



Gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus* türlerinin çeşitli virülans özellikleri, biyofilm oluşumu ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi

Tuğçe Gürkan¹, Meryem Burcu Külahcı^{2*}, Sumru Çıtak³

¹ Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye, (ORCID:0000-0002-1999-3319), tugcegurkan@gazi.edu.tr

^{2*} Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye (ORCID: 0000-0002-5007-5209), meryemburcu@gazi.edu.tr

³ Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye (ORCID: 0000-0003-1925-0483), scitak@gazi.edu.tr

(1st International Conference on Applied Engineering and Natural Sciences ICAENS 2021, November 1-3, 2021)

(DOI: 10.31590/ejosat.1012135)

ATIF/REFERENCE: Gürkan, T., Külahcı, M. B. & Çıtak, S. (2021). Gıda Örneklerinden İzole Edilen *Enterococcus* Türlerinin Çeşitli Virülans Özellikleri, Biyofilm Oluşumu ve Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi. *European Journal of Science and Technology* (28), 924-932.

Öz

Çalışmamızda Eylül -Aralık 2020 tarihlerinde 20 çiğ süt, 20 peynir, 20 çiğ tavuk eti, ve 20 çiğ et olmak üzere 80 adet gıda türünden izole edilen *Enterococcus* izolatlarının tanımlanması için temel biyokimyasal testler ve identifikasyon işlemi MALDI-TOF Kütle Spektrofotometresi ile yapılarak 60 izolattan 42 (%70) *Enterococcus faecalis* ve 18 (%30) *Enterococcus faecium* türü izole edilmiştir. *E.faecalis* ve *E.faecium* türlerinin Kirby-Bauer disk difüzyon metoduyla antibiyotik direnç profilleri, lipaz, jelatinaz, DNaz aktiviteleri, hemolitik aktivitesi, S tabakası varlığı ve biyofilm aktiviteleri incelenmiştir. *E.faecalis* türlerinin en fazla duyarlı olduğu antibiyotikler %100 kloramfenikol, streptomisin, vankomisin ve teikoplanin, %97,6 gentamisin ve norfloksasin, %95,2 ampisilin, %92,8 siprofloksasin olarak saptanmıştır. En fazla dirençlilik gösterdiği antibiyotik %90,4 tetrasiklidir. *E.faecium* türlerinin en fazla duyarlı olduğu antibiyotikler %100 ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, gentamisin, vankomisin ve teikoplanin, % 77,7 siprofloksasin, %72,2 norfloksasindir. En fazla dirençlilik gösterdiği antibiyotik %61,1 tetrasiklidir. Lipaz ve jelatinaz aktiviteleri tümünde negatif, DNaz aktiviteleri ise tümünde pozitif sonuç vermiştir. S tabakası varlığı *E.faecalis*'te %83,3 ve *E.faecium*'da %16,6 bulunmuştur. Biyofilm aktiviteleri Kongo Red Agar'da 60 adet *Enterococcus* spp. türü bakterinin 2'si (%3.3) kuvvetli, 22'si (%36.6) orta kuvvetli, 36'sı (%60) zayıf biyofilm pozitif üretmiştir. Mikroplak yönteminde *E.faecalis*'te 32'si (%53,3) zayıf, 8'i (%13,3) orta kuvvetli, 2'si (%3,3) kuvvetli biyofilm üretmiştir. *E.faecium*'da 17'si (%28,3) zayıf, 1'i (%1,6) orta kuvvetli biyofilm üretmiştir. Kuvvetli biyofilm üreten *Enterococcus* türleri saptanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Gıda, *Enterococcus*, Virülans özellikler, Virülans genler, Biyofilm oluşumu, Antibiyotik dirençliliği, Disk difüzyon.

Determination of various virulence properties and biofilm formation antibiotic resistance of *enterococcus* species isolated from food samples

Abstract

In our study, basic biochemical tests and identification process for the identification of *Enterococcus* isolates isolated from 80 food products, including 20 raw milk, 20 cheese, 20 raw chicken meat, and 20 raw meat, between September and December 2020, were performed with MALDI-TOF Mass Spectrophotometer and 42 of 60 isolates were identified. (70%) *Enterococcus faecalis* and 18 (30%) *Enterococcus faecium* species were isolated. Antibiotic resistance profiles, lipase, gelatinase, DNase activities, hemolytic activity, presence of S layer and biofilm activities of *E.faecalis* and *E.faecium* species were investigated by Kirby-Bauer disc diffusion method. The antibiotics to which *E.faecalis* species were most susceptible were found to be 100% chloramphenicol, streptomycin,

* Sorumlu Yazar: meryemburcu@gazi.edu.tr

vancomycin and teicoplanin, 97.6% gentamicin and norfloxacin, 95.2% ampicillin, 92.8% ciprofloxacin. The antibiotic with the highest resistance is 90.4% tetracycline. The antibiotics to which *E.faecium* species are most susceptible are 100% ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, gentamicin, vancomycin and teicoplanin, 77.7% ciprofloxacin, 72.2% norfloxacin. The antibiotic with the highest resistance is 61.1% tetracycline. Lipase and gelatinase activities were negative in all, and DNase activities were positive in all. Presence of S layer was found 83.3% in *E.faecalis* and 16.6% in *E.faecium*. Biofilm activities of 60 *Enterococcus* spp. on Congo Red Agar. Of the bacteria, 2 (3.3%) were strong, 22 (36.6%) were medium strong, and 36 (60%) were weak biofilm positive. In the microplate method, 32 (53.3%) weak, 8 (13.3%) medium-strong, 2 (3.3%) strong biofilms were produced in *E.faecalis*. In *E.faecium*, 17 (28.3%) produced weak biofilms and 1 (1.6%) produced medium-strength biofilm. Strong biofilm-producing *Enterococcus* species were not detected.

Keywords: Food, *Enterococcus* species, *Enterococcus*, Enterococci, Virulence determinants, Virulence genes, Biofilm formation, Antibiotic resistance, Disc diffusion.

1. Giriş

Enterococcus'lar, insan ve hayvanlarda gastrointestinal florada bulunup ve hayvanlardan elde edilen besin ürünlerinde olduğu gibi insan ve hayvan kaynaklı kanalizasyon ve fekal materyaller tarafından kontamine olmuş ortamlarda yaygındır [1], [2]. Hayvanların bağırsak florasındaki yaygınlığa göre hayvansal gıdalar başta olmak üzere pek çok gıdada bulunabilirler. Bu yüzden bazı çalışmalarda *E.faecalis* ve *E.faecium*'un fekal kontaminasyon göstergesi olarak değerlendirildiği görülmektedir [3]. *Enterococcus* 'ların gıdalarda yetersiz hijyen indikatörü olarak değil aynı zamanda gıdanın bir parçası olarak da göz önüne alınması gerekmektedir [3], [4]. Aynı zamanda *Enterococcus* 'lar ısıtma işlem görmüş et ürünlerinde yüksek sıcaklığa karşı dirençli olma özelliğinden dolayı pastörizasyon sonrası canlı kalırlar. Dilimleme ve paketleme gibi işlem basamaklarında çapraz kontaminasyona bağlı olarak üründe bozulma yapabilmektedirler. Bu bakteriler, istenmeyen özelliklerinin yanında birçok yararlı özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde starter, yardımcı kültür (adjunct) ve probiyotik olarak da kullanılmaktadır [3], [4], [5]. Normal floranın fırsatçı patojenleri olarak tanınan *Enterococcus* 'lar, hastane enfeksiyon etkenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Bazı suşlarının yararlı özelliklerinin yanında *Enterococcus* 'ların en yaygın hastane kaynaklı patojenlerin arasında yer aldığı, özellikle de *E. faecium* ve *E. faecalis*'in fırsatçı patojen olduğu, bakteriyemi ve endokarditisin gibi hastalıklarla beraber üriner sistemde ve merkezi sinir sistemi gibi dokularda enfeksiyonlara neden olabildiği bildirilmektedir. *Enterococcus* 'ların patojenite mekanizmalarında vankomisin gibi bazı antibiyotiklere direnç özelliklerinin ve sahip oldukları çeşitli virülans faktörlerinin önemli rolü olduğu belirtilmektedir [4].

