



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

SÜTE UYGULANAN ÖN İŞLEMLER ve PEYNİR ÜRETİMİNDE  
PROBİYOTİK MİKROORGANİZMALAR ile *Clostridium*  
*difficile* 'NİN ÖNLENMESİ  
DOKTORA TEZİ

GİZEM TAYLAN YALÇIN

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. NÜKHET NİLÜFER ZORBA

ÇANAKKALE-2023





T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**SÜTE UYGULANAN ÖN İŞLEMLER ve PEYNİR ÜRETİMİNDE PROBIYOTİK  
MİKROORGANİZMALAR ile *Clostridium difficile* 'NİN ÖNLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

GİZEM TAYLAN YALÇIN

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. NÜKHET NİLÜFER ZORBA

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje  
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FDK-2021-3497.

ÇANAKKALE – 2023



T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Gizem TAYLAN YALÇIN tarafından Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA yönetiminde hazırlanan ve **29/08/2023** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Süte Uygulanan Ön İşlemler ve Peynir Üretiminde Probiyotik Mikroorganizmalar ile *Clostridium difficile*'nin Önlenmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**İmza**

Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA

.....

(Danışman)

Prof. Dr. Yonca YÜCEER

.....

Prof. Dr. Alper AKÇALI

.....

Prof. Dr. Gülten TİRYAKİ GÜNDÜZ

.....

Doç. Dr. Ayşe Handan BAYSAL

.....

Tez No : 10578915

Tez Savunma Tarihi : 29/08/2023

.....  
Prof. Dr. Ahmet Evren ERGİNAL

Enstitü Müdürü

../09/2023

## ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Gizem TAYLAN YALÇIN

29/08/2023

## TEŞEKKÜR

Lisans döneminden itibaren bana mikrobiyoloji alanında çalışma fırsatı veren, bu güne kadar çalışmalarımız süresince karşılaştığımız tüm zorluklara rağmen benden yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA'ya, değerli görüşleri ile tezime katkıda bulunan tez izleme komitesinde yer alan sayın hocalarım Prof. Dr. Alper AKÇALI ve Prof. Dr. Yonca YÜCEER'e

Çalışmam süresince kullandığımız probiyotik kültürlerin temininde desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Yonca YÜCEER ve Prof. Dr. Sercan KARAV'a,

Gerçekleştirdiğim tüm analizler boyunca, zorlu peynir üretim süreçleri de dahil, her aşamda yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen çok sevgili laboratuvar çalışma arkadaşlarım Melike Nur TOSUN'a ve Gizem KORKMAZER'e

Hayatımın her alanında beni maddi ve manevi olarak destekleyen, zor zamanlarımda gücümü toplamama yardım eden ve asla pes etmeme izin vermeyerek güçlü kılan sevgili annem Hanife TAYLAN'a, babam Talip TAYLAN'a ve kardeşim Didem Lale TAYLAN'a, doktora sürecimin tüm zorluklarına katlanarak hayatıma katılan sevgili eşim Semih YALÇIN'a ve çoğu zaman göz yaşları, bolca emek ve gözyaşları ile geçen bu süreçte sabrım için kendime,

Çalışmam süresince çeşitli aşamalarda desteğini aldığım Arş. Gör. Murat BERBER'e ve adını sayamadığım ancak çalışmamda büyük küçük demeden katkılarını sunan herkese sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen süt ve peynirlerde *C.difficile* aranması kısmı TÜBİTAK 1200998 no'lu proje tarafından desteklenmiş olup desteklerinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu TÜBİTAK'a teşekkür ederim. Tez kapsamında gerçekleştirilen diğer araştırmalar ise Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından (Proje No: FDK 2021-3497 ) ile desteklenmiş olup desteklerinden dolayı Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim. Ayrıca doktora süresince eğitimime 100/2000 projesi (Gıda üretimi İşleme ve Teknolojisi) programı kapsamında destek veren Yüksek Öğretim Kurulu (YÖK)'na, teşekkür ederim,

Gizem TAYLAN YALÇIN

Çanakkale, Ağustos 2023



## ÖZET

### SÜTE UYGULANAN ÖN İŞLEMLER VE PEYNİR ÜRETİMİNDE PROBİYOTİK MİKROORGANİZMALAR İLE *Clostridium difficile* 'NİN ÖNLENMESİ

Gizem TAYLAN YALÇIN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA

29/08/2023, 176

Bu çalışmada, süt ve peynirlerde *C.difficile* varlığının araştırılması, süte uygulanan baktofugasyon ve ısısal işlemlerin *C.difficile*'nin kontrolündeki etkisinin belirlenmesi ve probiyotik mikroorganizmaların *C.difficile* kontrolünde kullanılabilirliğinin *in-vitro* ve peynir üretiminde araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada 91 süt ve 110 peynir incelenmiş, sütlerde %2,19'sinde *C.difficile* varlığı tespit edilirken peynirlerde *C.difficile* tespit edilememiştir. *C.difficile* sporlarının süttten eliminasyonu amacıyla D değerleri 5 farklı sıcaklık için belirlenmiştir. Sonuçlar iki farklı modelle değerlendirilmiştir. D<sub>85</sub> değerleri Log-lineer modelde 10,85-9,55 dk arasında iken Weibull modelinde 2,75-0,53 dk arasında belirlenmiştir. Sütteki *C.difficile* sporlarının eliminasyonu için baktofugasyon benzeri santrifüj işlemleri (4000,10000, 12000 g -10-15 dk) uygulanmış ancak *C. difficile* sporlarında 1-log spor/mL'den daha az azalma gösterdiği tespit edilmiştir. *C. difficile* inhibisyonunun belirlenmesi amacıyla probiyotik kültürler *in-vitro* yöntemlerle incelenmiştir. İnhibisyon zonlarının 14,25-78,96 mm arasında değiştiği belirlenmiştir. En yüksek inhibisyon zonu ticari probiyotik kültür karışımının *C.difficile* ATCC 700057'ye karşı kullanıldığında gözlenmiştir. Ayrıca inhibisyonun hangi tip bileşiklerden kaynaklandığının belirlenebilmesi amacıyla probiyotiklere ait hücresiz süpernatantlar sonra denenmiştir. Çalışmamızda kullanılan probiyotiklerin inhibisyon etkilerinin yalnızca asidik bileşiklerden kaynaklanmadığı belirlenmiştir. Etkin probiyotik kültürlerden seçilerek peynir üretimi ve olgunlaştırılması süreçlerinde *C. difficile*'nin önlenmesi amaçlanmıştır. Bu probiyotik karışımların peynirde 90 günlük olgunlaştırma sonunda *C.difficile* sporlarında 1-logaritmik azalma sağladığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, süt ve ürünlerinde



*C. difficile*'nin düşük oranda da olsa tespiti halk sağlığı riskinin göstergesidir. Süte uygulanan ısıt işlemlerde sporların 5-log luk azalmasını sağlayacak parametreler 85°C'de 15dk olarak önerilebilir. Baktofugasyon uygulamasının tek başına *C.difficile* sporlarını azaltıcı etkisi gözlenmemiş dolayısıyla ısıt işlemler ile kullanımının denenmesi önerilmiştir. Çalışmada kullanılan probiyotiklerin doğrudan veya peynir starter kültürü olarak, *C.difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde destek amacıyla kullanılma potansiyeli değerlendirilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** *Clostridioides difficile*, Spor, Termal direnç, Baktofügasyon, Probiyotikler, Peynir üretimi

## ABSTRACT

### ***Clostridium difficile* PREVENTION BY APPLYING PRETREATMENTS TO MILK AND USING PROBIOTICS IN CHEESE PRODUCTION**

Gizem TAYLAN YALÇIN

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Doctoral Dissertation in Food Engineering

Advisor: Assoc. Professor Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA

29/08/2023, 176

In this study, it was aimed to investigate the presence of *C. difficile* in milk and cheeses, to determine the effect of bacto-fugation and thermal treatments of milk on the control of *C. difficile*, and to investigate the utility of probiotic microorganisms in the control of *C. difficile* under in vitro and in cheese production. Ninety-one milk and 110 cheese samples examined and while the presence of *C. difficile* was detected in 2.19% of the milk samples, *C. difficile* could not be detected in the cheese samples. To eliminate *C. difficile* spores from milk, D values of *C. difficile* spores in milk were determined for 5 different temperatures. The results were evaluated using two different models. D<sub>85</sub> values were determined between 10.85 and 9.55 minutes for the log-linear model and between 2.75 and 0.53 minutes for the Weibull model. Bacto-fugation-like centrifugation processes (4,000, 10,000, 12,000 g - 10-15 min) were used to eliminate *C. difficile* spores in milk, but the decrease in *C. difficile* spores was found to be less than 1 log spores/mL was recorded. Probiotic cultures were examined with in-vitro methods to determine their effectiveness in *C. difficile* inhibition. It was determined that the obtained inhibition zones varied between 14.25-78.96 mm. The highest inhibition zone was observed when the commercial probiotic culture mixture was used against *C. difficile* ATCC 700057. Furthermore, to determine what type of compounds caused this inhibitory effect, cell-free supernatants It was found that the inhibitory effect of the probiotics used in our study was

not solely attributed to acidic compounds. Culture mixtures effective probiotic cultures were selected to prevent *C. difficile* during the cheese production and ripening processes. It was determined that these probiotic mixtures provided 1-log reduction in *C. difficile* spores after 90 days of ripening in cheese. As a result, the detection of *C. difficile* in milk and dairy products, although at a low rate, is an indicator of the public health risk. In thermal treatments applied to milk, the parameters that will provide a 5-log reduction in spores can be recommended as 85°C for 15 minutes. Since the effect of bacto-fugation alone in reducing *C. difficile* spores was not enough, it was recommended to combine it together with thermal treatments. The potential of the probiotics used in the study to be used directly or as a cheese starter culture to support the treatment of *C. difficile* infections can be evaluated.

**Keywords:** *Clostridioides difficile*, Spore, Thermal resistance, Bactofugation, Probiotics, Cheese production

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
JÜRİ ONAY SAYFASI.....	İ
ETİK BEYAN.....	İi
TEŞEKKÜR.....	İii
ÖZET .....	V
ABSTRACT .....	Vii
İÇİNDEKİLER .....	İx
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	Xiv
TABLolar DİZİNİ.....	Xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	Xix
<b>BİRİNCİ BÖLÜM</b>	
<b>GİRİŞ</b>	
	1
<b>İKİNCİ BÖLÜM</b>	
<b>ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b>	
	4
2.1. <i>Clostridium spp</i> .....	4
2.2. <i>Clostridium (Clostridioides) difficile</i> .....	5
2.2.1. Tanımlayıcı özellikleri / Morfolojik ve Özellikleri.....	5
2.2.2. Antimikrobiyal Direnç.....	7
2.2.3. Virülans Faktörleri.....	9
Toksinler.....	10
Spor.....	12
Kamç (Flagella).....	15
Diğer Faktörler.....	16
2.3. <i>Clostridium (Clostridioides) difficile</i> Enfeksiyonları.....	17
2.3.1. <i>C. difficile</i> Enfeksiyonlarının Tedavisi.....	19
<i>C. difficile</i> 'nin Probiyotik Mikroorganizmalar ile Önlenmesi.....	20
2.3.2. Toplum ile İlişkili <i>C. difficile</i> Enfeksiyonları.....	22
Çevresel Kaynaklarda <i>C. difficile</i> Varlığı.....	23

Hayvanlarda <i>C. difficile</i> Varlığı.....	24
Gıdalarda <i>C. difficile</i> Varlığı.....	26
Hayvansal Ürünlerde <i>C. difficile</i> Varlığı.....	27
Gıdalarda <i>C. difficile</i> Sporlarının Önlenmesi.....	30

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL YÖNTEM

3.1. Araştırma Planı.....	34
3.2. Araştırma 1 Süt ve Peynir örneklerinde <i>C. difficile</i> Varlığının Belirlenmesi.....	36
3.2.1. Çiğ Süt ve Peynir Örneklenmesi.....	36
3.2.2. Elde edilen <i>C. difficile</i> İzolatlarının Tanımlanması.....	39
İzolatların API 32 A ile Tanımlanması.....	39
Multiplex real-time PCR ile Doğrulama.....	40
DNA Ekstraksiyonu.....	40
Direkt Şüpheli Koloniden DNA Ekstraksiyonu.....	40
Ön Zenginleştirme Sıvısından DNA Ekstraksiyonu.....	41
İzolatlarda <i>C. difficile</i> Trioz Fosfat izomeraz (tpi) Gen Varlığının PCR ile belirlenmesi.....	41
3.2.3. İzolatların Toksin Tiplerinin Belirlenmesi.....	44
Toksin A ve Toksin B'nin Belirlenmesi.....	44
Binary Toksinin Belirlenmesi.....	46
3.2.4. İzolatların Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi.....	47
3.3. Araştırma 2 Süte Uygulanan Isıl İşlemlerin <i>C. difficile</i> Sporları Üzerine Etkisi.....	48
3.3.1. Spor Süspansiyonlarının Hazırlanması.....	48
3.3.2. Spor Süspansiyonlarının Süte İnokülasyonu.....	49
3.3.3. Sıcaklık uygulaması.....	49
3.3.4. Log-Lineer ve Weibull Modelleri Kullanılarak <i>C. difficile</i> Sporlarının Termal Dirençlerinin Hesaplanması.....	50
Log-Lineer Model.....	50
Weibull Modeli.....	51
Modellerin Karşılaştırılması.....	53
3.4. Araştırma 3 Süte <i>C. difficile</i> Kontaminasyonlarının Önlenmesinde Baktöfugason İşleminin Etkisi.....	54

3.5. Araştırma 4 <i>C. difficile</i> Üzerine Standart, Ticari ve Laboratuvar İzolatlarının Kullanımı ile İnaktivasyonunun İn-Vitro Olarak Belirlenmesi.....	54
3.5.1. Kullanılan Mikroorganizmalar.....	54
3.5.2. Anti- <i>Clostridioides difficile</i> (Anti-CD) Aktivitesi Olan Probiyotiklerin Belirlenmesi.....	56
3.5.3. <i>C. difficile</i> Üzerine Standart, Ticari ve Laboratuvar Kültür Süpernatantının Mikrotitre Plakası (MTP) Analizi ile Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi.....	58
3.6. Araştırma 5 <i>C. difficile</i> 'nin peynir yapımında gelişen asitlik ve probiyotik kültür kullanımı ile inaktivasyonunun belirlenmesi.....	60
3.6.1 Peynir üretiminde Kullanılan Çiğ Sütlerin Temini.....	60
3.6.2 Peynir Üretimi.....	60
Starter Kültürlerin Hazırlanması.....	62
Starter Kültür Aktivite Testi.....	63
İnokulum Hazırlanması.....	63
Peynir Mayası ve Maya Kuvveti Tayini.....	64
Pastörizasyon.....	64
Starter Kültür İlavesi.....	64
Mayalama.....	65
Pıhtı Kesimi ve Süzülmesi.....	65
Presleme.....	66
Fermantasyon.....	67
Kuru Tuzlama.....	67
Salamura İlavesi.....	67
Olgunlaştırma.....	68
3.6.3 Mikrobiyolojik Analizler.....	69
3.6.4 Fizikokimyasal Analizler.....	71
pH Ölçümü.....	71
Titrasyon Asitliği.....	71
Tuz Tayini.....	72
Kuru Madde Miktarı.....	72
3.7 İstatiksel Analizler.....	73

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM  
ARAŞTIRMA BULGULARI

74

4.1.	Araştırma 1 Süt ve Peynir Örneklerinde <i>C. difficile</i> Varlığının Belirlenmesi.....	74
4.1.1.	Süt ve Peynir Örneklerinden Elde Edilen İzolatlar.....	74
4.1.2.	Süt ve Peynir Örneklerinden Elde Edilen İzolatların Tanımlanması.....	76
4.1.3.	İzolatların Antibiyotik Direnç Profilleri.....	80
4.2.	Araştırma 2 Süte Uygulanan Isıl İşlemlerin <i>C. difficile</i> Sporları Üzerine Etkisi.....	83
	Log-Linear Model.....	83
	Weibull Modeli.....	90
	Modellerin Karşılaştırılması.....	94
4.3.	Araştırma 3 Süte <i>C. difficile</i> Kontaminasyonlarının Önlenmesinde Baktofugason İşleminin Etkisi.....	99
4.4.	Araştırma 4 <i>C. difficile</i> Üzerine Standart, Ticari ve Laboratuvar İzolatlarının Kullanımı ile İnaktivasyonunun İn-Vitro Olarak Belirlenmesi.....	102
4.4.1.	Anti- <i>Clostridioides difficile</i> (Anti-CD) Aktivitesi Olan Probiyotiklerin Belirlenmesi.....	102
4.4.2.	<i>C. difficile</i> Üzerine Standart, Ticari ve Laboratuvar Kültür Süpernatantının Mikrotitre Plakası (MTP) Analizi ile Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi.....	109
4.5.	Araştırma 5 <i>C. difficile</i> 'nin Peynir Yapımında Gelişen Asitlik ve Probiyotik Kültür Kullanımı ile İnaktivasyonunun Belirlenmesi.....	114
4.5.1	Peynirlerin Fizikokimyasal Özellikleri.....	115
	pH.....	116
	Kuru Madde.....	119
	Peynirlerde Tuz.....	122
	Titrasyon Asitliği.....	126
4.5.2	Peynirlerin Mikrobiyolojik Özellikleri.....	129
	Peynirlerde <i>C. difficile</i> .....	136
	BEŞİNCİ BÖLÜM .....	142
	SONUÇ ve ÖNERİLER .....	
	KAYNAKÇA .....	146
	ÖZGEÇMİŞ .....	1

## SİMGELER VE KISALTMALAR

CDI	<i>Clostridium difficile</i> ile ilişkili enfeksiyon
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Disodyum hidrojen fosfat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum dihidrojen fosfat
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Magnezyum sülfat heptahidrat
NaCl	Sodyum klorür
BHI	Brain Heart Infusion
TSA	Tryptone soya agar
TBX	Tryptone Bile X-glucuronide
MRS	De Man, Rogosa ve Sharpe
CC	Cycloserine- cefoxitin
MN	Monolactam- norfloxacin
AMR	Antibiyotik direnç
HİS	Hücre içermeyen süpernatant
g	Gram
%	Yüzde oranı
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
v	Hacim
kob	Koloni oluşturan birim
sn	Saniye
Dk	Dakika
°C	Derece santigrat
nm	Nanometre
log	Logaritma
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
MSE	Ortalama karekök hata
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute- Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
ATCC	American Type Culture Collection- Amerikan Tıp Kültür



	Koleksiyonu
PCR	Polymerase chain reaction- Polimeraz zincir reaksiyonu
CDC	Centers for Disease Control and Prevention- Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri
EFSA	The European Food Safety Authority- Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi



## TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Hayvansal ürünlerde <i>C. difficile</i> varlığı	28
Tablo 2	Real time PCR (qPCR) <i>tpi</i> gen karışımı	42
Tablo 3	<i>tpi</i> geni ve plazmid belirlemede kullanılan primer ve proplar	43
Tablo 4	Real time PCR (qPCR) ile Toksin A ve B belirlemede kullanılan karışım	45
Tablo 5	Toksin A ve Toksin B belirlemede kullanılan primer ve proplar	45
Tablo 6	Real time PCR (qPCR) Binary toksin belirlemede kullanılan karışımı	47
Tablo 7	Binary toksin varlığının belirlenmesinde kullanılan plasmid, primer ve proplar	47
Tablo 8	Çalışmada kullanılan probiyotik kültürler, <i>Clostridioides difficile</i> kültürleri, <i>C. sporogenes</i> ve <i>C. perfringens</i> kültürleri ve bu kültürlerin kaynakları	55
Tablo 9	Starter kültürlerin aktivite tipinin belirlenmesi	63
Tablo 10	Süt ve peynir örneklerine ait izolatların dağılımları	75
Tablo 11	Gradient şerit ile belirlenen MİK değerleri	81
Tablo 12	Süt içerisinde toksin üretmeyen <i>C. difficile</i> (ATCC 700057 ve ATCC 43593) sporlarının Log-lineer model ile hesaplanan D değerleri	85
Tablo 13	Süt içerisinde toksin üreten <i>C. difficile</i> (ATCC 1870 ve ATCC 9689) sporlarının Log-lineer model ile hesaplanan D değerleri	85
Tablo 14	Süt içerisinde, çiğ süt örneklerinden izole edilen laboratuvar suşlarına ait sporların Log-lineer model hesaplanan D değerleri	86
Tablo 15	<i>C. difficile</i> suşlarına ait z değerleri	89
Tablo 16	Süt içerisinde toksin üretmeyen <i>C. difficile</i> (ATCC 700057 ve ATCC 43593) sporlarının Weibull modeli ile hesaplanan $\delta$ ve $\beta$ , $R^2$ , ve MSE değerleri	91
Tablo 17	Süt içerisinde toksin üreten <i>C. difficile</i> (ATCC 1870 ve ATCC 8689) sporlarının Weibull modeli ile hesaplanan $\delta$ ve $\beta$ , $R^2$ , ve	92

	MSE değerleri	
<b>Tablo 18</b>	Süt içerisinde, çiğ süt örneklerinden izole edilen laboratuvar suşlarına ait sporların sporlarının Weibull modeli ile hesaplanan $\delta$ ve $\beta$ , $R^2$ , ve MSE değerleri	92
<b>Tablo 19</b>	Baktofugasyonun süt içerisindeki <i>C. difficile</i> sporlarına etkisi	100
<b>Tablo 20</b>	Disk difüzyonu ile belirlenen probiyotik kültürlerin inhibisyon bölgeleri (mm)	103
<b>Tablo 21</b>	Karışım probiyotik kültürlerin <i>C. difficile</i> suşları üzerinde inhibisyon etkileri (mm)	105
<b>Tablo 22</b>	Probiyotiklerin laboratuvar izolatlarına karşı inhibisyon etkileri (mm)	106
<b>Tablo 23</b>	Probiyotik kültürlere ait süpernatantların, <i>C. difficile</i> üzerine % inhibisyon etkileri	108
<b>Tablo 24</b>	Peynirlerin üretim aşamalarına ait pH değerleri	116
<b>Tablo 25</b>	Depolama süresi boyunca peynir örneklerinin pH değişimleri	117
<b>Tablo 26</b>	Peynir üretim sürecinde kullanılan çiğ sütten itibaren tuzlama aşamasının sonuna kadar kuru madde içerikleri (%)	120
<b>Tablo 27</b>	Depolama süresince peynirlerin kuru madde içerikleri (%)	121
<b>Tablo 28</b>	Peynir üretim sürecinde kullanılan çiğ sütten itibaren tuzlama aşamasının sonuna kadar tuz içerikleri (%)	123
<b>Tablo 29</b>	Depolama süresi boyunca peynir örneklerinde % tuz miktarı	124
<b>Tablo 30</b>	Peynir üretim sürecinde kullanılan çiğ sütten itibaren tuzlama aşamasının sonuna kadar laktik asit içerikleri (log kob/mL-g)	126
<b>Tablo 31</b>	Peynir depolama süresince peynir örneklerine ait laktik sayıları (log kob/g)	127
<b>Tablo 32</b>	Peynirlere ait üretim aşamalarında laktobasil sayıları (log kob/mL-g)	130
<b>Tablo 33</b>	Peynir depolama süresince peynir örneklerine ait laktobasil sayıları (log kob/g)	131
<b>Tablo 34</b>	Peynir üretim aşamalarında, peynir örneklerine ait laktokok sayıları (log kob/mL-g)	132
<b>Tablo 35</b>	Peynir depolama süresince peynir örneklerine ait <i>C. difficile</i> sayıları (log kob/g)	133

<b>Tablo 36</b>	Peynir üretim aşamalarında <i>C. difficile</i> varlığı (log kob/g-mL)	136
<b>Tablo 37</b>	Peynirlerin depolanmaları süresince <i>C. difficile</i> varlığı (log kob/g)	137



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	<i>C. difficile</i> 'nin vejetatif ve spor hücrelerinin yaşam döngüsü	7
Şekil 2	Bağırsak mikrobiyomunu etkileyen faktörler	22
Şekil 3	<i>C. difficile</i> aranmasında kullanılan süt ve peynir örneklerinin dağılımı	36
Şekil 4	<i>C. difficile</i> aranması için süt örneklenmesi	37
Şekil 5	Süt ve peynir örneklerinde <i>C. difficile</i> aranması	38
Şekil 6	Süt ve peynir örneklerinde <i>C. difficile</i> aranmasında inkübasyon görüntüleri (A) Ön zenginleştirme (B) selektif besiyerinde anaerobik inkübasyon	38
Şekil 7	Rapid ID 32 A ile şüpheli izolatların tanımlanması	39
Şekil 8	Koloniden <i>C. difficile</i> DNA ekstraksiyonu	40
Şekil 9	Süt ve peynir örneklerine ait ön zenginleştirme sıvılarından DNA ekstraksiyonu	41
Şekil 10	(a) PCR karışımının hazırlanması (b) DNA ekstraktlarının kuyucuklara eklenmesi (c) Plağın PCR'a yüklenmesi	43
Şekil 11	Probiyotiklerin <i>C. difficile</i> üzerine anti-CD etkilerinin in-vitro olarak belirlenmesi	57
Şekil 12	Çiğ süttten peynir üretimine kadar izlenen adımlar	62
Şekil 13	(A) pıhtının kesim öncesinde, (B) pıhtının kırılması, (C) pıhtının suyunu salması ve (D) pıhtının süzülmesi için cendere bezine aktarılması aşamaları	66
Şekil 14	Peynirlerin preslenmesi	67
Şekil 15	Salamura ilavesi öncesinde depolama yapılacak kaplarda peynirler	68
Şekil 16	Peynirlerin depolama süresi boyunca 4-5 °C'de depolanması	69
Şekil 17	(A) Süt örneklerinin oranları, (B) Peynir örneklerinin oranları	73
Şekil 18	z değerlerinin hesaplanmasında kullanılan termal direnç eğrileri	89
Şekil 19	<i>C. difficile</i> ATCC 700057 ve <i>C. difficile</i> ATCC 43593 suşlarına	95

	ait sporların termal dirençlerinin Log-lineer ve Weibull modelleri ile karşılaştırılması	
<b>Şekil 20</b>	<i>C. difficile</i> ATCC 1870 ve <i>C. difficile</i> ATCC 9689 suşlarına ait sporların termal dirençlerinin Log-lineer ve Weibull modelleri ile karşılaştırılması	96
<b>Şekil 21</b>	S25 ve S36 suşlarına ait sporların termal dirençlerinin Log-lineer ve Weibull modelleri ile karşılaştırılması	97
<b>Şekil 22</b>	Probiyotik kültürlerin <i>C. difficile</i> üzerine inhibisyon zonları	104
<b>Şekil 23</b>	Peynir örneklerinin çiğ süttten depolamanın son günü kadar pH değerleri	118
<b>Şekil 24</b>	Peynir örneklerinin çiğ süttten depolamanın son günü kadar kuru madde değerleri	122
<b>Şekil 25</b>	Peynir örneklerinin çiğ süttten depolamanın son günü kadar tuz içerikleri (%)	125
<b>Şekil 26</b>	Peynir örneklerinin çiğ süttten depolamanın son günü kadar içerdikleri laktik asit (%) miktarları	127
<b>Şekil 27</b>	Peynir örneklerinin çiğ süttten depolamanın son günü kadar içerdikleri laktobasil sayıları (log kob/mL, log kob/g)	131
<b>Şekil 28</b>	Peynir örneklerinin çiğ süttten depolamanın son günü kadar içerdikleri laktokok sayıları (log kob/mL, log kob/g)	134
<b>Şekil 29</b>	Peynir örneklerinin çiğ süttten depolamanın son günü kadar içerdikleri laktokok sayıları (log kob/g)	138

## BİRİNCİ BÖLÜM

### GİRİŞ

*Clostridioides (Clostridium) difficile*, insanlarda ve hayvanlarda hastalığa neden olan, Gram pozitif zorunlu anaerobik ve spor oluşturan bir bakteridir (Redding vd., 2021; Tsai vd., 2016). ABD'de Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nin hazırlayarak yayınlanadığı raporda ise, halk sağlığına yönelik en kritik antimikrobiyal direnç tehdidini içeren bakterinin *C. difficile* olduğu belirtilmiştir (CDC, 2019).

*C. difficile* enfeksiyonu (CDI), antibiyotikle ilişkili ishalin en yaygın nedeni olarak kabul edilir ve tedavisi dünya çapında sağlık hizmetlerine önemli bir ekonomik yük oluşturmaktadır (Pickering vd., 2019; Zhang vd., 2020)

*C. difficile* enfeksiyonlarının temel virülas faktörü bu bakteri tarafından salgılanan Toksin A ve Toksin B'dir. Bununla birlikte, antimikrobiyal tedavinin CDI gelişiminde önemli bir rol oynadığı ifade edilmektedir. Günümüzde halen antibiyotik tedavisi ve uygun hastane enfeksiyon kontrolü, CDI için en önemli önleyici tedbirlerdir. Antibiyotikler tedavinin ilk basamağı olmasına rağmen, CDI gelişiminde de anahtar risk faktörlerindedir. CDI'li hastalar için mevcut tedaviler, vankomisin veya fidaksomisin antibiyotiklerini içermektedir. Ancak antibiyotik tedavisi, sıklıkla nüksetme vakalarıyla ilişkilendirilmektedir. Sağlıklı bireylerde, bağırsak mikrobiyotası, *C. difficile*'ye karşı kolonizasyon direnci sağlamak için gereklidir; ancak antibiyotik tedavisi bu var olan koruyucu mikrobiyotanın bozulmasına neden olarak CDI'ye duyarlılığı arttırmaktadır (Pike ve Theriot, 2021; Blau ve Gallert, 2023).

Probiyotik mikroorganizmalar ise, besinler ve mukozal bağlanma yerleri için patojenlerle rekabet edebilir, ayrıca antimikrobiyal moleküller üreterek patojenik organizmaların neden olduğu enfeksiyonlara karşı direnç oluşumuna yardımcı olmaktadır (Mazzantini vd., 2022). Probiyotiklerin *C. difficile* üzerine etkilerinin araştırıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır (Na ve Kelly, 2011; Johnson vd., 2012; Fredua-Agyeman vd., 2017; Pal vd., 2022). Yapılan çalışmalar probiyotiklerin, özellikle antibiyotik tedavisi ile

birlikte kullanıldıklarında, enfeksiyonun tekrarlamasını engellemede olumlu etkileri bulunduğunu ifade etmektedir.

Son yıllarda, toplum ile ilişkili artan *C. difficile* vakalarının sayısı, *C. difficile*'nin farklı kaynaklardan (çevre, hayvanlar ve gıdalar vd.) bulaşabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır (Hoover ve Rodriguez-Palacios, 2013; Dahms vd., 2014; Lund ve Peck, 2015; Esfandiari vd., 2021). Ayrıca 2000'li yılların başından bu yana yapılan moleküler çalışmalar, gıda hayvanlarından ve diğer gıda ürünlerinden elde edilen bazı izolatların, hastalığa neden olduğu bilinen 027, 077 ve 078 gibi ribotiplerle genetik olarak örtüştüğünü göstermiştir (Rodriguez-Palacios ve LeJeune, 2011; Janezic vd., 2014; Rodriguez-Palacios vd., 2020)

Gıda kaynaklı bir *C. difficile* enfeksiyonu henüz bildirilmemiştir (Warriner vd., 2017). Ancak zoonotik pek çok kaynak (Songer ve Anderson, 2006 Pirs vd., 2008; Alam vd., 2019) ve süt örneklerinde (Jöbstl vd., 2010; Rahimi vd., 2014; Romano vd., 2018) *C. difficile* varlığının belirlendiğini ifade edilmektedir *C. difficile*'nin gıdalarda ve süt ürünlerinde önlenmesine yönelik çalışmalar ise oldukça sınırlıdır.

*C. difficile* enfeksiyonlarının yayılmasında, zorunlu anaerobik doğası sebebi ile aerotolerant ve metabolik olarak uykuda olan endosporlarının sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu sporlar gıda zincirinin çeşitli aşamalarında gıdalara kontamine olarak gıdaların bu mikroorganizmanın taşınmasında bir vektör olmasına sebep olmaktadır (Candel-Pérez vd., 2019). *C. difficile*'nin çeşitli gıdalarda tespit edildiği pek çok çalışma bulunmaktadır (Marcos vd., 2021; Bacheno vd., 2022; Bolton vd., Marcos, 2023).

*C. difficile* sporları ısı, pH, oksijen, antimikrobiyal ajanlar ve dezenfektanlar gibi fiziksel ve kimyasal koşullara karşı oldukça dirençlidir (Arora vd., 2019; Chiu vd., 2021). Ayrıca sporlar kontamine oldukları bir ortamda, birkaç haftadan birkaç aya kadar varlıklarını koruyabilmektedirler (Moore vd., 2013). Ancak *C. difficile* sporlarının gıdalardan eliminasyonu amacı ile farklı teknikler kullanılmasına yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Deng vd., 2015; Arora vd., 2019; Tosun vd., 2023). Bu çalışmalarda,



özellikle gıdalardan *C. difficile*'nin uzaklaştırılması için ısıtım işlem uygulamaları ön plana çıkmaktadır.

Bu tez çalışmasında 5 farklı bölümden oluşan bir araştırma planlanmıştır. Birinci adımında farklı illerden farklı hayvan türlerinin sütleri ve peynirlerinde *C. difficile* varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca elde edilen ve tanımlanan izolatların antimikrobiyal duyarlılıklarının ortaya koyulması amaçlanmıştır. Çalışmanın ikinci bölümünde, *C. difficile*'nin laboratuvar izolatları ve standart suşlarının süt içerisinde termal direncinin belirlenmesi ve ısıtım işlem etkileri iki farklı matematiksel model kullanılarak araştırılmış ve modellerin karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Üçüncü bölümde ise süt endüstrisinde sporlu bakterilerin uzaklaştırılmasında etkin olduğu ifade edilen baktöfugasyon işlemi benzeri santrifüj uygulamalarının *C. difficile* sporları ile kontamine olan sütlerden *C. difficile* sporlarının eliminasyonunda etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Dördüncü bölümde farklı probiyotik suşların *C. difficile* üzerine inhibisyon etkinliğinin in-vitro olarak araştırılmış ve oluşan inhibisyon etkinliğinin hangi tip bileşiklerden kaynaklandığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Son olarak *C. difficile* üzerine inhibisyon etkisi in-vitro olarak belirlenen suşlardan, istenilen beyaz peynir tekstürünü oluşturacak suş karışımı seçilerek *C. difficile*'nin peynir içerisinde oluşan asitlik ve depolama süresinde bir gıda sistemi içerisinde canlılığını nasıl etkilediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## İKİNCİ BÖLÜM

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

#### 2.1. *Clostridium* spp.

Clostridia sınıfı, atmosferde moleküler düzeyde oksijen konsantrasyonunun artmaya başladığı dönemde (yaklaşık olarak 2,34 milyar yıl önce) diğer bakterilerden ayrılan prokaryotik bir soydur (Knight ve Riley, 2019). Yeni nesil dizileme tekniklerinin gelişmesi ile birlikte Clostridia taksonomisinde günümüzde bazı değişiklikler meydana gelmiştir (Oren ve Rupnik, 2018). Ancak genel olarak *Clostridium* cinsi, anaerobik, Gram-pozitif, çubuk şeklinde, spor oluşturan bakterilerden oluşmaktadır (Grenda vd., 2022). Bununla birlikte bazı Clostridia'ların Gram negatif ve oksijen varlığında büyüebildiği ifade edilmektedir (McVey vd., 2022). *Clostridium* spp.'nin ilk izolasyonu. 19. yüzyılda Louis Pasteur tarafından yapılmıştır. Bu bakteri, anaerobik bütirik fermantasyon yoluyla bütirik asit üretme kabiliyeti nedeniyle ilk olarak *Vibrion butirique* olarak adlandırılmıştır. Ancak 19. yüzyılın sonunda, Adam Prażmowski keşfedilen mikroorganizmayı *Clostridium butyricum* olarak yeniden adlandırmıştır (Grenda vd., 2022).

*Clostridium* cinsi, şu anda yaklaşık 300 geçerli tanımlanmış türü olan *Clostridiaceae* familyasının bir parçasıdır. Esas olarak toprak ve su tortularında ve aynı zamanda insan ve hayvanların sindirim yollarında yaşadıkları çevrede her yerde bulunmaktadır (McVey vd., 2022).

Bu cinse ait türlerin yaklaşık beşte biri hayvanlar ve insanlar için patojen olarak kabul edilmektedir (Avbersek vd., 2009; Janezic vd., 2014). Patojenik Clostridia'ların tümünün spor üretebildiği ve spor oluşturma yeteneklerinin, bağırsakta ve çevrede kalıcılık açısından çok önemli olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca bu spor hücreleri bu bakterilerin kontrolünde zorluklara neden olmaktadır (McVey vd., 2022).

## 2.2. *Clostridium (Clostridioides) difficile*

*Clostridioides difficile*'nin ilk olarak 1935 yılında yeni doğanlarda bağırsak mikroflorasının bir parçası olarak tanımlandığı ifade edilmiştir (Rupnik vd., 2009; Tan, 2022). Bu bakterinin izolasyon ve kültüre almadaki zorluğunu yansıtmak için başlangıçta *Bacillus difficilis* olarak adlandırıldığı bildirilmiştir (Sugeng, 2012). Bu isimlendirme bakterinin *Clostridium* cinsine alınması ile yeniden adlandırma yapılarak *Clostridium difficile* olarak 2016 yılına kadar bu şekilde kullanılmaya devam edilmiştir.

Bu bakteri, 2016 yılında ikinci bir yeniden sınıflandırmaya dahil edilerek *Clostridioides difficile* olarak adlandırılmıştır (Tan, 2022). Lawson ve Rainey'nin (2015) *Clostridium* cinsini *C. butyricum* ve ilgili türlerle sınırlandırma önerisi doğrultusunda filogenetik olarak rRNA Clostridial küme I'den uzak olduğu ve küme XI'de yer aldığı gösterilen ve bu monofiletik grup dışında kalan *C. difficile* karışıklığa yol açmaktadır (Lawson vd., 2016). *C. difficile* için fenotipik, kemotaksonomik ve filogenetik analizlere dayanan yeni cins *Clostridioides* olarak önerilmiştir. 16S rRNA gen dizi analizine göre *Clostridioides difficile* (*C. difficile*)'nin %94,7 benzerlik ile en yakın akrabası olan *Clostridium manganotii* de *Clostridioides manganotii* olarak bu cinse aktarılmıştır (Oren ve Rupnik, 2018). Ancak günümüzde özellikle tedavide kafa karışıklıklarının önlenmesinde, *C. difficile* için her iki kullanımın da kullanılabileceği ifade edilmiştir (Oren ve Rupnik, 2018; Knight ve Riley, 2019).

### 2.2.1. Tanımlayıcı özellikleri / Morfolojik ve Özellikleri

*C. difficile* Gram pozitif, çubuk şeklinde bir bakteridir. Vejetatif hücreleri çoğu bakteriden biraz daha büyüktür, 0,5 ila 2 µm genişliğinde ve 3 ila 17 µm uzunluğundadır. Koloniler tipik olarak yuvarlak, düz, kirli beyazdır ve buzlu cam görünümüne sahiptir (Sugeng, 2012).

Bu bakterinin yüksek düzeyde bakteriyostatik bir bileşik olan ve spesifik at gübresi kokusuna sebep olan *p*-cresol sentezleyebildiği ve tolere edebildiği bildirilmiştir. Bu

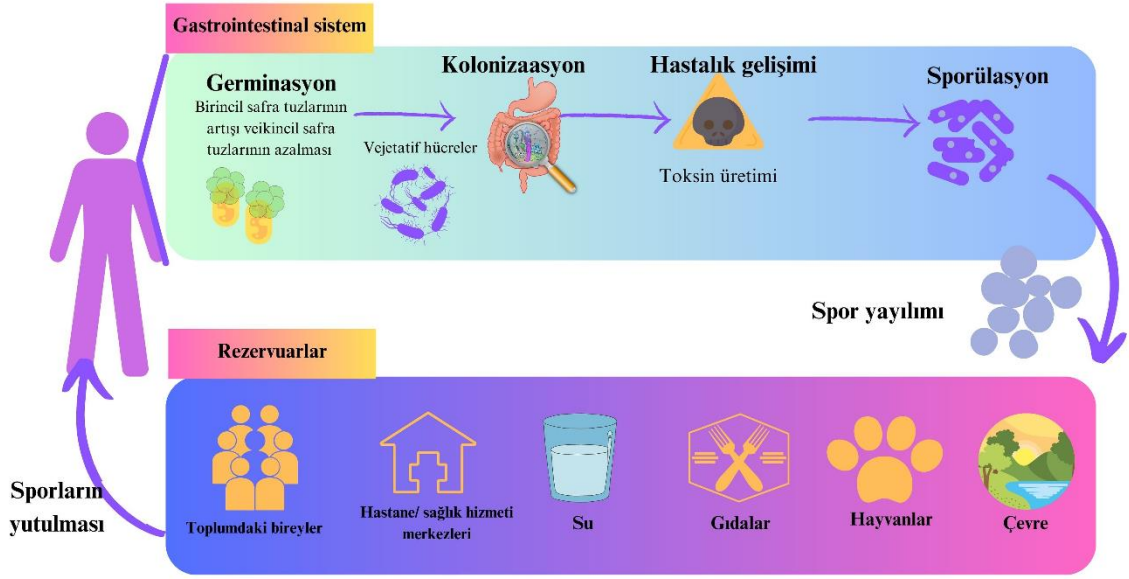
bileşik ayrıca *C. difficile*'nin diğer mikroorganizmalar ile rekabetine de büyük katkı sağlamaktadır (Doyle, 2013).

*C. difficile*, safra asitlerini tolere edebilme ve gelişmesi için karbon ve nitrojen sağlayan önemli bir bileşik olan etanolamini parçalama yeteneği de dahil olmak üzere, memeli bağırsağında büyümesine ve hayatta kalmasına izin veren çok sayıda adaptasyon mekanizmasına sahiptir (Doyle, 2013). Bağırsakta diğer bağırsak bakterileriyle karşılaştırıldığında nispeten yavaş büyüyen bir bakteridir. Fenotipik olarak, *Clostridium sporogenes*'e çok benzer; ancak, *C. sporogenes*'in aksine, *C. difficile* lipaz üretmez (Hoover ve Rodriguez-Palacios, 2013).

Rapor edilen gelişme sıcaklıkları 25- 45°C arasındadır. Ancak optimum gelişme 30 ve 37°C aralığındadır. Bununla birlikte, bazı suşlarının daha yüksek sıcaklıklarda daha hızlı geliştiği de ifade edilmektedir (Hoover ve Rodriguez-Palacios, 2013).

*C. difficile*, sağlıklı yetişkin insanların %2-5'inin ve yaşlıların %10-20'sinin bağırsak mikrobiyotasında bulunmaktadır (Gunaratnam vd., 2021). Ancak *C. difficile* genomunun yaklaşık olarak %11'i, antibiyotiğe dirençli genler içeren mobil genetik elementlerden oluşmaktadır. Bu mobil elementler bir *C. difficile* hücresinden diğerine yatay olarak geçebilen ve muhtemel olarak da son yıllarda *C. difficile*'nin hızlı evriminde önemli rol oynamış olan transpozonları ve profajları içermektedir. Bazı profajlar enfeksiyon sırasında indüklenmekte ve dışkı örneklerinden serbest viral partiküller olarak izole edilebilmektedirler (Doyle, 2013).

*C. difficile* fekal-oral yolla iletilmektedir ve yaşam döngüsü içerisinde vejetatif hücre formu, bir konakçının gastrointestinal sisteminde meydana gelmektedir. *C. difficile*'nin yaşam döngüsünün spor formu ise, sporların konakçıdan atılmasından sonra gerçekleşmektedir. *C. difficile*'nin yaşam döngüsü Şekil 1'de dösterilmiştir.



Şekil 1. *C. difficile*'nin vejetatif ve spor hücrelerinin yaşam döngüsü (Tan, 2022)

### 2.2.2. Antimikrobiyal Direnç

Antimikrobiyal direnç (AMR), en önemli halk sağlığı sorunları arasında kabul edilmektedir. Özellikle kronik hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde ciddi engeller oluşturduğu ifade edilmektedir. Son yıllarda AMR'nin önlenmesine yönelik çalışmalar artmasına rağmen, küresel anlamda AMR eğilimlerinin azalmasına yönelik sınırlı sonuçlar elde edilebildiği vurgulanmaktadır (Anusha vd., 2023).

*C. difficile*, sanayileşmiş dünyada tıbbi bakımla bağlantılı en sık görülen ishal nedenidir ve toplumdaki edinilmiş hastalıkların önemli bir kaynağıdır. ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezine göre, *C. difficile* önemli bir AMR patojenidir (Anusha vd., 2023). Bu sebeple özellikle sağlık hizmetleri üzerinde önemli bir ekonomik ve iş yükü oluşturmaktadır (Tickler vd., 2019).

1970'lerde *C. difficile*'nin ilk klinik çalışmaları, bu bakterilerin bazı antibiyotiklere, özellikle de klindamisine dirençli olduğunu göstermektedir (Rupnik vd., 2009). İlerleyen yıllarda tedavide yaygın sefalosporin kullanımını *C. difficile* enfeksiyonları için önemli bir

risk faktörü haline gelmiştir. Günümüzde ise *C. difficile*, linkomisin, klindamisin, aminoglikositler, tetrasiklinler, makrolidler, sefalosporin, penisilin ve florokinolonlara karşı direnç dahil olmak üzere AMR çeşitliliğine sahiptir. Siprofloksasin, levofloksasin, eritromisin ve fusidik asit direncinin en yüksek seviyede olduğu bildirilmektedir (Anusha vd., 2023).

Dört Avrupa ülkesinde domuz ve hayvanlardan izole edilen *C. difficile* 078 suşuna ait izolatların antibiyotik dirençleri Bakker vd., (2010) tarafından yapılan bir çalışmada araştırılmıştır. Çalışmada insan ve domuzlardan elde edilen tüm izolatların %85'inin insan veya domuz bakılmaksızın genetik olarak ilişkili bulunduğu ifade edilmektedir. Ayrıca insanlardan elde edilen suşların domuzlardan elde edilen suşlara göre tetrasikline önemli derecede daha dirençli olarak belirlenmiştir.

*C. difficile*'nin çok çeşitli antibiyotiklere dirençli olmasının, bakterinin antibiyotik varlığında kolonize olmasını ve enfeksiyon oluşumu sağladığı ifade edilmektedir. Geçmişten günümüzde *C. difficile* suşlarının antibiyotik duyarlılığının değiştiği bilinmektedir (Rupnik vd., 2009). 1980'lerde sefalosporinler ve geniş spektrumlu penisilinlerin sık kullanımı, *C. difficile* enfeksiyonuna yatkınlık sağlayan başlıca faktörler olarak klindamisinin yerini almasına neden olmuştur. Psödomembranöz kolit uzun yıllar boyunca önemli bir sağlık sorunu olmaya devam ederken, 2000'li yılların başlarında "hipervirülen" *C. difficile* suşlarının, özellikle de BI/NAP1/027 tipinin yüksek oranda ve küresel olarak belirlenmesinin önemli bir dönüm noktası olduğu ifade edilmektedir (Rupnik vd., 2009; Johanesen vd., 2015; Dilnessa vd., 2022).

Sonuç olarak *C. difficile* antibiyotik direncine yönelik araştırmalar, bu bakteride transpozonlar, mobil genetik elementler ve çeşitli genetik mutasyonlar dahil olmak üzere antibiyotik direncinin kazanılması için çoklu mekanizmaların var olduğunu ortaya çıkarmıştır. *C. difficile* genomunun önemli bir kısmının, varsayımsal konjüгатif ve mobilize olabilen transpozonlar ve bakteriyofajlar dahil olmak üzere çok sayıda mobil elementten oluştuğu bildirilmiştir (Peng vd., 2017; O'Grady vd., 2021). Plazmidlerin birçok insan patojeninde ve diğer clostridia'da antibiyotik direncinin transferinde önemli

bir rol oynadığı bilinmekle birlikte, *C. difficile*'de antibiyotik direncini kodlayan plazmidler açıklanmamıştır. *C. difficile*'de tetrasiklin, klindamisin ve eritromisin ile ilişkili aktarılabılır antibiyotik direnci ilk olarak 1980'lerde rapor edilmiştir. Bu direncin ve mobilize edilebilir ve konjugatif transpozonlar gibi entegre kromozomal elementlerin yatay gen transferi yoluyla ortaya çıktığı bulunmuştur. Bununla birlikte, bu antibiyotik sınıfına direnç *C. difficile*'de oldukça yaygındır (Johanesen vd., 2015).

Ayrıca antibiyotikler safra asidi metabolizmasını değiştirerek *C. difficile* büyümesini teşvik edebilmektedir. Spesifik safra asidi sinyalleri, *C. difficile* sporlarının vejetatif hücrelere çimlenmesi için ön koşuldur. Antibiyotik kullanımı ve kötüye kullanımı, bağırsak mikrobiyom disbiyozunu indüklemekte ve bu da safra metabolizmasında yer alan 7-a dehidroksilaz aktivitesine sahip bağırsak mikroorganizmalarının popülasyonunda azalmaya neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak da deoksikolat gibi sekonder safra asitlerinde azalma görülmektedir. Deoksikolat seviyelerindeki azalmaya ise, birincil safra asidi olan taurokolattaki artış eşlik etmektedir. Taurokolat, *C. difficile* sporlarının metabolik olarak aktif ve toksin üreten hücrelere germinasyonunu uyarmaktadır. Antimikrobiyal tedavi, CDI için tercih edilen tedavi olmaya devam etmektedir. Ancak özellikle tekrarlayan CDI'lara karşı antibiyotiklerin etkin bir çözüm sağlamadığı bilinmektedir (Pal vd., 2022).

### **2.2.3. Virülans Faktörleri**

*C. difficile*'nin temel virülans faktörleri vejetatif hücreleri tarafından salgılanan toksinleridir. Bununla birlikte, adhesinler, ekstraselüler enzimler, fimbria ve flagella, kapsül ve parakristal S katmanı gibi diğer faktörlerde şüphesiz virülansa katkıda bulunmaktadır. Bağırsak kolonizasyonu CDI için bir ön koşuldur, ancak ilgili mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmektedir (Baban vd., 2013).

## Toksinler

*C. difficile* toksinleri A (TcdA) ve B (TcdB), patojenin temel virülans faktörleridir ve toksin üreten *C. difficile*, antibiyotikle ilişkili ishalin ana etmenidir (Antikainen vd., 2009). Toksin A ve B, patojenite lokusu veya PaLoc olarak bilinen bir bölge içinde yer alan yerleşim sırasıyla *tcdA* ve *tcdB* olarak adlandırılan genler tarafından kodlanmaktadır (Britton ve Young, 2014; Janoir, 2016; Williamson vd., 2023). PaLoc bölgesinde *tcdA* ve *tcdB* genleri üç farklı gen ile birlikte kodlanmaktadır. *tcdR*, toksin gen ekspresyonunu doğrudan aktive eden alternatif bir RNA polimeraz sigma faktörünü kodlamaktadır; *tcdE*, bazı suşlarda, toksinin hücre dışı salınımında yer aldığı varsayılan halini kodlamaktadır; üçüncü gen *tcdC*, tarafından kodlanan proteinin rolünün ise henüz tam belirlenmediği ifade edilmektedir (Janoir, 2016).

Hem TcdA hem de TcdB, aktin depolimerizasyonunu, mukozal bariyerdeki sıkı bağlantıların yıkımını ve enflamasyonu teşvik etmek için konakçı hücrelerde Rho ve Rac GTPazlarını glukozile etmektedir. Glukozile edici toksinlerin, hem fare hem de hamster enfeksiyon modellerinde diyare ortaya çıkması için gerekli olduğu ve TcdB'nin enfeksiyonda daha belirgin bir rol oynadığı ifade edilmektedir (Anjuwon-Foster ve Tamayo, 2017).

*C. difficile* tarafından oluşturulan TcdA ve TcdB toksinleri, *Clostridium sordellii*'den Tcsl ve TcsH'yi, *Clostridium novyi*'den TcnA'yı ve *Clostridium perfringens* tip B ve C7'den Tcpl'yi içeren bir büyük Clostridial toksinler (LCT'ler) grubuna aittir. LCT'ler, üç ana fonksiyonel alana sahip tek zincirli proteinlerdir; karakteristik tekrarlara sahip bir amino-terminal bağlanma alanı, bir karboksi-terminal katalitik alanı ve varsayılan bir translokasyon alanı bulundukları bildirilmiştir (Voth ve Ballard, 2005).

Toksijenik olmayan suşlarda, patojenite lokusu (PaLoc) mevcut değildir ve bu suşlarda bu alanda 115 bp'lik bir DNA fragmanı bulunmaktadır (Cohen vd., 2000; Aktories vd., 2017). Toksijenik suşlarda PaLoc her zaman aynı genomik konumda bulunmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar bu genetik lokusun toksijenik olmayan suşlara



yatay gen transferi ile aktarılabildiğini ve bu aktarım ile toksijenik olmayan suşların toksin üretebildiği ifade etmektedir (Cohen vd., 2000; Brouwer vd., 2013; Roberts vd., 2014; Monot vd., 2015).

Toksin üretimi, çevresel sinyaller tarafından çift yönlü olarak düzenlenmektedir. Ekspresyonun inhibisyonu glukoz, amino asitler (örn. Prolin veya sistein), bütanol ve biotin ile gerçekleşirken, kısa zincirli yağ asitleri (örn. Bütirat) ve yüksek sıcaklık (37°C) toksin üretimini uyarmaktadır. Toksinlerin varlığı muhtemelen besinlerin sınırlandırılmasından kaynaklanan durağan aşamaya girildiğinin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Aktories vd., 2017).

Toksin A ve Toksin B'nin her ikisi de glukosiltransferaz yapısındadır. Rho ve Rac ailesinin küçük GTPazlarını (Rho, Rac, Cdc42) glukozu GTP-bağlayıcı proteinlerdeki çok önemli bir treonin kalıntısına bağlanmasıyla modifiye etmektedir ve böylece GTPazları etkisiz hale getirmektedir. Bunun meydana getirdiği temel sonuç ise Rho'ya bağlı sinyal oluşumunun engellenmesidir. Rho proteinleri temel anahtar proteinler olduklarından ve çoklu hücre fonksiyonlara katıldıklarından, glikozilasyon yolu ile inaktivasyonlarının hücre iskeletinin yeniden yapılandırılması, enflamasyon aktivasyonu, hücre döngüsü inhibisyonu, apoptoz (programlanmış hücre ölümü) veya nekrozun (doku ölümü) indüklenmesi de dahil olmak üzere hücresel çeşitli sorunların oluşmasına sebep olduğu bildirilmektedir (Janoir, 2016; Aktories vd., 2018).

TcdA ve TcdB aynı genel etki mekanizmasına sahip olmalarına rağmen, birkaç fenotipik farklılık barındırmaktadır (Pruitt ve Lacy, 2012; Janoir, 2016). CDI patofizyolojisinde her bir toksinin göreceli rolü uzun süredir tartışılan bir konu olmuştur. Hamster modelinde, her iki toksinin de hastalık semptomlarını ortaya çıkarmak için uyum içinde hareket ettiği gösterilmiştir: TcdB'nin daha güçlü sitotoksin olduğu kabul edilirken, TcdA oldukça enterotoksiktir. Ayrıca düşük konsantrasyonlarda, TcdA'nın, hücrelere bakteri bağlanmasını artırabilecek şekilde, plazma zarı bileşeninin ve reseptör dağılımının değişmesini teşvik edebildiği TcdB'nin ise şiddetli bağırsak hasarı ile birlikte bir

inflamasyon yükseltici bir etki ile virülansa katkı sağladığı ifade edilmektedir (Janoir, 2016).

TcdA ve TcdB'nin yanı sıra, *C. difficile*'nin bazı suşları, binary toksin (CDT) adlı üçüncü bir toksin üretmektedir. Bu toksin, *C. difficile* kromozomu üzerindeki PaLoc'tan ayrılan CDT lokusunda (CdtLoc) bulunan *cdtA* ve *cdtB* adlı iki gen tarafından kodlanmaktadır (Geric vd., 2006; Eckert vd., 2015). Bu, iki ayrı protein bileşiminden oluşan bir toksindir. Binary toksinin bu suşların virülansına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu toksin, TcdA ve TcdB'nin toksisitesini güçlendirebilmekte ve hastalığın daha ağır seyretmesine sebep olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle ek bir virülans faktörü olarak görülmektedir (Denève vd., 2009). Kendi başına hastalığa neden olmamasına karşın daha ciddi hastalıklarla ilişkilendirilen binary toksinin, genellikle hipervirulan denilen türlerde varlığı bildirilmektedir (Candel-Pérez vd., 2019).

