



## Detection of Some Bacteriocin Genes in *Enterococcus faecium* Isolates Obtained from Mastitic Bovine Milk Samples

Yeter DELİBAŞ<sup>1</sup> Süheyla TÜRKYILMAZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Adnan Menderes University, Health Science Institute, Department of Veterinary Microbiology, Aydın, Turkey

<sup>2</sup> Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Aydın, Turkey

Received: 13.04.2017

Accepted: 22.11.2017

### SUMMARY

In this study, *Enterococcus faecium* isolates obtained from mastitis cattle were investigated for carrying the most important bacteriocin structural genes enterocin A (entA), enterocin B (entB), enterocin P (entP) genes. The study material was 620 milk samples taken from mastitic cattle. Enterococcal isolation was performed using classical bacteriological methods in selective media. Molecular methods were used to in order to conduct the identification of genus and species as well as the presence of enterocin genes. As a result of isolation studies, 15.5% (96 isolates) of enterococci were isolated; of which 13.5% (13 isolates) were *E. faecium*. entA and entB genes bacteriocin structural genes were determined to be 30.8% (4 isolates) and the entP gene 7.7% (1 isolate). There were two gene combinations: the first one with 23.0% (3 isolates) entA + entB gene combination and the second with 7.7% (1 isolate) entA + entB + entP genes. This study showed that *E. faecium* strains obtained from mastitic cattle milk could potentially synthesize bacteriocin because they have potency to carry bacteriocin genes. It is believed that further studies are needed to determine the distribution of bacteriocin genes in other enterococci isolated from bovine milk of mastitis and to search for potential use of bacteriocins in this area.

**Key Words:** *Enterococcus faecium*, Bovine, Mastitis, Bacteriocin, Gene

### ÖZET

## Mastitisli Sığır Süt Örneklerinden Elde Edilen *Enterococcus faecium* İzolatlarında Bazı Bakteriyosin Genlerinin Saptanması\*

Bu çalışmada mastitisli sığırlardan elde edilen *Enterococcus faecium* izolatlarının, en önemli bakteriyosin yapısal genleri olan enterosin A (entA), enterosin B (entB), enterosin P (entP) genlerini taşıma potansiyelleri araştırıldı. Çalışma materyalini 620 mastitisli sığırdan alınan süt örnekleri oluşturdu. Enterokok izolasyonu selektif besiyerinde klasik yöntemler kullanılarak gerçekleştirildi. Cins ve tür düzeyinde identifikasyon ile bakteriyosin gen varlıklarını belirlemek için moleküler yöntemler kullanıldı. İzolasyon çalışmaları sonucunda %15.5 (96 izolat) enterokok izole edilirken; bunların %13.5 (13 izolat)'unun *E. faecium* olduğu belirlendi. Bakteriyosin yapısal genlerinden entA ve entB genleri izolatların %30.8 (4 izolat)'inde belirlenirken; entP geni %7.7 (1 izolatta) bulunuyordu. İki gen kombinasyonu mevcuttu: Bunlardan birincisi %23.0 (3 izolat) oranında entA+entB gen kombinasyonu ikincisi ise %7.7 (1 izolat) oranında entA+entB+entP genlerinin birlikte görüldüğü kombinasyondur. Bu çalışma ile mastitisli sığır sütlerinden elde edilen *E. faecium* suşlarının bakteriyosin genlerini taşıma potansiyeline sahip oldukları dolayısı ile bakteriyosin sentezleyebilecekleri belirlendi. Mastitis sığır sütünden izole edilen diğer enterokoklarda bakteriyosin genlerinin dağılımını saptamak ve bakteriyosinlerin bu alanda kullanım potansiyelini aramak için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulduğuna inanılmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Enterococcus faecium*, Sığır, Mastitis, Bakteriyosin, Gen

### GİRİŞ

Bakteriyosinler bazı bakteriler tarafından sentezlenen küçük, ısıya dayanıklı peptidlerdir. Diğer bakterilere karşı etkilidirler ve üretici bakteri kendi bakteriyosinine karşı spesifik bağışıklık mekanizmasına sahiptir. Bakteriyosinlerin, birçok bakteri tarafından sentezlendiği

düşünölmektedir. Bakteriyosinler bakteriyosin üretmeyen diğer bakterilerin protein sentez mekanizmasını bozarak bunların ölümüne neden olmakta veya gelişimlerini engellemektedirler. Bunu yaparken muhtemelen bakteriyosin üretmeyen mikroorganizmalar üzerinde rekabet açısından bir üstünlük sağlayarak hayatta kalma şanslarını artırmaktadırlar (Franz ve ark. 2007).

