

**ÇİĞ SÜT ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN  
LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK  
YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONU**

**Gülşah GÜNDOĞDU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Ocak 2016  
AMASYA**

**ÇİĞ SÜT ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN  
LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK  
YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONU**

**Gülşah GÜNDOĞDU**

**DANIŞMAN**

**Doç.Dr. Tuba YILDIRIM**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Ocak 2016**

**AMASYA**

Gülşah GÜNDOĞDU tarafından hazırlanan ÇİĞ SÜT ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONU adlı bu tezin yüksek lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tuba YILDIRIM

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Tuba YILDIRIM

Biyoloji Anabilim Dalı, A. Ü.

Prof. Dr. Belgin SIRIKEN

Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı,

OMÜ

Yrd. Doç. Dr. Önder İDİL

Biyoloji Anabilim Dalı, A.Ü.

Tarih 15/01/2016

Bu tez Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

**Doç. Dr. Mehmet KARA**

**Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm.

Gülşah GÜNDOĞDU

**ÇİĞ SÜT ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN  
LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN  
FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONU**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Gülşah GÜNDOĞDU**

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Ocak 2016**

**ÖZET**

Laktik asit bakterileri (LAB), fermente gıdaların üretiminde starter kültür olarak kullanılan ve bazı antimikrobiyal maddeler üreterek patojen bakterileri inhibe edebilen mikroorganizmalardır. Bu çalışmada; Amasya ilinde tüketime sunulan çiğ süt örneklerinden LAB izolasyonu, bazı patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi, inhibitör etki gösteren bakteriyosin potansiyeline sahip izolatların fenotipik ve genotipik yöntemlerle tür düzeyinde tanımlanması amaçlanmıştır. 77 çiğ süt örneğinden elde edilen 121 izolatın bazı patojen mikroorganizmalar (*S. aureus* ATCC25923, *E. coli* ATCC35218, *B. cereus* DSM4312, *S. enteritidis* ATCC13076, *P. aeruginosa* ATCC27853) üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi kuyu difüzyon tekniği ile incelenmiştir. İzolatların %32'si *B. cereus*'a, %31'i *P. aeruginosa*'ya, %26'sı *S. enteritidis*'e, %27'si *E. coli*'ye ve %21'i *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. Bu izolatlara Gram boyama, katalaz testi, optimum gelişme sıcaklığı ve pH değerleri, geliştiği NaCl konsantrasyonu testleri uygulanmıştır. 17 izolata API 50 CHL ve API 20 Strep testleri ile tür düzeyinde tanımlama yapılmıştır. İzolatların %29,4'ü *L. paracasei* ssp. *paracasei*, %11,8'i *L. plantarum*, %29,4'ü *Leuconostoc* spp., %11,8'i *E. faecalis*, %11,8'i *A. viridans*

ve %5,9'u *L. lactis* ssp. *cremoris* olarak tanımlanmıştır. Basil formundaki laktik asit bakterilerinden *L. plantarum* ve *L. paracasei* türlerinin genotipik özelliklerinin doğrulanması için PZR yöntemiyle, 121 izolatın %10,8'i *L. paracasei* ve %4,1'i ise *L. plantarum* olarak belirlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Laktik asit bakterileri, Çiğ süt, Antimikrobiyal aktivite

**Sayfa Adedi:** 86

**Tez Yöneticisi:** Doç. Dr. Tuba YILDIRIM



**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF LACTIC  
ACID BACTERIA ISOLATED FROM RAW MILK SAMPLES**

**(M.Sc.Thesis)**

**Gülşah GÜNDOĞDU**

**AMASYA UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**January 2016**

**ABSTRACT**

Lactic acid bacteria used as starter cultures in the production of fermented food and produce some antimicrobial agents which is capable of inhibition on pathogenic bacteria. In this study; it is aimed to isolation of lactic acid bacteria from raw milk samples consumption in Amasya, investigation of antimicrobial activity on some pathogenic microorganisms, in addition this, the isolates have the potential to be bacteriocins showing the inhibitory effects are made identification to the species level with phenotypic and genotypic methods. 121 strains isolated from 77 raw milks and antimicrobial activity was investigated on pathogenic bacteria (*S. aureus* ATCC25923, *E. coli* ATCC 35218, *B. cereus* DSM4312, *P. aeruginosa* ATCC27853 and *S. enteritidis* ATCC 13076) using the well diffusion technique. 32% of these isolates have been antimicrobial effect on *B. cereus*, 31% on *P. aeruginosa*, 26% on *S. enteritidis*, 27% on *E. coli*, 21% on *S. aureus*. This isolates were identified phenotypically by general microbiological methods such as gram stain, catalase test, optimum growth temperature and pH, NaCl concentration can be developed. 17 isolates were identified at the species level by API 50 CHL and API 20 Strep tests. According to this definition, isolates were determined as 29.4% *L. paracasei* ssp. *paracasei*, 11.8% *L. plantarum*, 29.4% *Leuconostoc* spp., 11.8% *E. faecalis*, 11.8% *A.*

*viridans* and 5.9% *L. lactis* ssp. *cremoris*. Basil form of lactic acid bacteria, *L. paracasei* and *L. plantarum* were typed using PCR for genotypic verification as 10.8% *L. paracasei* and 4.1% *L. plantarum* of 121 isolates.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, Raw milk, Antimicrobial activity

**Page Number:** 86

**Adviser:** Doç.Dr. Tuba YILDIRIM





## TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım günden bu yana bana destek olup yardımlarını esirgemeyen ve tez konumun belirlenip yürütülmesinde büyük katkısı olan, değerli hocam sayın Doç.Dr. Tuba YILDIRIM'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Özellikle laboratuvar çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Ceren YAVUZ'a sonsuz teşekkür ederim.

Teknik imkanlar sağlayan Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı uzman ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin bütün aşamalarında her türlü yardımlarını ve desteklerini hissettiğim arkadaşlarım; İbrahim TÜRKEL, Hamdi ÖZKUL, İkbâl MACİT, Dilber ÖZGÜN ve diğer tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmam süresince beni maddi ve manevi olarak destekleyen ve bugünlere gelmemde büyük emekleri olan kıymetli aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR .....	viii
TABLolar DİZİNİ .....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xiii
RESİMLER DİZİNİ .....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri .....	3
2.1.1. <i>Lactobacillus spp.</i> .....	5
2.1.2. <i>Lactococcus spp.</i> .....	6
2.1.3. <i>Streptococcus spp.</i> .....	7
2.1.4. <i>Bifidobacterium spp.</i> .....	8
2.1.5. <i>Enterococcus spp.</i> .....	9
2.1.6. <i>Pediococcus spp.</i> .....	10
2.1.7. <i>Leuconostoc spp.</i> .....	10
2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Oluşturduğu Metabolik Ürünler .....	11
2.2.1. Laktik Asit .....	11
2.2.2. Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	11
2.2.3. Hidrojen Sülfür (H <sub>2</sub> S) .....	12
2.2.4. Karbondioksit (CO <sub>2</sub> ) .....	13
2.2.5. Reuterin .....	13
2.2.6. Bakteriyosinler .....	14
2.2.6.1 Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması .....	16
2.3. Laktik Asit Bakterilerini Tanımlama Yöntemleri .....	19
2.3.1. Fenotipik Karakterlerin Belirlenmesi .....	19
2.3.2. Genotipik Karakterlerin Belirlenmesi .....	20

3. MATERYAL VE METOT .....	23
3.1. Materyal .....	23
3.1.1. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler .....	23
3.1.2. Kullanılan Referans Suşlar .....	28
3.2. Çiğ Süt Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu .....	29
3.3. İzolatların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	29
3.4. Antimikrobiyal Aktivite Gösteren İzolatların İdentifikasyonu .....	30
3.4.1. Gram Boyama .....	30
3.4.2. Katalaz Testi .....	31
3.4.3. Farklı NaCl Konsantrasyonlarında Gelişme Testi .....	31
3.4.4. Farklı pH' larda Gelişme Testi .....	32
3.4.5. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme Testi .....	32
3.5. Karbonhidrat Fermantasyon Testleri .....	32
3.5.1. API 50 CHL Testi .....	33
3.5.2. API 20 Strep Testi .....	34
3.5.2.1. Hemoliz Testi .....	36
3.6. İzolatların Genotipik Olarak Tanımlaması .....	37
3.7. İzolatlardan Genomik DNA İzolasyonu .....	37
3.8. Kaynatma Yöntemiyle DNA Saflaştırılması .....	38
3.9. <i>L. plantarum</i> ve <i>L. paracasei</i> İzolatları için Kullanılan Primer Dizileri .....	39
3.10. PZR Optimizasyon Çalışmaları .....	39
3.10.1. <i>L. plantarum</i> için Tm optimizasyonu .....	39
3.10.2. <i>L. plantarum</i> için MgCl <sub>2</sub> optimizasyonu .....	40
3.10.3. <i>L. plantarum</i> için primer optimizasyonu .....	41
3.10.4. <i>L. plantarum</i> Amplifikasyonu .....	41
3.10.5. <i>L. paracasei</i> için Tm optimizasyonu .....	42
3.10.6. <i>L. paracasei</i> için MgCl <sub>2</sub> optimizasyonu .....	43
3.10.7. <i>L. paracasei</i> için primer optimizasyonu .....	44
3.10.8. <i>L. paracasei</i> Amplifikasyonu .....	44
3.11. PZR Ürünlerinin Elektroforezi .....	45

4. BULGULAR.....	46
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....	46
4.2. Kuyucuk Difüzyon Testi Sonuçları.....	46
4.3. Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip İzolatların Belirlenmesi.....	49
4.4. Karbonhidrat Fermantasyon Testleri Sonuçları.....	51
4.5. PZR Optimizasyon Sonuçları.....	56
4.5.1. <i>L. plantarum</i> için Yapılan Optimizasyon Sonuçları.....	56
4.5.2. <i>L. paracasei</i> için Yapılan Optimizasyon Sonuçları.....	58
4.6. <i>L. plantarum</i> ve <i>L. paracasei</i> Amplifikasyon Sonuçları.....	60
5. TARTIŞMA.....	64
5.1. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Aktivitesi.....	64
5.2. Laktik Asit Bakterilerinin Farklı pH Değerlerinde Gelişme Yetenekleri.....	68
5.3. Laktik Asit Bakterilerinin Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Yetenekleri.....	69
5.4. Laktik Asit Bakterilerinin API Testleri ile Tanımlanması.....	70
5.5. Laktik Asit Bakterilerinin PZR ile Tanımlanması.....	71
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	72
7. KAYNAKÇA.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	86

## TABLOLARIN LİSTESİ

Tablo 2.1.Laktobasil genuslarının dahil oldukları temel gruplar.....	6
Tablo 2.2.Bazı bakteriyosinler ve üretici mikroorganizmalar.....	18
Tablo 2.3.Laktik asit bakterilerinin identifikasyonu için uygulanmış moleküler yaklaşımlar .....	22
Tablo 3.1.Gram pozitif bakteriler için genomik DNA saflaştırma protokolü .....	38
Tablo 3.2 : PZR analizinde kullanılan primer dizileri.....	39
Tablo 3.3. <i>L. plantarum</i> Tm optimizasyonu reaksiyon karışımı.....	40
Tablo 3.4. <i>L. plantarum</i> MgCl <sub>2</sub> optimizasyonu reaksiyon karışımı.....	40
Tablo 3.5. <i>L. plantarum</i> primer optimizasyonu reaksiyon karışımı.....	41
Tablo 3.6. <i>Lactobacillus plantarum</i> için PZR karışımı.....	42
Tablo 3.7. <i>Lactobacillus plantarum</i> için PZR programı.....	42
Tablo 3.8. <i>L. paracasei</i> Tm optimizasyonu reaksiyon karışımı.....	43
Tablo 3.9. <i>L. paracasei</i> MgCl <sub>2</sub> optimizasyonu reaksiyon karışımı.....	43
Tablo 3.10. <i>L. paracasei</i> primer optimizasyonu reaksiyon karışımı.....	44
Tablo 3.11. <i>Lactobacillus paracasei</i> için PZR karışımı.....	45
Tablo 3.12. <i>Lactobacillus paracasei</i> için PZR programı.....	45
Tablo 4.1.Üç ve daha az farklı patojen bakteri üzerinde antimikrobiyal aktivite gösteren izolatlar .....	47
Tablo 4.2.Dört farklı patojen bakteri üzerinde antimikrobiyal aktivite gösteren izolatlar.....	48
Tablo 4.3. Beş farklı patojen bakteri üzerinde karşı antimikrobiyal aktivite gösteren izolatlar .....	48
Tablo 4.4.Antimikrobiyal aktivite gösteren izolatların identifikasyonunda yapılan genel mikrobiyolojik testler.....	50
Tablo 4.5.API 50 CHL test sonuçları.....	52
Tablo 4.6.API 50 CHL test sonucuna göre tanımlanan türlerin kullandıkları karbon kaynakları.....	53
Tablo 4.7.API 20 Strep test sonuçları.....	56
Tablo 4.8. İzolatların API testlerinin ve PZR sonuçlarının karşılaştırılması.....	63

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 2.1. 16S rRNA sekans analizine göre laktobasiller, enterokoklar, streptokoklar, laktokoklar ve bazı diğer gram pozitif bakterilerilerin filogenetik pozisyonları.....	8
Şekil 2.2. Gliserolden reuterin biyosentezi.....	14
Şekil 2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	21
Şekil 4.1. <i>L. plantarum</i> için bağlanma sıcaklığı optimizasyonu elektroforez görüntüsü.....	57
Şekil 4.2. <i>L. plantarum</i> için MgCl <sub>2</sub> optimizasyonu elektroforez görüntüsü.....	57
Şekil 4.3. <i>L. plantarum</i> için primer optimizasyonu elektroforez görüntüsü.....	58
Şekil 4.4. <i>L. paracasei</i> için Tm optimizasyonu elektroforez görüntüsü.....	59
Şekil 4.5. <i>L. plantarum</i> için MgCl <sub>2</sub> optimizasyonu elektroforez görüntüsü.....	59
Şekil 4.6. <i>L. paracasei</i> için primer optimizasyonu elektroforez görüntüsü.....	60
Şekil 4.7. <i>L. plantarum</i> türü için yapılan PZR amplikonlarının elektroforez sonuçları.....	62
Şekil 4.8. <i>L. paracasei</i> türü için yapılan PZR amplikonlarının elektroforez sonuçları.....	62

**RESİMLERİN LİSTESİ**

Resim 3.1. API 50 CHL pozitif ve negatif test sribi.....	34
Resim 3.2. API 20 Strep negatif test sribi.....	35
Resim 3.3. API 20 Strep pozitif test sribi.....	35
Resim 3.4. Kanlı agar üzerinde hemoliz oluşturmeyan laktik asit bakterisi kolonileri.....	36
Resim 4.1. <i>Salmonella enteritidis</i> ve <i>Pseudomonas aeruginosa</i> patojenleri üzerinde etki gösteren bazı izolatlar.....	46
Resim 4.2. <i>Escherichia coli</i> ve <i>Bacillus cereus</i> patojenleri üzerinde etki gösteren bazı izolatlar.....	47
Resim 4.3. 42B ve <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014 standart suşuna ait ekim yapılmış ve renk değişimi gözlenmiş API 50 CHL sribi.....	51
Resim 4.4. 18A izolatına ait ekim yapılmış ve renk değişimi gözlenmiş API 20 Strep sribi.....	55
Resim 4.5. 21B izolatına ait ekim yapılmış ve renk değişimi gözlenmiş API 20 Strep sribi.....	55

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
A	Alfa
B	Beta
Bp	Baz çifti
°C	Santigrat derece
CO <sub>2</sub>	Karbondiyoksit
G	Gram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
H <sub>2</sub> S	Hidrojen sülfür
kDa	Kilo dalton
L	Litre
M	Molar
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
NaCl	Sodyum klorür
Nm	Nanometre
Pmol	Pikomol
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
Tm	Bağlanma sıcaklığı
µM	Mikromolar
µl	Mikrolitre
%	Yüzde



**Kısaltmalar****Açıklama**

ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
API	Analytical Profile Index
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DGGE	Denature Gradiyent Jel Elektroforezi
DSM	Deutscher Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
GRAS	Güvenli Kabul Edilen/Generally Recognized as Safe
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LH-PZR	Length Heterogeneity Polymerase Chain Reaction
MRSA	De Man Rogosa ve Sharpe Agar
MRSB	De Man Rogosa ve Sharpe Broth
NSBI	National Center for Biotechnology Information
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribo Nükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
RTi-PZR	Real-Time PZR
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
USA	United States of America
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
TSA	Tryptic Soy Agar
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA
UV	Ultraviyole
VP	Voges-Proskauer

## 1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB) karbonhidrat fermentasyonu sonucunda son ürün olarak laktik asit oluşturan, çubuk veya kok şeklinde, sporsuz, genellikle hareketsiz, Gram pozitif ve katalaz negatif mikroorganizmalardır. LAB içerisinde Streptococcaceae familyasına ait *Lactococcus* (süt ürünlerinde), *Leuconostoc* (sebzeler, süt ürünleri), *Pediococcus* (sebzeler, et ürünleri), *Oenococcus* (şarap) ve *Streptococcus* (süt ürünleri) cinsleri ile Lactobacillaceae familyasına ait *Lactobacillus* (sebzeler, tahıl, süt ve et ürünleri) cinsi bulunmaktadır. Özellikle *Lactobacillus* cinsine ait bazı türler insanların ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinin de önemli bir bölümünü oluşturmaktadır (Axelsson, 1998; Orla-Jensen, 1919).

Laktik asit bakterileri, gıda ürünlerinin besin değerine ve besinlerin biyolojik yolla korunmasına olumlu katkıda bulunmaları nedeniyle yüzyıllardır önemini koruyan mikroorganizmalardır. Laktik asit bakterilerinin çoğu; insan, hayvan ve bitkilerin bulunduğu doğal ortamlardan izole edilebilen, biyoteknolojik çalışmalarda ve endüstriyel birçok alanda kullanılan, insan beslenmesinde ve sağlığında oldukça önemli olan mikrobiyal ajanlardır (Furet ve ark., 2004; Gezginç ve ark., 2010; Kılıç, 2001; Leroy ve ark., 2004).

Gıdalarda sadece gıda kaynaklı patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmaları inhibe etmek ve/veya raf ömrünü uzatmak için kullanılan ve gıdanın özelliklerinde değişime sebep olmayan antogonistik kültürler “koruyucu kültürler” denir. Laktik asit bakterileri de “güvenli bakteriler” olarak kabul edilirler ve koruyucu kültürlerin özelliklerini taşırlar (İşleroğlu ve ark., 2008).

Laktik asit bakterilerinin önemli özelliklerinden birisi bakteriyosin olarak adlandırılan antimikrobiyal maddeleri üretmeleridir. Bakteriyosinler, protein veya protein kompleksleri olup, bakteriyel türlerin oldukça büyük bir kısmı tarafından üretilen potansiyel antimikrobiyel bileşiklerdir (Barefoot ve ark.,1993; Daescel, 1989). Laktik asit bakterilerinin en önemli inhibitör etkisi özellikle asidik ortamlarda oluşmaktadır. Ayrıca inoküle edilen starter kültür miktar ve aktivitesi de özellikle

fermantasyonun ilk aşamasında, patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmektedir (Tekinşen ve ark., 1994).

Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında çeşitli fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak, genel mikrobiyolojik yöntemler bir cins içindeki alt türleri ve suşları etkin bir şekilde ayırt etmek için çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle genotipik özelliklere dayanan yeni metotlar geliştirilmiş ve bakterilerin etkin bir şekilde tanımlanmasında kullanılmaya başlanmıştır (Conter ve ark., 2005; Greco ve ark., 2005).

Bu çalışmada; Amasya ilinde tüketime sunulan çiğ süt örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, *S. aureus* ATCC25923, *E. coli* ATCC35218, *B. cereus* DSM4312, *S. enteritidis* ATCC13076 ve *P. aeruginosa* ATCC27853 gibi bazı patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi ve inhibitör etki gösteren bakteriyosin potansiyeline sahip izolatların fenotipik ve genotipik yöntemlerle tür düzeyinde tanımlanması amaçlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri Gram pozitif basil ve koklardan oluşan, *Sporolactobacillus inulinus* dışında spor oluşturmayan, katalaz negatif ve hareketsiz mikroorganizmalardır. Firmicutes filumuna ait çeşitli bakteri cinslerinden oluşmaktadır. Laktik asit bakterilerinin en önemli cinsleri arasında *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella* yer almaktadır. Bütün laktik asit bakterileri anaerobik koşullar altında gelişim gösterebilmektedir. Ancak, çoğu anaerobik bakterilerin aksine oksijene karşı duyarlı değildirler, yani oksijen varlığında da gelişim gösterebilmektedirler. Bu nedenle de laktik asit bakterileri fakültatif anaerob mikroorganizmalar olarak nitelendirilmektedirler. Fermantasyon sonucunda ana ürün olarak laktik asit üreten bu bakteriler sitokrom içermezler ve elektron taşıma sistemi de taşımazlar. Bu yüzden laktik asit bakterilerinde enerji eldesi sadece substrat düzeyinde fosforilasyon ile gerçekleştirilmektedir (Beasley, 2004; Christensen ve ark., 1999; Dinçer ve ark., 2009; Klein ve ark., 1998; Madigan, 2006).

Karbonhidrat metabolizmaları göz önüne alındığında homofermentatif ve heterofermentatif olarak iki alt gruba ayrılırlar. Bu ayırım şekerlerin temel katabolik yollarındaki farklılıklarından kaynaklanmaktadır. LAB'lar heksozları fruktozdifosfat (FDP) yolu ile fermente ederek sadece laktik asit oluşturuyorsa homofermentatif laktik asit bakterileri (homolaktik fermantasyon), laktik asitin yanında etanol ve/veya asetat ve CO<sub>2</sub> yanında formik asit, diasetil ve asetaldehit meydana getiriyorsa heterofermentatif laktik asit bakterileri (heterolaktik fermantasyon) denir (Tabakoğlu, 2010; Tunail, 2009).

Laktik asit bakterileri su ve toprakta hemen hemen hiç bulunmamakla birlikte cins ve türe göre değişmek üzere et, süt, sebzeler gibi gıda maddelerinde bitki ve bitki

atıklarında, memelilerin ağız, bağırsak ve vajina florasında bulunmaktadır (Tekinşen ve ark., 1994).

Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmaların önemli bir kısmı antimikrobiyal bileşenler üretmelerine rağmen, gıdaların biyokontrolünde laktik asit bakterilerinin ayrı bir önemi vardır (Kurt ve Zorba, 2005). LAB; tabiatta yaygın oluşları, çeşitli gıda maddelerinde sıkça rastlanılan bozulmalara neden olmaları ve bazı gıdaların üretim ve olgunlaştırılmasında önemli rol oynamalarından dolayı da gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadırlar (Çon ve Gökalp, 2002).

Laktik asit bakterileri ve metabolitleri farklı fermente gıdalarda herhangi bir sağlık tehlikesi olmadan uzun yıllar boyunca tüketilmiştir. LAB'lerinin bu antimikrobiyal metabolitlerinin kullanımı bazı düzenleyici kurumlar tarafından da onaylanmıştır. Bazı gıdaların mikroflorasında doğal olarak bulunan ya da sonradan eklenen LAB kültürlerinin genellikle zararsız olduğu ve insan sağlığı için de yararlı olduğu kabul edilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri laktik asit bakterilerini GRAS (genellikle güvenli kabul edilen) statüsünde kabul etmiştir. LAB'lere ait bazı metabolitlerin ve diğer starter kültür bakterilerinin gıdalarda kullanılmasına izin vermiştir (Osmanağaoğlu ve Beyatlı, 2002).

Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması; morfolojileri (kok, basil veya kokobasil), glikoz fermantasyonu (homo/heterofermantasyon), farklı sıcaklıklarda gelişmeleri (10-60°C), yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişme yeteneği ve asit ya da alkali ortamlara olan toleransı temellerine dayanmaktadır. Yağ asitlerinin kompozisyonu ve hücre duvar unsurlarından da kemotaksonomik sınıflandırmada faydalanılmaktadır. Tür ve alt tür düzeyinde tanımlamalarda ise toplam protein profillerinin temeline dayanan SDS-PAGE yöntemi kullanılmaktadır. Son yıllarda ise laktik asit bakterilerinin tür ve alt türlerinin filogenetik pozisyonlarının belirlenmesinde daha güvenilir olduğu düşünülen ribozomal RNA'dan (rRNA) yararlanılmaktadır (Klein ve ark.,1998; Tabakoğlu, 2010; Yüksekdağ ve Beyatlı, 2009).

Bakteriyal taksonomiye klasik yaklaşım morfolojik ve fizyolojik özelliklere dayanmaktadır. Bu yaklaşım hücre duvarı kompozisyonu, hücresel yağ asitleri, isoprenoid quinonlar ve hücrelerin diğer karakteristikleri ile genişletilmiştir. DNA'nın %G+C miktarı, gen ürünlerinin elektroforetik özellikleri, DNA:DNA hibridizasyon çalışmaları, rRNA'nın sekansı gibi moleküler karakteristikler önemli taksonomik araçlar haline gelmiştir. Bu teknikler laktik asit bakterilerinin taksonomisinde önemli değişikliklere neden olmuştur (Tabakoğlu, 2010).

### 2.1.1. *Lactobacillus spp.*

Çubuk şeklinde olan bu bakterilerin bazı türleri kokobasil veya uzun zincir oluşturma özelliğindedir. Çok az tür veya suşun dışında hareketsizdirler. *Lactobacillus spp.* doğada ve gıdalarda sık rastlanan yaygın türler arasındadır. Genellikle nitratı redükte etmezler ve 5-53°C ile pH 5,5-5,8 arasında gelişebilirler. Patojen özellik göstermezler, aksine oluşturdukları bakteriyel özellikteki maddeler sayesinde saprofit ve patojen bakterilerin gelişmesini engellerler. Hücre içi peptidazlarla peptidleri aminoasitlere kadar parçalarlar (Yalanca, 2009).

En sık rastlanan *Lactobacillus* türleri *Lactobacillus brevis*, *L. casei* ve *L. plantarum*'dur (Kandler et al., 1986). *Lactobacillus* cinsine ait türler genellikle peynir, fermente gıdalar, ekmek mayası, silaj, şarap ve bira endüstrisinde starter kültür olarak kullanılmaktadır (Baele ve ark., 2002; Kashket, 1987). Glikoz fermantasyonuna göre *Lactobacillus* türleri 3 gruba ayrılırlar. Birinci grubu glikozu laktik asite fermente eden homofermantatif *Lactobacillus* türleri oluşturmaktadır. Bunlar *Thermobacterium* olarak da adlandırılırlar. İkinci grup ise fakültatif heterofermantatif *Lactobacillus* türlerinden oluşan *Streptobacterium*'lardır. Bu mikroorganizmalar glikozu büyük ölçüde laktik asite fermente eder ve glukonattan gaz üretebilir. Üçüncü grubu oluşturan zorunlu heterofermantatif *Lactobacillus* türleri ise heksozu laktik asit, asetik asit, etanol ve CO<sub>2</sub>'e fermente eder, bunlar *Betabacterium* olarak da adlandırılırlar (Tablo 2.1.) (Adıgüzel, 2008; Kılıç, 2001).

**Tablo 2.1.** Laktobasil genuslarının dahil oldukları temel gruplar (Stiles ve Holzapfel, 1997).

Grup I Homofermentatifler " <i>Thermobacterium</i> "	Grup II Fakültatif Heterofermentatifler " <i>Streptobacterium</i> "	Grup III Heterofermentatifler " <i>Betabacterium</i> "
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. amylophilus</i>	<i>L. agilis</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. aviarius</i>	<i>L. bifementans</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	<i>L. intestinalis</i>	<i>L. parakefir</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. kefirgranum</i>	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. vaginalis</i>
<i>L. ruminis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sanfrancisco</i>
	<i>L. rhamnosus</i>	
	<i>L. sakei</i>	

### 2.1.2. *Lactococcus spp.*

Laktokoklar Orla-Jensen tarafından 1919 yılında yapılan sınıflandırma neticesinde mezofilik olarak *Streptococcus* cinsine dahil edilmişlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise patojenik Streptococci'den serolojik N antijen grubuna sahip olmaları ile ayrılmışlardır. Teuber tarafından 1995 yılında açıklanan taksonomik sınıflandırmada *Lactococcus* olarak isimlendirilmiş ve diğer gruplardan ayrılmışlardır (Teuber, 1995).

Bu genusa ait laktik asit bakterileri kokoid yapıda olup, tek, çift veya zincir şeklinde morfolojik yapıya sahiptirler (Teuber, 1995). *Lactococcus* türleri laktozu fermente ederek gaz üretmeksizin L(+) laktik asit oluşturmaktadır. Süt ürünleri ve bitkilerde bulunan bu cinsin üyelerinin optimum gelişme sıcaklıkları 30°C'dir. Bu mikroorganizmaların 10°C'de gelişebildikleri, 45°C'de ise gelişme göstermedikleri ayrıca %6,5 NaCl varlığında ve ortam pH'sının 9,6 olması durumunda da gelişemedikleri tespit edilmiştir. Şekerleri homofermentatif yolla laktik aside dönüştürerek enerji elde etmektedirler (Adıgüzel, 2008; Holt ve ark., 1994).

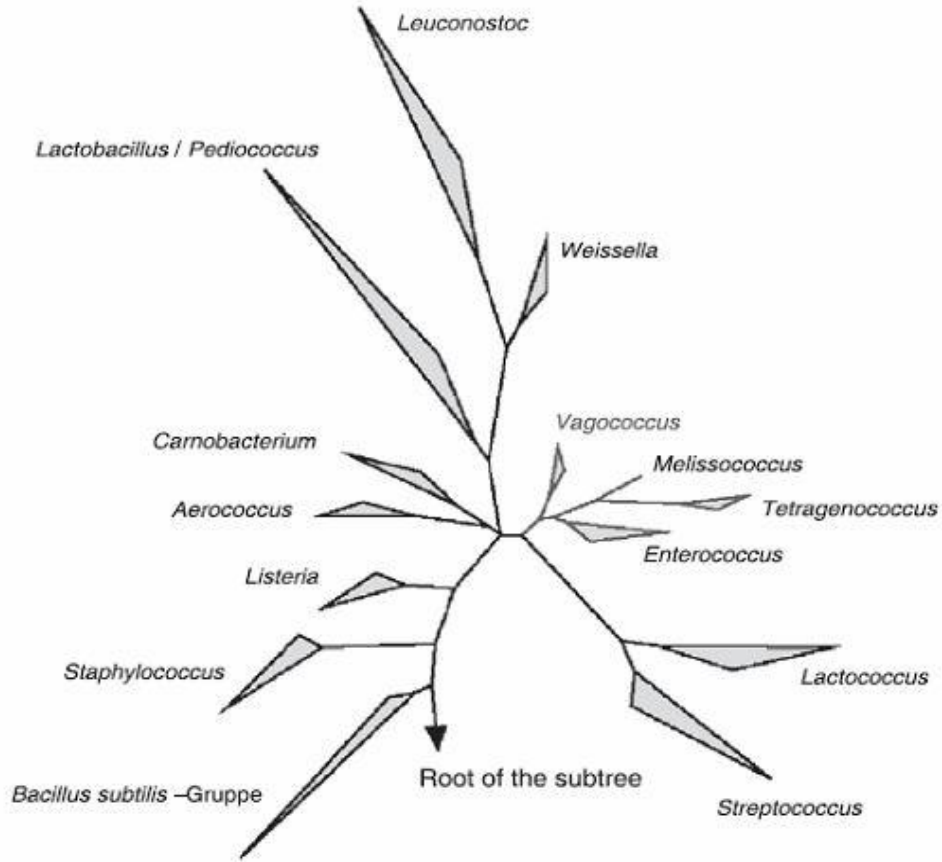
Peynir, tereyağı, krema ve yoğurt gibi fermente süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanımlarından dolayı *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* ve *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* büyük öneme sahiptir (Tabakoğlu, 2010; Tuncer, 2005).

### **2.1.3. *Streptococcus* spp.**

*Streptococcus* türleri spiral veya oval görünümde olan mikroorganizmalardır. Düzenli bir zincir şeklindeki görünülerinden dolayı da streptokok olarak adlandırılmaktadırlar (Hardie ve ark., 1995). Bu cinse ait laktik asit bakterileri homofermantatifler, gaz üretmezler ve kapsülsüzdürler. 25-45°C arasında gelişim göstermekte ve fazla miktarda laktat meydana getirmektedirler (Holt ve ark., 1994). Özellikle hayvanların sindirim sisteminde, süt ve süt ürünlerinde ayrıca sebzelerde bulunmaktadır (Stiles ve Holzapfel, 1997).

Laktik asit üreten *Streptococcus* türleri peynir ve bazı fermente süt ürünlerinin üretiminde önemli rol oynamaktadırlar. En önemli türleri *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* ve *Streptococcus raffinolactis*'tir. *Streptococcus lactis*, doğal olarak, çiğ süt, süt ürünleri ve bitkilerde bulunan homofermantatif bir laktik asit bakterisidir. *Streptococcus raffinolactis* ise genelde asitliği artmış sütlerden izole edilmektedir (Tatlı, 2009).





**Şekil 2.1.** 16S rRNA sekans analizine göre laktobasiller, enterokoklar, streptokoklar, laktokoklar ve bazı diğer gram pozitif bakterilerinin filogenetik pozisyonları (İşleroğlu, 2008)

#### 2.1.4. *Bifidobacterium* spp.

İlk kez 1899 yılında Tissier tarafından izole edilen *Bifidobacterium*'lar *Actinomycetaceae* familyasına aittir. *Bifidobacterium*'ların 15'i hayvansal kaynaklı 9'u ise insan bağırsak florası kökenli olmak üzere 24 türü bulunmaktadır. *Bifidobacterium*'lar çubuk şeklinde anaerob olup, oksijene toleransı türe göre farklılık göstermektedir. *Bifidobacterium bifidum* hidrojen peroksit eksikliğinde oksijene oranla daha fazla tolerans göstermektedir. İnce bağırsak florasında yer alan *Bifidobacterium bifidum* suşlarının optimum gelişme sıcaklığı 36-38°C arasında değişmektedir. Hayvansal kökenli suşlar ise 41-43°C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişim göstermektedir. Bu cinsin üyeleri 20°C'nin altında ya da 46°C'nin üzerinde

gelişim göstermezler. Optimum gelişim gösterdikleri pH aralığı ise 5,0 ile 8,0'dir (Özer, 2006; Tatlı, 2009).

Bu bakteriler yetişkinlerin ve bebeklerin bağırsak sisteminde, insanların vajinasında, ağzında ve çeşitli hayvan türlerinin sindirim sisteminde bulunur. Şimdiye kadar izole edilen suşlar V ve Y formunda spatül veya çomak şeklinde bir morfolojik yapı göstermektedir (Kılıç, 2008; Tabakoğlu, 2010).

### **2.1.5. *Enterococcus spp.***

Enterokoklar, laktik asit bakterilerinin önemli bir gurubunu oluştururlar. Önceleri *Streptococcus* cinsi içinde yer alan Enterokoklar, "fokal Streptokoklar" ya da "Lancefield serolojik D grubu Streptokoklar" olarak bilinmekteydi. Fakat 1984 yılında Streptokoklardan farklılıkları belirtilerek, *Enterococcus* adı altında ayrı bir cins olarak kabul edilmiştir. Enterokoklar Gram pozitif, katalaz negatif, oksidaz negatif, fakültatif anaerobik ve kok şeklinde hücelere sahiptir. Optimum gelişme sıcaklıkları 35°C'dir. Türlerle bağlı olarak 10-45°C, %6,5 tuz konsantrasyonunda ve pH 9,6'da gelişebilmektedir (Arslankoz, 2011; Moreno ve ark., 2006).

Enterokoklar, hayvanların sindirim atıklarında, toprakta, kirli suda ve hayvansal gıdalarda bulunurlar. Bu bakteriler primer patojen olarak bilinmezler, fakat genellikle ikincil patojen olarak özellikle insan bağışıklığını tehlikeye atan bakteriler içinde tanımlanmaktadır (Hummel ve ark., 2007). Fermente gıdaların tat, sertlik ve yumuşaklık gibi özelliklerinde etkin rol oynarlar. Enterokokların pastörizasyon sıcaklıklarına dirençli olmalarının yanında, farklı substrat ile düşük ve yüksek sıcaklık, ekstrem pH ve tuz konsantrasyonları gibi gelişme koşullarına adapte olma yetenekleri sayesinde, süt ve et gibi çiğ materyallerden üretilen gıda ürünleri ile ısıtma işlem uygulanan gıda ürünlerinden çok sık izole edilirler (İşleroğlu ve ark, 2008).

Enterokoklar, *enterocin* adı verilen bir bakteriyosin üretirler ve bu bakteriyosin genellikle ürünün bozulmasına sebep olur (Moreno ve ark., 2006).

#### **2.1.6. *Pediococcus spp.***

*Pediococcus* türleri Gram pozitif, katalaz negatif, hareketsiz, mikroaerofilik mikroorganizmalardır. Morfolojileri kok şeklinde tekli, çiftli kısa zincir veya tetrat şeklinde bakterilerdir. Bu cinse ait türlerin en iyi gelişme sıcaklığı 35°C, en yüksek gelişme sıcaklığı 42-45°C aralığındadır. Bazı türleri ekstrem sıcaklıklara, pH ve tuza tolerans gösterirler. Homofermantatif özelliktedirler ve doğal olarak bitkilerde bulunurlar. Ayrıca turşu, bira, şarap gibi fermente gıdaların üretiminde kullanılmaktadır (Hayaloğlu ve ark., 2001).

#### **2.1.7. *Leuconostoc spp.***

*Leuconostoc* türleri oval veya kok şeklindeki bakterilerin oluşturduğu zincir ya da grup biçiminde, Gram pozitif, spor oluşturmayan, katalaz negatif ve hareketsiz bakterilerdir. İçerdiği birçok tür %6,5 yüksek tuz konsantrasyonunda gelişebilmektedir. Optimum gelişme sıcaklıkları 20-30°C arasında olup, fakültatif anaerob koşullarda aktivite gösterebilmektedirler. Heterofermantatif olan bu bakteriler, karbonhidratları parçalayarak laktik asit yanında asetik asit, etil alkol ve CO<sub>2</sub> meydana getirirler (Hayaloğlu ve ark., 2001).

Laktik asit bakterilerinin bu üyeleri süt ürünleri, turşu ve çeşitli et ürünlerinin fermantasyonunda yer almaktadırlar. Arjinini hidrolize edemezler ve proteolitik değildirler. Diasetil ve çeşitli aroma maddeleri üretme yeteneğine sahiptirler. Sebze ürünlerinin fermantasyonunun başlatılmasında, diğer laktik asit bakterilerinden daha hızlıdırlar (Mavhungu, 2006).

## 2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Oluşturduğu Metabolik Ürünler

1900'lerin başından itibaren fermente süt ürünlerinin endüstriyel üretiminde artış söz konusudur. Laktik asit bakterileri antimikrobiyal maddeler üretmeleri sebebiyle gıdaların korunmasında eskiden beri kullanılmaktadırlar. Fermentasyon kullanılabilir karbonhidrat miktarını azaltır ve antimikrobiyal etkiye sahip küçük molekül ağırlığında organik moleküllerin oluşmasını sağlar. Bu moleküllerin en bilinenleri laktik asit, asetik asit ve propiyonik asittir (Salminen ve Wright, 1998).

Laktik asit bakterilerinin ürettiği antimikrobiyal maddeler;  $H_2O_2$  ile  $CO_2$  gibi düşük molekül ağırlığına sahip bileşenler, karakterize edilemeyen bileşenler ve bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler gibi yüksek molekül ağırlığına sahip bileşenler olarak sınıflandırılmaktadır (Ammor ve ark., 2006; Yang, 2000).

### 2.2.1. Laktik Asit

Laktik asit, tabiatta çok yaygın olarak bulunan asitlerden birisidir ve asetik asit ile birlikte geniş şekilde gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır (Çon ve Gökalp, 2002). Laktik asit, laktik asit bakterilerinin fermantasyonu sonucunda açığa çıkan organik asittir. Zayıf asit olup, ekşi ve kokusuz bir maddedir. Su, alkol ve eterle çözünürken, kloroformda çözünmez. Kolay polimerleşir. Bu özelliklerinden dolayı geniş kullanım alanları vardır (Çadırcı, 2003). Özellikle fermente ve salamura gıdalarda mikroorganizma gelişiminin önlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde en geniş kullanım alanları ise süt endüstrisi ve fermente gıdalardır (Tabakoğlu, 2010).

### 2.2.2. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )

Oksijen varlığında laktik asit bakterileri; flavoprotein içeren oksidaz, NADH oksidaz ve süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri sonucunda hidrojen peroksit oluştururlar. Laktik asit bakterileri sitokrom ve katalaz içeren "hem" gruplarına sahip değildir. Bu nedenle hidrojen peroksidi indirgeyemezler. Hidrojen peroksitin Gram pozitif

bakterilere (laktik asit bakterileri de dahil) karşı bakteriyostatik ve birçok Gram negatif bakteriye karşı ise bakteriyosidal etkisi bulunmaktadır (Yang, 2000).

Özellikle birçok laktobasil ve streptokok türü aerobik şartlar altında önemli miktarlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretebilmektedir (Çon ve Gökalp, 2002; Evren ve ark., 2006). Bakteri membranlarını bozmada etkin rol oynayan bu bileşiğe Gram negatif bakteriler duyarlıdır. Hidrojen peroksit özellikle *E.coli*'de DNA'nın üzerinde bozulmalara sebep olabilir (Kılıç, 2008).

Hidrojen peroksidin antimikrobiyal etkisi; sulfidril gruplarını okside ederek birçok enzimin denature olmasına sebep olması ve hücre zarı lipidlerini peroksitleyerek membran geçirgenliğini artırmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca bakterisidal etkiye sahip süperoksit ve hidroksil serbest radikallerinin oluşmasına sebep olarak DNA'ya zarar vermektedir (Ammor ve ark., 2006).

### **2.2.3. Hidrojen Sülfür (H<sub>2</sub>S)**

Bakterilerin sülfatları redükte etmeleri ve proteinleri parçalamasıyla hidrojen sülfür oluşmaktadır. LAB sistein, sistin ve metiyonin gibi ortamdaki kükürtlü aminoasitleri kullanarak hidrojen sülfür oluşturmaktadır (Toksoy, 1993).

Peptonlu demir agarda hidrojen sülfür oluşturan *Lactobacillus plantarum*, *L. viridescens* ve *L. coryneformis* türleri bildirilmiştir. Bunların dışında birçok *Lactobacillus* suşunun da anaerobik şartlarda ve düşük sıcaklıkta H<sub>2</sub>S oluşturdıkları açıklanmış ve besiyerinde karbon kaynağı az olduğunda hidrojen sülfürün meydana geldiği belirtilmiştir (Çadircı,2003;Yüksekdağ ve Beyatlı, 2003).

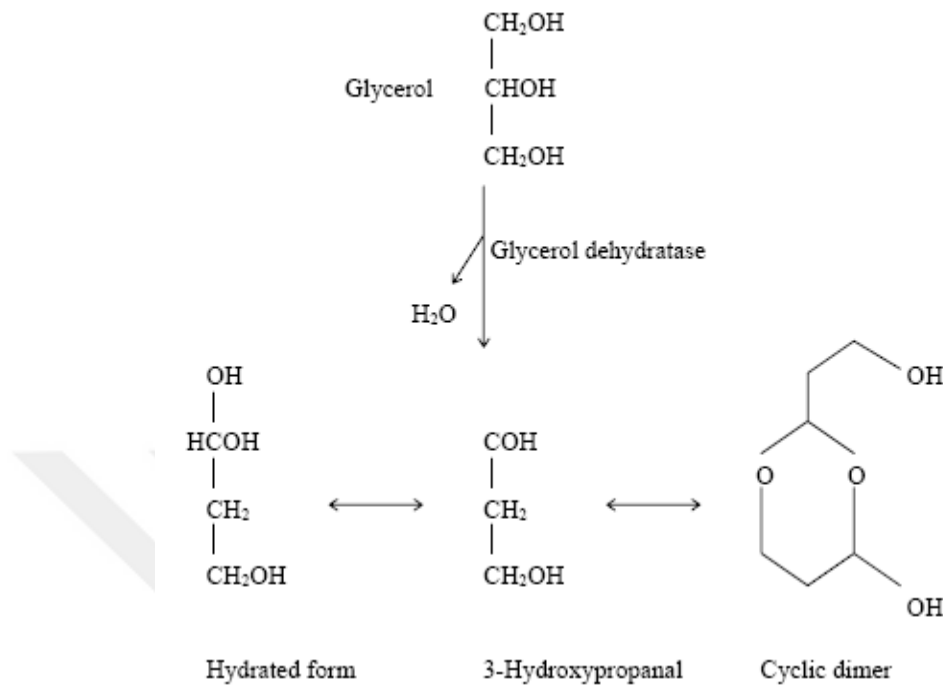
#### 2.2.4. Karbondioksit (CO<sub>2</sub>)

Karbondioksit, çoğunlukla heksozların heterofermantatif laktik asit fermantasyonu sırasında oluşmaktadır. CO<sub>2</sub> ortamın anaerobik olmasına sebep olarak ortamda aerobik mikroorganizmaların gelişimini etkilemektedir. Diğer antimikrobiyal etkisi ise ortam basıncını artırmasından kaynaklanmaktadır (Adams ve ark., 1997).