## **Spor**

Vejetatif *C. difficile* hücreleri toksin üretirken ve dolayısıyla hastalıklara neden olmaktan sorumluyken, sporların böyle bir patogenezi yoktur (Tan, 2022). *C. difficile* patojeninin bir diğer önemli belirleyicisi bakteriyel endospordur. Zorunlu bir anaerob olarak, *C. difficile*'nin hayatta kalması ve yayılması, çok katmanlı bir dış yapıdan oluşan spora bağlıdır. (Marsh ve Harrison, 2015). *C. difficile* sporlarının CDI'de oynadığı bu kritik öneme rağmen, *C. difficile* spor biyolojisi hakkındaki bilgi, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis* grubu ve *Clostridium perfringens* gibi iyi çalışılmış diğer organizmaların çok gerisindedir (Edwards vd., 2016). Bunun temel sebebinin, *B. subtilis*'in spor kılıfı proteinlerinin %25'inden daha azının *C. difficile* sporlarının kılıfının sahip olduğu proteinlerin homologlarını barındırması olduğu ve bu sebeple *C. difficile* sporlarının biyolojisi üzerine sınırlı bilginin elde edilebildiği bildirilmektedir (Tan, 2022).

Spor çekirdeğinde, sporun merkezinde yer alan bakteriyel DNA bulundurmaktadır. DNA çeşitli proteinlere bağlanarak ve süpersarmal şeklinde bulunmaktadır. Bu sayede, DNA hasarı en aza indirilebilmektedir. Ayrıca sarmal DNA'da, transkripsiyon faktörleri

DNA'ya bağlanamadığı için transkripsiyonun başlamasını engellemektedir. Bu durum, sporun bakteriyel replikasyonu desteklemek için gerekli olan besinlere erişimi olmadığı için istenen bir özelliktir. Gastrointestinal sistemde bulunmadığında spor hücrelerinin vejetatif hücreye dönmesi hücre ölümüne yol açacaktır. Vejetatif hücrelerle karşılaştırıldığında, sporlar son derece düşük su içeriğine sahiptir. Tüm bu özellikleri spor hücrelerinin dayanıklılığına katkı sağlamaktadır (Tan, 2022).

*C. difficile* sporları, düşük su aktivitesine (Deng vd., 2017), kimyasallara (Edwards vd., 2016), düşük sıcaklıklara (Deng vd., 2015) yüksek sıcaklıklara (Rodriguez-Palacios ve LeJeune, 2011; Arora vd., 2019) karşı oldukça dirençli sporlar oluşturmaktadır. Sporun yapısal katmanlarının benzersiz özellikleri, dezenfektanlara, ısıya ve kurumaya karşı sporun direncine katkıda bulunmaktadır (Marsh ve Harrison, 2015). Ek olarak, sporlar kontamine oldukları bir ortamda birkaç haftadan birkaç aya kadar varlıklarını sürdürebilmektedir (Gerding vd., 2008; Moore vd., 2013; Barbut, 2015).

Edwards vd., (2016) tarafından yapılan çalışmada *C. difficile*'nin 7 farklı suşunun vejetatif ve spor hücrelerinin etanol, oksijen, hidrojen peroksit, bütanol, kloroform, ısı ve sodyum hipoklorite (ev tipi çamaşır suyu) toleransı açısından test edildiği ifade edilmiştir. Araştırmacılar test edilen tüm suşların üzerinde sodyum hipokloritin *C. difficile* vejetatif ve spor hücrelerini sürekli olarak azaltan, çalışmada kullanılan tek kimyasal reaktif olduğunu belirtmektedir. Ayrıca yapılan çalışmada spor hücrelerin vejetatif hücrelere göre oldukça dirençli oldukları ve çeşitli *C. difficile* suşlarının vejetatif hücrelerinin ve sporlarının farklı direnç özelliklerine sahip olduğu belirtilmektedir.

Düşük su aktivitesi ( $a_w$ ) etkisinde *C. difficile* sporlarının hayatta kalma ve germinasyon yeteneklerini inceleyen bir çalışmada araştırmacılar PBS, ( $a_w \sim 1.00$ ), ticari kurutulmuş sığır eti ( $a_w \sim 0.82/0.72$ ) ve  $a_w$ -düzeltilmiş PBS'de ( $a_w \sim 0.82/0.72$ ) içerisinde 3 ay boyunca sporları takip etmişlerdir. Üç ay sonra ve test edilen tüm PBS  $a_w$  seviyeleri için, sporlarda koloni oluşumunda yaklaşık bir logaritmik azalma belirlemişlerdir. Ancak, direkt gıda ile çalışılan örneklerde bir azalma tespit edilemediği bunun da nedeninin gıda matriksinin sporlar üzerinde koruyucu bir etki sağlamış olmasından kaynaklanabileceği

ifade edilmiştir. Araştırmacılar bu sonuçların, *C. difficile* sporlarının germinasyon özelliklerine ve ortam özelliklerine bağlı olarak germinasyon etkinliklerinin değişebildiğini gösterdiğini ifade etmektedir (Deng vd., 2017).

*C. difficile*'deki spor germinasyonu ve aşırı büyüme mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak *Bacillus subtilis*'te görüldüğü gibi üç aşamalı bir süreci takip ettiği düşünülmektedir. Bu aşamalar (i) germinantların spesifik reseptörlere bağlanması, (ii) tek değerlikli katyonların salınımı ve (iii) korteks litik enzimler tarafından spor peptidoglikan korteksinin hidrolizi, çekirdek rehidrasyonu ve metabolik aktivite ve replikasyonun başlatılması olarak ifade edilmiştir. *C. difficile* germinantları ve ilişkili reseptörler iyi karakterize edilmemiştir; bununla birlikte, sodyum taurokolat ve glisin amino asidi dahil olmak üzere spesifik safra tuzlarının spor germinasyonda etkisi rolü gösterilmiştir (Moore vd., 2013). *C. difficile*, spordan çimlenen diğer bakterilerle karşılaştırıldığında yüksek oranda korunmuş çimlenme reseptörlerinden yoksundur. Örneğin, bir transmembran germinasyon reseptörü olan GerA, spor oluşturan bakteriler arasında nispeten yüksek oranda mevcuttur. Ancak, *C. difficile*'nin, GerA da dahil olmak üzere bilinen herhangi bir transmembran çimlenme reseptörüne sahip olmadığı ifade edilmiştir (Tan, 2022).

Safra tuzları ve amino asitlerin çimlenme sinyalleri olarak hareket ederek *C. difficile*'nin germinasyonunda hayati roller oynadığı düşünülmektedir. Gastrointestinal sistemde bulunan safra tuzları, sindirimin yan ürünleri olarak yalnızca memeli bağırsağında üretilmektedir. Tüm kolat türevli safra tuzları arasında taurokolat, çimlenmeyi teşvik etmede en etkili olan safra tuzudur. Bağırsakta antibiyotik kullanımı gibi faaliyetlerden kaynaklanan disbiyoz olduğunda kolondaki taurokolat seviyeleri de artmaktadır. Spor hücrelerinin germinasyonu için taurokolat varlığı önemli olsa da tek başına taurokolat varlığının yeterli olmadığı ifade edilmektedir (Tang vd., 2022). Ayrıca yapılan çalışmalar, sodyum taurokolata yanıt olarak *C. difficile* spor germinasyonunun, BI/NAP-1/027 grubu içinde bile önemli ölçüde değiştiğini; bu da germinasyon ile ilgili uyarıların "hipervirülans"ın türe özgü olmaktan ziyade izolata özgü olabileceğini belirtilmiştir (Rupnik vd., 2009).

*C. difficile* spor germinasyonunda etkili olan bir diğerk bileşik türü olan amino asitler, sporların germinasyonu için bir yardımcı uyarıcı gerektirmektedir. Spor germinasyonu sırasında amino asitlerin etki ettiği yol tam olarak bilinmemektedir. Ancak glisin safra tuzları ile kombinasyon halinde germinasyonu uyarmada en etkili amino asit olduğu ifade edilmektedir (Tan, 2022).

Spor hücreleri pek çok dış etkene karşı oldukça direnç göstermektedir. Kontamine olduğu yüzeyde aylarca hatta yıllarca varlığını koruyabilmektedir. Genellikle hastalar hastane ortamı veya sağlık çalışanları ile temas yoluyla *C. difficile* sporlarına maruz kalmaktadırlar (Rupnik vd., 2009). *C. difficile* sporlarının zorlu ortamlara karşı yüksek direnci, patojenik maruziyete katkıda bulunan her yerde yayılmaya izin vermektedir (Sugeng, 2012). Ayrıca, *C. difficile*'nin salgın suşlarının, in vitro olarak salgınlarda rol oynadığı bildirilmemiş suşlarına kıyasla daha yüksek bir sporülasyon kapasitesine sahip olduğu ifade edilmektedir (Rupnik vd., 2009). *C. difficile* enfeksiyonunu (CDI) edinme kaynakları olarak sıralanan dört geniş kategori vardır: çevreden kişiye, kişiden kişiye, hayvandan kişiye ve tüketim olarak ifade edilmektedir (Sugeng, 2012) (Şekil 1).

### **Kamçı (Flagella)**

Flagella oluşumu birçok bakteriye hareketli olma, abiyotik veya biyotik yüzeylerde kolonize olma, büyümeyi ve hayatta kalmayı optimize etme gibi avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca bazı yapısal flagellar proteinlerin hücre dışına taşınmasına izin veren pasif bir yapı olarak da hizmet eden entegre bir zar protein kompleksinden oluşmaktadır (Anjuwon-Foster ve Tamayo, 2017; Stevenson vd., 2015).

*C. difficile* diğerk bağırsak patojenlerine benzer bir niş içerisinde yer aldığından, flagellasının konakçının bağırsağındaki kolonizasyonuna katkı sağladığı ifade edilmektedir (Baban vd., 2013). Bununla birlikte, flagella'nın *C. difficile* patojenine katkısı karmaşıktır ve henüz tam olarak anlaşılammıştır. Ancak (i) konakçı hücrelere yapışmayı teşvik etmek; (ii) besinlere kolay ulaşımı sağlayan hareketlilik; (iii) biyofilm oluşumunu desteklemek; (iv) virülans faktörlerinin hücre zarları boyunca translokasyonunu kolaylaştırmak ve (v)

Toll benzeri reseptör 5 (TLR5) sinyal yolu aracılığıyla proinflamatuvar sitokinleri tetikleyerek immünomodülatörler olarak görev yapma gibi çeşitli etkilerle bakteriyel patojenize katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Baban vd., 2013; Stevenson vd., 2015).

### **Diğer Faktörler**

Gastrointestinal sistem, birçoğu yerleşiklik oluşturmadan veya hastalığa neden olmadan bağırsak boyunca geçiş yapan sürekli bir mikrobiyal popülasyon akışına maruz kalan karmaşık bir ekosistemdir. Gastrointestinal sistemin bu mikrobiyal popülasyonu, lümen içinde ve mukozal yüzeylerde ikamet eden tahmini 15.000 ila 36.000 farklı bakteri türü ile büyük bir genetik ve ekolojik çeşitliliği temsil etmektedir (Napolitano ve Edmiston, 2017). Bağırsak epitelini kaplayan mukozal yüzey ise, bu organizmanın hem bağışıklık tepkisinden kaçması hem de enterositlerle etkileşime girmesi ve spesifik yüzey moleküllerine yapışması gereken konak-patojen etkileşiminin ana bölgesidir. *C. difficile* ise, Vero hücreleri, Hela hücreleri, Hep-2 hücreleri, enterosit benzeri Caco-2 hücreleri, HT-29 ve mukus üreten HT-29-MTX hücreleri gibi farklı hücre dizilerine yapışabilmektedir. *C. difficile*'nin bağırsak mukozal hücrelerine yapışabilmesinde SLP proteinleri, Cwp84 sistein proteaz, Cwp66 adezini, CwpV proteini, Fibronektin bağlayıcı protein Fbp68, kollajen bağlayıcı protein CbpA, Lipoprotein CD630\_08730, ısı şoku proteini olan GroEL etkin rol oynamaktadır (Janoir, 2016).

*C. difficile*'nin bağırsak mukozasına tutunmasının yanında, abiyotik yüzeylerde tutunması ve biyofilm oluşturabilmesin, patojenitesinde rol oynamaktadır (Johanesen vd., 2015). Bakterilerin bağırsak mukozasında, birkaç Cwp proteini ve toksinler, özellikle toksin A dahil olmak üzere DNA, polisakkaritler ve proteinlerden oluşan bir matris içine gömülü olarak bulunduğu ifade edilmiştir. *C. difficile* biyofilminin oluşumunun Spo0A ve LuxS gibi merkezi düzenleyiciler, flagella ve sistein proteaz Cwp84 gibi yüzey bileşenleri tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. Biyofilm oluşumunun CDI ve nükslerindeki rolünü daha doğru bir şekilde tanımlamak için halen ek çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Ancak genel olarak biyofilmlerin *C. difficile* hücrelerinin antibiyotiklere olduğu kadar oksijen stresine karşı direncini arttırdığı ve bakterinin dirençli sporlar oluşturarak ortamdaki kalıcılığını arttırdığı ifade edilmektedir (Janoir, 2016).

### 2. 3. *Clostridium (Clostridioides) difficile* Enfeksiyonları

*C. difficile* enfeksiyonu (CDI), toksin aracılı bir bağırsak hastalığıdır. Bu enfeksiyonda ekstraintestinal belirtiler nadir olarak kabul görülmektedir. CDI'nin klinik sonuçlarının, asemptomatik kolonizasyondan hafif diyare ve karın ağrısı, ateş ve lökositoz dahil olmak üzere daha ciddi hastalık sendromlarına kadar değişebildiği ifade edilmektedir (Rupnik vd., 2009). Tipik belirtiler arasında günde 15-30 kadar bağırsak hareketi olan sulu ishal bulunmaktadır (Bartlett, 2008). Fulminan veya ciddi komplike CDI, inflamatuvar lezyonlar ve kolonda psödomembran oluşumu (PMC), toksik megakolon veya bağırsak perforasyonu, sepsis, şok ve ölüm ile karakterize olabildiği bildirilmiştir (Rupnik vd., 2009).

Bu enfeksiyon özellikle gelişmiş ülkelerde antibiyotikle ilişkili ishal ve sağlık bakımı enfeksiyonlarının en yaygın bulaşıcı nedeni olarak ortaya çıkmıştır (Androga vd., 2018; Zhang vd., 2019). Hastanelerde ve uzun süreli bakım tesislerinde sağlık hizmetlerine bağlı ishal ve ölümlerin en önemli nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Antibiyotik ilişkili ishal vakalarının %15-25'inden ve hemen hemen tüm antibiyotik ilişkili psödomembranoz kolit vakalarından sorumlu olan etken olarak belirtilmektedir. *C. difficile* kaynaklı enfeksiyonlarının görülme sıklığının, hastane kaynaklı bir başka enfeksiyon kaynağı olan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'un görülme sıklığını aştığı ifade edilmektedir. *C. difficile* enfeksiyöz diyare ile ilişkili mortalitenin %17 olduğu ve yaşlılar arasında %25'e kadar çıktığı belirtilmektedir (Dilnessa vd., 2022).

Ayrıca bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonlar sağlık sistemi üzerinde önemli bir mali yük (yılda yaklaşık 4,8 milyar dolar) oluşturmakta, aynı zamanda giderek artan görülme oranları ile sorunun giderek daha da büyüdüğü ifade edilmektedir (Britton ve Young, 2014; Gunaratnam vd., 2021). Bu enfeksiyon özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış ve uzun veya spesifik antibiyotik tedavileri (örn. Klindamisin, sefalosporinler, florokinolonlar) öyküsü olan yaşlı hastalarda ortaya çıkmakta bu da ölüm oranlarının giderek daha da artmasına neden olmaktadır (Antikainen vd., 2009).

*C. difficile*'nin ana doğal rezervuarı, insanlar veya hayvanlar gibi genç bireylerin bağırsaklarıdır (Janezic vd., 2016; Napolitano ve Edmiston, 2017). Sağlıklı yetişkinlerin yüzde üç ila beşinin toksijenik *C. difficile*'nin asemptomatik taşıyıcıları olduğuna inanılmaktadır. Bu oran hastanede yatan erişkinlerde ise ortalama %20'ye çıkmaktadır. Ayrıca 1 yaşından küçük bebeklerde bağırsakta toksijenik *C. difficile* varlığı oransal olarak %60 ila %70 aralığındadır (Hoover ve Rodriguez-Palacios, 2013; Napolitano ve Edmiston, 2017).

*C. difficile*'nin neden olduğu gastrointestinal hastalık spektrumu önemli ölçüde genişlerken, özellikle yakın geçmişe kadar olan dönemde yalnızca hastanede yatan yüksek riskli hasta popülasyonunda hastalığa neden olduğu düşünülmekteydi (Knight ve Riley, 2019). Ancak günümüzde hastane ortamına maruz kalmayan kişilerde artan oranlarda CDI bildirilmektedir (Alam vd., 2014).

Bağırsaktaki kolonizasyona direnç mekanizmaları ve güçlü bir mikrobiyota, Sporların çimlenmesini, vejetatif büyümeyi ve toksin üretimini engelleyerek *C. difficile*'nin aşırı gelişimine karşı koruma sağlamaktadır (Androga vd., 2018; Gunaratnam vd., 2021). İnsan ve hayvanlarda antimikrobiyal maruziyet, yenidoğan bağırsağına benzer bir ortam yaratmaktadır ve az gelişmiş bir mikrobiyota ile karakterize edilebilmektedir. Bunun sonucu olarak bağırsakların kolonizasyon direnci azalmaktadır. Böylesine riskli bir konakçı bağırsağında, *C. difficile* sporları hızla çimlenerek güçlü sitotoksinler üretmeye başlamaktadır. Bu da geniş kolonik iltihaplanmaya ve epitel doku hasarına neden olmaktadır (Theriot ve Young, 2015).

CDI prevalansının, antimikrobisallerin, özellikle klindamisin, sefalosporinlerin ve florokinolonun daha fazla kullanımına paralel olarak arttığı belirtilmiştir. Antimikrobiyal tedavi, *C. difficile* spor büyümesinin engellenmesine katkıda bulunan ortak bağırsak bakterilerini de yok ederek mikrobiyotada dengesizlik yaratmaktadır. Vakaların yaklaşık %10-35'inde, semptomlar düzeldikten ve tedavi kesildikten sonra bile CDI semptomlarının tekrarlayabildiği ifade edilmektedir (Moore vd., 2013; Marsh and Harrison, 2015). Sürekli



bir disbiyosis, *C. difficile*'ye avantaj sağlamakta ve CDI nükslerine neden olmaktadır (Androga vd., 2018).

2000'lerin başında, yeni nesil kinolona (florokinolon) dirençli RT027 / NAP1 / B1C. *difficile* suşu, Avrupa ve Kuzey ABD'de CDI salgınlarına neden olarak bu ülkelerde tedavide kullanılan antimikrobiyal yönetim politikalarının yeniden düzenlenmesine yol açmıştır. Günümüzde, *C. difficile* ribotip 027'e bağlı enfeksiyonların florokinolon direnci azalmış olmasına rağmen, diğer ribotiplerinin yayılmasını teşvik etmeye devam etmektedir. Özellikle moksifloksasin direnci, genellikle *C. difficile*'nin önemli ribotiplerinde bulunmaktadır. Bu durum, antimikrobiyal yönetim politikalarının sık sık gözden geçirilmesi ve denetlenmesi ihtiyacının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Androga vd., 2018).

### **2.3.1. *C. difficile* Enfeksiyonlarının Tedavisi**

Sağlık sistemlerinde *C. difficile* enfeksiyonunu (CDI) çevreleyen epidemiyoloji, karmaşık olmasına rağmen, uygun müdahalelerin yaratılmasında bir anahtardır. Konak, ajan ve çevrenin çok yönlü epidemiyolojik üçlüsü, CDI oranlarını başarılı bir şekilde düşürmek için eşzamanlı olarak ele alınması gereken temel faktörlerdir (Blanco vd., 2021). *C. difficile* enfeksiyonlarına yönelik hastane epidemiyolojisi ve müdahalelerinde tanı, tedavi ve enfeksiyon kontrol uygulamaları için yayınlanmış kılavuzlar bulunmaktadır (Surawicz vd., 2013).

Oral vankomisin ve metronidazol, hafif veya orta derecede CDI için tercih edilen terapötik seçenekler olarak verilmektedir. Ciddi bir hastalık için ise oral metronidazol ve intravenöz vankomisin kombinasyonu önerilmektedir. Her iki antimikrobiyal ajan, bu tedavilere dirençli olan *C. difficile*'nin spor oluşturucu doğası nedeniyle hastalık nüksleri ile de ilişkilendirilmiştir (Androga vd., 2018). Tekrarlayan CDI vakalarının yaklaşık yarısının, orijinal kalıcı suşla enfeksiyonun tekrarlamalarından ziyade, yeni enfeksiyonlara bağlı olduğu düşünülmektedir (Moore vd., 2013).

Vankomisin ve metranidazol vejetatif hücrelere karşı oldukça aktif bakteriyostatik ajanlar olmalarına karşın sporosidal aktiviteye sahip değildirler (Moore vd., 2013). Sporosidal etkinin sağlanması için, *C. difficile*'ye karşı oldukça etkili olan dar spektrumlu, sporosidal bir makrolid olan fidaxomicin, tekrarlayan CDI olasılığını büyük ölçüde azaltan mikrobiyotayı, önleme özelliği nedeniyle bazen birinci basamak tedavisi olarak kullanılmaktadır (Androga vd., 2018). Kanıtlanmış etkinliğine rağmen, fidaksomisinin maliyeti diğer tedavilerden önemli ölçüde daha yüksektir ve CDI'nin önemli sağlık bakım maliyetleri ile birleştiğinde, dünyanın birçok yerinde kullanıma uygun değildir (Androga vd., 2018).

ABD'deki 6 kişiden yaklaşık 5'i her yıl bir antibiyotik kuru almaktadır. Sonuç olarak, artan antimikrobiyal direnç (AMR) ve çoklu antimikrobiyallere karşı azalmış duyarlılık yaygın hale gelmiştir (Androga vd., 2018). Öte yandan, dışkı mikrobiyota transplantasyonu ve mikrobiyal ekosistem terapileri gibi alternatif CDI tedavilerinin kullanımı, tekrarlayan enfeksiyonlar için mükemmel iyileşme oranları vermekte ve antimikrobiyallere bağımlılığı azalttığı için popüler hale gelmektedir (Adamu ve Lawley, 2013). Ancak bu tedavide, donörlerden AMR genleri alma riski de bulunmaktadır (Androga vd., 2018).

Günümüzde, *C. difficile*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için yeni ve gelişmekte olan stratejiler arasında monoklonal antikorlar, aşılar, probiyotikler, biyoterapötikler ve yeni antibiyotikler bulunmaktadır (Napolitano ve Edmiston, 2017).

### ***C. difficile*'nin Probiyotik Mikroorganizmalar ile Önlenmesi**

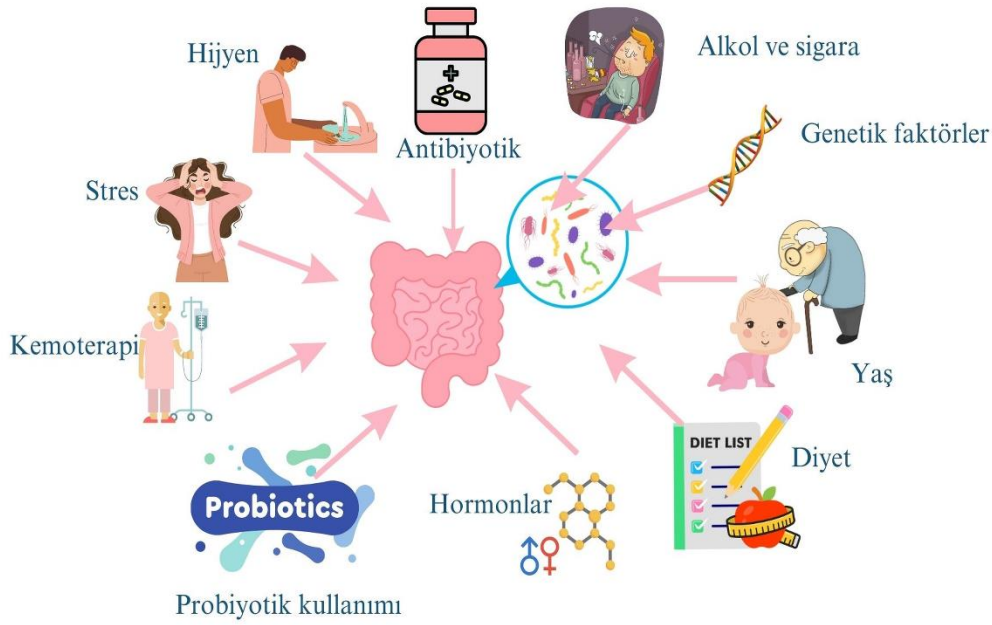
Probiyotikler, yeterli miktarlarda vücuda alındığında konakçıya olumlu sağlık etkileri sağlayabilen canlı mikrobiyal preparatlardır (genellikle laktobasiller, bifidobakterler ve *Saccharomyces boulardii* vd.). Etki mekanizmaları içerdiği suşlara bağlıdır ve patojenlerin büyümesini inhibisyonunu, bağırsak bariyer fonksiyonunun restorasyonunu ve immünomodülasyonu içerdiği düşünülmektedir (Lau ve Chamberlain, 2016; Samarkos vd., 2018). Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları

Derneği (ESCMID) yayımlanan kılavuzda, CDI tedavisinde dikkate alınan tedavi önerileri arasında probiyotiklere yer verilmiştir (Crobach vd., 2016).

Günümüzde probiyotiklerin sağlık üzerine etkilerini araştıran pek çok çalışma bulunmaktadır (Pochapin, 2000; Paper, 2001; D'Souza vd., 2002; Begley vd., 2006). Probiyotiklerin genel sağlık etkilerinin yanında özellikle *C. difficile* gibi pek çok antibiyotik, fiziksel ve kimyasal etkiye karşı dirençli bir mikroorganizmaya karşı gösterdikleri etkilere olan ilgi de giderek artmaktadır (Servin, 2004; McFarland, 2009; Johnson vd., 2012; Hell vd., 2013; Fredua-Agyeman vd., 2017).

Literatürde probiyotiklerin *C. difficile* üzerindeki etkilerini in vitro yöntemlerle inceleyen birçok çalışma bulunmaktadır (Trejo vd., 2010; Fredua-Agyeman vd., 2017; Golić vd., 2017; Islam vd., 2022). Ayrıca, in vivo çalışmalar, probiyotiklerin antibiyotik tedavisi ile birlikte kullanıldığında enfeksiyonun tekrarlaması üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Pillai ve Nelson, 2008; Bainum vd., 2023).

Probiyotiklerin sağladığı kolonizasyon direnci, bağırsak mikrobiyal topluluğunun, patojenik organizmaların bağırsak ortamını kolonize etmelerini önleyen engelleme ve rekabet etme yeteneğidir. *C. difficile*'ye karşı bağırsak mikrobiyotası aracılı kolonizasyon direnci, birincil safra asitlerinin ikincil safra asitlerine dönüştürülmesi ve böylece sporlarının çimlenmesini önlemesi yoluyla oluşmaktadır. Bununla birlikte, normal bağırsak mikrobiyotasının çeşitli nedenlerle bozulması sonucunda *C. difficile* kolonizasyonunu destekleyen disbiyotik bir duruma yol açmaktadır (Şekil 2). Bu nedenle bağırsak mikrobiyotasının besin nişlerini işgal etme ve buradaki besinlerin kullanımını kısıtlama yeteneğinin, *C. difficile* kolonizasyonunu önlemede önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Marshall vd., 2023).



Şekil 2. Bağırsak mikrobiyomunu etkileyen faktörler (Elkafas vd., 2022)

Terapötik ajanlar olarak probiyotik kullanmanın avantajı, bu canlı organizmaların sıklıkla, Toksin A'yı doğrudan yok eden proteazlar, toksin bağlanma bölgelerine müdahale, bağışıklık düzenlemesi ve QS sistemlerinin inhibisyonunu içerebilecek diğer mekanizmalar dahil olmak üzere birden fazla etki mekanizmasına sahip olması olarak ifade edilmektedir. Henüz bu konudaki bilgiler sınırlı olsa da bazı probiyotik suşların veya suş kombinasyonlarının, hücre algılama (QS) sistemlerine müdahale ederek *C. difficile* virülans faktörlerinin üretimini bozduğu belirtilmektedir (Gunaratnam vd., 2021).

### 2.3.2. Toplum ile İlişkili *C. difficile* Enfeksiyonları

Epidemiyolojideki değişiklikler, genel olarak daha yüksek hastalık insidansı ile sonuçlanan toplumdaki edinilmiş enfeksiyonlardaki artışı içerirken, hastaların daha önce proton pompası inhibitörlerini kullanması gibi potansiyel yeni risk faktörlerini de ortaya çıkarmaktadır. Antibiyotik alan, hastaneye yatırılan yaşlı hastalar hala enfeksiyon riski altındaki ana grup olsa da hastane ortamıyla veya antibiyotiklerle daha önce temas olmayan genç popülasyonlarda CDI'de artış olduğu görülmektedir. Ayrıca, çocuklar ve hamile kadınlar gibi önceden düşük risk altında olan belirli popülasyonlarda da CDI

oranları artmaktadır (Rupnik vd., 2009). ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezlerinden (CDC) alınan srveyans verilerine göre, 2012 ile 2015 yılları arasında sağlık hizmetiyle ilişkili (HA) CDI'nin toplam insidansı azalırken, toplumla ilişkili (CA) CDI'nin insidansında artış olduğu ifade edilmektedir (CDC, 2019; Tickler vd., 2019). Özellikle günümüzde bu artışın önceden hastaneye yatış veya antibiyotik tedavisi öyküsü olmayan genç hastalarda gözlemlenmesi toplumla ilişkili *C. difficile* enfeksiyonu ihtimallerini akıllara getirmektedir (Koene vd., 2012; Usui vd., 2020).

CDI için olası toplum kaynakları arasında toprak, su, evcil hayvanlar, yiyecek, et ve sebzeler, eti için kullanılan hayvanlar yer almaktadır. Gıdaların *C. difficile* kontaminasyonunun insanlarda klinik CDI'ye yol açtığına dair kesin bir kanıt yoktur. Bununla birlikte, son yıllarda artan CDI vakaları *C. difficile*'nin hastane dışında farklı kaynaklardan bulaşabileceğini düşündürmüştür (Rupnik ve Songer, 2010). Ayrıca yapılan çalışmalar semptomatik hastalardan elde edilen izolatlar ile toplum kaynaklı CDI için olası rezarvuarlardan elde edilen izolatların genetik olarak oldukça benzer olduğunu vurgulamaktadır (Spigaglia vd., 2023; Williamson vd., 2023)

Literatür, *C. difficile* yayılması hakkında çeşitli hipotezler sunmaktadır, ancak zorunlu anaerobik doğası göz önüne alındığında, CDI'nin oluşmasında endosporların vücuda alınması sorumlu görünmektedir. *C. difficile* ile ilgili birçok rapor, bu mikroorganizmanın toprak ve hem tatlı hem de deniz dahil olmak üzere su gibi doğal ortamlarda her yerde bulunabileceğini ifade etmektedir (Candel-Prez vd., 2019).

### **Çevresel Kaynaklarda *C. difficile* Varlığı**

*C. difficile*, oksijene dirençli sporlar oluşturma yeteneği nedeniyle her yerde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda gıda (Metcalf vd., 2010; Eckert vd., 2013; Tkalec vd., 2019; Usui vd., 2020), su (Kotila vd., 2013; Numberger vd., 2019), toprak (Lim vd., 2020) veya ev (Alam vd., 2014) ortamlarında varlığı bildirilmiştir.

Slovenya'nın kentsel ve kırsal bölgelerinden toplanan 107 su birikintisi ve 79 toprak numunesi örneğinde *C. difficile* varlığının araştırıldığı bir çalışmada; su birikintilerinde %14,4, toprak numunelerinde ise %36,7 oranında pozitiflik belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada elde edilen izolatların hâlihazırda yayınlanmış hayvan izolatlarına ait antimikrobiyal direnç modelleri ile uyum gösterdiği ifade edilmiştir (Janezic vd., 2016).

Blau ve Gallert, (2023) tarafından yapılan bir çalışmada 81 çevresel örnekten toplam 169 *C. difficile* izolatı elde edilmiştir. Çalışmada elde edilen çevresel *C. difficile* izolatlarının çoğunluğunun toksijenik olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar toksijenik bu suşlar arasında binary toksin pozitif izolatların da yer almasının dikkat çekici olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *C. difficile* suşlarının, özellikle dışkıyla kontamine olmuş çeşitli çevresel kaynaklarda daha yaygın olarak bulunabileceği ve bu durumun toplumla ilişkili *C. difficile* enfeksiyonlarının potansiyel bir kaynağı olabileceğini ifade etmişlerdir.

### **Hayvanlarda *C. difficile* Varlığı**

*C. difficile*, insanlarda olduğu kadar hayvanlarda da önemli bir enteropatojendir (Koene vd., 2012; Krijger vd., 2019; Blau ve Gallert, 2023). Hayvanların, kontamine hayvan ürünleriyle doğrudan temas veya tüketim yoluyla insanlar için rezervuar ve enfeksiyon kaynağı olabileceği, potansiyel zoonotik bulaşmayla ilgili endişeleri de arttırmıştır. Hayvanların *C. difficile*'yi kontamine ortamlarla, kontamine gıdalarla veya enfekte insanlarla temas yoluyla edinebileceğine inanılmaktadır (Knetsch vd., 2018; Marcos vd., 2021; Abad-Fau vd., 2023; Bolton ve Marcos, 2023). Bununla birlikte, zoonotik bulaşmanın kesin mekanizmaları ve kapsamı hala tam olarak anlaşılamamıştır (Abad-Fau vd., 2023).

Hayvanlarda *C. difficile* enfeksiyonlarının varlığı ilk olarak 1968'de antibiyotikle tedavi edilen hamsterlarda ölümcül bir enterik olay olarak bildirilmiştir (Hensgens vd., 2012). Antibiyotik tedavisi, diyet değişikliği ve yeni doğan dönemi, tıpkı insanlarda olduğu gibi gıda hayvanlarını da kapsayacak şekilde pek çok hayvan türünde *C. difficile* enfeksiyonları için risk faktörleridir (Rupnik vd., 2009; Bandelj vd., 2016). Enfeksiyon,

insandakine benzer şekilde hayvanlarda da konakçı bağırsak mikroflorasının bozulması nedeniyle meydana gelmektedir (Rupnik vd., 2009; Porsbo ve Agerso, 2016).

Günümüzde, yapılan çalışmalarda atlar (Kachrimanidou vd., 2019), filler (Bojesen vd., 2006), domuzlar (Weese vd., 2010; Hopman, vd., 2011a,b; Wu vd., 2016), buzağular (Keel vd., 2007; Hammitt vd., 2008), evcil hayvanlar (Clooten vd., 2008; Janezic vd., 2014; Krijger vd., 2019) ve vahşi hayvanlar (Krijger vd., 2019) gibi pek çok farklı hayvan türünde *C. difficile* varlığı belirlenmiştir.

Koene vd., (2012) tarafından Hollanda'da yedi farklı hayvan türünden alınan 839 dışkı örneğinde *C. difficile*'nin varlığı araştırılmıştır. Yapılan çalışmada pozitif örnek sayısı %3,4 (sığır) ile %25,0 (köpek) arasında bildirilmiştir. Örneklerden elde edilen 96 izolatın %53'ünün toksin geni barındırdığı, ayrıca domuz, sığır ve kümes hayvanlarından elde edilen tüm izolatların toksinojenik olduğu ifade edilmektedir. İzolatlar arasında ribotip 012'nin en çok sığırlarda ve ribotip 078'in ise domuzlarda baskın ribotip olarak belirlendiği ifade edilmiştir.

Hayvanlardan izole edilen genotiplerin (yaklaşık 30-50 farklı PCR ribotipi) heterojenliği, insan izolatlarının (yaklaşık 190 PCR ribotipi) heterojenliğinden daha düşüktür. Bunun nedeni, insan tiplendirme çalışmalarına kıyasla gerçekleştirilen sınırlı sayıda hayvan tiplendirme çalışması olabilir. En yaygın PCR ribotipleri, hayvan ve insan popülasyonları arasında farklılık göstermektedir. Ancak her iki popülasyondan da önemli sayıda ortak PCR ribotipi izole edildiği görülmektedir (Rupnik vd., 2009; Koene vd., 2012; Blasi vd., 2021).

Slovenya'da küçükbaş hayvanlar üzerinde yapılan bir çalışmada elde edilen izolatların hayvanlar ve insanlarda ortak PCR ribotipleri bulundurduğu belirlenmiş ve bu ortak izolatların hayvandan insana ve hayvandan çevreye *C. difficile* kontaminasyonlarında bir kaynak oluşturabileceği ifade etmişlerdir (Avberšek vd., 2014).

Benzer şekilde Avusturalya’da yapılan bir çalışmada RT237 ribotipin sadece Avustralya'daki domuzlardan izole edilmesine rağmen, *C. difficile* enfeksiyonu (CDI) hastalarında bulunduğu bildirilmiştir. Bu bulgu *C. difficile*'nin hayvanlardan insana potansiyel bulaşmasını destekler niteliktedir. Buna ek olarak araştırmacılar, yapılan çalışmada domuz çiftliklerinde yaşayan ve çalışan ailelerde %25'e varan yüksek bağırsak kolonizasyon yüzdeleri bulunmasının da bu hipotezi desteklediğini ifade etmişlerdir (Zhang vd., 2020).

Ayrıca son yıllarda literatürde yer alan çalışmalar hayvanlardan oluşabilecek bu aktarımın aynı zamanda uluslararası yayılıma da sebep olabileceğini ifade etmektedir (Blasi vd., 2021).

### **Gıdalarda *C. difficile* Varlığı**

2005 yılından bu yana, *Clostridium difficile*'nin toksik ve toksik olmayan çeşitli suşları ABD ve Avrupa'daki çeşitli gıdalardan pek çok farklı çalışmada izole edilmiştir. İzole edilen bu suşların, insanlarda şiddetli *C difficile* enfeksiyonları ile ilişkili suşların genetik ve virülen özelliklerine benzerlik göstermesi sebebi ile *C difficile*'in gıda kaynaklı (ve zoonotik) bir patojen olduğuna dair artan endişeler gün geçtikçe artmaktadır (Hoover ve Rodriguez-Palacios, 2013).

*C. difficile*'nin gıdalarda varlığının araştırılmasına yönelik pek çok çalışma mevcuttur. Bu amaçla yeşil sebzeler (Metcalf vd., 2010; Eckert vd., 2013), patates (Tkalec vd., 2019; Khun vd., 2023) ve havuç gibi kök sebzeler (Lim vd., 2018), deniz ürünleri (Agnoletti vd., 2019; Pasquale vd., 2011, 2012; Rodriguez vd., 2021; Troiano vd., 2015) et ve et ürünleri (Tsuchiya vd., 2008; Songer vd., 2009; Harvey vd., 2011; Limbago vd., 2012; Esfandiari vd., 2014; Mooyottu vd., 2015), süt ve süt ürünlerinde (Jöbstl vd., 2010; Sugeng, 2012; Hazarika vd., 2023) *C. difficile*'nin varlığını araştıran pek çok çalışma bulunmaktadır. Çalışmalar, genel olarak gıdalarda *C. difficile* pozitiflik oranının %8 ile %42 arasında değiştiğini göstermektedir (Khun vd., 2023). Gıda zincirinde kontaminasyona neden olabilecek bulaşma kaynakları arasında; çiftlik ortamı, çiftlik



hayvanları, toprak, gübre, su, meyve- sebze, çiğ ve işlenmiş gıdalar, yüzeyler ve gıda çalışanları ile işleme tesisleri gösterilmektedir. Son ürünlerde sporların varlığı, kontamine hammadde, gıda endüstrisinde çapraz kontaminasyon ve gıda işleme sırasında spor üretimi ile açıklanabilmektedir (Candel-Pérez vd., 2019).

### **Hayvansal Ürünlerde *C. difficile*'nin Varlığı**

Hayvanlarda *C. difficile*'nin varlığı hayvansal ürünlerde *C. difficile*'nin araştırılmasına yönelik çalışmaları arttırmıştır. Dünyanın farklı ülkelerinde hayvansal et ürünlerinde *C. difficile* varlığını araştıran pek çok çalışma bulunmaktadır (Tablo 1). Bunun yanında farklı hayvanlara ait süt örneklerinde (Rahimi vd., 2014; Romano vd., 2018), işlem görmüş sütlerde (Abdel-Hamid vd., 2011), peynirlerde (Sugeng, 2012; Hazarika vd., 2023), peynir dışındaki süt ürünlerinde (tam yağlı yoğurt) (Marcos et al., 2021) *C. difficile* varlığı araştırılmıştır.

Tablo 1

Hayvansal ürünlerde *C. difficile* varlığı

Et	Ülke	Bulunma sıklığı (%)	Toksin geni	Ribotip	Referans
Pişmiş ve çiğ et ürünleri	ABD	37/88 (%42,0)	tcdC	027, 078,	Songer vd., (2009)
Kıyma	İsveç	2/82 (%2,43)	tcdAve tcdB	-	Von Abercron vd., (2009)
Çiğ et örnekleri (koyun, tavuk, domuz, dana)	Hollanda	8/500 (%1,6)	tcdAve tcdB	001, 003, 087, 045, NT, 071	De Boer vd., (2011)
Çiğ et örnekleri (tavuk ciğeri, domuz eti, domuz ciğer, sığır eti)	Japonya	2/10 (%2,1)	-	F1, F7 , F8, F9, F1, F10, R6	Usui vd., (2020)
Çiğ Et	Kostarika	4/200(%2,0)	tcdA ve tcdB	-	Quesada-Gómez vd., (2013)
Et ve işlenmiş et ürünleri	İrlanda	1/110 (%1,1)	tcdB,	-	Marcos vd., (2021)
Çiğ et örnekleri (biftek, domuz eti, tavuk eti)	Hindistan	12/81 (%14,8)	tcdB, tcdA+tcdB	-	Hazarika vd., (2023)
İşlenmiş et ürünleri	Hindistan	3/101 (2,9)	-	-	Hazarika vd., (2023)

Ülkemizde bugüne kadar gıdalarda *C. difficile* varlığı araştıran çalışmalar da et ürünlerine odaklanılmıştır. Bu amaçla kuşbaşı et ve dana kıymada sırasıyla %2 ve %4 *C. difficile* pozitif sonuç elde edildiği ifade edilmiştir (Atasoy ve Gücükoğlu, 2017). Tavuk etinde yapılan bir çalışmada ise %25 oranında *C. difficile* varlığı bildirilmiştir (Guran ve İlhak, 2015).

Hampikyan vd., (2018) ise sığır karkaslarından %33,6, koyun karkaslarından %25,3 oranlarında *C. difficile* izole edildiğini ve sığır izolatlarının %18,1'inin, koyun izolatlarının %7,7'sinin ise özellikle salgınlarda önemli rol oynadığı düşünülen ribotip 027'ye ait olduğu ifade etmişlerdir. Araştırmacılar, ayrıca elde edilen izolatların antibiyotik dirençlerini incelemiş ve izolatların sefotaksim ve imipeneme dirençli buna karşılık amoksisilin-klavulanik asit, vankomisin ve tetrasikline duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Bingol vd., (2020) tavuk karkaslarında %37,3 oranında *C. difficile* tespit etmişler ve izolatların %8,7'sini ribotip 027 olarak tanımlanmışlardır. Tüm izolatların amoksisilin-klavulonik asit, vankomisin, metronidazol ve tetrasikline duyarlı, sefotaksim ve imipeneme dirençli olduğunu ifade etmişlerdir.

Attia, (2021) tarafından çiğ tavuk örneklerinde *C. difficile* aranmasına yönelik Mısır'da yapılan çalışmada 250 adet çiğ tavuk etinin örnek olarak kullanılmıştır. 11 (%4,4) örnekte *C. difficile* tespit edilmiştir. Elde edilen izolatların hiç birisinin toksijenik olmadığı ayrıca tüm izolatların vankomisine duyarlı, bazı izolatların ise metronidazol, tetrasiklin, klindamisin veya moksifloksasin antibiyotiklerine değişen derecelerde orta düzeyde/direnç gösterdiği ifade edilmiştir.

Bacheno vd., (2022) tarafından yapılan bir çalışmada ise çiğ et ve karkas yüzey sürüntü örneklerinde *C. difficile*'nin varlığını araştırılmıştır. Yapılan çalışmada toplamda 485 adet çiğ et ve karkas yüzey sürüntü örneğinde çiğ etin %2,91'inde ve karkas yüzey sürüntü örneklerinin %4,48'inde *C. difficile* belirlendiği ifade edilmiştir. Elde edilen izolatlarda ayrıca yüksek antibiyotik direnci (klindamisin siprofloksasin, metronidazol, eritromisin ve tetrasiklin) gözlemlendiği ifade edilmiştir. Ayrıca izolatlarda *tcdA* (%22,22), *tcdB* (%44,44), *cdtA* (%44,44) ve *cdtB* (%16,66) toksijenik genlerinin saptandığı belirtilmiştir.

Araştırmacılar gıda hayvanlarının, özellikle koyun ve sığırların, kesim aşamalarında *C. difficile* taşıyıcıları olduğunu ve insanlarda enfeksiyonlara sebep olan ribotiplerin hayvanlarda da belirlendiğini ve hayvanlardaki bu bulaşımın mezbaha içinde karkas kontaminasyonundan meydana gelmiş olabileceğini vurgulamışlardır (Bacheno vd., 2022; Hofer vd., 2010).

## Gıdalarda *C. difficile* Sporlarının Önlenmesi

Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı'nın (USDA) güvenli gıda tüketimini teşvik etmek için gıda türüne göre pişirme sıcaklığı önerileri vardır, ancak bu öneriler öncelikle vejetatif bakteri hücrelerinin (örneğin, *Salmonella*) yok edilmesini ele alır ancak spor hücrelerine yönelik öneriler bulunmamaktadır. Bugüne kadar gıdalarda *C. difficile* sporlarının kontrolü ile ilgili resmi bir tavsiye bulunmamaktadır (Hoover ve Rodriguez-Palacios, 2013).

Literatürde ise gıdalarda *C. difficile* sporların varlığının giderilmesine yönelik oldukça sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar gıdalara uygulanan ısı işlemler ile *C. difficile* sporlarının eliminasyonuna odaklanmaktadır (Rodriguez-Palacios ve LeJeune, 2011; Redondo-Solano vd., 2016; Arora vd., 2019). Ancak gıdalar için önerilen pek çok pişirme işlem uygulamasının gıdalardaki *C. difficile* sporlarını önlemede yetersiz kalacağı belirtilmektedir (Rodriguez-Palacios vd., 2010). Ayrıca ölümcül olmayan ısıtma işlemlerinin, spor germinasyonunu teşvik edeceği ifade edilmiştir (Hoover ve Rodriguez-Palacios, 2013).

Lund ve Peck, (2015), *C. difficile* sporlarının ısı direncini *Clostridium perfringens* sporlarınınkiyle karşılaştırmış ve her iki organizmanın sporlarının et ve kümes hayvanı ürünlerinin pişirilmesinde kullanılan tipik ısı işlem sıcaklıklarında hayatta kalabileceğini ve potansiyel olarak gıda kaynaklı hastalıklara yol açabileceğini belirtmiştir.

Sütün pastörizasyonu için FDA tarafından önerilen 100°C'nin altındaki farklı sıcaklık-zaman kombinasyonları, *C. difficile*'nin vejetatif hücrelerini yok etmek için yeterli olabileceği (Moore vd., 2013; Dharmasena vd., 2019; McSharry vd., 2021) ancak *C. difficile* spor hücrelerinin termal direnci vejetatif hücrelere göre daha yüksek olduğu ifade edilmektedir (Arora vd., 2019; Edwards vd., 2016). Ayrıca gıda matrisinin karmaşık ve olası koruyucu yapısından dolayı termal direnç çalışmalarının PBS gibi sıvılar yerine direkt olarak gıda matris yapısının ısı dirence etkisi göz önünde bulundurularak doğrudan gıda ile yapılması önerilmektedir (Rodriguez-Palacios ve LeJeune, 2011).

*Clostridium difficile* sporlarının, etlerin yeterli şekilde pişirilmesi için yaygın olarak önerilen minimum sıcaklık olan 71° C'de (160 ° F) 2 saat boyunca uygulanan ısı işlemde hayatta kaldığı, ancak 85°C'de 10 dakikalık bir ısı işleminin %95'lik bir ölüm sağladığı ifade edilmektedir (Rodriguez-Palacios vd., 2010). Hoover ve Rodriguez-Palacios, (2013) ise nispeten düşük seviyelerde *C. difficile* sporlarının (örn., 10<sup>1</sup> spor/g) soteleme gibi hafif pişirmeye maruz kaldığında uzun süreli olarak hayattan kalmaya devam edebileceğini ifade etmişlerdir.

Gıdaların bozulmasının önlenmesinde yüksek sıcaklığın yanında düşük sıcaklıklarda muhafazası da bir koruma yöntemi olarak uygulanmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar *C. difficile* sporlarının gıda matriksi içerisinde soğukta uzun süreler saklanması *C. difficile* sporlarının azaltılmasındaki etkisinin sınırlı olduğunu ifade etmektedirler (Deng vd., 2015; McSharry vd., 2021; Marcos vd., 2023).

Deng vd., (2015) et ve fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi içerisinde *C. difficile* sporlarının iki epidemik suşunun, düşük sıcaklıkta hayatta kalmalarını -80°C, -20°C, 4°C (buzdolabı sıcaklığı), 23°C (oda sıcaklığı) koşullarında saklama ve -20°C'den 23°C'ye 10 kez yapılan dondurma-çözme işlemlerinin etkilerini dört ay boyunca incelemişlerdir ve karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar uygulanan işlemlerin tamamında spor canlılığında azalma gözlenirken bu azalmanın sonunda sporların önemli ölçüde canlılığını koruyabildiğini ifade etmişlerdir. Benzer şekilde dondurup-çözdürme işleminin spor canlılığını azalttığını ancak spor canlılığının büyük oranda korunduğu ifade edilmiştir. Araştırmacılar, kullandıkları her iki *C. difficile* suşunun bir et modelinde PBS'den daha yüksek ısıl direnç gösterdiğini belirtmişlerdir.

McSharry vd., (2021) tarafından yapılan bir başka çalışmada etler farklı atmosferik koşullar altında paketlenerek farklı sıcaklıklarda depolanmıştır. Araştırmacılar 2 °C'de, oksijen koşullarından bağımsız olarak, 32 günlük depolama boyunca *C. difficile* konsantrasyonlarında sabit bir düşüş gözlemlendiğini, buna karşılık, yüksek sıcaklıkta *C. difficile* sayılarının orta ve yüksek bariyerli paketlerde ve anaerobik koşullar altında 2 gün

sonra önemli ölçüde başlangıç değerlerine kıyasla oldukça yüksek düzeylerde belirlendiğini ifade etmişlerdir.

Marcos vd., (2023) buzdolabı sıcaklıklarında saklanan (4°C) ve dondurularak (-20°C) depolanmış tavuk göğsü, dana biftek, ıspanak yaprakları ve süzme peynirde *C. difficile* (ribotip 078 ve 126) spor canlılığını ve depolama sonrası bu gıdaların hafif pişirme (sous vide) (60°C, 1 saat) uygulanmasını ısıl işlem olmayan kontrol grubu ile karşılaştırarak incelemişlerdir. Araştırmacılar bunlara ek olarak D80°C değerlerini gıda ortamı ve PBS ortamında kıyaslayabilmek için, 80°C'de PBS, sığır eti ve tavukta spor inaktivasyonunu da araştırmışlardır. Araştırmacılar soğukta saklama işlemlerinin ve hafif pişirme işleminin *C. difficile* sporlarında herhangi bir azalmaya neden olmadığını, ancak 80°C uygulanan ısıl işlemin PBS ve gıda matrikslerinde benzer seviyelerde azalma sağladığını ifade etmişlerdir.

Tosun vd., (2022) tarafından yapılan çalışmada *C. difficile* ile kontamine edilen marulların antimikrobiyal maddeler ile yıkanması ve ardından modifiye atmosfer paket ile paketlenerek 2 farklı sıcaklıkta depolanmasının *C. difficile* üzerine etkilerini araştırılmıştır. Başlangıç yüküne kıyasla antimikrobiyaller ile yıkama işleminin *C. difficile* sayısını azalttığını ancak modifiye atmosfer paketlemenin ve sıcaklığın *C. difficile* sayıları üzerinde bir etkisinin bulunmadığını ifade etmişlerdir.

Benzer şekilde Tosun vd., (2023) *C. difficile* ile kontamine ıspanaklarının doğal dezenfektan ile yeşil çay ekstraktı-asetik asitten (GTE-AA) oluşan farklı antimikrobiyal çözeltiler ile birlikte farklı konsantrasyonlardaki sodyum hipoklorit (NaOCl) ve kontrol ile yıkanmasının *C. difficile* üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmada kontrol grubu olarak ıspanak yapraklarının yalnızca musluk suyu ile yıkanmasının kullanıldığını ifade etmişlerdir. Yıkama çözeltileri içerisinde en yüksek etkinin NaOCl ile sağlandığını ancak araştırmada kullanılan diğer yıkama çözeltilerinin de sırası ile 2,27–3,08 log ve 3,21–3,66 log azalma sağladığı ifade edilmiştir. Musluk suyu ile yıkamanın ise *C. difficile*'nin ıspanaklardan uzaklaştırılmasında herhangi bir etkiye sebep olmadığı ifade edilmiştir.

Flock, (2017) tarafından yapılan çalışmada ise ilk kez fermantasyonun etkilerinin *C. difficile* sporlarının canlılığının bir fermente gıda olan yaz sosisinde incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda 60 günlük bir depolamada *C. difficile* sayısında bir değişiklik belirlenemediği ifade etmişlerdir.



## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Araştırma Planı

Çalışmamız 5 bölümden oluşacak şekilde ayrılmıştır. Her bölüme ait materyal ve metot ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

**1. Araştırma** İnek, koyun, keçi ve manda sütlerinde ve peynirlerde *C. difficile* varlığı araştırılmıştır. Elde edilen *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) şüpheli izolatlar ön eleme için API 32A ile tanımlanmıştır. Bu aşamada *C. difficile* olarak belirlenen izolatlar moleküler yöntemler ile doğrulanmıştır. Moleküler olarak *C. difficile* olduğu kesinleştirilen izolatlarda ise toksin A, toksin B ve binary toksin varlığı araştırılmıştır.

**2. Araştırma** Süt ve süt ürünlerinde olası *C. difficile* kontaminasyonlarının önlenmesinde uygulanacak ısıtma işlemi süre ve sıcaklıkları belirlenmiş ve etkinlikleri araştırılmıştır. *C. difficile* standart suş ve izolatlarının ısısız direnci iki farklı matematiksel model yardımıyla incelenmiştir. *C. difficile*'ye ait logaritmik azalma süreleri sütte ilk kez belirlenmiştir.

**3. Araştırma** Süt ve süt ürünleri üretimi sırasında diğer *Clostridial* sporların eliminasyonunda kullanılan bir yöntem olan baktöfugasyon işleminin, sütteki olası *C. difficile* sporlarının eliminasyonunda etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla baktöfugasyon uygulamasına benzer devir ve sürelerde santrifüjleme yapılarak uygulamaların etkinliği belirlenmiştir.

**4. Araştırma** *C. difficile*'nin önlenmesinde standart kültür koleksiyonlarına ait kültürler, gıda fermantasyonlarında kullanılan ticari kültürler ve laboratuvar izolatlarının kullanım olanakları in-vitro olarak araştırılmıştır. Etkin bulunan kültürlerin, ayrıca birlikte kullanımları ile etkinliklerinin artırılmasına çalışılmıştır. Ayrıca kültürlerin *C. difficile*



üzerine inhibisyon etkinliklerinin hangi tip bileşiklerden kaynaklandığı in-vitro yöntemler ile araştırılmıştır.