Antibiyotiklere karşı dirençli suş oluşumu çok sık görülmesine rağmen, bakteriyosinlere karşı dirençli suş gelişimi oldukça nadirdir. Toksik değildir; renksiz, tatsız, kokusuzdur. Bakteriyosinler, veterinerlik ve tıp alanlarında doğal antibiyotik ve hastalıkları tedavi edici olarak kullanılırken gıda sektöründe de biyokoruyucu özelliğinden dolayı tercih edilmektedir (Foulque Moreno ve ark. 2006).

Bakteriyosin üreten suşların, aynı ekosistemde yaşayan bakteriyosin üretmeyen diğer bakteriler üzerine ekolojik üstünlüğü bulunmaktadır. Laktik asit bakterilerinden olan enterokoklar, üretici mikroorganizma ile yakından ilgili suşlara karşı inhibitör etkinliği olan enterosinler olarak isimlendirilen bakteriyosinler (antimikrobiyal peptidler) üretebilir (Nes ve ark. 2007).

Enterokoklar tarafından üretilen pek çok bakteriyosin bulunmakla birlikte; bunlardan en önemlileri enterosin A, enterosin B ve enterosin P'dir (Franz ve ark. 2007). entA, entB ve entP sırası ile bu bakteriyosinlerin yapısal genleridir. Bir enterokokta bakteriyosin yapısal genlerinin saptanması her zaman enterosin üretimi anlamına gelmez (Strompfova ve ark. 2008) ama bakteriyosin üretme potansiyeli olan izolatların pratik anlamda belirlenmesi açısından önemli olabilir. Pekçok araştırmacı enterosin yapısal geninin bulunmasının, ilgili enterosinin üretimi anlamına gelmediğini ve sessiz bakteriyosin genlerinin varlığını bildirilmişlerdir (Eaton ve Gasson 2001; Semedo ve ark. 2003; Poeta ve ark. 2007). Nes ve ark. (2007); bakteriyosin genlerinin belirlenmesinin ilgili bakterinin mutlaka antibakteriyel aktiviteye sahip olması gerektiğini ve saptanabilir antibakteriyel aktivitenin olmamasının da bakteriyosin üretimi olmadığı anlamına gelmediğini bildirilmiştir. Bunun nedeni, ilk olarak, bazı peptid bakteriyosinler hedef bakteri üzerine dar spektrumda etkili olabilir, bu da duyarlı bir indikatör kullanımı için anahtar bir öneme sahiptir. İkinci, peptid bakteriyosin üretiminin sıklıkla düzenlenmesidir. Antibakteriyel aktivite üretiminin yetersizliği genellikle fonksiyonel olmayan bir genetik sistemle ilişkilidir (Nes ve ark. 2007).

Gıda, yem, hayvan izolatları, klinik ve klinik olmayan insan izolatlarının ürettiği enterosinlerin incelendiği yayınlar (Du Toit ve ark. 2000; Del Campo ve ark. 2001; De Vuyst ve ark. 2003; Hugas ve ark. 2003) mevcut olmakla birlikte, mastitisli sığır sütlerinden izole edilen enterokok suşlarının bakteriyosin oluşturma kapasitelerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Kim ve

ark. 2008). Bu çalışmada da, bakteriyosin oluşturma potansiyellerinin incelenmesi amacı ile mastitisli sığır sütlerinden elde edilen toplam 30 izolat (*Aerococcus viridans*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus simulans*) 72 indikatör bakteri ile yumuşak agar yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Çalışma sonucunda, Kore'de subklinik mastitise neden olan baskın patojenlerden olan koagülaz negatif stafilkok (CNS) türleri de dahil olmak üzere indikatör suşlar üzerine *L. lactis*'in belirgin bir antibakteriyel etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da, yöremizde mastitisli sığır sütlerinden izole enterokok türleri içerisinde halk sağlığı açısından önemli bir tür olan *Enterococcus faecium* sıklığını belirlenmesi, bu izolatlarda en önemli bakteriyosin yapısal genlerinden olan entA, entB, entP genlerini taşıma potansiyellerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Materyal

Çalışmada materyal olarak, rutin teşhis amacı ile getirilmiş olan ve son iki yıl içerisinde saha çalışmaları esnasında toparlanan, hepsi laktasyon döneminde, son bir ayda antibiyotik tedavisi almamış, 3-9 yaşları arasında, Holştayn ırkı ineklerden, veteriner hekim tarafından alınmış 620 klinik veya subklinik mastitisli süt örneği kullanıldı. Klinik mastitisli ineklerde fiziksel muayenede meme loblarında anormallik (şişkinlik, sıcaklık, ağrı, kızarıklık ya da sulu, kanlı, pıhtılı süt gibi) gözlemlenirken; subklinik mastitisli olan ineklerin belirlenebilmesi amacı ile Kalifornia Mastitis Testi (CMT) kullanıldı.