Karbondioksit anaerobik bir ortam oluşturarak, enzimatik dekarboksilasyonu inhibe etmekte, lipid membran yapısında birikerek, bu yapının geçirgenlik fonksiyonunu kaybetmesine neden olmaktadır. Karbondioksit etkili bir şekilde gıdalarda bozulma yapan mikroorganizmaların gelişimini engellemektedir (Yang, 2000).

#### 2.2.5. Reuterin

Reuterin; 3-hydroxypropanol olarak tanımlanan, yüksek çözünürlükte, küçük boyutlu, antimikrobiyel özellikte, gliserolün fermantasyonu sırasında oluşan ara bir bileşiktir (Cleusix ve ark., 2007; Yang, 2000). Bazı heterofermantatif *Lactobacillus reuterii* türleri tarafından üretilir. Reuterinin DNA sentezi üzerindeki etkisi ile ribonükleotid redüktazın alt birimini bağlayıcı bir inhibitör gibi etki ettiği bulunmuştur. *Candida*, *Clostridium*, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Shigella*, ve *Trypanosoma* cinsleri üzerinde bakteriyostatik etkisi vardır (Evren ve ark., 2006).



**Şekil 2.2.** Gliserolden reuterin biyosentezi (Yang, 2000)

### 2.2.6. Bakteriyosinler

Bakteriyosinler bakteriler tarafından sentezlenen protein yapısındaki bileşiklerdir. Genellikle üretici türe yakın akraba olan Gram pozitif türler üzerinde etki göstermektedir, üretici türlere karşı ise herhangi bir etkisi yoktur (Montville ve ark., 2001).

Bakteriyosinler, diğer bakteri türleri üzerinde bakteriyosidal ya da bakteriyostatik etkiye sahip, ribozomal sentezlenen peptitler olarak tanımlanmaktadır (Klaenhammer, 1993). Bu polipeptitler, gıda bozulması ve gıda kökenli hastalık etmeni bakterilerin gelişimini engelleme özelliklerinden dolayı, gıda endüstrisinde büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, bakteriyosinler insan ve hayvan enfeksiyonlarının tedavisinde gösterdikleri olumlu etki ile antibiyotiklere alternatif olarak önem kazanmaktadır (Nes ve Tagg, 1996).

LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin gıda koruyucusu olarak kullanılmalarının temel nedenleri;

- Genel olarak güvenli olmaları,
- Ökaryotik hücrelere karşı aktif ya da toksik olmamaları,
- Genel olarak pH ve sıcaklığa karşı tolerans göstermeleri,
- Gıda kökenli patojenlere ve çürükçül mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki göstermeleri,
- Bakterisidal etki mekanizmasının sitoplazmik membranla ilişkili olmasından dolayı antibiyotik direnciyle karşılaşmamaları olarak sayılabilir (Dinçer ve ark., 2009; Galvez ve ark., 2007).

Laktik asit bakterilerinden *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* tarafından üretilen bir bakteriyosin olan *nisin* bugüne kadar en iyi karakterize edilmiş olandır. *Nisin* geniş spektrumda antimikrobiyal aktiviteye sahip olması, gıda koruyucusu olarak uzun yıllar güvenle kullanılmış olması gibi olumlu özellikleri nedeni ile de ticari ve ekonomik anlamda ayrıca önem taşımaktadır. Nisaplin 1962-1965 yıllarında üretilen *nisin*'in ilk ticari ekstraktıdır (Dinçer ve ark., 2009; Thomas ve ark., 2005).

Günümüzde *nisin*'in yanında *Lactobacillus acidophilus* tarafından üretilen *acidophilin* ve *lactocidin*, *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen *lactocin* gibi bakteriyosinler de iyi karakterize edilmiş ve antimikrobiyal özellikleri kesinlik kazanmıştır. Laktobasiller tarafından üretilen, *lactocin 27*, *lactacin B*, *helveticin J*, *plantacin B* ve *plantaricin A* gibi bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddelerle ilgili pek çok araştırma bulunmaktadır (Dinçer ve ark., 2009; Schillinger ve ark., 1989).



### 2.2.6.1. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması

Klaenhammer (1993) Gram pozitif bakterileri inceleyerek yaptığı sınıflandırmaya göre bakteriyosinleri dört ana gruba ayırmıştır. Biyokimyasal özellikleri baz alınarak yapılan sınıflandırmada, molekül büyüklüğü, kimyasal yapıları, etki mekanizmaları ve ısı stabilitelere göre genel olarak dört ana sınıfa ayrılmışlardır. Bunlar;

Sınıf I: lantibiyotikler yani küçük peptidler (nisin, lacticin 3147A, lacticin 3147B, plantarisin C),

Sınıf II: küçük, ısıya karşı stabil peptidler,

Sınıf III: ısıya duyarlı büyük proteinler,

Sınıf IV: kompleks bakteriosinler olarak adlandırılmaktadır.

Sınıf I bakteriyosinler daha çok “lanthionine” içeriklerinden dolayı lantibiyotikler olarak adlandırılmaktadır. Yapılarında bilinen amino asitlerden farklı olarak lantionine (Lan) ve metillantionin (MeLan) amino asit türevlerini içermektedirler (Kurt ve Zorba, 2005).

Sınıf I bakteriyosinleri Sınıf Ia ve Sınıf Ib olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Sınıf Ia peptitleri genellikle 18-50 aminoasitten oluşmaktadır. Lanthionine, methyl-lanthionine, dehydrobutryrine ve dehydroalanine gibi ender bulunan aminoasitlere sahiptir. Bu grubun en bilinen üyesi ise *nisin*'dir (Cleveland ve ark., 2001). Sınıf Ib lantibiyotikler ise Sınıf Ia lantibiyotiklerden daha küçüktür. Büyüklükleri 19 aminoasiti aşmamaktadır. Sınıf Ib lantibiyotikler konakçı hücre enzimlerini inhibe etmektedir (Akkoç ve ark., 2009).

Sınıf II bakteriyosinler Sınıf I'den farklı olarak lanthionine içermezler. Ayrıca, molekül ağırlıkları 10 kDa'dan daha düşük olup, ısı stabilitesine sahiptirler. Bu sınıftaki bazı bakteriyosinler 100°C'den 121°C'ye kadar olan sıcaklıklara karşı stabildirler. Bakteri zarında gözenek oluşturarak (membran aktif) antimikrobiyal

aktivite gösterirler. Çok sayıda bakteriyosin içeren bu sınıf 3 alt sınıfa ayrılmaktadır (De Martinis ve ark., 2002). Bunların en önemlileri *enterocin A*, *pediocin AcH*, *sakacin A*, *lactococcin MMF II* gibi bakteriyosinlerin dahil olduğu Sınıf Ila bakteriyosinleridir. Bu sınıfın üyeleri *Listeria spp.* üzerindeki inhibitör etkilerinden dolayı anti-listerial bakteriyosinler olarak adlandırılmışlardır (Cotter ve ark., 2005; Ennahar ve ark., 2000; Ghrairi ve diğ., 2004).

Sınıf III bakteriyosinler; büyük, ısıya duyarlı proteinler olup, bakteriyosinlerin fizyolojik aktivitelerini gösteren, bakteriyolitik ekstraselüler enzimleri kapsamaktadır (Özkalp, 2006). Bu sınıfa ait bakteriyosinlerin moleküler ağırlığı 30 kDa'dan büyük ve ısı duyarlılık özelliğine sahip peptitler olarak karakterize edilmektedir (Diep ve ark.,1996; Nilsen ve ark.,2003; Sahl ve ark.,1995). Bu gruba giren bakteriyosinlerin büyük bir kısmı *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından sentezlenir, bu nedenle bu gruba 'Lactobacillus bakteriyosinleri' de denilmektedir (Kuleaşan, 2002). *Helvetisin J*, *laktisin A*, *laktisin B*, *helvetisin V-1829* ve *enterolisin A* bu grubun en bilinen üyeleridir (De Martinis ve ark., 2002; Jack ve ark., 1995; Tagg ve ark., 1976).

Sınıf IV bakteriyosinler ise büyük ve kompleks moleküller olup, aktiviteleri için karbohidrat ya da lipit bileşenlerine ihtiyaç duymaktadır. Bu sınıfa ait bilgiler yetersiz olup, biyokimyasal özellikleri yeterince karakterize edilememiştir (Chen ve Hoover, 2003).

**Tablo 2.2.** Bazı bakteriyosinler ve üretici mikroorganizmalar (Chen ve Hoover, 2003).

<b>Bakteriyosinler</b>	<b>Üretici mikroorganizma</b>
<b>Sınıf I a lantibiyotikler</b>	
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i>
Lactosin S	<i>Lactobacillus sakei</i>
Epidermin	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Galidermin	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
Lactisin 481	<i>Lactococcus lactis</i>
<b>Sınıf I b lantibiyotikler</b>	
Mersasidin	<i>Bacillus subtilis</i>
Cinnamisin	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
Ankovenin	<i>Streptomyces ssp.</i>
Duramisin	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
<b>Sınıf II a Bakteriyosinler</b>	
Pediosin PA-1/AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Sakasin A	<i>Lactobacillus sakei</i>
Sakasin P	<i>Lactobacillus sakei</i>
Leukosin A-UAL 187	<i>Leuconostoc gelidum</i>
Mesenterisin Y 105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Enterosin A	<i>Enterococcus faecium</i>
Diversin V41	<i>Carnobacterium divergens</i>
Laktokoksin MMFII	<i>Lactococcus lactis</i>
<b>Sınıf II b Bakteriyosinler</b>	
Laktokoksin G	<i>Lactococcus lactis</i>
Laktokoksin M	<i>Lactococcus lactis</i>
Laktasin F	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Plantarisin A	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Plantarisin S	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Plantarisin EF	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<b>Sınıf II c Bakteriyosinler</b>	
Acidosin B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Carnobakteriyosin A	<i>Carnobacterium piscicola</i>
Divergisin A	<i>Carnobacterium divergens</i>
Enterosin P	<i>Enterococcus faecium</i>
Enterosin B	<i>Enterococcus faecium</i>
<b>Sınıf III Bakteriyosinler</b>	
Helvetisin J	<i>Lactobacillus helveticus</i>
Helvetisin V-1829	<i>Lactobacillus helveticus</i>

### **2.3. Laktik Asit Bakterilerini Tanımlama Yöntemleri**

Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında çeşitli fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak, bu yöntemler bir cins içindeki tür ve alt türleri etkin bir şekilde ayırt etmede yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle genotipik özelliklere dayanan yeni yöntemler geliştirilmiş ve bakterilerin etkin bir şekilde tanımlanmasında kullanılmaya başlanmıştır (Conter ve ark., 2005; Greco ve ark., 2005).

#### **2.3.1. Fenotipik Karakterlerin Belirlenmesi**

Tanımlama yöntemlerinin başında fenotipik karakterlerin belirlenmesi gelmektedir. Laktik asit bakterilerinin fenotipik özelliklerinin belirlenmesi için yapılan genel mikrobiyolojik testlerin başında; bakteri morfolojisinin belirlenmesi, Gram reaksiyonu, farklı ortam koşullarında gelişmeleri, çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyonların belirlenmesi, glikozdan karbondioksit oluşturma ve arjinin hidroliz yeteneklerinin belirlenmesi ile laktik asit konfigürasyonunun belirlenmesi gelmektedir. Ancak bu tip yöntemler tam anlamıyla kesin sonuç vermeyebilir. Gelişen teknolojiyle birlikte, yeni bulunan genotipik karakterlerin ortaya konmasına dayalı yöntemler, fenotipik karakterlere dayalı tanımlamaların güvenilirliğinin sorgulanmasına neden olmuştur. Fenotipik yöntemlerin az tekrarlanabilirlik gibi kalıcı sınırlamaları vardır. Bazı tekniklerin belirsizliği geniş çaplı araştırma gerektirir ve ayırt etmede kesinlik sağlamaz (Elçioğlu, 2010; Mohania ve ark., 2008).

Fenotipik tanımlamayı pratik hale getirmek için kullanılan yarı otomatik veya otomatik tanımlama sistemleri geliştirilmiştir. Otomatik sistemler kullanıma hazır test kitleri şeklinde bulunmaktadır. Ticari olarak temin edilen bu kitler organizmaların bir dizi substratı fermente etmesine veya asimile etmesine dayanır. Bunlara örnek olarak Analytical Profile Index (API) (BioMerieux, France) ve BBL Crystal (Becton, Dickinson and Company, USA) verilebilir. Tanımlama çalışmalarında hazır kitlerin kullanılmasının amacı; mikroorganizmaların tanımlanmasının çabuk ve doğru bir şekilde yapılmasıdır. Bu kitlerin avantajları; birçok biyokimyasal testin bir arada çalışılması, az miktarda malzeme ve örnek

kullanımıyla kısa sürede sonuç vermesi, tekrarlanabilir olması ve yüksek doğrulukta sonuç vermesidir (Elçioğlu, 2010).

### 2.3.2. Genotipik Karakterlerin Belirlenmesi

Özellikle son yıllarda DNA temelli tanımlama yöntemleri büyük ölçüde gelişim göstermiştir. Genotipik yöntemlerin çoğu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction-PZR) prensibine dayanmaktadır. Laktik asit bakterilerini tanımlayabilmek için türün bazı baz dizilerinin bilinmesi gerekmektedir (Elçioğlu, 2010; Temmermanve ark., 2004).

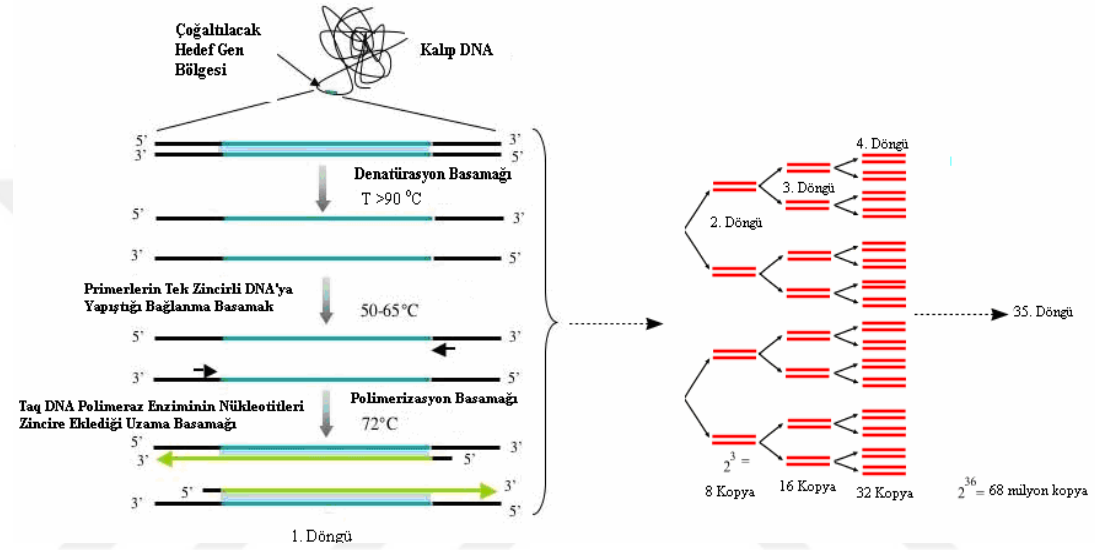
PZR tekniği; bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin primerler aracılığı ile çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı bir *in vitro* DNA sentezi yöntemidir. PZR'm çalışma prensibi üç aşamaya dayanır:

1. Denatürasyon: Kalıp DNA'nın yüksek sıcaklıkta (92-95°C'de) denatürasyonu (ayrılması) ve tek sarmallı polinükleotid zincirinin elde edilmesi basamağıdır.
2. Bağlanma: Reaksiyon sıcaklığının düşürülmesiyle primerlerin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye, hidrojen bağları kurarak bağlanması işlemidir. Bu işlem 40-65°C arasında gerçekleşmektedir.
3. Zincirin uzaması: Taq DNA polimeraz enzimi vasıtasıyla primerlerin zinciri tamamlayacak şekilde uzatılması sağlanır. Bu basamak 72-75°C'de gerçekleştirilir. DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklıkta primerlere bağlanmış olan enzim molekülleri, kalıp DNA'ya karşılık gelen nükleotidleri bağlayarak 5'-3' yönünde DNA sentezini gerçekleştirirler (Şekil 2.3) (Yılmaz ve Temiz, 2003).

PZR tekniğinde bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve bu döngü 25 ila 35 kez tekrarlanır. Her döngüde, iki primer arasında kalan özgün DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olur. Bir PZR uygulamasında "n" sayıda döngü varsa, ortamda maksimum "2<sup>n</sup>" sayıda DNA oluşması beklenir (Şekil 2.3). Bu işlem sonucunda elde edilen PZR amplikonlarının tanımlanmasında genellikle kullanılan

yöntem ise agaroz jel elektroforezidir. Amplikonlar agaroz jelde elektroforezle ayrıştırılarak çoğaltılan DNA parçasının büyüklüğü görünür hale getirilir (Yılmaz ve Temiz, 2003).

### PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu



Şekil 2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Kırmacı, 2010)

PZR yönteminden başka birçok farklı genotipik teknik, türlerin identifikasyonu için kullanılabilir. LAB'nin moleküler tiplendirmesinde; suşların içerdiği plazmit profilleri, restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (RFLP), değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD), gerçek zamanlı PZR (RT-PZR) ve kültür bağımlı olmayan yöntemler kullanılmaktadır (DGGE, TGGE, LH-PZR). Tablo 2.3'de bazı laktik asit bakterisi türlerinin tanımlanmasında kullanılan genotipik yöntemler gösterilmiştir (Ehrmann ve Vogel, 2005; Mohania ve ark., 2008).

**Tablo 2.3.** Laktik asit bakterilerinin identifikasyonu için uygulanmış moleküler yaklaşımlar (Mohania ve ark., 2008)

<b>Kullanılan Teknikler</b>	<b>Tanımlanan Türler</b>
Restriksiyon enzim analizi	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. reuteri</i>
Pulse-field jel elektroforezi	<i>Bifidobacteria spp.</i> <i>L. casei</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. lactis</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. rhamnosus</i>
Ribotyping	<i>L. reuteri</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. casei</i> <i>L. acidophilus</i>
RAPD profili	<i>Bifidobacteria spp.</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. casei</i>
Amplified rDNA restriksiyon analizi	<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. debrueckii</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i>
RFLP	<i>L. pentosus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. pseudoplatantum</i>
Real time PZR	<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. reuteri</i>

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

Amasya ilinde tüketime sunulan 77 adet çiğ süt örneği materyal olarak kullanılmıştır. Örnek toplama ve izolasyon işlemleri yaklaşık 3 aylık bir zaman periyoduna yayılmıştır. Örnekler aseptik koşullar altında alınarak Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirilmiş ve beklenmeden izolasyon işlemine geçilmiştir. Örnekler analizler tamamlanıncaya kadar +4°C'de saklanmıştır.

##### 3.1.1. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

###### De Man Rogosa ve Sharpe Agar (MRS Agar)

Pepton casein	10 g/L
Meat extract	10 g/L
Yeast extract	4 g/L
D (+) glukoz	20 g/L
Dipotasyum hidrojen sülfat	0,2 g/L
Tween 80	1 g/L
Diamonyum hidrojen sitrat	2 g/L
Sodyum asetat	5 g/L
Magnezyum sülfat	0,2 g/L
Manganez sülfat	0,04 g/L
Agar -agar	14 g/L

Ticari olarak elde edilen bu besiyeri (Merck 1.10660.0500) laktik asit bakterilerinin izolasyonu için kullanılmak üzere 68,2 gramının 1 litre distile suda çözülerek 121°C'de 15 dakika otoklavda (Nüve OT 90L, Türkiye) steril edilmesiyile hazırlanmıştır. 45°C'ye kadar soğutularak petri kaplarına dökülmüş ve dondurularak kullanıma hazır hale getirilmiştir.



**De Man Rogosa ve Sharpe Broth ( MRS Broth)**

Pepton casein	10 g/L
Meat extract	8 g/L
Yeast extract	4 g/L
D (+) glukoz	20 g/L
Dipotasyum hidrojen sülfat	2 g/L
Tween 80	1 g/L
Diamonyum hidrojen sitrat	2 g/L
Sodyum asetat	5 g/L
Magnezyum sülfat	0,2 g/L
Manganez sülfat	0,04 g/L

Ticari olarak elde edilen bu besiyeri (Merck 1.10661.0500) laktik asit bakterilerini aktifleştirmek için kullanılmak üzere 52,2 gramı 1 litre distile suda çözülerek 121°C' de 15 dakika otoklavda steril edilmesiyle hazırlanmıştır. Steril cam tüplere bölünerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

**%20 Gliserol içeren De Man Rogosa ve Sharpe Broth (MRS Broth)**

Ticari olarak elde edilen bu besiyeri çiğ süttten elde edilen laktik asit bakterisi izolatlarını saklamak için kullanılmak üzere 52,2 gramının 20'si gliserol olacak şekilde 1 litre distile su-gliserol karışımında çözülerek 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmesiyle hazırlanmıştır. Steril 2 ml' lik ependorflara bölünerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

**MRS Broth pH:3,9**

İçeriği verilen MRS broth besiyeri saf suda iyice çözülerek, 1 M hidroklorik asit çözeltisi ile pH'sı 3,9'a (Hanna Instruments, India) ayarlanmıştır. Vidalı cam tüplere 5'er ml dağıtılmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

**MRS Broth pH:9,6**

İçeriği verilen MRS broth besiyeri saf suda iyice çözülerek 1 M sodyum hidroksit çözeltisi ile pH'sı 9,6'ya ayarlanmıştır. Vidalı tüplere 5'er ml dağıtılmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

**%4 Tuz İçeren MRS Broth**

İçeriği verilen MRS broth ortamı saf suda eritilmiş ve litresinde 40 g olacak şekilde NaCl ilave edilerek hazırlanmıştır. Vidalı tüplere 5'er ml dağıtılmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

**%7,5 Tuz İçeren MRS Broth**

İçeriği verilen MRS broth besiyeri saf suda eritilmiş ve litresinde 75 g olacak şekilde NaCl ilave edilerek hazırlanmıştır. Vidalı tüplere 5'er ml dağıtılmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

**%10 Tuz İçeren MRS Broth**

İçeriği verilen MRS broth besiyeri saf suda eritilmiş ve litresinde 100 g olacak şekilde NaCl ilave edilerek hazırlanmıştır. Vidalı tüplere 5'er ml dağıtılmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

**Tryptic Soy Agar (TSA)**

Pepton kazein	15 g/L
Soya pepton	5 g/L
Sodyum klorit	5 g/L
Agar -agar	15 g/L

Ticari olarak elde edilen bu besiyerinin (Merck 1.05458.0500) 40 gramı 1 litre distile suda çözülerek 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmesiyle hazırlanmıştır. 45°C'ye kadar soğutulurken petri kaplarına dökülmüştür. Bu besiyeri çiğ sütlerden elde edilen izolatların patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini ölçmek için kullanılmıştır.