Enterococcus 'ların insan sağlığı açısından dikkat çekmesinin nedenlerinden biri antibiyotiklere direnç özellikleridir. Antibiyotik dirençliliği, *Enterococcus* 'ların hastane ortamında canlılığını sürdürmesine ve dirençli suşların yayılmasına neden olmaktadır. *Enterococcus* 'ların antibiyotik direnci doğal ve kazanılmış direnç şeklinde sınıflandırılmaktadır. Sefalosporinler, aminoglikozitler, polimiksinler, linkomisin ve klindamisinine karşı oluşan direnç doğal direnç olarak tanımlanmaktadır. Makrolitler, tetrasiklinler, kloramfenikol, trimetoprim sulfametoksazol, rifampisin, aminoglikozitler, glikopeptitler (vankomisin ve teicoplanin vb.) ve ampisiline karşı oluşan dirence ise kazanılmış direnç denilmektedir. Ampisilin, vankomisin ve gentamisin, çoklu antibiyotige dirençli *Enterococcus* 'ların tedavisinde klinik alanlarda yaygın kullanılan antibiyotiklerdir. Son yıllarda vankomisin yaygın kullanımı sonucu vankomisine dirençli *Enterococcus* (VRE) suşlarının sayısında ve bununla beraber hastane kaynaklı yüksek

vankomisin direncine sahip *Enterococcus* 'ların invazyon oranında artış gözlenmiştir [6].

Enterococcus 'ların patojenitesi hem antibiyotiklere olan dirençleri hem de virülans faktörleri ile ilişkilendirilmektedir. Virülans faktörleri olarak agregasyon materyalleri, jelatinaz, hücre dışı yüzey proteini bunlara örnek olarak verilebilir. Jelatinaz, jelatini, kollajeni, hemoglobini hidrolize eden bir hücre dışı metallo-endopeptidaz enzimidir. Gıdalardaki *E.faecalis* suşlarında jelatinaz üretim oranı, çalışmalarda genotipte jelatinaz geninin bulunmasına karşılık fenotipte bu özelliği göstermemesi üzerine değişiklik gösterebilmektedir. Hücre dışı yüzey proteininin adhezyonda ve konakçı bağışıklık sisteminden korunmada rol oynadığı düşünülmektedir. Patojenlerin konakçı dokudaki hücre dışı matrikse tutunması enfeksiyona yol açabilmektedir. Lipaz, besinlerle alınan yağların yapı taşlarına kadar parçalanması ve vücutta kullanılabilir hale getirilmesinden sorumlu olan enzimdir. Bu enzim sayesinde trigliserid formunda vücuda alınarak sindirim kanalında ilerleyen yağlar, yağ asitleri ve gliserole dönüştürülerek emilime hazır hale getirilir. Gıdalarda bulunan *Enterococcus* türleri lipaz enzimine dayanıklıdır ve aktivite sonuçları zayıf veya negatiftir [7].

DNaz, DNA'daki fosfodiester bağlarını kesen, DNA'yı kısa oligonükleotit parçalarına ya da tamamen bileşenlerine ayıran bir enzimdir. *E.faecalis* ve *E.faecium* türleri DNA bozunmasına neden olan bu enzime sahiptirler. Hücre zarfının bir parçası olan S tabakasının yapısında protein ve glukoprotein vardır. *Enterococcus* türlerinde S-tabakası peptidoglikan tabakaya bağlıdır (dış membran yoktur). S-tabakası hücreyi iyon ve pH değişimleri dışında ozmotik basınç ve yabancı enzimlere karşı da korur ve bazı bakteri hücrelerinde şeklin oluşumunda ve zarfın sağlamlığında rol oynar. *Enterococcus* türlerinin çoğunda S tabakası oluşumu pozitif gözlenir [8].

En yaygın iki *Enterococcus* türü olan *E.faecalis* ve *E.faecium*, çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylere geri döndürülemez şekilde eklenmiş bir hücre popülasyonundan oluşan, ekzopolimerik maddelerin hidratlanmış bir matrisine yerleştirilmiş biyofilm üretebilir [9]. Biyofilm, çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylere geri döndürülemez şekilde bağlanmış ve ekzopolimerik maddeler, proteinler, polisakaritler ve nükleik asitlerin hidratlı bir matrisine yerleştirilmiş bir hücre popülasyonudur [10]. Biyofilmlerin yok edilmesi çok zordur ve birçok kronik enfeksiyonun kaynağıdır [11]. Biyofilmlerdeki *Enterococcus* 'lar, planktonik olarak büyüyen *Enterococcus* 'lardan daha antibiyotiklere karşı daha dirençlidir, bu nedenle biyofilm oluşumunun potansiyel etkisi önemli olabilir [9].

Araştırmamızın amacı, *Enterococcus* türlerinin tüketime sunulan çeşitli gıda örneklerinden izolasyonu, identifikasyonu, antibiyotik dirençliliğinin, biyofilm üretimlerinin ve fenotipik virülans özelliklerinin araştırılmasıdır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Gıda Örneklerinin Toplanması

Eylül-Aralık 2020 tarihleri içerisinde, Ankara'da bulunan çeşitli market, çiftlik, sokak satıcıları ve pazarlarında satışa sunulan 20 çiğ süt, 20 peynir, 20 çiğ tavuk (göğüs, but, kanat), 20 çiğ et (gerdan, antrikot, döş, sırt) olmak üzere toplam 80 gıda örneği materyal olarak kullanılmıştır. Örnekler soğuk zincir koşullarında, steril kapların içinde laboratuvar ortamına getirilmiş ve aynı gün içinde çalışma yapılmıştır.

2.2. Gıda Örneklerinde *Enterococcus* İzolasyonu ve Ön Tanımlamasının Yapılması

Araştırmamızda *Enterococcus* spp. izolasyonu için, Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'nde belirtilen esaslara göre yapılmıştır [12]. Kültürel yöntemlere göre izolatların ön tanımlaması metotta 2 aşamada yapılmıştır:

2.2.1. Ön zenginleştirme

Alınan örnekler 9:1 oranında Tamponlanmış Peptonlu Su'ya (Peptone Water) konulmuştur. 24 saat 37°C 'de inkübe edilmiştir [12].

2.2.2. Zenginleştirme

10⁻¹ dilüsyondan Slanetz-Bartley Agar'da (SBA, Merck, 105262) ekim yapılarak 48-72 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. SBA besiyerinde üreyen tipik kırmızı ve pembe renkteki koloniler kanlı agara pasajlanarak 24-48 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır [12].