### Besiyerleri

Süt örneklerinden selektif olarak enterokok türlerinin izolasyonu amacıyla Chromocult® Enterococci Broth (EB) (Merck) ve BBL™ Enterococcosel Agar (EA) (BD), organizmaların tuz toleranslarını tespit etmek için %6.5 NaCl içeren Nutrient Broth (NB) (Oxoid) ve izolatların saklanması için %20 gliserinli Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Merck) kullanıldı.

### Primerler

Çalışmada kullanılan primerlerin sekansları, ampikon uzulukları, hedef genleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Kullanılan primerler dizileri, ampikon uzunlukları, hedef genleri

**Table 1.** Sequences, amplicon lengths, target genes of used primers

Primer	Sekans (5'-3')	Ampikon uzunluğu (bp)	Hedef Gen	Kaynak
Ent1	TACTGACAAACCATTTCATGATG	112	<i>tuf</i>	Ke ve ark 1999
Ent2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC			
FAC11	GAGTAAATCACTGAACGA	1.091	<i>ddl E.faecium</i>	Vilela ve ark 2006
FAC21	CGCTGATGGTATCGATTTCAT			
entP	GCTACGCGTTTCATATGGTAAT TCCTGCAATATTCTCTTTAGC	87	Enterocin P	Cintas ve ark 1997
entA	GGTACCACTCATAGTGGAAA CCCTGGAATTGCTCCACCTAA	138	Enterocin A	De Vuyst ve ark 2003
entB	CAAAATGTAAGAATTAAGTACG AGAGTATACATTTGCTAACCC	201	Enterocin B	De Vuyst ve ark 2003

## Metot

### Enterokok İzolasyonu

Mastitisli sığırlardan alınan süt örnekleri laboratuvara getirildikten sonra, EB'a bir öze dolusu inokule edildiler. Buyyonlar aerob koşullarda 37°C'de, besiyerinin parlak sarı rengi mavi-yeşil renge dönüşüncüye kadar, yaklaşık 24-72 saat inkübe edildi. Daha sonra renk değişimi olan kültürlerden selektif EA'a ekimleri yapıldı. Besiyeri 37°C'de aerob koşullarda 24-48 saat süreyle inkübe edildi. Sürenin sonunda üreyen siyah, koyu kahverengi koloniler enterokok türleri yönünden şüpheli kabul edilerek incelenmek üzere tekrar EA'a pasajlandı.

### Enterococcus spp. ve E. faecium İdentifikasyonu

Enterokokların cins düzeyinde ayrımı için ekilen selektif besiyerinde siyah, koyu kahverengi üreyen enterokok şüpheli kolonilere Gram boyama, %6.5 tuz içeren NB'da üreme ve katalaz testleri yapıldı (Lanthier ve ark. 2010). Gram pozitif kok şeklinde görülen, %6.5 tuz içeren, NB'da üreyebilen ve katalaz negatif olan kolonilerin identifikasyonları için EA pasajları yapıldı ve 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Süre sonunda şüpheli koloniler PZR ile incelenene kadar -20°C'de %20 gliserinli BHIB içerisinde saklandı.

İzolatlardan DNA ekstraksiyonu ticari bir genomik DNA ekstraksiyon kiti (InstaGene Matrix, BIO-RAD, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. DNA saflık kontrolü ve miktar tayinleri yapıldıktan sonra PZR'da kullanıldı.

### PZR

Çalışmada enterokokları cins düzeyinde identifikasyonu için *tuf* geni (Ke ve ark. 1999), bu enterokoklar içerisinde *E. faecium*'un tür düzeyinde identifikasyonu için *ddl<sub>E.faecium</sub>* geni (Vilela ve ark. 2006) daha önceki çalışmalarda bildirildiği gibi PZR ile yapıldı. Çalışmada sikluslar 95 °C'de 5 dak. başlangıç denatürasyonu takiben; 95 °C'de 30 sn. denatürasyon, 52 °C (entP), 53 °C (*E. faecium*), 54 °C (entB), 55 °C (*Enterococcus* sp., entA) bağlanma, 72 °C 60 sn. uzama toplam 30 döngü, 72 °C'de 15 dak. son uzama olacak şekilde ayarlandı.

## BULGULAR

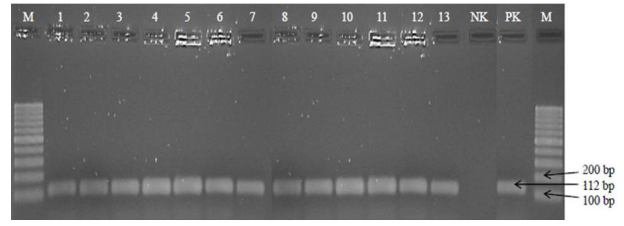
### İzolasyon

Bu çalışmada 620 klinik/subklinik mastitisli süt örneğinin incelenmesi sonucunda toplamda %15.5 (96 izolat) oranında enterokok şüpheli izolat elde edildi.