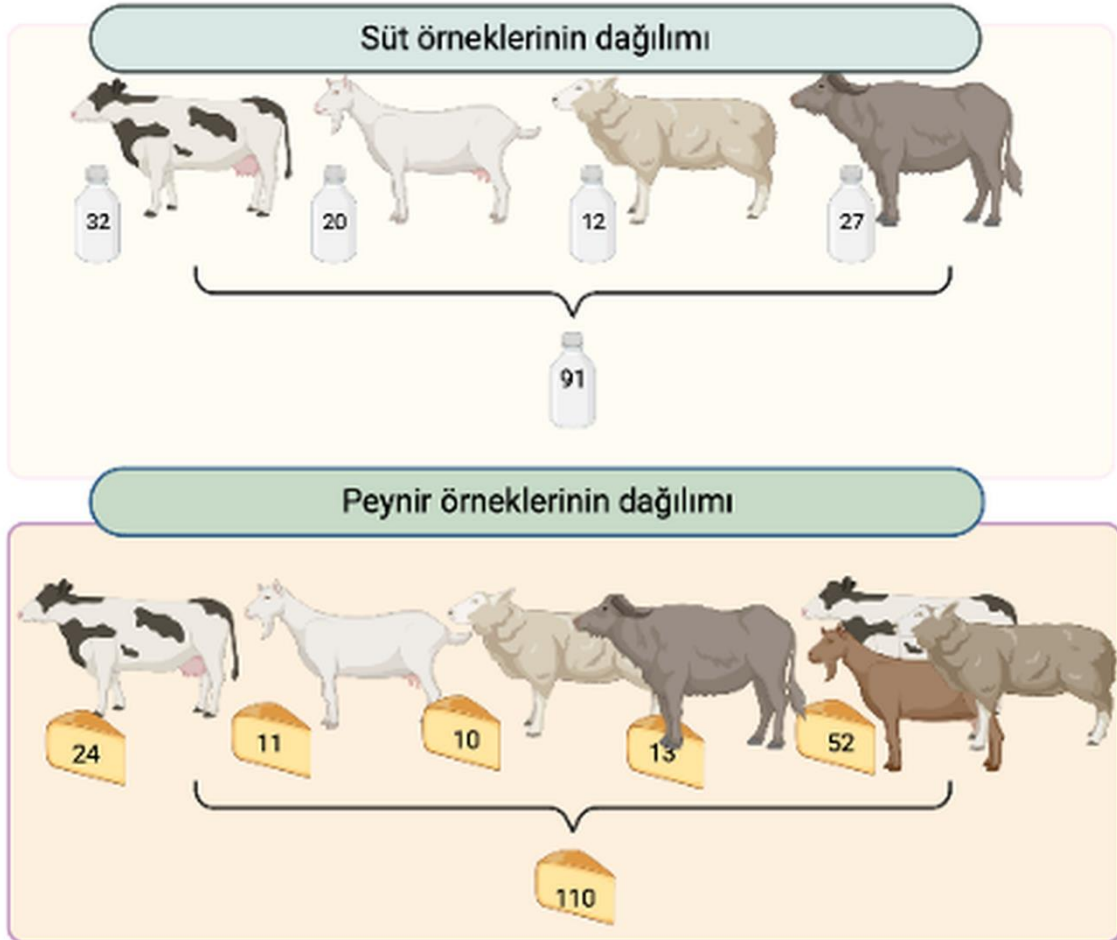
**5. Araştırma** İn-vitro yöntemler ile *C. difficile* üzerine inhibisyon etkisi belirlenen iki probiyotik kültür karışımı kullanılarak *C. difficile* ile kontamine peynirler üretilmiştir. *C. difficile*'nin peynir yapımında gelişen asitlik ve probiyotik kültür kullanımı ile inaktivasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Üretilen peynirler 3 ay boyunca depolanmış ve depolama süresince peynirlerin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik analizleri gerçekleştirilerek depolama süresince starter kültürlerin, *C. difficile* sayılarında ve peynirlerde oluşacak değişiklikler izlenmiştir.



## 3.2. Araştırma 1 Süt ve Peynir örneklerinde *C. difficile* Varlığının Belirlenmesi

### 3.2.1. Çiğ Süt ve Peynir Örneklenmesi

Analize alınan süt ve peynir örnekleri Manisa, Balıkesir, Kocaeli, İstanbul ve Çanakkale olmak üzere 5 farklı ilden temin edilmiştir. Toplamda 91 adet çiğ süt ve 110 adet peynir örneği temin edilerek *C. difficile* varlığı için araştırılmıştır (Şekil 3). Süt ve peynir örnekleme sırasında en az 100 mL süt ve 100 g peynir örneği steril kaplar içerisinde alınarak laboratuvara getirilmiştir (Şekil 4).



Şekil 3. *C. difficile* aranmasında kullanılan süt ve peynir örneklerinin dağılımı

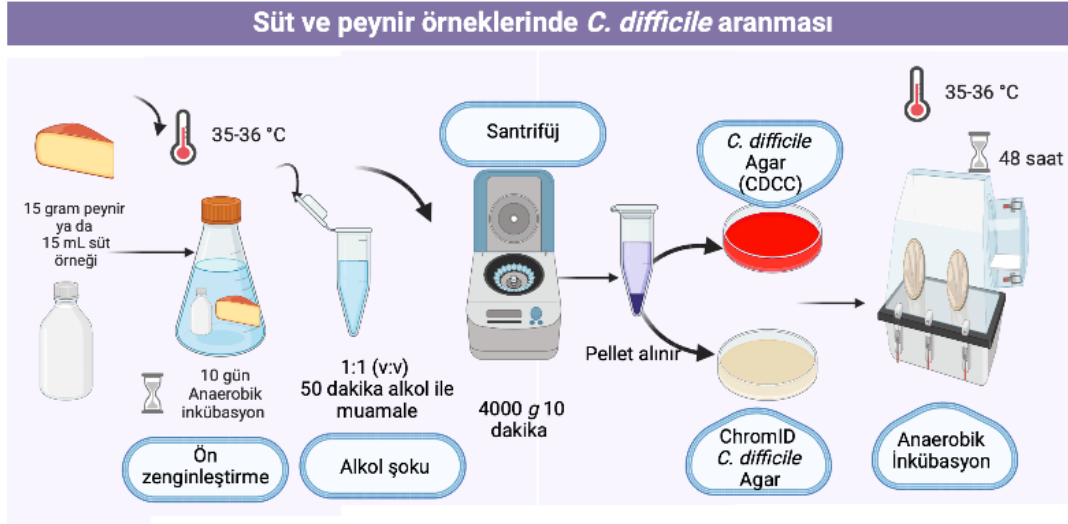


Şekil 4. *C. difficile* aranması için süt örneklenmesi

Peynir ve süt örneklerinde *C. difficile* aranmasında Pasquale vd., (2012) ve Norman vd., (2014)'nın yöntemleri modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda 15 gram peynir örneği ya da 15 mL süt örneği üzerine 30 mL *C. difficile* selective supplement (D-cycloserine- Cefoxitin (CC) içeren *C. difficile* enrichment broth (CDEB) (Protease peptone (40 g/L, Oxoid, İngiltere), fructose (6g/L, Merck, Almanya), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5g/L, Isolab, Almanya), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1g/L, Carlo Erba, Fransa), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,1g/L Alfa Aesar, Almanya), NaCl (2g/L, Merck, Almanya), taurocholic acid sodium salt hydrate (1g/L Merck, Almanya) ve, HiMedia, Hindistan)) besiyeri içerisinde 35-36°C'de 10 gün boyunca anaerobik kabin (Elektrotek 400TG, %80 N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, %10 H<sub>2</sub>, İngiltere) kullanılarak ön zenginleştirmeye bırakılmıştır.

Ön zenginleştirme sıvılarından 1 mL alınarak üzerine vejetatif hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla %96'lık etanol (1:1, v/v) ilave edilerek 50 dakika homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Ardından spor hücrelerinin toplanabilmesi için 4000 x g'de 10 dk santrifüj uygulanmış ve elde edilen pellet alınarak CC ilavesi ile birlikte %5 (v/v) at kanı (Liofilchem, İtalya) içeren *C. difficile* Agar Base (HiMedia, Hindistan)'e besiyeri ve ChromID *C. difficile* Agar (bioMérieux, Fransa) besiyerlerine eş zamanlı olarak inoküle edilmiştir (Şekil5). *C.difficile* Agar petripleri 48 saat, ChromID petripleri ise 24 saat 35-36°C'de anaerobik şartlarda inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 6). İnkübasyon süresi sonunda *C. difficile* Agar petriplerinde yuvarlak buzlu cam görünümünde at gübresi kokusuna sahip koloniler, ChromID petriplerinde ise siyah renkli koloniler alınarak

tanımlanması aşamasına kadar %17 Gliserol ve Yeast Extract (Merck, Almanya) içeren Brain Heart Infusion (BHI) Broth (HiMedia, Hindistan) -18°C’de saklanmıştır.



Şekil 5. Süt ve peynir örneklerinde *C. difficile* aranması



Şekil 6. Süt ve peynir örneklerinde *C. difficile* aranmasında inkübasyon görüntüleri (A) Ön zenginleştirme (B) selektif besiyerinde anaerobik inkübasyon

### 3.2.2. Elde edilen *C. difficile* izolatlarının tanımlanması

Tipik *C. difficile* morfolojik görüntüsü ile stok alınan şüpheli izolatların öncelikle tek koloni oluşturacak şekilde BHI Agar besiyerine çizilmiş, tek kolonilerden Gram (+) ve basil şekilli olan izolatlar API 32 A (Biomérieux, Fransa) hızlı tanı kiti ile tanımlanmıştır. API Rapid ID 32 A ile *C. difficile* olarak tanımlanan izolatlar ise moleküler yöntemler ile doğrulanmaya çalışılmıştır. Moleküler olarak da *C. difficile* olarak belirlenen izolatların, toksin A, toksin B ve binary toksin tipleri belirlenmiştir.

#### API 32 A ile Tanımlanması

Tipik morfolojik görüntü ve kokudaki şüpheli izolatlara gram boyama yapılmasının ardından Gram pozitif ve basil görüntüdeki izolatlar API Rapid ID 32 A hızlı tanı kiti (bioMérieux, Fransa) ile tanımlanmıştır (Şekil 7). Kit üretici talimatlarına göre uygulanmış olup 35-36°C'de %5 (v/v) koyun kanı (Liofilchem, İtalya) içeren BHI (HiMedia, Hindistan) Agar'da anaerobik koşullarda 24 saat inoküle edilerek aktif hale getirilen kültürler McFarland 4'e ayarlanarak test uygulanmıştır. 4 saatlik inkübasyon sonunda API Web™ yazılımında (versiyon 1.3.0) veritabanı kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.



Şekil 7. Rapid ID 32 A ile şüpheli izolatların tanımlanması

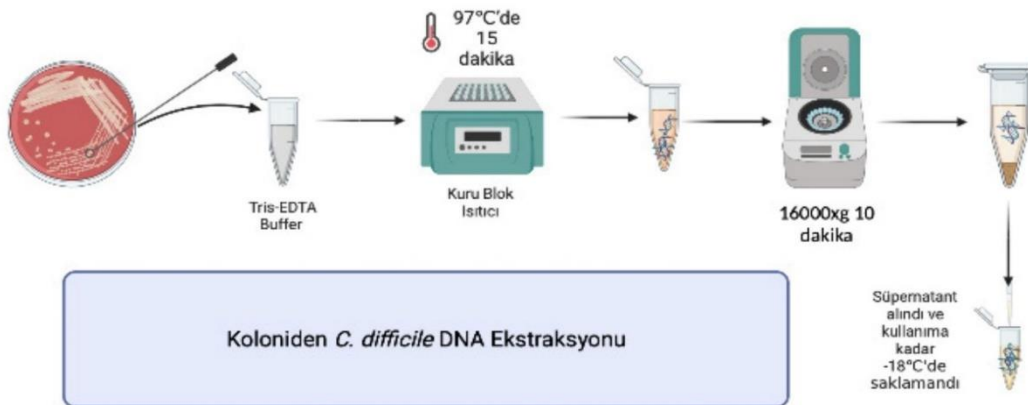
## Multiplex real-time PCR ile Doğrulama

API Rapid ID 32 A test kitlelerinde *C. difficile* sonucunu veren izolatların PCR’da doğrulanması amacıyla ilk olarak DNA ekstraksiyonları gerçekleştirilmiştir. DNA ekstraksiyonları hem elde edilen şüpheli izolatlardan hem de analize alınan gıdaların ön zenginleştirme sıvılarından gerçekleştirilmiştir.

### DNA Ekstraksiyonu

#### Direkt Şüpheli Koloniden DNA Ekstraksiyonu

BHI Agar besiyerinde 24 saat 35-36°C’de canlandırılmış olan şüpheli *C. difficile* izolatlarından 1 öze dolusu alınarak 1 mL TE (Tris-EDTA) Buffer (Sigma-Aldrich, ABD) içeren santrifüj tüpüne (dnase, rnase free) aktarılmıştır. Tüpler 97°C’de 15 dakika kuru blok ısıtıcıda (ThermoFisher Scientific, ABD) kaynatılmıştır. Kaynatılan tüplere 16000 xg’de 10 dakika santrifüj uygulanmıştır (Hermle Z 326 K, Almanya). Santrifüj sonunda çöken pelet uzaklaştırılmıştır (Rahimi vd., 2014) (Şekil 8). Elde edilen DNA ekstraktları -18°C’de saklanmıştır.

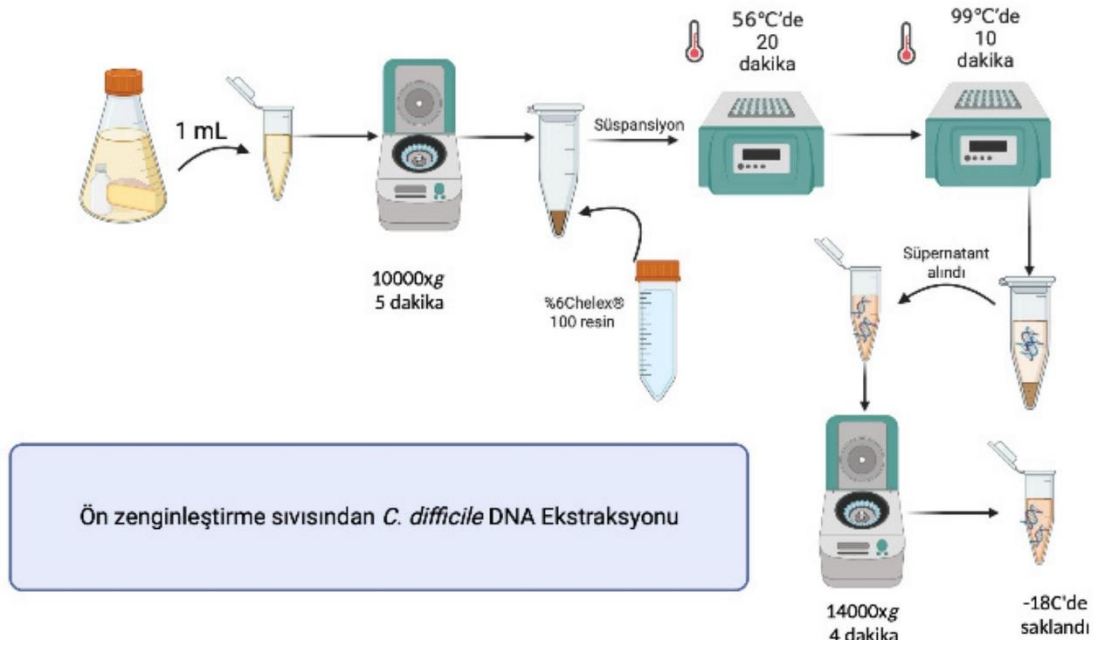


Şekil 8. Koloniden *C. difficile* DNA ekstraksiyonu



## Ön Zenginleştirme Sıvısından DNA Ekstraksiyonu

Ön zenginleştirme sıvılarından 1 mL'si alınarak santirifüj tüplerine aktarılmıştır. Ardından 10000xg'de 5 dk santrifüj edilmiş ve oluşan süpernatant uzaklaştırılarak çöken pelet %6'lık Chelex® 100 resin (BIO-RAD, ABD) ile süspansiyon edilmiştir. 56°C'de 20 dakikalık ısıl işlemin ardından 99°C'de 10 dk kaynatma uygulanan süpernatant 4°C'de 14000g'de 5 dk santrifüj edilmiştir (Heise vd., 2021) (Şekil 9). Elde edilen DNA ekstraktları -18°C'de saklanmıştır.



Şekil 9. Süt ve peynir örneklerine ait ön zenginleştirme sıvılarından DNA ekstraksiyonu

## İzolatlarda *C. difficile* Trioz Fosfat İzomeraz (*tpi*) Gen Varlığının PCR ile Belirlenmesi

Hem izolatlardan hem de önzenginleştirme sıvılarından elde edilen DNA ekstraktlarındaki *C. difficile tpi* geninin varlığı Heise vd., (2021) yöntemi modifiye edilerek belirlenmiştir. Mastermix (Roche, Almanya), primer ve probler (Eurofins Genomics, Avusturya) ve plazmid (Genscript, ABD) üretici talimatlarına göre hazırlanmıştır. İç amplifikasyon kontrolü olarak

[CY5]AATCGGCCAACGCGCGG[BHQ2] prob ile saptanacak *E. coli* plazmidi (pUC18 plazmid DNA, SD1162) plazmid DNA kullanılmıştır (Maurischat vd., 2015). İzolatlardan bir tanesi için gerekli olan karışım Tablo 2’de belirtilmiştir. Primer ve problemlerin nükleotid dizilimi Tablo 3’de verilmiştir. Primerler 5 pmol/μL ve problemler 2,5 pmol/μL olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımlar 96 kuyucuklu plaklara her birinde 15 μL olacak şekilde aktarılmıştır. Negatif kontrol için 5 μL PCR water eklenmiştir. Kuyucuklara 5 μL DNA ekstraktı eklendikten sonra plak üzerine sızdırmaz film (sealing film, SSIbio, ABD) yapıştırılarak 2500 rpm’de 20 saniye spindown (Fisherbrand, ABD) ile homojenizasyonu sağlanmıştır (Şekil 10). Plak Real time PCR (BIO-RAD, CFX96 Real-Time System, C1000 Touch Thermal Cycler, ABD) haznesine yerleştirilerek süre, sıcaklık ve döngü koşulları aşağıda belirtilen adımlarda yürütülmüştür. Pozitif kontrol olarak standart *Clostridioides difficile* ATCC 700057 *Clostridioides difficile* ATCC 43593, *Clostridioides difficile* ATCC 1870 ve *Clostridioides difficile* ATCC 9689 suşları kullanılmıştır. İzolatlara ait sonuçlar standart suşların DNA ekstraktlarından (pozitif kontrol) ve PCR water (negatif kontrol) elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Tablo 2

Real time PCR (qPCR) *tpi* gen karışımı

Malzemeler	Toplam Miktar (20 μL)
Light cycler 480 mastermix	10 μL
Tpi primer F20 μM	0,25μL
Tpi primer R20 μM	0,25μL
Plasmid primer F20 μM	0,25μL
Plasmid primer R20 μM	0,25μL
Tpi probe 20 μM	0,125μL
Plasmid probe 20 μM	0,125μL
Plasmid	0,1μL
DNA template	5 μL
PCR water	3,65 μL



Tablo 3

*tpi* geni ve plazmid belirlemede kullanılan primer ve proplar

	Nükleotid dizilimi (5'-3')
<i>tpiR</i>	GGTCTATTCCTACTTCTAATGC
<i>tpiF</i>	GAAGCTACTAAGGGTACAAA
<i>tpi</i> prob	[HEX]ATAAGAGGTGAAACTTCTCCTGTAAATGCTCC[TAM]
Plazmid (F)	GTCGGGAAACCTGTCG
Plazmid (R)	GCTCACATGTTCTTTCCTGC
Plazmid prob	[CY5]AATCGGCCAACGCGCGG[BHQ2]

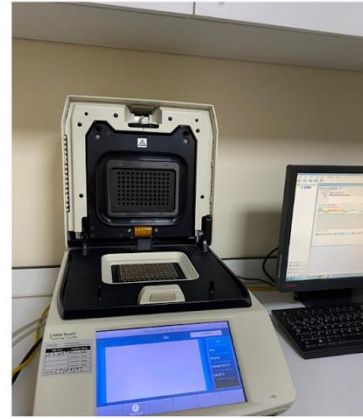
1. Adım 95°C → 5 dk
  2. Adım 95°C → 10 sn
  3. Adım 59°C → 1 dk
  4. Adım 72°C → 1 sn
  5. Adım 25°C → 30 sn
- } (2. adıma döngü 39 tur)



(a)



(b)



(c)

Şekil 10. (a) PCR karışımının hazırlanması (b) DNA ekstraktlarının kuyucuklara eklenmesi (c) Plagın PCR'a yüklenmesi

### 3.2.3. İzolatların Toksin Tiplerinin Belirlenmesi

*tpi* geni pozitif sonuç veren izolatların toksin A, toksin B ve binary toksin tipleri belirlenmiştir.

#### Toksin A ve Toksin B'nin Belirlenmesi

Süt örneklerinden elde edilen izolatlardan *tpi* genine sahip izolatların toksin A ve B genine sahip olup olmadığı qPCR ile belirlenmiştir. Toksinlerin belirlenmesi için gerekli olan karışım Tablo 4'de belirtilmiştir. İzolatların toksin A ve toksin B belirlenmesinde kullanılan primer, prob ve PCR döngü koşulları Tablo 5'de gösterilmiştir. Primerler 8 pmol/μL ve proplar 5 pmol/μL olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımdan 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucukta 15 μL olacak şekilde aktarılmıştır. Negatif kontrol için 5 μL PCR water eklenmiştir. Pozitif kontrol için toksin A ve B (+) *C. difficile* standart ATCC 1870 ve ATCC 9689 suşları kullanılmıştır. Kuyucuklara 5 μL DNA ekstraktı eklendikten sonra plak üzerine film yapıştırılarak 2500 rpm'de 20 saniye spindown (Fisherbrand, ABD) ile homojenizasyon sağlanmıştır. Plak Real time PCR (BIO-RAD, CFX96 Real-Time System, C1000 Touch Thermal Cycler, ABD) haznesine yerleştirilerek süre, sıcaklık ve döngü sayıları aşağıda belirtilen adımlarda PCR'da yürütülmüştür. Sonuçlar toksin A ve B pozitif standart suşların DNA ekstraktlarından (pozitif kontrol) ve PCR water (negatif kontrol) elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4

Real time PCR (qPCR) ile Toksin A ve B belirlemede kullanılan karışım

Malzemeler	Toplam Hacim (20 µL)
Light cyclers 480 mastermix	10 µL
Toksin A primer F10 µM	0,8 µL
Toksin A primer R10 µM	0,8 µL
Toksin B primer F10 µM	0,8 µL
Toksin B primer R10 µM	0,8 µL
Toksin A probe 10 µM	0,5 µL
Toksin B probe 10 µM	0,5 µL
DNA ekstraktı	5 µL
PCR water	0,8 µL

Tablo 5

Toksin A ve Toksin B belirlemede kullanılan primer ve problemler

Nükleotid dizilimi (5'-3')	
toksin A (F)	TGATAACGTATAGCTTGACC
toksin A (R)	ATGGTTTACCTCAGATAGG
toksin B (F)	GAAGGATTACCTGTAATTGC
toksin B (R)	CTGCCATTATACCTATCTTAGC
toksin A probe	[FAM]TGAATACTTTGCACCTGCTAATACGGATG[TAM]
toksin B probe	[HEX]CTCTTTGATTGCTGCACCTAAACTTACACC[TAM]

1. Adım 95°C → 5 dk
  2. Adım 95°C → 15 sn
  3. Adım 60°C → 1 dk
  4. Adım 25°C → 30 sn
- } (2. adıma döngü 39 tur)

## Binary Toksinin Belirlenmesi

Binary toksin belirlenmesinde izolatlardan bir tanesi için gerekli olan karışım Tablo 6'de belirtilmiştir. Binary toksinin belirlenmesinde kullanılan plazmid, primer ve proplar Tablo 7'de gösterilmiştir. İç amplifikasyon kontrolü olarak [CY5]AATCGGCCAACGCGCGG[BHQ2] problu *E. coli* plasmidi kullanılmıştır (Maurischat vd., 2015). Primerler 5 pmol/μL ve proplar 2,5 pmol/μL olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımlar 96 kuyucuklu plaklara kuyucukların her birinde 15 μL olacak şekilde aktarılmıştır.

Negatif kontrol için 5 μL PCR water eklenmiştir. Pozitif kontrol için binary toksin (+) *C. difficile* standart ATCC 1870 suşu kullanılmıştır. Kuyucuklara 5 μL DNA ekstraktı eklendikten sonra plak üzerine film yapıştırılarak 2500 rpm'de 20 saniye spindown (Fisherbrand, ABD) ile homojenizasyon sağlanmıştır. Plak Real time PCR haznesine yerleştirilerek süre, sıcaklık ve döngü sayıları aşağıda belirtilen adımlarda PCR'da yürütülmüştür. Sonuçlar binary toksin pozitif standart suşların DNA ekstraktlarından (pozitif kontrol) ve PCR water (negatif kontrol) elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Bu aşamada kullanılan PCR döngü koşulları aşağıda verilmiştir

1. Adım 95°C → 5 dk
  2. Adım 95°C → 10 sn
  3. Adım 59°C → 1 dk
  4. Adım 72°C → 1 sn
  5. Adım 25°C → 30 sn
- } (2. adıma döngü 39 tur)

Tablo 6

Real time PCR (qPCR) binary toksin belirlemede kullanılan karışım

Malzemeler	Toplam Miktar (20 µL)
Light 47ycler 480 mastermix	10 µL
Binary primer F 10 µM	0,5 µL
Binary primer R 10 µM	0,5 µL
Plasmid primer F20 µM	0,25 µL
Plasmid primer R20 µM	0,25 µL
Binary probe 20 µM	0,25 µL
Plasmid probe 20 µM	0,125 µL
Plasmid	0,1 µL
DNA template	5 µL
PCR water	3,025 µL

Tablo 7

Binary toksin varlığının belirlenmesinde kullanılan plasmid, primer ve proplar

Nükleotid dizilimi (5-3)	
Binary toksin (F)	TATATTAAGCAGAAGCATCTGT
Binary toksin ®	CTGGACCATTTGATATTAATAATT
Binary toksin probe	[FAM]TCCTCCACGCATATAATCATTTACATCAGC[TAM]
Plasmid (F)	GTCGGGAAACCTGTGC
Plasmid ®	GCTCACATGTTCTTTCTGC
Plasmid prob	[CY5]AATCGGCCAACGCGCGG[BHQ2]

### 3.2.4. İzolatların Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

İzolatların ve *C. difficile* (ATCC 700057, ATCC 43593, ATCC 9689 ve ATCC 1870)'nin vankomisin, metronidazol ve klindamisin antibiyotiklerine duyarlılıkları gradient test şeritleri (HiMedia, Hindistan) ile belirlenmiştir. Tedavide sıklıkla kullanılan

antibiyotiklerin minimum inhibisyon (MİK) değerleri test şeritlerinin yerleştirildiği bölgenin etrafında oluşacak inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçek ile kesiştiği nokta üzerinden belirlenmiştir (CLSI, 2012; CLSI 2023).

### **3.3. Araştırma 2 Süte Uygulanan Isıl İşlemlerin *C. difficile* Sporları Üzerine Etkisi**

*C. difficile*'nin hayvansal ürünler ve sütlerde izole edildiği göz önünde bulundurulduğunda termal direncinin süt içerisinde araştırılması direkt olarak süte inoküle edilerek gerçekleştirilmiştir. Çalışmada iki toksin oluşturan suş *C. difficile* ATCC 1870 (ribotip 027, A + B + CDT +) ve *C. difficile* ATCC 9689 (ribotip 001, A + B + CDT-) ve iki toksin oluşturmeyen suş *C. difficile* ATCC 700057 (ribotip 038, A- B- CDT-) ve *C. difficile* ATCC 43593 (ribotip 060, A- B- CDT-)'nin süt içerisinde termal ısıl dirençleri araştırılmıştır. Ayrıca birinci bölümde süt örneklerinden izole edilen ve moleküler olarak *C. difficile* olduğu doğrulanan iki izolata ait sporların ısıl dirençleri de süt içerisinde incelenmiştir. Çalışmada *C. difficile* suşları çevresel ortamlarda ve sütte spor şeklinde bulunacağı için ısıl işlem uygulamalarında *C. difficile* sporlarını kullanılmıştır.

#### **3.3.1. Spor Süspansiyonlarının Hazırlanması**

*C. difficile*'ye ait spor süspansiyonlarının hazırlanmasında Roshan, (2019) ve Arora et al., (2019)'nın yöntemleri birleştirilerek kullanılmıştır. *C. difficile*'ye ait her bir suş için kültürler %5 (v/v) koyun kanı içeren BHIS (Brain Heart Infusion, %0,5 yeast extract (Merck, Almanya), %0,1 L-cysteine (Merck, Almanya), 5µg/mL Hemin (Sigma, ABD), 1µg/mL K1 vitamini (Roche, Almanya)) Agar üzerine aktarılarak 10 gün boyunca 35-36°C'de anaerobik kabin içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petriyer vejetatif hücrelerin elimine edilebilmesi için 24 saat boyunca oda koşullarında bırakılmıştır. Petriyer üzerinde gelişen koloniler steril özeler yardımıyla toplanarak soğuk steril su içerisine alınmış ve steril santrifüj tüpleri içerisinde süspansiyon edilmesini sağlanmıştır. Süspansiyonlar içerisinde herhangi bir vejetatif hücre kalmadığından emin olunması için tüpler 70°C'de 20 dakika ısı uygulamasına maruz bırakılmıştır. Bunun ardından santrifüj

tüplerine 4000xg'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulanarak oluşan pellet steril destile su ile 10 kez yıkanmış ve her işlemde tekrar santrifüj uygulanarak süpernatant uzaklaştırılmıştır. Son aşamada hazırlanan süspansiyonun içeriğindeki spor sayısı seri dilüsyonları hazırlanarak spor sayımı ile kontrol edilmiştir. Ayrıca spor süspansiyonları spor boyama yapılarak mikroskopta kontrol edilmiştir.

### 3.3.2. Spor Süspansiyonlarının Süte İnokülasyonu

Bu amaçla 45 mL ticari UHT (3% yağ, 3,1% protein, 4,5% karbonhidrat, SEK, Türkiye) süte, 5 mL $10^8$  spor/mL (3 McFarland) içeren spor süspansiyonu eklenerek sütteki nihai spor süspansiyonun  $10^7$  spor/mL olması sağlanmıştır. Spor süspansiyonu ile karıştırılan süt, ısıtma işlemi uygulamak amacıyla 1 mL'lik steril santrifüj tüplerine bölünmüştür. Ayrıca analizde kullanılan süt örneklerinden ayrılarak *C. difficile* varlığı kontrol edilmiştir.

### 3.3.3. Sıcaklık Uygulaması

Isıtma işlemleri sıcaklık kontrollü su banyosunda (Mettler, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Su banyosu içerisindeki sıcaklık dağılımının homojenitesi her çalışma öncesi el termometresi ile kontrol edilmiştir. Spor solüsyonu içeren santrifüj tüpleri, ısıtma işlemi uygulaması için uygulanacak sıcaklıkta seçilen süreler için paraleli olacak şekilde hazırlanarak su banyosuna yerleştirilmiştir. Su banyosuna yerleştirilen tüplerin hedef sıcaklığa ulaşması, içerisinde spor solüsyonu bulunmayan santrifüj tüpü içerisine yerleştirilen el termometresi ile kontrol edilmiştir. Kontrol tüpü içerisindeki sıcaklık hedef sıcaklığa ulaştığında, hedef sıcaklıkta tutma süresi başlatılmıştır. Tüpün hedef sıcaklığa gelene kadar su banyosu içerisinde geçirdiği süre, hedef sıcaklıkta tutma süresine dahil edilmemiştir.

Analizde kullanılan *C. difficile* (ATCC 9689, 1870, 700057 ve 43593) ve iki laboratuvar izolatına ait spor süspansiyonları için sütün pastörizasyonunda kullanılan 63°C'den başlayarak ısıtma işlemleri 65, 75, 77,5, 80, 82,5 ve 85°C  $\pm 0,1^\circ\text{C}$  değişkenlik ile

gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık uygulaması sonrası su banyosundan çıkarılan tüpler, buzlu su içerisine alınarak hızlıca soğumaları sağlanmıştır.

Sıcaklık uygulaması sonrası canlı kalan hücrelerin sayımı için tüpler iki kez 4000xg'de santriüjlenerek süt kalıntıları uzaklaştırılmış ve sporların çökmesi sağlanmıştır. Ardından seri dilüsyonları hazırlanarak BHIS Agar üzerine inoküle edilmiştir. Petriler 48 saat boyunca 37°C'de anaerobik kabin içerisinde inkübasyona bırakılmış ve sonrasında oluşan koloniler sayılmıştır.

### **3.3.4. Log-Lineer ve Weibull Modelleri Kullanılarak *C. difficile* Sporlarının Termal Dirençlerinin Hesaplanması**

#### **Log-Lineer Model**

Süt içerisinde inoküle edilen *C. difficile* spor süspansiyonlarının termal dirençlerinin belirlenmesinde ilk olarak log-lineer model kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Bu amaçla spor süspansiyonlarının termal dirençlerinin hesaplanmasında kullanılan log-lineer modelde, 2 temel varsayım kabul edilerek hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Bu varsayımlar;

a. termal uygulamalar, su banyosunda eşit sıcaklıkta ve sporların eşit olarak dağıldığı 1 mL spor- süt süspansiyonu içeren santrifüj tüpleri içerisinde gerçekleştirilmiştir.

b. Aynı suşa ait her bir spor hücresi termal direnç açısından homojendir.

Mikroorganizmaların ısı ve diğer işlemler ile inaktivasyonunun geleneksel olarak birinci dereceden in aktivasyon kinetiğini takip ettiği varsayılmıştır. D değerine ait denklem



$$\log_{10}\frac{N}{N_0} = -\frac{t}{D} \quad (3.1)$$

olarak ifade edilmiştir

Bu denklemde verilen  $N_0$  başlangıç hücre sayısını (spor/mL),  $N$  ısıtma işlem süresinden sonra hayatta kalan hücrelerin sayısını (spor/mL),  $D$  (ilk ondalık azaltma süresi) organizmaların %90'ını yok etmek için gereken süreyi (dk),  $t$ =uygulama süresini (dk) temsil etmektedir.  $D$  değeri belirli ısıtma şartları altında başlangıçta var olan canlı mikroorganizma sayısının %90'nının inaktive edilebilmesi için gereken süre olarak ifade edilmektedir.

Termal inaktivasyonu tanımlamak için kullanılan ikinci parametre  $z$  ile gösterilen sıcaklık hassasiyeti göstergesidir.  $z$  değeri,  $D$  değerinin %90 azaltılması için gereken sıcaklık farkı olarak tanımlanmaktadır.  $z$  değeri, ısıtma sıcaklıklarına karşı  $\log_{10}D$ 'nin bir grafiği olan termal direnç eğrisinin negatif eğimi olarak elde edilmiştir.  $z$  değeri Denklem (3.2)'de gösterildiği gibi belirlenmiştir.

$$z = \frac{T_2 - T_1}{\log_{10}D_1 - \log_{10}D_2} \quad (3.2)$$

Denklemde  $D_1$  ve  $D_2$ , sırasıyla  $T_1$  ve  $T_2$  sıcaklıklarındaki  $D$  değerleridir.

Analiz edilen *C. difficile* sporlarının  $D$  değerlerinin hesaplanmasında Bigelow birinci dereceden modeli kullanılmıştır. Isıtma işlem sonrasında elde edilen sayım sonuçları Excel (2010\*, Microsoft, Redmond, WA)'e eklenen GInaFiT Geeraerd ve Van Impe inaktivasyon modeli versyon 1.7 (Geeraerd vd., 2005) kullanılarak değerlendirilmiştir.

$D$  değerlerinin hesaplanmasından sonra  $z$  değeri, sıcaklık ve  $\log D$  değerlerinin eğiminden Excel yazılımında doğrusal regresyon ile hesaplanmıştır. Sıcaklık ile  $D$  değerlerinin korelasyonlarının belirlenmesinde normallik testi yapılarak normallik testi

anlamalı çıkan değerlerin korelasyon katsayıları Pearson's korelasyon katsayısı ile değerlendirilmiştir.

### **Weibull Modeli**

Süt içerisinde inoküle edilen *C. difficile* spor süspansiyonlarının termal dirençlerinin belirlenmesinde ikinci olarak Weibull modeli kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Bu amaçla spor süspansiyonlarının termal dirençlerinin hesaplanmasında kullanılan Weibull modelinde de, 2 temel varsayım kabul edilerek hesaplamalar gerçekleştirilmiştir.

Bu varsayımlar;

- a. spor popülasyondaki her bir suşa ait sporların farklı dirençlere sahip olduğu
- b. Elde edilen hayatta kalma eğrisi her bir sporun ısıl işlem direnci dağılımının kümülatif (birikerek artma) biçimidir (Chen and Hoover, 2004).

$$\log N = \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^\beta \quad (3.3)$$

Bu denklemde  $\delta$ , ilk logaritmik azalma süresini temsil eder. Bu süre, hücre veya spor sayısında 1 log azalma elde etmek için gereken süre olduğundan, lineer termal inaktivasyonun D-değerine benzer ancak  $\beta$  değerine bağlıdır.  $\beta$  değeri boyutsuz bir parametredir ve "şekil parametresi" olarak adlandırılır; eğrinin geometrik şeklini belirler.

Sporisidal aktivitenin Weibull ile modellenmesi Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, 2010)'e eklenen GInaFiT Geeraerd ve Van Impe inaktivasyon programı versiyon 1.7 (Geeraerd vd., 2005) ile yapılmıştır.

Weibull modeline ait oluşturulan grafikler yorumlanırken (Arora vd., 2019)'ın

belirttiği  $\beta$  değerleri yorumları dikkate alınmıştır.

Bu doğrultuda;

$\beta > 1$  ise hayatta kalma eğrilerine ait grafik iç bükey olacak aynı zamanda  $\delta$  değerinin zamanla azaldığı, diğer bir ifade ile ısıtma işlem süresi içerisinde canlı kalan sporların ısıya karşı daha hassas olduğu

$\beta < 1$  ise hayatta kalma eğrisine ait grafiğin yukarı iç bükey ve  $\delta$  değerinin zamanla arttığını diğer bir ifadeyle ısıtma işlem süresince kalan sporların daha yüksek dirence sahip olduğu, strese uyum sağladığı

$\beta = 1$  ise  $\delta$  değeri sabit bir değer olduğu ve ölüm hızı zamandan bağımsız olarak değerlendirildiği ve tüm popülasyondaki sporların eşit dirence sahip olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

### **Modellerin Karşılaştırılması**

Modellerin karşılaştırılması amacı ile ortalama kareler hatası (MSE) değerleri göz önüne alınmıştır. Her bir model için belirlenen ortalama karesel hata değeri GlanaFIT programı kullanılarak hesaplanmıştır. Bu amaçla yapılan değerlendirmede her bir sıcaklık için iki model karşılaştırıldığında MSE değerleri ne kadar küçük belirlenmişse elde edilen hayatta kalma verilerinin modele uygunlukları artmaktadır (Chen, 2007). MSE değerinin hesaplanmasına ait denklem (3.4)'de verilmiştir.

$$MSE = \frac{\sum(\text{belkelenen sonu\c{c}} - \text{gözlenen sonu\c{c}})^2}{n-p} \quad (3.4)$$

Denklemden n, gözlem sayısını ve p ise tahmin edilecek parametre sayısını temsil etmektedir (Chen ve Hoover, 2004).

### **3.4. Araştırma 3 Süte *C. difficile* Kontaminasyonlarının Önlenmesinde Baktöfugasyon İşleminin Etkisi**

Baktöfugasyon işlemi süt içerisindeki toplam bakteri yükünün (Doyle vd., 2015; Ribeiro vd., 2019) ve bakteriyel sporların eliminasyonu için (Burtscher vd., 2023; D’Incecco vd., 2018, 2023; Garde, Arias, vd., 2011) kullanılmaktadır. Süt endüstrisinde sıklıkla kullanılan baktöfugasyon işleminde süte 8000 xg ve 10000 xg’de santrifüj uygulandığı bildirilmektedir (D’Incecco vd., 2023; Ribeiro vd., 2019).

Bu amaçla pastörize süt içerisine  $10^8$  spor/mL düzeylerinde *Clostridioides difficile* ATCC 700057 *Clostridioides difficile* ATCC 43593, *Clostridioides difficile* ATCC 1870 ve *Clostridioides difficile* ATCC 9689 sporları süte inoküle edilerek santrifüj tüpüne aktarılmıştır. İlk olarak sporların elde edilmesinde uygulanan 4.000 xg’de 10 dakika (Roshan, 2019) denenmiş ardından 10.000 xg’de (Gurian vd., 1982; Ribeiro vd., 2019) 15 dakika, sonrasında 12.000 xg’de 10 ve 15 dakika santrifüj uygulaması gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda tüpün üzerinde kalan süpernatant kısmı alınarak desimal dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan BHIS Agar plaklarına ekim yapılmıştır. Petriler 37°C’de 48 saat anaerobik koşullarda inkübe edilerek ve inkübasyon sonunda koloni sayımı yapılmıştır.

### **3.5. Araştırma 4 *C. difficile* Üzerine Standart, Ticari ve Laboratuvar İzolatlarının Kullanımı ile İnaktivasyonunun in-vitro Olarak Belirlenmesi**

#### **3.5.1. Kullanılan Mikroorganizmalar**

Çalışmamızda *C. difficile* üzerine kullanılan kültürlerin etkilerinin in-vitro olarak belirlenmesinde kullanılan tüm kültür ve kültür karışımları Tablo 8 ‘de gösterilmiştir. Kültürlerin seçiminde literatürde *C. difficile* ve diğer *Clostridium* spp. üzerine etkili bulunan türlerin ticari olarak yer aldığı karışımlar ile birlikte tekli standart kültürler ve laboratuvar izolatları dikkate alınmıştır

Tablo 8

Çalışmada kullanılan probiyotik kültürler, *Clostridioides difficile* kültürleri, *C. sporogenes* ve *C. perfringens* kültürleri ve bu kültürlerin kaynakları

Kültürler	Kültür tipi /Kültür içeriği	Kaynak
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	Tek kültür	(1)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Tek kültür	(2)
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 20219	Tek kültür	(2)
<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B 1922	Tek kültür	(3)
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 334	Tek kültür	(2)
LA5-C®	Tek kültür / <i>Lactobacillus acidophilus</i>	(4)
BB.12®	Tek kültür / <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB12	(4)
YOFLEX® YF-L901 (YF-L901)	Karışık kültür/ <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	(4)
DVS® ABT-2 (ABT-2)	Karışık kültür/ <i>Streptococcus salivarius thermophilus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> B	(4)
FD-DVS ABT-7 Probio-Tec® (ABT-7)	Karışık kültür/ <i>Streptococcus thermophilus</i> , LA5-C, <i>Bifidobacterium</i> species	(4)
Bactoferm SM-199 (SM-199)	Tek kültür / <i>Lactobacillus plantarum</i>	(4)
Ticari kültür	Tek kültür / <i>Enterococcus faecium</i> CBT EF4 <i>Lactobacillus acidophilus</i> CBT LA1, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CBT LR5, <i>Bifidobacterium longum</i> CBT BG7, <i>Bifidobacterium bifidum</i> CBT BF3	(5)
İzolat 33	Tek kültür	(6)
İzolat 43	Tek kültür	(6)
<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 700057 (ribotype 038, A- B- CDT-)	Tek kültür	(2)
<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 43593 (ribotype 060, A- B- CDT-)	Tek kültür	(2)

Tablo 8'in devamı

Kültürler	Kültür tipi /Kültür içeriği	Kaynak
<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 9689 (ribotype 001, A + B + CDT-)	Tek kültür	(2)
<i>Clostridioides difficile</i> ATCC 1870n(ribotype 027, A + B + CDT +)	Tek kültür	(2)
<i>Clostridioides difficile</i> S25	Tek kültür	(7)
<i>Clostridioides difficile</i> S36	Tek kültür	(7)
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	Tek kültür	(2)
<i>Clostridium perfringens</i> 12915	Tek kültür	(2)

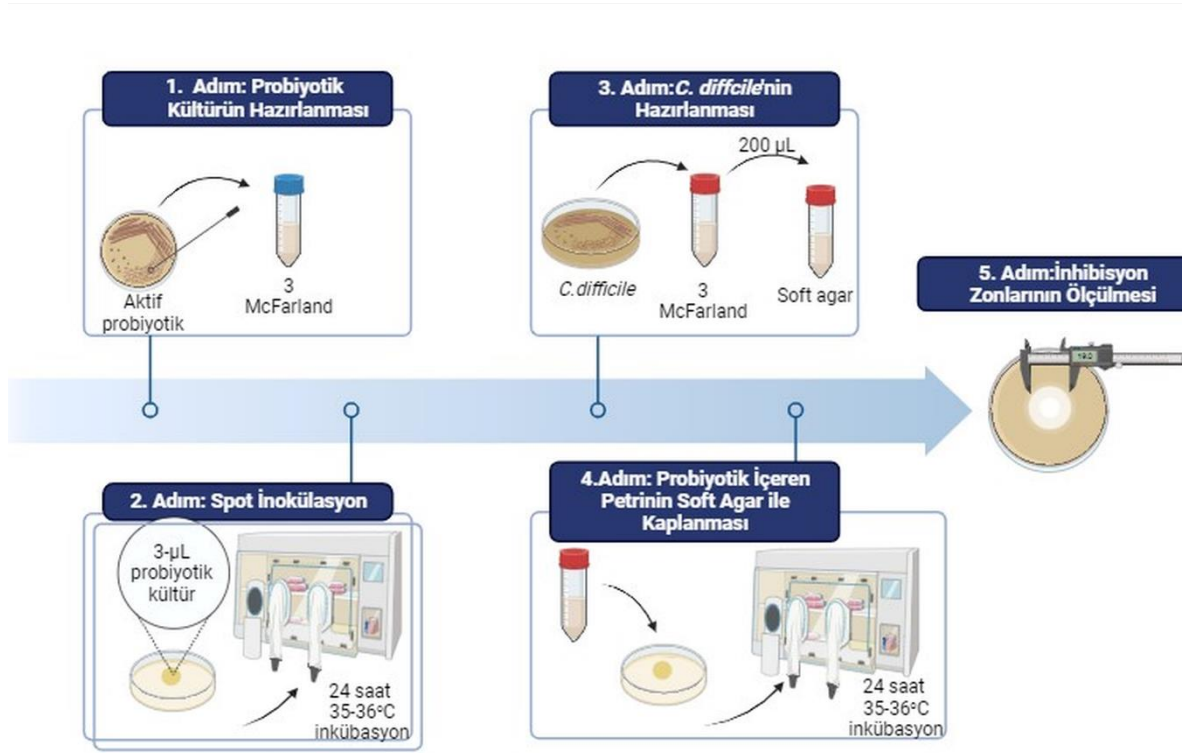
- (1) DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Almanya  
(2) ATCC: American Type Culture Collection  
(3) NRRL: Agricultural Research Service Culture Collection  
(4) CHR-HANSEN A/S  
(5) NBL Probiotics Gold® (Nobel, Türkiye)  
(6) Manda peynirinden izole edilen bu izolatların probiyotik kullanımına ilişkin ön çalışmalar yapılmıştır (Taylan, 2017)  
(7) Süt örneklerinden izole edilen ve moleküler olarak doğrulanmış *Clostridioides difficile* suşları

### 3.5.2. Anti- *C. difficile* (Anti-CD) Aktivitesi Olan Probiyotiklerin Belirlenmesi

Potansiyel probiyotiklerin Anti-CD aktivitelerinin belirlenmesi için yapılan analizler Islam vd., (2022) tarafından belirtilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla anti-CD özelliği araştırılan kültürler bir gece öncesinde MRS Agar (HiMedia, Hinhistan)'da anaerobik kabin içerisinde 36-37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda gelişen potansiyel probiyotik kültürlerden alınarak yoğunlukları 10<sup>8</sup> kob/mL'ye ayarlanmıştır. Daha sonra her bir kültürden alınarak paralel MRS Agar petripleri üzerine 3-µL'lik spot inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir. Spot inokülasyon yapılan kültürler 24 saat anaerobik kabinde inkübasyona bırakılmıştır. Potansiyel probiyotik spotları gelişimleri sonrası BHI Agar'da hazırlanan *C. difficile* kültürlerinden 200 µL inokulum içeren 10 mL %0,7 Agar içeren BHI soft agar ile kaplanmışlardır. Petripler yeniden anaerobik kabin içerisinde 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda spot inokülasyon yapılan probiyotiklerin etrafında oluşan inhibisyon zonları belirlenerek ölçülmüştür (Şekil 11). Analizde, pozitif kontrol olarak *C. difficile*

enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan vankomisin (30 µg/disk, Oxoid, İngiltere) diski kullanılmıştır.

Ayrıca etkin bulunan kültürlerden seçilerek kültür kokteylleri hazırlanarak birlikte kullanımlarının *C. difficile* üzerine etkileri aynı yöntem adımları izlenerek belirlenmiştir.



Şekil 11. Probiyotiklerin *C. difficile* üzerine anti-CD etkilerinin in-vitro olarak belirlenmesi

### 3.5.3. *C. difficile* Üzerine Standart, Ticari ve Laboratuvar Kültür Süpernatantının Mikrotitre Plakası (MTP) Analizi ile Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

*C. difficile* üzerine inhibisyon etkisi araştırılan standart, ticari ve laboratuvar izolatlarından etkin bulunan kültürler seçilerek bu etkinin seçilen kültürlerle ait hangi tip bileşiklerden kaynaklandığı araştırılmıştır. Bu çalışmada *C. difficile*'ye karşı yüksek inhibisyon gösteren kültürlerin etkinliklerinin temel kaynağının organik asitler ve/veya bakteriyosinlerden hangisi veya hangileri olduğu belirlenmeye çalışılmıştır. Analize alınan probiyotik kültürlerden yüksek Anti-CD etkisi gösteren kültürler tekli kullanımlarının yanında ayrıca birlikte kullanılarak da *C. difficile* üzerinde etkileri de incelenmiştir.

Bu amaçla Ratsep vd., (2014) tarafından bazı belirtilen yöntem modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Öncelikle, seçilen probiyotik kültürler MRS Broth'a inoküle edilerek 24 saat anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrası kültürlerle ait hücre içermeyen süpernatantlar, 15 dakika boyunca 3000 xg santrifüjleme ile toplanmıştır. Hücre içermeyen süpernatantların her bir kültür için pH'ı ölçülerek üç eşit parçaya bölünmüştür: birinci kısım ölçülen pH (asidik)'da bırakılmış ikinci kısım 6 N NaOH ile nötralize edilmiş ve son olarak üçüncü kısım 6 N NaOH ile nötralize edildikten sonra 20 dakika boyunca 100°C'de ısıtılmıştır. Ardından elde edilen tüm süpernatantlar 0,2 µM, steril şırınga filtreden geçirilerek steril tüp içerisine alınmıştır.

Çalışmada kullanılan *C. difficile* kültürleri %2 (v/v) kan ilave edilmiş Brain Heart Infusion (BHI) Agar'da 35-36°C anaerobik kabin içinde inkübasyona bırakılmıştır. Aktif *C. difficile* kültürlerinin konsantrasyonları, BHI Broth'da McFarland 3'e, ayarlanmıştır.

Seçilen probiyotik kültürlerin süpernatantlarının antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek için aşağıdaki reaksiyon karışımları mikropalak kuyucukları için hazırlanarak kullanılmıştır:



(1) 20 µL *C. difficile* hücre süspansiyonu, 162 µL Pepton Tampon Tuzu süspansiyonu ve 18 µL BHI Broth (pozitif kontrol olarak);

(2) 20 µL *C. difficile* hücre süspansiyonu, 162 µL hücresiz probiyotik kültür süpernatantı ve 18 µL BHI Broth;

(3) 20 µL *C. difficile* hücre süspansiyonu, 162 µL hücresiz nötralize probiyotik kültür süpernatantı ve 18 µL BHI Broth;

(4) 20 µL *C. difficile* hücre süspansiyonu, 162 µL hücresiz nötralize edilmiş ve ısıtılmış probiyotik kültür süpernatantı ve 18 µL BHI Broth.

Reaksiyon karışımları anaerobik koşullar altında 36-37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir.

Reaksiyon karışımlarının optik yoğunlukları inkübasyon öncesi ve sonrasında OD<sub>620</sub> nm'de mikropalak okuyucu (Thermo scientific, Multiscan FC, ABD) kullanılarak ölçülmüş, optik yoğunluklardaki değişiklik aşağıda verilen denklemde (3.4) değerlendirilerek *C. difficile* büyümesinin inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır.

$$C. difficile \text{ büyümesinin inhibisyon yüzdesi} = 100 - \frac{OD_t \times 100}{OD_c} \quad (3.4)$$

Denklemde verilen OD<sub>t</sub> ve OD<sub>c</sub>, probiyotik kültürlerin varlığında ve yokluğunda *C. difficile*'nin optik yoğunluk için ölçülen değerlerini ifade etmektedir.

### **3.6. Araştırma 5 *C. difficile*'nin peynir yapımında gelişen asitlik ve probiyotik kültür kullanımı ile inaktivasyonunun belirlenmesi**

*C. difficile* üzerine inhibisyon etkileri in vitro olarak belirlenen probiyotik kültür ve kültür karışımlarının peynirin üretimi ve depolanması sırasında *C. difficile* üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla in-vitro yöntemler ile *C. difficile* üzerinde yüksek inhibisyon etkisi belirlenen kültürler ön denemeler ile peynir üretiminde kullanılmıştır. Peynir mayası varlığında peynirde istenilen tekstür özelliklerinin oluşumu gözlenen NBL+ izolat 43 ve YF-L901+ izolat 33 kültür karışımları seçilerek üretim ve depolama süreçlerinde incelenecek olan peynir örneklerinin üretimlerinde kullanılmıştır.

#### **3.6.1. Peynir Üretiminde Kullanılan Çiğ Sütlerin Temini**

Peynirlerin tamamının üretiminde Bayır Süt (Çanakkale)'den temin edilen çiğ inek sütleri kullanılmıştır. Üretimde kullanılan sütler sağımın ardından kısa süre içerisinde alınarak hızlıca laboratuvara peynir üretimleri için ulaştırılmıştır. Çiğ sütler kaba kirliliklerinin uzaklaştırılması için cendere bezlerinden süzölmüş ve bir bölümü çiğ sütlerin analizleri için ayrılmıştır.

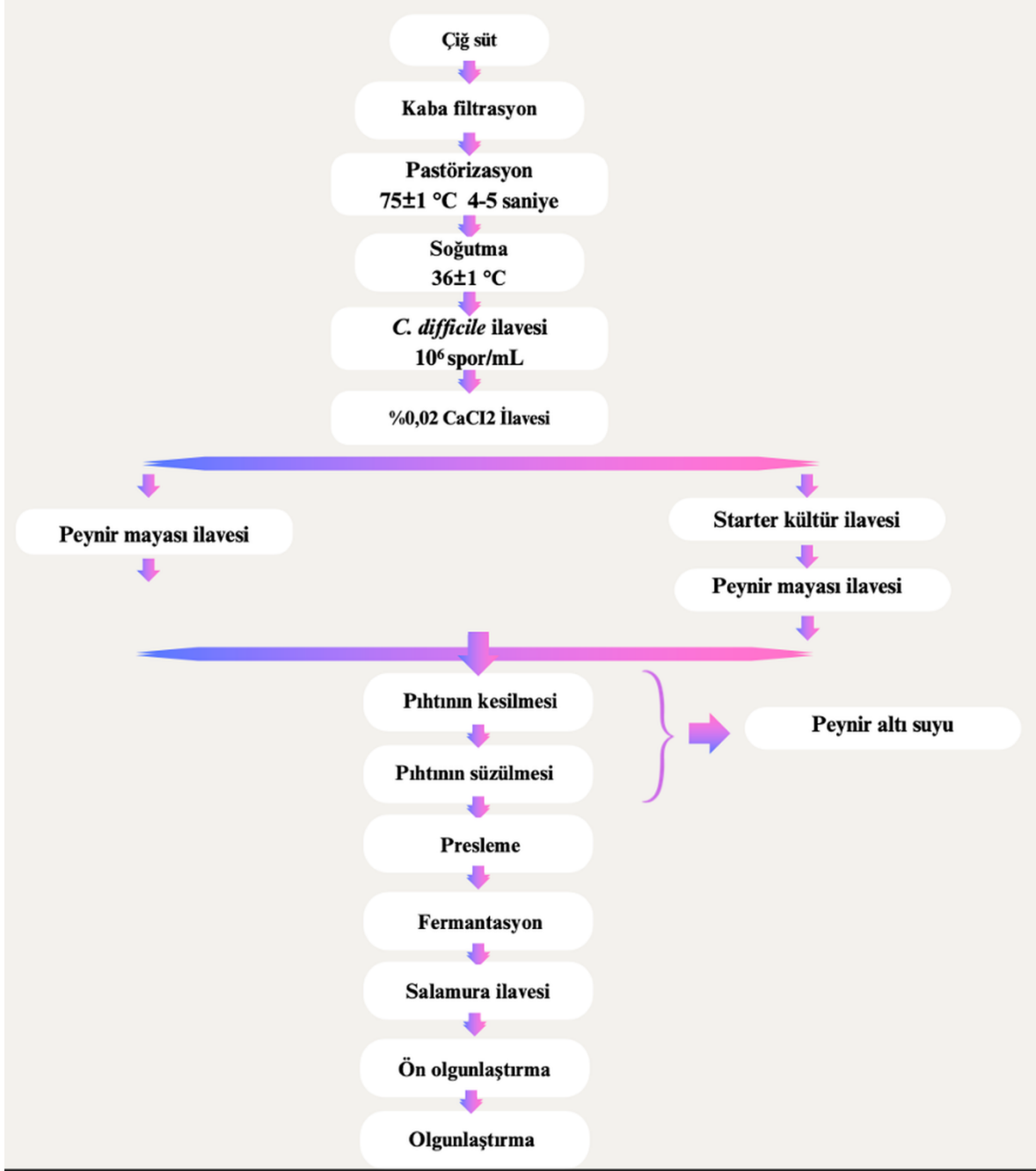
Çiğ sütlerden yapılan mikrobiyolojik analizler üretim ile aynı gün gerçekleştirilirken, fizikokimyasal analizler için ayrılan sütler analizlere kadar -18°C'de saklanmıştır.