2.3. Bakteri İzolatlarının Tür Tanımlamaları

Ön tanımlanması yapılan izolatların tür tanımlamaları Crystal Gram Positive Kit (BD BBL) ile yapılmış ve 60 bakteri örneğinin tamamının türü *Enterococcus* spp. olarak belirlenmiştir. İzolatların tür tayini Sağlık Bakanlığı'nın Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı'na ait Ulusal Mikrobiyoloji Laboratuvar'ında MALDI TOF MS kütle spektrometresi ile yapılmıştır. Pozitif Kontrol olarak *E.faecalis* ATCC 29212 suşu kullanılmıştır.

2.4. İzolatların Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi

Enterococcus spp. izolatlarının antibiyotik dirençliliği ve duyarlılığı Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2013) kurallarına belirlenen antibiyotiklere (gentamisin (10 mcg), tetrasiklin (30 mcg), eritromisin (15 mcg), kloramfenikol (30 mcg), streptomisin (30 mcg), ampicilin (10 mcg), vankomisin (30 mcg), siprofloksasin (10 mcg), norfloksasin (10 mcg) ve teikoplanin (30 mcg)) Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle yapılmıştır. Mueller Hinton Agar'da, inkübasyon süresi bitiminde disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülmüştür [13].

2.5. İzolatların Fenotipik Virülans Profilinin Belirlenmesi

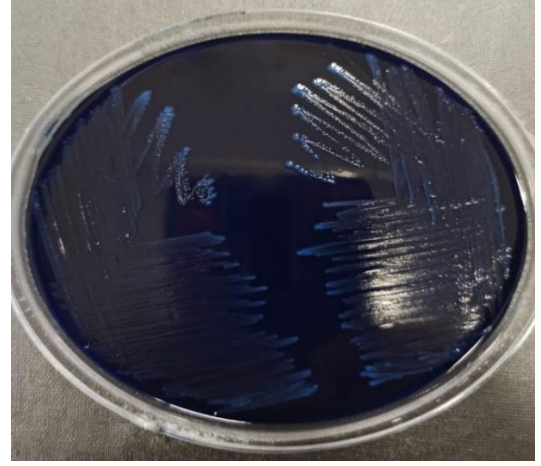
Hemolitik aktivite Koyun Kanlı Agar'da 37°C'de ve 24 saatte üreyen bakteri kolonilerinin hemolitik aktivitesi çevresinde eritrositlerin parçalanarak bir zon oluşturmasına göre değerlendirilmiştir [14].

Lipaz aktivitesi Tributyrin Agar'da 25-30°C'da 2-3 gün inkübe edilmiştir. Besiyeri bileşimindeki tribütirinin bulanıklığa neden olup olmadığı incelenmiştir [15].

Jelatinaz üretimi, jelatin ortamı (Nutrient Gelatine) üzerinde cam tüpler içerisinde 5 mL besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Öze ile sıvı besiyerinden alınan bakteri örneği jelatin besiyerine daldırma yöntemi ile ekilmiştir. 37°C'de 10-30 gün inkübe edilmiştir [16].

DNaz aktivitesi, DNaz Agar üzerinde belirlenmiştir. DNaz besiyerine ekimi yapılan bakterilerin üzerin %8.3'lük HCl damlatılmış ve bakterilerinde etrafında şeffaf zon oluşumu gözlemlenmiştir [17].

Yüzey tabakasının (S-tabakası) varlığı, 0.1 mg/mL Coomassie Brilliant Blue R 250 ile güçlendirilmiş TSA besiyeri üzerindeki kültürlerin çizilmesi ile değerlendirilmiştir. TSA besiyerine eklenen 0.1 mg/mL Coomassie Brilliant Blue üzerinde besiyerindeki proteinlerin parçalanması sonucunda kolonilerin koyu mavi renkte ürediği gözlemlenmiştir [18].

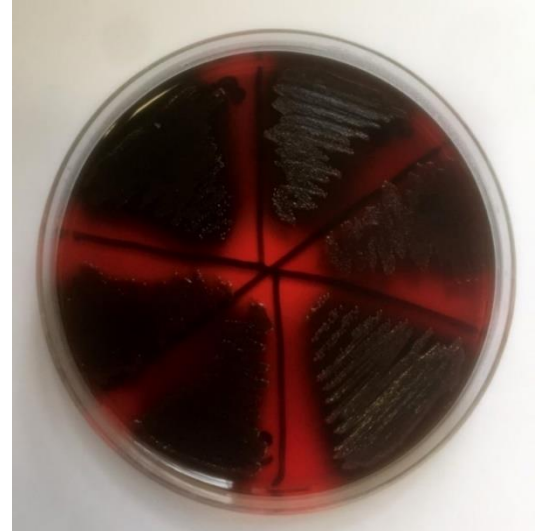


Resim 1. TSA-C besiyerinde *Enterococcus*'ların görünüşü

2.6. Biyofilm Oluşumu

2.6.1. Kongo Red Agar Yöntemi

Biyofilm oluşumuna Kongo Red Agar yöntemi ve Mikroplak Yöntemi ile bakılmıştır. Suşlar kongo kırmızılı agara ekim yapıldıktan sonra 25°C'de 24 saat inkübasyon sonucunda, kuru kristalize siyah koloniler oluşturan suşlar biyofilm pozitif, kırmızı veya pembe renkli koloni oluşturan suşlar ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir. Koyuluk derecesine göre sonuçlar +, ++, +++ şeklinde değerlendirilmiştir.



Resim 2. *Enterococcus* türlerinin Kongo Red Agar'da biyofilm aktiviteleri

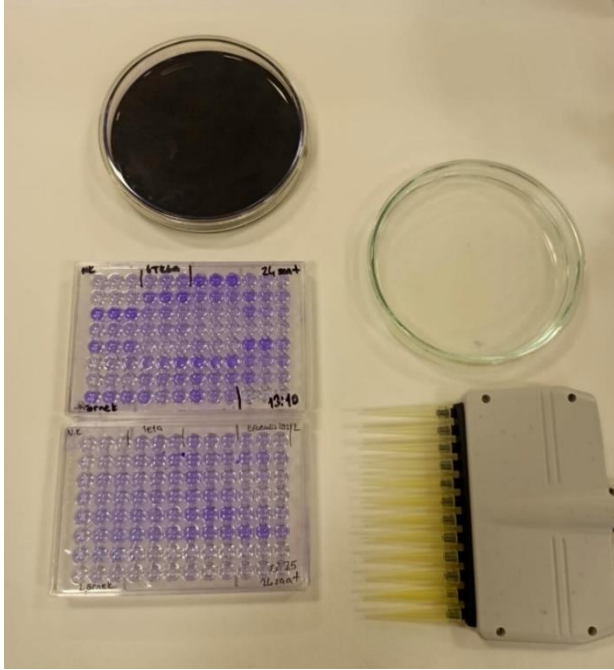
2.6.2. Mikroplak Yöntemi

Saflaştırılmış *Enterococcus* tür kolonileri, 10 mL Tripton Soy Broth'da süspansiyon edilmiş 37°C'de 18 saat süreyle inkübe edilmiş ve 2 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Hücre topları fosfat tamponlu çözelti (PBS) içinde, yapışma özellikleri, negatif kontrol olarak steril TSB içeren steril 96

kuyucuklu polistiren mikrotitre plakalarının oyukları yoluyla tespit edilerek yıkanmış *E. faecalis* 29212 pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Mikrotitre plakaları 24 saat 37°C'de inkübe edilmiş, steril PBS ile yıkanarak 28 ± 2 ° C'de kurumaya bırakılmıştır. Kristal viyole ile boyanıp 30 dakika beklenmiştir. Kuyucuklar tekrar sterilize edilmiş deiyonize su ile yıkanmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Yapışık hücrelere bağlanan kristal viyole boya 150 mL %99 etanol içinde yeniden süspansiyon haline getirilmiş, ilgili kuyucuklardaki OD okumaları 570 ve 595 nm'de bir mikropilaka okuyucu ile değerlendirilmiştir. Aşağıdaki tablolarda belirtilen değer aralıklarına göre “+, ++, +++” şeklinde değerlendirilmiştir [19].

