark., 2007; Sudağidan ve Yemenicioğlu, 2012). Son çalışmalarda, *S. aureus* suşlarının nisine karşı dirençliliğinin, nisin hidrofobisiteyi azaltması ve katyonik peptitlerle temas ile pozitif değişimi artırması biçiminde olduğu (Martinez ve ark., 2008), lizozim direncinin ise O-asilasyon ve integral membran proteinlerinden OatA (Bera ve ark., 2005) ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte gıda kaynaklı *S. aureus* suşlarında nisin ve lizozime karşı dirençliliğin araştırıldığı

sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Sudağidan ve Yemenicioğlu, 2012).

Bu çalışma, gıda kaynaklı *S. aureus* suşlarında gelişim ve biyofilm oluşumu üzerine, biyokoruyucu olarak gıdalarda kullanılan nisin ve lizozimin etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Kullanılan bakteri suşları

Çalışma kapsamında incelenen *S. aureus* suşları daha önceki çalışmamızda izole edilmiş ve moleküler yöntemler ile karakterizasyonu yapılmıştır (Aydın ve ark., 2011). Bu çalışmada et [sığır eti (SE-21A, SE-22C), hindi eti (HE-25A)], et ürünü [sosis (EU-6A, EU-7B)], unlu mamüller [pasta (P-22, P-33A, P-40A), yufka (YF-1B SARI, YF-62A, YF-62B, YF-75B)], ve hazır yemeklerden (YE-15A, YE-15B) izole edilen toplam 14 adet *S. aureus* suşu üzerinde, gıdalarda sıklıkla kullanılan biyokoruyucu maddeler olan lizozim ve nisin değişik konsantrasyonlardaki etkileri kantitatif olarak araştırılmıştır.

### Biyokoruyucu maddeler

Çalışmamızda test edilen biyokoruyucu maddelerden lizozim ( $\geq 40,000$  units/mg protein; Sigma L6876) tavuk yumurta akından saflaştırılmıştır (Sigma, Saint Louis, Amerika Birleşik Devletleri). Nisin ise *Lactococcus lactis*'ten izole edilmiş ve %2,5 oranında protein içeren saflaştırılmış halde satın alınmıştır (Sigma N5764).

### Bakteri gelişim testi

Biyokoruyucu maddelerin *S. aureus* suşlarının gelişimi üzerine etkileri, Sudağidan ve Yemenicioğlu (2012) tarafından bildirilen uygulama doğrultusunda incelenmiştir. Bakteriler Tryptic Soy Agar (TSA; Merck, Darmstadt, Almanya) üzerinde 37°C'de bir gece üretilerek, yoğunlukları 10 ml %0,9 NaCl içerisinde densitometre (Den-1, HVD Life Sciences, Viyana, Avusturya) yardımıyla McFarland 0,5'e ayarlanmıştır. Test edilecek biyokoruyucu maddeler lizozim (1, 2, 3, 4 ve 5 mg/ml) ve nisin (0,5; 2,5; 12,5; 25 ve 37,5 µg/ml) Tryptic Soy Broth (pH 6,5) içerisinde

aseptik koşullarda çözündürülmüştür. Hazırlanan biyokoruyucu maddelerden 180 µl alınarak, 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropalakalara [Corning Costar, (3599), New York, Amerika Birleşik Devletleri] her örnekten üç kuyucuğa olacak biçimde dağıtılmış ve her bir *S. aureus* suşundan hazırlanmış süspansiyondan 20 µl kuyucuklara ilave edilmiştir. Mikropalakalarda bakteri gelişiminin saptanması amacıyla, 37 °C'de inkübasyon yapabilme özelliğinde ve her 15 dakika süreyle 600 nm'de absorban değerlerini ölçebilen mikropalaka okuyucu (Varioskan® Flash, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlandiya) kullanılmıştır. Ölçme sonrasında, her bir bakteri ve biyokoruyucu için elde edilen absorban değerlerinin ortalaması ve standart sapmaları hesaplanarak, gelişme eğrileri elde edilmiştir (Şekil 1-2). Ayrıca, gelişme eğrilerinin linear kısmından özgül büyüme oram ve x-eksenini kestiği noktadan lag gecikme süreleri tespit edilmiş ve bu değerler biyokoruyucu içermeyen bakteri kültürleri ile oranlanarak yüzde inhibisyon değerleri hesaplanmıştır (%inhibisyon=100-[(S1/S2)×100] S1:biyokoruyucu içeren kültürün doğrusal eğimi, S2: kontrol kültürün doğrusal eğimi).