#### **3.6.2. Peynir Üretimi**

*C. difficile*'nin peynir yapımında gelişen asitlik ve probiyotik kültür kullanımı ile inaktivasyonunun belirlenmesi amacıyla üretilen peynirler aşağıda belirtilen numaralar ile kodlanmış ve depolama süresince ve üretim süresince gerçekleştirilen analizler bu kodlama üzerinden devam edilmiştir.

1. NBL+ izolat 43 ve peynir mayası
2. YF-L901 + izolat 33 ve peynir mayası
3. NBL+ izolat43 +CD ve peynir mayası
4. YF-L901 + izolat 33 +CD ve peynir mayası
5. CD ve peynir mayası
6. Yalnızca peynir mayası

Peynir üretiminde, her bir üretim için ayrı paslanmaz çelik peynir yapım setleri (Canberk Gıda, Türkiye) kullanılmıştır. Üretim sonunda peynirler 90 gün depolanarak seçilen probiyotik kültürlerin ürettiği antimikrobiyal özellikteki maddelerin ve gelişen asitliğin *C. difficile* üzerine etkisi incelenmiştir. Tüm peynirler, 2 tekerrürlü olacak şekilde üretilmiş ve analize alınacak her gün için de her bir örnekten 2 paralel halinde analize alınmıştır. Peynirlerin üretimi çiğ sütün alımından itibaren izlenen adımlar Şekil 12’de gösterildiği gibidir. Peynir üretimi Demirel, (2004)’te verildiği gibi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 12. Çiğ süttten peynir üretimine kadar izlenen adımlar

### Starter Kültürlerin Hazırlanması

Starter kültürlerin süte ilavesi öncesinde, ön çalışmalar ile seçilen starter kültürlerin (NBL+ izolat43 ve YF-L901 + izolat 33) MRS Broth'da 24 saatlik aktif kültürleri hazırlanmış ve buradan 10 mL alınarak yağsız süt tozu ile hazırlanan %10 kuru maddeli 100 mL besiyeri içerisinde aktiveleştirilerek kullanılmıştır.

## Starter Kültür Aktivite Testi

Starter kültürlerin aktiviteleri Horrall Elikler aktivite testi kullanılarak belirlenmiştir (Demirel, 2004). Bu amaçla, 100 mL steril %10 kuru maddeli süt tozu çözeltisi içerisine peynir üretiminde kullanılacak olan starter kültür %3 oranında olacak şekilde ilave edilmiştir. İnokülasyon sonrası karışım 37°C’de 3,5 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır ve sonrasında 0,1 N NaOH ile titre edilerek elde edilen sonuç % laktik asit cinsinden hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 9’da verilen şekilde değerlendirilmiştir.

Tablo 9  
Starter Kültürlerin aktivite tipinin belirlenmesi

Asitlik (% laktik asit)	Aktivite türü
0,30-0,35	Yavaş aktivite
0,36-0,39	Normal aktivite
0,40->0,40	Yüksek aktivite

## İnokulum Hazırlanması

Peynire inoküle edilecek *C. difficile* spor süspansiyonunun hazırlanmasında Roshan, (2019) ve Sorg ve Dineen (2009)’un yöntemleri modifiye edilerek kullanılmıştır. Sporların, süt içerisinde nihai konsantrasyonu  $10^6$  spor/mL olacak şekilde ayarlanarak süte ilave edilmiştir. Ayrıca süte ilave edilen spor süspansiyonu eklendiği süt içerisinden alınan örnekten hazırlanan seri dilüsyonların BHI Agar’a inokülasyonundan elde edilen sayım sonuçları ile kontrol edilmiştir.

## Peynir Mayası ve Maya Kuvveti Tayini

Peynirlerin üretiminde Maya Köy (Türkiye) firmasının ürettiği 1/160000 kuvvetinde ticari sıvı şirden mayası kullanılmıştır. Kullanılan maya kuvvetinin ve peynir üretiminde kullanılacak miktarının belirlenmesi amacı ile peynir üretiminde kullanılacak süttten 100 mL örnek alınarak 36-37°C'e kadar ısıtılmıştır. Kullanılacak olan ticari peynir mayası 5 kat seyreltilmiş ve 10 mL alınarak süte ilave edilmiştir. Peynir mayası çözeltisinin 5 mL'si süte ilave edildiği andan itibaren süre tutulmaya başlanmıştır. Sürekli ve yavaş bir şekilde karıştırılarak pıhtı oluşumu gözlenmiştir. İlk pıhtı tanecikleri görüldüğü ana kadar geçen süre belirlenerek bu süreye bağlı maya kuvveti hesaplanmıştır. Maya kuvvetinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Maya kuvveti} = \frac{2400 \times S}{t \times M} \quad (3.5)$$

S: Alınan süt miktarı (mL)

T: İlk pıhtının görüldüğü zaman (saniye)

M: Peynir mayası miktarı, (mL)

## Pastörizasyon

Peynir yapımında kullanılan sütler peynir yapım kiti (Canberk Gıda, Türkiye) içerisinde bulunan benmarin küvetlerde 75±1°C'de 4-5 saniye boyunca pastörize edilmiştir. Pastörizasyon sonrası sütler hızla soğutularak süt sıcaklığı 37±1°C'ye düşürülmüştür.

## Starter Kültür İlavesi

Soğutulan sütlere pastörizasyon sırasında sıcaklık etkisi ile azalan Ca<sup>+2</sup> tuzlarının yerine koyulabilmesi amacıyla süte %0,02 oranında CaCl<sub>2</sub> (Merck, Almanya) ilave edilmiş ve iyice karışması sağlanmıştır. Ardından hazırlanan starter kültür kokteyli %1 oranında inoküle edilerek 37±1°C'de 30 dakika ön fermantasyona bırakılmıştır. Bu amaçla starter

kültür olarak *C. difficile*'nin önlenmesinde in-vitro olarak etkili bulunan ve ön denemeler ile peynir üretimi için uygun tekstür oluşumuna imkan veren ticari kültür NBL (*Lactobacillus rhamnosus* CBT LR5 + *Lactobacillus acidophilus* CBT LA1 + *Bifidobacterium longum* CBT BG7+ *Bifidobacterium bifidum* CBT BF3 ve *Enterococcus faecium* CBT EF4) + izolat 43 ve YF-L901 (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* + *Streptococcus thermophilus*) + izolat 33 kültür karışımları peynir üretimlerinde kullanılmak üzere seçilmiş ve kullanılmıştır.

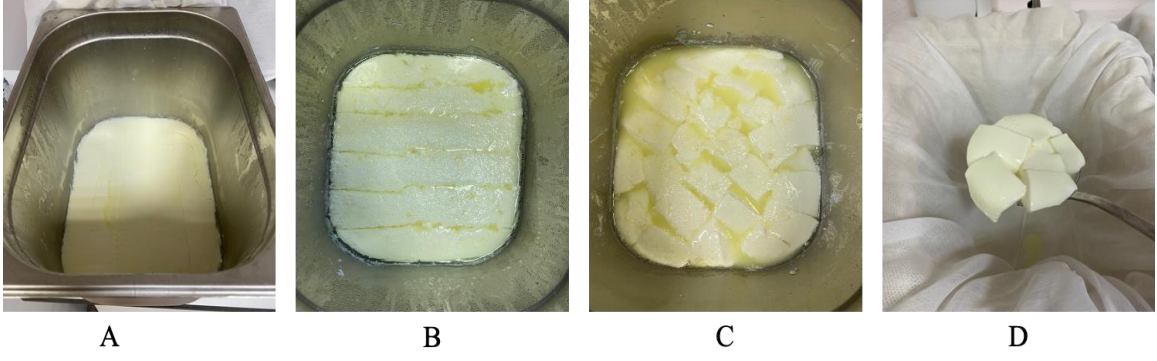
*C. difficile* inokülasyonu yapılan örneklerde bu aşamada *C. difficile* spor süspansiyonu süt içerisinde  $10^6$  spor/mL olacak şekilde ilave edilmiştir.

### **Mayalama**

Starter kültürlerin gelişimini takiben sütün yaklaşık pH değeri 5,6-6,1 seviyesine ulaştığında maya kuvveti ile hesaplanan miktarda peynir mayası ilavesi yapılmıştır. Mayalama işlemi sütlerin paylaştırıldığı paslanmaz çelik kaplarda,  $37\pm 1^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmış inkübatör içerisinde gerçekleştirilmiştir.

### **Pıhtı Kesimi ve Süzülmesi**

Pıhtı kesimi mayalanmanın gerçekleştirildiği kaplar içerisinde steril bıçaklarla gerçekleştirilmiştir. Kesilen pıhtı yaklaşık 15 dakika  $37\pm 1^\circ\text{C}$ 'de tutularak, pıhtının dibe çökmesi beklenmiştir. Peynir yapım seti içerisinde yer alan musluklu süzme küveti üzerine serilen steril cendere bezi üzerine kesilen pıhtı aktararak peynir altı suyunun pıhtıdan uzaklaşması sağlanmıştır. Mayalama işlemi sonucu oluşan pıhtı ve pıhtının kesim süreci ile süzülme süreci Şekil 13'de gösterilmiştir.



Şekil 13. (A) pıhtının kesim öncesinde, (B) pıhtının kırılması, (C) pıhtının suyunu salması ve (D) pıhtının süzülmesi için cendere bezine aktarılması aşamaları

### **Presleme**

Fazla suyu uzaklaştırılan pıhtılar, peynir yapım seti içerisinde yer alan sterilizasyona uygun delikli kalıplar (80x80x160 mm) içerisine alınarak pıhtıya şekil verilmiştir.

Ardından kalıbın preslenmesi için toplamda 90 dakika olacak şekilde ilk 20 dakika 1 kg ikinci 20 dakika 1,5 kg ve kalan zaman için 3 kg'lık ağırlıklar koyularak baskı uygulanmıştır. Delikli çelik kaplar içerisinde preslemenin ilk 20 dakikası Şekil 14'de gösterildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.





Şekil 14. Peynirlerin preslenmesi

### **Fermantasyon**

Presleme süresi tamamlandığında, peynirler kalıplardan çıkarılarak 12 saat boyunca 22 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.

### **Kuru Tuzlama**

Fermantasyon sonrasında her bir kalıp için yaklaşık 4 gram tuz ile tüm yüzeyleri tuzlanarak 25°C’de 24 saat boyunca tutulmuştur.

### **Salamura İlavesi**

Kuru tuzlama süresince içerisindeki fazla suyu atan peynir kalıplarından fazla su uzaklaştırılmıştır. Ardından peynirler plastik, iki litrelik, sızdırmaz kapaklı kapların içerisine alınarak üzerine %14 konsantrasyonda tuz (Billur Tuz, Türkiye) içeren, steril

olarak hazırlanmış ve pH değeri 4,8-5,0 olan salamura suyu ilave edilmiştir. Salamura ilavesi öncesinde depolama yapılacak kaplara koyulan peynirler Şekil 15 'de gösterilmiştir.



Şekil 15 Salamura ilavesi öncesinde depolama yapılacak kaplarda peynirler

### **Olgunlaştırma**

Olgunlaştırma işlemi iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiş olup, ön olgunlaştırma aşamasında peynir kapları öncelikle 3 hafta boyunca 14-15°C'de ön olgunlaştırılmaya bırakılmıştır. Ön olgunlaştırma sonrası peynirler 90 gün boyunca 4-5 °C'de depolanmıştır (Şekil 16).



Şekil 16. Peynirlerin depolama süresi boyunca 4-5 °C’de depolanması

### 3.6.3. Mikrobiyolojik Analizler

Çiğ süttten itibaren olmak üzere peynir üretiminin pastörizasyon sonrası, mayalama, fermentasyon ve tuzlama aşamaları sonunda laktobasillerin sayımı, laktokokların sayımı, *C. difficile* varlığının ve sayısının belirlenmesinin yanında tüm üretim aşamalarında *E. coli* varlığı araştırılmıştır.

Mikrobiyolojik analizler peynir üretim sürecinde ve 0., 30., 60. ve 90. günlerinde her bir peynir üretimi için yapılmıştır.

Bu amaçla 10’ar gram örnek, 45°C’ deki 90 mL steril trisodyum sitrat (Sigma, ABD) çözeltisi (%2) ile karıştırılmıştır. Ardından Stomacher’da 2 dakika homojenizasyon gerçekleştirilerek elde edilen süspansiyonun uygun dilüsyonları %0,1’lik serum fizyolojik çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır (Demirel, 2004).

*E. coli* sayımının belirlenebilmesi amacı ile hazırlanan desimal dilüsyonlardan TBX (Tryptone Bile X-glucuronide) Agar (Merck, Almanya) besiyerine inokülasyonlar yapılmış

ve 44°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandığına *E. coli* varlığını gösteren mavi-yeşil tipik koloniler sayılarak sonuçlar log kob/g olarak hesaplanmıştır (Kılınç vd., 2018).

Starter laktokokların sayımı için M17 Agar (HiMedia, Hindistan) besiyeri kullanılmış uygun dilüsyonlardan dökme plak yöntemi kullanılarak ekimler yapılmıştır. Petriler 37°C’de 48 saat inkübe edilmiş ve inkübasyona süresi sonunda muhtemel laktokok kolonileri sayılarak sonuçlar log kob/g olarak verilmiştir (Erkaya-Kotan vd., 2023).

Starter laktobasil sayımı için MRS Agar besiyeri kullanılmıştır. Hazırlanan desimal dilüsyonlardan dökme plak yöntemine göre ekim yapılmıştır. Petriler 30°C’de 72 saat anaerobik kabinde inkübe edilmiştir. İnkübasyona sonunda koloniler sayılarak sonuçlar log kob/g olarak verilmiştir (Erkaya-Kotan vd., 2023).

*C. difficile* sayımı için ise Arora vd., (2019)’un selektif olamayan sayım methodu modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla steril trisodyum sitrat (Sigma, ABD) çözeltisi (%2) kullanılarak hazırlanan dilüsyonlardan %5 kan ve CC antibiyotik içerikli *C. difficile* Agar Base (HiMedia, Hindistan) plaklarında dökme plak yöntemine göre ekim yapılmıştır. Petriler 37°C’de 2 gün anaerobik koşullarda inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda tipik koloniler sayılmıştır. Sonuçlar log kob/g olarak verilmiştir. Tüm analizler, 2 tekerrür/ 2 paralel olacak şekilde yapılmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde Minitab versiyon 17 kullanılarak hesaplanarak verilmiştir.

Peynir üretiminde kullanılan tüm ekipmanlar otoklavda steril edilmiştir Ayrıca inokülasyon yapılan tüm petriler analizler sonrasında otoklavda bertaraf edilmiştir.

### 3.6.4. Fizikokimyasal Analizler

Peynir üretiminde kullanılan sütten başlayarak üretimin çeşitli aşamalarında alınan örneklerde pH ölçümü, titrasyon asitliği, tuz ve kuru madde analizleri yapılmıştır.

#### pH Ölçümü

pH değerleri, süt örneklerinde doğrudan, peynir örneklerinde ise 10 gram örnek 10 mL saf su ile homojenize edilerek pH metre ile (Hanna Instruments, Romanya) ile ölçülerek belirlenmiştir (Şaşmazer, 2022).

#### Titrasyon Asitliği

Tüm örneklerdeki Titrasyon asitliği alkali asit titrasyon ile belirlenmiştir. Süt örnekleri analize alınırken doğrudan kullanılmış, ancak peynir örneklerinde 10 gram örnek saf su ile homojenize hale getirilmesinin ardından 0,1 N NaOH (Merck, Almanya) kullanılarak fenolftalein indikatörlüğünde açık pembe renk alana kadar titre edilmiştir. Tüm örnekler çift paralel şekilde çalışılmış ve sarfiyatların ortalaması alınarak sonuçlar aşağıdaki eşitlikten % laktik asit cinsinden hesaplanmıştır (Kabawanga, 2017).

$$\% \text{ Laktik asit} = \frac{(S-S_0) \times N \times 0,09}{m} \times 100 \quad (3.6)$$

S: Titrasyonda sarf edilen NaOH çözeltisinin miktarı (mL)

S<sub>0</sub>: Kör örnekte sarf edilen NaOH çözeltisinin miktarı (mL)

N: Titrasyonda sarf edilen NaOH çözeltisinin normalitesi

m: Peynir (gram) ya da süt miktarı (mL)

0,09: 0,1 N NaOH çözeltisinin 1mL'sine karşılık gelen kütlece laktik asit miktarı

## Tuz Tayini

Peynir örneklerinde tuz tayini için 10 gram örnek tartılarak 100 mL'lik balon joje içerisinde saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Balon joje içerisindeki su peynir karışı süzölmüştür ve süzöntüden 15 mL alınarak 250 mL'lik erlene içerisinde aktarılmıştır. Erlen içerisinde 100 mL saf su ilave edilerek karışım sağlanmıştır. Karışım içerisinde fenolfitaleyn damlatılmış ve hafif bir pembe renk oluşuna kadar titre edilmiş ve nötr hale getirilmiştir. Karışım içerisinde %5'lik potasyum kromat çözeltisinden 2 mL ilave edilmiştir. Ardından 0,1 N gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) ile titre edilmiştir. İşlem her bir örnek için çift paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Titrasyon sonrasında örneklerde bulunan % tuz miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Bilgin vd., 2023).

$$\% \text{ Tuz} = \frac{V - V_0 \times 0,00585}{P} \times 100 \quad (3.6)$$

V: Titrasyonda sarf edilen 0,1 N AgNO<sub>3</sub> çözeltisi miktarı (mL)

V<sub>0</sub>: Kör denemede sarf edilen 0,1 N AgNO<sub>3</sub> çözeltisi miktarı (mL)

P: Peynir miktarı (g)

0,00585: 0,1 N AgNO<sub>3</sub> çözeltisinin 1 mL'sine karşılık gelen kütlece NaCl miktarı

## Kuru Madde Miktarı

Süt ve peynir örneklerindeki kuru madde miktarı gravimetrik olarak belirlenmiş olup tüm örnekler çift paralel olacak şekilde çalışılmıştır. Toplam kuru madde miktarı aşağıdaki eşitlikten kütlece % olarak hesaplanmıştır.

$$KM = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \times 100 \quad (3.7)$$

KM: Toplam katı madde kütlece (gram)

M<sub>0</sub>: Cam baget + kurutma kabı kütlesi (gram)

M<sub>1</sub>: Kurutma kabı + cam baget + örneğin kütlesi (gram)

M<sub>2</sub>: Kurutma kabı + cam baget + kurutma sonrası örneğin kütlesi (gram)

### 3. 7. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel analizi için IBM SPSS (Versiyon 21) ve Minitab (versiyon 17) paket programları kullanılmıştır. Analizler 3 tekerrür 2 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

Sıcaklık uygulamaları ve D değerleri arasındaki ilişki Pearson korelasyon testi ile belirlenmiştir. P≤0.05 olduğu durumlarda uygulamalar arasındaki farklılıkları belirlemek için Tukey testi kullanılmıştır.

Probiyotik kültürler ile bu kültürlerin *C. difficile* üzerine etkileri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karıştırılmıştır. Starter olarak probiyotik kültürlerin kullanımı ile üretilen peynirlerin *C. difficile* üzerine etkilerinin mikrobiyolojik ve fizokimyasal özellikleri üretim ve depolama süresince karşılaştırılması ANOVA ile gerçekleşmiştir. P≤0,05 olduğu durumlarda uygulamalar arasındaki farklılıkları belirlemek için Tukey testi kullanılmıştır.

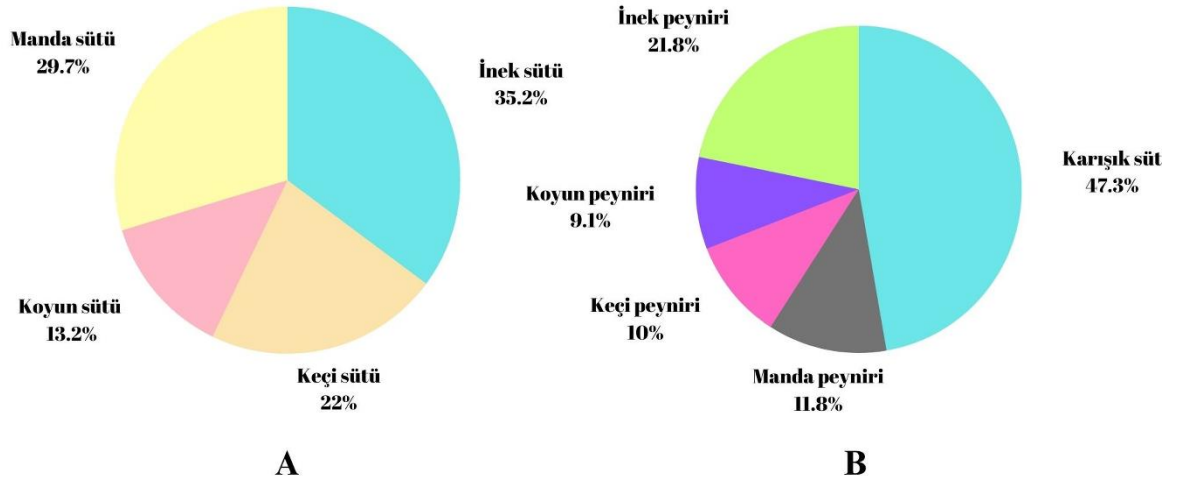
## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

### ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 4.1. Araştırma 1 Süt ve Peynir Örneklerinde *C. difficile* Varlığının Belirlenmesi

##### 4.1.1. Süt ve Peynir Örneklerinden Elde Edilen İzolatlar

Çalışmamızda süt ve peynirlerde *C. difficile* varlığının araştırılabilmesi için 91 süt örneği ve 110 peynir örneği analize alınmıştır. Süt ve peynir örneklerinin dağılımları Şekil 17’de gösterilmiştir. Çiğ süt örnekleri Çanakkale, Balıkesir ve İstanbul şehirlerinden, peynir örnekleri ise Çanakkale, Manisa, Balıkesir ve Kocaeli şehirlerinden temin edilmiştir.



Şekil 17. (A) Süt örneklerinin oranları, (B) Peynir örneklerinin oranları

Süt ve peynir örneklerinde *C. difficile* izolatlarının elde edilmesinde *C. difficile* tespitini arttırabilmek için CDCC ve ChormID olmak üzere iyi ayrı besiyeri kullanılmıştır. Analize alınan peynir ve süt örneklerinin dağılımı ve bu örneklerden her iki besiyeri ile alınan izolatlar ait dağılımlar Tablo 10’da gösterilmiştir. En yüksek *C. difficile* izolatı alınan örnekler karışık sütlerden üretilen peynirler olmuştur. 52 örneğin 18’inden izolat alınmış, CDCC besiyerinden 33, ChromID besiyerinden 2 izolat alınmıştır.



Tüm peynir tiplerinde CDCC besiyerinden izolat elde edilirken ChromID besiyerinde keçi peynirlerinden izolat elde edilememiştir. Her iki besiyerinden toplamda alınan 143 izolat tanımlanma aşamasına kadar BHI içerisinde -18°C’de saklanmıştır.

Tablo 10

Süt ve peynir örneklerine ait izolatların dağılımları

	Toplam Örnek Sayısı	İzolat Alınan Örnek Sayısı	Toplam Alınan İzolat Sayısı	
			CDCC	ChromID
<b>Süt</b>	<b>91</b>		<b>59</b>	<b>8</b>
İnek Sütü	32	17	22	4
Keçi Sütü	20	9	14	4
Koyun	12	6	7	0
Manda	27	15	16	0
<b>Peynir</b>	<b>110</b>		<b>66</b>	<b>10</b>
İnek Peyniri	24	6	13	3
Keçi Peyniri	11	1	4	0
Koyun Peyniri	10	5	9	1
Karışık Süt Peyniri	52	18	33	2
Manda	13	7	7	4

CDCC: *Clostridium difficile* Agar Base (Cycloserine+Cefoxitin)

#### 4.1.2. Süt ve Peynir Örneklerinden Elde Edilen İzolatların Tanımlanması

Süt ve peynir örneklerinden elde edilen izolatların tanımlanmasında ilk aşama olarak -18°C’de saklanan izolatların BHIS Agar’da canlandırılmıştır. Canlandırılan izolatlar Gram boyama ve mikroskop ile hücre şeklinin belirlenmesi ile izolatlar hakkında temel morfolojik bilgi elde edilmiştir. Bu aşamada 91 süt örneğinden elde edilen toplam 67 izolatın 9 tanesi (%13,43) Gram (+) basil olarak belirlenmiştir. Peynir örneklerinden ise toplam 76 izolat elde edilmiş ve bu izolatlara yapılan gram boyama sonucunda 14 tanesinin (%18,42) Gram (+) basil olduğu belirlenmiştir.

Süt örneklerinden elde edilen Gram (+) basil şeklindeki izolatların tanımlanmasında API Rapid ID 32 A uygulanmış ve iki izolat *C. difficile* olarak tanımlanmıştır. Bu iki izolat dışında kalan diğer tüm Gram (+) basil izolatlar API Rapid ID 32 A ile *Lactobacillus acidophilus* olarak tanımlanmıştır. Bu iki izolatın *C. difficile* olarak doğrulanabilmesi amacı ile Real-time PCR ile *tpi* geni varlığı araştırılmıştır. Yapılan moleküler analiz sonrası her iki izolatın da *tpi* gen bölgesini bulundurduğu belirlenmiş olup, *C. difficile* olarak doğrulanmıştır. *C. difficile* pozitif olarak belirlenen S25 ve S36 suşları sırası ile inek ve manda sütünden izole edilmiştir. Bu izolatlardan S25 Çanakkale ve S36 ile Balıkesir illerinden temin edilen sütlerden izole edilmişlerdir.

Peynir örneklerinde ise elde edilen Gram (+) 14 izolata API Rapid ID 32A uygulanmış ve tamamı *Lactobacillus acidophilus* olarak tanımlanmıştır. Elde edilen hiçbir izolat *C. difficile* olarak tanımlanamamıştır.

Sonuç olarak süt örneklerinin 2 (%2,19)’sinde *C. difficile* varlığı saptanmış, peynir örneklerinde ise *C. difficile* belirlenememiştir.

Kültür ortamında yakalanamayan *C. difficile*’nin tespit oranını artırmak amacıyla peynir ve süt örneklerine ait ön zenginleştirme sıvılarından direkt DNA ekstraksiyonu yapılarak, *C. difficile tpi* geni araştırılmıştır. Ancak yapılan çalışmada hem süt hem de

peynir örneklerine ait ön zenginleştirme sıvılarının hiçbirinde *C. difficile tpi* geni tespit edilememiştir.

*C. difficile* olduğu *tpi* geni varlığı ile doğrulanan izolatlarda, ayrıca toksin A Toksin B ve binary toksinleri kodlayan gen bölgelerinin varlığı araştırılmıştır. Her iki izolatta aranan bu toksin genleri tespit edilememiştir.

*C. difficile* birçok hayvan türünden (Gould ve Limbago, 2010; Rodriguez-Palacios vd., 2013) ve çevresel nişlerden izole edilmiştir. *C. difficile* hayvansal kaynaklardan izole edilmesine karşılık henüz zoonotik bir bulaşma deneysel olarak kanıtlanmamıştır. Ancak hayvandan ve insanlardan izole edilen genetik olarak bezer özellikteki *C. difficile* izolatların varlığı, zoonotik bulaşmanın kanıtı olarak düşündürmektedir (Dost vd., 2023; Keessen vd., 2011; Koene vd., 2012).

Süt doğrudan veya orta dereceli ısıl işlem uygulamalarından sonra farklı süt ürünlerine işlenerek tüketilebilmektedir. Sütlere hayvansal kaynaklardan direkt olarak ya da işleme sırasında çevresel kaynaklardan ve personelden *C. difficile* sporlarının bulaşması olasıdır (Sugeng, 2012; Marcos vd., 2023). Bununla birlikte süt ve süt ürünlerinde literatürde *C. difficile*'nin varlığının araştırıldığı sınırlı çalışma mevcuttur.

Mısır'da El Leboudy vd., (2014) tarafından yapılan çalışmada 50 çiğ süt örneğinde *C. difficile* varlığının araştırıldığı ve 11 örnekten muhtemel *C. difficile* izolatın elde edildiği ifade edilmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri izolatları Latex aglutinasyon ile test etmiş ve 2 izolatta pozitif sonuç elde edebilmişlerdir. Bu iki izolatın PCR ile doğrulamasını için yaptıkları çalışmalarda ise izolatlardan yalnızca 1 tanesinin PCR ile *C. difficile* olarak doğrulanabildiğini belirtmiştir.

Rahimi vd., (2014) tarafından yapılan çalışmada 135 sığır, 80 keçi, 100 koyun 49 manda ve 66 deve sütünden oluşan toplam 430 çiğ süt örneğinde *C. difficile* varlığı araştırılmıştır. Süt örnekleri arasında yalnızca sığır sütlerinin ikisinin (%0,46) *C. difficile*

pozitif olarak belirlendiği ifade edilmiştir. Çalışmanın en dikkat çekici yanı ise izolatlardan birinin toksin A ve toksin B üretiminden sorumlu genleri içeren ve salgınlarda rol oynadığı düşünülen 078 ribotipine ait olduğunun belirlenmiş olmasıdır. *C. difficile*'nin 078 ribotipinin çiğ sütlerden belirlendiği bir başka çalışma ise İtalya'da Romano vd., (2018) tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada, piyasadan topladıkları 6 çiğ süt örneğinde *C. difficile* varlığını araştırmışlardır. Analize alınan örneklerin tamamında (%100) *C. difficile* tespit edilmiştir. Bu oran sütlerden elde edilen en yüksek *C. difficile* pozitiflik oranıdır. Çalışmada elde edilen izolatlarının birinin ise 078 ribotipine ait olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca çalışmada, ilk kez izole edilen bir ribotip de dahil olmak üzere tüm izolatların toksin A ve toksin B üretiminde görev alan genleri barındırdıklarının belirlendiği belirtilmiştir.

Literatürde sütlerde *C. difficile* varlığının tespit edildiği çalışmaların yanı sıra alınan örneklerde *C. difficile*'nin tespit edilemediği çalışmalar da mevcuttur. Avustralya'da çiğ sütlerin araştırıldığı bir çalışmada mandıralardan 50 süt örneği analize alınmış ve hiçbir örnekte *C. difficile* varlığı belirlenememiştir (Jöbst vd., 2010). Yapılan bu çalışmaya benzer şekilde Slovenya'da 2015-2017 yılları arasında toplanan 260 çiğ süt ve peynir örneğinde *C. difficile* varlığının araştırıldığı ve yine örneklerinden hiçbirinde *C. difficile* varlığı tespit edilemediği belirtilmiştir (Tkalec vd., 2020). Hazarika vd., (2023) tarafından yapılan çalışmada yine benzer şekilde 25 inek sütünde *C. difficile* varlığının araştırıldığı ancak hiçbir örnekte *C. difficile* belirlenemediği bildirilmiştir.

Abdel-Hameid Ahmed vd., (2011) tarafından çiğ sütler ile birlikte 50 evaporasyon işlemi uygulanmış süt, 50 yoğunlaştırılmış süt ve 50 kurutulmuş süt örneğinde diğer *Clostridium* türleri ile birlikte *C. difficile* varlığının araştırıldığı ifade edilmiştir. Araştırmada, evaporasyon işlemi uygulanmış sütlerde %26, yoğunlaştırılmış sütlerde %4 ve kurutulmuş sütlerde %22 oranında *C. difficile* varlığı tespit edilmiştir.

Kanada'da yapılan bir diğer çalışmada 100 pastörize süt örneğinde *C. difficile* varlığı araştırılmıştır. Çalışmada, 2 örneğinin *C. difficile* içerdiğinin belirlendiği ifade

edilmiştir (Sugeng, 2012). Bu sonuç sütlerde pastörizasyon sonrası bile *C. difficile* açısından riskin devam ettiğinin bir göstergesidir.

Süt örnekleri ile birlikte çalışmaya peynir örnekleri de dahil edilmiştir. Peynirlerin, *C. difficile* için potansiyel bir kaynak olabileceği düşünülmüştür. Çünkü çiğ süt kullanılarak peynir üretimleri gerçekleştirilmektedir. Ayrıca pastörize süt ile üretilen peynirlerde de pastörizasyon işlemi yetersiz kaldığı için risk devam etmektedir. Ancak 110 peynir örneğinden alınan izolatların hiçbiri *C. difficile* olarak doğrulanmamıştır.

Ayrıca literatürde yer alan çalışmalar peynir için bu riskin varlığını ortaya koymuştur. Sugeng, (2012) tarafından yapılan çalışmada çeşitli yarı yumuşak peynirlerden *C. difficile*'nin ilk kez izole edildiği ve toplam 14/146 örnekte (%9,6) *C. difficile* bulunduğu ifade edilmiştir. Analize alınan peynir örneklerinde Camembert 3/19 (%15,8), mavi peynir 3/31 (%9,7), Brie 3/34 (%8,8) ve diğer yarı yumuşak peynirlerde 5/50 (%10) pozitif örnekler bulunduğu belirtilmiştir. Ayrıca araştırmacılar analize aldıkları keçi sütü ile üretilmiş peynirlerde pozitif örnek belirleyemediklerini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada ise toplamda 110 peynir örneği incelenmiş ancak alınan izolatların hiçbiri *C. difficile* olarak tanımlanamamıştır. Sugeng, (2012)'nin çalışmasına benzer olarak bu çalışmada örnek olarak kullanılan keçi peynir örneklerinin ise yalnızca birinden 4 şüpheli izolat elde edilmiş ancak izolatlar *C. difficile* olarak doğrulanamamıştır.

İrlanda'da çiftlikler, mezbahalar ve perakende gıdalarda *C. difficile* varlığının araştırıldığı çalışmada 30 süt ürününün (10 tam yağlı yoğurt, 10 kırmızı çedar peyniri ve 10 süzme peynir) örnek olarak kullanıldığı ve yoğurt örneklerinin 1 tanesinin pozitif sonuç verdiğini ifade etmişlerdir. Peynir örneklerinde ise çedar örneklerinde pozitif sonuç elde edilemediği ancak süzme peynir örneklerinde 6,8 log kob/g düzeyde *C. difficile* varlığının belirlendiği belirtilmiştir. Çalışmada süzme peynirlerinden elde edilen izolatların, toksin B (*tcdB*) kodlayan geni taşıdığı belirtilmiştir (Marcos vd., 2021). Hindistan'a özgü paneer peynirinde 10 örnekte *C. difficile*'nin varlığının araştırılmış ancak hiçbir örnekte *C. difficile* tespit edilememiştir (Hazarika vd., 2023). Peynirlerde *C. difficile* varlığının araştırıldığı çalışma sayısının oldukça sınırlı olmasının yanında Sugeng, (2012) tarafından yapılan

çalışma dışında örnek sayısı da oldukça sınırlıdır. Bu durum sonuçların karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır.

Çeşitli gıda türlerinden ve ülkelerden bildirilen *C. difficile* bulunma sıklığı oldukça değişkendir. Benzer şekilde süt ve süt ürünlerinde *C. difficile*'nin varlığına dair yapılan bu çalışmalarda, elde edilen pozitiflik oranları birbirinden oldukça farklıdır. Bu farklılığın sebebinin sütlerde ve gıda ürünlerinde *C. difficile* varlığının araştırılması için standart bir yöntem bulunmaması ve her araştırmacının birbirinden farklı yöntem basamakları ile araştırmalarını sürdürmeleri gösterilebilir. Buna ek olarak coğrafi dağılımdaki farklılıklardan kaynakmış olması muhtemeldir.

Dünya Sağlık Örgütü, gıda kaynaklı bir hastalığı “gıdanın yutulması yoluyla vücuda giren ajanların sebep olduğu, doğası gereği toksik veya genellikle de bulaşıcı” bir hastalık şeklinde tanımlamaktadır (WHO, 2007). Bu göz önünde bulundurulduğunda bir CDI vakasının gıda kaynaklı olup olmadığını belirlemek zordur, çünkü şu anda bir hastanın *C. difficile*'yi direkt olarak gıdalardan alıp almadığını belirlemek için herhangi bir epidemiyolojik kılavuz yoktur. Ayrıca pek çok gıda kaynaklı hastalıkta, kontamine olmuş gıdanın tüketilmesinden semptomların ortaya çıkmasına kadar nispeten kısa bir süre vardır. Öte yandan, *C. difficile* daha sonraki bir tarihte kolonizasyon fırsatı ortaya çıkana kadar hastalığa neden olmayabilir. Ayrıca, bir bireyin asemptomatik olarak *C. difficile* ile kolonize olması ve ardından bakteriyi başka bir bireye geçirmesi ve semptomatik hastalık ile sonuçlanması mümkündür. Bu nedenle, gıdayı epidemiyolojik olarak CDI ile ilişkilendirmek oldukça zordur.

#### **4.1.3. İzolatların Antibiyotik Direnç Profilleri**

Süt örneklerinden izole edilen ve *C. difficile* olduğu doğrulanan 2 izolatın ve standart *C. difficile* suşlarının klindamisin, vankomisin ve metronidazole karşı antibiyotik direnç profilleri Gradient test ile belirlenmiştir (Tablo 11).

Tablo 11

Gradient şerit ile belirlenen MİK değerleri

İzolat	MİK değeri (µg/mL)		
	Klindamisin	Vankomisin	Metronidazol
S36	1	1,5	6
S25	2	1,5	6
<i>C. difficile</i> ATCC 700057	0,125	1	0,25
<i>C. difficile</i> ATCC 43593	0,38	0,5	0,38
<i>C. difficile</i> ATCC 9689	1,5	1,5	0,50
<i>C. difficile</i> ATCC 1870	0,5	1	0,25

Sütlerden elde edilen izolatların antibiyotik dirençleri incelendiğinde vankomisin ve Metronidazol dirençlerinin aynı olduğu ancak klindamisin için MİK değerleri incelendiğinde S36 ya ait MİK değeri 1 µg/mL belirlenmişken S25' ait MİK değeri ise 2 µg/mL olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda klindamisin, vankomisin ve metronidazol'e karşı antibiyotik dirençleri araştırılan iki *C. difficile* izolatının direnç profilleri gradient şerit ile belirlenmiş olup vankomisin MİK değerler CLSI (2012) standardına göre klindamisin ve metranidazol MİK değerleri (CLSI, 2023)'e göre karşılaştırılmıştır. CLSI (2012) standardına göre *C. difficile* için vankomisin MİK değeri 05-4 µg/mL, CLSI, (2023)'e göre klindamisin MİK değeri 2-8 µg/mL, metronidazol MİK değeri ise 8-32 µg/mL olarak belirlenmiştir. S36 ve S25 numaralı izolatlara ait sonuçlar değerlendirildiğinde, iki izolatında çalışmada kullanılan tüm antibiyotiklerine karşı da duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Standart *C. difficile* suşlarına ait sonuçlar incelendiğinde ise kullanılan standart suşların tamamının her üç antibiyotiğe karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Literatürde süt ve peynir örneklerinde *C. difficile* varlığına yönelik çalışmalardan yalnızca birinde (Rahimi vd., 2014), elde edilen izolatların antibiyotiklere karşı dirençleri araştırılmıştır. Rahimi vd., (2014) tarafından yapılan çalışmada 430 çiğ süt örneğinden elde edilen 2 izolatın, aralarında vankomisin, metranidazol, kloramfenikol ve tetrasiklinin bulunduğu 11 antibiyotiğe karşı dirençlerin araştırıldığı belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde belirtilen bu dört antibiyotiğe karşı iki izolatın da duyarlı olduğu ifade edilmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak elde edilen izolatların metranidazole karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada antibiyotik duyarlılığı tespit edilen bu izolatlardan birinin enfeksiyonlarda rol oynayan 078 ribotipine ait olduğu vurgulanmıştır.

Süt ve süt ürünlerinden elde edilen *C. difficile* izolatlarına ait antibiyotik direnç henüz literatürde belirtilmemiş olsa da farklı gıda gruplarından elde edilen *C. difficile* izolatlarına ait direnç pek çok çalışmada bildirilmiştir (Lim vd., 2018; Bacheno vd., 2020).

Visser vd., (2012) kıymalardan elde ettikleri 2 sığır eti izolatının, test edilen tüm antimikrobiyal maddelere (vankomisin, metronidazol, kloramfenikol, moksifloksasin ve tigesiklin) karşı duyarlı belirlendiğini ancak domuz kıymalarından izole edilen bir suşun hem klindamisine hem de moksifloksasine dirençli olarak belirlendiğini ifade etmiştir.

Yeşil sebzelerde ve etlerde *C. difficile* varlığının araştırıldığı bir çalışmada ise 511 örnekten alınan 20 izolatın antibiyotik dirençlerinin araştırıldığı ifade edilmiştir. Araştırmacılar tüm izolatların vankomisin, metronidazol, seftriakson, eritromisin'e karşı duyarlı olduğunu ancak 18 izolatın siprofloksasin, 10 izolatın klindamisin ve 6 izolatın da tetrasiklin'e karşı dirençli olarak belirlendiğini ifade etmiştir. (Usui vd., 2020).

Hazarika vd., (2023) tarafından yapılan çalışmada süt ve peynir örneklerinin yanısıra et ve işlenmiş et ürünlerinde de *C. difficile* varlığının incelendiği ifade edilmiştir. Ancak süt ürünlerinde *C. difficile* belirlenemediği için yalnızca et ve işlenmiş et ürünlerinden elde edilen izolatların antibiyotik dirençlerinin varlığı araştırılmıştır. Araştırmacılar siprofloksasin, sefotaksim'e karşı dirençli izolatların olduğunu ancak test edilen moksifloksasin, klindamisin, tetrasiklin, tigesiklin, vankomisin, kloramfenikol ve



metronidazol antibiyotiklerine karşı izolatların tamamının duyarlı olduğunu ifade etmişlerdir.

Süt ve süt ürünlerinde *C. difficile* aranmasına yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunması ile birlikte var olan çalışmalarda antibiyotik direnç çalışmalarının yer almaması sonuçlarımızın karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Elde edilen sonuçların doğru bir şekilde değerlendirilebilmesi için bu alanda yapılacak daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

#### **4.2. Araştırma 2 Süte Uygulanan Isıl İşlemlerin *C. difficile* Sporları Üzerine Etkisi**

Süt içerisinde iki toksik olmayan suş *C. difficile* ATCC 43593 ve *C. difficile* ATCC 700057 ve iki toksinojenik suş *C. difficile* ATCC 9689 ve *C. difficile* ATCC 1870'nin yanı sıra bu çalışmada süt örneklerinden izole edilen iki *C. difficile* izolatının (S25 ve S36) termal ısı dirençleri 75 ile 85°C aralığında 5 farklı sıcaklık değeri için belirlenmiştir. Ancak sütün pastörizasyonunda kullanılan 63 ve 65°C arasında uygulanan bir buçuk saatlik ısı işlemlerin *C. difficile* sporları üzerine inhibisyon etkisi belirlenmemiştir.

Her bir ısı işlem sıcaklığı sonunda süt içerisinde *C. difficile* sporlarının hayatta kalma değerleri, uygulanan ısı işlem sürelerinin sonunda canlı kalan ve petri ortamında koloni oluşturan hücrelerin sayılması ile belirlenmiştir ve iki farklı model kullanılarak bu bakterilerin ısıl direncini en doğru ifade edebilecek model belirlenmeye çalışılmıştır.

#### 4.2.1. Log-Lineer ve Weibull Modelleri Kullanılarak *C. difficile* Sporlarının Termal Dirençlerinin Hesaplanması

##### Log-Lineer Model

Isı uygulaması süresine karşılık hayatta kalan *C. difficile* suşlarının D değerlerine ait grafikler log-lineer model ile oluşturulmuştur. Oluşturulan grafiklerden elde edilen eğrilerden regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değerlerine ek olarak lineer regresyon doğrularının eğimleri elde edilmiştir. Sonrasında ise, regresyon doğrusunun eğiminin negatif karşılığı olarak D değerleri hesaplanmıştır.

Çalışmamızda sıcaklık işlemi her bir suş için en uzun 60 dakika süreyle uygulanmıştır ve her bir suş için D değeri belirlenmiştir. Ancak yapılan ön çalışmalar sırasında ısı direnci araştırılan suşlar üzerine 63 ve 65°C'lik 60 dakikalık ısı işlem uygulamasının başlangıç yükünde bir azalma sağlamadığı tespit edilmiştir. Bu sebeple bu sıcaklık uygulamasına ait sonuçlara yer verilmemiştir.

Toksin oluşturmayan *C. difficile* suşlarına ait beş farklı sıcaklık için hesaplanan D değerlerine ait sonuçlar Tablo 12'de, toksin oluşturan *C. difficile* suşlarına ait aynı sıcaklıklar için hesaplanan D değerlerine ait sonuçlar ise Tablo 13'de verilmiştir. Bu çalışmada kapsamında sütlerden izole edilen iki adet laboratuvar izolatına ait aynı sıcaklıklarda hesaplanan D değerleri ise Tablo 14'de gösterilmiştir.

Tablo 12

Süt içerisinde toksin üretmeyen *C. difficile* (ATCC 700057 ve ATCC 43593) sporlarının Log-lineer model ile hesaplanan D değerleri

Sıcaklık (°C)	<i>C. difficile</i> ATCC 700057			<i>C. difficile</i> ATCC 43593		
	D (dakika)	R <sup>2</sup>	MSE	D (dakika)	R <sup>2</sup>	MSE
75	50,04±1,50	0,957	0,008	41,32±0,512	0,977	0,005
77,5	40,48±0,16	0,949	0,014	32,20±0,05	0,966	0,014
80	17,67±0,21	0,944	0,078	14,89±0,16	0,991	0,015
82,5	13,97±0,02	0,836	0,468	10,31±0,09	0,951	0,178
85	10,85±1,94	0,786	1,310	9,56±0,06	0,873	0,597

D değerleri, 2 paralel ölçümün ortalama ± standart hatası, MSE; ortalama kareler hatası

Tablo 13

Süt içerisinde toksin üreten *C. difficile* (ATCC 1870 ve ATCC 9689) sporlarının Log-lineer model ile hesaplanan D değerleri

Sıcaklık(°C)	<i>C. difficile</i> ATCC 1870			<i>C. difficile</i> ATCC 9689		
	D (dakika)	R <sup>2</sup>	MSE	D (dakika)	R <sup>2</sup>	MSE
75	44,85±0,80	0,986	0,002	33,44±0,33	0,995	0,001
77,5	23,66±0,08	0,990	0,007	27,60±0,72	0,993	0,003
80	13,71±0,00	0,970	0,069	16,19±0,09	0,931	0,120
82,5	11,50±0,06	0,860	0,456	11,43±0,01	0,844	0,532
85	10,47±0,40	0,812	0,873	10,84±0,09	0,832	0,665

D değerleri, 2 paralel ölçümün ortalama ± standart hatası, MSE; ortalama kareler hatası

Tablo 14

Süt içerisinde, çiğ süt örneklerinden izole edilen laboratuvar suşlarına ait sporların Log-linear model hesaplanan D değerleri

Sıcaklık (°C)	İzolat S25			İzolat S36		
	D (dakika)	R <sup>2</sup>	MSE	D (dakika)	R <sup>2</sup>	MSE
75	39,53±0,06	0,946	0,013	41,15±0,06	0,979	0,006
77,5	35,58±0,08	0,942	0,020	37,17±0,05	0,917	0,009
80	14,92±0,15	0,989	0,020	15,55±0,15	0,947	0,097
82,5	10,23±0,23	0,875	0,224	12,61±0,09	0,918	0,180
85	9,68±0,30	0,777	0,603	9,55±0,24	0,762	1,308

D değerleri, 2 paralel ölçümün ortalama ± standart hatası, MSE; ortalama kareler hatası

Tablo 12, Tablo 13 ve Tablo 14 incelendiğinde aynı sıcaklıklara ait D değerlerinin birbirinden farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca sıcaklık arttıkça tüm suşlara ait R<sup>2</sup> değerleri düşerken MSE değerleri yükselmiştir. Bu değerler incelendiğinde kullanılan tüm suşların sıcaklığa bağlı hayatta kalma değerlerinin doğrusallıktan saptığı belirlenmiştir. Uygulanan 75°C'lik sıcaklıkta D değeri en yüksek *C. difficile* ATCC 700057 suşuna aitken en küçük D değeri *C. difficile* ATCC 9689 suşuna ait belirlenmiştir. Çalışmada uygulanan en yüksek sıcaklık değeri olan 85°C'lik sıcaklıkta en yüksek D değeri yine *C. difficile* ATCC 700057'e ait iken en küçük D değeri ise S36 laboratuvar izolatında belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde Sıcaklık ile D değerleri arasında istatistiksel anlamda önemli negatif yönlü korelasyon saptanmıştır ( $P<0,05$ ,  $r=-0,947$ ). Sonuç olarak sıcaklık değerleri arttıkça D değerlerinde her bir suş için değişen oranlarda düşüş belirlenmiştir.

Tüm suşlara ait sonuçlar değerlendirildiğinde her bir *C. difficile* suşuna ait sporların ısı dirençlerinde farklılıklar gözlemlenmektedir. Standart *C. difficile* suşları ile laboratuvar izolatları karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde istatistiksel anlamda termal dirençlerinde bir farklılık belirlenmemiştir ( $P>0,05$ ).

Literatürdeki bazı çalışmalar, *C. difficile* sporlarının *C. botulinum* ve *C. perfringens* gibi diğer Clostridial gıda kaynaklı patojenlere göre önemli ölçüde daha düşük D

değerlerine sahip olduğunu belirtmektedir (Kamiya vd., 1989; Redondo-Solano vd., 2016). Bununla birlikte, sonuçlar ve önceki çalışmalar, *C. difficile* sporlarının termal direncinin, gıda işleme süreçlerinde hayatta kalma riski oluşturabileceğini düşündürmektedir.

*C. difficile* sporlarının termal direncine ilişkin yayınlanmış literatür sınırlıdır. Literatürde bu mikroorganizmanın süt içerisinde sporlarına ısıl işlemin etkinliğini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak sınırlı da olsa yapılan çalışmalar *C. difficile*'nin süte pek çok farklı kaynaktan kontamine olabileceğini ifade etmektedir (Romano vd., 2018; Sugeng, 2012). Ayrıca sütün akışkanlığı sporların kolayca dağılmasına ve daha sonra işlenmesine izin vermektedir (Ramaswamy vd., 2010). *C. difficile*'nin termal direncin araştırılmasında, çoğu çalışma besin ortamı, su ve et üzerinde gerçekleştirilmiştir (Rodriguez-Palacios ve LeJeune, 2011; Redondo-Solano vd., 2016; Oie vd., 2017; Arora vd., 2019; Pickering vd., 2019).

Rodriguez-Palacios vd., (2010) etler için tavsiye edilen pişirme sıcaklığında (71°C) 2 saatlik bir pişirme işleminin *C. difficile* sporların varlığının giderilmesinde başarısız olduğu ancak uygulanan bu pişirme işlemine ek 85°C'de 10 dakikalık bir ısıl işlem uygulamasının var olan *C. difficile* sporlarının %90'ını azaltabildiği ifade edilmiştir. Benzer şekilde Redondo-Solano vd., (2016) tarafından yapılan çalışmada, domuz etine inoküle edilen *C. difficile* sporlarının et ürünleri için önerilen pişirme sıcaklıklarında sporların varlıklarını koruyabildiğini ifade etmiştir.

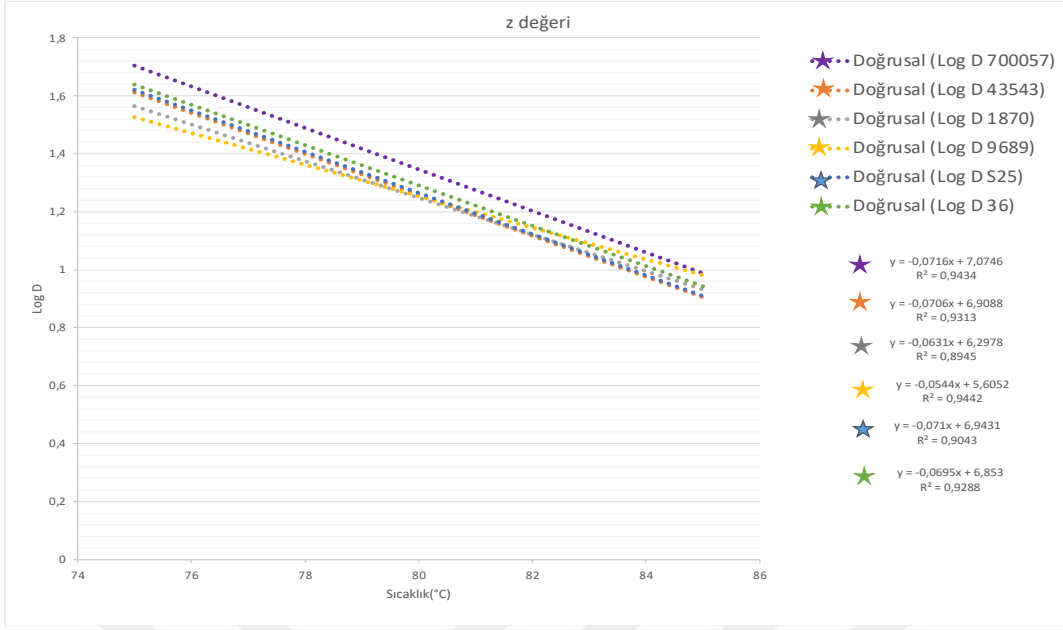
Rodriguez-Palacios ve LeJeune (2011) tarafından sığır etinde yapılan çalışmada ete kontamine edilen *C. difficile* sporlarının D<sub>85</sub> değerinin 2,5 ila 3 dakika arasında belirlendiği ifade edilmiştir. Benzer şekilde Arora vd., (2019), *C. difficile* sporlarının ete kontaminasyonunda, 82°C'de 4,39 dakikada ısıl işlem uygulamasının yalnızca 1 logaritmik spor inaktivasyonu sağladığı belirtilmiştir.

Suda *C. difficile* sporlarının ısıl direncinin araştırıldığı bir çalışmada, sporlarının 60°C'ye uzun süreli (>24 saat) ve 70°C'de 3 saatlik ısıl işleme karşı canlılıklarını koruyabildiği bildirilmiştir (Lawley vd., 2009). Suda yapılan bir başka çalışmada 80°C 'lik

2 dakika ısıtma işlemi uygulanmasının 1 logaritmik azalma için yeterli olduğu belirtilmektedir (Oie vd., 2017). Redondo-Solano vd., (2016) tarafından yapılan çalışmada ise, *C. difficile* sporlarının dirençleri hem peptonlu su hem de domuz eti içerisinde iki farklı geri kazanım besiyeri kullanılarak test edilmiştir. Araştırmacılar, *C. difficile* sporlarının gıda matriksi içerisinde daha yüksek ısıtma direnci olduğunu belirtmişlerdir. Ancak Marcos vd., (2023) tarafından yapılan çalışmada PBS ve domuz eti içerisindeki *C. difficile* sporlarının 80°C'de canlılıkları arasında fark tespit etmemişlerdir.