**Peptonlu Su**

Ticari olarak elde edilen peptondan (Lab M.C024) 1 g alınarak 1 litre distile su içerisinde çözülmüştür. İzolasyon basamağı için vidalı cam tüplere 9 ml aktarılmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

**Gram'ın Kristal Violet Boyası**

Kristal violet	2 g
Etil alkol (%95'lik)	20 ml
Amonyum oksalat	0,8 g
Distile su	80 ml

2 g kristal violet 20 ml etil alkolde çözülmüştür. 0,8 g amonyum oksalat ise 80 ml distile suda çözülmüştür. Sonra bu iki çözelti karıştırılarak bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün filtre kağıdından süzülerek cam şişelerde saklanmıştır. Hazırlanan bu boya gram boyama işleminde kullanılmıştır.

**Gram'ın Safranin Boyası**

Safranin	0,25 g
Etil alkol	10 ml
Distile su	50 ml

0,25 g safranin 10 ml etanolde çözüldükten sonra üzerine 50 ml distile su ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Bu karışım bir gece bekletildikten sonra ertesi gün filtre kağıdından süzülerek cam şişelerde saklanmıştır.

**Gram'ın İyodür Çözeltisi**

İyot	1 g
Potasyum iyodür	2 g
Sodyum bikarbonat (% 5'lik)	60 ml
Distile su	255ml

1 g iyot ve 2 g potasyum iyodür, 5 ml distile suda çözülmüştür. Buna 250 ml distile su ve 60 ml %5'lik sodyum bikarbonat ilave edilerek iyice karıştırılmıştır ve bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün filtre kağıdından süzülerek cam şişelerde saklanmıştır.

**10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Tamponu pH:8,4**

Trisma base (Sigma T6066)	107,81 g
Borik asit (Sigma B6768)	55,02 g
EDTA (Sigma E5134)	7,444 g

Kimyasal maddelerin hepsi tartılıp bir şişeye koyulduktan sonra 1 litre distile su içinde çözülmüştür. İyice çözünen karışımın pH'sı 8,4'e ayarlanarak çözelti hazır hale getirilmiştir.

### **1X TBE Tamponu pH:8,4**

10X TBE çözeltisinden 100 ml alınıp saf suyla 1 litreye tamamlanarak hazırlanmıştır. Agaroz jelin hazırlanması ve jele yüklenen PZR ampliconlarının yürütülmesinde kullanılmıştır.

### **Etidyum Bromür Çözeltisi**

DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi etidyum bromürün DNA bağları arasına bağlanarak, 300-360 nm'de ışığı absorblaması sonucunda floresan etki göstermesiyle oluşmaktadır. Bu nedenle 200 ml distile su içerisine, 20 µl etidyum bromür (5 µg/ml) eklenerek %10'luk etidyum bromür çözeltisi hazırlanmış ve jel boyama işlemi için kullanılmıştır.

### **3.1.2. Kullanılan Referans Suşlar**

Bu çalışmada; çiğ sütlerden elde edilen izolatların indikatör mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için beş adet patojen mikroorganizma kullanılmıştır. Bunlar; *Escherichia coli* ATCC 35218, *Bacillus cereus* DSM 4312, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 standart suşlardır.

Bunun yanında moleküler tanımlama sırasında pozitif kontrol olarak da *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 standart suşu kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan standart suşlar, Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir.

### 3.2. Çiğ Süt Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Çiğ süt örneklerinden steril numune poşetlerine, steril pipet vasıtasıyla 10 ml alınıp üzerine 90 ml önceden steril edilmiş peptonlu su çözeltisi aktarılmış ve 1-2 dakika karıştırılarak homojenize edilmiştir. Daha sonra desimal seri dilüsyonlar hazırlanmıştır.

Çiğ süt örneklerinden bakteri izolasyonu için De Man Rogosa ve Sharpe Agar (MRS) kullanılmıştır. Hazırlanan seri dilüsyonlardan 100 µl alınarak MRS agara aktarılmış ve drigalski spatülü ile yayma işlemi yapılmıştır. Örnekler mikroaerofilik ortamda, 37°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona (Thermo Scientific, Finland) bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında plaklarda üreyen koloniler ve laktik asit bakterisi olduğu düşünülen şüpheli kolonilerden 5 koloniye kadar seçilmiş ve katalaz testi uygulanmıştır. Katalaz testi sonucunda negatif olan koloniler, MRS agara ekilmiştir. Tekrar etüvde 37°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyonu takiben, üreyen kolonilere bir kez daha katalaz testi yapılmıştır. Katalaz negatif sonuç veren izolatlar, gram boyama yapılmış ve Gram pozitif sonuç veren koloniler, muhtemel laktik asit bakterileri olarak belirlenmiştir. İzolatlar %20 gliserol içeren MRS broth besiyeri içinde -20°C ve -80°C'de (Sanyo MDF-U5386S, Japan) saklamaya alınmıştır (İşleroğlu ve ark., 2008; Tabakoğlu, 2010).

### 3.3. İzolatların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

İzolatların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, patojen mikroorganizmalar olarak bu tip testlerde yaygın olarak kullanılan *Escherichia coli* ATCC 35218, *Bacillus cereus* DSM 4312, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 standart suşları kullanılmıştır. -20°C de muhafaza edilen bu suşlar Tryptic Soy Agar besiyerinde aktifleştirilmiştir. Antimikrobiyal aktivite testi için kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Hernandez ve ark., 2005; Tabakoğlu, 2010).

Antimikrobiyal aktivitesi belirlenecek izolat ilk olarak, MRS broth besiyerine inoküle edilerek 37°C'de etüvde 24 saat aktifleştirilmiş ve birinci aktif kültürleri elde edilmiştir. Daha sonra birinci aktif kültürlerden MRS broth besiyeri içeren tüplere inoküle edilerek, etüvde 24 saat daha inkübasyona bırakılmış ve ikinci aktif kültürleri elde edilmiştir. İkinci aktif kültürler 2420 rpm'de 20 dakika 5°C'de santrifüjlenerek (Sigma 3-30K, Germany) süpernatantları elde edilmiştir (Tabakoğlu, 2010; Toba ve ark., 1991). Süpernatantlar, 0,22 µm çaplı steril membran filtrelerden geçirilerek hücresiz filtratlar elde edilmiştir. Bir gün öncesinden aktifleştirilen beş mikroorganizma 0,5 McFarland yoğunluğunda olacak şekilde ayarlanmış ve önceden hazırlanan Tryptic Soy Agar besiyeri üzerine eküvyon yardımıyla ekilmiştir. Daha sonra steril mantar delici yardımıyla, ekim yapılan petriler üzerinde 6 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Açılan kuyucuklara hazırlanan süpernatantlardan 100 µl koyulmuş ve iki saat dışarıda bekletilerek süpernatantların besiyerine difüze olması sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan petriler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün petrilerde oluşan inhibisyon zonları bir kumpas yardımı ile ölçülmüştür ve inhibitör etki gösteren izolatlar belirlenmiştir (Hernandez ve ark., 2004; Tabakoğlu, 2010).

### **3.4. Antimikrobiyal Aktivite Gösteren İzolatların İdentifikasyonu**

Kuyucuk difüzyon testi sonucunda en az dört patojen mikroorganizmaya karşı inhibitör etki gösteren izolatlara, bu aşamada identifikasyon yapılmıştır. İzolatlara genel mikrobiyolojik yöntemlerden; Gram boyama, katalaz testi, gelişebildiği NaCl konsantrasyonu, optimum gelişme sıcaklığı ve farklı pH koşullarında üreyebilme kabiliyetleri ile ilgili testler uygulanmıştır. Daha sonra izolatlara API 50 CHL ve API 20 Strep test kitleri uygulanarak, izolatların tür düzeyinde tanımlanması yapılmıştır.

#### **3.4.1. Gram Boyama**

Gram boyama işlemi mikroorganizmaların tanımlanması ve sınıflandırılmasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yönteme göre, laktik asit bakterilerinin MRS agar ortamına ekilmiş bir gecelik aktif kültürlerinden iğne uçlu öze ile alınarak, temiz

bir lam üzerine bir damla saf su ile yayıldı ve kuruması beklendi. Kuruduktan sonra alevden 2-3 kez geçirilerek fikse edildi. Preparat üzerine ilk olarak kristal viyole boyası damlatılarak 1 dakika bekletildi. Saf su ile yıkanarak gram iyodu damlatıldı ve 1 dakika daha bekletildi. Lam saf su ile yıkandı ve alkol damlatılarak 15-20 saniye kadar bekletildi. Son olarak saf su ile yıkandıktan sonra safranin ile boyandı ve 1 dakika bekletildi. Preparat yıkandıktan sonra kuruması beklendi ve ışık mikroskobunda 100x'lik büyütmede immersiyon yağı damlatılarak incelendi.

Patojen mikroorganizmalara karşı inhibisyon aktivitesi gösteren izolatların 24 saatlik genç kültürleri, Gram boyama işlemine göre boyandı ve mikroskop incelemesi (Olympus CX21, China) sonucunda mavi-mor renkli koloniler Gram pozitif, pembe renkli koloniler ise Gram negatif olarak kabul edildi. Gram pozitif olan izolatlar muhtemel laktik asit bakterisi olarak seçildi. Ayrıca izolatların hücre morfolojileri de belirlendi.

#### **3.4.2. Katalaz Testi**

Patojen mikroorganizmalara karşı inhibitör etki gösteren izolatlar, MRS agarda üretildikten sonra temiz bir lam üzerine bir öze dolusu alınarak, üzerine bir damla %3'lük hidrojen peroksit damlatılmıştır. Birkaç saniye beklendikten sonra gaz kabarcıklarının oluşması pozitif, herhangi bir reaksiyonun gözlenmemesi ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Negatif sonuç veren izolatlar, muhtemel laktik asit bakterileri olarak seçilmiştir. Testte pozitif kontrol olarak ise *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 standart suşu kullanılmıştır.

#### **3.4.3. Farklı NaCl Konsantrasyonlarında Gelişme Testi**

Patojen mikroorganizmalara karşı inhibitör etki gösteren izolatlar, %4, %7,5 ve %10 NaCl konsantrasyonu içeren MRS broth besiyerine inoküle edilerek, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişme gösteren izolatlar besiyerinde bulanıklık oluşturarak kendini göstermiş ve pozitif olarak kabul edilmiştir, göstermeyenler ise



negatif olarak kabul edilmiştir. Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen MRS broth besiyeri kullanılmıştır.

#### **3.4.4. Farklı pH' larda Gelişme Testi**

Patojen mikroorganizmalara karşı inhibitör etki gösteren izolatlar hidroklorik asit ve sodyum hidroksit yardımıyla, pH'ları 3,9 ve 9,6'ya ayarlanan MRS broth besiyerlerine inokule edilerek, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda besiyerinde bulanıklık oluşturarak gelişme gösteren izolatlar pozitif, göstermeyenler ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen MRS broth besiyeri kullanılmıştır.

#### **3.4.5. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme Testi**

Patojen mikroorganizmalara karşı inhibitör etki gösteren izolatlar, MRS broth besiyerine inoküle edilerek, 4°C, 15°C ve 45°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda besiyerinde bulanıklık oluşturarak gelişme gösteren izolatlar pozitif, gelişme göstermeyenler negatif olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen MRS broth besiyeri kullanılmıştır.

#### **3.5. Karbonhidrat Fermentasyon Testleri**

İzolatların tür düzeyinde belirlenmesi amacıyla Analytical Profil Index (API) (Biomérieux, France) test kitleri kullanılmıştır. Mikroskop görünümü incelenerek belirlenen basil formundaki izolatlara API 50 CHL testi, kok formundaki izolatlara ise API 20 Strep testi uygulanmıştır.

### 3.5.1. API 50 CHL Testi

- Basil formundaki izolatların fenotipik tür tayininde API 50 CHL test kiti kullanılmıştır.
- 24 saatlik agar kültüründen 2 ml API süspansiyon ortamına yüksek miktarda kültür aktarılmıştır.
- 5 ml'lik saf su ortamına, hazırlanan süspansiyondan belirli hacimde aktararak 2 Mc Farland yoğunluğuna ayarlanmıştır.
- İstenilen yoğunluğa ulaşıldıktan sonra, 2 ml'lik süspansiyon ortamından aynı hacmin iki katı kadar alınarak, 10 ml'lik API CHL ortamına aktarılmış ve iyice karıştırılarak homojenize olması sağlanmıştır.
- Hazırlanan bu süspansiyon test stribine pipetlenmiş ve üzeri mineral yağ ile kaplanmıştır.
- $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edilmiş, 24 ve 48 saat sonunda sonuçlar kaydedilmiştir.
- 48 saat sonunda alınan sonuçlar (<https://apiweb.biomerieux.com/>) veritabanına girilerek izolatların tür düzeyinde tanımlamaları yapılmıştır.

API CHL 50 test kiti, 49 farklı karbohidratın fermentasyonunu test eden kullanıma hazır bir kittir. Bu karbohidratlar: Gliserol, eritritol, D-arabinoz, L-arabinoz, riboz, D-ksiloz, L-ksiloz, D-adonitol, metil-D-ksilopiranosid, D-galaktoz, D-glukoz, D-fruktoz, D-mannoz, D-sorboz, L-rhamnoz, dulcitol, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, metil- $\alpha$ D-mannopiranosid, metil- $\alpha$ D-glukopiranosid, N-asetilglukozamin, amygdalin, arbutin, esculin ferric sitrat, salisin, D-sellobioz, M-maltoz, D-laktoz, D-melibioz, D-sukroz, D-trehaloz, inulin, D-melezitose, D-rafinoz, amidon (nişasta), glikojen, ksilitol, gentiobiose, D-turanoz, D-lyxose, D-tagatoz, D-fukoz, L-fucoz, D-arabitol, L-arabitol, potasyum glukonat, potasyum-2-ketoglukonat, potasyum-5-ketoglukonattan oluşmaktadır.

API 50 CHL testinde asit oluşumu gerçekleşmiş olan tüplerde, bromeresol purple indikatöründen dolayı mor olan rengin sarıya dönüşmesi gerekmektedir. 25. tüpte bulunan esculin testinde ise renk sarı yerine siyaha dönüşmelidir. Karbonhidrat içermeyen birinci kontrol tüpünde renk değişimi olmamalıdır. Bütün bu bilgilere göre tüplerdeki renk değişimleri gözlenmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir.



**Resim 3.1.** API 50 CHL pozitif (solda) ve negatif (sağda) test stribi

### 3.5.2. API 20 Strep Testi

- Kok formundaki izolatların fenotipik tür tayininde ise API 20 Strep testi kullanılmıştır.
- 24 saatlik agar kültüründen 2 ml API süspansiyon ortamına aktarılarak, 4 Mc Farland yoğunlukta ayarlanmıştır.
- Bu test stribi iki kısımdan oluşmaktadır. Hazırlanan bu süspansiyondan ilk kısımdaki her bir mikrotüpe 100 µl pipetlenmiştir.
- 2 ml'lik süspansiyondan 500 µl kadar API GP mediuma aktarılmıştır. Homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra test kitinin ikinci kısmındaki

mikrotüplere 120 µl pipetlenmiş, ikinci kısmın üzeri mineral yağ ile kaplanmıştır.

- $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilmiştir. Sonuçlar (<https://apiweb.biomerieux.com>) veritabanına girilerek izolatların tür düzeyinde tanımlamaları yapılmıştır.

Bu test stribinin ilk kısmında; VP (sodyum piruvat), hipurik asit, eskulin ferric sitrat, piroglutamik asit  $\beta$ -naftilamid, 6-bromo 2-naftil- $\alpha$ D galactopiranozid, naftol ASBI-glukuronik asit, 2-naftil  $\beta$ D-galactopiranozid, 2-naftil fosfat, L-lözin- $\beta$ -naftilamid ve L-arjinin testleri bulunmaktadır. Bu ilk kısım, 4 saat inkübasyondan sonra gerekli reaktiflerin eklenmesiyle görülen renk değişimlerine göre okunmaktadır. İkinci kısım ise; D-riboz, L-arabinoz, D-mannitol, D-sorbitol, D-laktoz, D-trehaloz, inulin, D-rafinoz, amidon (nişasta) ve glikojen testlerini içermektedir. Bu ikinci kısım ise, 24 saat inkübasyondan sonra asit oluşumuna bağlı olarak kendiliğinden meydana gelen renk değişimine göre okunmaktadır. Tüplerdeki kırmızı rengin sarıya dönmesi pozitif, kırmızı veya turuncu olarak kalması ise negatif olarak değerlendirilmektedir. Sonuçlar (<https://apiweb.biomerieux.com/>) veritabanına girilerek tür düzeyinde tanımlamaları yapılmıştır.



**Resim 3.2.** API 20 Strep negatif test stribi



**Resim 3.3.** API 20 Strep pozitif test stribi

### 3.5.2.1. Hemoliz Testi

API 20 Strep testinde 21. test olarak hemoliz testinin de yapılması gerekmektedir. Hemoliz testi, daha çok streptokoklar ve stafilokokları kendi içlerinde ayırmak için kullanılır. Streptokoklar değişik hemoliz enzimlerine sahiptirler ve kanlı agar besiyerinde farklı özellikte hemolizlere neden olurlar. Streptokoklar, kanlı agar besiyerinde meydana getirdikleri bu farklı hemolizlere göre;  $\beta$ -hemolitik,  $\alpha$ -hemolitik ve  $\gamma$ -hemolilik streptokoklar olarak üçe ayrılırlar.  $\beta$ -hemolitik streptokoklar hemoglobini tam olarak hemoliz ederler ve bakteri kolonilerinin etrafında düzgün bir hatla çevrilmiş temiz ve berrak bir hemoliz zonu oluştururlar.  $\alpha$ -hemolitik streptokokların kanlı agar besiyerindeki kolonilerinin etrafında, kenarları keskin hatlı olmayan, bulanık ve yeşilimsi bir hemoliz zonu oluşur.  $\gamma$ -hemolitik streptokok terimi ise, hemolizin enzimlerine sahip olmayan, dolayısıyla da kanlı agar besiyerinde hemoliz oluşturmayan streptokokları tanımlamak için kullanılmaktadır (Temiz 2008). Laktik asit bakterileri hemoliz oluşturmazlar. İncelenecek olan izolat MRS broth ortamında geliştirilerek, kanlı agar besiyerine (GBL, Türkiye) tek koloni düşecek şekilde ekim yapılmıştır. Petriler 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir. Resim 3.4'te de görüldüğü gibi laktik asit bakteri kolonileri etrafında, herhangi bir zon görülmediğinden hemoliz oluşturmamışlardır.



**Resim 3.4.** Kanlı agar üzerinde hemoliz oluşturmeyen laktik asit bakteri kolonileri

### 3.6. İzolatların Genotipik Olarak Tanımlanması

Patojen mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etki gösteren izolatların, API test kitiyle yardımıyla tanımlanmasının ardından iki tür seçilmiş ve bunların genotipik olarak da doğrulanması için moleküler yöntemler uygulanmıştır. Seçilen türler *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* türleri olup bunlara uygun primerler belirlenerek, gen bölgelerinin çoğaltılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır.

### 3.7. İzolatlardan Genomik DNA Saflaştırılması

Patojen mikroorganizmalara karşı inhibitör etki gösteren izolatların DNA'ları kit protokolü uygulanarak saflaştırılmıştır. DNA izolasyonları için GeneJET Genomik DNA Saflaştırma Kiti (Thermo Scientific, Finland) kullanılmıştır. Üretici firmanın önerdiği protokol basamakları Tablo 3.1'deki gibi uygulanarak, genomik DNA'lar elde edilmiş ve kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

**Tablo 3.1.** Gram pozitif bakteriler için genomik DNA saflaştırma protokolü

1	Laktik asit bakterisi hücreleri 2 ml'lik santrifüj tüpünde 10 dk 5000 rpm'de santrifüj (Hettich Zentrifügen, Germany) edilerek toplandı ve süpernatant atıldı.
2	Pellet 180 µl gram pozitif lizis bufferla tekrar süspansiyon edilerek, 30 dk 37°C'de inkübe edildi.
3	200 µl lizis solüsyonu ve 20 µl proteinaz K eklendi. Homojen bir süspansiyon elde etmek için pipetleyerek ya da vorteksleyerek karıştırıldı.
4	Karışım 56°C'de (Thermobath ALB128, Korea) arasıra vortekslenerek (IKA, Germany) yaklaşık 30 dk inkübe edildi.
5	20 µl RNase A solüsyonu eklendi ve vortekslenerek karışım 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
6	400 µl saf etanol eklendi ve pipetlenerek karıştırıldı.
7	Hazırlanan lizat toplama tüpü takılı olan GeneJET genomik DNA saflaştırma kolonuna transfer edildi. Kolon 1 dk 6000 rpm'de santrifüj edildi ve toplama tüpü atıldı. GeneJET genomik DNA saflaştırma kolonuna yeni bir 2 ml toplama tüpü yerleştirildi.
8	500 µl yıkama buffer I (etanol eklenmiş) eklendi. 1 dk 8000 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken içerik atıldı ve saflaştırma kolonuna toplama tüpü tekrar takıldı.
9	500 µl yıkama buffer II (etanol eklenmiş) GeneJET genomik DNA saflaştırma kolonuna eklendi. 3 dk maksimum 12000 rpm'de santrifüj edildi.
10	Genomik DNA'yı elde etmek için 200 µl elüsyon buffer GeneJET genomik DNA saflaştırma kolon membranına eklendi. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve 1 dk 8000 rpm'de santrifüj edildi. Saflaştırılan DNA kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

### 3.8. Kaynatma Yöntemiyle DNA Saflaştırılması

En fazla üç patojen mikroorganizma üzerinde antimikrobiyal aktivite gösteren ve hiçbir patojen mikroorganizma üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermeyen izolatların DNA'ları, kaynatma yöntemiyle elde edilmiştir. Bu yöntemle göre MRS broth besiyerinde geliştirilen izolatlar, öncelikle 500 µl steril saf su içine alınarak 95°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra genomik DNA'ları içeren süpernatant kısımları, boş bir steril ependorfa alınmış ve çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

### 3.9. *L. plantarum* ve *L. paracasei* İzolatları için Kullanılan Primer Dizileri

*Lactobacillus plantarum* türü için genotipik tanımlama Tablo 3.2'de belirtilen *planF* ve *pREV* primerleri kullanılarak, 318 bp büyüklüğünde bir bölgenin çoğaltılmasıyla yapılmıştır. *Lactobacillus paracasei* türü için ise, Tablo 3.2'de belirtilen *casfor* ve *casrev* primerleri kullanılmış ve 142 bp büyüklüğünde bir gen bölgesi çoğaltılmıştır.