#### Biyofilm testi

Bakteri gelişim testi ardından mikropalakaların içerdiği kültürler dökülmek suretiyle, 5 kez 200 µl steril tamponlu fosfat solüsyonu (PBS, pH 7,0) ile yıkanarak yüzeylere tutunmayan bakteriler uzaklaştırılmıştır. Yüzeylere tutunan *S. aureus* suşları 200 µl metanol ile 15 dakika fikse edilerek metanol boşaltılmış ve mikropalakalar 55°C'de 1 saat kurumaya bırakılmıştır. Süre sonunda, mikropalakalar 200 µl kristal viyole çözeltisi ile 5 dakika boyanmış ve fazla boya çeşme altında mikropalakanın yıkanması ile uzaklaştırılmıştır. İşlemi takiben, tekrar mikropalakaların 55°C'de 1 saatlik kurutulmasının ardından kuyucuklardaki biyofilm yapan bakteriler tarafından tutulan boyaya 200 µl %33 asetik asit çözeltisi eklenerek ve 5 dakika 500 rpm hızda karıştırılarak çözündürülmüştür. Son olarak, mikropalakadaki boyanın absorban değerleri

590 nm'de mikropalaka okuyucu (Varioskan®) kullanılarak belirlenmiştir.

#### Bulgular

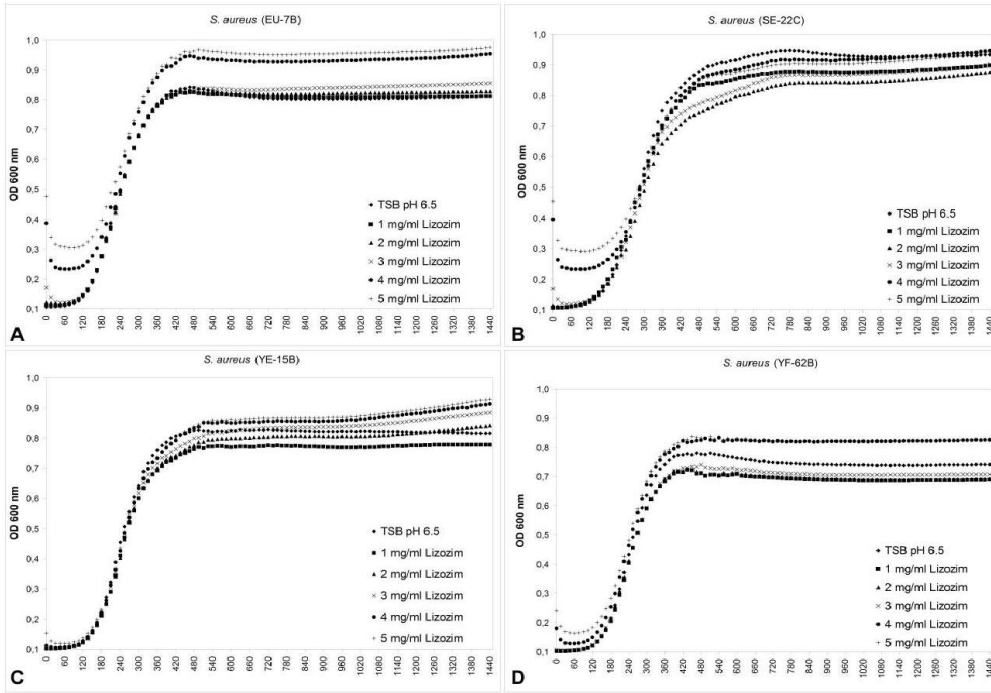
Çalışmamızda incelenen 14 adet *S. aureus* suşunda lizozime karşı duyarlı suş bulunamamış, test edilen 1-5 mg/ml konsantrasyonlarda lizozimin, bakteri gelişimi üzerine inhibisyon etkisinin olmadığı saptanmıştır (Şekil 1A-D). Lizozim kullanılan testlerde, suşların büyüme eğrilerindeki lag gecikme sürelerinde biyokoruyucu içermeyen kontrol suşu ile değişik konsantrasyonlarda lizozim içeren besi ortamındaki suşlar arasında farklılık gözlenmemiştir.