Tablo 1. Mikrotiter plaka yönteminde biyofilm oluşturma yeteneğinin sınıflandırılması

Cut-off değeri hesaplama	OD değerleri sonuçlarının ortalaması
$OD > 4 \times OD_c$... $OD > 0.236$ (Güçlü)
$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	$0.118 < OD \leq 0.236$ (İlman)
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	$0.059 < OD \leq 0.118$ (Zayıf)
$OD \leq 0.059$... $OD \leq 0.059$ (Hiçbiri)



Tablo.3. Gıda örneklerinden izole edilen *E.faecalis* ve *E.faecium* izolatlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antibiyotik dirençlilik oranlarının antibiyotiklere göre sayısı ve oranları

Bakteri Türü	<i>E.faecalis</i> Yüzde (%)			<i>E.faecium</i> Yüzde (%)			Toplam Duyarlılık	Toplam Dirençlilik
	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli		
Ampisilin (AM)	40 (%95,2)	-	2 (%4,7)	18 (%100)	-	-	58 (%96,6)	0
Eritromisin (E)	13 (%30,9)	9 (%21,4)	20 (%47,6)	4 (%22,2)	6 (%33,3)	8 (%44,4)	17 (%28,3)	28 (%46,6)
Tetrasiklin (TE)	4 (%9,5)	-	38 (%90,4)	7 (%38,8)	-	11 (%61,1)	11 (%18,3)	49 (%81,6)
Kloramfenikol (C)	42 (%100)	-	-	18 (%100)	-	-	60 (%100)	0
Siprofloksasin (CIP)	39 (%92,8)	3 (%7,1)	-	14 (%77,7)	3 (%16,6)	1 (%5,5)	53 (%88,3)	1 (%1,6)

Resim E.4. *Enterococcus türlerinin mikropilak yöntemiyle biyofilm aktiviteleri*

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Tablo.2. Gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus türlerinin izole edildikleri materyallere göre dağılımları*

Gıda örnek adı	<i>E.faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		Toplam İzolat Sayısı
	İzolat sayısı	%	İzolat sayısı	%	
Çiğ Süt (n=20)	11	55	6	30	17
Peynir (n=20)	12	60	8	40	20
Çiğ Tavuk (n=20)	10	50	1	5	11
Et (n=20)	9	45	3	15	12
TOPLAM	42	210	18	90	60

Tablo 2'ye göre; çalışılan gıdalardan 60 *Enterococcus* izolatı elde edilmiş olup 42 tanesi *E.faecalis* ve 12 tanesi *E.faecium* olarak tespit edilmiştir.

Streptomisin (S)	42 (%100)	-	-	18 (%100)	-	-	60 (%100)	0
Gentamisin (CN)	41 (%97,6)	1 (%2,3)	-	18 (%100)	-	-	59 (%98,3)	0
Vankomisin (VA)	42 (%100)	-	-	18 (%100)	-	-	60 (%100)	0
Norfloksasin (NOR)	41 (%97,6)	1 (%2,3)	-	13 (%72,2)	3 (%16,6)	2 (%11,1)	54 (%90)	2 (%3,3)
Teikoplanin (TEC)	42 (%100)	-	-	18 (%100)	-	-	60 (%100)	0

negatiftir. 60 *Enterococcus* izolat örneğinin tümünde DNaz aktivitesi pozitif bulunmuştur.

Tablo.5. Gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus spp.* izolatlarının Yüzey Tabakası (S-Tabakası) Varlığına göre TSA-C renk koyulukları sonuçlarının sayısı ve yüzde oranları

<i>Enterococcus spp.</i>	TSA-C Renkleri		
	Açık	Orta	Koyu
	S-tabakası		
	Negatif	Pozitif	
<i>E.faecalis</i>	2 (%14,2)	20 (%90,9)	20 (%83,3)
<i>E.faecium</i>	12 (%85,7)	2 (%9)	4 (%16,6)
TOPLAM	14	22	24

Tablo.3'e göre; gıda örneklerinden izole edilen *E.faecalis* ve *E.faecium* izolatlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antibiyotik dirençlilik oranlarında *E.faecalis* türlerinin %100 duyarlı olduğu antibiyotikler sırasıyla kloramfenikol, streptomisin, vankomisin ve teikoplanin olarak incelenmiştir. *E.faecium* türlerinin %100 duyarlı olduğu antibiyotikler sırasıyla ampicilin, kloramfenikol, streptomisin, gentamisin, vankomisin ve teikoplanin olarak incelenmiştir. En yüksek antibiyotik direnci tetrasiklinde saptanmış olup değerler *E.faecalis*'te 38 (%90,4) ve *E.faecium*'da 11 (61,1) şeklindedir.

Tablo.4. Gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus spp.* izolatlarının hemolitik aktivite sonuçlarına göre sayısı ve yüzde oranları

(Enterococcus spp.)	Hemolitik Aktivite	
	Pozitif	Negatif
<i>E.faecalis</i>	14 (%82,3)	28 (%65,1)
<i>E.faecium</i>	3 (%17,6)	15 (%34,8)
TOPLAM	17	43

Tablo 4'e göre hemolitik aktivite *E.faecalis*'te %82,3, *E.faecium*'da %17,6 olarak saptanmıştır.

60 *Enterococcus* izolatının tümünde lipolitik aktivite sonucunda bulanıklık ve zonlar gözlemlenmemiş ve lipaz aktiviteleri negatif sonuç vermiştir. 60 *Enterococcus* izolatının tümünde bir sıvılaşma, gözlenmemiş olup bakteriler jelatinaz

Tablo.6. Gıda örneklerinden izole edilen toplam 60 *Enterococcus spp.* türü bakterinin Kongo Red Agar ve Mikroplak Yöntemi ile elde edilen biyofilm aktivite ölçüm sonuçları

Bakteri Türü	<i>E.faecalis</i>		<i>E.faecium</i>	
	Yöntem		Yöntem	
	Kongo Red Agar	Mikroplak Yöntemi	Kongo Red Agar	Mikroplak Yöntemi
Aktivite Ölçüm Değeri				
+	31 (%51,6)	32 (%53,3)	6 (%10)	17 (%28,3)
++	11 (%52,3)	8 (%13,3)	10 (%16,6)	1 (%1,6)
+++	0	2 (%3,3)	2 (%3,3)	0

Tablo 6'ya göre çeşitli gıda örneklerinden izole edilen 60 adet *Enterococcus spp.* türü bakterinin kongo red agar'da biyofilm aktivitesinin 37'sinde (%61,6) zayıf, 21'inde (%35) orta kuvvetli, 2'sinde (%3,3) kuvvetli biyofilm görülmüştür.