**Tablo 3.2.** PZR analizinde kullanılan primer dizileri

Tür adı	Forward (5'-3') Reverse (5'-3')	PZR ürünü büyüklüğü (bp)	Referans
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>planF</i> :CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA <i>pREV</i> :TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC	318	Torriani ve ark., 2001
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>casfor</i> :GCA CCG AGA TTC AAC ATG GAA <i>casrev</i> :GCC ATC TTT CAG CCA AGA ACC	142	Tabasco ve ark., 2007

### 3.10. PZR Optimizasyon Çalışmaları

Jel fotoğraflarındaki bant profili görüntülerini daha net elde etmek için PZR karışım konsantrasyon oranlarının belirlenmesinde, farklı optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

#### 3.10.1. *Lactobacillus plantarum* için Tm (Bağlanma sıcaklığı) optimizasyonu

PZR yönteminde her bir örnek için 25 µl toplam hacimde karışım hazırlanmıştır. Tüm PZR çalışmaları biyogüvenlik kabini (Esco Class II BSC Airstream, Singapore) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Uygulanan reaksiyon karışımı ve farklı bağlanma sıcaklıkları Tablo 3.3'te verilmiştir. Primerlerin bağlanma sıcaklığı  $T_m=2(A+T)+4(G+C)$  formülü ile hesaplanmıştır. En iyi bağlanma sıcaklığını belirlemek için gradientli PZR uygulaması yapılmış ve 46-56°C arasında çalışılmıştır (Ghotbi ve ark., 2011).



**Tablo 3.3.** *L. plantarum* Tm optimizasyonu reaksiyon karışımı

Reaksiyon karışımı (25µl)	Bağlanma sıcaklığı (°C)	saf su (µL)	10X PZR tamponu (µL)	25 mM MgCl <sub>2</sub> (µl)	10 mM dNTP mix (µl)	10 µM planF primer (µl)	10 µM pREV primer (µl)	5U/µl TaqDNA polimeraz (µl)	DNA (µl) ≥50 ng
1. tüp	46,2	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
2. tüp	46,7	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
3. tüp	47,5	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
4. tüp	48,6	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
5. tüp	50,0	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
6. tüp	51,7	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
7. tüp	53,2	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
8. tüp	54,3	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
9. tüp	55,2	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
10. tüp	55,7	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
11. tüp	56,0	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1

**3.10.2. *Lactobacillus plantarum* için MgCl<sub>2</sub> optimizasyonu**

Bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra en iyi MgCl<sub>2</sub> konsantrasyon oranını tespit etmek için yapılmıştır. Reaksiyon karışımı Tablo 3.4'teki gibi hazırlanmıştır.

**Tablo 3.4.** *L. plantarum* MgCl<sub>2</sub> optimizasyonu reaksiyon karışımı

Reaksiyon karışımı (25µl)	saf su (µL)	10X PZR tamponu (µL)	25 mM MgCl <sub>2</sub> (µl)	10 mM dNTP mix (µl)	10 µM planF primer (µl)	10 µM pREV primer (µl)	5U/µl Taq DNA polimeraz (µl)	DNA (µl) ≥50 ng
1. tüp	17,09	2,5	0,75	0,5	1	1	0,35	1
2. tüp	17,65	2,5	1,00	0,5	1	1	0,35	1
3. tüp	17,40	2,5	1,25	0,5	1	1	0,35	1
4. tüp	17,15	2,5	1,50	0,5	1	1	0,35	1
5. tüp	16,90	2,5	1,75	0,5	1	1	0,35	1
6. tüp	16,65	2,5	2,00	0,5	1	1	0,35	1
7. tüp	16,40	2,5	2,25	0,5	1	1	0,35	1
8. tüp	16,15	2,5	2,50	0,5	1	1	0,35	1
9. tüp	15,09	2,5	2,75	0,5	1	1	0,35	1
10. tüp	15,65	2,5	3,00	0,5	1	1	0,35	1
11. tüp	15,40	2,5	3,25	0,5	1	1	0,35	1

### 3.10.3. *Lactobacillus plantarum* için primer optimizasyonu

Primer konsantrasyon oranının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Reaksiyon karışımı Tablo 3.5'teki gibi hazırlanmıştır.

**Tablo 3.5.** *L. plantarum* primer optimizasyonu reaksiyon karışımı

Reaksiyon karışımı (25µl)	saf su (µL)	10X PZR tamponu (µL)	25 mM MgCl <sub>2</sub> (µl)	10 mM dNTP mix (µl)	10 µM planF primer (µl)	10 µM pREV primer (µl)	5U/µl Taq DNA polimeraz (µl)	DNA (µl) ≥50 ng
1. tüp	17,15	2,5	3	0,5	0,25	0,25	0,35	1
2. tüp	16,65	2,5	3	0,5	0,50	0,50	0,35	1
3. tüp	16,15	2,5	3	0,5	0,75	0,75	0,35	1
4. tüp	15,65	2,5	3	0,5	1,00	1,00	0,35	1
5. tüp	15,15	2,5	3	0,5	1,25	1,25	0,35	1
6. tüp	14,65	2,5	3	0,5	1,50	1,50	0,35	1
7. tüp	14,15	2,5	3	0,5	1,75	1,75	0,35	1

### 3.10.4. *Lactobacillus plantarum* Amplifikasyonu

*Lactobacillus plantarum* türlerinin genotipik olarak tanımlanması için PZR karışımı Tablo 3.6'daki gibi belirlenmiş ve elde edilen tüm izolatlar PZR cihazında (Thermo Scientific Arktik Thermal Cycler, Finland) Tablo 3.7'deki protokole göre çalışılmıştır. Pozitif kontrol olarak *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 standart suşu kullanılmıştır.

**Tablo 3.6.** *Lactobacillus plantarum* için PZR karışımı

Kullanılan malzemeler	Konsantrasyon	Miktar
Saf su	-	17,15 µl
10 X Taq buffer	1x	2,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	2,5 µl
10 mM dNTP mix	0,2 mM	0,5 µl
10 µM <i>planF</i> primer	5 µM	0,5 µl
10 µM <i>pREV</i> primer	5 µM	0,5 µl
5U/µl Taq DNA polimeraz	1,75 U	0,35 µl
DNA	≥ 50 ng/µl	1 µl
Toplam hacim		25 µl

**Tablo 3.7.** *Lactobacillus plantarum* için uygulanan PZR programı

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94°C	3 dakika	1
Denatürasyon	94°C	30 saniye	} 30
Primerlerin bağlanması (Annealing)	51°C	10 saniye	
Zincir uzaması (Extension)	72°C	10 saniye	
Son uzama	72°C	10 dakika	1

### 3.10.5. *Lactobacillus paracasei* için Tm optimizasyonu

PZR yönteminde her bir örnek için 25 µl toplam hacimde karışım hazırlanmıştır. Uygulanan reaksiyon karışımı ve farklı bağlanma ısıları Tablo 3.8’de verilmiştir. En iyi bağlanma sıcaklığını belirlemek için gradientli PZR uygulaması yapılmış ve 51-60°C arasında çalışılmıştır (Tabasco ve ark., 2007).

**Tablo 3.8.** *L. paracasei* Tm optimizasyonu reaksiyon karışımı

Reaksiyon karışımı (25µl)	Bağlanma sıcaklığı (°C)	saf su (µL)	10X PZR tampo nu (µL)	25 mM MgCl <sub>2</sub> (µl)	10 mM dNTP mix (µl)	10 µM casfor primer (µl)	10 µM casrev primer (µl)	5U/µl TaqDNA polimeraz (µl)	DNA (µl) ≥50 ng
1. tüp	51,0	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
2. tüp	51,2	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
3. tüp	51,7	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
4. tüp	52,5	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
5. tüp	53,6	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
6. tüp	55,0	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
7. tüp	56,7	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
8. tüp	58,2	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
9. tüp	59,3	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
10. tüp	60,2	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1
11. tüp	60,7	16,65	2,5	2	0,5	1	1	0,35	1

### 3.10.6. *Lactobacillus paracasei* için MgCl<sub>2</sub> optimizasyonu

Bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra en iyi MgCl<sub>2</sub> konsantrasyon oranını tespit etmek için yapılmıştır. Reaksiyon karışımı Tablo 3.9'daki gibi hazırlanmıştır.

**Tablo 3.9.** *L. paracasei* MgCl<sub>2</sub> optimizasyonu reaksiyon karışımı

Reaksiyon karışımı (25µl)	saf su (µL)	10X PZR tamponu (µL)	25 mM MgCl <sub>2</sub> (µl)	10 mM dNTP mix (µl)	10 µM casfor primer (µl)	10 µM casrev primer (µl)	5U/µl Taq DNA polimeraz (µl)	DNA (µl) ≥50 ng
1. tüp	17,09	2,5	0,75	0,5	1	1	0,35	1
2. tüp	17,65	2,5	1,00	0,5	1	1	0,35	1
3. tüp	17,40	2,5	1,25	0,5	1	1	0,35	1
4. tüp	17,15	2,5	1,50	0,5	1	1	0,35	1
5. tüp	16,90	2,5	1,75	0,5	1	1	0,35	1
6. tüp	16,65	2,5	2,00	0,5	1	1	0,35	1
7. tüp	16,40	2,5	2,25	0,5	1	1	0,35	1
8. tüp	16,15	2,5	2,50	0,5	1	1	0,35	1
9. tüp	15,09	2,5	2,75	0,5	1	1	0,35	1
10. tüp	15,65	2,5	3,00	0,5	1	1	0,35	1
11. tüp	15,40	2,5	3,25	0,5	1	1	0,35	1

### 3.10.7. *Lactobacillus paracasei* için primer optimizasyonu

Primer konsantrasyon oranının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Reaksiyon karışımı Tablo 3.10'daki gibi hazırlanmıştır.

**Tablo 3.10.** *L. paracasei* primer optimizasyonu reaksiyon karışımı

Reaksiyon karışımı (25µl)	saf su (µL)	10X PZR tamponu (µL)	25 mM MgCl <sub>2</sub> (µl)	10 mM dNTP mix (µl)	10 µM casfor primer (µl)	10 µM casrev primer (µl)	5U/µl Taq DNA polimeraz (µl)	DNA (µl) ≥50 ng
1. tüp	17,15	2,5	3	0,5	0,25	0,25	0,35	1
2. tüp	16,65	2,5	3	0,5	0,50	0,50	0,35	1
3. tüp	16,15	2,5	3	0,5	0,75	0,75	0,35	1
4. tüp	15,65	2,5	3	0,5	1,00	1,00	0,35	1
5. tüp	15,15	2,5	3	0,5	1,25	1,25	0,35	1
6. tüp	14,65	2,5	3	0,5	1,50	1,50	0,35	1
7. tüp	14,15	2,5	3	0,5	1,75	1,75	0,35	1

### 3.10.8. *Lactobacillus paracasei* Amplifikasyonu

*Lactobacillus paracasei* türlerinin genotipik olarak tanımlanması için PZR karışımı Tablo 3.11'deki gibi belirlenmiş ve elde edilen tüm izolatlar PZR cihazında Tablo 3.12'deki protokole göre çalışılmıştır.

**Tablo 3.11.** *Lactobacillus paracasei* için PZR karışımı

Kullanılan malzemeler	Konsantrasyon	Miktar
Saf su	-	17,15 µl
10 X Taq buffer	1x	2,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	2,5 µl
10 mM dNTP mix	0,2 mM	0,5 µl
10 µM <i>casfor</i> primer	5 µM	0,5 µl
10 µM <i>casrev</i> primer	5 µM	0,5 µl
5U/µl Taq DNA polimeraz	1,75 U	0,35 µl
DNA	≥ 50 ng/µl	1 µl
Toplam hacim		25 µl

**Tablo 3.12.** *Lactobacillus paracasei* için uygulanan PZR programı

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94°C	3 dakika	1
Denatürasyon	94°C	30 saniye	30
Primerlerin bağlanması (Annealing)	56°C	20 saniye	
Zincir uzaması (Extension)	72°C	20 saniye	
Son uzama	72°C	5 dakika	1

### 3.11. PZR Ürünlerinin Elektrofrez

PZR ampikonlarının görüntülenmesinde %2'lik agaroz jel kullanılmıştır. 2 g agaroz 100 ml 1xTBE tamponu içinde mikrodalga fırında (Bosch, Germany) homojen bir şekilde çözülerek hazırlandı. Biraz soğuduktan sonra jel küvetlerine döküldü ve taraklar yerleştirilerek donmaya bırakıldı. Jel donduktan sonra taraklar dikkatli bir şekilde çıkartıldı ve ilk kuyucuklara DNA marker yüklendikten sonra tüm PZR ampikonları sıralı bir şekilde yüklendi. Elektrofrez jel düzeneği (Biorad Power Pac Basic, Singapore) 80 volta ayarlanarak ampikonlar 90 dakika yürütüldü ve ardından %10'luk etidyum bromür ile boyanarak görüntüleme cihazında (UV-transilluminator Vilber Lourmat, France) bant profilleri belirlendi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

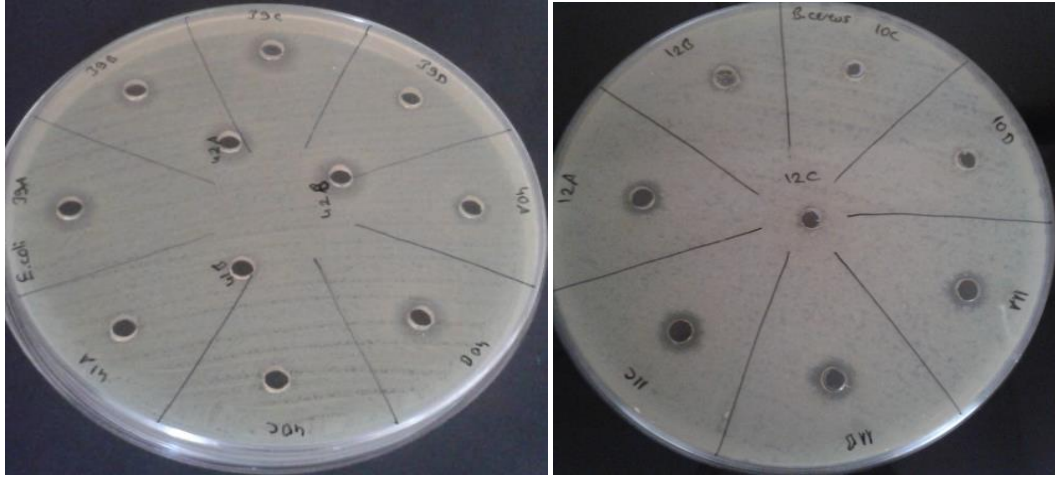
Amasya ilinde tüketime sunulan 77 çiğ süt örneği analiz edilmiştir. Analiz sonucunda 48 örnekten toplam 121 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlar ikiye kopya çoğaltılarak -20°C ve -80°C'de saklanmıştır ve patojen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için incelenmiştir.

### 4.2. Kuyucuk Difüzyon Testi Sonuçları

Yapılan kuyucuk difüzyon testi sonucunda izolatların (n=121) 32'si (%26) *Salmonella enteritidis*'e, 38'i (%31) *Pseudomonas aeruginosa*'ya, 39'u (%32) *Bacillus cereus*'a, 26'sı (%21) *Staphylococcus aureus*'a ve 33'ü (%27) *Escherichia coli*'ye karşı antimikrobiyal etki göstermiştir.



**Resim 4.1.** *Salmonella enteritidis* ve *Pseudomonas aeruginosa* patojenleri üzerinde etki gösteren bazı izolatlar



**Resim 4.2.** *Escherichia coli* ve *Bacillus cereus* patojenleri üzerinde etki gösteren bazı izolatlar

İzolatların birden çok patojen üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Buna göre; 8 izolat (%7) tek bir patojene karşı inhibitör etki gösterirken, 5 izolat (%4) 2, 4 izolat (%3) 3, 14 izolat (%12) 4, 16 izolat (%13) ise bütün patojenlere karşı inhibitör etki göstermiştir. Bu izolatlar Tablo 4.1, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'te gösterilmiştir. İzolatların 73 adedi (%60) ise hiçbir patojen bakteri üzerinde etki göstermemiştir.

**Tablo 4.1.** Üç ve daha az farklı patojen bakteri üzerinde antimikrobiyal aktivite gösteren izolatlar

İzolat Numaraları	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>Bacillus cereus</i> (DSM 4312)	<i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC 13076)
8 B	0	0	0	0	15 mm
9 B	0	11 mm	15 mm	9 mm	0
13 B	0	0	0	0	9 mm
28 B	0	0	0	9 mm	9 mm
30 A	0	0	0	10 mm	12 mm
30 B	0	0	0	9 mm	10 mm
34 A	0	0	0	8 mm	0
35 B	0	0	0	0	8 mm
35 C	0	0	0	0	8 mm
36 B	0	0	10 mm	0	0
36 C	0	10 mm	15 mm	0	10 mm
37 A	0	0	12 mm	11 mm	10 mm
37 B	0	0	13 mm	10 mm	0
37 C	0	0	11 mm	11 mm	12 mm
38 B	0	9 mm	12 mm	0	0
40 A	0	0	12 mm	0	0
42 C	0	0	0	10 mm	0



**Tablo 4.2.** Dört farklı patojen bakteri üzerinde antimikrobiyal aktivite gösteren izolatlar

<b>İzolat Numaraları</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)</b>	<b><i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)</b>	<b><i>Bacillus cereus</i> (DSM 4312)</b>	<b><i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC 13076)</b>
3 B	10 mm	9 mm	13 mm	12 mm	0
10 A	0	12 mm	11 mm	12 mm	12 mm
15 B	10 mm	12 mm	11 mm	9 mm	0
18 A	9 mm	10 mm	12 mm	11 mm	0
19 A	10 mm	11 mm	14 mm	12 mm	0
21 A	10 mm	10 mm	14 mm	11 mm	0
21 B	10 mm	9 mm	14 mm	11 mm	0
22 B	9 mm	12 mm	14 mm	11 mm	0
23 A	9 mm	11 mm	13 mm	12 mm	0
24 A	0	10 mm	12 mm	11 mm	12 mm
27 A	0	11 mm	9 mm	9 mm	9 mm
32 A	0	10 mm	13 mm	9 mm	12 mm
38 A	11 mm	9 mm	12 mm	12 mm	0
38 C	9 mm	10 mm	14 mm	10 mm	0

**Tablo 4.3.** Beş farklı patojen bakteri üzerinde antimikrobiyal aktivite gösteren izolatlar

<b>İzolat Numaraları</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)</b>	<b><i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)</b>	<b><i>Bacillus cereus</i> (DSM 4312)</b>	<b><i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC 13076)</b>
3 A	9 mm	10 mm	12 mm	12 mm	11 mm
11 A	9 mm	11 mm	13 mm	9 mm	10 mm
11 B	9 mm	12 mm	12 mm	10 mm	13 mm
11 C	9 mm	12 mm	13 mm	11 mm	13 mm
12 A	8 mm	12 mm	13 mm	9 mm	11 mm
12 B	9 mm	11 mm	12 mm	9 mm	11 mm
13 A	11 mm	11 mm	11 mm	9 mm	12 mm
18 D	11 mm	11 mm	14 mm	12 mm	13 mm
19 B	9 mm	11 mm	13 mm	10 mm	9 mm
20 A	10 mm	10 mm	14 mm	11 mm	10 mm
27 C	12 mm	9 mm	14 mm	10 mm	11 mm
39 A	11 mm	10 mm	12 mm	10 mm	12 mm
39 C	12 mm	11 mm	15 mm	12 mm	12 mm
40 B	10 mm	10 mm	15 mm	11 mm	11 mm
42 A	9 mm	10 mm	12 mm	12 mm	11 mm
42 B	10 mm	10 mm	14 mm	12 mm	11 mm

### **4.3. Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip İzolatların Belirlenmesi**

Kuyucuk difüzyon testi sonucunda, patojen mikroorganizmalardan en az dördüne karşı inhibitör etki gösteren 30 izolat belirlenmiştir (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3). Bu izolatların; Gram boyama, katalaz testi, gelişebildiği NaCl konsantrasyonu, optimum gelişme sıcaklığı ile farklı pH koşullarında üreyebilme özellikleri belirlenmiştir. Bu testlerin sonuçları Tablo 4.4'te gösterilmektedir.