Tablo 1'de değişik konsantrasyonlardaki nisinin inhibisyon ve gelişme eğrilerindeki lag fazındaki gecikme süreleri gösterilmiştir. Bu bağlamda, nisinin yüksek konsantrasyonlarında ( $\geq 12,5$  µg nisin/ml) *S. aureus* suşları üzerinde inhibisyon etkisi görülmüş ve nisine en dirençli bakteri olarak sığır etinden izole edilen *S. aureus* SE-22C suşu bulunmuştur (Tablo 1). Söz konusu suş, 37,5 µg nisin/ml konsantrasyonda uzun bir lag fazından sonra gelişim göstermiştir (Şekil 2A-D).

Biyokoruyucu maddelerin bakterilerin biyofilm oluşturmaları üzerine etkileri incelendiğinde ise, lizozimin artan konsantrasyonlarının 4 adet *S. aureus* suşunda (EU-7B, HE-25A, SE-21A, YE-15A) biyofilm oluşumunu arttırdığı (OD = 590 nm, >0,5) tespit edilmiştir. Bunun yanında lizozimin, SE-22C suşunda lizozim içermeyen besiyerine göre önce biyofilm oluşumunu azalttığı daha sonra artan konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu arttırdığı ortaya konmuştur (Şekil 3). Diğer taraftan, lizozimin 2 adet *S. aureus* suşunda (YF-62A ve YF-62B) biyofilm oluşumunu azalttığı, 7 adet suşta ise (OD = 590 nm, <0,5) biyofilm yapımında önemli bir değişikliğe neden olmadığı bulunmuştur. Nisinin biyofilm oluşumu üzerine etkileri incelendiğinde; 10 adet biyofilm oluşturmayan suşta (OD = 590 nm, <0,5) herhangi bir etki gözlenmemiş, 4 adet suşta (SE-22C, YE-15A, YF-62A, YF-62B) ise artan nisin konsantrasyonlarının biyofilm oluşumunu azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4).