Kuvvetli biyofilm oluşturan bakteri türlerinden ikisi de *E.faecium*'dur.

Mikroplak yönteminde 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılan 60 izolat arasında en yüksek biyofilm değerine sahip olanı *E.faecalis* türü süt örneğidir ve biyofilm değeri 595 nm'de 2,211'dir. Biyofilm değeri en düşük olan izolat ise *E.faecium* türüne ait olup yine süt örneğinden elde edilmiştir ve biyofilm değeri 595 nm'de 0,022'dir. 48 saatlik inkübasyon süresinde de biyofilm değeri yüksek olan izolatların çoğunlukla *E.faecalis* türüne ait olduğu görülmüştür. Toplam biyofilm aktivitesi *E.faecalis*'te 42 (%70), *E.faecium*'da 18 (%30) olarak saptanmıştır.

Enterococcus'lar, hayvanların bağırsak florasındaki yaygınlığa bağlı olarak özellikle hayvansal gıdalar başta olmak üzere pek çok gıdada bulunabilmektedir. Bu nedenle birçok çalışmada *E.faecalis* ve *E.faecium*'un fekal kontaminasyon göstergesi olarak değerlendirildiği görülmektedir. Ancak pek çok gıdada *E. faecalis*'in yaygın bulunuşunun her zaman için doğrudan fekal kontaminasyon göstergesi olarak değerlendirilmemesi gereğine de değinilmektedir. Peynir ve et gibi belirli hayvansal ürünlerin veya örneğin zeytin gibi fermente edilmiş bitki ürünlerinin fermentasyonu ve olgunlaşmasında faydalı olabildikleri gibi bir gıda kontaminantı olarak istenmeyebilir [20], [21]. *Enterococcus*'ların pastörizasyondan etkilenmemeleri, geniş pH veya örneğin zeytin gibi fermente edilmiş bitki ürünlerinin fermentasyonu ve olgunlaşmasında faydalı olabildikleri gibi bir gıda kontaminantı olarak istenmeyebilir [20], [21]. *Enterococcus*'ların pastörizasyondan etkilenmemeleri, geniş pH aralıklarında ve yüksek NaCl konsantrasyonunda büyüyebilmeleri yemeye hazır gıdaların kalıntı mikrobiyotasını oluşturabilirler [22], [23].

Çalışmamızda 80 farklı gıda örneğinden (çiğ süt, peynir, çiğ tavuk, et) yapılan izolasyon ve tür tanımlamaları sonucunda 60 bakteri izolatının 42'si (%70) *E.faecalis* ve 18'i (%30) *E.faecium* olarak belirlenmiştir. Ülkemizde ve yurt dışında yapılan son çalışmalarda gıda kaynaklı *Enterococcus*'ların beyaz peynirden, tulum peynirinden, geleneksel Türk sucuğundan, tavuk, sığır eti, Cheddar peyniri, beyaz peynir, krem peynir, yoğurt, sütlü tatlılar gibi gıdalardan karabiber ve kırmızı biber gibi baharatlardan yaygın olarak izole edildiği gözlenmektedir [3], [4], [5]. Oruç ve ark. İran ve Türk beyaz peynirlerinden yaptıkları bir çalışmada 12 *E.faecalis* ve 8 *E.faecium* suşu elde etmişlerdir [24].

Bu çalışmalarda bizim sonuçlarımızla paralel olarak *Enterococcus* türlerinin et ve süt ürünlerinde yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir. Gomes ve ark. Brezilya gıda ürünleri ile (çiğ ve pastörize süt, et ürünleri, peynirler ve sebzeler) yaptıkları çalışmada gıda örneklerinin %52,5'ini *Enterococcus* olarak tespit etmişlerdir. Pavia ve ark. *Enterococcus* izolatlarını Catanzaro (İtalya) perakende satış noktalarında satılan etlerden (sığır, tavuk, hindi, kuzu ve domuz eti) çoğunluğu tavuk eti (%65,4) olmak üzere %45'inden, izole etmişlerdir. Bulunan türlerde en sık rastlanılanları çiğ süt ve ette *E. faecium* ve *E. faecalis* iken sebzelerde *E. casseliflavus* olarak bulunmuştur [25], [26], [27].

Suzzi ve ark. 2000 yılında İtalyan keçi peyniri ile yaptıkları bir çalışmada en yaygın olan *Enterococcus* türlerinin *E.faecalis* ve *E.faecium* olduğunu tespit etmişlerdir. Suzzi ve ark. *E. faecium* ve *E. faecalis*'in çevresel örneklerden en sık izole edilen türler olduğunu ve bu çalışmada olduğu gibi, istenmeyen enterokokların varlığının bozulma sorunlarına neden olabileceğini ve peynir üretimi sırasında kötü hijyen koşullarından kaynaklanabileceğini doğrulamıştır. Suzzi ve

arkadaşlarının sonuçları, araştırmamızda da gıdalarda *E.faecalis* (%70) ve *E.faecium* (%30) yüksek sıklıkta izole edilen türler olması nedeni ile uygunluk göstermiştir [28].

Wessels ve ark. (1988) *E. faecalis*'in (izolatların %73.4'ü) süzme peynirde yaygın olan tür olduğunu, Rao ve ark. (1986), Hindistan'da yaptıkları çalışmada, *E.faecalis*'in çiğ sütte, *Efaecium*'un kuru süt hariç tüm süt ürünlerinde baskın olduğunu bildirmişlerdir [29]. Litopoulou-Tzanetaki (1990) çalışmasında, Kefalotyri peynirindeki aroma gelişimi için önemli olan diğer laktik asit bakterileri ile birlikte kullanılan *E.durans* ve *E.faecium*'u tespit etmiştir [30].

Ülkemizde yapılan çalışmalarda Çıtak ve ark. *Enterococcus* spp. varlığı açısından analiz ettikleri 30 Türk beyaz peynir numunesinden elde ettikleri 101 izolatından 62 *E. faecalis*, 25 *E.faecium*, 7 *E.durans*, 5 *E.mundtii* ve 2 *E.Hirae* elde etmişlerdir [31]. Çıtak ve ark. Yaptıkları bir başka çalışmada 78 çiğ süt örneğinden izole ettikleri 177 *Enterococcus* izolatının %54.2'sini *Enterococcus faecalis* ve %29'unu *E.faecium* olarak tanımlamışlardır [32].

Enterococcus'ların antibiyotik direnci doğal (intrinsik) direnç ve kazanılmış direnç şeklinde sınıflandırılmaktadır. *Enterococcus* antibiyotik direnci üzerine yapılan çalışmalar değerlendirilirken ortaya çıkan görüntü, çoklu ilaca dirençli suşların olası oluşumudur. *Enterococcus* antibiyotik direnci klinik alana özel değildir, aynı zamanda gıda endüstrisinde de yaygındır. Daha önce hastanede ya da antibiyotik kullanmadıkları zaman hastaneye yatırılan bireylerde VRE varlığı, VRE'nin gıda zinciri yoluyla olabileceğini de düşündürmektedir.