Literatürde yer alan çalışmalarda ve bu çalışmada elde edilen sonuçların farklılıklarından biri de, bu çalışmalarda kullanılan *C. difficile* suşlarının birbirinden farklı olması olabilir. Çünkü sonuçlarımız da göstermektedir ki farklı suşlara ait termal dirençler için aynı sıcaklıkta farklı değerler elde edilmiştir. Farklı suşların termal dirençlerindeki farklılıkların ise, suşların sporlarının korteks bileşimi ve yapısındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Joshi vd., 2012). Ayrıca benzer matrikslerde aynı suşlar ile yapılan çalışmalardaki farklılıklar ise, çalışmalarda sporların geri kazanımı için kullanılan yöntemlerdeki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir (Pickering vd., 2019). Özellikle Joshi vd., (2012) tarafından yapılan çalışmada ribotip 002 ve ribotip 027 sporlarının dış korteks farklılıklarını gösterilmiş ve bu farklılıkların suşların yüzey kolonizasyon yeteneklerinde önemli olduğu belirtilmiştir. Ayrıca çalışmalarda kullanılan sporlar aynı matrikste ve aynı ribotipten olsalar bile aynı ribotipten türlerin bile izole edildikleri kaynağa göre fenotipik farklılıklar gösterebileceği belirtilmektedir (Redondo-Solano vd., 2016). Bu durum ısıtma direncinde etki edecektir.

$z$  değeri, mikroorganizmaların termal duyarlılığını temsil etmektedir. Kullanılan 4 standart ve iki laboratuvar izolatına ait  $z$  değerleri ısıtma işlem sıcaklıklarına karşı  $\log_{10}D'$ 'nin bir grafiği olan termal direnç eğrisinin negatif eğimi olarak elde edilmiştir.  $z$  değerlerinin elde edilmesinde kullanılan termal direnç grafikleri Şekil 18'de gösterilmiştir. Şekil 18 üzerinde test edilen her bir suşa ait termal direnç denklemi ve bu denklemlere ait  $R^2$  değerleri gösterilmiştir. Termal direnç denklemlerinden elde edilen hesaplanmış  $z$  değerleri ise Tablo 14'de gösterilmiştir.



Şekil 18. z değerlerinin hesaplanmasında kullanılan termal direnç eğrileri

Tablo 16

*C. difficile* suşlarına ait z değerleri

Suş	Z değeri (°C)
<i>C. difficile</i> ATCC 700057	13,96
<i>C. difficile</i> ATCC 43593	14,16
<i>C. difficile</i> ATCC 1870	15,84
<i>C. difficile</i> ATCC 9689	18,38
S26	14,08
S36	14,38

Tablo 16’da yer alan z değerleri incelendiğinde en yüksek z değeri *C. difficile* ATCC 9689 suşa ait belirlenmiştir. En düşük z değeri ise *C. difficile* ATCC 700057 suşunda belirlenmiştir. z değerleri açısından değerlendirildiğinde laboratuvar izolatları ile *C. difficile* standart suşları arasında istatistiksel açıdan farklılık belirlenmemiştir ( $P > 0,05$ ). Redondo-Solano vd., (2016) *C. difficile*’nin gıda içerisinde ilk kez z değerinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirdikleri çalışmada elde ettikleri z değerlerinin 6,20-12,30°C değerleri arasında belirlendiğini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar gıda ortamı dışında peptonlu su kullanarak da çalışmalarını tekrar ettiklerini ve z değerlerinin peptonlu suda (8,80-

10,80°C) gıda ortamına kıyasla düşük belirlediklerini ifade etmişlerdir. Arora vd., (2019) yağsız kıyma içerisine inoküle edilen *Clostridium difficile* ATCC 17857 sporlarının z değeri 5,17°C olarak belirlendiği ifade etmiştir. Literatürde yer alan *C. difficile*'nin z değerine dair çalışmalardan elde edilen z değerleri bu çalışmaya kıyasla oldukça düşük belirlenmiştir. Aynı sıcaklıklarda D değerinin farklılaşmasına etki eden benzer faktörlerin z değerini de etkilediği düşünülmektedir

Termal ölüm parametreleri (D ve z değerleri), gıda işleyicilerinin, gıda kaynaklı patojenlerle ürünün potansiyel kontaminasyonunu ele almak için gıda üretim sürecinin yeterliliğini değerlendirmesine yardımcı olmaktadır (Redondo-Solano vd., 2016). Bu nedenle doğru şekilde belirlenmesi gıdanın güvenliği ve uygulanacak işlemin etkinliğinin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

### **Weibull Modeli**

Hayatta kalma eğrileri doğrusal olmadığında, D değeri genellikle hayatta kalma eğrisinin doğrusal kısmı dikkate alınarak belirlenir. Bu durum, ısı işlem uygulamalarında gerçeği tam olarak yansıtamayan bir durumdur. Bu şekilde değerlendirilen işlemlerde eğrinin şekillerine bağlı olarak eksik ya da aşırı sıcaklık uygulamasına sebep olabilmektedir.

Geçmişten günümüze, bu tip doğrusal olmayan hayatta kalma eğrilerini tanımlamak için Cerf (Cerf, 1977), modifiye Gompertz (Bhaduri vd., 1991), Weibull (Peleg ve Cole, 1998) gibi biz dizi model önerilmiştir. Bu modellerin arasında Weibull modelinin, kolay uygulanabilirliği ve esnekliği ile diğerlerine nazaran ön plana çıktığı ifade edilmektedir (Chen ve Hoover, 2004).

Log-lineer modelinden farklı olarak, Weibull modelinde mikrobiyal hücrelerin termal direncinin hesaplanmasında, kümülatif değerlere dayalı bir hesaplama kullanılmaktadır. Weibull modeli kullanılarak toksin üretmeyen *C. difficile* sporları için



hesaplanan  $\delta$ ,  $\beta$ ,  $R^2$  ve MSE değerleri Tablo 16'da, toksin üreten *C. difficile* sporları için Tablo 17'de ve laboratuvar izolatları için Tablo 18'de gösterilmiştir.

Tablo 16

Süt içerisinde toksin üretmeyen *C. difficile* (ATCC 700057 ve ATCC 43593) sporlarının Weibull modeli ile hesaplanan  $\delta$  ve  $\beta$ ,  $R^2$ , ve MSE değerleri

	Sıcaklık (°C)	$\delta$ (dakika)	$\beta$	$R^2$	MSE
<i>C. difficile</i> 700057	75	47,01± 5,28	0,90± 0,16	0,959	0,008
	77,5	35,11± 3,14	1,07± 0,18	0,969	0,014
	80	7,53± 1,40	0,64± 0,07	0,990	0,010
	82,5	5,48±0,99	1,17±0,19	0,983	0,183
	85	2,75± 0,99	2,00± 0,12	0,998	0,531
<i>C. difficile</i> 43593	75	39,93±3.73	0,96±0,13	0,977	0,006
	77.5	31,48±4,31	1,12±0,26	0,944	0,016
	80	18,17±1,38	1,39±0,17	0,990	0,017
	82,5	5,66±0,52	1,08±0,09	0,995	0,086
	85	1,33±0,27	0,71±0,10	0,989	0,174

$\delta$ : Delta,  $\beta$ : p değeri (şekil parametresi), MSE; ortalama kareler hatası,  $\delta$  ve  $\beta$  değerleri, ortalama ± standart hata şeklinde hesaplanmıştır.

Tablo 17

Süt içerisinde toksin üreten *C. difficile* (ATCC 1870 ve ATCC 8689) sporlarının Weibull modeli ile hesaplanan  $\delta$  ve  $\beta$ ,  $R^2$ , ve MSE değerleri

	Sıcaklık(°C)	$\delta$ (dakika)	$\beta$	$R^2$	MSE
<i>C. difficile</i> 1870	75	47,99±1,90	1,18±0,10	0,996	0,002
	77.5	24,56±1,32	1,31±0,17	0,988	0,007
	80	14,20±2,85	1,24±0,29	0,965	0,066
	82.5	5,18±1,09	1,00±0,18	0,980	0,199
	85	1,47±0,42	0,98±0,20	0,975	0,372
<i>C. difficile</i> 9689	75	34,01±1,52	1,04±0,06	0,996	0,001
	77.5	25,41±1,81	1,02±0,15	0,984	0,003
	80	13,89±1,60	1,26±0,16	0,998	0,086
	82,5	5,98±0,80	1,31±0,17	0,989	0,248
	85	1,94±0,44	1,13±0,24	0,976	0,191

$\delta$ : Delta,  $\beta$ : p değeri (şekil parametresi), MSE; ortalama kareler hatası,  $\delta$  ve  $\beta$  değerleri, ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde hesaplanmıştır.

Tablo 18

Süt içerisinde, laboratuvar suşlarına ait sporların sporlarının Weibull modeli ile hesaplanan  $\delta$  ve  $\beta$ ,  $R^2$ , ve MSE değerleri

	Sıcaklık (°C)	$\delta$ (dakika)	$\beta$	$R^2$	MSE
<b>S25</b>	75	41,21± 4,66	1,10± 0,21	0,959	0,013
	77,5	32,13± 3,09	0,86± 0,10	0,981	0,021
	80	16,37± 2,13	1,07± 0,10	0,990	0,022
	82,5	4,04±1,41	0,68±0,08	0,976	0,100
	85	0,53± 0,15	0,41± 0,12	0,994	0,288
<b>S36</b>	75	40,50±3,59	0,96±0,11	0,979	0,006
	77.5	24,18±4,35	0,61±0,08	0,975	0,009
	80	8,75±2,88	0,71±0,08	0,982	0,037
	82,5	5,21±2,81	0,67±0,13	0,995	0,169
	85	1,35±0,30	0,39±0,10	0,994	0,354

$\delta$ : Delta,  $\beta$ : p değeri (şekil parametresi), MSE; ortalama kare hata,  $\delta$  ve  $\beta$  değerleri, ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde hesaplanmıştır.

Weibull modeli ile hesaplanan  $\beta$  değerleri ve sıcaklıklar arasındaki korelasyon incelendiğinde sıcaklık ve  $\beta$  değerleri arasında negatif yönlü bir korelasyon belirlenmiştir ( $P<0,05$ ,  $r=-0,975$ ).

İlk indirgeme süresi olarak ifade edilen  $\delta$  değerleri incelendiğinde, uygulanan en düşük sıcaklıkta tüm sporlara ait veriler incelendiğinde en yüksek değer laboratuvar izolat S25 sporlarına aittir. Bu sıcaklıktaki en düşük  $\delta$  değeri ise *C. difficile* ATCC 9689 sporuna aittir. Sıcaklık arttırıldığında her bir suşa ait sporların  $\delta$  değerlerinde farklı oranlarda düşüş belirlenmiştir. Uygulanan en yüksek sıcaklıkta  $\delta$  değerleri incelendiğinde en yüksek değerin *C. difficile* ATCC 700057 suşuna ait sporun en düşük değerin ise S25 suşuna ait sporun olduğu belirlenmiştir. Tüm suşlara ait sporların  $\delta$  değerleri değerlendirildiğinde aynı sıcaklıklar için toksijenik, toksijenik olmayan suşlar ve laboratuvar suşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenememiştir ( $P>0,05$ ). Bu, hipervirulansın sporların daha yüksek termal direnci ile zorunlu olarak ilişkili olmadığını göstermektedir.

$\delta$  değeri, D değerinden farklı olarak  $\beta$  değerine bağlıdır.  $\beta$  değerlerinin sıcaklığa bağlı olması beklendiği için sıcaklık ile  $\beta$  değerleri arasındaki korelasyon araştırılmış ancak negatif bir korelasyon saptanabilmiştir ( $P<0,01$ ,  $r=-0,877$ ).

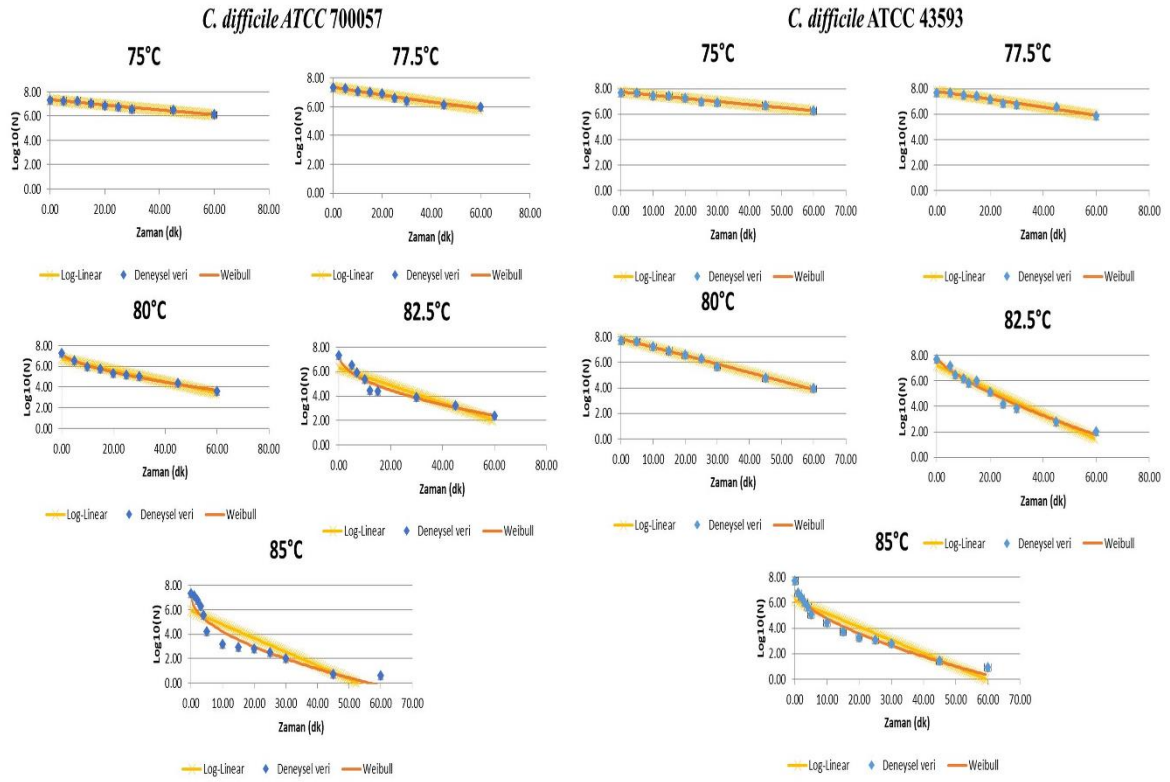
Weibull modelinde mikroorganizma grafiğinin şeklini belirleyen  $\beta$  değerleri incelenmiş ve standart *C. difficile* kültürlerine ait sporlarının  $\beta$  değerleri genel olarak  $\beta>1$  olarak belirlenmiştir. Bu değerlerin 1'den büyük olması  $\delta$  değerlerinin zamanla azalacağını ve geri kalan sporların ısıya karşı daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Bu çalışmaya benzer şekilde Pickering vd., (2019), *C. difficile* sporlarının PBS içerisindeki ısı işlemler ile araştıran çalışmada, 80°C'nin altındaki sıcaklıklarda  $\beta$  değerinin 1'den büyük olduğunu ancak sıcaklık 80°C'nin üzerinde olduğunda  $\beta$  değerlerinin 1'in altına düştüğü belirtilmiştir. Arora ve ark. (2019) tarafında yapılan başka bir çalışmada *C. difficile* sporlarının ete uygulanan tüm sıcaklıklarda  $\beta$  değerlerinin 1'in üzerinde olduğu belirlenmiştir.

Sütlerden izole edilen S25 ve S36 izolatlarının sporlarının termal dirençleri Weibull modeli ile incelendiğinde standart *C. difficile* suşlarına kıyasla  $\beta$  değerindeki farklılıklar dikkat çekmektedir. Standart *C. difficile*'nin dört suşu için de  $\beta$  değerleri genel olarak 1'den büyük belirlenmişken laboratuvar suşlarının sporlarına ait  $\beta$  değerleri genel olarak 1'den küçüktür. Bu durum, hayatta kalma eğrisi yukarı doğru içbükey olacağını,  $\delta$ 'nın zamanla artacağını göstermektedir. Başka bir deyişle, ısıtma işlemi süresince kalan sporlar daha yüksek dirence sahip olacak veya strese uyum sağlayacaktır, dolayısıyla ölme olasılıkları daha düşüktür. Weibull modelinde, spor oluşturan farklı mikroorganizmalar üzerinde yapılan ısıtma direnç çalışmalarında, bu çalışmadan farklı olarak  $\beta$  değerlerinin birden düşük olduğu bildirilmiştir (Peleg ve Cole, 2000; Stone vd., 2009).

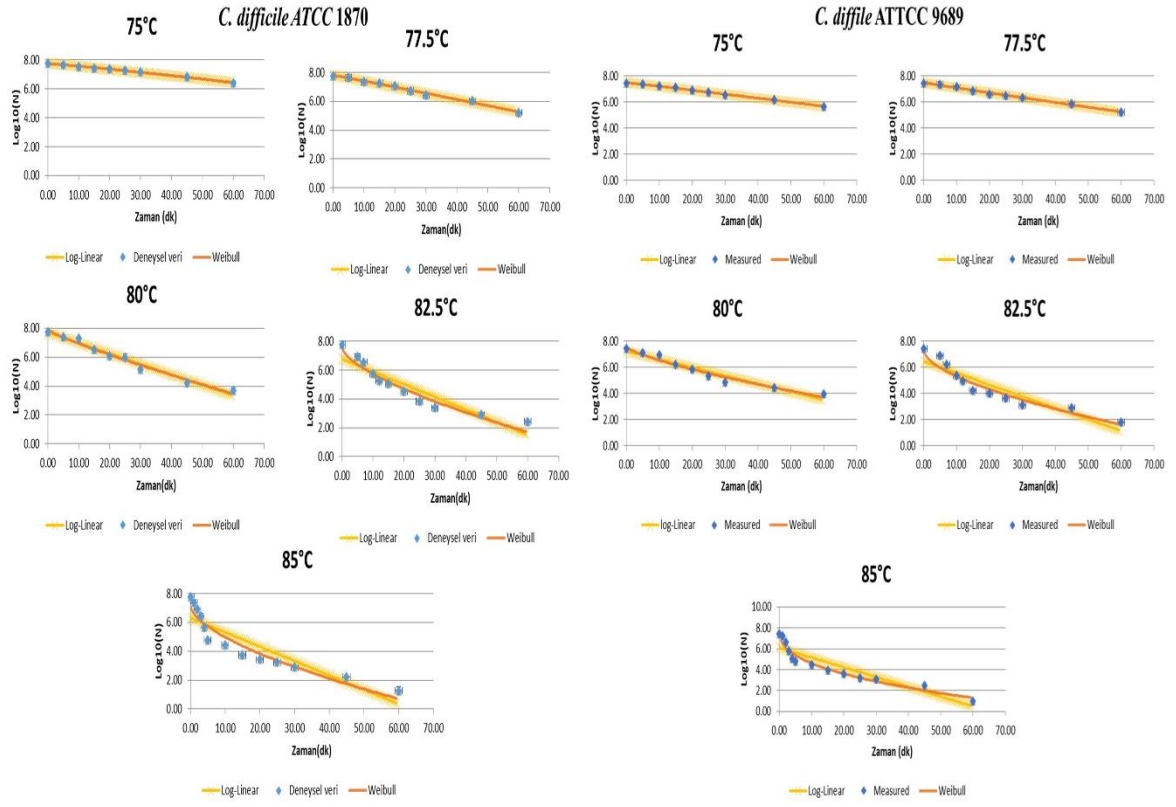
### **Modellerin Karşılaştırılması**

Geleneksel olarak, mikroorganizmaların termal inaktivasyonu, aynı içsel ısı direnci paylaşan homojen bir popülasyon varsayımına dayanan log-lineer kinetik modeller kullanılarak gösterilmiştir. Bu yaklaşım, D değerlerinin ve z değerlerinin hızlı bir şekilde hesaplanmasının mümkün olduğu gıda mikrobiyolojisi ve gıda güvenliği alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır (Pickering vd., 2019). Isıtma işleminin canlı kalım üzerine etkisi üzerine yapılan çalışmalar verilerin her zaman doğrusal dağılım göstermediği fikrini desteklemektedir (Van Boekel, 2002; Chen ve Hoover, 2004; Arora vd., 2019; Pickering vd., 2019).

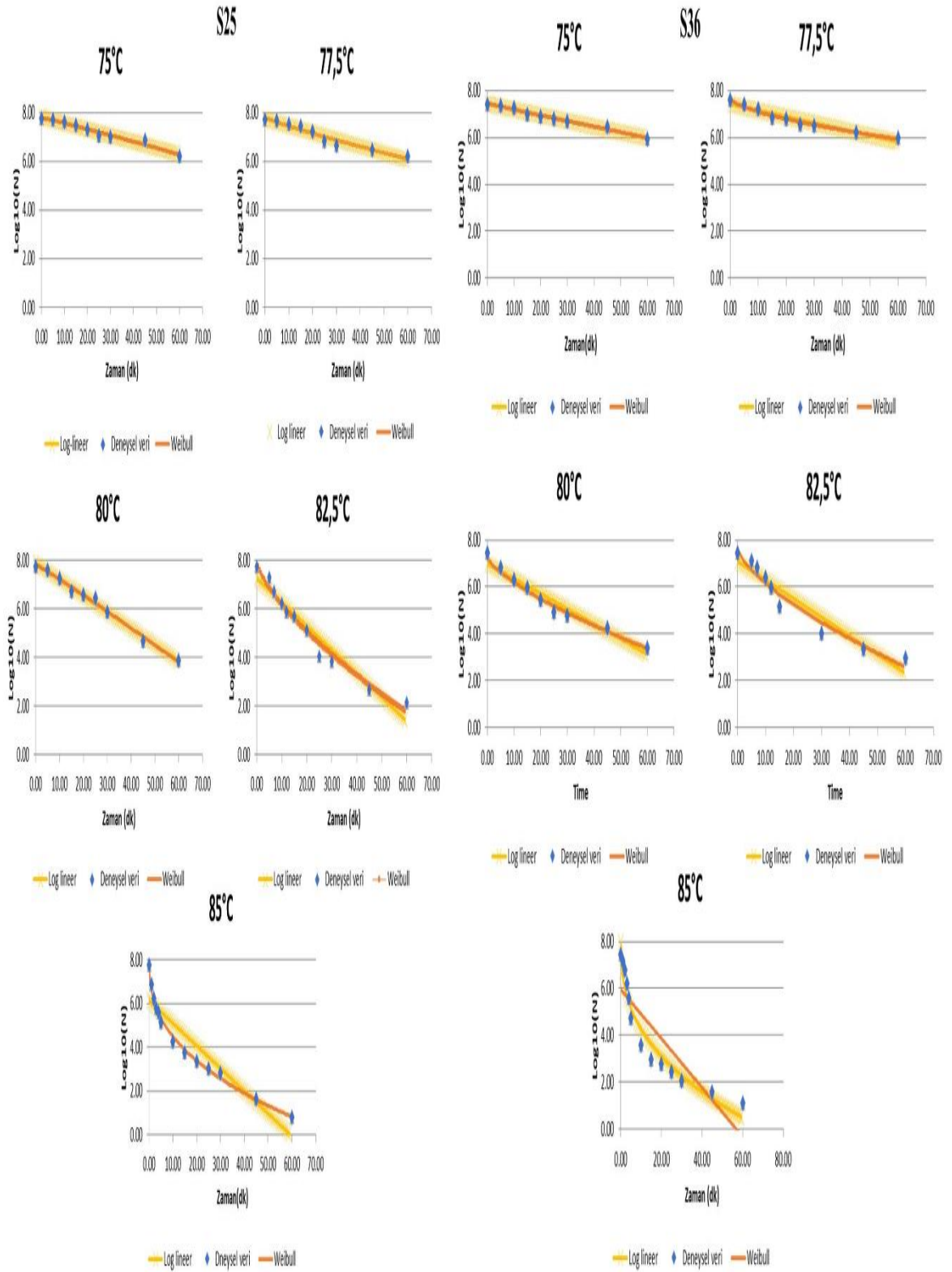
Log lineer ve Weibull modelleri kullanılarak sonuçların karşılaştırılması için toksin üretmeyen *C. difficile* suşlarına ait grafikler Şekil 19'da, toksin üreten *C. difficile* suşlarına ait grafikler Şekil 20'de ve laboratuvar izolatlarına ait grafikler Şekil 21'de gösterilmiştir.



Şekil 19. *C. difficile* ATCC 700057 ve *C. difficile* ATCC 43593 suşlarına ait sporların termal dirençlerinin Log-linear ve Weibull modelleri ile karşılaştırılması



Şekil 20. *C. difficile* ATCC 1870 ve *C. difficile* ATCC 9689 suşlarına ait sporların termal dirençlerinin Log-linear ve Weibull modelleri ile karşılaştırılması



Şekil 21. S25 ve S36 suşlarına ait sporların termal dirençlerinin Log-lineer ve Weibull modelleri ile karşılaştırılması

Her iki model ile elde edilen ilk logaritmik azalma değerleri arasında istatistiksel olarak pozitif korelasyon belirlenmiştir ( $P < 0,01$ ,  $r = 0,983$ ). Ancak tüm bu değerler, süt için önerilen pastörizasyon değerlerinden ( $63^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika veya  $72^{\circ}\text{C}$ 'de 15 saniye) oldukça yüksektir.

Son yıllarda birçok ülkede çiğ süt tüketimindeki artış göz önüne alındığında (Fusco vd., 2020), pastörizasyonun bile yetersiz kaldığı *C. difficile* sporlarının küresel bir risk oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamız sırasında elde edilen sonuçlar hayatta kalma verilerinin sıcaklık artışına bağlı olarak doğrusallıktan uzaklaştığını göstermektedir. Modellerin MSE değerleri karşılaştırıldığında, Weibull modelinde elde edilen MSE değerlerinin log-lineer modele göre yüksek sıcaklıklarda düştüğü ve hayatta kalma verilerini ortaya koymaya daha uygun olduğu grlmştir. Ayrıca yüksek sıcaklıklarda deneysel veriler ile Weibull modeli ile elde edilen sonuçlar bu anlamda birbirini desteklemektedir.

Log-lineer model ile Weibull modeli arasındaki bu farklılığın kaynaklarından birinin sporları çevreleyen bir matrisin ısıya karşı tampon görevi görme ihtimali olduğu düşünülmektedir (Pickering vd., 2019). Ek olarak, çoğu gıdanın doğal homojen olmaması, mikroorganizmaların örneklenmesi ve kümelenmesi açısından deneysel sorunlara neden olabilir. Süt bu açıdan değerlendirildiğinde, sporlara ısı iletiminde homojen iletim sağlamasına rağmen sporların ısıl dirençleri zamanla doğrusal bir azalma göstermemiştir.

Literatürde yer alan pek çok çalışma çalışmamıza benzer şekilde Weibull eğrilerinin dağılımlarının deneysel veri sonuçlarını açıklamaya Log-Lineer eğrilerinden daha uygun olduğunu ifade etmektedir (Peleg ve Cole, 2000; Chen ve Hoover, 2004; Oliveira vd., 2018).

Ancak Hassan ve Ramaswamy, (2011), *C. sporogenes*'in ısıl direncinin hesaplanmasında beta değerlerinin yaklaşık olarak 1'e eşit olduğunu ve Weibull modeli ile hesaplanan ısıl direnç değerlerinin log-lineer modelden farklı olmadığını belirtmişlerdir.



*C. difficile* sporlarının termal direnci, substrata veya matrise bağlıdır. Bu nedenle gıda, su ve çeşitli sıvı ortamlarda yapılan ısıl direnç sonuçları aynı sıcaklıkta farklı direnç seviyeleri ortaya koymaktadır (Dharmasena vd., 2019; Pickering vd., 2019; Redondo-Solano vd., 2016) . Bu sebeple *C. difficile* sporlarının ısıl direncinin belirlenmesinde belirli bir gıda matrisinin kullanılması, uygulanacak ısıl işlem süresinin ve sıcaklığının doğru olarak belirlenmesi için gereklidir

Sonuç olarak bu çalışmanın bu bölümünde, süte olası *C. difficile* spor kontaminasyonunda uygulanan ısıl işlem süreleri ve sıcaklıklarının doğru belirlenmesi maksimum duyuşal ve besinsel nitelikleri korurken istenen hedef bakteri inaktivasyon seviyelerine ulaşmak için optimum sıcaklık ve zaman kombinasyonlarının seçilmesinde gıda endüstrisine açısından önemlidir.

### **4.3. Araştırma 3 Süte *C. difficile* Kontaminasyonlarının Önlenmesinde Baktöfüğasyon İşleminin Etkisi**

Baktöfüğasyon, özellikle mandıralarda peynir yapımında kullanılacak sütün mikroorganizmalarının uzaklaştırılması amacı ile kullanılan bir santrifüj işlemidir (Vissers vd., 2007; Faccia, 2013). Baktöfüğasyon işleminde genellikle 10000 xg'lik santrifüj işlemi tercih edilmektedir (Bergere vd., 1969).

Yapılan çalışmalarda baktöfüğasyonu uygulama süreleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Stock ve Sillen (1998) tarafından yapılan çalışmada anaerobik sporların sütlerden uzaklaştırılmasında uygulanan baktöfüğasyon işlemi 15-20 dakika süre ile uygulanırken koliformların sütlerden uzaklaştırılması amacı ile 9000 xg'de yalnızca 1 saniye uygulanmıştır.

Bu çalışmada farklı baktöfüğasyon derecelerinin süt içerisine inoküle edilen *C. difficile* sporları üzerine etkisine ait sonuçlar Tablo 19'de gösterilmiştir.

Tablo 19

Baktöfugasyonun süt içerisindeki *C. difficile* sporlarına etkisi

Mikroorganizma(spor)	Baktöfugasyon		Başlangıç spor sayısı (log kob/mL)*	İşlem sonrası spor sayısı (log kob/mL)*
	Santrifüj (xg)	Süre (dk)		
<i>C. difficile</i> ATCC 700057	4000	10	7,32±0,19	6,90±0,09
	10000	15		6,64±0,60
	12000	10		6,57±0,10
	12000	15		6,43±0,04
<i>C. difficile</i> ATCC 43593	4000	10	7,71 ± 0,23	7,64±0,01
	10000	15		7,49±0,20
	12000	10		7,43±0,00
	12000	15		7,06±0,21
<i>C. difficile</i> ATCC 1870	4000	10	7,76±0,18	7,71±0,15
	10000	15		7,59±0,11
	12000	10		7,37±0,01
	12000	15		7,25±0,04
<i>C. difficile</i> ATCC 9689	4000	10	7,43±0,04	7,22±0,06
	10000	15		7,02±0,01
	12000	10		6,92±0,02
	12000	15		6,80±0,60

\*İki paralel ölçüm ortalaması ± standart hata

Tablo 19'daki sonuçlar incelendiğinde en düşük santrifüj (4000 xg) ve en yüksek santrifüj (12000 xg) değerleri de dahil olmak üzere *C. difficile*'nin bu çalışmada kullanılan dört standart suşuna ait sporlara karşı bir logaritma birimlik bir azalma dahi tespit edilememiştir. Ayrıca g değeri ve uygulama süresi arttırıldığında süt yağının santrifüj tüpü üzerinde toplanmaya başlayarak sütün bütünlüğünün bozulmasına neden olduğu gözlemlenmiştir.

Çiğ sütün mikrobiyolojik kontaminasyonunu azaltmak çok önemlidir. Özellikle çiğ sütte bakteriyel endospor oluşturan bakterilerin ve sporlarının sayısının azaltılması amacıyla çeşitli yöntemlerin kullanılmasının, pastörize sütün raf ömrünü uzatmak ve

pastörize sütle üretilen süt ürünlerindeki teknolojik sorunları azaltmak için kullanılabileceği ifade edilmektedir (Farkye, 2004). Baktöfugasyon temel olarak süt (1,034 g/mL) ve süt içerisindeki mikroorganizmaların yoğunluk farkı ile ayrılması prensibine dayanmaktadır. Bakteriye sporlar, 1,30–1,32 g/mL gibi yüksek bir yoğunluğa sahiptir. Vejetatif hücrelerin yoğunluğu yalnızca 1,07–1,12 g/mL'dir ve bu nedenle baktöfugasyon sırasında spordan daha düşük oranda elimine edilir. Yoğunluğa ek olarak, hücre boyutu da önemlidir. Büyük hücreler ve hücre kümeleri, küçük olanlardan daha iyi ayrılmaktadırlar (Eugster ve Jakob, 2019).

Yapılan çalışmalar sektörde sıklıkla kullanılan değerler olduğu için baktöfugasyon işleminde süte 8000 xg ve 10000 xg'de uygulandığını ifade edilmektedir (Ribeiro vd., 2019; D'Incecco vd., 2023). Literatürde baktöfugasyon işleminin toplam bakteri yükünü önemli ölçüde azalttığı ifade edilmektedir (Doyle vd., 2015; Ribeiro vd., 2019).

Literatürde *C. difficile* sporlarının baktöfugasyon ile azaltılmasına yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. *Clostridium tyrobutyricum* ise peynir üretiminde ekonomik kayıplara sebep olan sporlu bir bakteridir. Hollanda süt endüstrisinin, çiftçilerine *Clostridium tyrobutyricum* spor sayılarının azaltılmasında baktöfugasyon işlemi uygulanmasını önerdiği ifade edilmektedir (Vissers vd., 2007; Burtscher vd., 2023). Literatürde bu çalışmadan farklı olarak *C. tyrobutyricum* (Bergere vd., 1969), *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* (Torres-Anjel ve Hedrick, 1971) sporlarının ısı işlem ve baktöfugasyon kombinasyonu ile yüksek oranda elimine edilebildiği ifade edilmiştir.

Ribeiro vd., (2019) tarafından yapılan bir çalışmada süütün baktöfugasyonunda 10000 xg kullanılmış araştırmacılar çalışmada kullandıkları bazı mikroorganizmaların sayılarının değişen oranlarda azaldığını ancak endospor oluşturan psikrotroflar olduğu ve proteolitik veya lipolitik aktiviteye sahip olduğunu ifade ettikleri iki türün baktöfugasyon sonrası da geri kazanıldıklarını belirtmişlerdir. Araştırmacılar, benzer şekilde baktöfugasyon işleminin tek başına bakteriyel endosporların eliminasyonunda yetersiz kalabileceğini ancak başka yöntemler ile birlikte kullanımının daha etkili olabileceğini ifade etmişlerdir.

D’Incecco vd., (2023) tarafından yapılan çalışmada ise baktöfugasyon işleminin sütün mikrobiyotasında oluşturduğu etkilerin yanında baktöfugasyon işlemi uygulanan süttten elde edilen peynirlerinin duyuusal profillerinin negatif yönde etkilendiğini ve aynı zamanda daha düşük ester içerdiğini ifade etmişlerdir. Benzer şekilde (Faccia, 2013) tarafından yapılan çalışmada baktöfugasyon işlemi uygulanan sütler ile uygulanan peynirlerde duyuusal özellik kayıplarının yaşandığı ifade edilmektedir. Baktöfugasyon uygulanan sütlerden üretilen peynirlerde oluşan bu aroma ve çeşitli besinlerce kayıpların, uygulanan bu işlem sırasında starter laktik asit bakterilerinin de sayılarında oluşan azalmalardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir (Faccia, 2013; D’Incecco vd., 2023;).

Sonuç olarak baktöfugasyon işlemleri süt içerisindeki diğer bakteriyel hücrelerin ve sporlarının eliminasyonu için kullanılabilir bir yöntem olsa da tek başına uygulanmasının *C. difficile* sporları üzerin etkinliği belirlenememiştir. Ayrıca yüksek santrifüj değerlerinde sütün yağının süt yüzeyine ayrılması da istenmeyen bir özellik olduğu için bu işlemlerin ve üzerindeki değerlerin sporların süt içerisinde eliminasyonunu sınırlandırmaktadır.

#### **4.4. Araştırma 4 *C. difficile* Üzerine Standart, Ticari ve Laboratuvar İzolatlarının Kullanımı ile İnaktivasyonunun İn-Vitro Olarak Belirlenmesi**

##### **4.4.1. Anti- *Clostridioides difficile* (Anti-CD) Aktivitesi Olan Probiyotiklerin Belirlenmesi**

Probiyotiklerin *C. difficile* ATCC 700057, *C. difficile* ATCC 43593, *C. difficile* ATCC 1870, *C. difficile* ATCC 9689 suşları ile birlikte *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 ve *Clostridium perfringens* ATCC 12915 üzerine inhibisyon etkisinin belirlenmesinde elde edilen inhibisyon zonlarına ait sonuçlar Tablo 20’de verilmiştir. İnhibisyon zonlarına ait elde edilen sonuçlar vankomisin diskinin kültürlerine karşı oluşturduğu zonlar dikkate alınarak değerlendirilmiştir.

Tablo 20

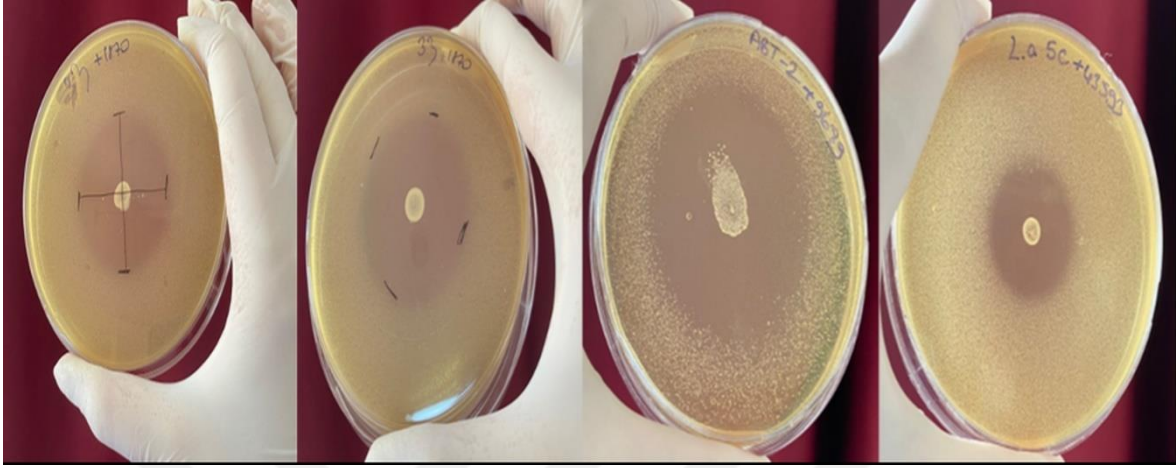
Disk difüzyonu ile belirlenen probiyotik kültürlerin inhibisyon bölgeleri (mm)

Probiyotikler	<i>C. difficile</i> ATCC 43593	<i>C. difficile</i> ATCC 700057	<i>C. difficile</i> ATCC 1870	<i>C. difficile</i> ATCC 9689	<i>C. perfringens</i> ATCC 12915	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437
<i>Lactobacillus</i> <i>casei</i> NRRL B 1922	29,98 <sup>Ab</sup> ±0,09	31,19 <sup>Ac</sup> ±2,60	41,37 <sup>Aabc</sup> ±3,96	30,77 <sup>Abc</sup> ±5,54	33,81 <sup>Abc</sup> ±0,23	42,65 <sup>Bb</sup> ±0,11
<i>Lactobacillus</i> <i>reuteri</i> DSM 17938	21,18 <sup>Cf</sup> ±1,46**	28,13 <sup>BCe</sup> ±3,43*	31,59 <sup>ABCcd</sup> ±2,38	24,07 <sup>Cd</sup> ±4,39	36,45 <sup>Abc</sup> ±0,09	33,94 <sup>Abcd</sup> ±2,01
<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> GG	38,85 <sup>Ab</sup> ±5,39	32,89 <sup>Abcd</sup> ±1,96	45,22 <sup>Aab</sup> ±5,36	26,95 <sup>Bd</sup> ±1,16	38,06 <sup>Abbc</sup> ±0,61	42,72 <sup>Ab</sup> ±0,79
<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> ATCC 20219	25,77 <sup>Ac</sup> ±1,59	32,59 <sup>Ac</sup> ±2,41	35,51 <sup>Abc</sup> ±1,11	29,72 <sup>Ac</sup> ±3,98	38,09 <sup>A</sup> ±1,12	36,28 <sup>Ac</sup> ±1,14
<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> ATCC 334	41,22 <sup>Ab</sup> ±2,27	30,88 <sup>BCcd</sup> ±0,38	49,27 <sup>Aa</sup> ±0,86	26,81 <sup>Cd</sup> ±0,89	40,82 <sup>Abbc</sup> ±0,09	33,47 <sup>BCcd</sup> ±1,16
ABT-2	38,53 <sup>Ca</sup> ±3,24	49,56 <sup>Abb</sup> ±3,79	42,57 <sup>Bcab</sup> ±2,28	52,22 <sup>Aa</sup> ±1,11	37,39 <sup>Cbc</sup> ±1,07	53,73 <sup>Ab</sup> ±2,84
ABT-7	27,56 <sup>Dbc</sup> ±0,41	37,33 <sup>CDbc</sup> ±2,50	39,05 <sup>Cabc</sup> ±1,52	41,06 <sup>BCb</sup> ±1,32	49,80 <sup>Ba</sup> ±1,37	71,62 <sup>Aa</sup> ±0,46
LA5-C	33,52 <sup>Ba</sup> ±2,41	40,56 <sup>Abb</sup> ±1,40	42,46 <sup>Aab</sup> ±1,46	41,24 <sup>Abb</sup> ±0,89	45,46 <sup>Ab</sup> ±1,32	33,34 <sup>Bcd</sup> ±0,52
YF-L901	33,42 <sup>Bca</sup> ±3,33	42,53 <sup>Abb</sup> ±1,63	50,20 <sup>Aa</sup> ±0,35	50,76 <sup>Aa</sup> ±3,74	36,26 <sup>Bbc</sup> ±2,23	22,38 <sup>Ce</sup> ±0,57
BB,12	<b>14,25<sup>Dg</sup>±1,45</b>	22,92 <sup>CDfbc</sup> ±0,84	29,56 <sup>Bcd</sup> ±1,05	42,18 <sup>Abb</sup> ±2,30	43,55 <sup>Aabc</sup> ±1,19	37,05 <sup>Abc</sup> ±1,63
SM 199	34,33 <sup>Bca</sup> ±3,08	49,56 <sup>Ab</sup> ±2,39	41,14 <sup>Ababc</sup> ±0,96	32,20 <sup>BCbc</sup> ±1,30	34,66 <sup>BCbc</sup> ±1,94	30,80 <sup>Ccd</sup> ±0,27
Isolate 33	26,79 <sup>Bc</sup> ±0,93	32,02 <sup>Abcd</sup> ±1,86	41,76 <sup>Aabc</sup> ±2,17	29,94 <sup>Bbc</sup> ±2,87	34,08 <sup>Abbc</sup> ±1,84	28,87 <sup>Bd</sup> ±1,19
Isolate 43	29,54 <sup>BCb</sup> ±2,46	26,83 <sup>Ce</sup> ±0,74	47,53 <sup>Aab</sup> ±4,33	25,07 <sup>Cd</sup> ±1,70	38,74 <sup>Abbc</sup> ±1,92	30,84 <sup>BCcd</sup> ±0,72
Ticari probiyotik kültür	31,07 <sup>Bca</sup> ±1,13	<b>78,96<sup>Aa</sup>±1,54</b>	29,31 <sup>Ccd</sup> ±1,05	42,18 <sup>Bb</sup> ±2,30	34,21 <sup>BCbc</sup> ±0,41	39,64 <sup>BCc</sup> ±2,22
Vancomycin	22,04 <sup>Ad</sup> ±0,20	23,00 <sup>Af</sup> ±0,01	22,77 <sup>Ae</sup> ±0,59	22,71 <sup>Ad</sup> ±0,34	20,82 <sup>Ad</sup> ±0,70	20,34 <sup>Af</sup> ±0,20

\*Değerler, üç paralel ölçümün ortalama ± standart hatası olarak ifade edilmiştir. \*\* Aynı sütunda farklı büyük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır. Aynı satırda farklı küçük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır. Vankomisin (30 µg/disk): pozitif kontrol

İnhibisyon zonlarının 14,25-78,96 mm arasında değiştiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan bazı probiyotiklerin *C. difficile* üzerine oluşturdukları inhibisyon etkileri Şekil 22’de gösterilmiştir. Elde edilen en yüksek inhibisyon zonu ticari probiyotik kültürün *C. difficile* ATCC 700057 üzerinde gözlenmiştir. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938’in *C. difficile* ATCC 43593 üzerindeki inhibisyon zonu ve BB.12 nin *C. difficile*

ATCC 700057 üzerindeki inhibisyonu dışında elde edilen tüm inhibisyon zonları, pozitif kontrol olarak kullanılan vankomisin'in inhibisyon zonundan daha büyüktür.



Şekil 22. Probiyotik kültürlerin *C. difficile* üzerine inhibisyonu zonları

Kullanılan probiyotikler tekli ve çoklu kültürlerden oluşmaktadır. Elde edilen inhibisyon etkileri incelendiğinde yüksek inhibisyon etkisi sağlayan kültürlerin birlikte kullanımının *C. difficile* kültürleri üzerinde oluşturduğu inhibisyon etkileri incelenmiş ve Tablo 21’de gösterilmiştir.

Tablo 21

Karışım probiyotik kültürlerin *C. difficile* suşları üzerinde inhibisyon etkileri (mm)\*

Probiyotik	<i>C. difficile</i>	<i>C. difficile</i>	<i>C. difficile</i>	<i>C. difficile</i>
	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC
	43593	700057	1870	9689
<i>L. rhamnosus</i> GG + izolat 33	32,15 <sup>Ca</sup> ±1,91	36,51 <sup>Bb</sup> ±0,67	43,92 <sup>Ec</sup> ±1,69	35,55 <sup>Cb</sup> ±0,33
YFL+NBL	35,99 <sup>Eb</sup> ±0,03	36,31 <sup>Bb</sup> ±0,63	34,04 <sup>Ca</sup> ±1,19	36,29 <sup>Db</sup> ±1,11
YFL+33	26,57 <sup>Aa</sup> ±1,70	31,22 <sup>Ac</sup> ±0,36	28,49 <sup>Ab</sup> ±1,33	37,11 <sup>Dd</sup> ±0,52
SM 199+33	36,42 <sup>Ea</sup> ±0,40	39,70 <sup>Cb</sup> ±2,64	39,19 <sup>Db</sup> ±2,01	37,86 <sup>Db</sup> ±1,76
<i>L. rhamnosus</i> GG +43	30,78 <sup>Bb</sup> ±1,78	36,31 <sup>Bd</sup> ±0,81	28,89 <sup>Aa</sup> ±1,00	34,31 <sup>Ac</sup> ±1,55
LA5C+43	34,02 <sup>Da</sup> ±1,32	45,28 <sup>Dc</sup> ±1,21	41,83 <sup>Eb</sup> ±1,99	36,82 <sup>Da</sup> ±2,10
Ticari probiyotik kültür (NBL) + 43	30,65 <sup>Ba</sup> ±1,18	51,21 <sup>Ed</sup> ±0,98	40,59 <sup>Ec</sup> ±0,71	35,18 <sup>Cb</sup> ±1,14

\*Değerler, üç paralel ölçümün ortalama ± standart hatası olarak ifade edilmiştir. Aynı sütunda farklı büyük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır.

Karışım kültürlerin oluşturdukları inhibisyonu zonları, kültürlerin tek başına kullanımına ait zonlarla kıyaslandığında, sonuçlarda tekli kullanımlara göre farklılıklar oluşturmuştur. Kültürlerin karışım halinde kullanılmasında SM199+33'un *C. difficile* ATCC 43593 ve *C. difficile* ATCC 700057 suşlarına, *Lactobacillus rhamnosus* GG + izolat 33 karışımının *C. difficile* ATCC 700057'e, *L. rhamnosus* GG + izolat 43'ün *C. difficile* ATCC 43593 ve *C. difficile* ATCC 700057 ve *C. difficile* ATCC 9689'a, LA5-C+ izolat 43'ün ise *C. difficile* ATCC 43593'e karşı etkisinin tekli kullanımlarına kıyasla arttığı belirlenmiştir.

Ayrıca standart *C. difficile* kültürlerine karşı yüksek inhibisyonu belirlenen probiyotiklerden seçilerek, sütlerden izole ettiğimiz S25 ve S36 laboratuvar izolatlarına karşı inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Probiyotiklerin laboratuvar izolatlarına karşı inhibisyon etkileri Tablo 22'de gösterilmiştir.

Tablo 22

Probiyotiklerin laboratuvar izolatlarına karşı inhibisyon etkileri\*

Probiyotik	S25	S36
<i>L. rhamnosus</i> GG	36,19 <sup>E</sup> ±1,21	33,52 <sup>D</sup> ±1,65
<i>L. plantarum</i> ATCC 334	40,79 <sup>B</sup> ±1,29	31,98 <sup>C</sup> ±1,35
ABT-7	29,16 <sup>BC</sup> ±0,11	38,19 <sup>E</sup> ±1,75
SM 199	34,33 <sup>D</sup> ±1,38	49,28 <sup>F</sup> ±1,99
Ticari kültür	76,76 <sup>F</sup> ±1,39	31,59 <sup>C</sup> ±0,15
33	27,10 <sup>B</sup> ±2,53	27,77 <sup>B</sup> ±0,44
Vankomisin	21,52 <sup>A</sup> ±0,22	22,72 <sup>A</sup> ±0,17

\*Değerler, üç paralel ölçümün ortalama ± standart hatası olarak ifade edilmiştir. Aynı sütunda farklı büyük harfler ile ifade edilen değerler birbirinden farklıdır.

Laboratuvar kültürüne karşı probiyotiklerin etkileri incelendiğinde farklı probiyotiklerin inhibisyon etkilerinin suşa bağlı olarak değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek inhibisyon etkisinin ise S25 izolatına karşı ticari kültürün oluşturduğu inhibisyonu için belirlenmiştir. Laboratuvar izolatları standart *C. difficile* suşları ile karşılaştırılarak incelendiğinde inhibisyon değerlerinin standart kültürlerin kullanılan probiyotik kültürlerin inhibisyonlarının ortalamasından farklılaşmadığı gözlemlenmiştir ( $P>0,05$ ). Probiyotik kültürlerin *C. difficile*'nin standart ve laboratuvar izolatları üzerine etkisinin kullanılan kültüre bağlı olduğu görülmüştür.

Bu çalışmaya benzer bir yöntem ile probiyotik *Bacillus amyloliquefaciens* suşunun *C. difficile* üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmada elde edilen en yüksek inhibisyon değerinin 30 mm belirlendiği ifade edilmiştir (Islam vd., 2022). Benzer şekilde, Mansour vd., (2018), tarafından yapılan çalışmada, probiyotik kültür süpernatantlarının *C. difficile* üzerinde 27-35 mm'lik inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir. Monteiro vd., (2019) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise 4 farklı *Bifidobacterium* ve 8 farklı *Lactobacillus* suşunun bu çalışmada da yer alan *C. difficile* ATCC 9689 ve *C. perfringens* ATCC 12915 suşları üzerinde etkileri araştırılmıştır. Probiyotiklerin inhibisyon etkisinin kültür türüne bağlı olarak değiştiğini vurgulanmıştır. Araştırmacılar, *C. difficile* ve *C. perfringens* için 0-13 mm inhibisyon zonları elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar,



elde ettiğimiz sonuçlara göre her iki mikroorganizma içinde oldukça düşüktür. Literatürdeki bu çalışmalarla karşılaştırıldığında, SM 199, LA5-C, ve ABT-2 suşlarının tüm *C. difficile* suşları, *C. perfringens* ATCC 12915 ve *C. sporogenes* ATCC 11437 üzerinde daha fazla inhibisyona sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca kullanılan probiyotik karışımlarının *C. difficile* ATCC 9689.suşu üzerine oluşturdukları inhibisyon değerleri oldukça yüksek belirlenmiştir.

*Lactobacillus acidophilus* 'un tek (LA5-C) veya karışım kültürler içerisinde (ABT-2 ve ticari kültür) kullanıldığında tüm suşlara karşı son derece büyük inhibisyon zon çapları geliştirdiği gözlenmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları literatür sonuçları ile karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlarda gözlemlenen bu farklılıkların en önemli sebebinin, araştırmalarda farklı *C. difficile* suşlarının ve probiyotik suşların ve inhibisyon etkisinin araştırılmasında kullanılan farklılığından kaynaklanmış olması muhtemeldir. Probiyotiklerin suşa bağlı etki gösterdiklerini ifade eden bu hipotez, bu araştırmaya ait bulgular tarafından da desteklenmektedir. *Lactobacillus plantarum* ATCC 20219 ( $P=0,134$ ) dışında, kullanılan tüm probiyotiklerin inhibisyon zonları, hangi kültüre karşı kullanıldıklarına bağlı olarak değişiklik göstermiştir ( $P<0,05$ ). Ancak bu çalışmada yer alan *C. difficile* ATCC 9689 suşu üzerinde yine bu çalışmada kullanılan probiyotik *L. reutrei* DMS 17938 ve *L. rhamnosus* suşlarının inhibitör etkilerini araştıran bir çalışmada, bu çalışma ile aynı suşlar kullanılmasına rağmen sonuçlar oldukça farklı bulunmuştur (*L. reutrei* DMS 17938- 5 mm, *L. rhamnosus*-11mm) (Piatek vd., 2020). Bu kültürlerin *C. difficile* üzerinde oluşturduğu bölgeler 24,07 mm (*L. reutrei* DMS 17938) ve 26,95 mm (*L. rhamnosus*) olarak belirlenmiştir.

*Lactobacillus plantarum* (ATCC 20219, ATCC 334 ve SM-199) kültürlerinde her suşun oluşturduğu inhibisyon zonlarında farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Klinik çalışmalar, tedavide *L. plantarum* kullanımının CDI'nin önlenmesi ve tedavisi için önemli bir kültür olduğunu vurgulamaktadır (Dudzicz vd., 2018; Klarin vd., 2008). Özellikle antibiyotik ilişkili ishaller hastaların bağırsaklarında *L. plantarum* suşlarının eksikliği ile *C.*

*difficile* varlığı arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Sepp vd., 2011). Kullanılan diğer bir probiyotik kültür olan *Lactobacillus reuteri*, *C. difficile* enfeksiyonlarını önlemek için klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir probiyotiktir (Mills vd., 2018; Pal vd., 2022). Çalışmalar, *L. reuteri*'nin laktik asit, etanol ve reuterisin gibi bileşikler ürettiğini göstermektedir (Mills vd., 2018; Mu vd., 2018; Pal vd., 2022).

Literatürde probiyotiklerin *C. difficile* üzerine inhibisyon etkisinin suşa bağlı olarak farklılaşmasında, probiyotik suşlar tarafından üretilen farklı antimikrobiyal bileşiklerin farklılıklarının da etkili olabileceği ifade edilmektedir. Çalışmalar, probiyotikler tarafından üretilen çeşitli bileşiklerin, *C. difficile*'yi inhibe etmenin yanı sıra kültürün mikro ortamında değişikliklere neden olarak toksin üretimi ile ilgili sinyal yollarını değiştirebildiğini göstermektedir (Pal vd., 2022; Trejo vd., 2010).

Sonuç olarak standart *C. difficile*, laboratuvar izolatları, *C. sporogenes* ve *C. perfringens* üzerine probiyotik kültürlerin etkileri tekli veya karışım halinde kullanılmalarından bağımsız şekilde suşa bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

*C. difficile*'nin probiyotikler ile önlenmesine yönelik çalışmalar, ağırlıklı olarak antibiyotiklerin *C. difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde destekleyici olarak kullanılma olasılıklarının araştırılmasına odaklanmıştır (Goldstein vd., 2017; Hell vd., 2013; Johnson vd., 2012; Johnston vd., 2012; Na ve Kelly, 2011).

Bu çalışmada fermente gıdaların üretiminde direkt olarak kullanılan ticari kültürlerin ve direkt olarak fermente bir gıdadan izole edilen 33 ve 43 izolatların *C. difficile* ve diğer kullanılan suşlara karşı etkili olması gıdaların *C. difficile* enfeksiyonlarının önlenmesinde yardımcı olarak kullanılması açısından ümit vericidir. Bunu destekleyen bir çalışmada, probiyotik içeren gıdaların *C. difficile* enfeksiyonlarındaki etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 ve *Lactobacillus acidophilus* NCFM içeren bir probiyotik peynirin bağırsak mikrobiyotası ve dışkı bağırsaklık belirteçleri üzerindeki etkileri 31 yaşlı gönüllüde değerlendirilmiş ve bu peyniri

tüketen yaşlılarda daha düşük *Clostridium difficile* sayılarına yönelik bir eğilim belirlendiği ifade edilmiştir (Lahtinen vd., 2012).

#### 4.4.2. *C. difficile* Üzerine Standart, Ticari ve Laboratuvar Kültür Süpernatantının Mikrotitre Plakası (MTP) Analizi ile Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Kullanılan probiyotiklerin *C. difficile* üzerindeki inhibisyon etkilerini ve bu etkiye hangi tip bileşiklerin neden olduğunu araştırmak için asidik, nötralize ve nötralize + ısıtılmış işlem görmüş olmak üzere üç farklı hücresiz süpernatant (HİS) formu kullanılmıştır. *C. difficile* üzerindeki inhibitör etkileri araştırılan probiyotik suşlardan elde edilen hücresiz süpernatantların inhibisyon oranları Tablo 23’de gösterilmiştir.