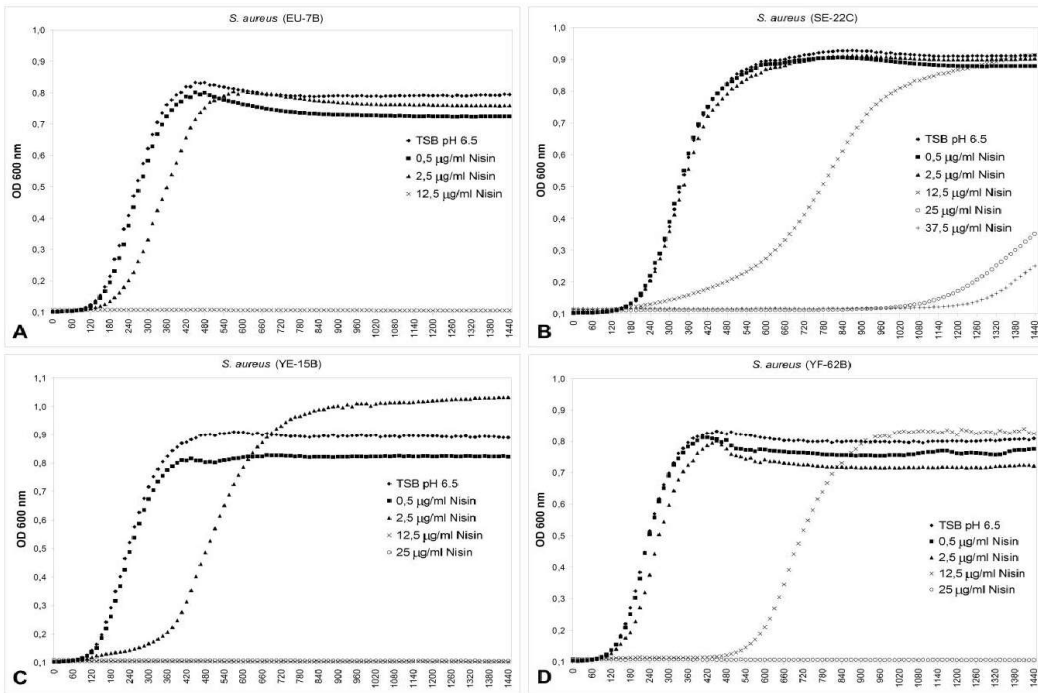
**Tablo 1.** Gıda kaynaklı *S. aureus* suşlarının nisin varlığında gelişme inhibisyonu ve lag gecikme süreleri.  
**Table 1.** Inhibition of growth and the lag periods of foodborne *S. aureus* strains in the presence of nisin.

Suş No	0,5 µg nisin/ml			2,5 µg nisin/ml			12,5 µg nisin/ml			25 µg nisin/ml			37,5 µg nisin/ml			
	Lag gecikme (dakika)	Inhibisyon (%)	Lag gecikme (dakika)	Inhibisyon (%)	Lag gecikme (dakika)	Inhibisyon (%)	Lag gecikme (dakika)	Inhibisyon (%)	Lag gecikme (dakika)	Inhibisyon (%)	Lag gecikme (dakika)	Inhibisyon (%)	Lag gecikme (dakika)	Inhibisyon (%)	Lag gecikme (dakika)	Inhibisyon (%)
EU-6A	36,94±5,0	-14,29±3,3	426,67±101,0	-35,09±5,5	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00
EU-7B	8,46±2,2	1,90±1,6	41,43±3,2	-23,81±1,6	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00
HE-25A	15,72±3,9	10,38±7,5	53,99±6,2	-6,60±2,8	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00
P-22	3,95±1,1	-1,59±3,6	15,06±3,3	-23,81±4,1	427,78±36,1	-44,05±1,7	-	-100,00	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00
P-33A	13,44±2,2	0,00±2,3	38,68±2,8	-23,48±7,3	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00
P-40A	5,39±2,4	0,00±2,6	19,20±2,8	-17,54±3,0	404,68±55,9	-30,70±1,5	-	-100,00	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00
SE-21A	4,16±2,5	-0,85±2,5	13,20±4,7	-9,32±3,9	430,81±74,2	-43,22±7,8	-	-100,00	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00
SE-22C	-1,07±1,3	1,92±1,7	-0,15±0,5	-7,69±2,9	156,57±28,0	-48,08±2,9	538,11±18,7	-79,49±3,6	496,76±99,45	-79,49±16,8	-	-100,00	-	-	-	-100,00
YE-15A	21,04±1,2	0,83±5,2	174,81±16,1	-25,83±5,2	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00
YE-15B	6,19±0,4	-1,75±4,0	164,18±13,4	-24,56±1,5	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00
YF-1B SARI	1,07±0,5	5,00±3,0	17,87±5,1	-5,00±1,7	416,80±27,2	-31,00±5,2	-	-100,00	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00
YF-62A	7,67±1,5	-3,31±2,5	27,10±6,5	-10,74±4,3	341,49±10,1	-28,93±2,9	-	-100,00	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00
YF-62B	4,35±2,5	4,20±1,5	19,08±2,3	-9,24±2,5	345,59±47,7	-33,50±5,0	-	-100,00	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00
YF-75B	4,23±1,9	2,86±2,9	28,61±0,9	-0,95±3,3	458,71±49,8	-39,05±4,4	-	-100,00	-	-	-	-100,00	-	-	-	-100,00