**Tablo 4.4.** Antimikrobiyal aktivite gösteren izolatlara uygulanan genel mikrobiyolojik testler

İzolat numarası	Gram boyama	Katalaz	Hücre morfolojisi	Farklı pH'da gelişme		Farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişme			Farklı sıcaklıklarda gelişme		
				pH: 3,9	pH:9,6	%4	%7,5	%10	4°C	15°C	45°C
3A	+	-	Kok	+	±	++	++	+	-	+	+
3B	+	-	Basil	+	±	++	++	+	-	+	+
10A	+	-	Kok	+	+	+	+	-	-	+	±
11A	+	-	Basil	+	+	++	++	+	-	+	+
11B	+	-	Basil	+	±	++	++	+	-	+	+
11C	+	-	Basil	+	±	++	++	+	-	±	+
12A	+	-	Kok	-	-	+	-	-	-	+	±
12B	+	-	Basil	+	-	+	-	-	-	+	±
13A	+	-	Kok	+	±	++	++	+	-	+	±
15B	+	-	Kok	+	+	+	+	-	-	+	+
18A	+	-	Kok	±	-	+	-	-	-	±	-
18D	+	-	Basil	+	+	++	++	+	-	+	+
19A	+	-	Basil	+	+	++	+	+	-	+	±
19B	+	-	Basil	+	+	++	+	+	-	+	±
20A	+	-	Basil	+	+	++	++	+	-	±	+
21A	+	-	Basil	+	+	++	++	+	-	+	+
21B	+	-	Kok	-	+	-	+	-	-	-	+
22B	+	-	Basil	+	+	++	+	+	-	+	-
23A	+	-	Basil	+	+	++	++	+	-	+	+
24A	+	-	Kok	+	±	++	++	+	-	+	+
27A	+	-	Basil	+	+	++	++	+	-	+	+
27C	+	-	Basil	+	+	++	++	+	-	+	+
32A	+	-	Kok	+	±	++	++	+	-	+	+
38A	+	-	Basil	+	+	++	++	+	-	+	+
38C	+	-	Basil	+	+	++	++	+	-	+	+
39A	+	-	Basil	+	±	++	++	+	-	+	+
39C	+	-	Basil	+	+	++	++	+	-	+	+
40B	+	-	Kok	-	+	-	+	-	-	±	+
42A	+	-	Basil	+	+	++	++	+	-	+	+
42B	+	-	Basil	+	+	++	++	+	-	+	+

++ kuvvetli pozitif, + pozitif, ± zayıf pozitif, - negatif

#### 4.4. Karbonhidrat Fermantasyon Testleri Sonuçları

İzolatların tür düzeyinde belirlenmesi amacıyla Analytical Profil Index (API) test kitleri kullanılmıştır. Mikroskop görünümü incelenerek belirlenen basil formundaki izolatlara API 50 CHL testi, kok formundaki izolatlara ise API 20 Strep testi uygulanmıştır.



**Resim 4.3.** 42B (solda) ve *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 standart suşuna (sağda) ait ekim yapılmış ve renk değişimi gözlenmiş API 50 CHL stribi

Çalışılan 30 izolattan örnekleme yapılarak 17 izolat seçilmiştir. Bu izolatlardan basil formundaki 7 izolata yapılan API 50 CHL test sonuçlarına göre; 2 izolat (20A ve 23A) *Lactobacillus plantarum*, 5 izolat (11A, 27A, 38A, 39A ve 42B) ise *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* olarak tanımlanmıştır. Bu testler için pozitif kontrol olarak *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 standart suşu kullanılmıştır ve sonuçlar Tablo 4.5'te gösterilmiştir. Tanımlanan *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* türlerinin kullandıkları karbon kaynakları ise Tablo 4.6'da verilmiştir.

**Tablo 4.5.** API 50 CHL test sonuçları

İzolat no	Tanımlanan tür	Yüzdesi
20A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	%95,3
23A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	%99,7
11A	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	%99,4
27A	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	%99,7
38A	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	%99,4
39A	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	%99,6
42B	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	%92,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	<i>Lactobacillus plantarum</i>	%99,9



**Tablo 4.6.** API 50 CHL test sonucuna göre tanımlanan türlerin kullandıkları karbon kaynakları (devamı)

24	Arbutine	+	+	+	+	+	+	+	+
25	Esculine	+	+	+	+	+	+	+	+
26	Salicine	+	+	+	+	+	+	+	+
27	D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+
28	D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
29	D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
30	D-Melibiose	+	+	+	-	-	-	-	-
31	D-Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+
32	D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+
33	Inuline	+	-	-	+	-	+	+	+
34	D-Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+
35	D-Raffinose	+	+	-	-	-	-	-	-
36	Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-
37	Glycogene	-	-	-	-	-	-	-	-
38	Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-
39	Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+
40	D-Turanose	+	+	-	+	+	+	+	-
41	D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-
42	D-Tagatose	+	+	-	+	+	+	+	+
43	D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-
44	L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-
45	D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-
46	L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-
47	Potassium Gluconate	-	-	-	+	+	+	-	-
48	Potassium 2-Ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-
49	Potassium-5-Ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-

+ pozitif, - negatif

Örnekleme ile seçilen kok formundaki 10 izolata yapılan API 20 Strep test sonuçlarına göre; 1 izolat (18A) *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, 2 izolat (21B ve 40B) *Enterococcus faecalis*, 2 izolat (10A ve 15B) *Aerococcus viridans* ve 5 izolat (3A, 12A, 13A, 24A ve 32A) ise *Leuconostoc* spp. olarak belirlenmiştir (Tablo 4.7).



**Resim 4.4.** 18A izolatına ait ekim yapılmış ve renk değişimi gözlenmiş API 20 Strep stribi



**Resim 4.5.** 21B izolatına ait ekim yapılmış ve renk değişimi gözlenmiş API 20 Strep stribi



**Tablo 4.7.** API 20 Strep test sonuçları

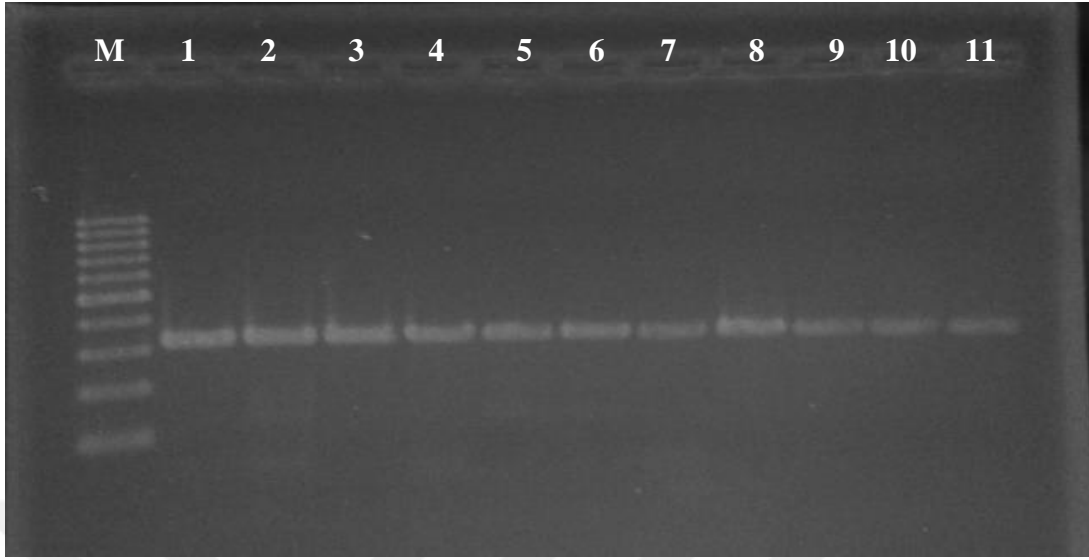
İzolasyon no	Tanımlanan tür	Yüzdesi
18A	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	%83,9
21B	<i>Enterococcus faecalis</i>	%88,2
40B	<i>Enterococcus faecalis</i>	%99,0
10A	<i>Aerococcus viridans</i>	%71,5
15B	<i>Aerococcus viridans</i>	%71,5
3A	<i>Leuconostoc</i> spp.	%60,8
12A	<i>Leuconostoc</i> spp.	%60,8
13A	<i>Leuconostoc</i> spp.	%60,8
24A	<i>Leuconostoc</i> spp.	%99,4
32A	<i>Leuconostoc</i> spp.	%91,5

#### 4.5. PZR Optimizasyon Sonuçları

##### 4.5.1. *Lactobacillus plantarum* için Yapılan Optimizasyon Sonuçları

###### *L. plantarum* Tm optimizasyonu

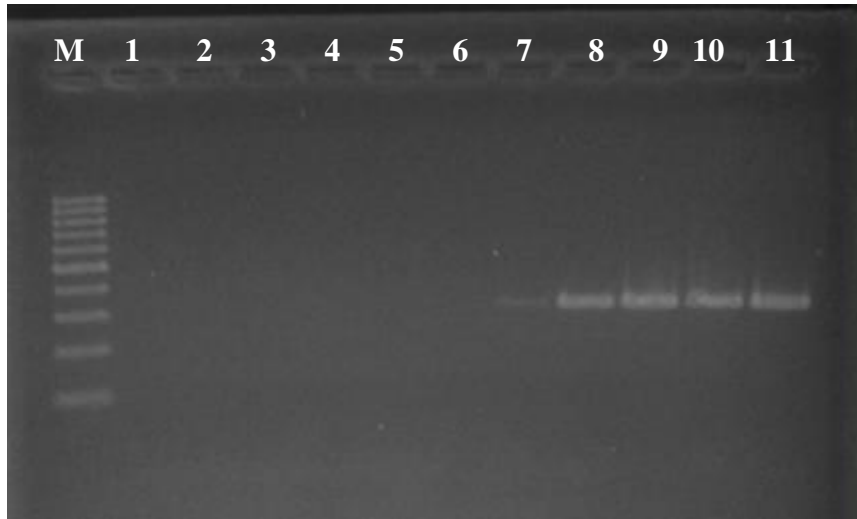
*L. plantarum* için kullanılan *planF* ve *pREV* primerlerinin bağlanma sıcaklığının belirlenmesi için yapılan optimizasyon çalışmasında, 46-56°C sıcaklık aralığı kullanılmıştır. Şekil 4.1'de verilen sonuçlara göre en iyi bant profili 6. ve 7. kuyularda gözlenmiş ve bağlanma sıcaklığı bundan sonraki çalışmalarda 51°C olarak uygulanmıştır.



**Şekil 4.1.** *Lactobacillus plantarum* için bağlanma sıcaklığı optimizasyonu elektroforez görüntüsü. **M:** Marker (100 bp), **1:** 46,2°C , **2:** 46,7°C , **3:** 47,5°C , **4:** 48,6°C , **5:** 50°C , **6:** 51,6°C , **7:** 53,2°C , **8:** 54,3°C , **9:** 55,2°C , **10:** 55,7°C , **11:** 56°C

#### ***L. plantarum* MgCl<sub>2</sub> optimizasyonu**

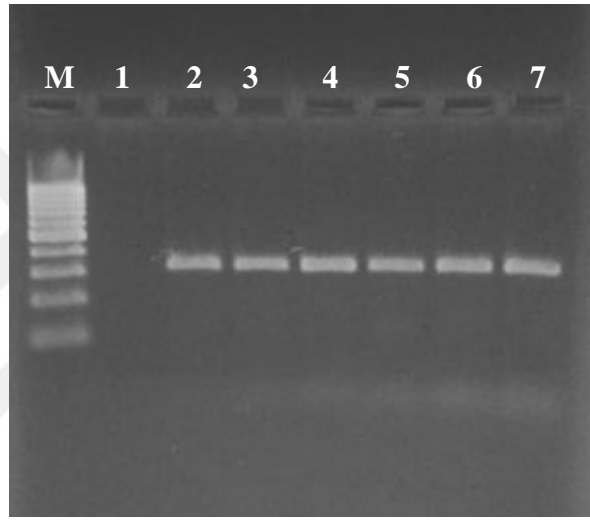
Bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra yapılan MgCl<sub>2</sub> optimizasyonunda, 0,75-3,25 mM konsantrasyon aralığı çalışılmıştır. Şekil 4.2'de verildiği gibi en iyi bant profili 8. kuyuda görülmüş ve 2,5 mM olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.2.** *Lactobacillus plantarum* için MgCl<sub>2</sub> optimizasyonu elektroforez görüntüsü. **M:** Marker (100 bp), **1:** 0,75 mM, **2:** 1 mM, **3:** 1,25mM, **4:** 1,5mM, **5:** 1,75mM, **6:** 2 mM, **7:** 2,25 mM, **8:** 2,5 mM, **9:** 2,75 mM, **10:** 3 mM, **11:** 3,25 mM

### ***L. plantarum* primer optimizasyonu**

Bağlanma sıcaklığı ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu belirlendikten sonra yapılan primer optimizasyonunda, 2,5-17,5 pmol/μl konsantrasyon aralığı çalışılmıştır. Şekil 4.3'te verildiği gibi en iyi bant profili, 2. kuyuda görülmüş ve 5 pmol/μl olarak belirlenmiştir.

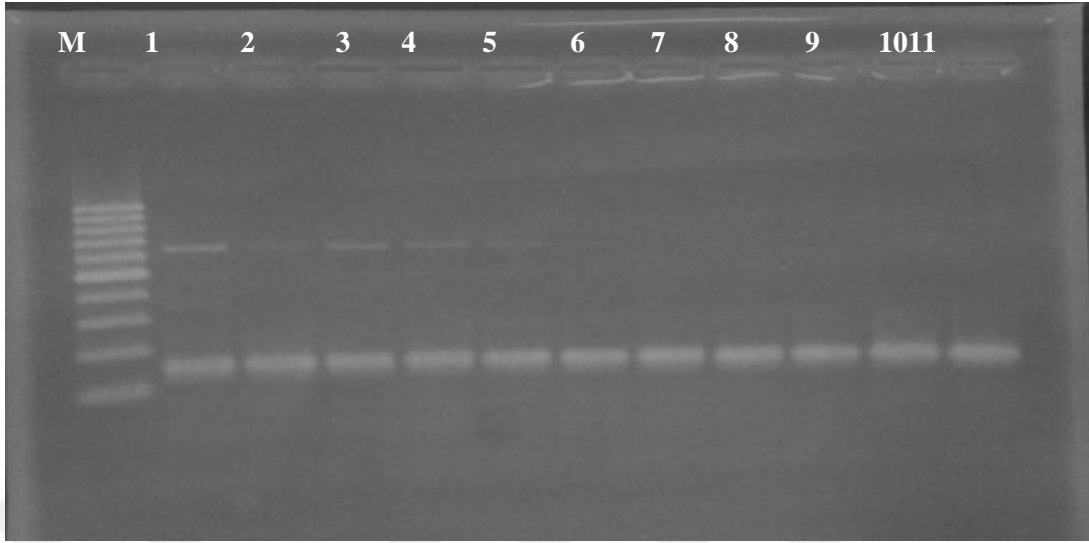


**Şekil 4.3.** *Lactobacillus plantarum* için primer optimizasyonu elektroforez görüntüsü. **M:** Marker (100 bp), **1:** 2,5 pmol/μl, **2:** 5 pmol/μl, **3:** 7,5 pmol/μl, **4:** 10 pmol/μl, **5:** 12,5 pmol/μl, **6:** 15 pmol/μl, **7:** 17,5 pmol/μl

### **4.5.2. *Lactobacillus paracasei* için Yapılan Optimizasyon Sonuçları**

#### ***L. paracasei* Tm optimizasyonu**

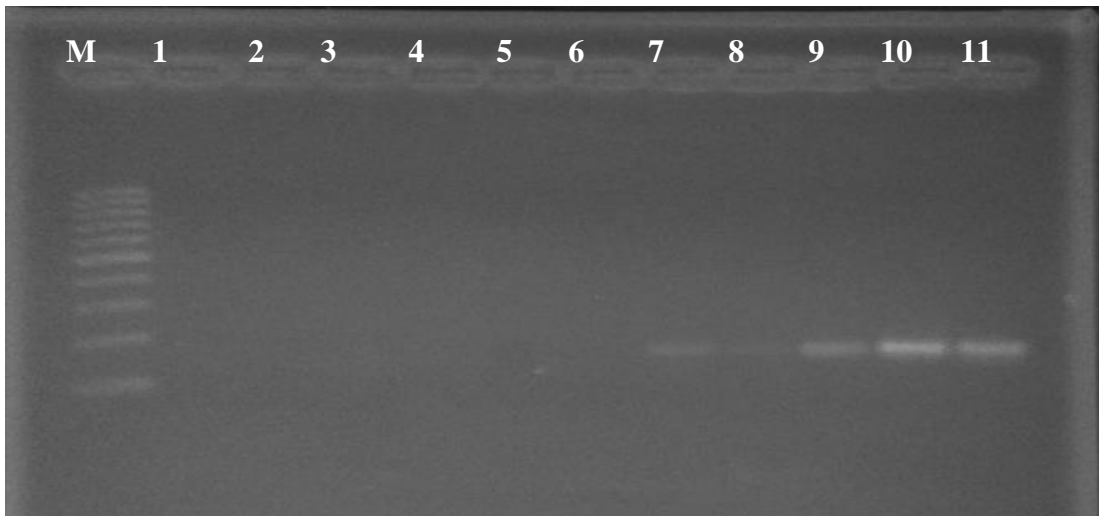
*L. paracasei* için kullanılan *casfor* ve *casrev* primerlerinin bağlanma sıcaklığının belirlenmesi için yapılan optimizasyon çalışmasında, 51-60°C sıcaklık aralığı kullanılmıştır. Şekil 4.4'te verilen sonuçlara göre, en iyi bant profili 6, 7, ve 8. kuyulardaki 55-58°C sıcaklıkları arasında görülmüştür. Sonraki çalışmalar için bağlanma sıcaklığı 56°C olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.4.** *Lactobacillus paracasei* için bağlanma sıcaklığı optimizasyonu elektroforez görüntüsü. **M:** Marker (100 bp), **1:** 51°C , **2:** 51,2°C , **3:** 51,7°C , **4:** 52,5°C , **5:** 53,6°C , **6:** 55°C , **7:** 56,7°C , **8:** 58,2°C , **9:** 59,3°C , **10:** 60,2°C , **11:** 60,7°C

#### ***L. paracasei* MgCl<sub>2</sub> optimizasyonu**

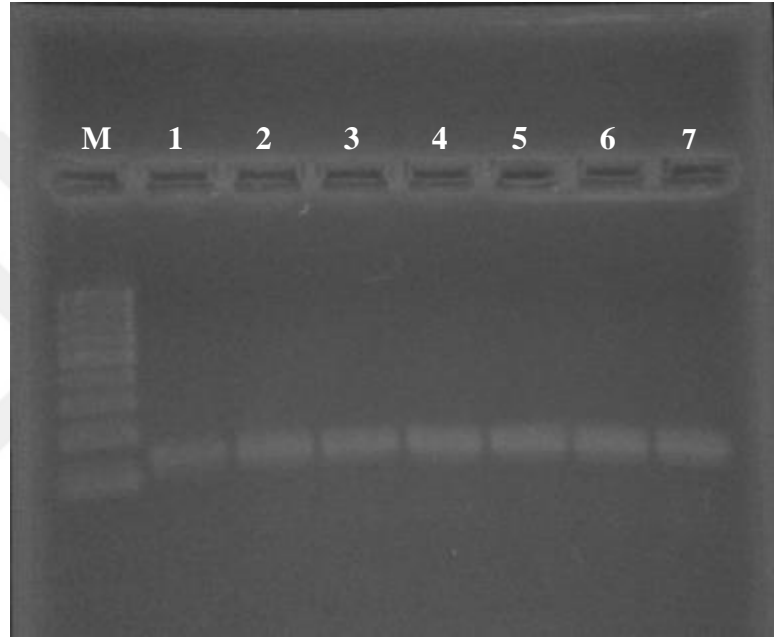
Bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra yapılan MgCl<sub>2</sub> optimizasyonunda, 0,75-3,25 mM konsantrasyon aralığı çalışılmıştır. Şekil 4.5'te verildiği gibi en iyi bant profili 2,5 mM olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.5.** *Lactobacillus paracasei* için MgCl<sub>2</sub> optimizasyonu elektroforez görüntüsü. **M:** Marker (100 bp), **1:** 0,75 mM, **2:** 1 mM, **3:** 1,25mM, **4:** 1,5mM, **5:** 1,75mM, **6:** 2 mM, **7:** 2,25 mM, **8:** 2,35 mM, **9:** 2,5 mM, **10:** 3 mM, **11:** 3,25 mM

### ***L. paracasei* primer optimizasyonu**

Bağlanma sıcaklığı ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu belirlendikten sonra yapılan primer optimizasyonunda, 2,5-17,5 pmol/μl konsantrasyon aralığı çalışılmıştır. Şekil 4.6'da verildiği gibi en iyi bant profili, 2. kuyuda görülmüş ve 5 pmol/μl olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.6.** *Lactobacillus paracasei* için primer optimizasyonu elektroforez görüntüsü. **M:** Marker (100 bp), **1:** 2,5 pmol/μl, **2:** 5 pmol/μl, **3:** 7,5 pmol/μl, **4:** 10 pmol/μl, **5:** 12,5 pmol/μl, **6:** 15 pmol/μl, **7:** 17,5 pmol/μl.