Tablo 23

Probiyotik kültürlerine ait süpernatantların, *C. difficile* üzerine % inhibisyon etkileri

Probiyotik	Süpernatant	<i>C. difficile</i> ATCC 700057	<i>C. difficile</i> ATCC 43593	<i>C. difficile</i> ATCC 1870	<i>C. difficile</i> ATCC 9689	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	<i>C. perfringens</i> ATCC 12915
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	Normal Süpernatant (pH:4,19±0,01*)	98,5	99,1	98,0	95,1	99,41	97,1
	Nötralize**	47,8	72,8	43,2	TE	70,1	31,3
	Nötralize ** + ısıtılmış	11,9	20,3	41,5	TE	34,1	21,2
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Normal Süpernatant (pH:4,21±0,01)	99,5	99,6	99,6	99,5	95,1	97,3
	Nötralize	23,4	42,9	36,6	14,1	32,2	27,1
	Nötralize + ısıtılmış	17,6	30,2	11,6	TE	TE	TE
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 20219	Normal Süpernatant (pH:4,32±0,01*)	99,6	99,6	99,6	99,9	99,8	97,9
	Nötralize**	70,2	95,4	83,8	99,8	64,2	70,0
	Nötralize + ısıtılmış	TE	22,2	23,1	TE	28,9	33,6

Tablo 23'ün Devamı

Probiyotik	Süpernatant	<i>C. difficile</i> ATCC 70057	<i>C. difficile</i> ATCC 43593	<i>C. difficile</i> ATCC 1870	<i>C. difficile</i> ATCC 9689	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	<i>C. perfringens</i> ATCC 12915
<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B 1922	Normal Süpernatant (pH:4,72±0,01)	99,6	99,7	99,7	99,5	96,2	96,2
	Nötralize	29,9	69,1	46,1	43,4	54,9	72,1
	Nötralize + ısıtılmış	TE	TE	TE	TE	10,1	9,2
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 334	Normal Süpernatant (pH:3,95±0,03)	99,7	99,7	96,6	99,8	89,9	99,1
	Nötralize	68,0	89,2	78,3	44,7	54,1	61,6
	Nötralize + ısıtılmış	60,7	91,7	32,3	56,8	76,8	83,9
LA5-C	Normal Süpernatant (pH:5,34±0,07)	99,7	99,7	98,4	99,6	99,3	99,0
	Nötralize	ND	7,7	8,2	22,2	33,2	20,1
	Nötralize + ısıtılmış	TE	TE	TE	TE	TE	TE
BB,12	Normal Süpernatant (pH:4,93±0,01)	12,3	36,1	21,5	41,3	54,4	42,7
	Nötralize	10,5	24,0	14,9	23,1	21,2	16,1
	Nötralize + ısıtılmış	10,7	20,3	TE	TE	TE	TE
YF-L901	Normal Süpernatant (pH:4,60±0,01)	41,0	39,3	30,3	29,6	32,2	39,0
	Nötralize	ND	30,0	TE	5,1	TE	TE
	Nötralize + ısıtılmış	ND	28,2	TE	3,2	4,5	25,51
ABT-2	Normal Süpernatant (pH:5,05±0,01)	85,1	81,2	80,2	80,0	76,9	83,6
	Nötralize	TE	TE	TE	TE	TE	TE
	Nötralize + ısıtılmış	TE	TE	TE	TE	TE	TE
ABT-7	Normal Süpernatant (pH:4,83±0,02)	99,7	99,6	99,6	99,4	99,8	94,2
	Nötralize	21,7	29,5	37,6	32,0	45,3	39,0
	Nötralize + ısıtılmış	TE	TE	TE	TE	11,1	13,2

Tablo 23'ün Devamı

Probiyotik	Süpernatant	<i>C. difficile</i> ATCC 700057	<i>C. difficile</i> ATCC 43593	<i>C. difficile</i> ATCC 1870	<i>C. difficile</i> ATCC 9689	<i>C. sporogenes</i> ATCC 11437	<i>C. perfringens</i> ATCC 12915
SM 199	Asidik (pH:4,58±0,01)	97,1	96,9	96,0	96,7	98,5	94,2
	Nötralize	TE	81,7	TE	TE	TE	TE
	Nötralize + ısıtılmış	30,8	61,5	23,8	36,7	TE	TE
Ticari probiyotik kültür	Normal Süpernatant (pH:4,65±0,01)	98,5	98,7	98,8	98,5	97,6	98,4
	Nötralize	60,8	62,4	38,9	38,1	64,2	61,2
	Nötralize + ısıtılmış	10,5	33,2	16,4	TE	21,8	17,6
İzolat 33	Normal Süpernatant (pH:3,79±0,01)	99,1	99,7	99,0	99,0	99,2	99,2
	Nötralize	91,1	94,2	60,8	79,8	87,9	91,00
	Nötralize + ısıtılmış	87,3	82,0	88,9	84,2	75,2	71,10
İzolat 43	Normal Süpernatant (pH:4,34±0,02)	99,7	99,7	99,6	99,5	99,5	99,2
	Nötralize	23,0	68,6	56,9	TE	21,7	TE
	Nötralize + ısıtılmış	ND	24,3	22,4	TE	8,1	TE

\*Sonnular ortalama±standart hata Şeklinde üç paralel sonucun ortalaması Şeklinde verilmiştir. \*\*Nötralize pH 7, TE: % inhibisyon tespit edilemedi

Kullanılan tüm probiyotiklerin HİS'leri değişen oranlarda inhibisyon saęlamıŐtır. Normal süpernatantlara ait pH değerleri incelendiğinde pH 3,79-5,34 arasında değişmektedir. Probiyotiklerin HİS'lerinin doğrudan kullanımında en yüksek inhibisyon yüzdesi *Lactobacillus plantarum* ATCC 20219 suşunun *C. difficile* ATCC 9689 üzerindeki inhibisyonu olarak belirlenmiştir. HİS'lerin arasında BB.12'nin *C. difficile* ATCC 700057 üzerindeki inhibisyonu ise en düşük yüzde inhibisyon olarak belirlenmiştir. BB.12'nin HİS'lerine ait inhibisyon yüzdeleri diğer probiyotik kùltürlere ait asidik HİS'ler ile kıyaslandığında oldukça zayıf inhibisyon yüzleri oluŐturabildięi belirlenmiştir. BB.12'ye benzer Şekilde YF-L901 suşuna ait HİS'lerinde diğer probiyotik kùltürlerin HİS'lerine kıyasla daha düşük inhibisyon yüzdelere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Probiyotik

kültürlerin HİS pH oranları ile inhibisyon yüzdeleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir ( $P>0,05$ ).

Probiyotik kültürlerle ait HİS'ler nötralize edildiğinde, normal süpernatantlarına göre inhibisyon yüzdelerinin değişen oranlarda düştüğü gözlenmiştir. Ancak, ABT-2 probiyotik kültürünün denediğimiz hiçbir kültüre karşı nötralize süpernatantlarının inhibisyon etkisi belirlenmemiştir. Benzer şekilde SM-199'un *C. difficile* ATCC 43593 suşu dışında analizde kullandığımız hiçbir kültürlere karşı inhibisyon etkisi belirlenmemiştir. Buna karşılık *Lactobacillus plantarum* ATCC 20219 suşunun nötralize edilmiş hücresiz süpernatantlarının, tüm suşlara karşı yüksek inhibisyon yüzdelerine sahip olduğu belirlenmiştir. Laboratuvar izolatımız olan izolat 33'ün ise nötralize edilmiş HİS'lerinin en düşük inhibisyon yüzdesi *C. difficile* ATCC 1870 üzerine (%60,8) olarak belirlenmiştir. Diğer kültürlere karşı inhibisyon yüzdeleri ise aynı kültürün asidik HİS'lerine oldukça yakın belirlenmiştir.

Nötralize edilmiş ve ısıtılmış HİS'lerin genel olarak asidik ve nötralize edilmiş süpernatantlara kıyasla oldukça düşük inhibisyon yüzdelerine olduğu belirlenmiştir. Ancak *Lactobacillus plantarum* ATCC 334 suşu bu yönüyle diğer probiyotik kültürlerden ayrılmıştır. Bu kültürün en düşük inhibisyon yüzdesi *C. difficile* ATCC 1870'e karşı oluşturduğu %32,3'lik inhibisyon değeri olarak belirlenmiştir. Diğer tüm *C. difficile* suşlarına karşı bu probiyotik kültürün HİS'lerinin %60,7 ile %91,7n arasında inhibisyon oranları verdiği tespit edilmiştir. ABT-2'nin asidik HİS'i dışında herhangi bir kültüre karşı hiçbir inhibitör etki belirlenmemiştir. *Lactobacillus casei* NRRL B 1992 ve ABT-7 suşlarının nötralize ve ısıtılmış süpernatantları *C. difficile* suşları üzerinde etkili bulunmazken, *C. sporogenes* ve *C. perfringens* üzerinde belirli oranlarda inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Ek olarak, laboratuvar izolatımız 33'ten elde edilen tüm hücresiz süpernatantların, tüm suşlara karşı yüksek bir inhibisyon yüzdesi verdiği bulunmuştur. Bu izolat ve izolat 43 daha önceki çalışmalarımızda manda peynirinden laboratuvarımızda izole edilen ve probiyotik özellikleri tespit edilmiştir. *Lactobacillus spp.* olarak tanımlanan izolatlarımızdır (Taylan, 2017).

Sonuç olarak farklı probiyotik suşların inhibitör etkileri suşa bağlı olarak değişse de inhibisyon etkisinin kaynağının esas olarak probiyotik suşların süpernatantlarının işlenmesine bağlı olarak değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Süpernatantın nötralize edilmesinin o suşun asidik süpernatantına kıyasla, tüm probiyotik suşlar için azalan inhibisyon yüzdeleri gösterdiği gözlemlenmiştir. Literatürde yer alan pek çok çalışma, probiyotiklerin *C. difficile*'ye karşı inhibitör etkisinin bu probiyotiklerin ürettiği asidik bileşiklerden kaynaklandığını belirtmektedir (Kondepudi vd., 2012; Lee vd., 2013; Servin, 2004).

Schoster vd., (2013) çeşitli laktik asit bakterilerinden elde edilen süpernatantları *C. difficile* in-vitro üzerinde test etmişler ve bu çalışmaya benzer şekilde inhibitör etkinin pH'ya bağlı organik asitlerden kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Benzer şekilde kullanılan ticari probiyotik kültürlerin inhibitör etkilerinin pH'a bağlı olduğu bildirilmiştir (Fredua-Agyeman vd., 2017). Yine başka bir çalışma, benzer şekilde asidik süpernatantların, *C. difficile* büyüme yüzdelerini azaltmada nötrleştirilmiş süpernatantlardan daha yüksek etkili olduğunu ifade etmektedir (Mansour vd., 2018). Ancak literatürde yer alan bu çalışmaların ve elde edilen sonuçların aksine Ratsep vd., (2014) çalışmasında kullandığı *L. plantarum* suşlarının *C. difficile* üzerine inhibitör etkilerinin pH'ya bağlı olmadığını belirtmektedirler.

Elde ettiğimiz sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde çalışmada kullanılan probiyotiklerin *C. difficile* üzerindeki inhibisyon etkisinin temel nedeninin, bu kültürlerin ürettiği asidik bileşikler olduğu belirlenmiştir. Özellikle laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik ve asetik asitlerin buldukları ortamda oluşturdukları asidik pH nedeniyle antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları bildirilmektedir (Mani-López vd., 2022). Bununla birlikte, pH etkisi ortadan kaldırıldığında ve süpernatantlar nötralize edildiğinde bile, süpernatantların *C. difficile* üzerindeki bireysel etkileri, probiyotik kültürlerde bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri bileşiklerin varlığının bir göstergesi olarak ifade edilmektedir (Fredua-Agyeman vd., 2017; Ratsep vd., 2014). Nötralize HİS'lere ait bu etkinin temel kaynağının genellikle laktik asit bakterilerinin ürettiği bu bileşiklerin miktarına, kullanılan karbon kaynağına, elektron alıcısına, aerobik veya anaerobik büyüme gibi kültür koşullarındaki değişikliklere bağlı olarak değişebileceği belirtilmektedir (Mani-López vd., 2022).

Bu çalışmaya benzer şekilde birçok çalışma, probiyotiklerin *C. difficile* üzerindeki inhibitör etkilerinin sadece organik asitlere bağlı olmadığını, organik asitlerle birlikte bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri bileşiklere ve sıcaklığa dayanıklı antimikrobiyal peptitler/proteinlerin varlığının da antimikrobiyal etki üzerinde belirleyici olabileceğini ortaya koymaktadır (Kondepudi vd., 2012; Schoster vd., 2013; Fredua-Agyeman vd., 2017). Çalışımızda elde edilen sonuçlar da bu teoriyi destekler niteliktedir.

#### **4.5. Araştırma 5 *C. difficile*'nin Peynir Yapımında Gelişen Asitlik ve Probiyotik Kültür Kullanımı ile İnaktivasyonunun Belirlenmesi**

Beyaz peynir, çiğ inek sütü, çiğ koyun sütü veya her ikisinin karışımından üretilen ve salamurada olgunlaştırılan yumuşak veya yarı sert bir peynirdir (Öner vd., 2006; Özcan Yardım ve Durak, 2023). Türk beyaz peyniri taze iken yumuşak bir dokuya sahip olmasına rağmen salamurada (%12-%14) 3 ay olgunlaştırıldıktan sonra yarı sert veya yarı yumuşak olarak sınıflandırılabilir (Aktaş vd., 2023). Ülkemizde beyaz peynir, genellikle küçük işletmelerde çiğ süttten üretilmektedir ve starter kültürü eklenmemektedir. Peynirin mikrobiyal bileşimi olgunlaşma sırasında değişmektedir. Laktik asit bakterilerinin, olgunlaşma sırasında diğer mikrobiyal gruplara baskın halde olmasının olgunlaşma özelliklerinin belirlenmesinde büyük önem taşıdığı ifade edilmiştir (Öner vd., 2006).

Probiyotik pek çok kültür laktik asit bakterileri (LAB) içerisinde yer almaktadır (Coimbra-Gomes vd., 2023; Mugwanda vd., 2023). LAB ise özellikle peynir gibi fermente gıdaların üretiminde starter kültür olarak kullanılabilir ve fermente gıdaların organoleptik, reolojik ve besinsel özelliklerinin oluşmasında büyük rol oynadıkları ifade edilmektedir (Öründü ve Tarakçı, 2021; Abarquero vd., 2023). Bu nedenle de büyük ekonomik öneme sahiptirler. Ancak peynir üretiminde starter olarak kullanılan bu suşların bir diğer önemli özelliği, patojenlere karşı oluşturdukları antimikrobiyal aktivitelerdir (Abarquero vd., 2023; Aktaş vd., 2023).

Peynir üretiminde starter olarak kullanılacak probiyotiklerin seçiminin üretimi yapılacak peynirin türüne göre belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (Hedef vd., 2022;



Karimi vd., 2012b). Bu amaçla yapılan ön denemeler ile *C. difficile* üzerine inhibisyon etkileri belirlenen kültürler yine ön denemeler ile küçük miktarlar ile peynir üretiminde kullanılarak uygun tekstürü oluşturabilen iki kültür karışımı (NBL ticari kültür ve izolat 33, YF-L901 ve izolat 43) peynir üretiminde kullanılmak üzere seçilmiştir.

Probiyotik kültürlerin antimikrobiyal özelliklerinin *C. difficile* (CD) üzerine inhibisyon etkilerini inceleyebilmek amacı ile seçilen bu iki probiyotik kültür karışımı kullanılarak ve peynir mayası ile *C. difficile* varlığında peynir üretimleri gerçekleştirilmiştir. Probiyotik kültürler ve peynir mayası ile yapılan peynir üretimlerinin ayrıca *C. difficile* içermeyecek şekilde kontrol gruplarının üretimleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca negatif kontrol olarak starter kültür kullanımı olmadan yalnızca peynir mayası ile üretim yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak ise *C. difficile* ile birlikte peynir mayası kullanılarak üretim yapılmıştır. *C. difficile* içermeyen peynirlerde fizikokimyasal ve mikrobiyolojik analizler ile üretimden depolama sonuna kadar incelenmiştir.

#### **4.5.1. Peynirlerin Fizikokimyasal Özellikleri**

*C. difficile* inoküle edilmeden üretilen kontrol peynirlerinin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde pH, kuru madde, tuz ve titrasyon asitliği özellikleri değerlendirilmiştir.

#### **pH**

Üretim aşamalarında çiğ süttten, tuzlama aşamasına kadar peynirlerin pH değerleri Tablo 24’de gösterildiği gibidir. Depolama süresince peynirlere ait pH değerleri ise Tablo 25’de gösterildiği gibidir.

Tablo 24

Peynirlerin üretim aşamalarına ait pH değerleri

Peynir örneği	Çiğ süt	Pastörizasyon sonrası	Mayalama	Fermantasyon	Tuzlama
1	6,59 <sup>Aa</sup> ±0,01	6,54 <sup>Aa</sup> ±0,01	5,77 <sup>Ba</sup> ±0,02	5,31 <sup>Ca</sup> ±0,10	4,95 <sup>Da</sup> ±0,03
2	6,55 <sup>Ab</sup> ±0,06	6,47 <sup>ABa</sup> ±0,03	5,70 <sup>Ca</sup> ±0,00	4,93 <sup>Dab</sup> ±0,02	4,66 <sup>Ea</sup> ±0,02
3	6,53 <sup>Ab</sup> ±0,02	6,48 <sup>ABa</sup> ±0,03	5,72 <sup>Ca</sup> ±0,14	5,00 <sup>Dab</sup> ±0,02	4,66 <sup>Ea</sup> ±0,03
4	6,58 <sup>Ac</sup> ±0,01	6,60 <sup>Aa</sup> ±0,02	5,43 <sup>Ba</sup> ±1,29	5,01 <sup>Cab</sup> ±0,00	4,61 <sup>Da</sup> ±0,01
5	6,61 <sup>Aa</sup> ±0,01	6,48 <sup>Aa</sup> ±0,00	5,43 <sup>Ba</sup> ±0,00	4,95 <sup>Cb</sup> ±0,04	4,79 <sup>Da</sup> ±0,17
6	6,48 <sup>Ad</sup> ±0,16	6,34 <sup>ABa</sup> ±0,05	5,48 <sup>Ba</sup> ±0,01	5,21 <sup>Cab</sup> ±0,01	4,65 <sup>Da</sup> ±0,00

1: Kontrol grubu (negatif kontrol, yalnızca peynir mayası), 2: Peynir mayası + NBL + izolat 43, 3: Peynir mayası+YF-L901 + 33, 4: Peynir mayası + NBL + izolat 43 + CD, 5: Peynir mayası+YF-L901 + izolat 33 + CD, 6: Pozitif kontrol (Peynir mayası + CD), Aynı sütun ve satır üzerinde farklı harfler ile temsil edilen değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $P<0,05$ ). Harflendirmeler yatayda büyük harfler, dikeyde küçük harfler kullanılarak yapılmıştır.

Peynir üretiminde kullanılan çiğ sütlerin pH değerleri incelendiğinde pH değerleri arasında istatistiksel olarak farklılık belirlenmiştir. Çiğ sütlerin pH değerlerindeki bu farklılığın sebebi sütlerin peynir üretimleri için farklı günlerde temin edilmiş olması olabilir. Örneklerin her birinin mayalama aşamasının sonuna kadar pH değerlerinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Mayalama ve fermantasyon aşamalarında oluşan pH farklılıkları ise üretimde kullanılan starter kültürlerin ve oluşturdukları bileşiklerin pH değerlerinin ve bu bileşiklerin miktarlarındaki değişikliklerden kaynaklanıyor olabilir. Üretilen peynirler tuzlama aşamasının sonuna geldiğinde ise pH değerleri tüm örneklerde benzer değerlerde belirlenmiştir.

Tablo 25

Depolama süresi boyunca peynir örneklerinin pH değişimleri

Peynir örneği	0.gün	30. gün	60. gün	90. gün
1	4,57 <sup>Aa</sup> ±0,05	4,58 <sup>Aa</sup> ±0,01	4,57 <sup>Aa</sup> ±0,05	4,55 <sup>Aa</sup> ±0,02
2	4,66 <sup>Aa</sup> ±0,00	4,52 <sup>ABa</sup> ±0,01	4,49 <sup>Ba</sup> ±0,01	4,43 <sup>Ba</sup> ±0,05
3	4,57 <sup>Aa</sup> ±0,05	4,58 <sup>Aa</sup> ±0,06	4,50 <sup>Aa</sup> ±0,04	4,42 <sup>Aa</sup> ±0,02
4	4,54 <sup>Aa</sup> ±0,05	4,47 <sup>Aa</sup> ±0,10	4,44 <sup>Aa</sup> ±0,08	4,39 <sup>Ab</sup> ±0,01
5	4,64 <sup>Aa</sup> ±0,12	4,60 <sup>Aa</sup> ±0,02	4,45 <sup>Aa</sup> ±0,06	4,50 <sup>Aab</sup> ±0,01
6	4,63 <sup>Aa</sup> ±0,01	4,57 <sup>Aa</sup> ±0,02	4,51 <sup>Ba</sup> ±0,01	4,50 <sup>Bab</sup> ±0,02

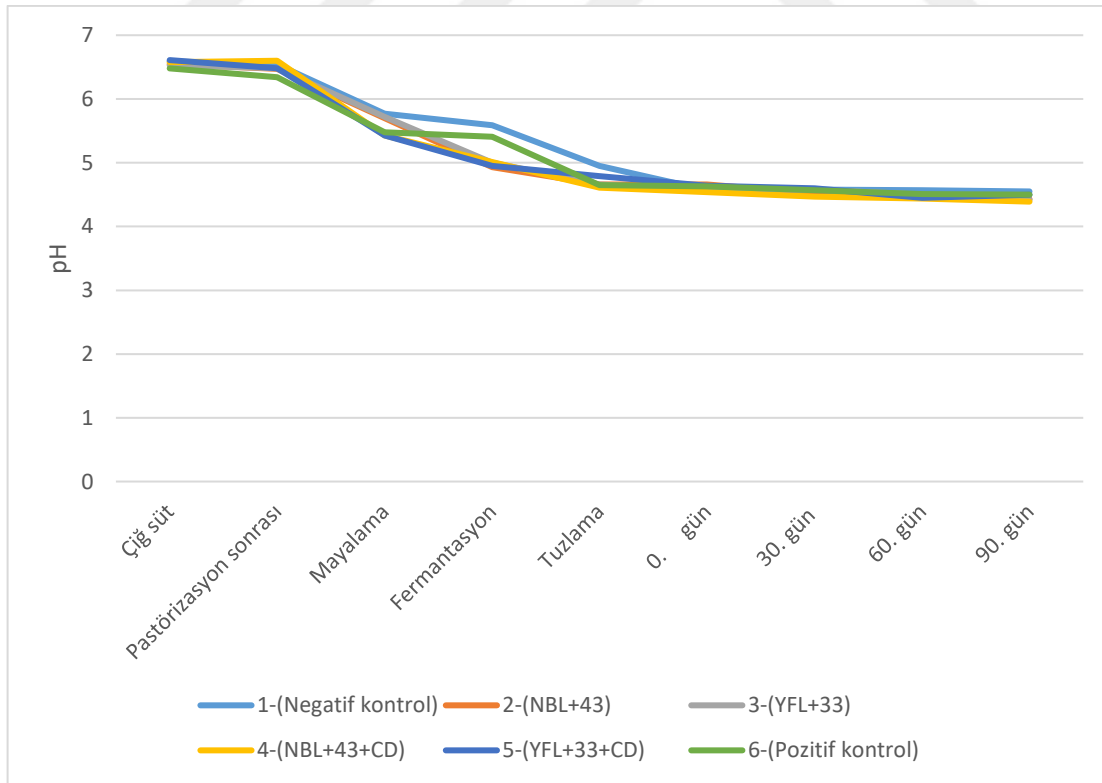
**1:** Kontrol grubu (negatif kontrol, yalnızca peynir mayası), **2:** Peynir mayası + NBL + izolat 43, **3:** Peynir mayası+YF-L901 + 33, **4:** Peynir mayası + NBL + izolat 43 + CD, **5:** Peynir mayası+YF-L901 + izolat 33 + CD, **6:** Pozitif kontrol (Peynir mayası + CD), Aynı sütun ve satır üzerinde farklı harfler ile temsil edilen değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $P<0,05$ ). Harflendirmeler yatayda büyük harfler, dikeyde küçük harfler kullanılarak yapılmıştır.

Depolama süresince peynirlerin pH değerleri incelendiğinde depolamanın 0. gününde peynirlerin pH değerleri arasında farklılık belirlenmemiştir ( $P>0,05$ ). Depolama süresinin farklı günlerinde pH değerleri birbirinden farklılık göstermiş olsa da depolama sonunda 90. günde örneklerin pH değerleri arasında istatistiksel olarak farklılık belirlenmemiştir.

Bu çalışmaya benzer şekilde Gonzalez ve Zarate, (2015) tarafından yapılan çalışmada, peynir olgunlaşması sırasında *Clostridium sporogenes*'in kontrolünde starter kültüre (*Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) ek *Lactobacillus plantarum* TF711'in etkisini incelenmiştir. Üretilen peynirleri 45 gün boyunca 12°C'de vakum paketlerde olgunlaştırmışlardır. Araştırmacılar, olgunlaşma süresinin sonunda *Lactobacillus plantarum* kullanılarak üretilen peynirleri kontrol grubu ile kıyaslandığında pH değerlerinde farklılık belirlememiştir. Ávila vd., (2016) tarafından yapılan bir başka çalışmada yarı sert peynir üretiminde starter kültür olarak *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ve *Streptococcus thermophilus* *Lactococcus*

*lactis* subsp. *lactis* kullanılmıştır. *Clostridium tyrobutyricum* sporları üzerine yüksek basınç uygulaması ile birlikte starter kültürün inhibisyon etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar yalnızca starter kültür ve *Clostridium tyrobutyricum* sporları kullanılarak üretilen kontrol grubu peynirlerin üretim süresince pH değerlerinin düştüğünü ancak uygulanan yüksek basıncın bu değerleri değiştirmedığını ifade etmiştir.

Şaşmazer, (2022) tarafından yapılan çalışmada ise peynir mayasına ilave starter probiyotik kültür (*Lactococcus cremoris*, *Bifidobacterium bifidum* BB-12, *Lactococcus lactis* ve *Lactobacillus acidophilus* LA-5,) kullanımı ile beyaz peynir üretilmiştir. Araştırmacılar, 90 günlük olgunlaştırma süresinin sonunda pH değerlerinin probiyotik kültür ilave edilmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında benzer bulunduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar benzer şekilde peynir üretiminde kullanılan çiğ sütlerin pH değerinin 6,71, depolama süresi sonunda kontrol peynirlerinde pH değerinin ise 4,50 ve probiyotik peynir örneklerinde ise pH 4,55 olarak bildirilmiştir.



Şekil 23. Peynir örneklerinin çiğ süttten depolamanın son günü kadar pH değerleri

Starter kültürlerin pH değerlerindeki en hızlı düşüş mayalanma ve fermantasyon aşamalarında olmuştur (Şekil 23). Depolama boyunca peynirlerdeki pH giderek asidik olsa da pH'nın düşüş hızının yavaşladığı belirlenmiştir. pH, peynirin yapısını etkileyen önemli fizikokimyasal özelliklerden biridir. Ayrıca peynir içerisine eklenen ya da var olan probiyotik bakterilerin varlığını koruması için büyük önem taşımaktadır. *L. acidophilus*'un büyümesi için optimum pH'nın 5,5–6,0 olması beklenmektedir. Ancak *L. acidophilus*'un pH 2'ye bile adapte olarak canlılığını koruyabildiği ifade edilmektedir (Kulkarni vd., 2018). Bifidobakteriler ise, *L. acidophilus* kadar aside toleranslı değildir ve genel olarak pH 4,0'ın altında gelişimlerinin durduğu ifade edilmektedir. Çoğu bifidobakter türü 4,6'nın altındaki pH değerlerine duyarlı olduğundan, pratik uygulamalarda nihai ürünün pH değeri 4,6'nın üzerinde tutulması gerektiği aksi takdirde, bifidobakteriyel popülasyonun hızla azalacağı vurgulanmaktadır (Karimi vd., 2011). Kullanılan starter kültürler göz önüne alındığında içeriğinde içerisinde hem *Lactobacillus acidophilus* hem de *Bifidobacterium* türleri içeren NBL ticari kültürü bulunmaktadır. Üretim süreçleri incelendiğinde pH değerlerinin tüm peynir örnekleri için en düşük seviyesi 90. gün depolama da belirlenmiştir. pH değerlerinin en düşük seviyesi bile peynirler içerisinde gelişimi için uygun olarak değerlendirilebilmektedir.

### **Kuru Madde**

Peynir üretiminde kullanılan çiğ süt ve peynir üretimindeki aşamalarda belirlenen kuru madde miktarları (%) Tablo 26'da gösterilmiştir. Peynirlerin üretim sonrası depolanması sırasındaki kuru madde içerikleri (%) Tablo 27'de gösterildiği gibidir.

Tablo 26

Peynir üretim sürecinde kullanılan çiğ süttten itibaren tuzlama aşamasının sonuna kadar kuru madde içerikleri (%)

Peynir örneği	Çiğ süt	Pastörizasyon sonrası	Mayalama	Fermantasyon	Tuzlama
1	10,92 <sup>Aa</sup> ±0,73	10,53 <sup>Aa</sup> ±0,09	13,83 <sup>Ba</sup> ±0,26	46,24 <sup>Ca</sup> ±0,00	46,47 <sup>Ca</sup> ±0,43
2	10,84 <sup>Aa</sup> ±0,44	11,13 <sup>Aa</sup> ±0,43	13,94 <sup>Ba</sup> ±0,16	46,31 <sup>Ca</sup> ±0,02	47,50 <sup>Ca</sup> ±0,27
3	10,77 <sup>Aa</sup> ±0,04	10,85 <sup>Aa</sup> ±0,84	14,52 <sup>Bb</sup> ±0,36	46,40 <sup>Ca</sup> ±0,33	46,46 <sup>Ca</sup> ±1,00
4	10,39 <sup>Aa</sup> ±0,04	10,58 <sup>Aa</sup> ±0,37	14,96 <sup>Bb</sup> ±0,07	46,99 <sup>Ca</sup> ±0,00	45,86 <sup>Ca</sup> ±1,00
5	11,17 <sup>Aa</sup> ±0,29	10,63 <sup>Aa</sup> ±0,10	14,95 <sup>Bb</sup> ±0,02	46,47 <sup>Ca</sup> ±0,71	45,93 <sup>Ca</sup> ±0,23
6	9,81 <sup>Aa</sup> ±0,14	10,47 <sup>Aa</sup> ±0,36	13,61 <sup>Ba</sup> ±0,15	46,17 <sup>Ca</sup> ±0,49	46,66 <sup>Ca</sup> ±0,32

**1:** Kontrol grubu (negatif kontrol, yalnızca peynir mayası), **2:** Peynir mayası + NBL + izolat 43, **3:** Peynir mayası+YF-L901 + 33, **4:** Peynir mayası + NBL + izolat 43 + CD, **5:** Peynir mayası+YF-L901 + izolat 33 + CD, **6:** Pozitif kontrol (Peynir mayası + CD), Aynı sütun ve satır üzerinde farklı harfler ile temsil edilen değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $P<0,05$ ). Harflendirmeler yatayda büyük harfler, dikeyde küçük harfler kullanılarak yapılmıştır.

Peynir üretiminde kullanılan sütlerin kuru maddeleri ortalama olarak %10,65 olarak belirlenmiştir. Peynir üretimi aşamalarından fermantasyon aşamalarında ise örneklerin kuru madde içerikleri hızla %46,43 değerine ulaşmıştır. Üretim aşamalarında kuru madde miktarları incelendiğinde üretimin tüm aşamalarında örnekler arası farklılık belirlenememiştir. Her bir peynir örneği için ise kuru madde miktarlarının mayalama aşamasında farklılaşmaya başladığı ve fermantasyon sonrasında ise peynirlerin kuru madde miktarlarında önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

Tablo 27

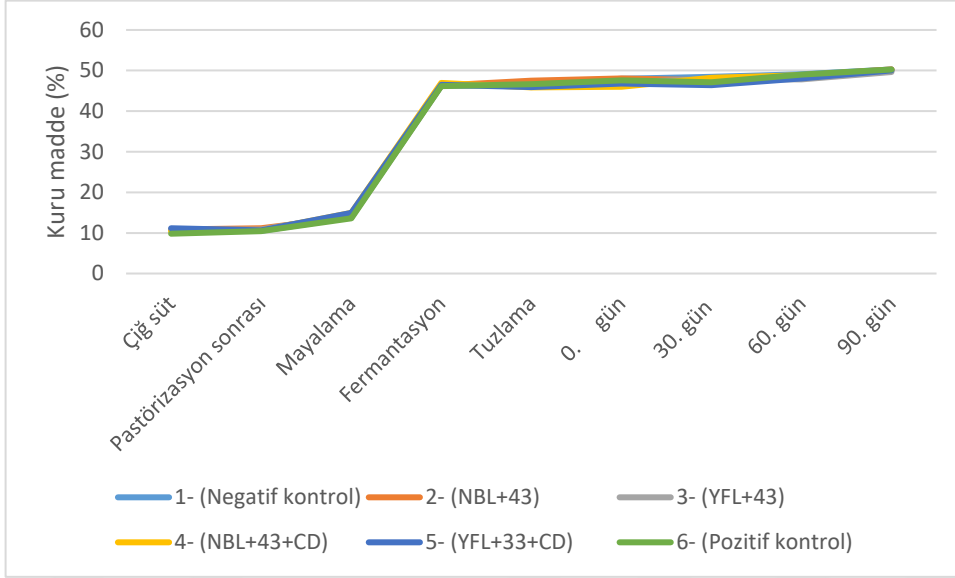
Depolama süresince peynirlerin kuru madde içerikleri (%)

Peynir örneği	0.gün	30. gün	60. gün	90. gün
1	48,01 <sup>Aa</sup> ±0,29	48,42 <sup>Aa</sup> ±0,34	49,05 <sup>ABa</sup> ±0,07	50,26 <sup>Ba</sup> ±0,22
2	48,02 <sup>Aa</sup> ±0,86	48,61 <sup>Aa</sup> ±0,17	48,76 <sup>Aa</sup> ±0,01	50,28 <sup>Aa</sup> ±0,92
3	47,13 <sup>Aa</sup> ±0,87	47,92 <sup>Aa</sup> ±0,43	47,85 <sup>Aa</sup> ±0,34	49,64 <sup>Aa</sup> ±0,14
4	46,00 <sup>Aa</sup> ±1,78	48,21 <sup>Aa</sup> ±0,93	48,86 <sup>Aa</sup> ±0,01	50,09 <sup>Aa</sup> ±0,05
5	46,78 <sup>Aa</sup> ±0,75	46,40 <sup>Aa</sup> ±0,58	48,06 <sup>Aa</sup> ±0,92	50,03 <sup>Aa</sup> ±0,89
6	47,62 <sup>Aa</sup> ±0,05	47,10 <sup>Aa</sup> ±1,02	49,03 <sup>Aa</sup> ±0,06	50,26 <sup>Aa</sup> ±0,05

**1:** Kontrol grubu (negatif kontrol, yalnızca peynir mayası), **2:** Peynir mayası + NBL + izolat 43, **3:** Peynir mayası+YF-L901 + 33, **4:** Peynir mayası + NBL + izolat 43 + CD, **5:** Peynir mayası+YF-L901 + izolat 33 + CD, **6:** Pozitif kontrol (Peynir mayası + CD), Aynı sütun ve satır üzerinde farklı harfler ile temsil edilen değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $P<0,05$ ). Harflendirmeler yatayda büyük harfler, dikeyde küçük harfler kullanılarak yapılmıştır.

Peynir örneklerinin toplam kuru madde miktarında depolama boyunca her bir örnek için yaklaşık %2 oranında bir artış gözlemlenmiştir. Örnekler her bir depolama günü için birbirleri ile karşılaştırıldıklarında kuru madde içerikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenememiştir( $P>0,05$ ).

Peynir üretiminde kullanılan çiğ süttten peynirlerin depolanmasının son gününe kadar geçen süreçte % kuru madde oranları Şekil 24'te gösterilmiştir.



Şekil 24. Peynir örneklerinin çiğ süttten depolamanın son günü kadar kuru madde değerleri

Şaşmazer, (2022) tarafından benzer üretim tekniği ile *Lactobacillus acidophilus* LA-5 ile *Bifidobacterium bifidum* BB-12, *Lactococcus lactis* + *Lactococcus cremoris* kültürleri kullanılarak üretilen probiyotik peynirlere ait kuru madde (%) miktarları incelenmiş ve 30. günde %35,90 60.günde %35,91 90.günde ise maksimum %36,01 seviyesine ulaşıldığı belirtilmiştir. Ayrıca çalışmada peynir üretiminde kullanılan çiğ sütlerin kuru maddesi ortalama olarak %12,10 olarak belirtilmiştir. Çalışmamızda kullanılan sütlerin kuru madde oranları yapılan bu çalışma ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak % 2 daha az belirlenmiştir. Ancak depolama süresinin sonunda bu çalışmada elde edilen kuru madde miktarlarının Şaşmazer (2022) tarafından yapılan çalışmada elde edilen kurumadde oranlarından oldukça yüksek bulunmuştur. Çalışmalar arasındaki bu farklılığın olası temel sebebinin kullanılan kültürlerin farklılığı olduğu düşünülebilir.

### **Peynirlerde Tuz**

Peynir üretim sürecinde kullanılan çiğ süttten itibaren tuzlama aşamasının sonuna kadar tuz içerikleri (%) Tablo 28’de gösterilmiştir. Ayrıca peynirlerin depolama süreleri boyunca tuz içerikleri Tablo 29’da gösterilmiştir.



Tablo 28

Peynir üretim sürecinde kullanılan çiğ süttten itibaren tuzlama aşamasının sonuna kadar toplam tuz içerikleri (%)

Peynir örneği	Çiğ süt	Pastörizasyon sonrası	Mayalama	Fermantasyon	Tuzlama
1	TE	TE	TE	TE	2,68 <sup>ab</sup> ±0,12
2	TE	TE	TE	TE	2,56 <sup>a</sup> ±0,09
3	TE	TE	TE	TE	2,97 <sup>ab</sup> ±0,03
4	TE	TE	TE	TE	2,99 <sup>ab</sup> ±0,03
5	TE	TE	TE	TE	3,03 <sup>b</sup> ±0,09
6	TE	TE	TE	TE	2,95 <sup>ab</sup> ±0,06

**1:** Kontrol grubu (negatif kontrol, yalnızca peynir mayası), **2:** Peynir mayası + NBL + izolat 43, **3:** Peynir mayası+YF-L901 + 33, **4:** Peynir mayası + NBL + izolat 43 + CD, **5:** Peynir mayası+YF-L901 + izolat 33 + CD, **6:** Pozitif kontrol (Peynir mayası + CD), TE: test edilmedi, Aynı sütun üzerinde farklı harfler ile temsil edilen değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $P<0,05$ ).

Peynirlerin tuzlama aşamasının sonunda örneklerin genel olarak birbirine benzer tuz içeriklerine sahip olduğu ancak 5 numaralı peynirin diğerlerinden farklılaştığı belirlenmiştir. Tuzlama aşamasında peynirlerdeki tuz içeriği ortalama %2,86 olarak belirlenmiştir. Bu aşamadaki en yüksek tuz içeriği ise %3,03 tuz içeren ve starter kültür (YF-L901 + izolat 33)'e ek *C. difficile* inoküle edilerek üretilmiş peynirde belirlenmiştir.

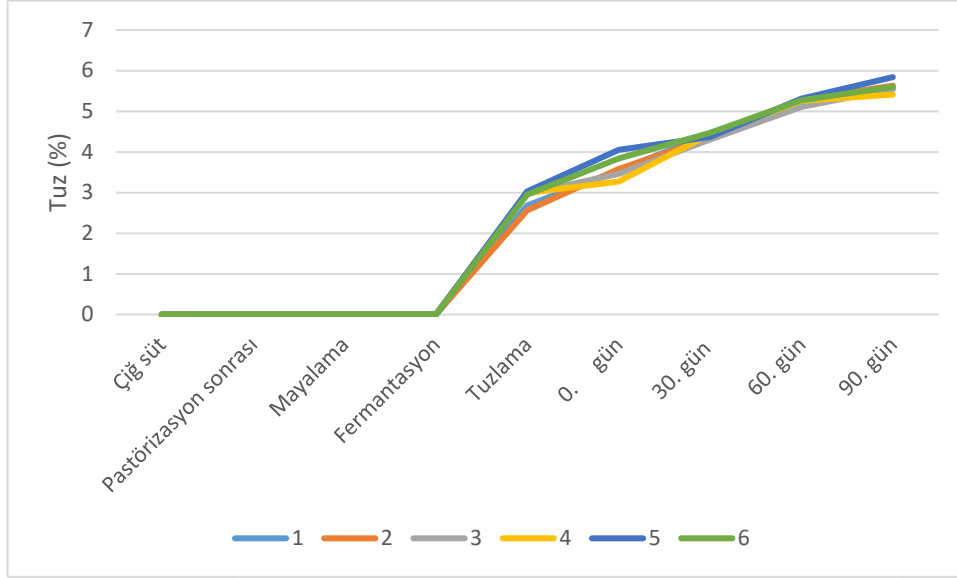
Tablo 29

Depolama süresi boyunca peynir örneklerinde % toplam tuz miktarı

Peynir örneği	0.gün	30. gün	60. gün	90. gün
1	3,55 <sup>Aab</sup> ±0,07*	4,43 <sup>Ba</sup> ±0,19	5,22 <sup>Ca</sup> ±0,01	5,55 <sup>Ca</sup> ±0,03
2	3,58 <sup>Aab</sup> ±0,13	4,34 <sup>Ba</sup> ±0,02	5,29 <sup>Ca</sup> ±0,02	5,63 <sup>Ca</sup> ±0,14
3	3,46 <sup>Aab</sup> ±0,02	4,35 <sup>Ba</sup> ±0,11	5,11 <sup>Ca</sup> ±0,04	5,55 <sup>Da</sup> ±0,01
4	3,27 <sup>Ab</sup> ±0,14	4,44 <sup>ABa</sup> ±0,06	5,26 <sup>Ba</sup> ±0,37	5,41 <sup>Ba</sup> ±0,28
5	4,05 <sup>Aa</sup> ±0,15	4,37 <sup>Aa</sup> ±0,00	5,31 <sup>Ba</sup> ±0,07	5,84 <sup>Ca</sup> ±0,05
6	3,84 <sup>Aab</sup> ±0,06	4,47 <sup>Ba</sup> ±0,03	5,27 <sup>Ca</sup> ±0,04	5,60 <sup>Da</sup> ±0,02

**1:** Kontrol grubu (negatif kontrol, yalnızca peynir mayası), **2:** Peynir mayası + NBL + izolat 43, **3:** Peynir mayası+YF-L901 + 33, **4:** Peynir mayası + NBL + izolat 43 + CD, **5:** Peynir mayası+YF-L901 + izolat 33 + CD, **6:** Pozitif kontrol (Peynir mayası + CD), Aynı sütun ve satır üzerinde farklı harfler ile temsil edilen değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $P<0,05$ ). Harflendirmeler yatayda büyük harfler, dikeyde küçük harfler kullanılarak yapılmıştır.

Örneklerin depolanmasının ilk gününden 90. güne kadar depolama süresi arttıkça tuz miktarının arttığı ( $P<0,05$ ) ancak tuz miktarının peynir örneğinde starter kültür kullanımına bağlı olmadığı belirlenmiştir ( $P>0,05$ ). Depolama süresinin sonunda maksimum tuz miktarı %5,84 olarak belirlenmiştir. Bu değer Türk gıda kodeksi peynir tebliği (2015/6)'nde salamura ile olgunlaştırılan peynirlerde izin verilen maksimum tuz oranı (%7,5)'in altındadır.



Şekil 25. Peynir örneklerinin çiğ süttten depolamanın son günü kadar tuz içerikleri (%)

Peynirdeki tuz, su aktivitesi üzerindeki etkisiyle peynirin olgunlaşmasını etkilemektedir. Ayrıca tuz konsantrasyonu, pek çok enzim aktivitesi ile birlikte mikrobiyal gelişmeyi ve peynirlerin proteolizini etkileyen bir faktördür (Karimi vd., 2011). Olgunlaşma sürecinde, tuz peynir boyunca yayılır, böylece merkezdeki ve çevredeki tuz içeriğindeki farklılıklar olgunlaşma süresiyle birlikte azalır. Tuzlama sadece peynirlerin lezzetine katkıda bulunmaz, aynı zamanda starter mikroorganizmaların büyümesi ve aktivitesi üzerinde de bir etkiye sahiptir (Özer vd., 2009). Starter ve probiyotik kültürlerin canlılığı tuz konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Beyaz salamura peynirlerde probiyotiklerin büyümesi için tuzun ana sınırlayıcı faktör olduğu bildirilmiştir (Karimi vd., 2011).

Yılmaztekin, (2001) tarafından starter *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum* kültürlerinin kullanıldığı çalışmada üretilen beyaz peynirlerde bu çalışmaya benzer şekilde %5 seviyelerinde belirlenmiştir. Şaşmazer, (2022) probiyotikler kullanılarak üretilen peynirlerin tuz oranlarının ise depolama süresince 1,58-1,68 aralığında değiştiği ifade edilmiştir. Bu çalışma ile kıyaslandığında çalışmamızda tuz içeriği yüksek (%5,59) belirlenmiştir. Ancak kodekste izin verilen değer altında kalmıştır.

## Titrasyon Asitliği

Laktik asit yuzdesi ile temsil edilen titre edilebilir asitlik, peynirde probiyotik bakterilerin canlılığı için önemli faktörlerden birisidir. Probiyotiklerin ürettikleri düşük pH'ya sahip bileşiklerin özellikle, peynirlerin tekstürel ve duysal özelliklerini önemli ölçüde etkilediği ifade edilmektedir (Mugwanda vd., 2023). Titrasyon asitliği kullanılarak peynirlerin üretim sürecinde çığ süttten itibaren % laktik asit miktarlarına ait sonuçları Tablo 30'da gösterilmiştir.

Tablo 30

Peynir üretim sürecinde kullanılan çığ süttten itibaren tuzlama aşamasının sonuna kadar laktik asit içerikleri (%)

Peynir örneği	Çığ süt	Pastörizasyon sonrası	Mayalama	Fermantasyon	Tuzlama
1	0,23 <sup>Aa</sup> ±0,09*	0,26 <sup>Aa</sup> ±0,01	0,27 <sup>Ba</sup> ±0,03	0,30 <sup>Ba</sup> ±0,12	0,38 <sup>Ca</sup> ±0,02
2	0,25 <sup>Aa</sup> ±0,02	0,26 <sup>Aa</sup> ±0,22	0,30 <sup>Bb</sup> ±0,08	0,42 <sup>Cb</sup> ±0,20	0,86 <sup>De</sup> ±0,01
3	0,23 <sup>Aa</sup> ±0,15	0,25 <sup>Aa</sup> ±0,06	0,32 <sup>Bb</sup> ±0,10	0,43 <sup>Cab</sup> ±0,03	0,65 <sup>Dc</sup> ±0,53
4	0,25 <sup>Aa</sup> ±0,21	0,26 <sup>Aa</sup> ±0,01	0,32 <sup>Ab</sup> ±0,09	0,45 <sup>Bb</sup> ±0,10	0,75 <sup>Cd</sup> ±0,23
5	0,25 <sup>Aa</sup> ±0,02	0,27 <sup>Aa</sup> ±0,17	0,31 <sup>Bb</sup> ±0,01	0,45 <sup>Cb</sup> ±0,09	0,73 <sup>Dd</sup> ±0,09
6	0,24 <sup>Aa</sup> ±0,18	0,25 <sup>ABa</sup> ±0,07	0,27 <sup>Ba</sup> ±0,12	0,31 <sup>Ca</sup> ±0,04	0,35 <sup>Db</sup> ±0,16

**1:** Kontrol grubu (negatif kontrol, yalnızca peynir mayası), **2:** Peynir mayası + NBL + izolat 43, **3:** Peynir mayası+YF-L901 + 33, **4:** Peynir mayası + NBL + izolat 43 + CD, **5:** Peynir mayası+YF-L901 + izolat 33 + CD, **6:** Pozitif kontrol (Peynir mayası + CD), Aynı süttünde ve satırda farklı harfler ile temsil edilen değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $P<0,05$ ). Harflendirmeler yatayda büyük harfler, dikeyde küçük harfler kullanılarak yapılmıştır.

Peynirlerin üretiminde kullanılan çığ süttlerin laktik asit içerikleri bakımından aralarında farklılık belirlenememiştir ( $P>0,05$ ). Çığ süttten itibaren kontrol peynirleri de dahil olmak üzere peynir üretiminin son aşamasına kadar laktik asit (%) değerleri artış göstermiştir. Bu artışlar incelendiğinde en büyük artışlar starter kültür ilavesi ile üretilen peynirlerde gözlemlenmiştir. Üretim aşamalarının sonunda kontrol peynirinde laktik asit

değerleri ortalama %0,36 iken starter kültür ile üretilen peynirlerde bu değer %0,74'lere ulaştığı tespit edilmiştir.

Depolama süresince peynir örneklerine ait laktik asit içerikleri Tablo 31'de gösterilmiştir.

Tablo 31

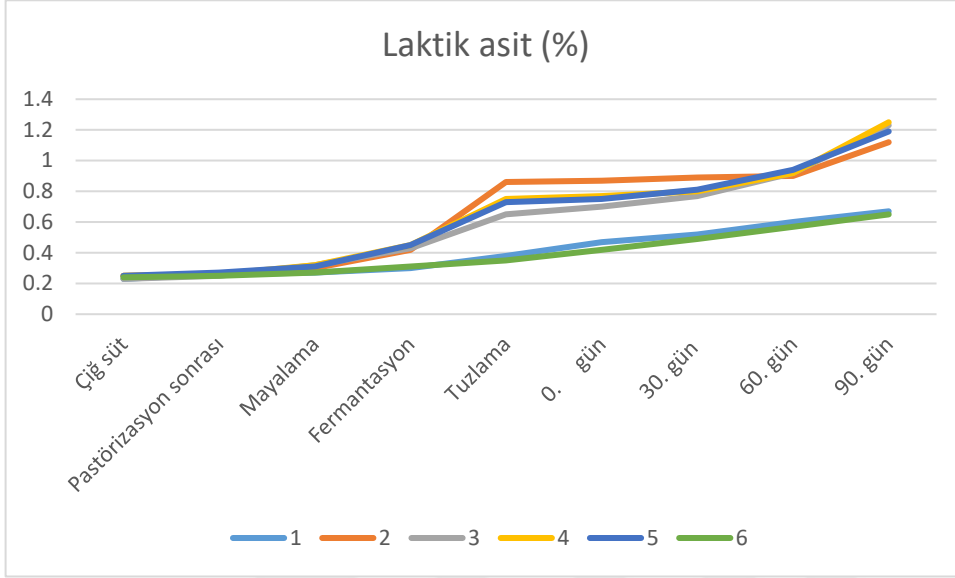
Peynir depolama süresince peynir örneklerine ait laktik içerikleri (%)

Peynir örneği	0.gün	30. gün	60.gün	90. gün
1	0,47Aa±0,09*	0,52 <sup>Aa</sup> ±0,02	0,60 <sup>Ba</sup> ±0,34	0,67 <sup>Ca</sup> ±0,34
2	0,87 <sup>Ae</sup> ±0,13	0,89 <sup>ABe</sup> ±0,10	0,90 <sup>Bd</sup> ±0,21	1,12 <sup>Cb</sup> ±0,10
3	0,70 <sup>Ac</sup> ±0,03	0,77 <sup>Bc</sup> ±0,24	0,92 <sup>Cbc</sup> ±0,01	1,23 <sup>Ccd</sup> ±0,43
4	0,77 <sup>Ad</sup> ±0,30	0,80 <sup>Ad</sup> ±0,12	0,92 <sup>Bbc</sup> ±0,26	1,25 <sup>Cd</sup> ±0,05
5	0,75 <sup>Ad</sup> ±0,10	0,81 <sup>Bd</sup> ±0,33	0,94 <sup>Cb</sup> ±0,01	1,19 <sup>Dc</sup> ±0,03
6	0,42 <sup>Ab</sup> ±0,06	0,49 <sup>Bb</sup> ±0,18	0,57 <sup>Ca</sup> ±0,30	0,65 <sup>Da</sup> ±0,24

**1:** Kontrol grubu (negatif kontrol, yalnızca peynir mayası), **2:** Peynir mayası + NBL + izolat 43, **3:** Peynir mayası+YF-L901 + 33, **4:** Peynir mayası + NBL + izolat 43 + CD, **5:** Peynir mayası+YF-L901 + izolat 33 + CD, **6:** Pozitif kontrol (Peynir mayası + CD),\*Sonuçlar 3 paralel analiz sonucunun ortalama ± standart hata şeklinde hesaplanmıştır. Aynı sütunda ve satırda farklı harfler ile temsil edilen değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $P<0,05$ ). Harflendirmeler yatayda büyük harfler, dikeyde küçük harfler kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 30'da yer alan peynirlerin 90 günlük depolama süresince laktik asit (%) değerleri incelendiğinde tüm peynirlerin depolamanın ilk gününden itibaren laktik asit (%) değerlerinde artış tespit edilmiştir. Depolama sonunda kontrol grubu örneklerinin starter kültür ile üretilen peynirlere kıyasla oldukça farklılaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 26) ve laktik asitlik değerlerine olgunlaştırmanın ve kullanılan starter probiyotiklerin etkisi ayrı ayrı önemli ( $P<0,05$ ) bulunmuştur. Genel olarak değerlendirildiğinde en yüksek laktik asit

(%) değeri NBL ticari kültürüne ek laboratuvar izolatu 43'ün starter olarak kullanıldığı 4 numaralı peynirde belirlenmiştir (%1,25).



Şekil 26. Peynir örneklerinin çiğ süttten depolamanın son günü kadar içerdikleri laktik asit (%) miktarları

Şekil 26 incelendiğinde laktik asit miktarının mayalama ve fermantasyon aşamalarından itibaren arttığı gözlemlenmektedir. Bu sonuçlar peynirlerin üretiminden itibaren depolama sonuna kadar pH değerlerinin düşüşü ile de paralellik göstermektedir. Literatürde peynirlerin depolanması sırasında laktik asit (%) değerlerinde artış belirlendiğini ifade eden çalışmalar yer almaktadır (Mugwanda vd., 2023; Uzkuç vd., 2023). Peynirlerdeki laktik asit miktarının sütün doğal içeriğinde olan ve laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan bileşikler ile ilişkilendirildiği ifade edilmektedir (Karimi vd., 2012; Hadeş vd., 2022). Sonuçlar incelendiğinde elde edilen laktik asit bakterileri sayılarının da laktik asit miktarındaki artış ile paralel şekilde arttığı gözlemlenmiştir.

#### 4.5.2. Peynirlerin Mikrobiyolojik Özellikleri

Peynir, yoğurt gibi daha asidik fermente süt ürünleri ile karşılaştırıldığında probiyotiklerin bağırsağa taşınması için daha iyi bir alternatif olarak değerlendirilmektedir (Karimi, vd., 2012; Vinderola vd., 2009). Literatürde probiyotik kültür kullanımı ile farklı peynirlerin üretimlerinin gerçekleştirildiği pek çok çalışma yer almaktadır (Cuffia vd., 2017; Hedef vd., 2022; Kasimoğlu vd., 2004; Vinderola vd., 2009). Ayrıca yapılan pek çok çalışma peynirlerde kullanılan probiyotik kültürlerin patojenlere karşı etkili olduğunu ifade etmektedir (Bogovič Matijašić vd., 2007; Coelho vd., 2014; Garde vd., 2011; González ve Zárata, 2015).

Bu amaçla *C. difficile* (CD)'nin peynir yapımında gelişen asitlik ve probiyotik kültür kullanımı ile inaktivasyonunun belirlenmesi için 6 farklı peynir üretilerek 90 günlük olgunlaşmaya bırakılmıştır.

Üretilen 6 peynirin üretim süresince belirlenen mikrobiyolojik özelliklerinden laktobasillere ait sayım sonuçları Tablo 32'de gösterilmiştir. Bu peynirlere ait depolama süresince belirlenen laktobasil sayıları ise Tablo 33'de gösterilmiştir.