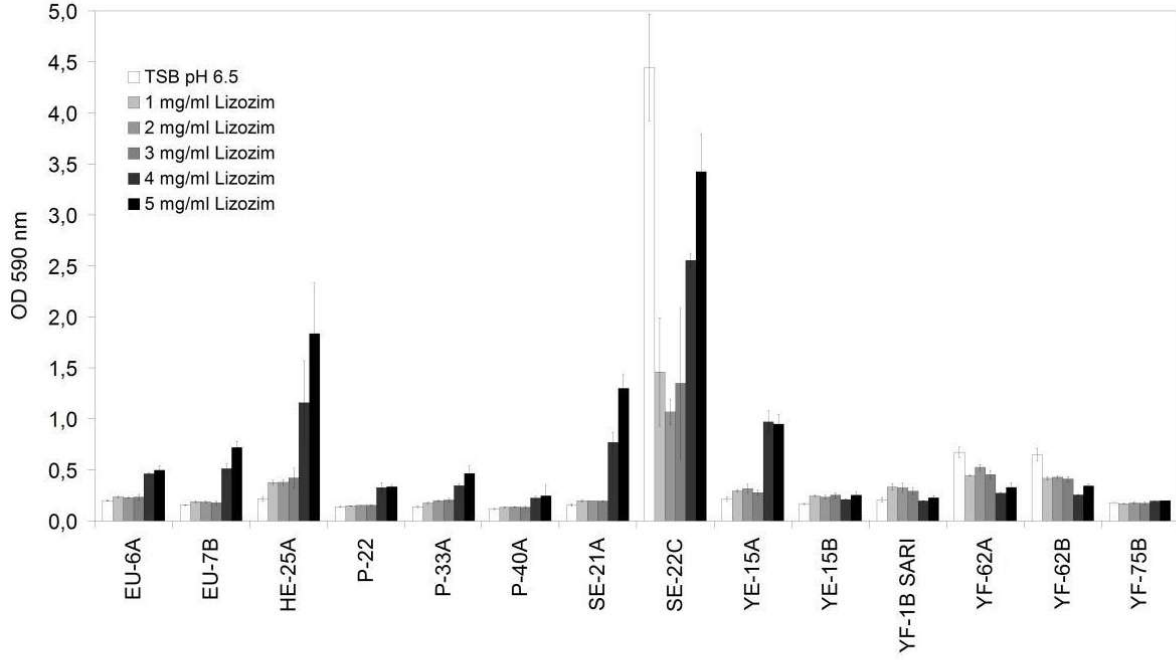
Şekil 1. Seçilmiş *S. aureus* suşlarının farklı konsantrasyonlardaki lizozim varlığında gelişme eğrileri (A-D).

Figure 1. Growth curves of selected *S. aureus* strains in different concentrations of lysozyme (A-D).