### PZR

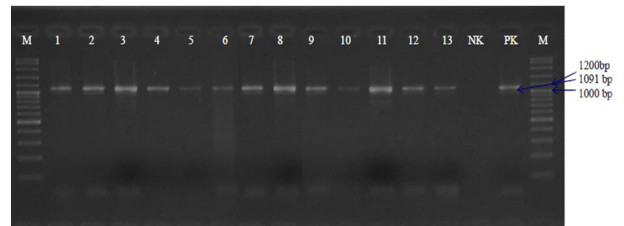
Doksan altı enterokok şüpheli izolat ile yapılan PZR sonrasında 96 izolatın hepsinde 112 bp uzunluğunda ampikon elde edildi ve *Enterococcus* spp. olarak tanımlandı (Şekil 1).

*Enterococcus* spp. olarak tanımlanan 96 izolat DNA'sı ile yapılan PZR sonrasında, izolatların 13 (%13.5)'ünde 1091 bp uzunluğunda ampikon elde edildi ve bunlar *E. faecium* olarak identifiye edildi (Şekil 2).



**Şekil 1.** *Enterococcus* sp.'nin *tuf* geninin PZR ile saptanması **1-13:** *Enterococcus* sp. saha izolatları **PK:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212, 112 bp) **NK:** Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** 100 bp DNA ladder (Vivantis)

**Figure 1.** The PCR assay of *tuf* gene for the detection of *Enterococcus* sp. **1-13:** *Enterococcus* sp. field isolates **PK:** Positive control for *tuf* gene (*E. faecalis* ATCC 29212, 112 bp), **NK:** Negative control (*E. coli* ATCC 35150) **M:** Marker (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Vivantis)

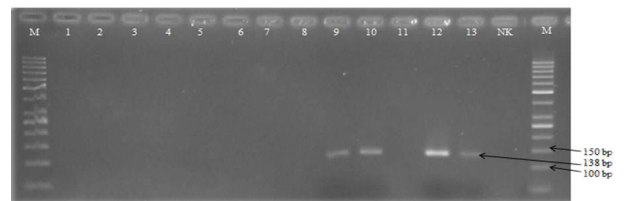


**Şekil 2.** *E. faecium*'nin *ddl<sub>E.faecium</sub>* geninin PZR ile saptanması belirlenmesi **1-13:** *E. faecium* saha izolatları **PK:** Pozitif kontrol (sekanslanmış saha izolatı, 1091 bp) **NK:** Negatif kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** Marker (100 bp DNA ladder, Vivantis)

**Figure 2.** The PCR assay of *ddl<sub>E.faecium</sub>* gene for the detection of *E. faecium* **1-13:** *E. faecium* field isolates **PK:** Positive control for *ddl<sub>E.faecium</sub>* gene (Sequenced field isolate, 1091 bp), **NK:** Negative control (*E. coli* ATCC 35150) **M:** Marker (100 bp DNA Ladder, Vivantis)

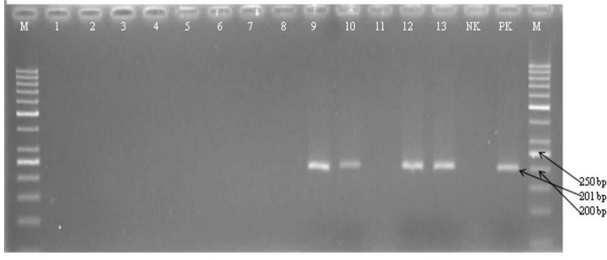
### Bakteriyosin Genleri (entA, entB, entP):

On üç *E. faecium* izolatının bakteriyosin genleri yönünden yapılan PZR incelemesi sonucunda izolatların %30.8 (4 izolat)'inin entA geni, %30.8 (4 izolat)'inin entB geni, %7.7 (1 izolat)'inin entP geni pozitif olduğu belirlendi (Şekil 3, Şekil 4, Şekil 5).