Tablo 32

Peynirlere ait üretim aşamalarında laktobasil sayıları (log kob/mL-g)

Peynir örneği	Çiğ süt	Pastörizasyon sonrası	Mayalama	Fermentasyon	Tuzlama
1	3,98 <sup>Aa</sup> ±0,01*	1.12 <sup>Ba</sup> ±0.01	4,17 <sup>Ca</sup> ±0,01	4,16 <sup>Ca</sup> ±0,01	4,02 <sup>Ca</sup> ±0,11
2	3,97 <sup>Aa</sup> ±0,02	1.00 <sup>Ba</sup> ±0.30	5,20 <sup>Cb</sup> ±0,10	8,02 <sup>Db</sup> ±0,07	8,27 <sup>Ec</sup> ±0,01
3	3,96 <sup>Aa</sup> ±0,02	1.08 <sup>Ba</sup> ±0.05	5,80 <sup>Cc</sup> ±0,20	7,32 <sup>Dc</sup> ±0,12	8,20 <sup>Ed</sup> ±0,06
4	3,97 <sup>Aa</sup> ±0,02	1.01 <sup>Ba</sup> ±0.00	5,18 <sup>Cc</sup> ±0,14	8,30 <sup>Dd</sup> ±0,26	8,29 <sup>Dc</sup> ±0,08
5	3,94 <sup>Aa</sup> ±0,07	1.09 <sup>Ba</sup> ±0.10	5,73 <sup>Cc</sup> ±0,06	7,65 <sup>Dd</sup> ±0,21	8,30 <sup>Ecd</sup> ±0,06
6	3,96 <sup>Aa</sup> ±0,01	1.07 <sup>Ba</sup> ±0.01	4,10 <sup>Cd</sup> ±0,01	4,11 <sup>Da</sup> ±0,01	4,11 <sup>Eb</sup> ±0,01

**1:** Kontrol grubu (negatif kontrol, yalnızca peynir mayası), **2:** Peynir mayası + NBL + izolat 43, **3:** Peynir mayası+YF-L901 + 33, **4:** Peynir mayası + NBL + izolat 43 + CD, **5:** Peynir mayası+YF-L901 + izolat 33 + CD, **6:** Pozitif kontrol (Peynir mayası + CD), **TE:** tespit edilemedi, \*Aynı sütunda ve satırda farklı harfler ile temsil edilen değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $P<0,05$ ). Harflendirmeler yatayda büyük harfler, dikeyde küçük harfler kullanılarak yapılmıştır.

Çiğ süt ve pastörizasyon sonrasına kadar her bir peynir üretiminden alınan örneklerdeki laktobasil sayıları benzer bulunmuştur ( $P>0,05$ ). Çiğ sütlerde ortalama 3,96 log kob/mL düzeyinde laktobasil varlığı tespit edilmiştir. Çiğ sütler pastörize edildiğinde ise ortalama olarak bu değer 1,06 log kob/mL düzeyine gerilediği belirlenmiştir. Mayalama aşamasından itibaren ise peynirlerdeki laktobasillere ait sayımların birbirlerinden farklılaşmaya başladığı belirlenmiştir.

Starter kültür ilavesi olmayan 1 ve 6 numaralı peynirlerde laktobasil sayıları ortalama olarak tuzlama sonrasında 4,06 log kob/mL düzeyine ulaşmıştır. Starter kültür üretilen peynirlerde *C. difficile* varlığından bağımsız olarak laktobasil sayıları yaklaşık olarak  $10^8$  kob/mL düzeyine ulaştığı belirlenmiştir. Starter kültürler varlığına ek *C. difficile* varlığı, peynir üretimi tamamlandığında bu örneklerdeki laktobasil sayılarının farklılaşmasına neden olmamıştır.

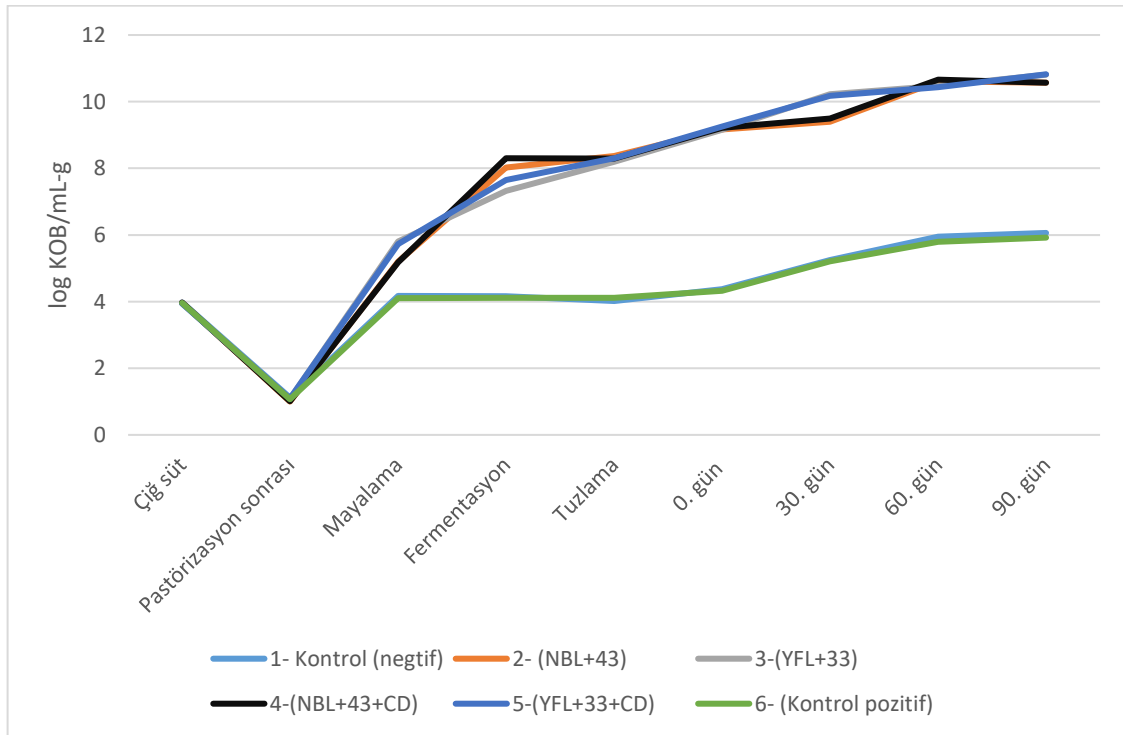


Tablo 33

Peynir depolama süresince peynir örneklerine ait laktobasil sayıları (log kob/g)

Peynir örneği	0.gün	30. gün	60.gün	90. gün
1	4,37 <sup>Aa</sup> ±0,19*	5,25 <sup>Aa</sup> ±0,02	5,95 <sup>Ba</sup> ±0,06	6,06 <sup>Ba</sup> ±0,07
2	9,17 <sup>Ab</sup> ±0,17	9,40 <sup>Ab</sup> ±0,24	10,61 <sup>Ab</sup> ±0,10	10,57 <sup>Ab</sup> ±0,30
3	9,16 <sup>Ab</sup> ±0,03	10,22 <sup>Bb</sup> ±0,12	10,47 <sup>Bcb</sup> ±0,11	10,81 <sup>Cb</sup> ±0,18
4	9,21 <sup>Ab</sup> ±0,10	9,49 <sup>Ab</sup> ±0,24	10,66 <sup>Bb</sup> ±0,04	10,57 <sup>Bb</sup> ±0,20
5	9,25 <sup>Ab</sup> ±0,00	10,17 <sup>Bb</sup> ±0,08	10,43 <sup>Bcb</sup> ±0,16	10,82 <sup>Cb</sup> ±0,24
6	4,32 <sup>Aa</sup> ±0,06	5,21 <sup>Aa</sup> ±0,02	5,79 <sup>Ba</sup> ±0,21	5,92 <sup>Ba</sup> ±0,22

**1:** Kontrol grubu (negatif kontrol, yalnızca peynir mayası), **2:** Peynir mayası + NBL + izolat 43, **3:** Peynir mayası+YF-L901 + 33, **4:** Peynir mayası + NBL + izolat 43 + CD, **5:** Peynir mayası+YF-L901 + izolat 33 + CD, **6:** Pozitif kontrol (Peynir mayası + CD), **TE:** tespit edilemedi, \*Aynı sütunda ve satırda farklı harfler ile temsil edilen değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $P<0,05$ ). Harflendirmeler yatayda büyük harfler, dikeyde küçük harfler kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 27. Peynir örneklerinin çiğ süttten depolamanın son günü kadar içerdikleri laktobasil sayıları (log kob/mL, log kob/g)

Peynirlerin depolama süresinde laktobasil sayıları incelendiğinde en yüksek laktobasil sayısı, starter kültür YF-L901+ izolat 33 ve *C. difficile* içeren peynir örneğinde (10,82 kob/g) ulaşılmıştır. Laktobasil sayısı aynı starter kültür ile üretilen ve *C. difficile* içermeyen örnekte ise en yüksek ikinci (10,81 kob/g) peynir olmuştur. Üretimde starter kültür kullanılan dört peynirin de depolama sonunda laktobasil sayıları arasında anlamlı bir farklılık belirlenememiştir ( $P>0,05$ ). Çiğ süt aşamasından depolanmanın son gününe kadar starter kültür içeren örneklerin her aşamasındaki laktobasil sayılarının oldukça benzer oldukları görülmüştür (Şekil 27). Ayrıca starter kültür ile *C. difficile* inoküle edilmiş peynir örneklerindeki starter laktobasil sayılarının *C. difficile* varlığından etkilenmediği görülmüştür.

Peynir üretimi çiğ süttten tuzlama aşamasının sonuna kadar belirlenen laktokok sayıları Tablo 34’de gösterilmiştir. Peynirlere ait depolama süresince laktokokların sayıları ise Tablo 35’de gösterilmiştir.

Tablo 34

Peynir üretim aşamalarında, peynir örneklerine ait laktokok sayıları (log kob/mL-g)

Peynir örneği	Çiğ süt	Pastörizasyon sonrası	Mayalama	Fermantasyon	Tuzlama
1	4,24 <sup>Ad</sup> ±0,01*	0,91 <sup>Be</sup> ±0,02	4,19 <sup>Ca</sup> ±0,06	5,31 <sup>Da</sup> ±0,01	5,74 <sup>Ea</sup> ±0,14
2	4,86 <sup>Aa</sup> ±0,03	1,21 <sup>Bb</sup> ±0,01	4,86 <sup>Ab</sup> ±0,03	5,16 <sup>Cb</sup> ±0,02	5,37 <sup>Db</sup> ±0,01
3	4,80 <sup>Ab</sup> ±0,01	1,10 <sup>Bd</sup> ±0,14	5,61 <sup>Cc</sup> ±0,01	5,50 <sup>Dc</sup> ±0,01	5,79 <sup>Ec</sup> ±0,01
4	4,40 <sup>Ac</sup> ±0,01	1,18 <sup>Bc</sup> ±0,91	4,88 <sup>Cb</sup> ±0,01	5,13 <sup>Db</sup> ±0,01	5,39 <sup>Eb</sup> ±0,03
5	4,90 <sup>Ae</sup> ±0,15	1,32 <sup>Ba</sup> ±0,01	5,58 <sup>Cc</sup> ±0,01	5,61 <sup>Cd</sup> ±0,01	5,76 <sup>Dc</sup> ±0,01
6	4,23 <sup>Ad</sup> ±0,02	1,21 <sup>Bb</sup> ±0,00	5,18 <sup>Cd</sup> ±0,02	5,31 <sup>Da</sup> ±0,01	5,77 <sup>Ec</sup> ±0,09

**1:** Kontrol grubu (negatif kontrol, yalnızca peynir mayası), **2:** Peynir mayası + NBL + izolat 43, **3:** Peynir mayası+YF-L901 + 33, **4:** Peynir mayası + NBL + izolat 43 + CD, **5:** Peynir mayası+YF-L901 + izolat 33 + CD, **6:** Pozitif kontrol (Peynir mayası + CD), **TE:** tespit edilemedi, \*Aynı sütun ve satır üzerinde farklı harfler ile temsil edilen değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $P<0,05$ ). Harflendirmeler yatayda büyük harfler, dikeyde küçük harfler kullanılarak yapılmıştır.

Peynirlerin üretiminde kullanılan sütlere ait laktokok sayıları incelendiğinde çiğ sütlerdeki laktokok sayılarının pastörizasyon sonrasındaki laktokok sayılarından istatistiksel anlamda farklı olduğu belirlenmiştir ( $P<0,05$ ). Pastörizasyon sonrasında da durum değişmemiş ve örneklerdeki laktokok sayıları birbirlerinden farklı bulunmuştur. Tuzlama aşaması sonuna kadar örneklerin her birinde laktokok sayıları artış göstermiştir. Bu aşamada en yüksek laktokok sayısı (5,79 kob/g) starter kültür olarak YF-L901 + izolat 33 içeren peynir örneğinde belirlenmiştir.

Tablo 35

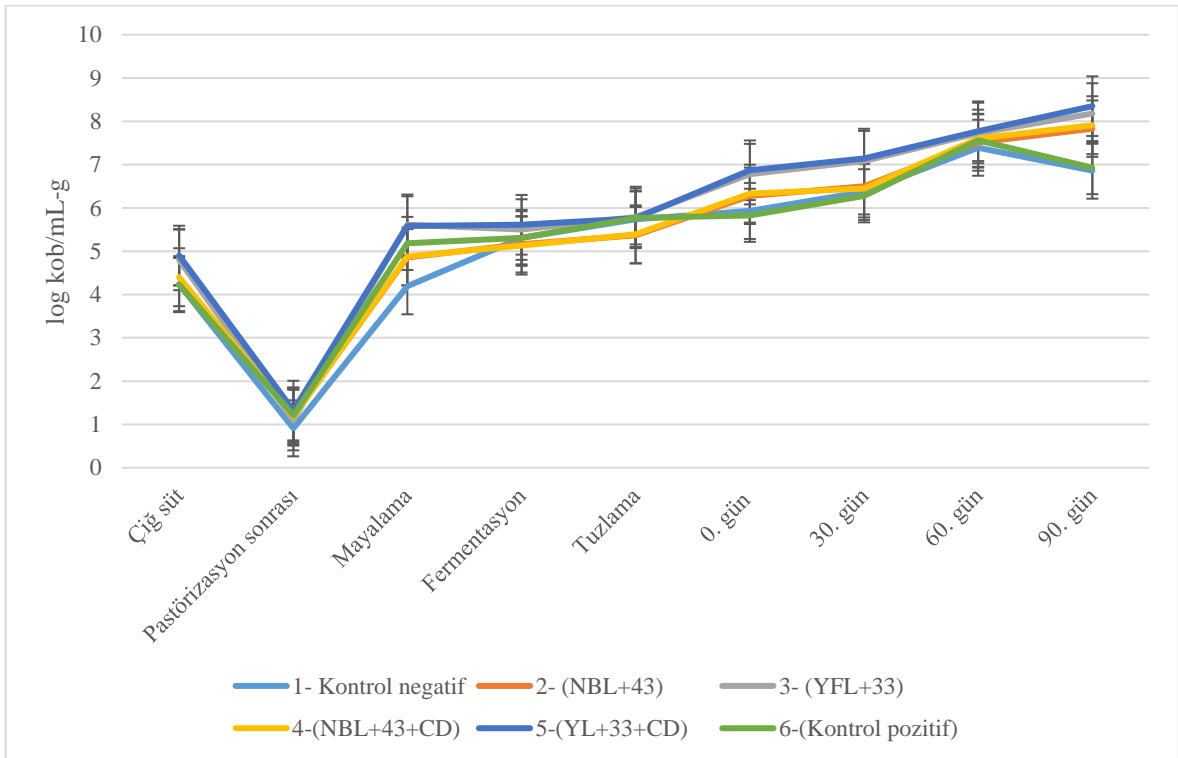
Peynir depolama süresince peynir örneklerine ait laktokok sayıları (log kob/g)

Peynir	0.gün	30. gün	60. gün	90. gün
1	5,93 <sup>Ba</sup> ±0,02	6,37 <sup>ABab</sup> ±0,25	7,39 <sup>Aa</sup> ±0,25	6,86 <sup>ABb</sup> ±0,17
2	6,28 <sup>Ab</sup> ±0,07	6,50 <sup>Aab</sup> ±0,16	7,51 <sup>Ba</sup> ±0,01	7,83 <sup>Bab</sup> ±0,23
3	6,78 <sup>Ac</sup> ±0,05	7,08 <sup>Aab</sup> ±0,01	7,73 <sup>Ba</sup> ±0,16	8,18 <sup>Ba</sup> ±0,04
4	6,33 <sup>Ab</sup> ±0,03	6,45 <sup>Aab</sup> ±0,14	7,61 <sup>Ba</sup> ±0,11	7,91 <sup>Cab</sup> ±0,02
5	6,87 <sup>Ac</sup> ±0,04	7,17 <sup>Aa</sup> ±0,01	7,77 <sup>Ba</sup> ±0,17	8,35 <sup>Ca</sup> ±0,02
6	5,83 <sup>Aa</sup> ±0,07	6,28 <sup>Ab</sup> ±0,16	7,56 <sup>Ba</sup> ±0,25	6,93 <sup>CBb</sup> ±0,24

**1:** Kontrol grubu (negatif kontrol, yalnızca peynir mayası), **2:** Peynir mayası + NBL + izolat 43, **3:** Peynir mayası+YF-L901 + 33, **4:** Peynir mayası + NBL + izolat 43 + CD, **5:** Peynir mayası+YF-L901 + izolat 33 + CD, **6:** Pozitif kontrol (Peynir mayası + CD), **TE:** tespit edilemedi, \*Aynı sütunda ve satırda farklı harfler ile temsil edilen değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $P<0,05$ ). Harflendirmeler yatayda büyük harfler, dikeyde küçük harfler kullanılarak yapılmıştır.

Starter kültür içermeyen 1 numaralı peynir örneğinde depolama süresince laktokok sayısında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ( $P<0,05$ ). Starter kültür içeren peynirlerde ise *C. difficile* varlığından bağımsız şekilde depolama süresince var olan laktokokların varlıklarını devam ettirebildikleri ve ortalama depolama süresinin başından sonunda 1,50 log artış gösterdiği belirlenmiştir. Peynirlerin üretiminden kullanılan çiğ süt aşamasından başlayarak depolamanın son gününe kadar laktokokların sayıları Şekil 28'de gösterilmiştir. Çiğ sütte bulunan laktokokların pastörizasyon sırasında ısı işleminden etkilendikleri ancak tamamen inhibe olmadığı belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak üretilen ve starter kültür

içermeyen kültürlerde bu laktokok sayıları depolama süresi içerisinde 60. günde maksimum sayıya (7,47 kob/g) ulaşmıştır. Ancak her iki kontrol örneğinde de 90. günde ortalama 6,89 log/g'a düşmüştür. İçerisinde starter bulunmayan pozitif ve negatif kontrol grubu örneklerinde laktokok sayılarında 60. günden 90. güne kadar düşüş gözlemlenmiştir. Kontrol grubu örneklerinde laktokoklarda oluşan bu düşüşün bu örnekler içerisinde spontan şekilde bulunan laktokokların oluşan asitlik ve tuz varlığında canlılıklarını kaybetmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 28. Peynir örneklerinin çiğ süttten depolamanın son günü kadar içerdikleri laktokok sayıları (log kob/mL, log kob/g)

Starter kültür ile üretimi yapılan peynirde hem laktobasil hem de laktokokların koloni sayılarının mayalama ve fermentasyon aşamalarındaki hızlı artışı, peynirlerin pH değişimleri ile paralel şekilde gözlemlenmiştir. Artan laktik asit bakterisi sayısının oluşturduğu asitlik ile pH düşüşü gözlemlenmiştir. Laktik asit bakterilerinin gelişimlerine paralel olarak pH düşüşünün temel sebeplerinden biri, bu bakteriler tarafından üretilen organik asitlerdir. Oluşan organik asitlerin peynirde aroma oluşumunun yanında

patojenlere karşı antimikrobiyal etkinin en önemli sebeplerinden biri olduğu ifade edilmektedir (Li vd., 2020).

Starter kültürler ile üretilen peynirlerin probiyotik olarak kabul edilebilmeleri için bu kültürlerin, tüketim anına kadar canlılığını koruyabilmeleri önemlidir. Yapılan çalışmalar peynirlerin probiyotiklerin gelişimi ve varlığını koruyabilmesi için gereken uygun koşulları sağladığını göstermektedir (Karimi vd., 2011; Şaşmazer, 2020). Özellikle probiyotik peynirleri diğer probiyotik süt ürünlerinden ayıran en önemli özelliklerden biri olarak, probiyotik bakterilerin nispeten uzun olgunlaşma-depolama süresi boyunca canlılıklarını sürdürmelerinin gerekliliği ifade edilmektedir (Karimi vd., 2012). Probiyotik olarak üretilen gıdalar kullanılan probiyotik kültürlerden en az  $10^7$  kob/g-mL içermelidir (Şaşmazer, 2022). Çalışmada starter olarak eklenen probiyotik kültürlerin depolama boyunca canlılıklarını devam ettirebildikleri gözlenmiştir. Depolama süresinin sonunda starter kültür içeren peynirlerin laktobasil sayıları  $10^{10}$  kob/g sayısına, laktokok sayıları ise  $10^8$  kob/g sayısına ulaşmıştır.

Bu çalışmadan farklı olarak Kasimoğlu vd., (2004) tarafından yalnızca *Lactobacillus acidophilus*'un starter olarak kullanılarak üretilen peynirlerde *Lactobacillus acidophilus*'un depolamanın 15. gününden itibaren azalma gösterdiği ifade edilmektedir. Yılmaztekin, (2001) tarafından yapılan bir başka çalışmada *L. acidophilus* LA-5 kullanılarak üretilen peynirlerde depolama sürecinin ilk gününden son gününe (90.gün) probiyotik kültürün sayısının yaklaşık olarak 3 logaritmik birimlik bir azalma gösterdiği ifade edilmektedir. Literatürde ile ortaya çıkan bu farklılıklar, kullanılan kültürler, tuz miktarı ve pH değerlerinin farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Ancak bu çalışmaya benzer şekilde Şaşmazer, (2020) tarafından yapılan çalışmada probiyotik peynir içerisinde kullanılan laktokokların ve laktobasillerin depolama süresince varlıklarını koruyabildiklerini bildirilmiştir.

## Peynirlerde *C. difficile*

Peynir üretiminde *C. difficile* inokülasyonu yapılan örneklerde (4-5 ve 6 numaralı peynirler) *C. difficile* spor süspansiyonu  $10^6$  spor/mL olacak şekilde çiğ sütlerin pastörizasyonundan sonra ilave edilmiştir. Çiğ sütler de dahil olmak üzere tüm peynirler üretim aşamaları ve depolama aşamalarında *C. difficile* varlığı ve sayısı açısından kontrol edilmiştir. Peynirlerin üretim aşamaları boyunca elde edilen *C. difficile* sonuçları Tablo 36'da gösterilmiştir. Peynirlere ait 90 günlük depolama süresince *C. difficile* varlığına ait sonuçlar ise Tablo 37'de gösterilmiştir.

Tablo 36

Peynir üretim aşamalarında *C. difficile* varlığı (log kob/g)

Peynir örneği	Çiğ süt	Pastörizasyon sonrası	Mayalama	Fermantasyon	Tuzlama
1	TE*	TE	TE	TE	TE
2	TE	TE	TE	TE	TE
3	TE	TE	TE	TE	TE
4	TE	TE	5,61 <sup>Aa</sup> ±0,17	5,63 <sup>Aa</sup> ±0,01	5,61 <sup>Aa</sup> ±0,02
5	TE	TE	5,71 <sup>Ab</sup> ±0,02	5,70 <sup>Ab</sup> ±0,01	5,73 <sup>Aa</sup> ±0,01
6	TE	TE	5,54 <sup>Ac</sup> ±0,11	5,54 <sup>Ac</sup> ±0,01	5,52 <sup>Aa</sup> ±0,07

**1:** Kontrol grubu (negatif kontrol, yalnızca peynir mayası), **2:** Peynir mayası+NBL + izolat 43, **3:** Peynir mayası+YF-L901 + 33, **4:** Peynir mayası+NBL + izolat 43 + CD, **5:** Peynir mayası+YF-L901 + izolat 33 + CD, **6:** Pozitif kontrol (Peynir mayası+CD), **TE:** tespit edilemedi, \*Aynı sütunda ve satırda farklı harfler ile temsil edilen değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ( $P<0,05$ ). Harflendirmeler yatayda büyük harfler, dikeyde küçük harfler kullanılarak yapılmıştır.

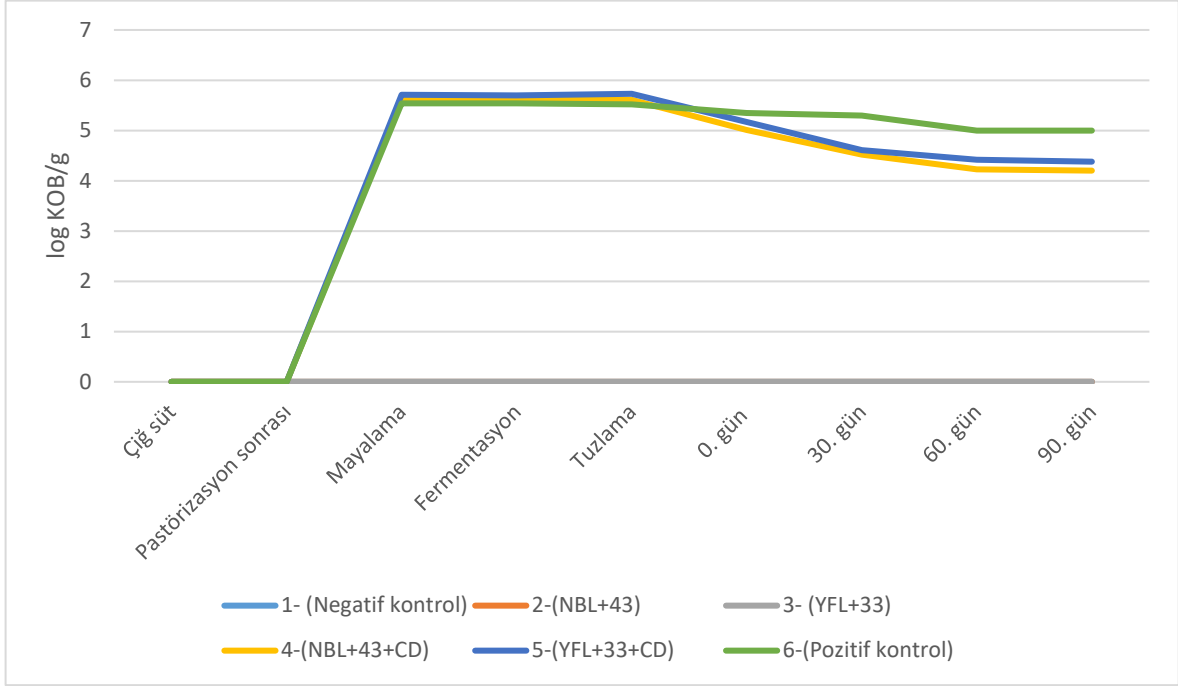
Peynirlerin üretiminde kullanılan çiğ sütlerin hiçbirinde *C. difficile* varlığı tespit edilememiştir. *C. difficile* inokülasyonu yapılmayan peynir örneklerinde üretim aşamalarında ve depolama boyunca yapılan incelemelerde hiçbir örnekte *C. difficile* varlığı tespit edilememiştir. *C. difficile* inokülasyonu yapılan 4,5 ve 6 numaralı örneklerde ise

mayalama aşamasında  $10^6$  spor/mL süspansiyonu şeklinde *C. difficile* sporları ilave edilmiş ancak  $\approx 10^5$  spor/mL geri kazanılabilmektedir. Peynir içinde tutunan bu *C. difficile* sporları tuzlama aşamasının sonunda kadar benzer sayılarda kalmıştır. Tuzlama aşamasının sonunda örneklerin *C. difficile* sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir ( $P>0,05$ ). Depolama süresince azalarak depolama süresinin sonunda starter kültür içeren peynir örneklerinde yaklaşık 1 logaritmik bir azalma gözlemlenmiştir. Starter kültür olmadan yalnızca peynir mayası ve *C. difficile* içeren 6 numaralı peynirde ise başlangıçta süte eklenen ve peynir içerisinde tutunan *C. difficile* sayısı depolama süresince yalnızca az bir miktar düştüğü gözlemlenmiştir (Şekil 29). Depolamanın ilk gününden itibaren *C. difficile* içeren tüm örneklerde *C. difficile* sayıları depolama boyunca farklılık göstermiştir ( $P<0,05$ ). Depolama süresince örneklerdeki *C. difficile* sayılarındaki farklılığın sebebi içerdikleri farklı laktik asit bakterileri ve bu bakteriler tarafından üretilen farklı antimikrobiyal bileşiklerin varlığıdır.

Tablo 37  
Peynirlerin depolanmaları süresince *C. difficile* varlığı (log kob/g)

Peynir	0. gün	30. gün	60. gün	90. gün
1	TE	TE	TE	TE
2	TE	TE	TE	TE
3	TE	TE	TE	TE
4	5,51 <sup>Aa</sup> ±0,10	4,52 <sup>Ba</sup> ±0,26	4,23 <sup>Ca</sup> ±0,13	4,20 <sup>Ca</sup> ±0,01
5	5,17 <sup>Ab</sup> ±0,02	4,61 <sup>Bb</sup> ±0,07	4,42 <sup>Cb</sup> ±0,07	4,38 <sup>Db</sup> ±0,01
6	5,35 <sup>Ac</sup> ±0,01	5,30 <sup>Ac</sup> ±0,08	5,00 <sup>Bc</sup> ±0,01	5,00 <sup>Bc</sup> ±0,18

**1:** Kontrol grubu (negatif kontrol, yalnızca peynir mayası), **2:** Peynir mayası + NBL + izolat 43, **3:** Peynir mayası+YF-L901 + 33, **4:** Peynir mayası + NBL + izolat 43 + CD, **5:** Peynir mayası+YF-L901 + izolat 33 + CD, **6:** Pozitif kontrol (Peynir mayası + CD), **TE:** tespit edilemedi, \*Aynı sütun ve satır üzerinde farklı harfler ile temsil edilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ( $P<0,05$ ). Harflendirmeler yatayda büyük harfler, dikeyde küçük harfler kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 29. Peynir örneklerinin çiğ süttten depolamanın son günü kadar içerdikleri *C. difficile* sayıları (log kob/g)

Starter kültür olarak seçilen NBL+izolat 43 ve YFL+izolat 33 probiyotik kültür karışımlarının *C. difficile* inhibisyonu üzerindeki etkisi çalışma kapsamında belirlenmiştir. Bu kültür karışımlarının her ikisi içerisinde de basil ve kok şeklinde laktik asit bakterileri mevcuttur. Bu kültür karışımları depolama süresince varlıklarını koruyarak miktarlarını artırırken *C. difficile* sporlarının sayısı depolama süresi ilerledikçe azalmıştır. Bu sonuç bize kullanılan probiyotik kültürlerin *C. difficile* üzerinde in-vitro ortamda gösterdikleri inhibisyon etkisini peynirin özellikle depolanması süresince de gösterdiğini düşündürmektedir. Ancak *C. difficile*'nin sporlarının 100 spor/g düzeyinde bile hastalık yapabildiği belirtilmiştir (Warriner vd., 2017). Bu nedenle peynirlere kontamine olabilecek *C. difficile* sporlarının 1 logaritmik düzeyde bile olsa azalmasının sağlanmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

Spor oluşturan bakteriler süt endüstrisi kirleticileridir ve bu mikroorganizmaların ciddi ekonomik kayıplardan (bozulma) ve gıda kaynaklı hastalık salgınlarından sorumlu olduğu ifade edilmektedir. Süt ve süt ürünlerinde bulunan ve yaygın biçimde spor oluşturan bakterilerin, bozulma ve halk sağlığı açısından endişe kaynağı olan çeşitli türleri



içeren *Bacillus* ve *Clostridium* cinsine ait olduğu bildirilmektedir (Oliveira vd., 2016). *Clostridium* spp. her yerde bulunan ve spor oluşturan bakterilerdir, bu da onların süt ürünleri zincirine girişlerini kolaylaştırmakta ve peynirde bozulma oluşmasını kontrol etmeyi son derece zorlaştırmaktadır (Ávila vd., 2023). Silajla alınan ve dayanıklı yapıları nedeniyle bozulmadan sindirim sisteminden geçen sporlar, gübrede yüksek konsantrasyonlarda bulunmakta ve hijyenik olmayan sağım koşulları nedeniyle süte geçmektedir. *Clostridium tyrobutyricum* geç şişme problemi olan peynirlerden izole edilen birincil suç olmasına rağmen, *C. beijerinckii*, *C. butyricum* ve *C. sporogenes* de peynirde aynı kusurla ilişkilidir (Cremonesi vd., 2012). Dünyanın farklı yerlerinde üretilen birçok geleneksel peynir türü vardır ve bunların 50'den fazla çeşidi Türkiye'de geleneksel veya endüstriyel yöntemlerle üretilmektedir (Şahiner vd., 2023). Bu peynir çeşitleri arasında en çok tercih edilen ve ekonomik açıdan önemli olan beyaz peynirdir (Kabawanga, 2017). Özellikle mandıralarda artisanal geleneksel peynir üretiminde, endüstriyel ölçekli üretim sürecinden farklı olarak, çiğ veya düşük sıcaklıktaki süt, starter kültürler olmadan peynir üretiminde kullanılmaktadır. Bu üretim yöntemi peynir lezzeti ve dokusu üzerinde olumlu etkiler yaratırken geç şişme gibi mikrobiyolojik bozulmalara yatkınlığı arttırmaktadır. Endüstriyel üretimde pastörizasyonun üretim sürecinde Clostridial sporları ve çapraz kontaminasyonları ortadan kaldıramaması da peynirde şişme kusuruna neden olur (Şahiner vd., 2023).

*C. difficile* süt ve süt ürünlerinin de (Abdel-Hamid vd., 2011; Hazarika vd., 2023; Jöbstl vd., 2010; Marcos vd., 2021; Rahimi vd., 2014; Romano vd., 2018; Sugeng, 2012) dahil olduğu pek çok gıdadan izole edilmiştir. (Hazarika vd., 2023; Hoover ve Rodriguez-Palacios, 2013; Marcos vd., 2021, 2022; Rodriguez-Palacios vd., 2013; Songer ve Anderson, 2006). *C. difficile*'nin gıdalarda ve özellikle süt ve süt ürünlerinde varlığına yönelik sınırlı çalışma bulunmasının yanında gıdalarda *C. difficile* inhibisyonuna yönelik çalışma da oldukça sınırlıdır. Yapılan çalışmalarda *C. difficile* sporlarının gıdalar ile birlikte düşük sıcaklık ve dondurularak muhafazası (Deng vd., 2015; Flock, 2017; Marcos vd., 2023), pişirilmesi (Marcos vd., 2023; Rodriguez-Palacios vd., 2010; Rodriguez-Palacios ve LeJeune, 2011), düşük su aktivitesinde varlığı (Deng vd., 2017), durumlarında bile gıda içerisinde *C. difficile* sporlarının varlığını sürdürmeyi başardığı ifade edilmektedir. Çalışmamızda starter kültür ve *C. difficile* sporlarının birlikte varlığında

üretilen peynirlerde *C. difficile* sporlarının azaldığı, buna ek olarak yalnızca *C. difficile* ve peynir mayası ilavesinin bulunduğu peynirlerde de düşük sayıda *C. difficile* miktarının azaldığı tespit edilmiştir. Oluşan bu azalmanın temel sebebinin sütün içerisinde spontan olarak bulunan laktik asit bakterilerinin varlığından ve oluşan asitlikten kaynaklandığı düşünülmektedir.

Laktik asit bakterilerinin *C. difficile*'de neden olduğu bu inhibitör aktivite, laktik asit ve/veya diğer organik asitler, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler veya antibiyotikler, besin rekabeti, alkollü bileşikler, diasetil ve değiştirilmiş bir oksidasyon-redüksiyon potansiyelini de içine alan çeşitli faktörlere atfedilmektedir (Savadogo vd., 2004; Abarquero vd., 2023). Bu nedenle kullanılan probiyotik kültürlerin *C. difficile* üzerine etkileri bu kültürlerin ürettikleri pek çok farklı bileşikten kaynaklanıyor olabilir. Bu çalışmada starter kültür olarak kullanılmak için seçilen kültürlerin in- vitro ortamda *C. difficile* üzerine etkileri incelendiğinde bu kültürlerin inhibisyon etkilerinin yalnızca asidik bileşiklerden kaynaklanmadığı gözlemlenmiştir (Tablo 22).

Literatürde *C. difficile*'nin peynir içerisine inoküle edilerek starter kültür varlığında hayatta kalmasını inceleyen bir başka çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak Flock, (2017) tarafından yapılan çalışmada ilk kez fermantasyonun etkilerinin *C. difficile* sporlarının canlılığını bir fermente gıda olan yaz sosisinde incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda 60 günlük bir depolamada *C. difficile* sayısında bir değişiklik belirlenemediği ifade edilmiştir.

Bu çalışmaya benzer şekilde peynirlerde bakteriyosin üretmeyen ve bakteriyosin üreten *L. lactis* subsp. *lactis* INIA 415 suşlarının, *Clostridium beijerinckii* INIA 63 üzerine etkileri depolama sürecince peynir içerisinde incelenmiştir. Araştırmacılar, depolama süresi sonunda bakteriyosin üreten *L. lactis* subsp. *lactis* INIA 415 suşunun *Clostridium beijerinckii* INIA 63 sporları üzerinde inhibisyon (0,45 log kob/g) etkisinin belirlendiği ifade etmişlerdir (Garde vd., 2011).

Gonzalez ve Zarate, (2015) tarafından yapılan benzer bir başka çalışmada, *C. sporogenes*'in  $10^4$  spor m/L konsantrasyonu ile kontamine edilmiş sütlerden üretilen

peynirlerde *Lactobacillus plantarum* TF711 ile birlikte yapılan üretimlerin *C. sporogenes* üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırmacılar depolama süresince kontrol peynirleri ile kıyaslandığında *C. sporogenes* sporlarının yaklaşık olarak 2 logaritmik birim azaldığını belirtmişlerdir. Bu durum *C. difficile* ile *C. sporogenes* arasındaki direnç farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca başlangıç inokülasyon dozunun farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Süte inokülasyon miktarının belirlenmesinde *C. difficile*'nin gıdalarda inaktivasyonunda kullanılan  $10^5$  spor/mL (Redondo-Solano vd., 2016),  $10^6$  spor/mL (Arora vd., 2019),  $10^7$ - $10^8$  spor/mL (Deng vd., 2015) çalışmaları dikkate alınmıştır. Ayrıca ön denemelerde elde edilen sonuçlarda  $10^3$  ve altındaki düzeylerde *C. difficile* sporlarının geri kazanımında yaşanan zorluklar sebebi ile  $10^6$  spor/mL konsantrasyonu inokülasyon dozu olarak seçilmiştir.

Sonuç olarak probiyotik kültürlerin peynirlerde starter olarak kullanımı direkt olarak süte ya da üretim aşamasında peynire kontamine olan *C. difficile* suşlarının önlenmesinde kullanılabilir alternatif bir yöntem olabilir. Bu amaçla seçilecek starter kültürlerin peynirin üretimi sırasında peynirde istenen özellikleri sağlaması ve varlığını depolama süresinin sonuna kadar koruyabilmesi önem taşımaktadır. Kullanılan her iki probiyotik kültür karışımı hem peynirin istenen peynir yapısını oluşturmasını sağlamış hem de depolama süresince varlıklarını korumuştur. Bütün bunlara ek olarak *C. difficile* sporları üzerine oluşturdukları inhibisyon etkileri her iki kültür karışımının güvenli peynir üretiminde önemli bir alternatif olarak değerlendirilmesinin önünü açmıştır.

## BEŞİNCİ BÖLÜM

### SONUÇ VE ÖNERİLER

*Clostridioides difficile* geçmişten günümüze özellikle sağlık kuruluşlarındaki enfeksiyonlarla ilişkilendirilse de, son yıllarda değişen epidemiyolojisi sebebi ile gıda kaynaklı bir tehdit olarak da giderek daha fazla önem kazanmaktadır (Lund ve Peck, 2015; Marsh ve Harrison, 2015). Yapılan çalışmalarda *C. difficile*'nin gıda, hayvanlar ve insanlar arasında enfeksiyonlara sebep olan ortak suşlarının belirlenmesi bu bakterinin çeşitli yollar ile insan ve hayvanlarda enfeksiyonlara neden olduğuna dair şüpheleri arttırmaktadır. *C. difficile*'nin gıda kaynaklı bulaşma potansiyelinin belirlenmesi ve var olabilecek kontaminasyonların önüne geçilmesi gerekmektedir. Süt ürünlerinde *C. difficile* varlığına yönelik çalışmalarda *C. difficile* varlığı ve riski bildirilmiş olmasına rağmen süt ürünlerinde bu bakterinin önlenmesine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmada süt örneklerinde %2,19 oranında *C. difficile* pozitiflik belirlenmiştir. Elde edilen izolatların vankomisin ve klindamisin ve metranidazol antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu görülmüştür. Peynir örneklerinde ise analize alınan örneklerde *C. difficile* varlığı tespit edilememiştir. Süt örneklerinden elde edilen izolat sayısının azlığı ile birlikte peynir örneklerinde *C. difficile*'nin belirlenememiş olması *C. difficile* açısından sütlerin halen risk taşıdığı gerçeğini değiştirmemektedir. Alınan süt ve peynir örnekleri sınırlı alandan alınmış örneklerden oluşmaktadır. Daha çeşitli alanlardan toplanmış süt ve çeşitli üretim teknikleri ile üretilmiş farklı peynirlerinde analize katıldığı çalışmalar yapılmalıdır. Ayrıca gıdalardan *C. difficile* izolasyonlarında kullanılan ortak ve etkin bir izolasyon yöntemin geliştirilmesi gerekmektedir.

*C. difficile* sporları enfeksiyonlarının aktarılmasında temel risk faktörüdür ve vejetatif formunun zorunlu anaerobik yapısı sebebi ile gıdalarda spor formunda bulunmaktadır. Çalışmada izole edilen *C. difficile* suşlarının ve standart *C. difficile* suşlarının sporlarının süt içerisinde 5 farklı sıcaklık değerinde 60 dakikalık sıcaklık uygulamalarına dirençleri araştırılmıştır. İki farklı matematiksel modelleme kullanılarak elde edilen termal direnç değerleri karşılaştırılmış ve sıcaklık artışına bağlı olarak bakteri

sporlarının termal direnç grafiklerinin doğrusallıktan uzaklaştığı görülmüştür. Sıcaklık arttıkça termal direnç değerlerinin belirlenmesinde Weibull modelinin daha uygun olduğu belirlenmiştir. Uygulanan termal işlemlerinin süt içerisindeki sporlar üzerinde yıkıcı etkilerinin gözlemlenebilmesi için ileri görüntüleme tekniklerinin kullanılması önerilmektedir.

*C. difficile* sporlarının sütlerden elimine edilebilmesi için ısı işlem uygulamasının dışında termal olmayan bir işlem olarak baktöfugasyon işlemi uygulanmıştır. Çalışmada baktöfugasyon için kullanılan farklı santrifüj hızları ve sürelerinin *C. difficile*'nin sütlerden eliminasyonu üzerine etkisi belirlenememiştir. Baktöfugasyonun sütlerde *C. difficile* üzerine etkinliğinin artırılabilmesi amacıyla ısı işlem veya farklı teknikler ile birlikte kullanımı önerilmektedir. Ayrıca standart spor oluşturan bir başka mikroorganizma ile baktöfugasyonun etkinliğinin kontrol edilmesi önerilmektedir.

*C. difficile*'nin vejetatif hücrelerinin bağırsak mikrobiyotasında probiyotikler ile yaşam alanları ve besinler dahil çeşitli alanlarda rekabet halindedir. Ayrıca probiyotikler tarafından üretilen çeşitli antimikrobiyal bileşiklerin de *C. difficile* üzerine inhibisyon etkileri bilinmektedir. Bu amaçla fermente gıda üretiminde kullanılan probiyotik kültürler, ticari kültür ve standart probiyotik kültürlerin *C. difficile* üzerine etkileri araştırılmıştır. En yüksek inhibisyon zonunun ticari bir kültür olan NBL (78,96 mm) 'ye ait olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma göstermektedir ki *C. difficile* üzerine probiyotiklerin etkisi hem probiyotiklerin hem de *C. difficile* suşuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Çalışmamızda ayrıca bu probiyotiklerin inhibisyon etkisinin hangi tip bileşiklerden kaynaklandığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar probiyotiklerin temel inhibisyon etkisinin asidik karakterli bileşiklerden kaynaklandığı ancak baktoriyosin ve çeşitli sıcaklığa dayanıklı bileşiklerin de inhibisyon etkisine katkı sağladığı belirlenmiştir. Probiyotiklerin direkt olarak kullanımlarının araştırılabilmesi için in-vivo çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca probiyotikler tarafından üretilen ve inhibisyona katkı sağlayan bileşikleri ayrıntılı şekilde karakterize edilmesi önerilmektedir.

Son bölümde *C. difficile*'nin bir gıda içerisinde varlığının izlenmesi ve peynir içerisinde gelişen asitlik ve kullanılan kültürlerle ait antimikrobiyal etkiler incelenmiştir. Fermente bir gıda olan peynir içerisinde *C. difficile*'nin hayatta kalmasının incelenmesi amacı ile starter kültür varlığında ve yokluğunda peynir üretimleri gerçekleştirilmiştir. Üretilen peynirler 90 günlük bir depolama ile üretim ve depolama süresince fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikler açısından incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar starter kültür kullanımının pH ve % laktik asit gibi değerler açısından kontrol gruplarından farklılaştığını ve aynı zamanda *C. difficile* üzerinde 1 logaritmik birimlik bir azalma sağladığı belirlenmiştir. *C. difficile*'nin gıdalar içerisinde gıda bileşenlerinden ve *C. difficile* ile birlikte bulunan diğer mikroorganizmalardan nasıl etkileneceğine yönelik çalışmaların artırılması gerekmektedir.

Sonuç olarak

- *C. difficile* enfeksiyonlarında gıdaların rolünün anlaşılabilmesi için farklı gıda gruplarını da kapsayacak şekilde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca bu araştırmaların yürütülmesinde ve sonuçların ortak olarak değerlendirilebilmesi amacı ile ortak bir izolasyon yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır.
- Süt içerisinde *C. difficile* sporlarının inaktivasyonu için ısı işlem halen etkin bir yöntemdir. Süte uygulanacak ısı işleminin sıcaklık ve süre değerlerinin doğru şekilde tespit edilmesi de büyük önem taşımaktadır. Weibull matematiksel yöntemi ise süt içerisinde *C. difficile* sporlarının termal dirençlerinin belirlenmesinde etkin sıcaklık ve sürenin hesaplanmasında kullanım potansiyeline sahiptir.
- Süte uygulanan baktöfugasyon işleminin *C. difficile* sporlarının süttten uzaklaştırılmasında tek başına yeterli olmadığı ve başka yöntemler ile kombinasyonlarının etkinin artırılmasında katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

- İn-vitro olarak *C. difficile* üzerine çeşitli probiyotiklerin suşa bağlı olarak etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu etkin bulunan suşların *C. difficile* enfeksiyonlarında tedaviye destek olarak kullanım potansiyellerinin bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca *C. difficile* üzerine etkisi belirlenen suşların içerisinde fermente gıdaların üretiminde kullanılan suşların yer alması bu kültürler ile üretilen gıdaların da *C. difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde tedaviye ek gıda takviyesi olarak kullanım potansiyeline göstermektedir.
- Peynir üretiminde kullanılan starter kültürlerin peynirlerin üretim ve depolama süresince *C. difficile* sporlarının inaktivasyonuna katkı sağladığı belirlenmiştir. Peynirler starter kültür ile üretilmemiş olsalar bile süt içerisinde doğal olarak var olan laktik asit bakterilerinin *C. difficile* üzerine az miktarda da olsa inhibisyon etkisine sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuçlarımız peynirlerin *C. difficile* enfeksiyonlarının tedavisine probiyotik destek olarak kullanılabilme potansiyeli olduğunu düşündürmektedir.

## KAYNAKÇA

- Abad-Fau, A., Sevilla, E., Martín-Burriel, I., Moreno, B., Bolea, R. (2023). "Update on Commonly Used Molecular Typing Methods for *Clostridioides difficile*". *Microorganisms*, 11(7), 1752. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071752>.
- Abarquero, D., Bodelón, R., Flórez, A. B., Fresno, J. M., Renes, E., Mayo, B., Tornadijo, M. E. (2023). "Technological and safety assessment of selected lactic acid bacteria for cheese starter cultures design: Enzymatic and antimicrobial activity, antibiotic resistance and biogenic amine production". *Lwt*, 180. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114709>.
- Abdel-Hamid, A. M., El-Prince, E., Abdel-Haleem, A. A., Amin, M. M. (2011). "Prevalence of *Clostridium* Species in Concentrated and Dried Milk". *Assiut Veterinary Medical Journal*, 57(131), 1-12. <https://doi.org/10.21608/avmj.2011.176913>.
- Adamu, B. O., ve Lawley, T. D. (2013). "Bacteriotherapy for the treatment of intestinal dysbiosis caused by *Clostridium difficile* infection". *Current Opinion in Microbiology*, 16(5), 596-601. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.009>.
- Agnoletti, F., Arcangeli, G., Barbanti, F., Barco, L., Brunetta, R., Cocchi, M., Conedera, G., D'Este, L., Drigo, I., Spigaglia, P., Mazzolini, E. (2019). "Survey, characterization and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* from marine bivalve shellfish of North Adriatic Sea". *International Journal of Food Microbiology*, 298(February), 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.003>.
- Aktaş, M. H., Erdoğan, A., Çetin, B. (2023). "Bacteriocin characterization of autochthonous *Lactococcus lactis* L54 and its application as starter culture for Beyaz cheese". *Food Bioscience*, 53(May). <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102739>.
- Aktories, K., Papatheodorou, P., Schwan, C. (2018). "Binary *Clostridium difficile* toxin (CDT) - A virulence factor disturbing the cytoskeleton". *Anaerobe*, 53, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.03.001>.
- Aktories, K., Schwan, C., Jank, T. (2017). "Toxin Biology". *Annual Review of Microbiology*, 71(1), 281-307.



- Alam, M. J., Anu, A., Walk, S. T., Garey, K. W. (2014). "Investigation of potentially pathogenic *Clostridium difficile* contamination in household environs". *Anaerobe*, 27, 31-33. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.03.002>.
- Alam, M. J., McPherson, J., Miranda, J., Thrall, A., Ngo, V., Kessinger, R., Begum, K., Marin, M., Garey, K. W. (2019). "Molecular epidemiology of *Clostridioides difficile* in domestic dogs and zoo animals". *Anaerobe*, 59, 107-111. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.06.005>.
- Androga, G. O., Knight, D. R., Lim, S. C., Foster, N. F., Riley, T. V. (2018). "Antimicrobial resistance in large clostridial toxin-negative, binary toxin-positive *Clostridium difficile* ribotypes". *Anaerobe*, 54, 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.07.007>.
- Anjuwon-Foster, B. R., ve Tamayo, R. (2017). "A genetic switch controls the production of flagella and toxins in *Clostridium difficile*". *PLoS Genetics*, 13(3), 1-33. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006701>.
- Antikainen, J., Pasanen, T., Mero, S., Tarkka, E., Kirveskari, J., Kotila, S., Mentula, S., KÖnÖnen, E., Virolainen-Julkunen, A. R., Vaara, M., Tissari, P. (2009). "Detection of virulence genes of *Clostridium difficile* by multiplex PCR". *Apmis*, 117(8), 607-613. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02509>.
- Anusha, M., Tejaswini, V., Udhaya Kumar, S., Prashantha, C. N., Vasudevan, K., George Priya Doss, C. (2023). "Gene network interaction analysis to elucidate the antimicrobial resistance mechanisms in the *Clostridium difficile*". *Microbial Pathogenesis*, 178, 106083. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106083>.
- Arora, J., Oudit, D., Austin, J. W., Ramaswamy, H. S. (2019). "Evaluation of thermal destruction kinetics of *Clostridium difficile* spores (ATCC 17857) in lean ground beef with first-order/Weibull modeling considerations". *Journal of Food Process Engineering*, 42(7), 1-11. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13273>.
- Attia, A. E. T. (2021). "Retail chicken meats as potential sources of *Clostridioides difficile* in Al-Jouf, Saudi Arabia". *Journal of Infection in Developing Countries*, 15(7), 972-978. <https://doi.org/10.3855/jidc.13624>.

- Avbersek, J., Janezic, S., Pate, M., Rupnik, M., Zidaric, V., Logar, K., Vengust, M., Zemljic, M., Pirs, T., Ocepek, M. (2009). "Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia". *Anaerobe*, 15(6), 252-255. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.07.004>.
- Avberšek, J., Pirš, T., Pate, M., Rupnik, M., Ocepek, M. (2014). "*Clostridium difficile* in goats and sheep in Slovenia: Characterisation of strains and evidence of age-related shedding". *Anaerobe*, 28, 163-167. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.06.009>
- Ávila, M., Calzada, J., Muñoz-Tébar, N., Sánchez, C., Ortiz de Elguea-Culebras, G., Carmona, M., Molina, A., Berruga, M. I., Garde, S. (2023). "Inhibitory activity of aromatic plant extracts against dairy-related *Clostridium* species and their use to prevent the late blowing defect of cheese". *Food Microbiology*, 110(August 2022). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104185>.
- Ávila, M., Gómez-Torres, N., Delgado, D., Gaya, P., Garde, S. (2016). "Application of high pressure processing for controlling *Clostridium tyrobutyricum* and late blowing defect on semi-hard cheese". *Food microbiology*, 60, 165-173.
- Baban, S. T., Kuehne, S. A., Barketi-Klai, A., Cartman, S. T., Kelly, M. L., Hardie, K. R., Kansau, I., Collignon, A., Minton, N. P. (2013). "The Role of Flagella in *Clostridium difficile* Pathogenesis: Comparison between a Non-Epidemic and an Epidemic Strain". *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073026>.
- Bacheno, H., Ahmadi, M., Fazeli, F., Ariaai, P. (2022). "*Clostridioides difficile* in Foods with Animal Origins; Prevalence, Toxigenic Genes, Ribotyping Profile, and Antimicrobial Resistance". *Journal of Food Quality*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/4868409>.
- Bainum, T. B., Reveles, K. R., Hall, R. G., Cornell, K., Alvarez, C. A. (2023). "Controversies in the Prevention and Treatment of *Clostridioides difficile* Infection in Adults: A Narrative Review". *Microorganisms*, 11(2), 1-22. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020387>.
- Bakker, D., Corver, J., Harmanus, C., Goorhuis, A., Keessen, E. C., Fawley, W. N., Wilcox, M. H., Kuijper, E. J. (2010). "Relatedness of human and animal *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 isolates determined on the basis of multilocus variable-number

- tandem-repeat analysis and tetracycline resistance”. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(10), 3744-3749. <https://doi.org/10.1128/JCM.01171-10>.
- Bandelj, P., Blagus, R., Briski, F., Frlic, O., Vergles Rataj, A., Rupnik, M., Ocepek, M., Vengust, M. (2016). “Identification of risk factors influencing *Clostridium difficile* prevalence in middle-size dairy farms”. *Veterinary Research*, 47(1), 0-11. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0326-0>.
- Barbut, F. (2015). “How to eradicate *Clostridium difficile* from the environment”. *Journal of Hospital Infection*, 89(4), 287-295. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.12.007>.
- Bartlett, J. G. (2008). “Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infection”. *Clinical Infectious Diseases*, 46. <https://doi.org/10.1086/521865>.
- Begley, M., Hill, C., Gahan, C. G. M. (2006). “Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics”. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729-1738. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1729-1738.2006>.
- Bergere, J. L., Le Bars, D., Commissaire, J. (1969). “La bactofugation du lait et l'élimination des spores de *Clostridium tyrobutyricum*”. *Le Lait*, 49(488), 507-519. <https://doi.org/10.1051/lait:196948820>.
- Bhaduri, S., Smith, P. W., Palumbo, S. A., Turner-Jones, C. O., Smith, J. L., Marmer, B. S., Buchanan, R. L., Zaika, L. L., Williams, A. C. (1991). “Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in liver sausage slurry”. *Food Microbiology*, 8(1), 75-78. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(91\)90019-X](https://doi.org/10.1016/0740-0020(91)90019-X).
- Bilgin, M. G., Bayır Güneş, A., Özkan, B. (2023). “İstanbul’da Satışa Sunulan Beyaz Peynirlerde Bazı Kimyasal Parametrelerinin Değerlendirilmesi”. *Akademik Et ve Süt Kurumu Dergisi*, 5, 4-9.
- Bingol, E. B., Hampikyan, H., Muratoglu, K., Akkaya, E., Cetin, O., Colak, H. (2020). “Characterisation and antibiotic susceptibility profile of *Clostridioides (Clostridium) difficile* isolated from chicken carcasses”. *Journal of Veterinary Research*, 64(3), 407-412. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0052>.
- Blanco, N., Robinson, G. L., Heil, E. L., Perlmutter, R., Wilson, L. E., Brown, C. H., Heavner, M. S., Nadimpalli, G., Lemkin, D., Morgan, D. J., Leekha, S. (2021). “Impact of a *C. difficile* infection (CDI) reduction bundle and its components on

- CDI diagnosis and prevention”. American Journal of Infection Control, 49(3), 319-326. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.10.020>.
- Blasi, F., Lovito, C., Albini, E., Bano, L., Dalmonte, G., Drigo, I., Maresca, C., Massacci, F. R., Orsini, S., Primavilla, S., Scoccia, E., Tofani, S., Forte, C., Magistrali, C. F. (2021). “*Clostridioides difficile* in calves in central Italy: Prevalence, molecular typing, antimicrobial susceptibility and association with antibiotic administration”. *Animals*, 11(2), 1-15. <https://doi.org/10.3390/ani11020515>.
- Blau, K., ve Gallert, C. (2023). “Prevalence, Antimicrobial Resistance and Toxin-Encoding Genes of *Clostridioides difficile* from Environmental Sources Contaminated by Feces”. *Antibiotics*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010162>.
- Bogovič Matijašić, B., Koman Rajšp, M., Perko, B., Rogelj, I. (2007). “Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*”. *International Dairy Journal*, 17(2), 157-166. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.01.011>.
- Bojesen, A. M., Olsen, K. E. P., Bertelsen, M. F. (2006). “Fatal enterocolitis in Asian elephants (*Elephas maximus*) caused by *Clostridium difficile*”. *Veterinary Microbiology*, 116(4), 329-335. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.025>.
- Bolton, D., ve Marcos, P. (2023). “The Environment, Farm Animals and Foods as Sources of *Clostridioides difficile* Infection in Humans”. *Foods*, 12(5), 1094. <https://doi.org/10.3390/foods12051094>.
- Britton, R. A., ve Young, V. B. (2014). “Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*”. *Gastroenterology*, 146(6), 1547-1553. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.059>.
- Brouwer, M. S. M., Roberts, A. P., Hussain, H., Williams, R. J., Allan, E., Mullany, P. (2013). “Horizontal gene transfer converts non-toxigenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers”. *Nature Communications*, 4, 1-6. <https://doi.org/10.1038/ncomms3601>.
- Burtscher, J., Rudavsky, T., Zitz, U., Neubauer, V., Domig, K. J. (2023). “Importance of Pre-Milking Udder Hygiene to Reduce Transfer of *Clostridial* Spores from Teat Skin to Raw Milk”. *Microorganisms*, 11(5), 1-15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051337>.