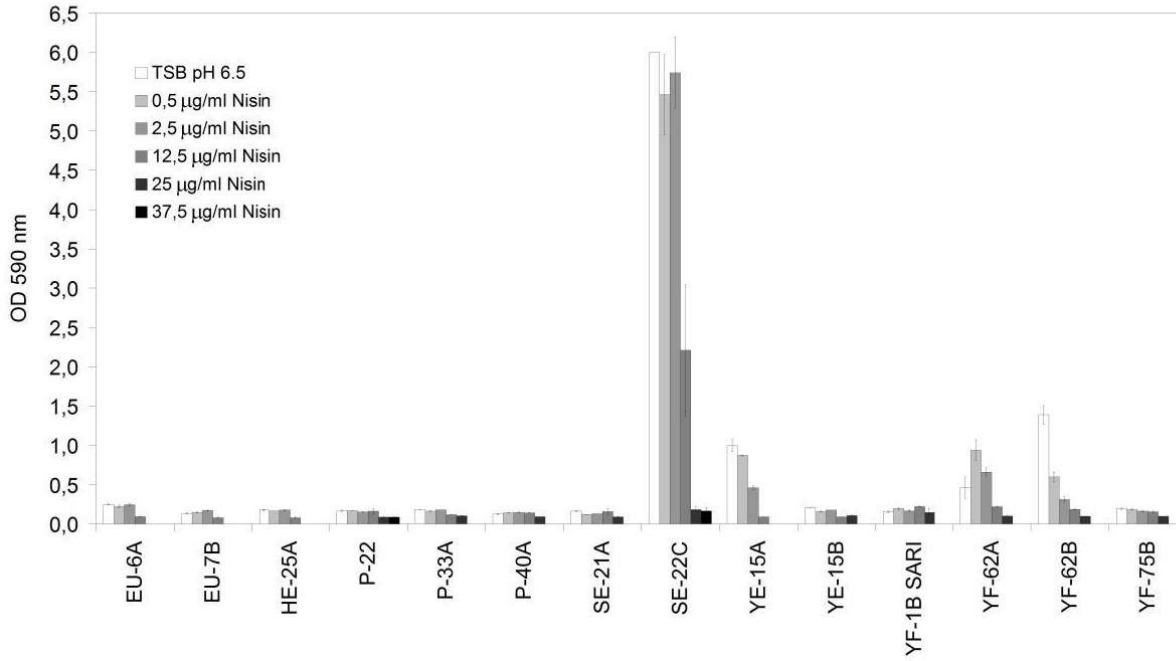
Şekil 2. Seçilmiş *S. aureus* suşlarının farklı konsantrasyonlardaki nisin varlığında gelişme eğrileri (A-D).

Figure 2. Growth curves of selected *S. aureus* strains in different concentrations of nisin (A-D).



Şekil 3. Lizozimin *S. aureus* suşlarında biyofilm oluşumu üzerine etkisi.

Figure 3. Effect of lysozyme on biofilm formation of *S. aureus* strains.



Şekil 4. Nisinin *S. aureus* suşlarında biyofilm oluşumu üzerine etkisi.

Figure 4. Effect of nisin on biofilm formation of *S. aureus* strains.

### Tartışma ve Sonuç

Lizozim ve nisin gıda sektöründe gıda patojenlerine karşı kullanılan en önemli biyokoruyucu maddeler arasında yer almaktadır. Nisinin peynirlerde anaerobik spor oluşturan bakterilerde gelişimi engellediği, laktik asit bakterilerinin yoğurtta gelişimini sınırlayarak raf ömrünü uzattığı, *C. botulinum* ve bozulmaya neden olan birçok bakterinin konserve gıdalar ile kürlenmiş et ve balıklarda gelişiminin engellenmesinde, alkollü içeceklerden birada bozulmaya neden olan laktik asit bakterilerinin inhibisyonunda kullanıldığı bildirilmiştir (Ünlütürk, 2003).