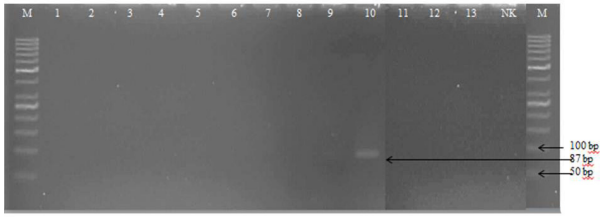
**Şekil 3.** entA geninin elektroforez görünümü **9,10,12,13.** entA pozitif izolatlar (138 bp) **NK:** Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** Marker (50 bp DNA Ladder, Vivantis)

**Figure 3.** Electrophoresis image of entA gene **9,10,12,13.** entA positive isolates (138 bp) **NK:** Negative control (*E. coli* ATCC 25922) **M:** Marker (50 bp DNA Ladder, Vivantis)



**Şekil 4.** entB geninin elektroforez görünümü **9,10,12,13.** entB pozitif izolatlar (201 bp) **NK:** Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** Marker (50 bp DNA Ladder, Vivantis)

**Figure 4.** Electrophoresis image of entB gene **9,10,12,13.** entB positive isolates (201 bp) **NK:** Negative control (*E. coli* ATCC 25922) **M:** Marker (50 bp DNA Ladder, Vivantis)



**Şekil 5.** entP geninin elektroforez görünümü **10.** entP pozitif izolatlar (87 bp) **NK:** Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922) **M:** Marker (50 bp DNA Ladder, Vivantis)

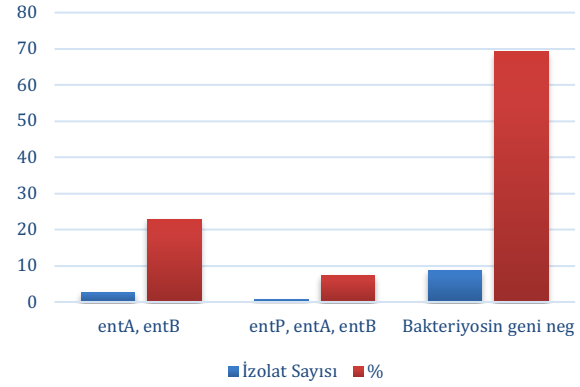
**Figure 5.** Electrophoresis image of entP gene **10.** entP positive isolates (87 bp) **NK:** Negative control (*E. coli* ATCC 25922) **M:** Marker (50 bp DNA Ladder, Vivantis)

**Tablo 2.** *E. faecium* izolatlarının taşıdığı bakteriyosin genleri

**Table 2.** Bacteriocin genes carried by *E. faecium* isolates

	entP	entA	entB	Bakteriyosin gen kombinasyonları
1	-	-	-	
2	-	-	-	
3	-	-	-	
4	-	-	-	
5	-	-	-	
6	-	-	-	
7	-	-	-	
8	-	-	-	
9	-	+	+	entA, entB
10	+	+	+	entP, entA, entB
11	-	-	-	
12	-	+	+	entA, entB
13	-	+	+	entA, entB
Toplam	1	4	4	
(%)	(7.7)	(30.8)	(30.8)	

Sonuçlar bakteriyosin yapısal gen kombinasyonları yönünden değerlendirildiğinde ise iki gen kombinasyonu mevcuttu: Bunlardan birincisi %23.0 (3 izolat) oranında entA+entB gen kombinasyonu ikincisi ise %7.7 (1 izolat) oranında entA+entB+entP genlerinin birlikte görüldüğü kombinasyondur (Tablo 2, Şekil 6).



**Şekil 6.** *E. faecium* izolatlarının taşıdığı bakteriyosin gen kombinasyonları

**Figure 6.** Bacteriocin gene combinations carried by *E. faecium* isolates

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Enterokok cinsi bakteriler üzerine olan ilgi son yıllarda, bu bakterilerin önemli nazokomial patojenler olarak kabul edilmeleri ile birlikte, transfer edilebilir veya kazanılabilir çoklu antibiyotik dirençliliklerinin bulunması nedeni ile artmıştır (Eaton ve Gasson 2001). Enterokok cinsi bakteriler insanların ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde yaşayan saprofit bakterilerdirler bu karmaşık ekosistemde hayatta kalmak için ortamdaki diğer mikroorganizmalarla rekabet etmek zorundadırlar (Lorenzelli 1994; Turtura ve Giraffa 1995).

Bakteriyosin üreten suşların, aynı ekosistemde yaşayan bakteriyosin üretmeyen diğer bakteriler üzerine ekolojik üstünlüğü bulunmaktadır. Farklı orjinlerden izole edilen enterokok suşlarının ürettiği enterosinlerin incelendiği yayınlar bulunmaktadır (De Vuyst ve ark. 2003; Hugas ve ark. 2003). Bakteriyosin üreten enterokokların önemli bir kısmı gıdalardan (peynir, et, balık, sebze) insanlar ve hayvanlardan (Foulquie ve ark. 2006; Brandão ve ark. 2010) izole edilmektedir. Bakteriyosin üreten enterokoklar aynı zamanda çöplerden (Laukova ve Jurin 1997), atık sulardan (Marekova ve ark. 2007), farklı ruminantların rumen içerikleri ve hayvansal atıklardan (Laukova ve Marekova 2001) izole edilmiştir. Bununla birlikte hayvansal kaynaklardan izole edilmiş olan enterokok izolatlarının incelendiği çalışmalar sınırlı olmakla birlikte (Du Toit ve ark. 2000; Del Campo ve ark. 2001; De Vuyst ve ark. 2003), mastitisli sığır sütlerinden izole edilen enterokok suşlarının bakteriyosin oluşturma kapasitelerinin incelendiği tek bir çalışmaya rastlanılmıştır (Kim ve ark. 2008). Bu çalışmada da, enterokokların yalnızca fenotipik olarak bakteriyosin oluşturabilme kapasiteleri belirlenmiş olup gen taşıma potansiyelleri incelenmemiştir.