Pavia ve ark. (2000), İtalya'da kontamine beyaz peynir, tavuk, kuzu, hindi ve sığır etinden izole ettikleri *Enterococcus*'ların Vankomisine dirençli *Enterococcus* (VRE) ve Teikoplanine dirençli *Enterococcus* (TRE) düzeylerini sırasıyla %29 ve %39 olarak tespit etmişlerdir. Tavuk örneklerinde vankomisin direncini daha yüksek (%76,5) bulmuşlardır. Teikoplanine (TRE) karşı genel direnç %30 iken, pozitif olanlar arasında TRE izolatların %66.7'sini temsil ediyordu. En sık görülen izolatlar *E.faecium* (%35.6) ve *E.faecalis* (%33.3) idi. Vankomisin ve teikoplanine direnci *E. faecium*'un sırasıyla %75 ve %78,5'inde ve *E. faecalis*'in %40 ve %46.7'sinde gözlemlenmiştir. Çoğu suşun ampisiline (%80) duyarlı, metisiline (%88.9) dirençli olduğunu görmüşlerdir. İzolatlarda en yüksek direnç prevalansını streptomisin (%88.9), tetrasiklin (%84.4) ve eritromisin (%75.6) olarak bulmuşlardır. Vankomisine direncin, metisilin, teikoplanin, eritromisin, tetrasiklin ve kloramfenikol ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu saptamışlardır [25].

%80'den fazla insan enfeksiyonları ile ilişkili *Enterococcus*'ların en önemlileri *E. faecalis*'tir [33]. Son yıllarda, VRE ile kolonizasyonun sıklıkla sağlık ortamı dışındaki hayvan, gıda ve çevresel rezervuarlardan kaynaklandığı öne sürülmüştür. Bu da *E. faecalis*'in patojenik potansiyelinin *E. faecium*'dan daha fazla olduğunu düşündürmektedir [34], [25].

Ülkemizde yapılan çalışmalarda Çıtak ve ark. 30 Türk beyaz peynirinden elde ettikleri *Enterococcus* spp.'nin 101 izolatından 62 *E. faecalis* ve 25 *E.faecium* türünün streptomisin, eritromisin, oksasilin ve vankomisine karşı direncini araştırmış ve *E. faecalis* izolatlarının %96.8'inde, *E. faecium* izolatlarının %76'sında vankomisine direnç saptamışlardır ve bu çalışma ile Türk beyaz peynirinde *Enterococcus*'ların, vankomisine dirençli suşların varlığını doğrulamışlardır [31].

Çıtak ve ark. bir başka çalışmalarında antibiyotiklerin çiğ süttten elde edilen *Enterococcus* izolatlarına karşı in vitro

aktivitelerini belirlemek için disk-difüzyon yöntemini uygulamış ve *Enterococcus* izolatlarında yüksek oranda oksasilin, streptomisin ve eritromisin direnci olduğunu görmüşlerdir (%95, 97 ve %86). *E.faecalis* izolatlarının sırasıyla %48 ve %52'sinde vankomisin ve teikoplanin direnci, *E. faecium* için %26 ve %33 vankomisin ve teikoplanin direnci gözlemlenmiştir [35].

Bizim sonuçlarımıza göre de *E.faecalis* türlerinin *E.faecium*'a göre antibiyotiklere daha duyarlı oldukları görülmüştür. *E.faecalis* türlerinin duyarlı olduğu antibiyotikler sırasıyla kloramfenikol 42 (%100), streptomisin 42 (%100), vankomisin 42 (%100) teikoplanin 42 (%100), gentamisin 41 (%97,6), norfloksasin 41 (97,6), ampisilin 40 (%95,2) olarak incelenmiştir. *E.faecium* türlerinin duyarlı olduğu antibiyotikler sırasıyla ampisilin (%100), kloramfenikol 18 (%100), streptomisin 18 (%100), gentamisin 18 (%100), vankomisin 18 (%100) ve teikoplanin 18 (%100), siprofloksasin 14 (%77,7), norfloksasin 13 (%72,2) olarak incelenmiştir. En yüksek antibiyotik direnci tetrasiklinde saptanmış olup değerler *E.faecalis*'te 38 (%90,4) ve *E.faecium*'da 11 (%61,1) şeklindedir. *E.faecalis* ve *E.faecium* için toplam antibiyotik duyarlılık oranları ampisilinde 58 (%96,6), eritromisinde 17 (%28,3), tetrasiklinde 11 (%18,3), kloramfenikolde 60 (%100), siprofloksasinde 53 (%88,3), streptomisinde 60 (%100), gentamisinde 59 (%98,3), vankomisinde 60 (%100), norfloksasinde 54 (%90), teikoplaninde 60 (%100) olarak incelenmiştir. *E.faecalis* ve *E.faecium* için toplam antibiyotik dirençlilik oranları tetrasiklinde 49 (%81,6), eritromisinde 28 (%46,6), siprofloksasinde 1 (%1,6), norfloksasinde 2 (%3,3) olarak bulunmuş ve kloramfenikol, streptomisin, gentamisin, vankomisin, teikoplanin ve ampisilinde toplam dirençlilik 0'dır.

Araştırmamızda süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri gibi gıda örneklerinden izole edilen toplam 60 *Enterococcus* izolatının en fazla vankomisin 60 (%100), kloramfenikol 60 (%100), teikoplanin 60 (%100), streptomisine 60 (%100) duyarlı, tetrasiklin 49 (%81,6) ve eritromisine 28 (%46,6) dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Ülkemizde son yıllarda yapılan Oruç ve ark. (2021) çalışmasında Türk beyaz peynirlerinden izole ettikleri *E.faecalis* ve *E.faecium* suşlarında çalıştıkları kloramfenikol (duyarlı), tetrasiklin (duyarlı), vankomisin (duyarlı), gentamisin (duyarlı), eritromisin (orta duyarlı) ve ampisilin (8 duyarlı ve 14 dirençli suş) antibiyotikleri ile elde ettikleri sonuçlar bizim sonuçlarımızı desteklemiştir [24].

Ülkemizde yapılan çalışmalarda Şanlıbaba ve ark. (2018) peynir ile yaptıkları çalışmada direnç fenotipini; kanamisin (%98.6), ampisilin (%48.8), siprofloksasin (%45.5), eritromisin (%18.8), tetrasiklin (%11.7), kloramfenikol (%4.2), gentamisin (%3.8) ve streptomisin (%1.4) şeklinde tespit etmişlerdir. Suşların hiçbirini vankomisine dirençli bulmamışlardır. *E. faecium* suşları antibiyotik direnç seviyeleri ile gösterildiği gibi *E.faecalis* suşlarından daha dirençli fenotipler göstermiş ve *E.faecium* ve *E.faecalis* suşlarının antibiyotiklere karşı dirençlerinin de istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (p<0.05). Toplamda, *E.faecium*'un %100'ü ve *E.faecalis* suşlarının %88,8'i birden fazla ilaca dirençli bulunmuştur [35].

Son yapılan araştırmalarda gıdalardan izole edilen *Enterococcus*'ların antibiyotik direnç özelliklerinin yanında potansiyel virülans faktörleri yönüyle de incelenmesinin gerektiği vurgulanmaktadır [1], [36], [37], [38], [39]. Araştırmamızda virülans karakterleri olarak *Enterococcus* türlerinin hemolitik aktivitesini *E.faecalis*'te 14 %82,3, *E.faecium*'da 3 %17,6 olarak saptadık. Lipaz ve jelatinaz aktivitesi negatif bulduk. DNAz aktivitesini bütün *E.faecalis*

(%100) ve *E.faecium* (%100) türlerinde pozitif gözlemledik. S-layer tabakası bulundurma oranlarını *E.faecalis*'te 20'si (%83,3), *E.faecium*'da 4 (%16,6) olarak gözlemledik.