Çalışmamızda kullanılan ve değişik gıda kaynaklarından izole edilen *S. aureus* suşlarının tamamı lizozime karşı dirençli bulunmuştur. Bu sonuç, lizozim direncinin *S. aureus*'un önemli virulans faktörlerinden biri olduğu hipotezini doğrulamaktadır (Fedtke ve ark., 2004). Nisinin lizozime göre gıda kaynaklı *S. aureus* suşlarına karşı daha etkili bir biyokoruyucu olduğu ortaya konulmuştur. Fakat nisine karşı dirençli suşların varlığı da söz konusudur. Özellikle çalışmamızda sığır etinden izole edilen *S. aureus* SE-22C suşu nisine karşı yüksek direnç göstermiş test edilen en yüksek konsantrasyon olan 37,5 µg nisin/ml'de uzun bir lag süresi sonunda büyüme göstermiştir (Şekil 2B). Elde edilen nisin inhibisyon değerleri daha önce rapor edilenlere göre oldukça yüksektir. Ming ve Daeschel'in (1993) çalışmasında izole ettiği *S. aureus* P-40A suşunun MİK değeri 0,54 µg nisin/ml olarak tespit edilmiş ve nisin dirençli mutant formunun MİK değeri ise 2,2 µg nisin/ml olarak belirlenmiştir. Diğer yandan çalışmamızda elde edilen inhibisyon değerlerinin daha önce rapor edilen nisine adapte olmuş *S. aureus* Sa9R suşundan (MİK değeri 100 µg nisin/ml'den büyük bulunmuştur) düşük oldukları belirlenmiştir (Martínez ve ark., 2008). Sadece *S. aureus* suşlarında değil önemli bir gıda patojeni olan *L. monocytogenes* suşlarında da nisine dirençli mutantlar tespit edilmiştir (Harris ve ark., 1991). *S. aureus* suşlarındaki nisin direnç mekanizmaları incelendiğinde hücre duvarı teikoik asitlerindeki pozitif yüklü D-Alanin esterlerinin miktarının dirençte rol oynadığı

düşünülmektedir (Peschel ve ark., 1999). Direnç mekanizmasında önemli role sahip olduğu düşünülen diğer bir etken ise *S. aureus* tarafından üretilen nisini inaktive edebilen nisinaz enzimidir (Carlson ve Bauer, 1957). Sadece *S. aureus*'ta değil nisin dirençli *Bacillus* türlerinde de nisinaz enzimi üretimi tespit edilmiş (Jarvis, 1967) bunun yanında sürekli nisine maruz kalan streptokok suşlarında hücre duvarının kalınlaşması sonucu nisine karşı direnç gelişiminin olduğu sonucuna da varılmıştır (Grade ve ark., 2004).

Yapılan literatür taramalarında, nisinin özellikle gıda kaynaklı *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda önemli gıda biyokoruyucu maddeleri olan lizozim ve nisinin gıda kaynaklı *S. aureus* suşlarının gelişme ve biyofilm oluşturma yetenekleri üzerine etkileri belirlenmiştir. Lizozimin suşların gelişimi üzerine etkisi olmamasına rağmen biyofilm yapımını tetikleyici bir rolü olduğu bulunmuş, nisinin inhibisyon etkisi yanında biyofilm yapımını da azalttığı belirlenmiştir. Lizozimin gıdalarda tek başına kullanımının yeterli olmayacağı, dirençli suşların inhibisyonu için yüksek miktarlarda nisine veya diğer biyokoruyucu maddeler ile kombine edilebileceği düşünülmektedir.

### Teşekkür

Çalışmamıza bilimsel önerileri ile katkıda bulunan Prof. Dr. Ahmet Yemenicioğlu'na (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü) ve laboratuvar imkanlarından faydalandığımız İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (BİYOMER) teşekkür ederiz.

### KAYNAKLAR

- Akkoç, N., Şanlıbaba, P., Akçelik, M., 2009. Bakteriyosinler: Alternatif gıda koruyucuları. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 25, 59-70.
- Aydin, A., Muratoglu, K., Sudagidan, M., Bostan, K., Okuldu, B., Harsa, S., 2011. Prevalence