Sınıf II bakteriyosinler 3 grupta incelenir. Birinci grupta pediosin ailesinin enterosinleri olan enterosin A ve enterosin P bulunur. İkinci grupta, lider peptid olmaksızın sentezlenen bakteriyosinlerden olan enterosin L50A/B, üçüncü grupta ise yine biyokimyasal yapıları daha farklı lineer pediosin olmayan enterosinlerden olan enterosin B yer almaktadır (Nilsen ve ark. 2003). Farklı orjinlerden izole edilmiş olan *E. faecium* suşlarında tekli ve çoklu enterosin yapısal genlerinin varlığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Poeta ve ark. 2006; Poeta ve ark. 2007; Özdemir ve ark. 2011). Yapılan bu çalışmalar genellikle dışkı, çevresel örnekler ve gıdalardan izole edilen

enterokok suşları üzerine odaklanmıştır. Yapılan bir çalışmada kümes hayvanlarının dışkı örneklerinden 76 enterokok (43 *E. faecalis*, 30 *E. faecium*, 2 *E. durans*, 1 *E. hirae*) izole edilmiş ve bu enterokoklarda bakteriyosin gen varlığı PZR ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda entA ve entB genleri 9 *E. faecium* izolatında belirlenmiştir (Poeta ve ark. 2006). Başka bir çalışmada, entA 15 *E. faecium* suşunda tespit edilmekle birlikte bunlardan 12 tanesinde entB geninin de bulunduğu bildirilmiştir (Poeta ve ark. 2007). Aynı çalışmada, entA, entB, ve entP gen kombinasyonu yarıcık bir kuş ve bir tilkiden elde edilmiş olan 2 *E. faecium* izolatında saptanmıştır (Poeta ve ark. 2007). Başka bir çalışmada ise, çevresel örneklerden izole edilen 57 enterokok (34 *E. faecium*, 6 *E. hirae*, 4 *E. casseliflavus*, 4 *E. durans*, 4 *E. faecalis*, 3 *E. mundtii* ve 2 *E. avium*) izole edilmiş; bunlardan 34 *E. faecium* izolatlarının 22'sinin entA, entB, entP; 9'unun entA, entB, birinin entA ve entP yapısal genlerini taşıdığını bildirilirken 2 izolatın herhangi bir yapısal gen taşımadığı belirlenmiştir (Özdemir ve ark. 2011)

Yapılan çalışmalarda bakteriyosin üreten enterokok izolatlarının yüksek gen taşıma potansiyellerinin olduğu bildirilmektedir (Casaus ve ark. 1997; Cintas ve ark. 2000; Poeta ve ark. 2007). Bazı çalışmalarda fermente gıdalardan izole edilmiş enterokoklarda birden fazla bakteriyosin kodlayan genin PZR ile saptanmasının çok sık görüldüğü bildirilmekle birlikte (Edalatian ve ark. 2012), Özden Tuncer ve ark. (2013) peynirden izole ettikleri 3 *E. faecium* suşunun birinin entA ve entB, ikisinin ise entA, entB ve entP taşıdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde 3 farklı genin 2 farklı kombinasyonuna rastlanılmıştır. Bunlar %23.0 oranında (3 izolat) entA+entB ve %7.7 oranında (1 izolat) entA+entB+entP genlerinin birlikte görüldüğü gen kombinasyonlarıydı. Yapılan pek çok çalışmada da benzer gen kombinasyonları bildirilmektedir (Poeta ve ark. 2006; Poeta ve ark. 2007; Brandão ve ark. 2010; Özdemir ve ark. 2011). Enterokoklar arasında genetik materyalin suşlar arasında aktarılması, sık görülen enterosin genlerinin dağılımını sağlamış olabilir (Strompfova ve ark. 2008).