Ülkemizde ise İspirli ve ark. (2017) Türk beyaz peyniri ile yaptıkları çalışmada *Enterococcus* suşları için tam hemolitik aktivite gözlemlenmemişler ve kısmi hemolitik aktivite olarak 12 suştan 8'inde gözlemlenmişlerdir [40].

Semedo ve ark. koyun peyniri ve süttten izole ettikleri 20 farklı türdeki 164 *Enterococcus* suşundan koyun kanlı agarda yaptıkları hemolitik aktivite sonucuna göre bütün suşlarda hemolitik aktivite gözlemlenmişler ve bu özelliğin *Enterococcus*'larda yaygın olduğunu tespit etmişlerdir [14].

Lauková ve ark. Slovakya'da 283 keçiden çiğ keçi sütü (53) örnekleri toplamış ve elde ettikleri *Enterococcus* izolatlarında jelatinaz genine rastlamamışlardır [41].

İgbinosa ve ark. (2020) çalışmalarında gıdalardan izole ettikleri 59 *Enterococcus* izolatının fenotipik virülans özelliklerinden: S-layer 59 (%100); jelatinaz üretimi 19 (%32,2); ve β -hemoliz, 21 (%35.6) şeklinde bulmuşlardır [8].

Semedo ve ark. çalışmalarında çoğunluğu gıda kaynaklı suşların (%63) %49'unda lipaz aktivitesi saptamıştır. Pozitif fenotipleri *E.faecalis* (%51), *E.durans* (16%) ve *E.faecium* (%11) olarak bulmuşlardır. %70'i gıda kaynaklı ve sadece %22'si klinik olan suşların %22'sinde deoksiribonükleaz (DNaz) üretimi tespit edilmiştir [14].

Semedo ve ark. (2003) ve İgbinosa ve ark. (2019) sonuçları ile çalışmamızda 60 *Enterococcus* izolatına uyguladığımız jelatinaz aktivitesinin negatif sonuç göstermesi jelatinaz aktivitesinin virülans karakteri olarak gıdalarda *Enterococcuslar*'da önemini ortaya çıkarmıştır [14], [8].

Biyofilmler çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylere geri döndürülemez şekilde bağlanmış ve ekzopolimerik maddeler, proteinler, polisakkaritler ve nükleik asitlerin hidratlı bir matrisine yerleştirilmiş bir hücre popülasyonudur. Biyofilmlerin yok edilmesi çok zordur ve birçok kronik enfeksiyonun kaynağıdır. Ulusal Sağlık Enstitüleri'ne göre biyofilmler tıbbi olarak önemlidir ve vücuttaki mikrobiyal enfeksiyonların % 80'inden fazlasını oluşturur [42].

Biyofilmlerdeki *Enterococcuslar*, planktonik olarak büyüyen *Enterococcus*'lara göre antibiyotiklere karşı daha dirençlidir, bu nedenle biyofilm oluşumunun potansiyel etkisi önemli olabilir [42].

Çalışmamızda çeşitli gıda örneklerinden izole edilen 60 adet *Enterococcus* spp. türü bakterinin Kongo Red Agar yöntemiyle bakılan biyofilm aktivitesi sonuçlarına göre 2'si (%3.3) kuvvetli, 22'si (%36.6) orta kuvvetli, 36'sı (%60) zayıf biyofilm pozitif bulunmuştur. En kuvvetli biyofilm oluşumu iki *E.faecium* izolatında saptanmıştır.

Mikroplak yöntemiyle bakılan biyofilm aktivite sonuçlarına göre ise 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılan 60 izolat arasında en yüksek biyofilm değerine sahip olanı süt örneğinden elde edilen *E.faecalis*'tir ve biyofilm değeri 595 nm'de 2,211'dir. Biyofilm değeri en düşük olan izolat ise *E.faecium* türüne ait olup yine süt örneğinden elde edilmiştir ve biyofilm değeri 595 nm'de 0,022'dir. 48 saatlik inkübasyon süresinde de biyofilm değeri yüksek olan izolatların çoğunlukla *E.faecalis* türüne ait olduğu görülmüştür.

Bu çalışmalar sonucu *E. faecalis* bakteri türlerinin *E.faecium* türlerine göre daha yüksek sayıda biyofilm oluşturduklarını gözlemledik. Bu veriler *E. faecalis*'in *E. faecium*'dan daha sık biyofilm ürettiğini ve biyofilm oluşumunun *Enterococcus* enfeksiyonunun patogeneğinde önemli bir faktör olabileceğini düşündürmektedir.

Mohamed ve ark. yaptığı çalışmada bir biyofilmin *E. faecalis* ve *E. faecium* tarafından farklı biyomateryaller üzerine yapışmasını ve üretimini göstermiş ve *Enterococcus*'ların biyofilm üretme yeteneği olarak üreteral stentler, intravasküler kateterler, safra stentleri ve silikon gastrostomi cihazları gibi çeşitli tıbbi cihazlara bağlanma kapasitesini göstermişlerdir [9].

Di Rosa ve diğer araştırmacılar *E. faecalis* suşlarının tamamına yakınında (%95,2) biyofilm oluşturma yeteneği tespit etmişlerdir. *E. faecalis* izolatlarının *E. faecium*'dan daha sık biyofilm ürettiğini öne sürmüşlerdir [43].

4. Sonuç

Amaçlarımız doğrultusunda elde ettiğimiz sonuçlar; gıda ürünlerinden izole edilen *Enterococcus*'lara çeşitli özellikler kazandıran virülans genler ve antibiyotik dirençliliği hakkında bilgiler ortaya konulmuş, direncin oluşmasını engelleme veya oluşan direnci azaltmaya yönelik ileride yapılacak çalışmalara yön verecektir. Bu bilgiler ışığında, direncin gelişiminin önlenmesinin önemi, dolayısıyla gıda ve hayvancılık işletmelerinde bilinçli ve kontrollü üretim yapılması gerekliliği vurgulanarak, ülke ekonomisi ve toplumun refah düzeyinin artırılması ile yaygın bir etki sağlayacaktır.

Bu çalışma ile normal floranın fırsatçı patojenleri olarak insanlarda, nozokomiyal kan dolaşımı, üriner sistem infeksiyonlarına, bakteriyemiye, endokardite, intraabdominal, yumuşak doku infeksiyonlarına ve neonatal sepsis gibi ciddi hastalıklara yol açan *Enterococcus*'ların gıda zinciri aracılığı ile insanlara bulaşabileceği bilincinin kazandırılması ve hayvansal gıda tüketiminin daha bilinçli yapılması gerektiği vurgulanmıştır.

Ayrıca *Enterococcus*'lardaki hemolitik aktivite, biyofilm oluşumu ve diğer virülans faktörleri klinik alanda izole edilen *Enterococcus* izolatlarının yanında gıda kaynaklı izolatlarda da bulunabileceği ve bakterinin patojenitesini etkileyebileceği düşünülmektedir.