- Candel-Pérez, C., Ros-Berruezo, G., Martínez-Graciá, C. (2019). “A review of *Clostridioides [Clostridium] difficile* occurrence through the food chain”. *Food Microbiology*, 77, 118-129. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.08.012>.
- CDC. (2019). “Antibiotic resistance threats in the United States, 2019”. Centers for Disease Control and Prevention. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>
- Cerf, O. (1977). “Tailing of survival curves of bacteria spores Tailing of Survival Curves of Bacterial Spores”. *Journal of applied Bacteriology*, 42, 1-19.
- Chen, H. (2007). “Use of linear, Weibull, and log-logistic functions to model pressure inactivation of seven foodborne pathogens in milk”. *Food Microbiology*, 24(3), 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.06.004>
- Chen, H., ve Hoover, D. G. (2004). “Use of Weibull model to describe and predict pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk”. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5(3), 269-276. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.03.002>.
- Chiu, C. W., Tsai, P. J., Lee, C. C., Ko, W. C., Hung, Y. P. (2021). “Inhibition of spores to prevent the recurrence of *Clostridioides difficile* infection - A possibility or an improbability?”. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2021.06.002>
- Clooten, J., Kruth, S., Arroyo, L., Weese, J. S. (2008). “Prevalence and risk factors for *Clostridium difficile* colonization in dogs and cats hospitalized in an intensive care unit”. *Veterinary Microbiology*, 129(1-2), 209-214. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.013>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*. Approved Standard-eighth edition. CLSI document M11-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2023). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility M100*. 33rd Editions Clinical and Laboratory Standards.
- Coelho, M. C., Silva, C. C. G., Ribeiro, S. C., Dapkevicius, M. L. N. E., Rosa, H. J. D. (2014). “Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic

- acid bacteria". *International Journal of Food Microbiology*, 191, 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.029>.
- Cohen, S. H., Tang, Y. J., Silva, J. (2000). "Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains". *Journal of Infectious Diseases*, 181(2), 659-663. <https://doi.org/10.1086/315248>.
- Coimbra-Gomes, J., Reis, P. J. M., Tavares, T. G., Faria, M. A., Malcata, F. X., Macedo, A. C. (2023). "Evaluating the Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Implicated in Natural Fermentation of Table Olives, cv. Cobrançosa". *Molecules*, 28(8). <https://doi.org/10.3390/molecules28083285>
- Cremonesi, P., Vanoni, L., Silvetti, T., Morandi, S., Brasca, M. (2012). "Identification of *Clostridium beijerinckii*, *Cl. butyricum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum* isolated from silage, raw milk and hard cheese by a multiplex PCR assay". *Journal of Dairy Research*, 79(3), 318-323. <https://doi.org/10.1017/S002202991200026X>.
- Crobach, M. J. T., Planche, T., Eckert, C., Barbut, F., Terveer, E. M., Dekkers, O. M., Wilcox, M. H., Kuijper, E. J. (2016). "European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection". *Clinical Microbiology and Infection*, 22, S63-S81. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.010>.
- Cuffia, F., George, G., Renzulli, P., Reinheimer, J., Meinardi, C., Burns, P. (2017). "Technological challenges in the production of a probiotic pasta filata soft cheese". *Lwt*, 81, 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.039>
- De Boer, E., Zwartkruis-Nahuis, A., Heuvelink, A. E., Harmanus, C., Kuijper, E. J. (2011). "Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in The Netherlands". *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 561-564. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.007>.
- Demirel, N. N. (2004). "Salamuralı (İzmir) tulum peynirinde *Staphylococcus aureus* üremesine ve enterotoksin oluşturmasına farklı inokulasyon aşamalarının ve tuz konsantrasyonlarının etkisi". Doktora Tezi. Ege Üniversitesi. İzmir Türkiye.
- Denève, C., Janoir, C., Poilane, I., Fantinato, C., Collignon, A. (2009). "New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis". *International Journal of*

- Antimicrobial Agents, 33(1), 24-28. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(09\)70012-3](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(09)70012-3).
- Deng, K., Plaza-Garrido, A., Torres, J. A., Paredes-Sabja, D. (2015). “Survival of *Clostridium difficile* spores at low temperatures”. Food Microbiology, 46, 218-221. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.022>.
- Deng, K., Talukdar, P. K., Sarker, M. R., Paredes-Sabja, D., Torres, J. A. (2017). “Survival of *Clostridium difficile* spores at low water activity”. Food Microbiology, 65, 274-278. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.013>.
- Dharmasena, M., Wei, T., Bridges, W. C., Jiang, X. (2019). “Thermal resistance of *Clostridium difficile* endospores in dairy compost upon exposure to wet and dry heat treatments”. Journal of Applied Microbiology, 127(1), 274-283. <https://doi.org/10.1111/jam.14295>.
- D’Incecco, P., Bettera, L., Bancalari, E., Rosi, V., Sindaco, M., Gobbi, S., Candotti, P., Nazzicari, N., Limbo, S., Gatti, M., Pellegrino, L. (2023). “High-speed cold centrifugation of milk modifies the microbiota, the ripening process and the sensory characteristics of raw-milk hard cheeses”. Food Research International, 172, 113102. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113102>.
- D’Incecco, P., Pellegrino, L., Hogenboom, J. A., Cocconcelli, P. S., Bassi, D. (2018). “The late blowing defect of hard cheeses: Behaviour of cells and spores of *Clostridium tyrobutyricum* throughout the cheese manufacturing and ripening”. LWT- Food Science and Technology, 87, 134-141. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.083>.
- Dilnessa, T., Getaneh, A., Hailu, W., Moges, F., Gelaw, B. (2022). “Prevalence and antimicrobial resistance pattern of *Clostridium difficile* among hospitalized diarrheal patients: A systematic review and meta-analysis”. PLoS ONE, 17(1 January), 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262597>.
- Dost, I., Abdel-Glil, M., Schmoock, G., Menge, C., Berens, C., González-Santamarina, B., Wiegand, E., Neubauer, H., Schwarz, S., Seyboldt, C. (2023). “*Clostridioides difficile* in South American Camelids in Germany: First Insights into Molecular and Genetic Characteristics and Antimicrobial Resistance”. Antibiotics, 12(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010086>.

- Doyle, C. J., Gleeson, D., Jordan, K., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Cotter, P. D. (2015). “Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products”. *International Journal of Food Microbiology*, 197, 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.022>.
- Doyle, M. E. (2013). “*Clostridium difficile* as a risk associated with animal sources”. Food Research Institute (FRI).
- D’Souza, A. L., Rajkumar, C., Cooke, J., Bulpitt, C. J. (2002). “Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: Meta-analysis”. *British Medical Journal*, 324(7350), 1361-1364. <https://doi.org/10.1136/bmj.324.7350.1361>.
- Dudzicz, S., Kujawa-Szewieczek, A., Kwiecień, K., Więcek, A., Adamczak, M. (2018). “*Lactobacillus plantarum* 299v reduces the incidence of *Clostridium difficile* infection in nephrology and transplantation ward—Results of one year extended study”. *Nutrients*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/nu10111574>.
- Eckert, C., Burghoffer, B., Barbut, F. (2013). “Contamination of ready-to-eat raw vegetables with *Clostridium difficile* in France”. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 1435-1438. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.056358-0>.
- Eckert, C., Emirian, A., Le Monnier, A., Cathala, L., De Montclos, H., Goret, J., Berger, P., Petit, A., De Chevigny, A., Jean-Pierre, H., Nebbad, B., Camiade, S., Meckenstock, R., Lalande, V., Marchandin, H., Barbut, F. (2015). “Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B”. *New Microbes and New Infections*, 3, 12-17. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2014.10.003>.
- Edwards, A. N., Karim, S. T., Pascual, R. A., Jowhar, L. M., Anderson, S. E., McBride, S. M. (2016). “Chemical and stress resistances of *Clostridium difficile* spores and vegetative cells”. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01698>.
- Erkaya-Kotan, T., Gürbüz, Z., Dağdemir, E., Şengül, M. (2023). “Utilization of edible coating based on quince seed mucilage loaded with thyme essential oil: Shelf life, quality, and ACE-inhibitory activity efficiency in Kaşar cheese”. *Food Bioscience*, 54, 102895. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102895>.



- Esfandiari, Z., Jalali, M., Ezzatpanah, H., Weese, J. S., Chamani, M. (2014). "Prevalence and characterization of *Clostridium difficile* in beef and mutton meats of Isfahan Region, Iran". *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(8), 1-5. <https://doi.org/10.5812/jjm.16771>.
- Eugster, E., ve Jakob, E. (2019). "Pre-treatments of Milk and their Effect on the Food Safety of Cheese". *Milk Science International*, 72(72), 45-52.
- Faccia, M. (2013). "Influence of the Milk Bactofugation and Natural Whey Culture on the Microbiological and Physico-Chemical Characteristics of Mozzarella Cheese". *Journal of Food Processing and Technology*, 04(04). <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000218>.
- Farkye, N. Y. (2004). "Cheese technology". *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 91-98. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00146.x>.
- Flock, G. (2017). "*Clostridium difficile: A Study on its Potential as a Food-borne Pathogen and Strategies for Controlling its Transmission*". Doktora Tezi, University of Connecticut. ABD.
- Fredua-Agyeman, M., Stapleton, P., Basit, A. W., Beezer, A. E., Gaisford, S. (2017). "In vitro inhibition of *Clostridium difficile* by commercial probiotics: A microcalorimetric study". *International Journal of Pharmaceutics*, 517(1-2), 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.005>.
- Fusco, V., Chieffi, D., Fanelli, F., Logrieco, A. F., Cho, G. S., Kabisch, J., Böhnlein, C., Franz, C. M. A. P. (2020). "Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 2013-2049. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12568>
- Garde, S., Arias, R., Gaya, P., Nuñez, M. (2011). "Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: Identification and characterization of isolates". *International Dairy Journal*, 21(4), 272-278. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.003>.
- Garde, S., Ávila, M., Arias, R., Gaya, P., Nuñez, M. (2011). "Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine

- milk cheese”. *International Journal of Food Microbiology*, 150(1), 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.018>.
- Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P., Van Impe, J. F. (2005). “GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves”. *International Journal of Food Microbiology*, 102(1), 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.038>
- Gerding, D. N., Muto, C. A., Owens, R. C. (2008). “Measures to control and prevent *Clostridium difficile* infection”. *Clinical Infectious Diseases*, 46(1), 43-49. <https://doi.org/10.1086/521861>.
- Geric, B., Carman, R. J., Rupnik, M., Genheimer, C. W., Sambol, S. P., Lyerly, D. M., Gerding, D. N., Johnson, S. (2006). “Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters”. *Journal of Infectious Diseases*, 193(8), 1143-1150. <https://doi.org/10.1086/501368>.
- Goldstein, E. J. C., Johnson, S. J., Maziade, P. J., Evans, C. T., Sniffen, J. C., Millette, M., McFarland, L. V. (2017). “Probiotics and prevention of *Clostridium difficile* infection”. *Anaerobe*, 45, 114-119. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.12.007>.
- Golić, N., Veljović, K., Popović, N., Djokić, J., Strahinić, I., Mrvaljević, I., Terzić-Vidojević, A. (2017). “In vitro and in vivo antagonistic activity of new probiotic culture against *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens*”. *BMC Microbiology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1015-5>.
- González, L., ve Zárate, V. (2015). “Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* TF711 against *Clostridium sporogenes* when used as adjunct culture in cheese manufacture”. *Journal of Dairy Research*, 82(2), 236-241. <https://doi.org/10.1017/S0022029915000126>.
- Gould, L. H., ve Limbago, B. (2010). “*Clostridium difficile* in food and domestic animals: A new foodborne pathogen”. *Clinical Infectious Diseases*, 51(5), 577-582. <https://doi.org/10.1086/655692>.
- Grenda, T., Grenda, A., Domaradzki, P., Krawczyk, P., Kwiatek, K. (2022). “Probiotic Potential of *Clostridium spp.*—Advantages and Doubts”. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(7), 3118-3130. <https://doi.org/10.3390/cimb44070215>.

- Gunaratnam, S., Millette, M., McFarland, L. V., DuPont, H. L., Lacroix, M. (2021). "Potential role of probiotics in reducing *Clostridioides difficile* virulence: Interference with quorum sensing systems". *Microbial Pathogenesis*, 153, 104798. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104798>.
- Guran, H. S., ve Ilhak, O. I. (2015). "*Clostridium difficile* in retail chicken meat parts and liver in the Eastern Region of Turkey". *Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 10(4), 359-364. <https://doi.org/10.1007/s00003-015-0950-z>.
- Gurian, L., Ward, T. T., Katon, R. M. (1982). "Possible Foodborne Transmission in a Case of Pseudomembranous Colitis Due to *Clostridium difficile*: Influence of Gastrointestinal Secretions on *Clostridium difficile* Infection". *Gastroenterology*, 83(2), 465-469. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(82\)80345-4](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(82)80345-4).
- Hadef, S., Idoui, T., Sifour, M., Genay, M., Dary-Mourrot, A. (2022). "Screening of Wild Lactic Acid Bacteria from Algerian Traditional Cheeses and Goat Butter to Develop a New Probiotic Starter Culture". *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 387-399. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-10000-2>.
- Hammitt, M. C., Bueschel, D. M., Keel, M. K., Glock, R. D., Cuneo, P., DeYoung, D. W., Reggiardo, C., Trinh, H. T., Songer, J. G. (2008). "A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis". *Veterinary Microbiology*, 127(3-4), 343-352. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.09.002>
- Hampikyan, H., Bingol, E. B., Muratoglu, K., Akkaya, E., Cetin, O., Colak, H. (2018). "The prevalence of *Clostridium difficile* in cattle and sheep carcasses and the antibiotic susceptibility of isolates". *Meat Science*, 139, 120-124. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.01.020>.
- Harvey, R. B., Norman, K. N., Andrews, K., Hume, M. E., Scanlan, C. M., Callaway, T. R., Anderson, R. C., Nisbet, D. J. (2011). "*Clostridium difficile* in poultry and poultry meat". *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(12), 1321-1323. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0936>.
- Hassan, H. F., Ramaswamy, H. S. (2011). "Heat resistance of *G. stearothermophilus* and *C. sporogenes* in carrot and meat alginate purees". *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(3), 376-385. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00519.x>.

- Hazarika, R., Sarmah, H., Doley, M. K., Saikia, D. P., Hazarika, G., Barkalita, L. M., Deka, P., Manoharan, S., Sharma, R. K. (2023). “*Clostridioides difficile* in food and food products of animal origin in Assam, India”. *Anaerobe*, 81, 102723. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2023.102723>.
- Heise, J., Witt, P., Maneck, C., Wichmann-Schauer, H., Maurischat, S. (2021). “Prevalence and phylogenetic relationship of *Clostridioides difficile* strains in fresh poultry meat samples processed in different cutting plants”. *International Journal of Food Microbiology*, 339, 109032. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109032>.
- Hell, M., Bernhofer, C., Stalzer, P., Kern, J. M., Claassen, E. (2013). “Probiotics in *Clostridium difficile* infection: Reviewing the need for a multistrain probiotic”. *Beneficial Microbes*, 4(1), 39-51. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0049>
- Hensgens, M. P. M., Keessen, E. C., Squire, M. M., Riley, T. V., Koene, M. G. J., De Boer, E., Lipman, L. J. A., Kuijper, E. J. (2012). “*Clostridium difficile* infection in the community: A zoonotic disease?”. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), 635-645. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03853.x>.
- Hofer, E., Haechler, H., Frei, R., Stephan, R. (2010). “Low occurrence of *Clostridium difficile* in fecal samples of healthy calves and pigs at slaughter and in minced meat in Switzerland”. *Journal of Food Protection*, 73(5), 973-975. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.5.973>.
- Hoover, D. G., ve Rodriguez-Palacios, A. (2013). “Transmission of *Clostridium difficile* in foods”. *Infectious Disease Clinics of North America*, 27(3), 675-685. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.05.004>.
- Hopman, N. E. M., Keessen, E. C., Harmanus, C., Sanders, I. M. J. G., van Leengoed, L. A. M. G., Kuijper, E. J., Lipman, L. J. A. (2011). “Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets”. *Veterinary Microbiology*, 149(1-2), 186-192. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.013>.
- Hopman, N. E. M., Oorburg, D., Sanders, I., Kuijper, E. J., Lipman, L. J. A. (2011). High occurrence of various *Clostridium difficile* PCR ribotypes in pigs arriving at the slaughterhouse. *Veterinary Quarterly*, 31(4), 179-181. <https://doi.org/10.1080/01652176.2011.649370>

- Islam, M. I., Seo, H., Redwan, A., Kim, S., Lee, S., Siddiquee, M., Song, H.-Y. (2022). “In Vitro and In Vivo Anti- *Clostridioides difficile* Effect of a Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* Strain”. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(1), 46-55. <https://doi.org/10.4014/jmb.2107.07057>.
- Janezic, S., Potocnik, M., Zidaric, V., Rupnik, M. (2016). “Highly divergent *Clostridium difficile* strains isolated from the environment”. *PLoS ONE*, 11(11), 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167101>.
- Janezic, S., Zidaric, V., Pardon, B., Indra, A., Kokotovic, B., Blanco, J. L., Seyboldt, C., Diaz, C. R., Poxton, I. R., Perreten, V., Drigo, I., Jiraskova, A., Ocepek, M., Weese, J. S., Songer, J. G., Wilcox, M. H., Rupnik, M. (2014). “International *Clostridium difficile* animal strain collection and large diversity of animal associated strains”. *BMC Microbiology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-173>.
- Janoir, C. (2016). “Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection”. *Anaerobe*, 37, 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.10.009>.
- Johanesen, P. A., Mackin, K. E., Hutton, M. L., Awad, M. M., Larcombe, S., Amy, J. M., Lyras, D. (2015). “Disruption of the gut microbiome: *Clostridium difficile* infection and the threat of antibiotic resistance”. *Genes*, 6(4), 1347-1360. <https://doi.org/10.3390/genes6041347>.
- Johnson, S., Maziade, P. J., McFarland, L. V., Trick, W., Donskey, C., Currie, B., Low, D. E., Goldstein, E. J. C. (2012). “Is primary prevention of *Clostridium difficile* infection possible with specific probiotics?”. *International Journal of Infectious Diseases*, 16(11), 776-782. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.06.005>.
- Johnston, B. C., Ma, S. S. Y., Goldenberg, J. Z., Thorlund, K., Vandvik, P. O., Loeb, M., Guyatt, G. H. (2012). “Probiotics for the Prevention of *Clostridium difficile* – Associated Diarrhea”. *Annals of Internal Medicine*, 157(12), 878. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-157-12-201212180-00563>.
- Joshi, L. T., Phillips, D. S., Williams, C. F., Alyousef, A., Baillie, L. (2012). “Contribution of spores to the ability of *Clostridium difficile* to adhere to surfaces”. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21), 7671-7679. <https://doi.org/10.1128/AEM.01862-12>

- Jöbstl, M., Heuberger, S., Indra, A., Nepf, R., Köfer, J., Wagner, M. (2010). “*Clostridium difficile* in raw products of animal origin”. *International Journal of Food Microbiology*, 138(1-2), 172-175. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.022>.
- Kabawanga, İ. T. (2017). “Süt İşletmesinde Beyaz ve Kaşar Peynir Üretim Sürecinin İzlenmesi”. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ankara Üniversitesi.
- Kachrimanidou, M., Tzika, E., Filioussis, G. (2019). “*Clostridioides (Clostridium) difficile* in food-producing animals, horses and household pets: A comprehensive review”. *Microorganisms*, 7(12), 11-13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120667>.
- Kamiya, S., Yamakawa, K., Ogura, H., Nakamura, S. (1989). “Recovery of spores of *Clostridium difficile* altered by heat”. *Heat or Alkali*, 28, 217-221.
- Karimi, R., Mortazavian, A. M., Amiri-Rigi, A. (2012a). “Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese”. *Food Microbiology*, 29(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.008>.
- Karimi, R., Mortazavian, A. M., Da Cruz, A. G. (2011). “Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review”. *Dairy Science and Technology*, 91, 283-308.
- Karimi, R., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M. (2012b). “Review Article: Sensory Characteristics of Probiotic Cheese”. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(5), 437-452. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00194.x>.
- Kasimoğlu, A., Göncüoğlu, M., Akgün, S. (2004). “Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*”. *International Dairy Journal*, 14(12), 1067-1073. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.04.006>.
- Keel, K., Brazier, J. S., Post, K. W., Weese, S., Songer, J. G. (2007). “Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species”. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 1963-1964. <https://doi.org/10.1128/JCM.00224-07>.
- Keessen, E. C., Gaastra, W., Lipman, L. J. A. (2011). “*Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities”. *Veterinary Microbiology*, 153(3-4), 205-217. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.020>.

- Khun, P. A., Phi, L. D., Bui, H. T. T., Bui, N. T., Vu, Q. T. H., Trinh, L. D., Collins, D. A., Riley, T. V. (2023). Environmental contamination with *Clostridioides (Clostridium) difficile* in Vietnam. *Journal of Applied Microbiology*, 134(6). <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad118>.
- Kılınç, B., Yılmaz, B. Ş., Gören, B. (2018). “İzmir’in farklı bölgelerinde satışa sunulan midye dolmaların mikrobiyolojik kalitesi”. *Acta Aquatica Turcica*, 14(4), 276-290.
- Klarin, B., Wullt, M., Palmquist, I., Molin, G., Larsson, A., Jeppsson, B. (2008). “*Lactobacillus plantarum* 299v reduces colonisation of in critically ill patients treated with antibiotics”. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 52(8), 1096-1102. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.2008.01748.x>.
- Knetsch, C. W., Kumar, N., Forster, S. C., Connor, T. R., Browne, H. P., Harmanus, C., Sanders, I. M., Harris, S. R., Turner, L., Morris, T., Perry, M., Miyajima, F., Roberts, P., Pirmohamed, M., Songer, J. G., Weese, J. S., Indra, A., Corver, J., Rupnik, M., Lawley, T. D. (2018). “Zoonotic transfer of *Clostridium difficile* harboring antimicrobial resistance between farm animals and humans”. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(3), 1-8. <https://doi.org/10.1128/JCM.01384-17>.
- Knight, D. R., ve Riley, T. V. (2019). “Genomic delineation of zoonotic origins of *Clostridium difficile*”. *Frontiers in Public Health*, 7, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00164>.
- Koene, M. G. J., Mevius, D., Wagenaar, J. A., Harmanus, C., Hensgens, M. P. M., Meetsma, A. M., Putirulan, F. F., van Bergen, M. A. P., Kuijper, E. J. (2012). “*Clostridium difficile* in Dutch animals: Their presence, characteristics and similarities with human isolates”. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(8), 778-784. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03651.x>.
- Kondepudi, K. K., Ambalam, P., Nilsson, I., Wadström, T., Ljungh, Å. (2012). “Prebiotic-non-digestible oligosaccharides preference of probiotic bifidobacteria and antimicrobial activity against *Clostridium difficile*”. *Anaerobe*, 18(5), 489-497. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.08.005>.

- Kosikowski, F. V., ve Fox, P. F. (1968). "Low heat, hydrogen peroxide, and bacto-fugation treatments of milk to control coliforms in cheddar cheese". *Journal of Dairy Science*, 51(7), 1018-1022.
- Kotila, S. M., Kuusi, M., KÄnÄnen, E., Virolainen, A., PitkÄnen, T., Miettinen, I. T., Brazier, J., Eerola, E., Jalava, J., Laine, J., Vuento, R. (2013). "*Clostridium difficile* contamination of public tap water distribution system during a waterborne outbreak in Finland". *Scandinavian Journal of Public Health*, 41(5), 541-545. <https://doi.org/10.1177/1403494813481648>.
- Krijger, I. M., Meerburg, B. G., Harmanus, C., Burt, S. A. (2019). "*Clostridium difficile* in wild rodents and insectivores in the Netherlands". *Letters in Applied Microbiology*, 69(1), 35-40. <https://doi.org/10.1111/lam.13159>.
- Lahtinen, S. J., Forssten, S., Aakko, J., Granlund, L., Rautonen, N., Salminen, S., Viitanen, M., Ouwehand, A. C. (2012). "Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM® modifies subpopulations of fecal lactobacilli and *Clostridium difficile* in the elderly". *Age*, 34(1), 133-143. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9208-6>.
- Lau, C. S., ve Chamberlain, R. S. (2016). "Probiotics are effective at preventing *Clostridium difficile*-associated diarrhea: A systematic review and meta-analysis". *International Journal of General Medicine*, 9, 27-37. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S98280>.
- Lawley, T. D., Croucher, N. J., Yu, L., Clare, S., Sebaihia, M., Gouling, D., Pickard, D. J., Parkhill, J., Choudhary, J., Dougan, G. (2009). "Proteomic and genomic characterization of highly infectious *Clostridium difficile* 630 spores". *Journal of Bacteriology*, 191(17), 5377-5386. <https://doi.org/10.1128/JB.00597-09>.
- Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L., Finegold, S. M. (2016). "Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938". *Anaerobe*, 40, 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>.
- Lee, J. S., Chung, M. J., Seo, J. G. (2013). "In vitro evaluation of antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Clostridium difficile*". *Toxicological Research*, 29(2), 99-106. <https://doi.org/10.5487/TR.2013.29.2.099>



- Li, J., Huang, Q., Zheng, X., Ge, Z., Lin, K., Zhang, D., Chen, Y., Wang, B., Shi, X. (2020). "Investigation of the Lactic Acid Bacteria in Kazak Cheese and Their Contributions to Cheese Fermentation". *Frontiers in Microbiology*, 11(March), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00228>
- Lim, S. C., Foster, N. F., Elliott, B., Riley, T. V. (2018). "High prevalence of *Clostridium difficile* on retail root vegetables, Western Australia". *Journal of Applied Microbiology*, 124(2), 585-590. <https://doi.org/10.1111/jam.13653>.
- Lim, S. C., Knight, D. R., Moono, P., Foster, N. F., Riley, T. V. (2020). "*Clostridium difficile* in soil conditioners, mulches and garden mixes with evidence of a clonal relationship with historical food and clinical isolates". *Environmental Microbiology Reports*, 12(6), 672-680. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12889>.
- Limbago, B., Thompson, A. D., Greene, S. A., MacCannell, D., MacGowan, C. E., Jolbitado, B., Hardin, H. D., Estes, S. R., Weese, J. S., Songer, J. G., Gould, L. H. (2012). "Development of a consensus method for culture of *Clostridium difficile* from meat and its use in a survey of U.S. retail meats". *Food Microbiology*, 32(2), 448-451. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.005>.
- Lund, B. M., ve Peck, M. W. (2015). "A possible route for foodborne transmission of *Clostridium difficile*? *Foodborne*". *Pathogens and Disease*, 12(3), 177-182. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1842>.
- Mani-López, E., Arriolja-Bretón, D., ve López-Malo, A. (2022). "The impacts of antimicrobial and antifungal activity of cell-free supernatants from lactic acid bacteria in vitro and foods". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(1), 604-641. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12872>.
- Mansour, N. M., Elkhatib, W. F., Aboshanab, K. M., Bahr, M. M. A. (2018). "Inhibition of *Clostridium difficile* in Mice Using a Mixture of Potential Probiotic Strains *Enterococcus faecalis* NM815, *E. faecalis* NM915, and *E. faecium* NM1015: Novel Candidates to Control *C. difficile* Infection (CDI)". *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(3), 511-522. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9285-7>.
- Marcos, P., Glennon, C., Whyte, P., Rogers, T. R., McElroy, M., Fanning, S., Frias, J., Bolton, D. (2023). "The effect of cold storage and cooking on the viability of

- Clostridioides difficile* spores in consumer foods”. *Food Microbiology*, 104215. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104215>.
- Marcos, P., Whyte, P., Burgess, C., Ekhlas, D., Bolton, D. (2022). “Detection and Genomic Characterisation of *Clostridioides difficile* from Spinach Fields”. *Pathogens*, 11(11), 1310. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111310>.
- Marcos, P., Whyte, P., Rogers, T., McElroy, M., Fanning, S., Frias, J., Bolton, D. (2021). “The prevalence of *Clostridioides difficile* on farms, in abattoirs and in retail foods in Ireland”. *Food Microbiology*, 98(February). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103781>
- Marsh, J. W., ve Harrison, L. H. (2015). “*Clostridium difficile*: A Food Safety Concern?”. *Antimicrobial Resistance and Food Safety: Methods and Techniques*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801214-7.00010-7>
- Marshall, A., McGrath, J. W., Graham, R., McMullan, G. (2023). “Food for thought-The link between *Clostridioides difficile* metabolism and pathogenesis”. *PLoS pathogens*, 19(1), e1011034. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011034>.
- Mazzantini, D., Calvigioni, M., Celandroni, F., Lupetti, A., Ghelardi, E. (2022). “In vitro assessment of probiotic attributes for strains contained in commercial formulations”. *Scientific Reports*, 12(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25688-z>.
- McFarland, L. V. (2009). “Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections”. *Anaerobe*, 15(6), 274-280. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.09.002>.
- McSharry, S., Koolman, L., Whyte, P., Bolton, D. (2021). “An investigation of the survival and/or growth of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in beef stored under aerobic, anaerobic and commercial vacuum packaging conditions at 2 °C and 20°C”. *Food Control*, 119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107475>.
- McVey, D. S., Kennedy, M., Chengappa, M. M., Wilkes, R. (2022). “Veterinary Microbiology”. *Australian Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1981.tb05783.x>.

- Metcalf, D. S., Costa, M. C., Dew, W. M. V., Weese, J. S. (2010). “*Clostridium difficile* in vegetables, Canada”. Letters in Applied Microbiology, 51(5), 600-602. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02933.x>.
- Mills, J. P., Rao, K., Young, V. B. (2018). “Probiotics for prevention of *Clostridium difficile* infection”. Current Opinion in Gastroenterology, 34(1), 3-10. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000410>.
- Monot, M., Eckert, C., Lemire, A., Hamiot, A., Dubois, T., Tessier, C., Dumoulard, B., Hamel, B., Petit, A., Lalande, V., Ma, L., Bouchier, C., Barbut, F., Dupuy, B. (2015). “*Clostridium difficile*: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus”. Scientific Reports, 5, 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep15023>.
- Monteiro, C. R. A. V., Do Carmo, M. S., Melo, B. O., Alves, M. S., Dos Santos, C. I., Monteiro, S. G., Bomfim, M. R. Q., Fernandes, E. S., Monteiro-Neto, V. (2019). “In vitro antimicrobial activity and probiotic potential of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* against species of *Clostridium*”. Nutrients, 11(2). <https://doi.org/10.3390/nu11020448>.
- Moore, P., Kyne, L., Martin, A., Solomon, K. (2013). “Germination efficiency of clinical *Clostridium difficile* spores and correlation with ribotype, disease severity and therapy failure”. Journal of Medical Microbiology, 62(2013), 1405-1413. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.056614-0>.
- Mooyottu, S., Flock, G., Kollanoor-Johny, A., Upadhyaya, I., Jayarao, B., Venkitanarayanan, K. (2015). “Characterization of a multidrug resistant *C. difficile* meat isolate”. International Journal of Food Microbiology, 192, 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.002>.
- Mu, Q., Tavella, V. J., Luo, X. M. (2018). “Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases”. Frontiers in Microbiology, 9, 1-17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00757>.
- Mugwanda, K., Hamese, S., Van Zyl, W. F., Prinsloo, E., Plessis, M. Du, Dicks, L. M. T., Thimiri Govinda Raj, D. B. (2023). “Recent advances in genetic tools for engineering probiotic lactic acid bacteria”. Bioscience Reports, 43(1), 1-27. <https://doi.org/10.1042/BSR20211299>.

- Na, X., ve Kelly, C. (2011). “Probiotics in *Clostridium difficile* Infection”. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 45(1),154-158.  
<https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31822ec787>.
- Napolitano, L. M., ve Edmiston, C. E. (2017). “*Clostridium difficile* disease: Diagnosis, pathogenesis, and treatment update”. *Surgery (United States)*, 162(2), 325-348.  
<https://doi.org/10.1016/j.surg.2017.01.018>.
- Norman, K. N., Harvey, R. B., Andrews, K., Hume, M. E., Callaway, T. R., Anderson, R. C., Nisbet, D. J. (2014). “Survey of *Clostridium difficile* in retail seafood in College Station, Texas”. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 31(6), 1127-1129.  
<https://doi.org/10.1080/19440049.2014.888785>.
- Numberger, D., Riedel, T., McEwen, G., Nübel, U., Frentrup, M., Schober, I., Bunk, B., Spröer, C., Overmann, J., Grossart, H. P., Greenwood, A. D. (2019). “Genomic analysis of three *Clostridioides difficile* isolates from urban water sources”. *Anaerobe*, 56, 22-26. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.01.002>.
- O’Grady, K., Knight, D. R., Riley, T. V. (2021). “Antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile*”. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 40(12), 2459-2478. <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04311-5>.
- Oie, S., Ohkusa, T., Kamiya, A., Okutani, A., Inoue, S. (2017). “Thermal inactivation of spores of *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Clostridium difficile*”. *Journal of Hospital Administration*, 6(5), 9.  
<https://doi.org/10.5430/jha.v6n5p9>.
- Oliveira, R. B. A., Baptista, R. C., Chinha, A. A. I. A., Conceição, D. A., Nascimento, J. S., Costa, L. E. O., Cruz, A. G., Sant’Ana, A. S. (2018). “Thermal inactivation kinetics of *Paenibacillus sanguinis* 2301083PRC and *Clostridium sporogenes* JCM1416MGA in full and low fat “requeijão cremoso””. *Food Control*, 84, 395-402. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.030>.
- Oliveira, R. B. A., Margalho, L. P., Nascimento, J. S., Costa, L. E. O., Portela, J. B., Cruz, A. G., Sant’Ana, A. S. (2016). “Processed cheese contamination by spore-forming

- bacteria: A review of sources, routes, fate during processing and control". Trends in Food Science and Technology, 57, 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.008>.
- Oren, A., ve Rupnik, M. (2018). "Clostridium difficile and Clostridioides difficile: Two validly published and correct names". Anaerobe, 52, 125-126. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.07.005>.
- Öner, Z., Gül Karahan, A., Aloğlu, H. (2006). "Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese during ripening". Lwt, 39(5), 449-454. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.03.015>.
- Öründü, S., ve Tarakçı, Z. (2021). "Effects of different starter culture applications pre- and post-scalding on the biochemical and sensory properties of pasta filata type cheeses". Lwt, 136. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110288>.
- Özcan Yardım, D., Durak, M. Z. (2023). "Identification of antihypertensive bioactive peptides in the herby and white cheeses produced from different milk types". European Food Research and Technology, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04293-y>.
- Özer, B., Kirmaci, H. A., Şenel, E., Atamer, M., Hayaloğlu, A. (2009). "Improving the viability of Bifidobacterium bifidum BB-12 and Lactobacillus acidophilus LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation". International Dairy Journal, 19(1), 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.07.001>.
- Pal, R., Athamneh, A. I. M., Deshpande, R., Ramirez, J. A. R., Adu, K. T., Muthuirulan, P., Pawar, S., Biazzo, M., Apidianakis, Y., Sundekilde, U. K., de la Fuente-Nunez, C., Martens, M. G., Tegos, G. P., Seleem, M. N. (2022). "Probiotics: insights and new opportunities for Clostridioides difficile intervention". Critical Reviews in Microbiology, 1-21. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2022.2072705>.
- Paper, F. A. O. F. (202M.S.). "Probiotics in food, healths and nutritional properties and guidelines for evaluation". FAO Food and Nutrition Paper, 50.
- Pasquale, V., Romano, V. J., Rupnik, M., Dumontet, S., Čižnár, I., Aliberti, F., Mauri, F., Saggiomo, V., Krovacek, K. (2011). "Isolation and characterization of Clostridium difficile from shellfish and marine environments". Folia Microbiologica, 56(5), 431-437. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0068-3>.

- Pasquale, V., Romano, V., Rupnik, M., Capuano, F., Bove, D., Aliberti, F., Krovacek, K., Dumontet, S. (2012). "Occurrence of toxigenic *Clostridium difficile* in edible bivalve molluscs". *Food Microbiology*, 31(2), 309-312. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.001>
- Peleg, M., ve Cole, M. B. (1998). "Reinterpretation of microbial survival curves". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(5), 353-380. <https://doi.org/10.1080/10408699891274246>.
- Peleg, M., ve Cole, M. B. (2000). "Estimating the survival of *Clostridium botulinum* spores during heat treatments". *Journal of Food Protection*, 63(2), 190-195. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.2.190>.
- Peng, Z., Jin, D., Kim, H. B., Stratton, C. W., Wu, B., Tang, Y. W., Suna, X. (2017). "Update on antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*: Resistance mechanisms and antimicrobial susceptibility testing". *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7), 1998-2008. <https://doi.org/10.1128/JCM.02250-16>.
- Piatek, J., Krauss, H., Ciechelska-Rybarczyk, A., Bernatek, M., Wojtyla-Buciora, P., Sommermeyer, H. (2020). "In-vitro growth inhibition of bacterial pathogens by probiotics and a synbiotic: Product composition matters". *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/ijerph17093332>.
- Pickering, D. S., Vernon, J. J., Freeman, J., Wilcox, M. H., Chilton, C. H. (2019). "Investigating the transient and persistent effects of heat on *Clostridium difficile* spores". *Journal of medical microbiology*, 68(10), 1445-1454. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001048>
- Pike, C. M., ve Theriot, C. M. (2021). "Mechanisms of Colonization Resistance Against *Clostridioides difficile*". *The Journal of infectious diseases*, 223(3), S194-S200. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa408>.
- Pillai, A., ve Nelson, R. (2008). "Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults". *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004611.pub2>

- Pirs, T., Ocepek, M., Rupnik, M. (2008). "Isolation of *Clostridium difficile* from food animals in Slovenia". *Journal of Medical Microbiology*, 57(6), 790-792. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47669-0>.
- Pochapin, M. (2000). "The effect of probiotics on *Clostridium difficile* diarrhea". *American Journal of Gastroenterology*, 95(1), 2-4. [https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(99\)00809-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(99)00809-6).
- Porsbo, L. J., ve Agerso, Y. (2016). "*Clostridium difficile* – A possible zoonotic link". National Food Institute, Technical University of Denmark.
- Pruitt, R. N., ve Lacy, D. B. (2012). "Toward a structural understanding of *Clostridium difficile* toxins A and B". *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2(March), 28. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00028>.
- Quesada-Gómez, C., Mulvey, M. R., Vargas, P., Del Mar Gamboa-Coronado, M., Rodríguez, C., Rodríguez-Cavillini, E. (2013). "Isolation of a toxigenic and clinical genotype of *Clostridium difficile* in retail meats in Costa Rica". *Journal of Food Protection*, 76(2), 348-351. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-169>.
- Rahimi, E., Momtaz, H., Hemmati, M. (2014). "İran'da sığır, koyun, keçi, deve ve manda çığ sütlerinde *Clostridium difficile*'nin tespiti". *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(3), 371-374. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2013.10175>.
- Ramaswamy, H. S., Shao, Y., Zhu, S. (2010). "High-pressure destruction kinetics of *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 spores in milk at elevated quasi-isothermal conditions". *Journal of Food Engineering*, 96(2), 249-257. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.07.019>.
- Ratsep, M., Naaber, P., Kõljalg, S., Smidt, I., Shkut, E., Sepp, E. (2014). "Effect of *Lactobacillus plantarum* Strains on Clinical Isolates of *Clostridium difficile* in vitro". *Journal of Probiotics and Health*, 02(01), 1-5. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000119>.
- Redding, L., Huang, E., Ryave, J., Webb, T., Barnhart, D., Baker, L., Bender, J., Kristula, M., Kelly, D. (2021). "*Clostridioides difficile* on dairy farms and potential risk to dairy farm workers". *Anaerobe*, 69, 102353. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102353>.

- Redondo-Solano, M., Burson, D. E., Thippareddi, H. (2016). “Thermal resistance of *Clostridium difficile* spores in peptone water and pork meat”. *Journal of Food Protection*, 79(9), 1468-1474. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-579>
- Ribeiro, J. C., Peruzi, G. A. S., Bruzaroski, S. R., Tamanini, R., Lobo, C. M. O., Alexandrino, B., Conti, A. C. M., Alfieri, A. A., Beloti, V. (2019). “Short communication: Effect of bacto-fugation of raw milk on counts and microbial diversity of psychrotrophs”. *Journal of Dairy Science*, 102(9), 7794-7799. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16148>.
- Roberts, A. P., Allan, E., Mullany, P. (2014). “The Impact of Horizontal Gene Transfer on the Biology of *Clostridium difficile*”. *Advances in Microbial Physiology* (1. bs, C. 65). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.002>
- Rodriguez, C., Mith, H., Taminiau, B., Bouchafa, L., Van Broeck, J., Soumillion, K., Ngyuvula, E., García-Fuentes, E., Korsak, N., Delmée, M., Daube, G. (2021). “First isolation of *Clostridioides difficile* from smoked and dried freshwater fish in Cambodia”. *Food Control*, 124(January). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107895>.
- Rodriguez-Palacios, A., Borgmann, S., Kline, T. R., LeJeune, J. T. (2013). “*Clostridium difficile* in foods and animals: history and measures to reduce exposure”. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 14(1), 11-29. <https://doi.org/10.1017/S1466252312000229>.
- Rodriguez-Palacios, A., ve LeJeune, J. T. (2011). “Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in *Clostridium difficile*”. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 3085-3091. <https://doi.org/10.1128/AEM.01589-10>.
- Rodriguez-Palacios, A., Reid-Smith, R. J., Staempfli, H. R., Weese, J. S. (2010). “*Clostridium difficile* survives minimal temperature recommended for cooking ground meats”. *Anaerobe*, 16(5), 540-542. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.05.004>.
- Romano, V., Pasquale, V., Lemee, L., El Meouche, I., Pestel-Caron, M., Capuano, F., Buono, P., Dumontet, S. (2018). “*Clostridioides difficile* in the environment, food, animals and humans in southern Italy: Occurrence and genetic relatedness.



- Comparative Immunology*”, *Microbiology and Infectious Diseases*, 59, 41-46.  
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.08.006>
- Roshan, N. (2019). “Non-conventional antimicrobial and alternative therapies for the treatment of *Clostridium difficile* infection”. The University of Western Australia School of Biomedical Sciences Microbiology and Immunology.
- Rupnik, M., ve Songer, J. G. (2010). “*Clostridium difficile*: Its potential as a source of foodborne disease”. *Advances in Food and Nutrition Research* Elsevier Inc.  
[https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(10\)60003-4](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(10)60003-4).
- Rupnik, M., Wilcox, M. H., Gerding, D. N. (2009). “*Clostridium difficile* infection: New developments in epidemiology and pathogenesis”. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 526-536. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2164>.
- Samarkos, M., Mastrogianni, E., Kampourpoulou, O. (2018). “The role of gut microbiota in *Clostridium difficile* infection”. *European Journal of Internal Medicine*, 52, 28-32.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.02.006>.
- Savadogo, A., Ouattara, C. A., Bassole, I. H., Traore, A. S. (2004). “Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk”. *Pakistan Journal of nutrition*, 3(3), 174-179.
- Schoster, A., Kokotovic, B., Permin, A., Pedersen, P. D., Bello, F. D., Guardabassi, L. (2013). “In vitro inhibition of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* by commercial probiotic strains”. *Anaerobe*, 20, 36-41.  
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.02.006>.
- Sepp, E., Štšepetova, J., Smidt, I., Rätsep, M., Kõljalg, S., Lõivukene, K., Mändar, R., Jaanimäe, L., Löhr, I. H., Natås, O. B., Naaber, P. (2011). “Intestinal lactoflora in Estonian and Norwegian patients with antibiotic associated diarrhea”. *Anaerobe*, 17(6), 407-409. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.04.012>.
- Servin, A. L. (2004). “Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens”. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), 405-440.  
<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.01.003>.

- Songer, J. G., ve Anderson, M. A. (2006). “*Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals”. *Anaerobe*, 12(1), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2005.09.001>.
- Songer, J. G., Trinh, H. T., Killgore, G. E., Thompson, A. D., McDonald, L. C., Limbago, B. M. (2009). “*Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007”. *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), 819-821. <https://doi.org/10.3201/eid1505.081071>.
- Sorg, J. A., ve Dineen, S. S. (2009). “Laboratory maintenance of *Clostridium difficile*”. *Current Protocols in Microbiology*, 12,1-10. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc09a01s12>.
- Spigaglia, P., Barbanti, F., Faccini, S., Vescovi, M., Criscuolo, E. M., Ceruti, R., Gaspano, C., Rosignoli, C. (2023). “*Clostridioides difficile* in Pigs and Dairy Cattle in Northern Italy: Prevalence, Characterization and Comparison between Animal and Human Strains”. *Microorganisms*, 11(7), 1738. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071738>.
- Stack, A., ve Sillen, G. (1998).”Bactofugation of liquid milks”. *Nutrition and Food Science*, 5, 280-282.
- Stevenson, E., Minton, N. P., Kuehne, S. A. (2015). “The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenicity”. *Trends in Microbiology*, 23(5), 275-282. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.01.004>.
- Stone, G., Chapman, B., Lovell, D. (2009). “Development of a log-quadratic model to describe microbial inactivation, illustrated by thermal inactivation of *Clostridium botulinum*”. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 6998-7005. <https://doi.org/10.1128/AEM.01067-09>.
- Sugeng, C. K. (2012). “Determining the Growth Limiting Conditions and Prevalence of *Clostridium difficile* in Foods”. Department of Biochemistry, Microbiology, and Immunology Faculty of Medicine University of Ottawa. Canada.
- Surawicz, C. M., Brandt, L. J., Binion, D. G., Ananthakrishnan, A. N., Curry, S. R., Gilligan, P. H., McFarland, L. V., Mellow, M., Zuckerbraun, B. S. (2013). “Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile*

infections”. American Journal of Gastroenterology, 108(4), 478-498. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.4>.

Şahiner, A., Çalışkan, S., Halat, E. (2023). “Quantitative Detection of Late Blowing Agents *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, and *C. sporogenes* in Traditional Turkish Cheese by Multiplex Real-Time PCR”. Food Analytical Methods, 16(4), 781-786. <https://doi.org/10.1007/s12161-023-02454-z>.

Şaşmazer, R. Ç. (2022). “Probiyotik Beyaz Peynir Üretimi Olanaklarının Araştırılması”. Bursa Uludağ Üniversitesi. Doktora Tezi. Türkiye.

Tan, D. T. (2022). “A *Clostridioides difficile* surveillance study of Canadian retail meat samples from 2016-2018: a possible source of human clinical infections? “Master of Science. University of Manitoba.

Tang, H. W., Phapugrangkul, P., Fauzi, H. M., Tan, J. S. (2022). “Lactic Acid Bacteria Bacteriocin, an Antimicrobial Peptide Effective Against Multidrug Resistance: a Comprehensive Review”. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 28(1), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10317-6>.

Theriot, C. M., ve Young, V. B. (2015). “Interactions between the Gastrointestinal Microbiome and *Clostridium difficile*”. Annual Review of Microbiology, 69(1), 445-461. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104115>.

Tickler, I. A., Obradovich, A. E., Goering, R. V., Fang, F. C., Tenover, F. C. (2019). “Changes in molecular epidemiology and antimicrobial resistance profiles of *Clostridioides (Clostridium) difficile* strains in the United States between 2011 and 2017”. Anaerobe, 60, 102050. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.06.003>.

Tkalec, V., Jamnikar-Ciglenecki, U., Rupnik, M., Vadnjal, S., Zelenik, K., Biasizzo, M. (2020). “*Clostridioides difficile* in national food surveillance, Slovenia, 2015 to 2017”. Eurosurveillance, 25(16). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.16.1900479>.

Tkalec, V., Janezic, S., Skok, B., Simonic, T., Mesaric, S., Vrabic, T., Rupnik, M. (2019). “High *Clostridium difficile* contamination rates of domestic and imported potatoes compared to some other vegetables in Slovenia”. Food Microbiology, 78, 194-200. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.017>.

- Torres-Anjel, M. J., ve Hedrick, T. I. (1971). "Spore Removal by Centrifugation and Its Effect on Ultra-High Temperature Commercial Sterilization of Milk". *Journal of Dairy Science*, 54(3), 326-330. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(71\)85837-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(71)85837-X).
- Tosun, M. N., Taylan, G., Demirel Zorba, N. N. (2022). "Antibacterial and antibiofilm activities of some plant essential oils and synergistic effects of cinnamon essential oil with vancomycin against *Clostridioides difficile*: in vitro study". *Letters in Applied Microbiology*, 75(3), 598-606. <https://doi.org/10.1111/lam.13747>.
- Tosun, M. N., Taylan Yalcın, G., Korkmazer, G., Zorba, M., Caner, C., Demirel Zorba, N. N. (2023). "Disinfection of *Clostridioides difficile* on spinach with epigallocatechin-based antimicrobial solutions and sodium hypochlorite". *International Journal of Food Microbiology*, 402, 110301. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110301>.
- Trejo, F. M., Pérez, P. F., De Antoni, G. L. (2010). "Co-culture with potentially probiotic microorganisms antagonises virulence factors of *Clostridium difficile* in vitro". *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 98(1), 19-29. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9424-6>.
- Troiano, T., Harmanus, C., Sanders, I. M. J. G., Pasquale, V., Dumontet, S., Capuano, F., Romano, V., Kuijper, E. J. (2015). "Toxigenic *Clostridium difficile* PCR ribotypes in edible marine bivalve molluscs in Italy". *International Journal of Food Microbiology*, 208, 30-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.002>.
- Tsai, B. Y., Ko, W. C., Chen, T. H., Wu, Y. C., Lan, P. H., Chen, Y. H., Hung, Y. P., Tsai, P. J. (2016). "Zoonotic potential of the *Clostridium difficile* RT078 family in Taiwan". *Anaerobe*, 41, 125-130. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.002>.
- Tsuchiya, A. C., Gomes, E. S., Kuaye, A. Y., Kabuki, D. Y. (2008). "Detection and pathogenic potential of *Clostridium difficile* in commercial meat and meat products in Brazil". *Food Science and Technology International*, 1-8. <https://doi.org/10.1177/1082013221992665>.
- Usui, M., Maruko, A., Harada, M., Kawabata, F., Sudo, T., Noto, S., Sato, T., Shinagawa, M., Takahashi, S., Tamura, Y. (2020). Prevalence and characterization of

- Clostridioides difficile* isolates from retail food products (vegetables and meats) in Japan . *Anaerobe*, 61, 102132. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102132>
- Uzkuç, H., Çelebi Uzkuç, N. M., Yuceer, Y. (2023). “*Cynara Cardunculus* Proteazi Kullanılarak Üretilen Keçi Peynirinin Duyusal Özellikleri ve Uçucu Bileşen Profili”. *Gıda / the Journal of Food*, 48, 683-697. <https://doi.org/10.15237/gida.gd23026>.
- Van Boekel, M. A. J. S. (2002). “On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells”. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 139-159. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00742-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00742-5).
- Vinderola, G., Prosello, W., Molinari, F., Ghiberto, D., Reinheimer, J. (2009). “Growth of *Lactobacillus paracasei* A13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product”. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 171-174. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.021>.
- Visser, M., Sepelhorst, S., Olson, N., Du, T., Mulvey, M. R., Alfa, M. J. (2012). “Detection of *Clostridium difficile* in retail ground meat products in Manitoba.” *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 23(1), 28-30. <https://doi.org/10.1155/2012/646981>.
- Vissers, M. M. M., Driehuis, F., Te Giffel, M. C., De Jong, P., Lankveld, J. M. G. (2007). “Minimizing the level of butyric acid bacteria spores in farm tank milk”. *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3278-3285. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-798>
- Von Abercron, S. M. M., Karlsson, F., Wigh, G. T., Wierup, M., Krovacek, K. (2009). “Low occurrence of *Clostridium difficile* in retail ground meat in sweden”. *Journal of Food Protection*, 72(8), 1732-1734. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.8.1732>.
- Voth, D. E., ve Ballard, J. D. (2005). “*Clostridium difficile* toxins: Mechanism of action and role in disease”. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 247-263. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.247-263.2005>.
- Warriner, K., Xu, C., Habash, M., Sultan, S., Weese, S. J. (2017). “Dissemination of *Clostridium difficile* in food and the environment: Significant sources of *C. difficile* community-acquired infection?”. *Journal of Applied Microbiology*, 122(3), 542-553. <https://doi.org/10.1111/jam.13338>.

- Weese, J. S., Wakeford, T., Reid-Smith, R., Rousseau, J., Friendship, R. (2010). “Longitudinal investigation of *Clostridium difficile* shedding in piglets”. *Anaerobe*, 16(5), 501-504. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.08.001>.
- Williamson, C. H. D., Roe, C. C., Terriquez, J., Hornstra, H., Lucero, S., Nunnally, A. E., Vazquez, A. J., Vinocur, J., Plude, C., Nienstadt, L., Stone, N. E., Celona, K. R., Wagner, D. M., Keim, P., Sahl, J. W. (2023). “A local-scale One Health genomic surveillance of *Clostridioides difficile* demonstrates highly related strains from humans, canines, and the environment”. *Microbial genomics*, 9(6). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001046>.
- Wu, Y. C., Lee, J. J., Tsai, B. Y., Liu, Y. F., Chen, C. M., Tien, N., Tsai, P. J., Chen, T. H. (2016). “Potentially hypervirulent *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 lineage isolates in pigs and possible implications for humans in Taiwan”. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(2), 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.02.002>.
- Yılmaztekin, M. (2001). “Beyaz peynir üretiminde *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum*’dan yararlanma olanakları”. Harran Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
- Zhang, L. J., Yang, L., Gu, X. X., Chen, P. X., Fu, J. L., Jiang, H. X. (2019). “The first isolation of *Clostridium difficile* RT078/ ST11 from pigs in China”. *PLoS ONE*, 14(2), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212965>.
- Zhang, W. Z., Li, W. G., Liu, Y. Q., Gu, W. P., Zhang, Q., Li, H., Liu, Z. J., Zhang, X., Wu, Y., Lu, J. X. (2020). “The molecular characters and antibiotic resistance of *Clostridioides difficile* from economic animals in China”. *BMC Microbiology*, 20(1), 4-10. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01757-z>.