Kanatlı hayvan ve domuz üretiminde bakteriyosinler ve bakteriyosin üreten bakterilerin potansiyel avantajlarından yararlanılmaktadır. Saflaştırılmış veya yarı saflaştırılmış bakteriyosinler hayvanları korumak için hayvan yemine katkı maddeleri olarak doğrudan ilave edilebilir. Alternatif olarak, bakteriyosin üreten bakteriler, probiyotikler olarak kullanılabilir ve bakteriyel patojenlere karşı kolonizasyon ve koruma sağlamak için hayvanlara inoküle edilebilir. Her iki prosedür de gıda kaynaklı patojenler kadar hayvan patojenlerini de azaltabilir. Sonuç olarak, bu, antibiyotik dirençli bakterilerin ortaya çıkmasını, ekonomik kayıpları ve insan sağlığına olumsuz etkileri azaltabilir. Birçok ülke antibiyotik kısıtlayıcı politikalar geliştirdiğinde, alternatif antimikrobiyallere duyulan ihtiyaç yeni bakteriyosinlerin belirlenmesinde ve mevcut bakterilerin test edilmesinde temel itici güç olacaktır (Ben Lagha ve ark. 2017).

Hayvan üretiminde yarı saflaştırılmış bakteriyosinler veya bakteriyosin üreten bakterilerin kullanılması muazzam bir araştırma ve pazarlama potansiyeli olan bir alandır. Bakteriyosinler, bakteriyel hastalıkların önlenmesi veya tedavisi için antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilir (Ben Lagha ve ark. 2017). Bakteriyosinler, sadece antimikrobiyal büyüme promotörlerine alternatif değil, aynı zamanda hayvan hastalıklarının önlenmesi, kontrolü ve tedavileri için umut verici terapötik ajanlar olarak da düşünülmektedir. Birkaç çalışma, efektif antimikrobiyal terapötikler veya profilaktik olarak saflaştırılmış

bakteriyosin potansiyelini araştırmış ve umut verici sonuçlar vermiştir (Ogunbanwo ve ark. 2004, Cole ve ark. 2006). Bununla birlikte, her bir bakteriyosinin üretim maliyeti, dozajı, zamanlaması ve in vivo aktivitesi de dahil olmak üzere ele alınması gereken bir takım hususlar halen devam etmektedir. Yapılan ilginç bir çalışmada, balıklardan bakteriyosin üreten *Bacillus* türleri izole edilmiş ve bu bakteriyosinlerin, sığır mastitis patojenlerine karşı antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılabilir potansiyelleri incelenmiş bu *Bacillus* izolatlarının, sığır mastitis patojenlerinin önlenmesi için arzu edilen özelliklere sahip olduğu ve potansiyel bir uygulama ile cazip aday olabileceği bildirilmiştir (Wanjiru Maina 2015).

Bakteriyosinler atık sularda ve gübrede bulunan patojenik bakterin insanlara bulaşmasını sınırlandırmak için de kullanılabilir (Lauková ve ark. 2000). Bu uygulamalar kümes hayvanları ve domuz sanayilerine aktarılabilir ancak bu olasılığı doğrulamak için daha fazla araştırma gerekmektedir (Ben Lagha ve ark. 2017).

Sonuç olarak, bu çalışma yörenizde mastitisli sığır sütlerinden elde edilen enterokoklar içerisinde, halk sağlığı açısından oldukça önemli bir tür olan, *E. faecium* izolasyon oranının düşük olduğunu gösterdi. Bununla birlikte, *E. faecium* izolatları enterosin yapısal genlerini taşıma dolayısı ile bakteriyosin oluşturabilme potansiyeline sahip idi. Enterosin genlerinden entA, entB ve entP genleri, genellikle farklı kombinasyonlarda birlikte taşınıyordu. Bu şekilde birden çok enterosin genini içeren dört *E. faecium* izolatının çeşitli enterosinleri üretebilen genetik potansiyelleri yüksek izolatlar oldukları düşünülebilir. Enterokoklarda bakteriyosin yapısal genlerinin farklı kombinasyonlarının yaygın görülmesi onların biyoteknolojik uygulamalarda, gıda veya ilaç endüstrisinde ya da insan ya da hayvan sağlığında probiyotik olarak kullanımları için uygun olabilir.

## TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Adnan Menderes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından VTF-15071 nolu proje olarak desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Ben Lagha A, Haas B, Gottschalk M, Grenier D (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Vet Res* 48:22. DOI 10.1186/s13567-017-0425-6
- 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.
- Casaus P, Nilsen T, Cintas LM, Nes, IF, Hernández PE, Holo H (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin. *Microbiol-SGM*, 143, 2287-2294.
- Cintas LM, Casaus P, Håvarstein LS, Hernandez PE, Nes IF (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl Environ Microbiol*, 63, 4321-4330.
- Cole K, Farnell MB, Donoghue AM, Stern NJ et al., (2006). Bacteriocins reduce *Campylobacter* colonization and alter gut morphology in turkey poults. *Poult Sci* 85:1570-1575.
- De Vuyst L, Foulquie Moreno MR, Revets H (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int J Food Microbiol*, 84, 299-318.
- Del Campo R, Tenorio C, Jimenez-Diaz R, Rubio C, Gomez-Lus R, Baquero F, Torres C (2001). Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrob Agents Ch*, 45, 905-912.
- Du Toit M, Franz CM, Dicks LM, Holzapfel WH (2000). Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J Appl Microbiol*, 88, 482-494.