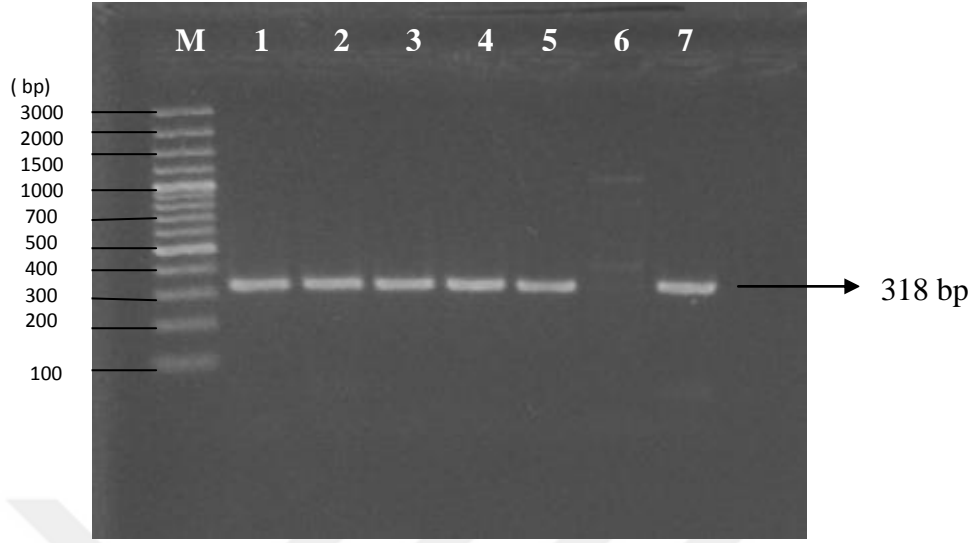
### **4.6. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus paracasei* Amplifikasyon Sonuçları**

Patojen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivite gösteren 30 izolata, *Lactobacillus plantarum* tanımlaması için PZR çalışması yapılmıştır. Örnekleme ile seçilen izolatlardan 2 tanesi (20A ve 23A) API test kitleriyle, *Lactobacillus plantarum* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlardan 20A'nın genotipik olarak *Lactobacillus plantarum* olduğu doğrulanmıştır. 23A izolatu ise herhangi bir bant profili göstermemiştir. Bu izolatların yanı sıra, örnekleme ile seçilen ve API testleriyle tanımlanan 17 izolatın dışında kalan 13 izolat arasındaki 18D, 19A, 19B

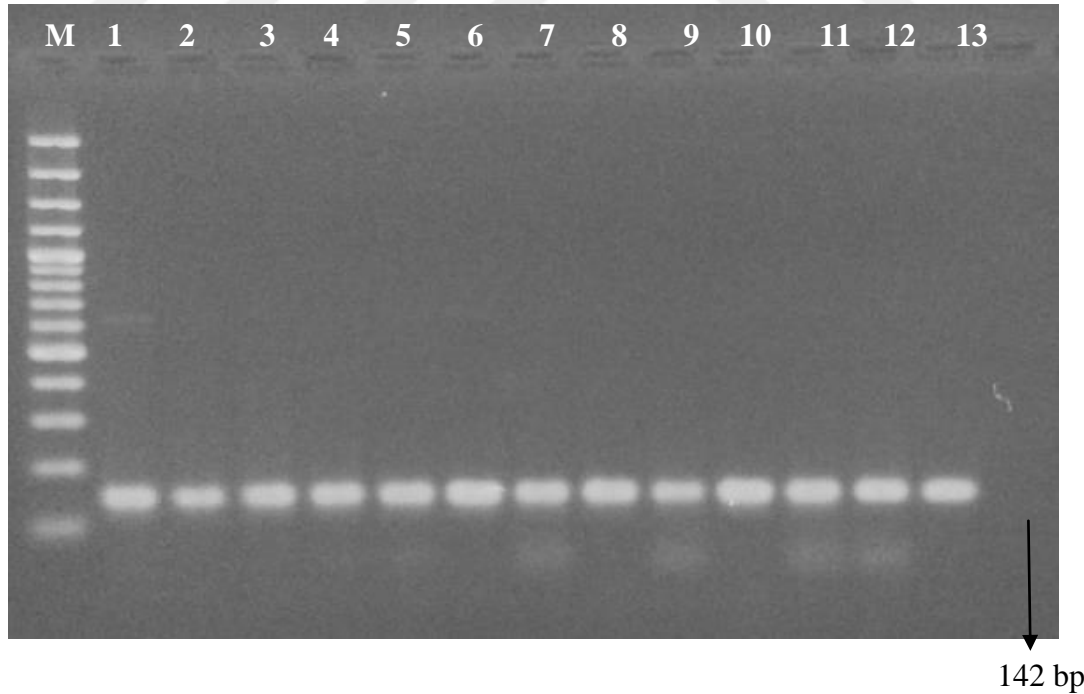
ve 22B izolatlarının da 318 bp büyüklükte bant profili oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.7). API testiyle tanımlanan diğer türlerin (*Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Enterococcus faecalis*, *Aerococcus viridans*, *Leuconostoc spp.*) de herhangi bir bant profili oluşturmadığı ve bu izolatların *Lactobacillus plantarum* olmadığı genotipik olarak da doğrulanmıştır (Tablo4.8).

Daha sonra patojen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivite gösteren 30 izolata, *Lactobacillus paracasei* tanımlaması için PZR çalışması yapılmıştır. Örnekleme ile seçilen izolatlardan 5 tanesi (11A, 27A, 38A, 39A ve 42B) API test kitiyle *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların hepsi istenilen büyüklükte bant profili oluşturarak genotipik olarak da doğrulanmıştır. Bu izolatların yanı sıra, örnekleme ile seçilen ve API testleriyle tanımlanan 17 izolatın dışında kalan 13 izolat arasındaki 3B, 11B, 11C, 12B, 27C, 38C, 39C ve 42A izolatlarının da 142 bp büyüklükte bant profili oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.8). API testiyle tanımlanan diğer türlerin (*Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Enterococcus faecalis*, *Aerococcus viridans*, *Leuconostoc spp.*) de herhangi bir bant profili oluşturmadığı ve bu izolatların *Lactobacillus paracasei* olmadığı genotipik olarak belirlenmiştir (Tablo 4.8).

En fazla üç farklı patojen mikroorganizmaya karşı inhibitör etki gösteren ve hiçbir patojen üzerinde etki göstermeyen toplam 91 izolata PZR çalışması yapılmıştır. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus paracasei* türü için elde edilen ampikonlar bant profili göstermemiştir.



**Şekil 4.7.** *Lactobacillus plantarum* türü için yapılan PZR ampliconlarının elektroforez sonuçları **M:** Marker (100 bp), **1:** 18D, **2:** 19A, **3:** 19B, **4:** 20A, **5:** 22B, **6:** 23A, **7:** *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 standart suş.



**Şekil 4.8.** *Lactobacillus paracasei* türü için yapılan PZR ampliconlarının elektroforez sonuçları **M:** Marker (100 bp), **1:** 3B, **2:** 11A, **3:** 11B, **4:** 11C, **5:** 12B, **6:** 27A, **7:** 27C, **8:** 38A, **9:** 38C, **10:** 39A, **11:** 39C, **12:** 42A, **13:** 42B

**Tablo 4.8.** İzolatların API testleri ile PZR sonuçlarının karşılaştırılması

İzolat numarası	API testi ile tanımlanan türler	PZR ile tanımlanan türler
3A	<i>Leuconostoc spp.</i>	
3B	Tanımlama yapılmadı	<i>Lactobacillus paracasei</i>
10A	<i>Aerococcus viridans</i>	
11A	<i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
11B	Tanımlama yapılmadı	<i>Lactobacillus paracasei</i>
11C	Tanımlama yapılmadı	<i>Lactobacillus paracasei</i>
12A	<i>Leuconostoc spp.</i>	
12B	Tanımlama yapılmadı	<i>Lactobacillus paracasei</i>
13A	<i>Leuconostoc spp.</i>	
15B	<i>Aerococcus viridans</i>	
18A	<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	
18D	Tanımlama yapılmadı	<i>Lactobacillus plantarum</i>
19A	Tanımlama yapılmadı	<i>Lactobacillus plantarum</i>
19B	Tanımlama yapılmadı	<i>Lactobacillus plantarum</i>
20A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
21A	Tanımlama yapılmadı	
21B	<i>Enterococcus faecalis</i>	
22B	Tanımlama yapılmadı	<i>Lactobacillus plantarum</i>
23A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Tanımlanamadı
24A	<i>Leuconostoc spp.</i>	
27A	<i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
27C	Tanımlama yapılmadı	<i>Lactobacillus paracasei</i>
32A	<i>Leuconostoc spp.</i>	
38A	<i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
38C	Tanımlama yapılmadı	<i>Lactobacillus paracasei</i>
39A	<i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
39C	Tanımlama yapılmadı	<i>Lactobacillus paracasei</i>
40B	<i>Enterococcus faecalis</i>	
42A	Tanımlama yapılmadı	<i>Lactobacillus paracasei</i>
42B	<i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>



## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada; Amasya ilinde tüketime sunulan 77 farklı çiğ süt örneğinden izole edilen 121 laktik asit bakterisinin, bazı patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Antimikrobiyal aktivite gösteren izolatlar belirlenerek, önce fenotipik daha sonra da genotipik identifikasyonlar yapılmıştır. Çeşitli biyokimyasal testler yapıldıktan sonra izolatlar API test kitleriyle tür düzeyinde tanımlanmıştır. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus paracasei* türleri PZR yöntemi ile doğrulanmıştır.

Yapılan API ve PZR test sonuçları birlikte değerlendirildiğinde 6 izolat *L. plantarum*, 13 izolat ise *L. paracasei* olarak identifiye edilmiştir.

### 5.1. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktivitesi

Elde edilen 121 izolatın antimikrobiyal aktiviteleri; *Escherichia coli* ATCC 35218, *Bacillus cereus* DSM 4312, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mikroorganizmalarına karşı test edilmiştir. Bu beş mikroorganizmadan *B. cereus* ile *S. aureus* Gram pozitif, *E.coli*, *P. aeruginosa* ve *S. enteritis* ise Gram negatif mikroorganizmalardır. Test edilen mikroorganizmalardan *P. aeruginosa* psikrofil özelliğinden dolayı özellikle gıdalarda bozulma etmeni olarak rol oynamaktadır. Diğer patojen mikroorganizmalar ise gıda enfeksiyon ve intoksikasyonlarına sebep olmaları nedeniyle test mikroorganizmaları olarak seçilmişlerdir.

Elde edilen izolatların (n=121) 48'i (%40) en az bir mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivite gösterirken, 73'ü (%60) ise hiçbir mikroorganizma üzerinde etki göstermemiştir. Bu izolatların dört ve üzeri mikroorganizmaya karşı etki gösteren 30 adedi seçilerek, fenotipik ve genotipik tanımlamaları yapılmıştır.

Yapılan kuyucuk difüzyon testi sonucunda, 121 izolatın 39'u (%32) *Bacillus cereus*'a, 38'i (%31) *Pseudomonas aeruginosa*'ya, 33'ü (%27) *Escherichia coli*'ye,

32'si (%26) *Salmonella enteritidis*'e ve 26'sı (%21) *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal etki göstermiştir.

Seçilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinin bakteriyosin, organik asitler, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya diğer inhibitör maddelerden kaynaklandığı incelendiğinde; kullanılan beş mikroorganizmanın tümü de katalaz aktivitesine sahip mikroorganizmalardır. Bu nedenlerle inhibitör etkinin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dışında diğer inhibitör etki gösteren faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda gıda kökenli LAB'lerinin büyük çoğunluğunun antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmiş ancak, bu inhibitör etkinin büyük oranda (%70-80 gibi) başta laktik asit olmak üzere üretilen organik asitler ile asit üretimine bağlı olarak pH'nın düşmesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Gonzalez ve ark., 2007; Ohmomo ve ark., 2000; Villani ve ark., 2001). Organik asit, düşük pH ve hidrojen peroksit faktörleri elimine edildikten sonra bakteriyosin üretimine bağlı inhibitör etki gösteren izolat sayısının ise çok düşük olduğu yine aynı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Türkiye'den bildirilen bir çalışmada Sezer (2007), çiğ süt örneklerinden elde edilen 58 adet antimikrobiyal etkili izolattan sadece bir izolatın bakteriyosin ürettiği ve bu sayede patojen mikroorganizmalara karşı inhibitör etki gösterdiğini bildirmiştir. Benzer şekilde Villani ve ark. (2001)'nin yaptığı çalışmada aynı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak yapılan bu çalışma kapsamında bakteriyosin varlığı araştırılmamıştır.

Çalışmamızda LAB'lerinden *Enterococcus faecalis* izole edilmiştir. Leroy ve Vuyst (2002) tarafından yapılan bir çalışmada; peynirden izole edilen *Enterococcus faecium* RZS C5 suşunun *Listeria spp.*'ne karşı bakteriyosin ürettiği belirlenmiştir. Ancak günümüzde *Enterococcus*'ların gıda endüstrisinde kullanılmaları sorgulanmaktadır. *Enterococcus* cinsi bakteriler hala bazı araştırmacılar tarafından güvenli olarak kabul edilmemektedir. Antibiyotiğe dirençli bazı suşlarının gıdalardan izole edilmesi, antibiyotik direncinin gıda zincirine girebileceği endişesini doğurmaktadır. Ayrıca bu suşların, gıda yoluyla insan bağırsak florasında bulunan diğer bakterilerin antibiyotik direnci kazanmasına yol açabileceği düşünülmektedir (Erginkaya ve ark., 2007).

Cocolin ve ark. (2007) tarafından kuyu difüzyon tekniği kullanılarak yapılan çalışmada; keçi sütünden izole edilen *Enterococcus faecium* suşunun ürettiği bakteriyosinlerin *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* ve *Lactococcus* gibi çeşitli laktik asit bakterileri ile *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium butyricum* üzerine olan antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Laktik asit bakterileri üzerinde belirgin bir etkinin olmadığı ancak *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium butyricum*'a karşı bakteriyosin ürettiği belirlenmiştir.

Çon ve Karasu (2009) tarafından, turşudan ve fermente yeşil zeytinden izole edilen *Lactobacillus plantarum* suşlarının, *Yersinia lipolitica* dışında *Lactobacillus sakei*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* üzerinde farklı derecelerde antimikrobiyal etki gösterdiği, *Lactobacillus pentosus* suşlarının ise; *Yersinia lipolytica* dışında *Lactobacillus sakei*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* üzerinde farklı antimikrobiyal etkilerinin olduğu belirtilmiştir.

Tamang ve ark. (2009) tarafından fermente ürünlerden izole edilen *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici*, *Leuconostoc spp.* ve *Enterococcus durans* suşlarının; *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde farklı antimikrobiyal etkilerinin olduğu ancak *Listeria monocytogenes* ve *Enterococcus faecium* üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada izole edilen beş *Lactobacillus plantarum* suşunun *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *B. cereus* üzerinde antimikrobiyal etkilerinin olduğu, üç izolattan ise *S. enteritidis* üzerinde herhangi bir inhibitör etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. En iyi antimikrobiyal aktivite en yüksek zon çaplarının ölçüldüğü *P. aeruginosa* patojeni üzerinde, en düşük aktivite ise en küçük zon çaplarının ölçüldüğü *S. aureus* patojeni üzerinde görülmüştür. *Lactobacillus paracasei* suşlarının ise *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *B. cereus* üzerinde etkili olduğu, üç izolattan ise, *S. aureus* (n=2) veya *S. enteritidis* (n=1) üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir.

İzole edilen iki *Enterococcus faecalis* türünün, *P. aeruginosa* üzerinde belirgin bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu, diğer patojenler üzerindeki etkilerinin ise çok düşük olduğu belirlenmiştir. İzole edilen *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* suşunun ise; *S. enteritidis* hariç diğer patojen türler üzerinde düşük bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında bulgular PZR veya API testleri ile tür düzeyinde belirlenen ve 4 veya 5 mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal etki gösteren toplam 19 *L. plantarum* ve *L. paracasei* izolatu birlikte değerlendirildiğinde; 19 izolatu tamamı *E.coli*, *P. aeruginosa* ve *B. cereus*'a karşı inhibitör etki gösterirken, 5 izolat *S. enteritidis*'e, bir izolat ise *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. İzolatların tür düzeyinde antimikrobiyal etkileri incelendiğinde ise 6 *L. plantarum* izolatından 3'ünün *S. enteritidis* dışında diğer 4 mikroorganizmaya karşı inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. İdentifiye edilen 13 *L. paracasei* izolatından 2'si *S. enteritidis*'e, bir izolat ise *S. aureus*'a karşı inhibitör etki göstermiş, diğer 10 izolat ise beş mikroorganizmaya karşı inhibitör etki göstermiştir. Yine tür düzeyinde tanımlanan *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* izolatu da *S. enteritidis*'e karşı inhibitör etki gösterememiştir. Sonuç olarak tanımlanmış 20 izolattan 6'sı *S. enteritidis* izolatu karşı inhibitör etki gösterememiştir.

Bu konu ile ilgili yapılan çalışmaların birinde Gonzalez ve ark. (1994), süt orjinli bir izolat olan *L. plantarum*'un ürettiği plantaricin C'nin Gram negatif bakterilere karşı etkisiz olmasına karşın, Gram pozitif mikroorganizmalar için geniş bir antimikrobiyal spektruma sahip olduğunu belirtmişlerdir. Aslım ve ark. (2005), süt ürünlerinden izole ettikleri *L. plantarum*'un ürettiği antimikrobiyal etkili maddenin *Yersinia enterocolitica* ve *E. coli* üzerinde etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 6 *L. plantarum* izolatının Gram pozitif bakterilerden *S. aureus* ve *B. cereus* üzerine inhibitör etki gösterdiği, 3 izolatın ise *S. enteritidis* dışında iki Gram negatif mikroorganizmaya inhibitör etki gösterdiği görüldü. Bu durum çalışmada kullanılan *S. enteritidis* suşunun, hücre duvarı yapısı dışında başka faktörlerden kaynaklanan bir koruma mekanizmasına sahip olabileceğini göstermektedir.

*L. paracasei* ile ilgili çalışmalar da yapılmıştır. Bu çalışmaların birinde Sezer (2007) kefir ve tulum örneklerinden izole edilen *L. paracasei* ssp. *paracasei* suşunun ürettiği antimikrobiyal etkili maddenin, *E. coli* üzerinde oldukça etkili olduğunu bildirmiştir. Bu çalışma bulgularına benzer şekilde bizim çalışmamızda da, identifiye edilen 13 *L. paracasei* izolatının tamamı *E. coli* üzerine inhibe edici etki göstermiştir.

## 5.2. Laktik Asit Bakterilerinin Farklı pH Değerlerinde Gelişme Yetenekleri

Kıran (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, hazır gıdalardan izole edilen ve çeşitli kültür koleksiyonlarından temin edilen laktik asit bakterilerinin hiçbirinin pH 2 ve pH 3'te gelişemediği; pH 4, pH 5 ve pH 6'da ise hepsinin geliştiği belirlenmiştir. pH 9,6'da *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* ve *L. fermentum* türlerinin geliştiği, *Leuconostoc* ve *Pediococcus pentocaceus* suşlarının ise zayıf gelişme gösterdiği belirtilmiştir.

Adnan ve Tan (2007) yaptıkları bir çalışmada, geleneksel Malezya ürünlerinden izole ettikleri *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus casei* türlerinin, pH 4,5, pH 7,0 ve pH 9,0'da geliştiğini belirtmişlerdir.

Tangüler (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, şalgam suyundan izole edilen *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinslerinin pH 4'te gelişme gösterdiği, fakat pH 9,6'da hiçbir bakterinin gelişme göstermediği belirtilmiştir. Aynı çalışmada kontrol olarak kullanılan *L. plantarum*, *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* türlerinden *L. buchneri* hariç diğer bakterilerin pH 4,4'de gelişebildiği, fakat hiçbirinin pH 9,6'da gelişemediği belirtilmiştir.

Yaptığımız çalışmada izole edilen laktik asit bakterilerinin, pH 3,9 ve pH 9,6'da üreme yetenekleri incelenmiştir. pH 3,9'da *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* ve *Aerococcus viridans* türleri iyi gelişme gösterirken; *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* ve *Leuconostoc* türleri ya zayıf gelişme göstermiş ya da hiç gelişme göstermemiştir. pH 9,6'da ise *Lactobacillus plantarum*

suşları iyi gelişme gösterirken, bazı *Lactobacillus paracasei* türleri ile birlikte bazı *Leuconostoc* türleri ya zayıf gelişme göstermiş ya da hiç gelişme göstermemiştir.

### **5.3. Laktik Asit Bakterilerinin Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Yetenekleri**

Sanchez ve Palop (2000) yaptıkları bir çalışmada, turşudan izole ettikleri *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, *L. brevis*, ve *L. fermentum* türlerinin %4 tuz konsantrasyonunda geliştiğini, %6,5 tuz konsantrasyonunda bütün türlerde farklı oranlarda gelişme görülebildiğini, %8 tuz oranında ise *L. fermentum* haricinde diğer türlerde gelişme olduğunu belirtmişlerdir.

Kıran (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, hazır gıdalardan izole edilen ve çeşitli kültür koleksiyonlarından temin edilen laktik asit bakterilerinin, %4 tuz konsantrasyonunda bütün izolatların geliştiği, %6,5 tuz konsantrasyonunda 5 izolat hariç diğerlerinin geliştiği, %12 tuz konsantrasyonunda sadece 4 izolatın zayıf gelişme gösterdiği ve %18 tuz konsantrasyonunda ise hiçbirinin gelişmediği belirtilmiştir.

Adnan ve Tan (2007) geleneksel Malezya ürünlerden izole ettikleri laktik asit bakterilerinden, %1,5, %2,5 ve %5 tuz konsantrasyonlarında tüm *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus casei* türlerinin geliştiğini, %7,5 ve %10 tuz konsantrasyonunda bu türlerinin gelişemediğini belirtmişlerdir.

İşleroğlu ve ark. (2008) yaptıkları bir çalışmada, yöresel peynirlerden izole ettikleri *Enterococcus faecalis* türünün %3, %4 ve %6,5 tuz konsantrasyonlarında gelişebildiğini fakat, %10 tuz konsantrasyonunda gelişemediğini belirtmiştir.

Yaptığımız çalışmada; izole edilen laktik asit bakterilerinin %4, %7,5 ve %10 tuz konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri incelenmiştir. İzole edilen *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus paracasei* türleri, %4 ve %7,5 tuz konsantrasyonlarında gelişme gösterirken, %10 tuz konsantrasyonunda zayıf gelişme göstermişlerdir.

*Enterococcus faecalis* türleri ise, %7,5 tuz konsantrasyonunda gelişme gösterirken, %10 tuz konsantrasyonunda gelişme göstermemiştir. İzole edilen *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* türü ise %4 tuz konsantrasyonunda gelişmiş fakat, %7,5 ve %10 tuz konsantrasyonunda gelişme göstermemiştir.

#### 5.4. Laktik Asit Bakterilerinin API Testleri ile Tanımlanması

Özgün (2009) tarafından yapılan bir çalışmada; anne sütü (kolostrum) ve bebek feçes örneklerinden izole edilen laktik asit bakterileri API 50 CHL testiyle tanımlanmış ve *Lactobacillus acidophilus*, *L. acidophilus* 3, *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* türleri bulunmuştur.