5. Teşekkür

Çalışmamız, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Müdürlüğü'nün 05/2020-19 kodlu projesiyle desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürlerimizi sunarız.

Kaynakça

[1] Franz, C. M., Muscholl-Silberhorn, A. B., Yousif, N. M., Vancanneyt, M., Swings, J., & Holzapfel, W. H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4385-4389.

[2] Oryaşın, E. (2008). *Çeşitli çevresel kaynaklardan izole edilen enterokokların disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarının tespiti* (Doctoral dissertation, Adnan Menderes Üniversitesi).

[3] Klein, G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 123-131.

[4] İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., & Yıldırım, M. (2008). Identification and isolation of lactic acid bacterium having antimicrobial activity from traditionally produced cheese. *Journal of the Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University*.

[5] Khan, H., Flint, S., & Yu, P. L. (2010). Enterocins in food preservation. *International journal of food microbiology*, 141(1-2), 1-10.

[6] Toğay, S. Ö., & Temiz, A. (2011). Gıda kaynaklı enterokokların gıda ve insan sağlığı yönünden önemi. *Gıda*, 36(5), 303-310.

[7] Yu, M. K., Kim, M. A., Rosa, V., Hwang, Y. C., Del Fabbro, M., Sohn, W. J., & Min, K. S. (2019). Role of extracellular DNA in *Enterococcus faecalis* biofilm formation and its susceptibility to sodium hypochlorite. *Journal of Applied Oral Science*, 27.

[8] Igbinosa, I. H., Beshiru, A., Egharevba, N. E., & Igbinosa, E. O. (2020). Distribution of Enterobacteria in Ready-to-Eat Food in Cafeterias and Retail Food Outlets in Benin City: Public Health Implications. *Journal of Community Medicine and Primary Health Care*, 32(2), 80-94.

[9] Mohamed, J. A., & Huang, D. B. (2007). Biofilm formation by enterococci. *Journal of medical microbiology*, 56(12), 1581-1588.

[10] Bollinger, N., Hassett, D. J., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., & McDermott, T. R. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of iron override effects on quorum sensing and biofilm-specific gene regulation. *Journal of bacteriology*, 183(6), 1990-1996.

[11] Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(4), 999-1007.

[12] Kodeksi, T. G. (2011). Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. *RG*, 29(2011), 28157.

[13] Wayne, P. A. (2011). Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.

[14] Smedo, T., Almeida Santos, M., Martins, P., Silva Lopes, M. F., Figueiredo Marques, J. J., Tenreiro, R., & Barreto Crespo, M. T. (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2569-2576.

[15] Jeong, J. Y., Jo, Y. H., Kim, S. B., Liu, Q., Lee, J. W., Mo, E. J., ... & Lee, M. K. (2015). Pancreatic lipase inhibitory constituents from *Morus alba* leaves and optimization for extraction conditions. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 25(11), 2269-2274.

[16] Kanemitsu, K., Nishino, T., Kunishima, H., Okamura, N., Takemura, H., Yamamoto, H., & Kaku, M. (2001). Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. *Journal of microbiological methods*, 47(1), 11-16.

[17] Omar, N. B., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N. M., Franz, C. M., ... & Gálvez, A. (2004). Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(1), 118-130.

[18] Bernoth, E. M. (1990). Autoagglutination, growth on tryptone-soy-Coomassieagar, outer membrane protein patterns and virulence of *Aeromonas salmonicida* strains. *Journal of Fish Diseases*, 13(2), 145-155.

[19] Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Čirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891-899.

- [20]Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology*, 106(1), 1-24.
- [21]Ben Braïek, O., & Smaoui, S. (2019). Enterococci: between emerging pathogens and potential probiotics. *BioMed Research International*, 2019.
- [22]Ghosh, A., & Zurek, L. (2015). Antibiotic resistance in Enterococci: A food safety perspective. In *Antimicrobial Resistance and Food Safety* (pp. 155-180). Academic Press.
- [23]Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., & Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Frontiers in microbiology*, 9, 1791.
- [24]Oruc, O., Cetin, O., Darilmaz, D. O., & Yüsekdağ, Z. N. (2021). Determination of the biosafety of potential probiotic *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from traditional white cheeses. *LWT*, 148, 111741.
- [25]Pavia, M., Nobile, C. G., Salpietro, L., & Angelillo, I. F. (2000). Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *Journal of food protection*, 63(7), 912-915.
- [26]Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T. M., Condon, S., & Swings, J. (2002). Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3560-3565.
- [27]Saavedra, L., Taranto, M. P., Sesma, F., & de Valdez, G. F. (2003). Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 241-245.
- [28]G., Suzzi, M., Caruso, F., Gardini, A., Lombardi, L., Vannini, M. E., Guerzoni and M. T., Lanorte, “A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino),” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 89 pp. 2, 267-274, 2000.
- [29]Devriese, L. A., Pot, B., Van Damme, L., Kersters, K., & Haesebrouck, F. (1995). Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *International journal of food microbiology*, 26(2), 187-197.
- [30]Litopoulou-Tzanetaki, E. (1990). Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of Kefalotyri cheese. *Journal of Food Science*, 55(1), 111-113.
- [31]Çitak, S., Yucel, N., & Orhan, S. (2004). Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57(1), 27-31.
- [32]Citak, S., Yucel, N., & Mendi, A. (2005). Antibiotic resistance of enterococcal isolates in raw milk. *Journal of food processing and preservation*, 29(3-4), 183-195.
- [33]Jett, B. D., Huycke, M. M., & Gilmore, M. S. (1994). Virulence of enterococci. *Clinical microbiology reviews*, 7(4), 462-478.
- [34]Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS microbiology reviews*, 26(2), 163-171.
- [35]Sanlibaba, P., & Senturk, E. (2018). Prevalence, characterization and antibiotic resistance of enterococci from traditional cheeses in Turkey. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 1955-1963.
- [36]Hugas, M., Garriga, M., & Aymerich, M. T. (2003). Functionality of enterococci in meat products. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 223-233.
- [37]Hummel, A., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. (2007). Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Systematic and applied microbiology*, 30(1), 1-7.
- [38]Theilacker, C., Sanchez-Carballo, P., Toma, I., Fabretti, F., Sava, I., Kropec, A., ... & Huebner, J. (2009). Glycolipids are involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in *Enterococcus faecalis*. *Molecular microbiology*, 71(4), 1055-1069.
- [39]Carlos, A. R., Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, M. T., & Tenreiro, R. (2010). Transcriptional analysis of virulence-related genes in enterococci from distinct origins. *Journal of applied microbiology*, 108(5), 1563-1575.
- [40]İspirli, H., Demirbaş, F., & Dertli, E. (2017). Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish white cheese. *LWT*, 75, 358-365.
- [41]Lauková, A., Focková, V., & Pogány Simonová, M. (2021). Enterococcal Species Associated with Slovak Raw Goat Milk, Their Safety and Susceptibility to Lantibiotics and Duracin ED26E/7. *Processes*, 9(4), 681.
- [42]İlhan, G. Ü. N., & Ekinci, F. Y. (2009). Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda*, 34(3), 165-173.
- [43]Di Rosa, R., Creti, R., Venditti, M., D'Amelio, R., Arciola, C. R., Montanaro, L., & Baldassarri, L. (2006). Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS microbiology letters*, 256(1), 145-150.