- 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.
- Edalati MR, Najafi MBH, Mortazavi SA (2012). Production of bacteriocins by *Enterococcus* spp. isolated from traditional, Iranian, raw milk cheeses, and detection of their encoding genes. *Eur Food Res Tech Z Lebensm Unters Forsch*, 234, 789–796.
- Foulquie Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, DeVuyst L (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol*, 106, 1–24.
- Franz CM, Worobo RW, Quadri LEN, Schillinger U, Holzapfel WH, Vederas JC, Stiles ME (1999). A typical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl Environ Microbiol*, 65, 2170–2178.
- Franz CMAP, Van Belkum M, 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.
- Hugas M, Garriga M, Aymerich MT (2003). Functionality of enterococci in meat products. *Int J Food Microbiol*, 88, 223–233.
- Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG (1999). Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol*, 37, 3497–3503.
- Kim SY, Park YK, Kim SH, Shin S, Koo HC, Youn JH, So JH, Paik HD, Park YH, Choi KY (2008). Isolation of bacteriocin producing bacteria from bovine milk effective to bovine mastitis-causing and other antibiotic-resistant bacteria. *The Congress of FAVA, FAVA - OIE Joint Symposium on Emerging Diseases*, 27-30 October, Bangkok, Thailand.
- Lanthier M, Scott A, Lapen D, Zhang Y, Topp E (2010). Frequency of virulence genes and antibiotic resistances in *Enterococcus* sp. isolates from wastewater and feces of domesticated mammals and birds, and wildlife. *Can J Microbiol*, 56, 715–29.
- Laukova A, Jurin P (1997). Distribution and characterization of *Enterococcus* species in municipal sewages. *Microbios*, 97, 73–80.
- Laukova A, Marekova M (2001). Production of bacteriocins by different enterococcal isolates. *Folia Microbiologica*, 46, 49–52.
- Lorenzelli P (1994). Gram-positive cocci isolated from slaughtered poultry. *Microbiol Res*, 149, 203–213.
- Marekova M, Laukova A, Skaugen M, Nes I (2007). Isolation and characterization of a new bacteriocin, termed enterocin M, produced by environmental isolate *Enterococcus faecium* AL41. *J Ind Microbiol Biot*, 34, 533–7.
- Nes IF, Diep DB, Holo H (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol*, 189, 1189–98.
- Nilsen T, Nes IF, Holo H (2003). Enterolysin A, a cell wall degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl Environ Microbiol*, 69, 2975–2984.
- Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA (2004). Influence of bacteriocin in the control of *Escherichia coli* infection of broiler chickens in Nigeria. *World J Microbiol Biotechnol* 20, 51–56.
- Özdemir BG, Oryaşın E, Biyık HH, Özteber M, Bozdoğan B (2011). Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. *Indian J Microbiol*, 51, 182–187.
- 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. *Turkish J Biol*, 37, 443–449.
- Poeta P, Costa D, Rodrigues J, Torres C (2006). Detection of genes encoding virulence factors and bacteriocins in fecal enterococci of poultry in Portugal. *Avian Dis*, 50, 64–68.
- Poeta P, Costa D, Rojo-Bezarez B, Zarazaga M, Klibi N, Rodrigues J, Torres C (2007). Detection of antimicrobial activities and bacteriocin structural genes in faecal enterococci of wild animals. *Microbiol Res*, 162, 257–263.
- Semedo T, Santos MA, Martins P, Lopes MFS, Marques JFF, Tenreiro R, Crespo MTB (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J Clin Microbiol*, 41, 2569–2576.
- Strompřová V, Lauková A, Simonová M, Marcináková M (2008). Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. *Vet Microbiol*, 132, 293–301.
- Turtura GC, Giraffa G (1995). Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol*, 12, 291–299.
- Vilela MA, de Souza SL, Palazzo ICV, Ferreira JC, de Morais Jr MA, da Costa Darini AL, de Morais MMC (2006). Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Northeast of Brazil. *Mem I Oswaldo Cruz*, 101, 716–719.
- Wanjiru MJ (2015). Isolation, identification and screening of *Bacillus* species from *Rastrineobola argentea* (Omena) for production of bacteriocins active against bovine mastitis pathogens (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*). Jomo Kenyatta University, Food Science and Nutrition Master's Thesis.