Hızarcı (2011) tarafından yapılan bir çalışmada; peynir örneklerinden 75 adet LAB izole edilmiş ve API 50 CHL ile tür düzeyinde tanımlanarak; %39,7'si *Lactobacillus brevis* 1, %27,4'ü *L. brevis* 3, %20,6'sı *L. plantarum* 1, %5,5'i *L. paracasei* ssp. *paracasei* 1, %4,1'i *L. pentosus*, %1,4'ü *L. brevis* 2, %1,4'ü *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 olarak belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada fenotipik testlere ek olarak API 50 CHL ve API 20 Strep test kitleri kullanılmış ve izolatların tür düzeyinde tanımlamaları yapılmıştır. Buna göre 17 LAB izolatı elde edilmiş ve bu izolatların tür düzeyinde dağılımları; 2 izolat *Lactobacillus plantarum* (%11,8) (20A, 23A), 5 izolat *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (%29,4) (11A, 27A, 38A, 39A, 42B), 1 izolat *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (%5,9) (18A), 2 izolat *Enterococcus faecalis* (%11,8) (21B, 40B), 2 izolat *Aerococcus viridans* (%11,8) (10A, 15B) ve 5 izolat *Leuconostoc spp.* (%29,4) (3A, 12A, 13A, 24A, 32A) olarak bulunmuştur. Sonuç itibariyle *Lactobacillus paracasei* ve *Leuconostoc spp.* türleri baskın tür olarak belirlenmiştir.

### 5.5. Laktik Asit Bakterilerinin PZR ile Tanımlanması

Kırmacı (2010) yaptığı bir çalışmada, çiğ koyun sütünden üretilen Urfa peynirlerinden 143 izolat elde etmiş ve 16S rDNA dizi analizi ile tanımlamıştır. 143 izolatın %48,95'inin *Enterococcus spp.*, %40,55'inin *Lactococcus spp.*, %9,10'unun *Lactobacillus spp.*, %0,69'unun *Streptococcus spp.* ve %0,69'unun *Leuconostoc spp.* olduğunu belirlemiştir. Enterokokların %40,0'i *Enterococcus faecium*, %32,8'i *E. durans*, %18,5'i *E. faecalis*; laktokokların %62,71'i *Lactococcus lactis ssp. lactis*, %30,5'si ise *Lactococcus garvieae* olarak sınıflandırmıştır.

Yaptığımız çalışmada API testleri ile tanımlanan *L. plantarum* ve *L. paracasei* türlerinin genotipik olarak doğrulanması için PZR yöntemi uygulanmıştır. *L. plantarum* türüne ait olan 23A izolatı dışında 18D, 19A, 19B ve 22B izolatları *L. plantarum* olarak tanımlanmıştır. API yöntemiyle tanımlanan *L. paracasei* türüne ait olan 11A, 27A, 38A, 39A ve 42B izolatlarının yanı sıra 3B, 11B, 11C, 12B, 27C, 38C, 39C ve 42A izolatları da *L. paracasei* olarak tanımlanmıştır. PZR çalışması sonucunda (n=121); %4,1'i *L. plantarum* ve %10,8'i *L. paracasei* olarak belirlenmiştir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Amasya ilinde tüketime sunulan 77 adet çiğ süt örneğinden izole edilen 121 izolatın, bazı patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır.

2. İzolatların antimikrobiyal etkilerini araştırmak için kuyucuk difüzyon testi uygulanmıştır. 121 izolatın 32'si (%26) *Salmonella enteritidis*'e, 38'i (%31) *Pseudomonas aeruginosa*'ya, 39'u (%32) *Bacillus cereus*'a, 26'sı (%21) *Staphylococcus aureus*'a ve 33'ü (%27) *Escherichia coli*'ye karşı antimikrobiyal etki göstermiştir.

3. En az dört patojen mikroorganizma üzerinde antimikrobiyal aktivite gösteren 30 izolattan örnekleme yapılarak seçilen 17 izolata, API 50 CHL ve API 20 Strep test kitleri kullanılarak tür düzeyinde tanımlama yapılmıştır. Bu tanımlama sonucuna göre izolatların (n=17); %29,4'ü *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, %11,8'i *Lactobacillus plantarum*, %29,4'ü *Leuconostoc* spp., %11,8'i *Enterococcus faecalis*, %11,8'i *Aerococcus viridans* ve %5,9'u *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* olarak belirlenmiştir.

4. API testleri ile tanımlanan *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus paracasei* türlerinin genotipik olarak doğrulanması için PZR yöntemi uygulanmıştır. İstenilen gen bölgelerinin çoğaltılması için *planF-pREV* ve *casfor-casrev* primerleri kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda (n=121); %4,1'i *Lactobacillus plantarum* ve %10,8'i *Lactobacillus paracasei* olarak belirlenmiştir.

Son yıllarda tüketicilerin doğal ve katkısız ürünlere olan ilgisi, gıdaların muhafazasında kimyasal koruyucuların kullanımının azaltılması ve alternatif olarak doğal inhibitör maddelerin kullanılması bu tür çalışmaların önemini artırmaktadır. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitelerinden; organik asitler, hidrojen peroksit, diasetil, asetaldehit ve bakteriyosin gibi metabolitlerden biri ya da bir kaçının ortak etkisi sorumlu olabilir.

Bu çalışmada çiğ sütlerden izole edilerek antimikrobiyal etkileri belirlenen laktik asit bakterilerinin, gıdaların fermentasyonu ve korunmasında kullanımları söz konusu olabilir. Bu nedenle antimikrobiyal aktivitesinin ve gıdalar ile etkileşimlerinin olduğu düşünülen bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri bileşiklerin, moleküler yöntemler kullanılarak mekanizmalarının aydınlatılması, ayrıca protein analiz yöntemleri kullanılarak protein profillerinin belirlenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

## 7. KAYNAKÇA

Adams, M. R., Nicolaides, L., "Review of the sensitivity of different foodborne pathogens fermentation", *Food Control*, Vol.8,No.5/6. pp. 227-239, (1997).

Adıgüzel, G., "Fermente Türk Sucuğundan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Karakterizasyonu", Doktora tezi, *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, s. 3-7 (2008).

Adnan, A.F.M. ve Tan, I.K.P., "Isolation of Lactic Acid Bacteria from Malaysian Foods and Assessment of the Isolates for Industrial Potential", *Bioresource Technology*, 98, 1380-1385s., (2007).

Akkoç, N., Şanlıbaba, P. ve Akçelik, M., "Bakteriosinler: Alternatif Gıda Koruyucuları", *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25 (1-2), 59–70s., (2009).

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., and Chevallier, I., "Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1- screening and characterization of the antimicrobial compounds", *Food Control* 17 454-461, (2006).

Arslankoz, N., "Ankara Çubuk yöresi turşularından izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi"; Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, s. 9-10 (2011).

Aslım, B., Yüksekdağ, Z.N., Sarıkaya, E., Beyatlı, Y., "Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products", *LWT*, 38, 691–694, (2005).

Axelsson, L., "Lactic acid bacteria: Classification and physiology, Lactic Acid Bacteria", *Microbiol. and Funct. Asp.*, pp. 1-73, (1998).

Baele, M., Vanechoutte, M., Verhelst, R., Vancanneyt, M., Devriese, LA., Haesebrouck, F., " Identification of *Lactobacillus* Species Using tDNA-PZR", *J.Microbiol Methods*, 50: 263-271.(2002).

Beasley, S., "Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota", Academic Dissertation in Microbiology, University of Helsinki, *Faculty of Agriculture and Forestry Sciences*, Finland 120 p. (2004).

Barefoot, S.F., Nettles, C.G., "Antibiosis Revisited: Bacteriocins Produced by Dairy Starter Cultures", *J Dairy Sci*; 76, 2366-2379. (1993).

Chen, H. ve Hoover, D.G., "Bacterocins and Their Food Applications", *Comp. Rev. Food. Sci. Food.Safety*, vol. 2, p.p 82-100, (2003).

Christensen, JE., Dudley, EG., Pederson, JA., Steele, J.L., "Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria", *Anton Leeuw*, 76: 217-246. (1999).

Cleveland, J., Montville T.J., Nes I.F. ve Chikindas M. L., "Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation", *International Journal of Food Microbiology*, vol.71, p.p 1–20, (2001).

Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Duboux, M. and Gwenaelle, L. B., "Inhibitory Activity Spectrum of Reuterin Produced by *Lactobacillus reuteri* Against Intestinal Bacteria", *BMC Microbiology*, 7, 101, (2007).

Cocolin, L., Foschino, R., Comi, G. ve Fortina, M.G., "Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk", *Food Microbiology*, 24: 752 – 758p, (2007).

Conter, M., Muscariello, T., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A., Campanini, G., Ianieri. A. "Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From an Italian Dry Fermented Sausage", *Ann Fac Medic Vet Di Parma*, Vol XXV. Pag. 167- 174 (2005).

Cotter, P. D., Hill, C., ve Ross, R. P., "Bacteriocins: developing innate immunity for food", *Food Microbiology* V:3, (2005).

Çadırcı, B.H., "Bazı *Lactobacillus* cinsi bakterilerin çeşitli gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerine antagonistik etkisi", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, s.9-17, (2003).

Çon, A. ve Gökalp, H.Y., "Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Şekilleri", *Türk Mikrobiyol Cem. Derg.* 30: 180-190 (2002).

Çon, A. ve Karasu, N., "Determination of Antagonistic Starter Cultures for Pickle and Olive Fermentation Processes", *Czech J. Food. Sci.*, 27 (3), 185-193s., (2009).

Daeschel, M.A., "Antimicrobial Substances From Lactic Acid Bacteria for Use as Food Preservatives", *Food Technol.* 1989; 164-167. (1989).

De Martinis, E.C.P., Alves, V.F., Franco, B.D.G.M., "Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products", *Food Reviews International*, 18:2, 191 – 208p, (2002).

Diep, D.B., Havarstein, L.S. ve Nes, I.F., "Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11", *J. Bacteriol.*, 178: 4472–4483, (1996).

Dinçer, E., Kıvanç, M., Karaca, H., "Biyokoruyucu Olarak Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosinler", *Gıda Dergisi*. 08059. (2009).

Ehrmann, M.A. and Vogel, R.F., "Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria", *Trends in Food Science & Technology*, 16:31–42p. (2005).

Elçiöglü, Ö., "Kargı Tulum Peynir'inden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Starter ve Probiyotik Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, **Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Eskişehir, s.5-7, (2010).

Ennahar, S., ve Deschamps, N., "Anti-Listeria effect of enterocinA, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria", **Journal of Applied Microbiology**, 88, 449-457, (2000).

Erdoğrul, Ö.T., Çetin, Ö. ve Ergün, Ö., "Fermente Sucuklardan İzole Edilen *Pediococcus pentosaceus* Suşlarının Bazı Metabolik ve Antimikrobiyel Aktiviteleri Üzerine Çalışmalar", **İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi** 28 (1), 249-254s, (2002).

Erginkaya, Z., Yurdakul, N. E., ve Karakaş, A., "*Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*' in Starter ve Probiyotik Kültür Özellikleri", **Gıda Dergisi**, 32(3), (2007).

Evren, M., Albayram, C. ve Apan, M., "Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu antimikrobiyal maddeler", **Türkiye 9. Gıda Kongresi** ; 24-26 Mayıs Bolu, (2006).

Furet, J-P., Quenee, P., Tailliez, P., "Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PZR", **International Journal of Food Microbiology**, 97: 197- 207, (2004).

Galvez, A., Abriouel, H., Lòpez, RL., Omar, NB., "Bacteriocin-based strategies for food biopreservation", **International Journal of Food Microbiology**, 120: 51-70, (2007).

Gezginç, Y.,Akyol, İ., "Geleneksel Yoğurtlardan İzole Edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*' ların Tanımlanması"; **KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi.**, 13(2); s. 23-29; (2010).

Greco, M., Mazzette, R., De Santis, EPL., Corona, A., Cosseddu, AM., "Evolution and Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated During the Ripening of Sardinian Sausages", *Meat Science*; 69, 733-739. (2005).

Ghotbi, M., Soleimani-Zad, S. and Sheikh-Zeinoddin, M.; "Identification of *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus plantarum* in Lighvan cheese with 4 month ripening period by means of *recA* gene sequence analysis"; *African Journal of Biotechnology* vol. 10(10) pp. 1902-1906. (2011).

Ghraiiri, T., Mania, M., Berjeaud, J.M., ve Frere, J., "Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a traditional Tunisian cheese", *Journal of Applied Microbiology*, 97, 621-628, (2004).

Gonzalez, B., Arca, P., Mayo, B., Suarez, J.E., "Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin", *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (6): 2158-63, (1994).

Hardie, JM., Whiley, RA., "Classification and Overview of Genera *Streptococcus* and *Enterococcus*", *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*, 26, 1-11 (1995).

Hayaloğlu, AA., Erginkaya, Z., "Gıda Endüstrisinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri", *Gıda Teknolojileri Derneği* Yayın No:23. (2001).

Hernandez, D., Candell, E. and Zarate, V., "Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of *plantaricin* TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711", *Journal of Applied Microbiology*, 99: 77-84p. (2005).

Hızarcı, Ö., "Tulum Peynirinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması Ve Anti-listerial Etkilerinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, s. xv, (2011).

Holt, JG., Krieg, NR., Sneath, PHA., Staley, JT., Williams, ST., "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", *Williams and Wilkins*, USA, 9. Edition (1994).

İşleroğlu, H., Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M., "Yöresel Peynirden Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Laktik Asit Bakterisinin İzolasyonu ve Tanısı", *GOÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(1), 1 – 6s. (2008).

Jack, R.W., Tagg, J.R. ve Ray, B., "Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria", *Microbiological Reviews*, 171 – 200p, (1995).

Kashket, ER., "Bioenergetics of Lactic Acid Bacteria: Cytoplasmic pH and Osmotolerance", *FEMS Microbiol Rev.*,46: 233-244 (1987).

Kandler, O., Weiss, N., "Regular, non-sporing Gram-positive Rods", *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2: 1208-1234. (1986).

Kayagil, F., "Geleneksel Starter Kültürlerin Peynir Kalitesine Etkisi" *Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü* Yüksek Lisans Tezi.14s. (2006).

Kılıç, S., "Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri", *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları* No: 542, s:421. (2001).

Kıran, F., " Hücre Duvarı Protein Profilleri ve Pilazmid İçeriklerine Göre Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Tanısı", Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 130s., Ankara.,(2006).

Kıran, F., Osmanağaoğlu, Ö., "Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda/Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler", *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27(1), 62-74. (2011).



Kırmacı, H.A., " Geleneksel Urfa Peynirinde Yer Alan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Moleküler Karakterizasyonu ve Starter Kültür Olarak Kullanım Olanakları", Doktora Tezi, *Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, s. 14-16, (2010).

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G., "Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria", *International Journal of Food Microbiology*, 41: 103-125. (1998).

Klein, G., " Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro intestinal tract", *International Journal of Food Microbiology* 88: 123-131p. (2003).

Klaenhammer, T.R., "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria", *FEMS Microbol. Rev.*, 12, 39-86, (1993).

Kuleaşan, H., "Laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinlerin tanımlanması, sınıflandırılması ve bazı gıda kaynaklı patojenler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi", Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, s.10-15, (2002).

Kurt, Ş. ve Zorba, Ö., "Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları", *YYÜ Vet. Fak. Derg.* 16 (1): 77 – 83s. (2005).

Kushiro, A., Chervaux, C., Cool-Portier, S., Perony, A., Legrain-Raspaud, S., Obis, D., Onoune, M., Moer, A. "Antimicrobial Susceptibility Testing of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria by Broth Microdilution Method and Etest", *International Journal of Microbiology* 1. (2009).

Leroy, F., De Vuyst, L., "Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase", *International Journal of Food Microbiology*, 72(1), 155-164, (2002).

Leroy, F., De Vuyst, L., "Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry", *Trends Food Sci. Technol.* 15: 67- 68. (2004).

Madigan, MT., Martinko, JM., Brock, TD., "Brock Biology Of Microorganisms", *11<sup>nd</sup> Edition, Pearson Prentice Hall*, New York, 1056 p. (2006).

Mathur, S., Singh, R., "Antibiotic Resistance in Food Lactic Acid Bacteria-A Review", *International Journal of Food Microbiology*, 105, 281-295. (2005).

Mavhungu, J., "Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from "Ting" in the Northern Province of South Africa", *Master of Science University of Pretoria*. 74 p., Pretoria (2006).

Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O. and Yadav, H., "Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria", *Journal of Digestive Diseases*, 9: 190 – 198p. (2008).

Montville, T. J., Winkowski, K. and Chikindas, M.L., "Biologically Based Preservation Systems. In Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers", 2nd edn, pp. 629–647. Edited by M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville. Washington, DC: *American Society for Microbiology*, (2001).

Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L., " The Role and Application of Enterococci in Food and Health", *International Food of Microbiology*, vol. 106, p.p 1-24 (2006).

Nes, I.F., Tagg, J.R., "Novel lantibiotics and their pre-peptides". *Antonie van Leeuwenhoek*, 69: 89–97.(1996).

Nilsen, T., Nes, I.F. ve Holo, H., "Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333", *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 2975–2984, (2003).

Orla-Jensen, S., In S. Orla-Jensen (Ed.), "The lactic acid bacteria", pp 1-196, *Copenhagen: A.F. Host and Son*, (1919).

Osmanağaoğlu, Ö., Beyatlı, Y., "The use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in food biopreservation", *Türk Mikrobiyoloji Cem. Derg.* 32: 295–306p. (2002).

Özer, B., "Yoğurt Bilimi ve Teknolojisi", *Sidas Matbaacılık*, İzmir, 168-169s. (2006).

Özgün, D., "Anne Sütü (Kolostrum) ve Bebek Feçeslerinden *Lactobacillus* Cinsi Bakteri Suşlarının İzolasyonu ve API 50 Chl Sistemi ile İdentifikasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, s. ii, (2009).

Özkalp, B., "Doğal Tip *Lactococcus lactis* Suşlarının Endüstriyel Starter Kültür Potansiyellerinin Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü*, Ankara, s 6-8, (2006).

Sahl, H.G., Jack, R.W. and Bierbaum, G., "Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications", *Eur. J. Biochem.*, 230: 827–853, (1995).

Salminen S., and Wright A., " Lactic Acid Bacteria", *New York, Dekker*, (1998).

Sanchez, I. ve Palop, L., "Biochemical Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Spontaneous Fermentation of Almagro Eggplants", *International Journal of Food Microbiology*, 59, p.p 9-17, (2000).

Schillinger, U., Lücke, FK., "Antibacterial Activity of *Lactobacillus sakei* Isolated from Meat", *App Environ Microbiol*, 55 (8): 1901-1906. (1989).

Schleifer, K. H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W., Amann, R., "Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria", *Int. Dairy Journal*. 5: 1081- 1094. (1995).

Stiles, M.E. and Holzappel, W.H., "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy", *International Journal of Food Microbiology*, 36: 1–29p. (1997).

Tabakoğlu, C., "Yöresel Peynirlerden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Tanısı Ve Bazı Gıda Patojenleri Üzerindeki Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, s.57-59 (2010).

Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Pelaez, C., and Requena, T.; "Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei subs. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk"; *International Dairy Journal* 17; p 1107-1114. (2007).

Tagg, J.R., "Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*", *Indian J. Med. Res.*, 199: 13-6. (2004).

Tamang, J.P, Tamang, B., Schillinger, U., Guigas, C., ve Holzappel, W.H. "Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Ethnic Fermented Vegetables of the Himalayas", *International Journal of Food Microbiology*, vol 135, p.p 28-33., (2009).

Tangüler, H., "Şalgam Suyu Üretiminde Etkili Olan Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi ve Şalgam Suyu Üretim Tekniğinin Geliştirilmesi", Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. 367 s., Adana, (2010).

Tatlı, D., "Geleneksel süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Adana, s. 11-13 (2009).

Tekinşen, O.C., Atasever, M., "Süt Ürünlerinde Starter Kültür", **Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi** no:150; Konya. (1994).

Temiz, A., "Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri", **Hatiboğlu Yayınları**:96, Yükseköğretim Dizisi:29:90-93, Ankara. (2008).

Temmerman, R., Huys, G. and Swings, "Identification of Lactic Acid Bacteria: Culture- Dependent And Culture-Independent Methods", **Trends In Food Science & Technology**, 15, 348-359p. (2004).

Teuber, M., "The genus *Lactococcus*, in the lactic acid bacteria, the genera of lactic acid bacteria" , **Blackie Academics and Professionals**. 2; 173-235. (1995).

Thomas, LV., Delves, B., "Nisin. In: Antimicrobials in Food", Davidson P.M. Sofos JN, Branen AL. (chief eds), **Taylor & Francis Group**, New York, pp. 237-275. (2005).

Toba, T., Yoshioka, E., Itoh, T., "Acidophilucin A, a new heat labile bacteriocin from *Lactobacillus acidophilus*", **Letters in Applied Microbiology**, 12, 106 108, (1991).

Toksoy A., "Baz Laktik Asit Bakterilerinin Oluşturduğu Antimikrobiyal Maddelerin Kontaminant Mikroorganizmalar Üzerine İnhibisyon Etkisi", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, (1993).

Torriani, S., Felis, G. and Dellaglio, F. ; "Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PZR Assay with *recA* Gene-Derived Primers", **Applied and Environmental Microbiology** vol.67 no.8 p.3450-3454. (2001).

Tunail, N., "Mikrobiyoloji", *Pelin Ofset, Ankara*, s. 448. Ankara, (2009).

Tuncer, Y., "Laktokok suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin tanısı ve bu özelliğin genetik doğasının belirlenmesi", Doktora Tezi , *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara. (2005).

Villani, F., Aponte, M., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O., Moschetti, G., "Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1–5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk", *J. Appl. Microbiol.*, 90, 430–439, (2001).

Yalanca, İ., "Geleneksel et ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik direncinin belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, s.5-8 (2009).

Yang, Z., " Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties", *Department of Food Technology, University of Helsinki*, (2000).

Yıldırım, Z., "Antimikrobiyal Madde Üreten Bir Lactobacilli'nin İzole ve Teşhis Edilmesi". *Gıda Dergisi*, 26(4):303-306. (2001).

Yılmaz, R. ve Temiz, A., "*Streptococcus salivarius subs. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*' un klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve karakterizasyonu". *Orlab Mikrobiyol. Derg*, 1(3), s.19-42, (2003).

Yüksekdağ, Z.N. ve Beyatlı, Y., "Bazı laktik asit bakterilerinin fizyolojik, biyokimyasal, plazmit DNA ve protein profil özelliklerinin incelenmesi", *Gıda Dergisi*, 34 (2): 91-98s. (2009).

## ÖZGEÇMİŞ

12 Ekim 1988 tarihinde Amasya'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Amasya Yeşilirmak İlköğretim Okulu'nda bitirdim. Lise öğrenimimi 2006 yılında Amasya Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2007 yılında Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladığım lisans öğrenimimi 2011 yılında bitirdim. 2013 yılında Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimime başladım ve halen bu eğitime devam etmekteyim.