- and antibiotic resistance of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates in Turkey. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 63-69.
- Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W., Götz, F., 2005. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 55, 778-787.
- Blake, K.L., Randall, C.P., O'Neill, A.J., 2011. In vitro studies indicate a high resistance potential for the lantibiotic nisin in *Staphylococcus aureus* and define a genetic basis for nisin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 2362-2368.
- Carlson, S., Bauer, H.M., 1957. Nisin, ein antibakterieller Wirkstoff aus *Streptococcus lactis* unter Berücksichtigung des Resistenzproblems. *Archiv für Hygiene und Bakteriologie* 141, 445-459.
- Chen, H., Hoover, D.G., 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2, 82-100.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3, 777-788.
- Davidson, P.M., Harrison, M.A., 2002. Resistance and application to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology* 56, 69-78.
- Davidson, P.M., Juneja, V.K., Branen, J.K., 2002. Antimicrobial Agents. In: Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S. and Thorngate J.H. (Eds). *Food Additives*. Marcel Dekker, New York.
- Donlan, R.M., 2001. Biofilms and device associated infections. *Emerging Infectious Disease* 7, 277-281.
- Fedtke, I., Götz, F., Peschel, A., 2004. Bacterial evasion of innate host defenses—the *Staphylococcus aureus* lesson. *International Journal of Medical Microbiology* 294, 189-194.
- Gill, A.O., Holley, R.A., 2000. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. *Food Research International* 33, 83-90.
- Grade, S., Avila, M., Nunez, M., 2004. Fast induction of nisin resistance in *Streptococcus thermophilus* INIA 463 during growth in milk. *International Journal of Food Microbiology* 96, 165-172.
- Harris, L.J., Fleming, H.P., Klaenhammer, T.R., 1991. Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A and UAL500 to nisin. *Journal of Food Protection* 54, 836-840.
- Herbert, S., Bera, A., Nerz, C., Graus, D., Paschel, A., Goerke, C., Meehl, M., Cheung, A., Götz, F., 2007. Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in Staphylococci. *PLoS Pathogens* 3, 981-994.
- Jarvis, B. 1967. Resistance to nisin and production of nisin-inactivating enzymes by several *Bacillus* species. *Journal of General Microbiology* 47, 33-48.
- Koponen, O., 2004. Studies of producer self-protection and nisin biosynthesis of *Lactococcus lactis*. Institute of Biotechnology and Department of Applied Chemistry and Microbiology, Helsinki, Finland.
- Martinez, B., Obeso, J.M., Rodriguez, A., Garcia, P., 2008. Nisin-bacteriophage cross resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* 122, 253-258.
- Ming, X., Daeschel, M.A., 1993. Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection* 56, 944-948.
- Moretro, T., Hermansen, L., Hoick, A.L., Sidhu, M.S., Rudi, K., Langsrud, S., 2003. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus ica among Staphylococci from food and food processing environments. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5648-5655.
- Naidu, A.S., 2000. Overview. In: Naidu, A.S., (Ed). *Natural Food Antimicrobial Systems*, Chapter 1. CRC Press, Boca Raton.
- Parente, E., Riciardi, A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 628-638.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacheri, H., Jung, G., Götz, F., 1999. Inactivation of the dit operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins and other antimicrobial peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 8405-8410.
- Pinto, M.S., de Carvalho, A.F., Pires, A.C.S., Souza, A.A.C., da Silva, P.H.F., Sobral, D., 2011. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of traditional Minas serro cheese. *International Dairy Journal* 21, 90-96.

- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C., 2002. Preservation and fermentation: Past, present and future. International Journal of Food Microbiology 79, 3-16.
- Samelis, J., Kakouri, A., Rogga, K.J., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G., 2003. Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4°C in vacuum packages. Food Microbiology 20, 661-669.
- Sudagidan, M., Yemenicioğlu, A., 2012. Effects of nisin and lysozyme on growth inhibition and biofilm formation capacity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk and cheese samples. Journal of Food Protection 75, 1627-1633.
- Ünlütürk, A., 2003. Mikrobiyal Gelişmenin İnhibisyonu. In: Ünlütürk, A., Turantaş, F. (Eds), Gıda Mikrobiyolojisi, 3. baskı. Meta basım Matbaacılık hizmetleri, İzmir, pp. 188.
- Üstümkol, N. 2006. Farklı ortam koşullarında nisin, lizozim ve bazı bitkisel kaynakların küf gelişiminin kontrol altına alınması üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul.