

**BEYAZ PEYNİR VE SÜT İŞLEME TESİSİNDEN İZOLE
EDİLEN MİKROBİYOTANIN KARAKTERİZASYONU**

**CHARACTERIZATION OF MICROBIOTA ISOLATED
FROM WHITE CHEESE AND MILK PROCESSING
FACILITY**

ZEYNEP GÖRKEM CERİT

DOÇ. DR. REMZİYE YILMAZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Her zaman yanımda olan canım aileme.

ÖZET

BEYAZ PEYNİR VE SÜT İŞLEME TESİSİNDEN İZOLE EDİLEN MİKROBİYOTANIN KARAKTERİZASYONU

Zeynep Görkem CERİT

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Remziye YILMAZ

Eş Danışman: Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU

Haziran 2020, 167 sayfa

Bu çalışmada, endüstriyel olarak üretilen beyaz peynirin, üretim süresince meydana gelen süt ürünlerinin ve üretimde kullanılan işletme ekipmanının mikrobiyotasının Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon- Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) analizine dayalı kültüromik ve shotgun metagenomik dizileme yöntemleriyle belirlenmesi ve sonuçların laktik asit bakterileri açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, küçük ölçekli bir süt işletmesinde gerçekleşen beyaz peynir üretimi süresince çiğ süttten itibaren son ürüne kadar çeşitli aşamalarda süt ürünü örnekleri (çiğ süt, starter kültür eklendikten sonra süt, pıhtı, teleme ve beyaz peynir) alınmıştır. Bunun yanında üretimde kullanılan ekipman yüzeylerinden (tanker, tekne, karıştırıcı, kesme teli, cendere bezi) örnekler alınmıştır. Örneklerden elde edilen izolatlardan MALDI-TOF MS analizi ile *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus thermophilus*,

Enterococcus faecalis, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* ve *Pediococcus pentosaceus* türlerine ait 109 adet laktik asit bakterisi tür düzeyinde tanımlanmıştır. İzolatlardan 9 adedi cins düzeyinde tanımlanmış olup *Enterococcus* olarak belirlenmiştir. İzolatlardan 4 adedi MALDI-TOF MS ile tanımlanamamış olup “Tanımlama olmadığında veri tabanına göre bulunan en yakın suş” tanımı ile *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus gallinarum* ve *Enterococcus gallinarum/Enterococcus casseliflavus* olarak sonuçlanmıştır. Shotgun metagenomik dizileme ile belirlenen süt ürünü ve ekipman yüzey örneklerinin mikrobiyel profilleri farklılık göstermiştir. Süt ürünü örneklerinde en yoğun bulunan filum Firmicutes (%63-70 arasında değişen oranlarda) iken, ekipman yüzey örneklerinde Proteobacteria (%84-89 arasında değişen oranlarda) en yoğun bulunan filum olmuştur. Ekipman yüzey örneklerinde Firmicutes filumu %5-14 oranında tespit edilmiştir. Örneklerde laktik asit bakterileri içinde en yoğun bulunan cins *Lactococcus* olmuştur. Bunu *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella*, *Lactobacillus* ve *Pediococcus* takip etmektedir. En yoğun bulunan laktik asit bakterisi türü ise *Lactococcus lactis*'tir. Tüm bakteri türleri arasında süt ürünü örneklerinde baskın tür *Staphylococcus aureus* (%21-37 arasında değişen oranlarda) olmuştur. İki yöntem birbiriyle karşılaştırıldığında, metagenomik analizlerle elde edilen biyoçeşitlilik kültüromik ile elde edilen biyoçeşitlilikten çok daha yüksektir. Metagenomik yöntemler ile örneklerde *Lactococcus* cinsine ait 11 tür, *Streptococcus* cinsine ait 64 tür *Enterococcus* cinsine ait 46 tür, *Lactobacillus* cinsine ait 54 tür ve *Pediococcus* cinsine ait 2 tür tanımlanmıştır. MALDI-TOF MS ile ise *Lactococcus* cinsine ait 1 tür, *Enterococcus* cinsine ait 4 tür, *Lactobacillus* cinsine ait 5 tür, *Streptococcus* cinsine ait 1 tür ve *Pediococcus* cinsine ait 1 tür tanımlanmıştır. Bu çalışmanın devamında örneklerden izole edilip tanımlanan bakterilerin starter kültür olma potansiyelleri incelenerek bir beyaz peynir starter kültürü elde edilmesi planlanmaktadır. Ayrıca MALDI-TOF MS ile tanımlanamayan 4 izolatın tüm genom dizileme analizleri ile yeni laktik asit bakterisi türü olma potansiyelleri incelenecektir.

Anahtar Kelimeler: beyaz peynir, mikrobiyota, shotgun dizileme, metagenomik analizler, kültüromik, MALDI-TOF MS

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF MICROBIOTA ISOLATED FROM WHITE CHEESE AND MILK PROCESSING FACILITY

Zeynep Görkem CERİT

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Remziye YILMAZ

Co- Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU

June 2020, 167 pages

In this study, it was aimed to determine the microbiota of industrially produced white cheese, dairy products that occur during production and equipment using in production by culturomics based on Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and shotgun metagenomic sequencing methods and evaluate the results in terms of lactic acid bacteria. In this line, dairy samples from raw milk to final product (raw milk, starter culture added milk, clot, curd, white cheese) and equipment surface samples using in production (raw milk truck, cheese vessel, stirrer, cutting wire, cheesecloth) are collected from a small-scale dairy plant. 109 isolates identified at species level belonging to *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* and *Pediococcus pentosaceus* and 9 isolates identified as *Enterococcus* at genus level by MALDI-TOF MS. 4 of the isolates couldn't be identified by MALDI-TOF MS and resulted *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*,

Enterococcus gallinarum ve *Enterococcus gallinarum/Enterococcus casseliflavus* as “The closest strain found by database if there is no identification”. These isolates have the potential to be new species. Microbial profile of dairy samples and equipment surface samples determined by shotgun metagenomic sequencing differed. Firmicutes was found as the dominant phylum (ranging from 63% to 70%) in the dairy samples while Proteobacteria was found as the dominant phylum (ranging from 84% to 89%) in the equipment surface samples. Firmicutes was found in the equipment surface samples by 5-14%. Lactococcus was the most abundant lactic acid bacteria genus for all samples. Among all bacterial species, the dominant species in dairy samples was *Stapylococcus aureus* (ranging from 21% to 37%). This followed by Streptococcus, Enterococcus, Leuconostoc, Weisella, Lactobacillus and Pediococcus genera respectively. *Lactococcus lactis* was the dominant species. The biodiversity obtained by metagenomics was much higher than the biodiversity obtained by culturomics. 11 species of Lactococcus genus, 46 species of Enterococcus genus, 54 species of Lactobacillus genus, 64 species of Streptococcus genus and 2 species of Pediococcus genus were determined by metagenomics while 1 species of Lactococcus genus, 3 species of Enterococcus genus, 6 species of Lactobacillus genus, 1 species of Streptococcus genus and 1 species of Pediococcus genus were determined by MALDI-TOF MS. In the continuation of this study, it is planned to examine the potential of bacteria isolated from samples to be starter culture and obtain a white cheese starter culture. In addition, the potential of being a new lactic acid bacteria species will be examined with whole genome sequencing analyzes of 4 isolates that couldn't be identified by MALDI-TOF MS.

Keywords: white cheese, microbiota, shotgun sequencing, metagenomic analysis, culturomics, MALDI-TOF MS

TEŞEKKÜR

Tez alıőmam sűresince, tez fikrimin bulunmasından tezimin son aőamasına kadar beni yűnlendiren, destekleyen, engin bilgilerini ve tecrűbelerini benimle paylaőan deęerli danıőman hocam Do. Dr. Remziye YILMAZ'a, engin bilgilerini benimle paylaőan, tez alıőmam boyunca desteklerini esirgemeyen deęerli eő danıőman hocam Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOęLU'na teőekkűrlerimi sunarım.

Tez jűrimde bulunan deęerli hocalarım Prof. Dr. Fűsun EYİDOęAN, Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ, Prof. Dr. Vural GűKMEN ve Dr. Őęr. Ŭyesi Deren TAHMAS KAHYAOęLU'na deęerli yorumları ve katkılarından dolayı teőekkűr ederim.

Tez çalıőmam sırasında, mikrobiyoloji űn denemelerini gerçekleőtirmem için imkân saęlayan MAYSA GIDA'ya, Genel Műdűr Nurdan TUNCAL'a, Ar-Ge Bűlűmű Proje Yűneticisi Hilal ATA'ya ve tekniker Yusuf CEBE'ye teőekkűr ederim.

Analizlerimin bir kısmını gerçekleőtirdięim Bursa Ulusal Gıda Starter Kűltűr Gen Bankası'na, burada analizlerimi yűrűtmemde her tűrlű teknik ve manevi desteęini hissettięim sevgili arkadaőım Őzlem IŐIK'a teőekkűr ederim.

Laboratuvar çalıőmalarım ve tez yazımı sűresince manevi desteęini esirgemeyen sevgili dostum Merve ARIOęLU'na, tez çalıőmam boyunca teknik ve manevi desteęini esirgemeyen sevgili Őzgű KAPTAN'a sonsuz teőekkűr ederim.

Doęduęum gűnden beri desteklerini arkamda hissettięim, beni bűyűten, yetiőtiren sevgili aileme; annem Nurgűl CERİT, babam Ertuęrul CERİT ve kardeőim Murat CERİT'e sonsuz teőekkűrlerimi sunarım.

Bu çalışma TAGEM ARGE 31/18 numaralı proje ile TAGEM tarafından maddi olarak desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TAGEM'e ve değerli TAGEM uzmanı Ahmet BUDAKLIER'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	16
2. GENEL BİLGİLER	18
2.1. Beyaz Peynir	18
2.1.1. Endüstriyel Beyaz Peynir Üretimi	19
2.1.2. Beyaz Peynir Mikrobiyotası	21
2.2. Laktik Asit Bakterileri	24
2.3. Laktik Asit Bakterilerini Tanımlama Yöntemleri.....	26
2.3.1. Laktik Asit Bakterilerinin Klasik Kültürel Yöntemlerle Tanımlanması	27
2.3.2. Kültüromik yaklaşımı ile Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması	28
2.3.3. Metagenomik Analizler	30
3. MATERYAL METOT	38
3.1. Materyal	38
3.2. Metot.....	38
3.2.1. Örnekleme.....	40
3.2.2. Kültüromik yaklaşımı ile Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon ve Tanımlanması	42
3.2.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu.....	42
3.2.2.2. İzolatlardan Saf Kültür Elde Edilmesi ve Saf Kültürlerin Muhafazası	42
3.2.2.3. İzole Edilen Saf Kültürlerin Kodlanması.....	43
3.2.2.4. Klasik Kültürel Yöntemlerle Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi	43

3.2.2.5. MALDI-TOF MS ile Tanımlama	45
3.2.3. Shotgun Metagenom Dizileme ile Tanımlama.....	46
3.2.3.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu	47
3.2.3.2. DNA Kütüphanesi Hazırlama	48
3.2.3.3. Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing, NGS)	50
3.2.3.4. Biyoinformatik Analizler	50
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	52
4.1.Kültüromik yaklaşımı ile Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon ve Tanımlanması	52
4.1.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	52
4.1.2. Klasik Kültürel Yöntemlerle Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi	52
4.1.3. MALDI-TOF MS ile Tanımlama	62
4.2. Shotgun Metagenom Dizileme ile Tanımlama Sonuçları	67
4.2.1. Biyoinformatik Analiz Verileri	67
4.3. Kültüromik ve Metagenomik Analiz Sonuçlarının Karşılaştırmalı Değerlendirmesi	129
5. YORUM	139
6. KAYNAKLAR.....	144
EKLER	155
EK 1 – İstatistiksel Bilgiler- Total Stat Info	155
EK 2 –LAB MALDI-TOF MS Spektrumları.....	156
EK 3 – Örneklerin Staphylococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu	159
EK 4 - Tezden Türetilmiş Bildiriler	163
EK 5 – Orjinallik Raporu	165
ÖZGEÇMİŞ	166

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Beyaz peynir üretimi	20
Şekil 2.2. Kazein zincirinin kırılması.	21
Şekil 2.3. İnsan Mikrobiyom Projesinin ilk aşaması (HMP1).....	21
Şekil 2.4. Del Chierico (2014)'e göre kültüromik yaklaşımı	29
Şekil 2.5. MALDI-TOF MS çalışma prensibi	29
Şekil 2.6. Metagenomik analizlerin ortaya çıkışı	31
Şekil 2.7 Metagenom çalışma yöntemleri.....	32
Şekil 3.1. Süt ve peynir mikrobiyotası: Shotgun metagenomik analiz ve kültüromik yaklaşımı.	39
Şekil 3.2. Örneklerin alındığı süt işleme tesisinin beyaz peynir üretim ünitesi planı.....	41
Şekil 3.3. Tek koloni düşürme tekniği ile M17 Agar ve KAA besiyerlerinde elde edilen saf koloni örnekleri.	43
Şekil 3.4. MALDI-TOF MS plakası ve mikroorganizmaların cihaza yüklenmesi.	46
Şekil 3.5. VITEK® MS Acquisition Station ekran görüntüsü.....	46
Şekil 3.6. NEBNext® Ultra™ II DNA kütüphanesi hazırlığı iş akışı.	49
Şekil 3.7. Yeni nesil dizileme (NGS) iş akışı.	50
Şekil 3.8. Veri analizi iş akış şeması.	50
Şekil 4.1. Gram pozitif kok ve basillerin mikroskop görüntüleri.	53
Şekil 4.2. Örneklerin alem düzeyinde ısı haritası. D: Dairy (Süt ürünü örnekleri), E: Equipmant (Ekipman yüzey örnekleri).	68
Şekil 4.3. Örneklerin cins düzeyinde PCoA Grafiği.....	69
Şekil 4.4. Örneklerin tür düzeyinde PCoA grafiği.....	70
Şekil 4.5. N1 örneğinin alem düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.....	72
Şekil 4.6. N5 örneğinin alem düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.....	73
Şekil 4.7. N6 örneğinin alem düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.....	75
Şekil 4.8. N8 örneğinin alem düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.....	76
Şekil 4.9. N1 örneğinin Lactobacillales düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	78
Şekil 4.10. N5 örneğinin Lactobacillales düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu	78
Şekil 4.11. N6 örneğinin Lactobacillales düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	79
Şekil 4.12. N8 örneğinin Lactobacillales düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	79
Şekil 4.13. Örneklerin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.....	82

Şekil 4.14. N1 örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	82
Şekil 4.15. N2 örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	83
Şekil 4.16. N3 örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	83
Şekil 4.17. N4 örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	84
Şekil 4.18. N5 örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	84
Şekil 4.19. N6 örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	86
Şekil 4.20. N7 örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	87
Şekil 4.21. N8 örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	87
Şekil 4.22. N9 örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	88
Şekil 4.23. N10 örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	88
Şekil 4.24. Örneklerin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	89
Şekil 4.25. N1 örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	91
Şekil 4.26. N2 örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	92
Şekil 4.27. N3 örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	93
Şekil 4.28. N4 örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	94
Şekil 4.29. N5 örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	95
Şekil 4.30. N6 örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	98
Şekil 4.31. N7 örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	98
Şekil 4.32. N8 örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	99
Şekil 4.33. N9 örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	100
Şekil 4.34. N10 örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	101
Şekil 4.35. Örneklerin Lactobacillus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	102
Şekil 4.36. N1 örneğinin Lactobacillus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	104
Şekil 4.37. N2 örneğinin Lactobacillus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	105
Şekil 4.38. N3 örneğinin Lactobacillus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	106
Şekil 4.39. N4 örneğinin Lactobacillus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	107
Şekil 4.40. N5 örneğinin Lactobacillus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	108
Şekil 4.41. N6 örneğinin Lactobacillus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	111
Şekil 4.42. N7 örneğinin Lactobacillus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	112
Şekil 4.43. N8 örneğinin Lactobacillus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	113
Şekil 4.44. N9 örneğinin Lactobacillus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	114
Şekil 4.45. N10 örneğinin Lactobacillus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.	115
Şekil 4.46. Örneklerin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonları.	116

Şekil 4.47. N1 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu. ..	118
Şekil 4.48. N2 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu. ..	119
Şekil 4.49. N3 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu. ..	120
Şekil 4.50. N4 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu. ..	121
Şekil 4.51. N5 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu. ..	122
Şekil 4.52. N6 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu. ..	124
Şekil 4.53. N7 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu. ..	125
Şekil 4.54. N8 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu. ..	126
Şekil 4.55. N9 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu. ..	127
Şekil 4.56. N10 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu. ..	128
Şekil 4.57. MALDI-TOF MS ile D- Süt ürünü örnekleri (N1, N2, N3, N4), E- Ekipman yüzey örnekleri (N6, N7, N8, N9, N10) ve N5- Beyaz peynir örneğinde tanımlanan mikroorganizmaların dağılımı.....	130
Şekil 4.58. MALDI MALDI-TOF MS ile D- Süt ürünü örnekleri (N1, N2, N3, N4), E- Ekipman yüzey örnekleri (N6, N7, N8, N9, N10) ve N5- Beyaz peynir örneğinde tanımlanan mikroorganizmaların shotgun metagenomik dağılımı.	130
Şekil Ek 2.1 HUF18ZN1M1002 izolatının MALDI-TOF MS spektrumu (<i>Lactococcus lactis</i> , %99,9).	156
Şekil Ek 2.2. HUF19ZN1R1001 izolatının MALDI-TOF MS spektrumu (<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , %99,9).	157
Şekil Ek 3.3. HUF19ZN1K1001 izolatının MALDI-TOF MS spektrumu (<i>Enterococcus faecalis</i> , %99,9).	158
Şekil Ek 3.1. N1 (Çiğ süt) örneğinin Staphylococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.....	159
Şekil Ek 3.2. N5 (Beyaz peynir) örneğinin Staphylococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.....	160
Şekil Ek 3.3. N6 (Tanker) örneğinin Staphylococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.....	161
Şekil Ek 3.4. N8 (Karıştırıcı) örneğinin Staphylococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.....	162

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Beyaz peynir mikrobiyolojik kriterler.....	18
Çizelge 2.2. Beyaz peynir starter kültürü olarak kullanılabilceği bildirilen mikroorganizmalar	23
Çizelge 2.3. Lactococcus, Streptococcus, Lactobacillus ve Enterococcus cinsi laktik asit bakterilerinin taksonomik sınıflandırması.....	25
Çizelge 3.1. Örnekleme noktaları ve işletme elemanları	41
Çizelge 3.2. Hedeflenen laktik asit bakterisi, kullanılan seçici besiyeri ve inkübasyon koşulları.....	42
Çizelge 3.3. Kodlama sistemi.....	43
Çizelge 3.4. Hedeflenen laktik asit bakterileri ve ayırım testleri	44
Çizelge 3.5. FastQC programı özellikleri.....	51
Çizelge 4.1. M17 Agardan izole edilen LAB olduğu değerlendirilen izolatların makroskopik ve mikroskopik özellikleri ile Gram ve Katalaz reaksiyonu sonuçları.	53
Çizelge 4.2. MRS Agardan izole edilen LAB olduğu değerlendirilen izolatların makroskopik ve mikroskopik özellikleri ile Gram ve Katalaz reaksiyonu sonuçları.	56
Çizelge 4.3. KAA Agardan izole edilen LAB olduğu değerlendirilen izolatların makroskopik ve mikroskopik özellikleri ile Gram ve Katalaz reaksiyonu sonuçları.	59
Çizelge 4.4. M17 Agar'dan izole edilen LAB olmadığı değerlendirilen izolatların makroskopik ve mikroskopik özellikleri ile Gram ve Katalaz reaksiyonu sonuçları.	61
Çizelge 4.5. MRS Agar'dan izole edilen LAB olmadığı değerlendirilen izolatların makroskopik ve mikroskopik özellikleri ile Gram ve Katalaz reaksiyonu sonuçları.	62
Çizelge 4.6. M17 Agardan izole edilen izolatların MALDI-TOF MS tanımlama sonuçları.	63
Çizelge 4.7. MRS Agardan elde edilen izolatların MALDI-TOF MS tanımlama sonuçları.	64

Çizelge 4.8. KAA Agardan izole edilen izolatların MALDI-TOF MS tanımlama sonuçları.....	65
Çizelge 4.9. Schilinger ve Lücke (1987)'ye göre laktik asit bakterisi olmadığı değerlendirilen izolatların MALDI-TOF MS ile tanımlama sonuçları.....	67
Çizelge 4.10. MALDI-TOF MS sonuçlarına göre örneklerden izole edilen LAB sayıları.	131
Çizelge 4.11. MALDI-TOF MS sonuçlarına göre örneklerden izole edilen LAB olmayan mikroorganizmalar.	136
Çizelge 4.12. Örneklerde tanımlanan bazı mikroorganizmaların <i>BacDive</i> veritabanı bilgileri.....	136
Çizelge Ek 1.1 İstatistiksel Bilgiler.	155

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

g	Gram
mL	Mililitre
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
bp	Baz çifti
Mbp	Mega baz çifti

Kısaltmalar

MALDI-TOF MS	Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon- Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)
GMP	Glikomakropeptit
MRS	Man Rogosa Sharp
LAB	Laktik Asit Bakterileri
KAA	Kanamisin Azid Esculin Agar
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
RNA	Ribo Nükleik asit
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
NGS	Next Generation Sequencing
Kob	Koloni oluşturan birim
CHCA	α-siyano-4-hidroksisinamik asit
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
Ca ²⁺	Kalsiyum
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit

TEPGE	Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼
T¼IK	T¼rkiye İstatistik Kurumu
NGS	Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing)

1. GİRİŞ

Beyaz peynir mikrobiyotası, peynir üretim sürecinde önemli bir rol oynar ve peynirin kendine özgü tat ve koku gibi organoleptik özelliklerinin oluşmasında etkilidir (Jonnala ve ark., 2018). Endüstride beyaz peynir üretimi için kullanılan laktik asit bakterilerinden oluşan starter kültür karışımları, sütte asitlik geliştirmenin yanında beyaz peynirin tat ve koku bileşiklerini oluşturmada görev alırlar. Endüstriyel beyaz peynir üretiminde çiğ süte uygulanan ısı işlem ile çiğ sütte bulunan mikroorganizmaların tamamının yok edilmediği bildirilmiştir (Kable ve ark., 2016). Bunun yanında beyaz peynir üretim işletmelerinde peynirin temas ettiği ekipmandan peynire çeşitli mikroorganizmalar geçebilmektedir. Bu sebeple peynir mikrobiyotasına starter kültürün yanında peynire işlenen sütün mikrobiyotası ve işletme ekipmanının taşıdığı mikrobiyel yükün de etkisi olabileceği bildirilmiştir (Wolfe ve ark., 2014; Stellato ve ark., 2015). Starter kültür olmayan ve çiğ süt ve/veya çevresel kaynaklardan mikrobiyotaya katılan laktik asit bakterilerinin de beyaz peynirin organoleptik özellikleri ve besinsel içeriğinin gelişimine katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (Fox ve ark., 2000; Wolfe ve ark., 2014;).

Mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan klasik kültürel yöntemlerin yanı sıra son yıllarda öne çıkan moleküler yöntemler ve DNA dizileme teknolojilerinde yaşanan gelişmeler mikrobiyota çalışmalarının daha doğru ve kesin bir şekilde yapılabilmesine olanak sağlamıştır (Jonnala ve ark., 2018; Escobar-Zepeda ve ark., 2020). Metagenomik, çevresel bir örnekte bulunan tüm genomların doğrudan izole edilerek genetik analizinin gerçekleştirilmesi olarak tanımlanabilir (Escobar-Zepeda, 2015; Chiu ve ark., 2019). Genetik materyalin dizilenmesiyle gerçekleştirilen metagenomik analizlerde yeni nesil sekanslama yöntemleri kullanılmaktadır. Metagenomik çalışmalar sonucu yüksek boyutlu dizi verileri elde edildiği için bu yönetime yüksek çıktılı dizileme teknolojileri (HTS, High Throughput Sequencing) de denmektedir (Ercolini, 2013). Metagenomik analizler ile elde edilen bu yüksek çıktılı diziler ham data olarak adlandırılmakta ve biyoinformatik araçlar ile özel yazılım ve veri tabanları kullanılarak anlamlı verilere dönüştürülmektedir (Ondov ve ark., 2011).

Metagenomik analizlerin ortaya çıkması, mikroorganizmaların tanımlanmasında önemli bir adım olmuştur. Saf kültürlerin izolasyonuna dayalı tanımlama tekniklerinin aksine

metagenomik analizler kültüre edilemeyen mikroorganizmaların da tanımlanabilmesine olanak sağlamaktadır (Escobar-Zepeda, 2015). Beyaz peynir açısından düşünüldüğünde bu yöntemler; süt, peynir, peynir üretiminin gerçekleştirildiği ortam gibi faktörlerin mikrobiyel kompozisyonlarının belirlenmesini ve bunların son ürün beyaz peynir mikrobiyotasına ve peynirin özelliklerine olan olası katkılarının incelenmesini mümkün kılmaktadır (Ercolini, 2013; Stellato ve ark., 2015; Jonnala ve ark., 2018).

Bu çalışmanın amacı, omik teknolojiler ile beyaz peynir üretim sürecine ilişkin süt, peynir ve çevre mikrobiyotasının dinamikleri hakkında laktik asit bakterileri açısından kapsamlı genel bir bakış sağlamaktır. Bu amaçla, bir beyaz peynir üretim hattından alınan süt ürünü ve çevresel örneklerin mikrobiyel kompozisyonunun toplam DNA'ya dayalı shotgun metagenomik dizileme ile belirlenmesi ve kültüromik yaklaşım ile mikroorganizmaların izolasyonu ve tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Kültüromik, seçici besiyerlerinde farklı ortam şartlarında geliştirilen ve saf kültür olarak elde edilen izolatların Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon- Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS) ile tanımlanmasına olanak sağlayan bir yaklaşımdır (Bizzini ve ark., 2010; Garcia ve ark., 2016). Burada bir mikrobiyota çalışmasında kültüre dayalı ve kültürden bağımsız iki yöntemin karşılaştırılması mümkün olmuştur. Beyaz peynirin üretimi süresince çiğ süttten son ürüne kadar gerçekleşen mikrobiyel dinamizme ışık tutulması ve çevresel örneklerin bu dinamizme katkısının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beyaz Peynir

Peynir, sütün enzimler ya da organik asitler kullanılarak pıhtılaştırılması, oluşan pıhtının baskılanarak peyniraltı suyunun ayrılmasıyla oluşan, farklı yağ oranlarında ve farklı sertliklerde olabilen, çeşidine göre değişen renk, tat ve koku özelliklerine sahip bir süt ürünüdür. Dünyada 1000'in üzerinde, Türkiye'de ise 50'ye yakın peynir çeşidinin olduğu bildirilmiştir (Ateş ve ark., 2001; Togay ve ark., 2020). TEPGE Süt ve Süt Ürünleri Durum Tahmin Raporu ve Ulusal Süt Konseyi Süt Raporuna göre ülkemizde en çok tüketilen ve pazar payı en yüksek olan peynir çeşidi beyaz peynirdir (Anonim, 2017; Anonim, 2018). TÜİK Süt ve Süt Ürünleri Üretim İstatistikleri 2020 Mart ayı raporuna göre Türkiye'de inek sütünden üretilen peynir miktarı bir önceki yılın bahsedilen ayına kıyasla %12,2 artış göstererek 63300 ton, manda, koyun ve keçi sütlerinden üretilen diğer peynirlerin üretimi ise %14,8 azalarak 2700 ton olmuştur (Anonim, 2020). Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği (Tebliğ No: 2015/6) uyarınca beyaz peynir “Hammaddenin peynir mayası kullanılarak pıhtılaştırılması ile elde edilen telemenin tekniğine uygun olarak işlenmesiyle üretilen, üretim aşamalarındaki farklılıklara göre taze veya olgunlaştırılmış olarak tanımlanabilen, çeşidine özgü karakteristik özellikler gösteren salamuralı peynir” olarak tanımlanmaktadır. Çizelge 2.1'de Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği (Tebliğ No: 2009/68) uyarınca beyaz peynirin uyması gereken mikrobiyolojik kriterlere yer verilmiştir.

Çizelge 2.1. Beyaz peynir mikrobiyolojik kriterler

Gıda	Mikroorganizmalar	Numune alma planı		Limitler ⁽¹⁾	
		n	N	m	M
Peynir (eritme peynir hariç diğer tüm peynirler)	Enterobacteriaceae	5	2	10 ³	10 ⁴
	<i>S. aureus</i> ⁽⁴⁾	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	0/25 g-mL	
	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	0/25 g-mL	
	<i>E. coli</i> O157:H7	5	0	0/25 g-mL	

⁽¹⁾ : Aksi belirtilmedikçe limit kob/g-mL olarak değerlendirilir.

⁽⁴⁾ : Koagülaz pozitif stafilokoklar. n: Analize alınacak numune sayısını

c: “M” değeri taşıyabilecek en fazla numune sayısını

m: (n – c) sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla değeri

M: “c” sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla değeri ifade etmektedir.

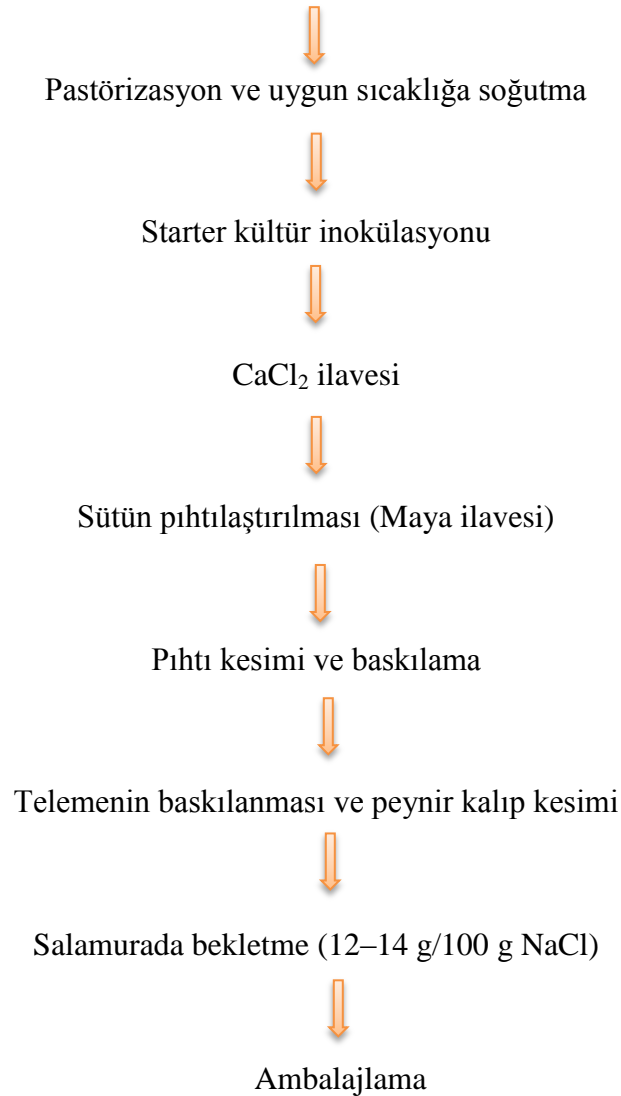
2.1.1. Endüstriyel Beyaz Peynir Üretimi

Beyaz peynirin kalitesi peynire işlenen sütün kimyasal kompozisyonuyla yakından ilişkilidir. Bu sebeple süt kimyasal ve mikrobiyolojik açıdan iyi kalitede olmalıdır (Hayaloğlu ve ark., 2002). Buna göre işletmeye gelen süt; antibiyotik, deterjan ve kimyasal kalıntı içermemeli, mastitisli olmamalı, kolostrum içermemeli, laktasyonun ilk ve son safhalarında elde edilmemelidir. Kimyasal bileşimi normal olmayan, özellikle mastitisli hayvanlardan elde edilen sütlerin serum proteini içeriği yüksek, kazein içeriği ise düşüktür. Düşük kazein içeriğine sahip süttten üretilen peynirin randımanı düşmekte ve peynirde yumuşama problemi oluşmaktadır (Üçüncü, 1999). Mikrobiyel açıdan peynire işlenen süt, koliform, Clostridium ve Bacillus cinsi bakterileri içermemelidir (Hayaloğlu ve ark., 2002).

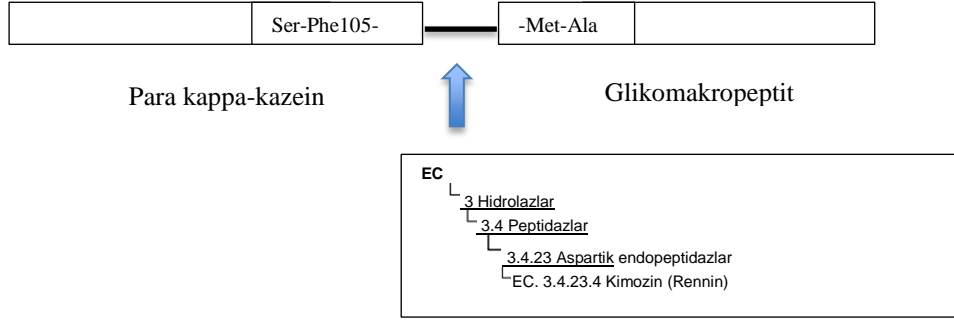
Endüstriyel beyaz peynir üretiminde, işletmeye gelen çiğ süt kalite kontrolünden geçtikten sonra çiğ süt tanklarına alınır. Süt, üretime alınmadan önce ilk olarak basit filtreler ile gözle görülen kirliliklerden, daha sonra merkezkaç kuvveti ile çalışan seperatörlerle gözle görünmeyen yabancı maddelerden ayrıştırılır. Temizlenen sütün protein ve yağ oranı ayarlanarak sütün standardizasyonu yapılır. Daha sonra süt yüksek basınç altında 60-65°C sıcaklıkta çok ince filtrelerden geçirilerek homojenizasyonu sağlanır. Homojenizasyon ile sütün içerdiği yağ globüllerinin çapı eşitlenir. Ön işlemlerin ardından süt 72-75°C'de 15 saniye ısıl işleme maruz bırakılır ve hızlı bir şekilde 28-30°C'ye soğutulur. Sütün bu sıcaklığa soğutulmasının sebebi beyaz peynir starter kültürlerinin mezofilik özellikte laktik asit bakterilerinden oluşması ve bu sıcaklıklarda optimum gelişmesidir (Akın ve ark., 2003). Starter kültür eklenmesiyle sütün asitliği artar. Starter eklendikten sonra süte CaCl₂ eklenir. Bunun sebebi pastörizasyonda yüksek sıcaklığın etkisiyle ayrılan Ca²⁺'nın yapıya tekrar kazandırılmasıdır. Starter kültürün etkisiyle pH 5.5'e geldiğinde süte rennet enzimi (peynir mayası) ilave edilir. Bu pH pıhtılaşmayı sağlayan rennet enziminin optimum aktivite gösterdiği pH'tır. Kazeinin dört alt biriminden biri olan kappa kazeinin sütün pıhtılaşmasında önemli bir yeri vardır. Rennet enzimi kappa kazeinin 105. amino asidi fenilalanin ve 106. amino asidi metiyonin arasındaki bağı kırar (Şekil 2.2). Kırılan zincirde hidrofobik olan kısım para kappa-kazein (para kappa-casein) yapıdan ayrılır ve pıhtıyı oluşturur. Hidrofilik kısım olan glikomakropeptit (GMP) ise serum kısımda çözünerek yapıdan ayrılır. Pıhtı oluştuktan sonra 1 cm³'lük küpler halinde kırılıp

baskılanarak fazla suyunu bırakması sağlanır. Pıhtı baskılanırken cendere bezine sarılır ve üzerine ağırlık uygulanır. Cendere bezi beyaz peynirin bir yüzeyinde olan pütürlü şeklin oluşmasını sağlar. Pıhtının fazla suyunun alınmasıyla oluşan teleme 7 cm³'lük küpler halinde kesilir ve 24 saat salamurada (12–14 g/100 g NaCl) bekletilir (Topçu ve ark., 2005; Hayaloğlu ve ark., 2002). Salamurada bekletildikten sonra beyaz peynir, tercihe bağlı olarak olgunlaştırılmadan tüketime sunulabilmektedir. Salamuranın ardından taze beyaz peynir ambalajlanarak yine salamura (6 g/100 g NaCl) içinde satışa sunulur. Olgunlaştırılarak tüketime sunulan beyaz peynirin olgunlaştırılması ise 4-8°C'de 60-90 gün yapılmaktadır (Topçu ark., 2005).

Sütün temizlenmesi, standardizasyonu ve homojenizasyonu



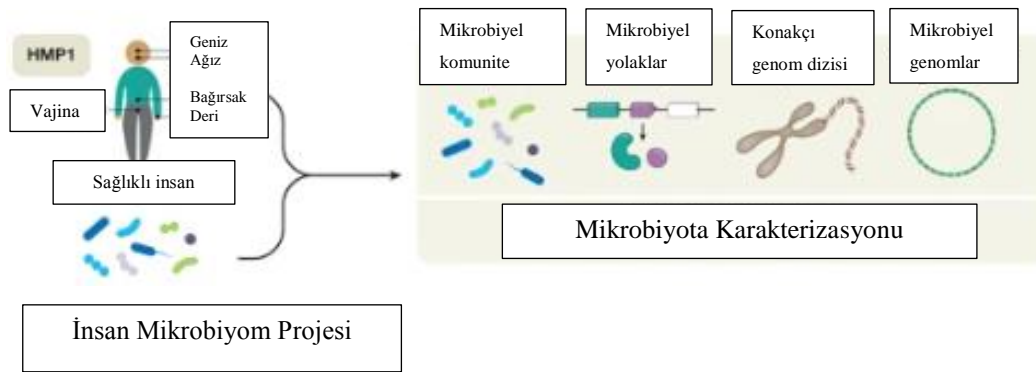
Şekil 2.1. Beyaz peynir üretimi (Üçüncü, 2015).



Şekil 2.2. Kazein zincirinin kırılması.

2.1.2. Beyaz Peynir Mikrobiyotası

Mikrobiyota belirli ortamda bulunan mikrobiyel topluluğun tamamına verilen isimdir (Liu, 2016). Mikrobiyom tanımı, ilk kez Nobel ödüllü mikrobiyolog Joshua Lederberg tarafından 2001 yılında yapılmıştır (Prescott, 2017). Buna göre, insan vücudunda bulunan kommensal, simbiyotik ve patojen mikroorganizmalardan oluşan ekosistemi ifade eden terim “mikrobiyom” olarak tanımlanmıştır (Lederberg, 2001). Daha sonra mikrobiyota ve mikrobiyom terimleri insan ve mikrobiyomu arasındaki etkileşimi açıklamayı hedefleyen İnsan Mikrobiyom Projesi (HMP) tarafından tekrar açıklanmıştır (Proctor ve ark., 2019) (Şekil 2.3). Günümüzde mikrobiyom, belirli bir ortamda bulunan bakteri, arkea, küf ve mayalardan oluşan mikrobiyel topluluğun oluşturduğu mikrobiyotanın toplam genomu olarak ifade edilmektedir (Turnbaugh ve ark., 2007; Liu, 2016; Knight ve ark., 2018).



Şekil 2.3. İnsan Mikrobiyom Projesinin ilk aşaması (HMP1) (Proctor ve ark., 2019)

Mikrobiyotanın bulunduğu konakçı ortamı insan, hayvan ya da bitki olabileceği gibi çevresel bir örnek de olabilir (Liu, 2016). Bu açıklamadan hareketle, bir peynir çeşidinin taşıdığı mikroorganizma topluluğu “peynir mikrobiyotası” olarak tanımlanabilir. Peynir mikrobiyotası, çok büyük oranda, kullanılan starter kültüre göre

şekillenmektedir (Ercolini, 2004). Süt mikrobiyotası, peynir yapımında tüm süreçte önemli bir rol oynar ve peynire özgü lezzet ve doku gelişimine katkıda bulunur (Tilocca ve ark., 2020).

Starter kültürler ürüne istenilen tat, koku, aroma ve yapı gibi özellikleri kazandırmak amacı ile kullanılan ve bilinen özelliklere sahip karışık mikroorganizma kültürleridir. Bunun yanında, peynir üretiminde işletmeye gelen çiğ sütün taşıdığı mikroorganizmalar da peynir mikrobiyotası ile ilişkilidir. Çünkü çiğ sütte bulunan mikroorganizmaların tamamı pastörizasyon işlemi ile yok edilememektedir (Kable ve ark., 2016). Bu faktörlerin yanında peynir üretim işletmesinde peynirin temas ettiği ekipmandan peynire çeşitli mikroorganizmalar geçebilmektedir. Bu yüzden beyaz peynir mikrobiyotasını sadece eklenen starter kültür değil çiğ süt mikrobiyotası ve işletme ekipmanlarının taşıdığı mikroorganizmalar gibi faktörler de etkilemektedir (Stellato ve ark., 2015).

Peynir mikrobiyotası, başlatıcı birincil mikroflora ve ikincil mikroflora olarak ikiye ayrılır (Tunail, 2009). Birincil mikroflora olan laktik asit bakterileri laktik asit fermantasyonuyla sütün asitliğini arttırırken olgunlaşma sürecinde de sahip oldukları enzimler sayesinde peynirin görünüş, tat, koku, tekstür gibi karakteristik özelliklerinin oluşumunu sağlarlar. İkincil mikroorganizmalar ise olgunlaşma sürecinde çeşitli organik asitlerin oluşumuna önemli katkı sağlarlar. İkincil mikroflora peynir yüzeyinde ve/veya içinde gelişebilen başlatıcı kültür dışı laktik asit bakterileri, maya ve küflerden oluşabilmektedir (Beresford ve ark., 2001). Günümüzde endüstriyel olarak üretilen beyaz peynirler genellikle taze peynir olarak olgunlaştırılmadan tüketime sunulmaktadır. Bu sebeple beyaz peynirin ikincil mikroflorası bulunmamaktadır (Tunail, 2009). Beyaz peynirin mikrobiyotasının oluşumunda ise starter kültür olarak kullanılan mikroorganizmaların yanında çevresel mikrobiyotanın, starter kültür olmayan mikroorganizmaların da etkisinin olabileceği bildirilmiştir (Jonnala ve ark., 2018). Literatür incelendiğinde, beyaz peynirde baskın tür olarak *Lactococcus lactis* ve *Streptococcus thermophilus*'un bulunduğu görülmektedir. Bu mikroorganizmalar özellikle peynirin olgunlaşmasının ilk aşamalarında daha belirgindir. Beyaz peynirde önemli tür olarak bildirilen diğer mikroorganizmalar *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium*'dur. *Lactobacillus fermentum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Leuconostoc*

mesenteroides subsp. *dextranicum* ve *Leu. lactis* ve türleri de beyaz peynirde ağırlıklı olarak bulunan bakterilerdir (Karakuş ve ark., 1992; Gürsel ve ark., 2003; Çıtak ve ark., 2004). Ülkemizde beyaz peynir starter kültürü ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde özellikle *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ve *Lc. lactis* subsp. *lactis*'in, bunların yanında *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *St. thermophilus*, *L. helveticus* ve *L. plantarum* bakterilerinin beyaz peynir starter kültürü olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Beyaz peynir starter kültürü olarak kullanılabileceği bildirilen mikroorganizmalar

Starter kültür	Kaynak
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Uysal, 1996
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>L. casei</i> <i>L. plantarum</i>	Üçüncü, 1999
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>L. helveticus</i>	Gürsoy ve ark., 2001
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Dağdemir, 2001
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Hayaloğlu ve ark., 2002
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Tunail, 2009
Mezofilik kültür+ <i>E. faecium</i> EF031 (ek kültür) Mezofilik kültür+ <i>E. faecium</i> M74 (ek kültür)	Bulat, 2011
<i>Lc. lactis</i> <i>E. faecium</i> <i>L. plantarum</i>	Ertürkmen ve ark., 2015
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis/cremoris</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>St. thermophilus</i>	Chr. Hansen, 2014
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>	Kesenkaş, 2015
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>St. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	Danisco, 2019
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>St. thermophilus</i>	Natural Food Culture, 2019

2.2. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri, gıda endüstrisinde birçok fermente gıda ürününün üretiminde kullanılan önemli bakterilerdir. Laktik asit bakterileri, filogenetik olarak Lactobacillales takımına ait, 6 aile, 30'dan fazla cins ve 300'den fazla türü barındıran bir bakteri grubudur (Endo ve ark., 2019). Lactococcus, Lacobacillus, Enterococcus, Streptococcus, Leuconostoc ve Pediococcus cinsleri başlıca laktik asit bakterileridir. Lactococcus, Streptococcus, Lactobacillus ve Enterococcus cinsi laktik asit bakterilerinin taksonomik sınıflandırması Çizelge 2.3'te verilmiştir (KEGG GENOME Database, 2020). Zheng ve arkadaşları tarafından 2020 yılı Nisan ayında yayımlanan bir çalışmada, laktik asit bakterilerinden Lactobacillaceae ve Leuconostocaceae ailelerinin sınıflandırılması tüm genom dizileme teknikleriyle yeniden değerlendirilmiştir. Çalışmanın çıktısı olarak Lactobacillus cinsinin 25 cins ayrılması önerilmiştir. Bunlar daha önceden de var olan fakat çalışmada tanımı tekrar yapılan Lactobacillus ve Paralactobacillus cinsleri ile 23 yeni cins; Levilactobacillus, Lentilactobacillus, Limosilactobacillus, Ligilactobacillus, Furfurilactobacillus, Amylolactobacillus, Secundilactobacillus, Holzapfelia, Loigolactobacillus, Dellaglioia, Bombilactobacillus, Companilactobacillus, Lapidilactobacillus, Paucilactobacillus, Agrilactobacillus, Lacticaseibacillus, Latilactobacillus, Lactiplantibacillus, Fructilactobacillus, Acetilactobacillus, Apilactobacillus, Liquorilactobacillus ve, Schleiferilactobacillus olmuştur. Tanımlanan bu yeni cinslerin temsil ettiği eski Lactobacillus cinsi bakterilerin sadece cins isimleri değişmiş olup tür ve suş isimleri aynı kalmıştır (Zheng ve ark., 2020). Çizelge 4.12'de bu çalışma ile yeniden isimlendirilen bakterilere yer verilmiştir.

Laktik asit bakterileri Gram pozitif, *Sporlactobacillus inulinus* dışında spor oluşturmayan, anaerobik, aerobik ya da fakültatif aerobik olan, kok ya da çubuk şekilli, karbonhidrat metabolizmasının ana fermentasyon ürünlerinden biri olan laktik asiti üreten oldukça değerli mikroorganizmalardır (Temiz, 1989; Tunail, 2009). Bu bakteriler aynı zamanda, asidi tolere edebilen, katalaz ve oksidaz negatif olan, nitratı redükte edemeyen mikroorganizmalardır (Adams ve Moss, 2004). Laktik asit bakterileri düşük guanin ve sitozin (G+C) oranına (%35-53) sahiptirler ve genom büyüklükleri genel olarak 1.8-3.4 Mbp arasında değişmektedir (Wyszynska ve ark., 2015, Yılmaz ve ark., 2015).

Çizelge 2.3. Lactococcus, Streptococcus, Lactobacillus ve Enterococcus cinsi laktik asit bakterilerinin taksonomik sınıflandırması

	Lactococcus	Streptococcus	Lactobacillus	Enterococcus
Alem	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Şube	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes
Sınıf	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli
Takım	Lactobacillales	Lactobacillales	Lactobacillales	Lactobacillales
Aile	Streptococcaceae	Streptococcaceae	Lactobacillaceae	Enterococcaceae
Cins	Lactococcus	Streptococcus	Lactobacillus	Enterococcus

Laktik asit bakterileri gelişmek için karbonhidratlar, amino asitler, vitamin, mineral ve bazen de yağ asitleri ve peptitler gibi zengin besinlere ihtiyaç duymaktadırlar. Bundan dolayı da besin içeriği yüksek olan ortamlarda bulunurlar. Bunlara, gastrointestinal sistem; mide ve bağırsak, vajinal yollar, ağız boşluğu, bitki yüzeyleri, silaj ve süt ve süt ürünleri gibi çok çeşitli ortamlar örnek olarak verilebilmektedir (Endo ve ark., 2019).

Laktik asit bakterileri buldukları ortamın içeriğindeki hegzosları fermente ederek laktik asit oluştururlar ve fermantasyon sonucu ürettikleri son ürüne göre iki gruba ayrılırlar. Hegzoslardan sadece laktik asit (%90-100) oluşturanlar homofermantatif laktik asit bakterileri, laktik asidin (%50) yanısıra etanol, asetat ve CO₂ oluşturanlar ise heterofermantatif laktik asit bakterileridir.

Laktik asit fermantasyonu sonucu ortaya çıkan laktik asit, asetik asit, asetaldehit ve diasetil gibi aromatik bileşikler sayesinde yoğurt, peynir çeşitleri, kefir, ekşi krema, fermente çiğ sucuk, tarhana gibi kendine özgü tadı ve aroması olan ürünler elde edilmektedir. Bundan dolayı seçilen bazı laktik asit bakterisi suşlarından starter kültürler, aroma geliştirici kültürler ve probiyotik kültürler üretilmektedir. Starter kültür özelliği gösteren laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik asit ile ortamın asitliği artar ve asidi tolere edemeyen mikroorganizmaların bu ortamda yaşaması güçleşir. Laktik asit bakterileri asidi tolere edebildikleri için bu ortamda rekabetçi konumdadır ve böylelikle patojen ve diğer mikroorganizmaların inhibe edilmesini sağlarlar. Bunun yanında laktik asit bakterilerinin metabolitlerinden olan hidrojen peroksit, diasetil, bakteriyosin ve

amonyak gibi maddeler diğer mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal özellik göstermektedir. Böylece bir gıda maddesinde laktik asit bakterilerinin varlığı ile istenmeyen mikroorganizmaların inhibe edilmesi sağlanabilmektedir.

Laktik asit bakterileri gıda endüstrisinde önemli bir yeri olan fermente gıdaların üretilmesinde starter kültür olarak kullanılmaları, asitlik ve aroma geliştirici olmaları, antimikrobiyal aktiviteleri ve probiyotik olmaları gibi özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde çok önemli bir yer tutmaktadırlar.

2.3. Laktik Asit Bakterilerini Tanımlama Yöntemleri

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması süt endüstrisi için büyük önem arz etmektedir. Laktik asit bakterilerinin tanımlanması ile süt ve süt ürünlerinin mikrobiyotası hakkında edinilen bilgiler starter kültür ve peynir üretim teknolojilerinin geliştirilmesinde kullanılarak süt endüstrisine ekonomik anlamda katkı sağlayabilmektedir. Ayrıca süt ve ürünlerinin mikrobiyotasının belirlenmesi, süt ürünlerinin kalitatif ve duyuşal özelliklerinin ve güvenilirliğinin kontrol edilmesi için oldukça önemlidir (Tilocca ve ark., 2020).

100 yılı aşkın süredir mikrobiyolojide, mikroorganizmaların katı besiyeri kullanılarak izole edilmesi ve uygulanan bazı testlerle bu izolatların morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin belirlenmesiyle tanımlanması esasına dayalı klasik kültürel yöntemler kullanılmaktadır (Ottman ve ark., 2012; Yarza ve ark., 2014; Escobar-Zepeda ve ark., 2015). Mikroorganizmalar ile ilgili çalışmalar, 1676 yılında Leeuwenhoek'un ağız mikroorganizmalarıyla ilgili raporundan günümüzde kullanılan moleküler yöntemler ile tanımlama çalışmalarına kadar uzun bir yol kat etmiştir. Mikroorganizmaların izolasyonu ile ilgili çalışmalar ilk olarak bilim insanlarının patates dilimleri ve jelatin gibi katı besi ortamlarında mikroorganizmaları kültüre etmeleriyle başlamıştır. İzolasyon yöntemlerinin bulunması mikroorganizmaların "Görünmeyen organizmalar" olarak adlandırdığı dönemlerde mikroorganizmaların keşfi, mikroskop altında gözlemlenebilmesi ve onların fizyolojilerinin anlaşılabilmesi adına ilk basamak olmuştur (Escobar- Zepeda ve ark., 2015).

1970'lerin sonunda ribozomal RNA genlerinin moleküler markırlar olarak kullanılabilceği görüşünün ortaya atılması ve bununla birlikte Sanger sekanslamanın ortaya çıkışı mikroorganizmaların tanımlanmasında bir devrim yaratmıştır (Woese ve Fox,1977; Sanger ve ark., 1977; Escobar- Zepeda ve ark., 2015). Ardından Polimeraz zincir reaksiyonu, rRNA genlerinin klonlanması ve dizilenmesi, Denature edici Gradient Jel Elektrofrezisi (DGGE) gibi moleküler yöntemler mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılmaya başlanmıştır (Yılmaz, 2015; Ercolini, 2013). Metagenomik analizlerin ortaya çıkması, mikroorganizmaların tanımlanmasında önemli bir adım olmuştur. Saf kültürlerin izolasyonuna dayalı tanımlama tekniklerinin aksine metagenomik analizler kültüre edilemeyen mikroorganizmaların da tanımlanabilmesine olanak sağlamaktadır (Escobar-Zepeda, 2015).

2.3.1. Laktik Asit Bakterilerinin Klasik Kültürel Yöntemlerle Tanımlanması

Klasik kültürel yöntemlerle tanımlamada ilk aşama mikroorganizmaların saf kültür halinde izole edilmeleridir. Bunun için uygun seçici besiyerlerinden yararlanılmaktadır (Mannu ve ark., 2000). Laktik asit bakterilerinin geliştirilmesi ve izolasyonunda MRS Agar ve MRS Broth, M17 Agar ve M17 Broth, Kanamycin Esculin Azide Agar gibi yüksek besleyici özelliğe sahip seçici besiyerleri kullanılmaktadır (Rogaso ve ark., 1953; Sharpe, 1979). Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında ilk olarak seçici besiyerinden uygun makroskopik morfolojiye sahip koloniler seçilerek saf kültür olarak elde edilir. Ardından izolatların mikroskobik morfolojileri incelenerek kaydedilir. Sonrasında izolatların Gram reaksiyonu ve katalaz aktiviteleri belirlenmektedir. Sporsuz ubuk veya kok şeklinde, Gram pozitif ve Katalaz negatif özellik gösteren izolatlar laktik asit bakterileri olarak belirlenmektedir (Schillinger ve Lücke, 1987).

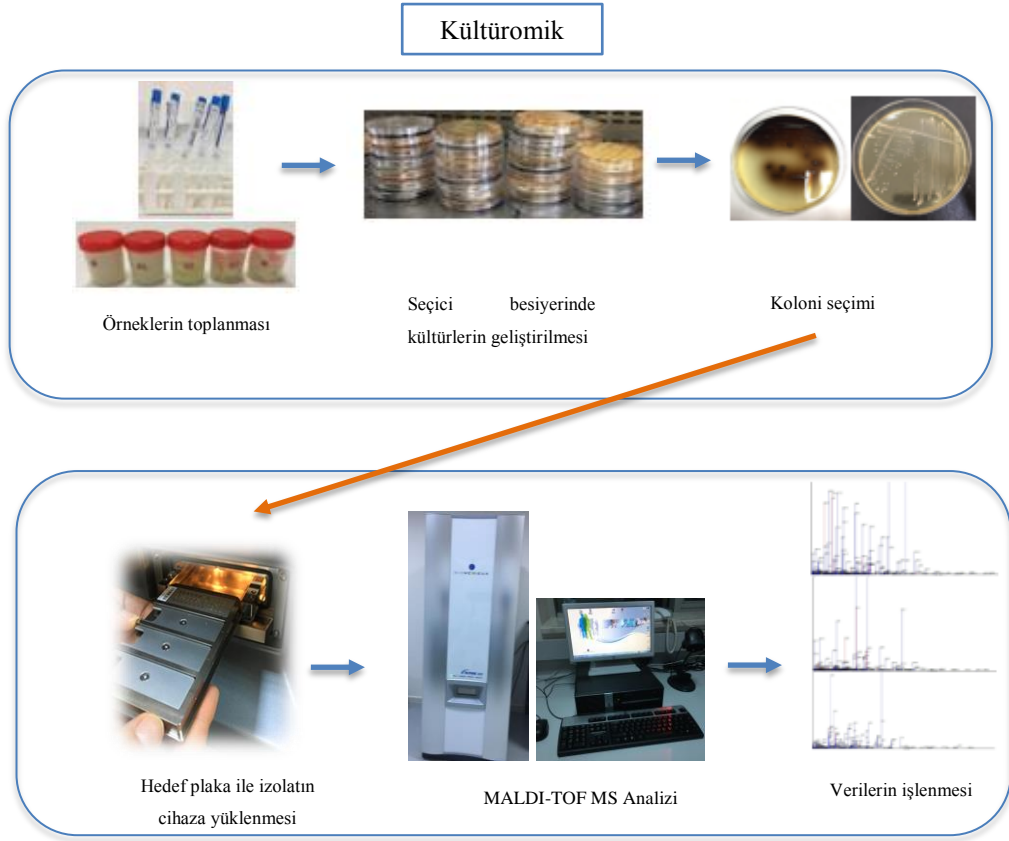
Klasik kültürel yöntemlerde bakterilerin cins düzeyinde tanımlanması amacıyla bir takım biyokimyasal ve fizyolojik testler uygulanmaktadır (Schillinger ve Lücke, 1987). Bunlara; farklı sıcaklık ve pH değerleri ile farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme, glukozdan gaz oluşturma, karbonhidrat fermentasyon testleri, antibiyotik duyarlılığı, arjininden amonyak üretimi, indol, Voges-Proskauer, jelatin hidrolizi ve üreaz testleri, sukrozdan dekstran oluşturma gibi testler örnek gösterilebilir (Schlinger ve Lücke, 1987).

2.3.2. Kültüromik yaklaşımı ile Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

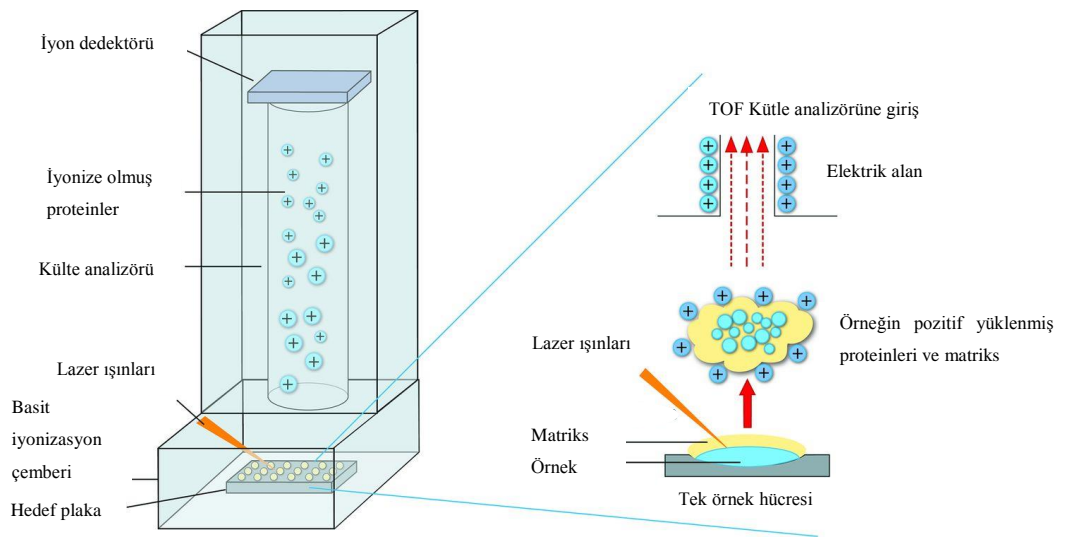
Kültüromik, seçici besiyerlerinde farklı ortam şartlarında geliştirilen ve saf kültür olarak elde edilen izolatların Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon- Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) ile tanımlanmasına olanak sağlayan bir yaklaşımdır (Bizzini ve ark., 2010; Garcia ve ark., 2016, Nacef ve ark., 2017). Şekil 2.4'te Del Chierico (2014)'nın kültüromik yaklaşımı özetlenmiştir.

MALDI-TOF MS, mikroorganizmaların proteinlerinin iyonize edilerek bir elektrik alandan geçirilmesi ile protein profillerinin çıkarılması esasına dayanır (Garcia ve ark., 2016). MALDI-TOF MS'te tanımlamanın ilk basamağı saf kültür olarak elde edilen izolatın hedef plaka üzerinde matriks solüsyonu ile muamele edilip kristalleştirilmesidir. Matriks solüsyonu ile kaplanan ve kuruması beklenen örnek sonrasında hedef plaka ile cihaza yüklenir. Cihaz içi vakumu sağlandıktan sonra hedef plaka lazer ışınına maruz bırakılır. Kristalize halde bulunan proteinler lazer ışınının etkisiyle iyonlaşır ve protonlanmış iyonlar elde edilir. İyon bulutu bir elektrik alanda hızlandırılarak uçuş tüpünden geçirilir. İyonların uçuş tüpünde geçirdikleri süre (Time of Flight, TOF) uçuş süresi analizatörleri ile hesaplanır. Bu süre iyonların kütlesiyle ilişkilidir. İyonların uçuş tüpünde aldıkları yol tamamlandığında, her bir izolat için kütle spektrumları elde edilir. Bu spektrumlar veritabanında bulunan veriler ile karşılaştırılır ve mikroorganizmaların tanımlanması gerçekleştirilir (Bizzini ve ark., 2010; Garcia ve ark., 2016). Şekil 2.5'te MALDI-TOF MS çalışma prensibi gösterilmiştir (Patel, 2015).

Kültüromik yaklaşımının, mikrobiyel toplulukta az yoğunlukta bulunan mikroorganizmaların da tanımlanması, hızlı ve ekonomik olması, yalnızca canlı mikroorganizmaların tanımlanmasına olanak sağlaması ve tanımlanan kültürlerin ileri çalışmalar için saklanmasına izin vermesi gibi avantajları vardır. Ancak kültüromik yöntemi ile sadece kültüre edilebilen mikroorganizmaların tanımlanması mümkün olmaktadır (Nacef ve ark., 2017).



Şekil 2.4. Del Chierico (2014)'e göre kültüromik yaklaşımı (Orijinal resimler kullanılmıştır).



Şekil 2.5. MALDI-TOF MS çalışma prensibi (Patel, 2015).

2.3.3. Metagenomik Analizler

Mikrobiyel topluluk bir ortamda aynı anda birlikte var olan organizmalar grubudur (Escobar-Zepeda ve ark., 2015). Mikroorganizmaların fizyolojilerini anlamak için kullanılan yöntemlerin, Robert Koch'un katı halde besin ögelerini mikroorganizmaların sayısını belirlemek ve onları mikroskop altında görüntülemek için kullanmasıyla başladığı ifade edilebilir. Ancak, Petri kabında gelişen ve mikroskopta görüntülenen mikroorganizma sayısı arasındaki büyük fark, mikroorganizmaları kültüre etme yöntemlerinin yetersiz kaldığını göstermiştir (Handelsman, 2004; Stewart, 2012; Sielaff ve ark., 2019). Dökme Plak Yönteminde Büyük Farklılık (Great Plate Count Anomaly) olarak isimlendirilen bu yetersizlik, var olan mikroorganizmaların yaklaşık olarak yalnızca %1'nin *in vitro* olarak belirlenebildiğini göstermiştir (Vartoukian ve ark., 2010; Stewart, 2012; Escobar-Zepeda ve ark., 2015; Serra ve ark., 2019). Elde edilen bu veriyle beraber belli bir ortamda bulunan mikroorganizmaların belirlenmesi ve tanımlama çalışmalarının yapılabilmesi için yeni yöntemlerin gerekliliği ortaya çıkmıştır (Şekil 2.6).

Metagenomik, çevresel bir örnekte bulunan tüm genomların doğrudan izole edilerek genetik analizinin yapılması olarak tanımlanabilir (Escobar-Zepeda, 2015; Chiu ve ark., 2019). Genetik materyalin dizilenmesiyle gerçekleştirilen metagenomik analizler yeni nesil dizileme yöntemleriyle gerçekleştirilir. Yeni nesil dizileme sistemleriyle bitki, bakteri, maya, küf, virüs gibi mikroorganizmaların genomlarının ultra hızlı olarak, yüksek doğrulukla dizilenmesi mümkündür. Günümüzde kullanılan yeni nesil dizileme sistemleri, Illumina Genome Analyzer, Applied BioSystem SOLID, Complete Genomics, Helios, Pacific Biosciences ve IonTorrent'tir (Üstek ve ark., 2011; Jongman ve ark., 2020; Nair ve ark., 2020).

Metagenomik analizler ampikon dizileme ve shotgun olarak ikiye ayrılmaktadır. Ampikon dizilemede, örnekten tüm mikroorganizmaların toplam DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra taksonomik bilgi veren belirli gen bölgeleri hedeflenir. Bunlara, nesiller boyu korunmuş ve taksonomik bilgi veren 16S rRNA, 18S rRNA ve ITS genleri örnek verilebilir (Jorgerson ve ark., 2019, Martin ve ark., 2019; Escobar-Zepeda ve ark., 2020). Bu hedeflenen genler spesifik primerler yardımıyla elde edilir ve PCR ile

amplifiye edilirler. Amplifiye edilen gen bölgeleri dizilenir ve biyoinformatik araçlarla bu diziler anlamlı verilere dönüştürülerek mikroorganizmalar tanımlanmış olur (Ranjan, 2016; Breitwieser ve ark., 2019; Serra ve ark., 2019).

Katı besiyerinde kültürel yöntemler



Dökme Plak Yönteminde Büyük Farklılık (Great Plate Count Anomaly)

(Var olan mikroorganizmaların yalnızca yaklaşık %1'nin *in vitro* düzeyde belirlenebilmesi)



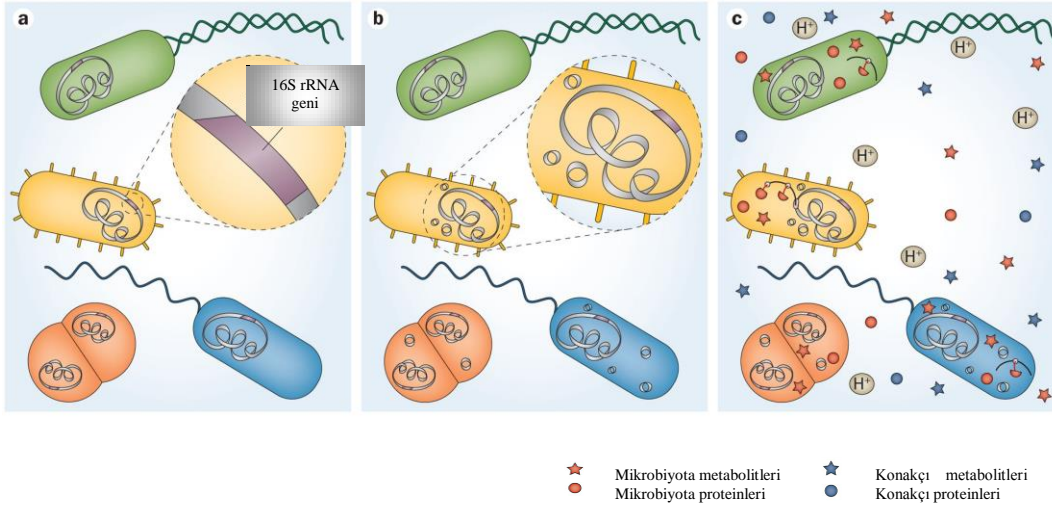
Moleküler Yöntemler ve Metagenomik Analizler

Şekil 2.6. Metagenomik analizlerin ortaya çıkışı

Shotgun dizileme ise; örnekte bulunan tüm genomun rastgele parçalarının dizildiği sistemdir. Shotgun dizileme ve ampikon dizilemenin en önemli farkı tüm genom shotgun dizileme ile mikroorganizmaların tür düzeyinde tanımlanmasında ampikon dizilemeyle tanımlamaya kıyasla daha güvenilir sonuçlar elde edilmesidir (Ranjan, 2016; Thoendel ve ark., 2019). Tüm genom shotgun dizileme ve ampikon dizilemede farklı veritabanları kullanılmaktadır ve shotgun dizilemede daha büyük ham veri elde edilmektedir (Wyres ve ark., 2014; Deurenberg ve ark., 2017; Jagadeesan ve ark., 2019; Escobar-Zepeda ve ark., 2020). Şekil 2.7'de aynı örneğin mikrobiyotasının 16S rRNA dizileme ve metagenomik yöntemler kullanılarak belirlenmesini gösteren bir yaklaşım sunulmuştur. Burada her resim aynı mikrobiyotayı temsil etmektedir. Ancak mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan her bir yöntemin çıktısı farklı bilgiler sunmaktadır (Whiteside ve ark., 2015).

Tüm genom shotgun dizileme daha ayrıntılı incelenecek olursa, ilk aşama yine ortamda bulunan mikroorganizmaların genetik materyalinin doğrudan ekstrakte edilmesidir. Bu elde edilen genetik materyal o ortamda bulunan tüm mikroorganizmaların genomunu kapsamaktadır (Sharpton, 2014; Knight ve ark., 2018). Toplam genom olarak doğrudan izole edilen DNA'lar dizileme için çok uzundur. Bu yüzden öncelikle DNA'ların küçük fragmentlere (200-600 bp) mekanik ya da enzimatik yollarla ayrılması gerekir. Küçük parçalara ayrılan DNA fragmentlerinin iki ucuna adaptörler eklenir (Morey ve ark.,

2013; Jagadeesan ve ark., 2019). Bu adaptörler kütüphanenin oluşturulması sırasında DNA fragmentlerinin bir yüzeye bağlanması için gereklidir. Daha sonra bu DNA fragmentleri 95°C'ye ısıtılarak denatüre edilir ve tek zincirli hale getirilir. Tek zincirli hale getirilen DNA fragmentlerinin bir yüzeye tutunması sağlanır. Bu yüzey kullanılan yeni nesil sekanslama tekniğine göre değişim göstermektedir (Morey ve ark., 2013). Illumina sistemde bu amaç için oligonükleotitlerle kaplanmış bir akış hücresi kullanılırken, Ion Torrentte boncuklar (bead) kullanılır. Yüzeye tutunan DNA parçaları kütüphaneleri oluşturur. Devamında bu kütüphanelerden kümeler oluşturulur. Bu amaçla ortama eklenmiş olan nükleotitler, polimeraz enzimi, primerler ve buffer ile DNA'ların eşlenmesi gerçekleşir. Çift zincirli hale gelen DNA'lar tekrar denatüre edilir ve orijinal zincir uzaklaştırılır. Sonra kalan zincirler tekrar eşlenirler bu döngü defalarca tekrarlanır ve bu şekilde kümeler oluşturulmuş olur. Dizileme aşamasına geçildiğinde DNA'ların eşlenmesinde floresanla modifiye edilmiş nükleotitler kullanılır (Metzker, 2009, Ranjan, 2016; Zhang ve ark., 2019). Böylece her bir nükleotitin eklenmesinde ışık kaynağı ile birlikte hangi nükleotitin eklendiği görüntülenir ve böylece sırayla eklenen nükleotitler dizilenmiş olur. Dizileme işleminden sonra elde edilen dizilerin analizi biyoinformatik analizler yapılarak gerçekleştirilir. Bu analizlerle hedeflenen ortamda hangi mikroorganizmaları olduğu ve bunların ne oranda bulunduğu tespit edilebilir (Morey ve ark., 2013; Escobar-Zepeda ve ark., 2015; Jagadeesan ve ark., 2019).



Şekil 2.7 Metagenom çalışma yöntemleri a.16S rRNA yöntemi ile yapılan taksonomik tanımlama çalışmaları b. Metagenom: Mikrobiyotaya ait plazmitleri de içeren gen ve genomlar, popülasyonun genetik potansiyelinin belirlenmesi c. Mikrobiyom: mikrobiyota ve konakçıya ait metabolitler ile mikrobiyotanın toplam gen ve genomu (Whiteside ve ark., 2015).

Gıdalar bakteri, maya, küf gibi organizmaları birlikte bulundurur ve bu mikroorganizmalar birbirleriyle etkileşimde bulunarak gıdaların fermantasyonundan sorumludur veya bozulmasına sebep olur. Son yirmi yılda geliştirilen kültürden bağımsız metotlar ile gıda üretimi, depolaması ve dağıtım süreçleri fermantasyon ve bozulma dinamikleri incelenmiştir (Cocolin ve Ercolini 2015; Serra ve ark., 2019).

Gıdalarda gerçekleştirilen bu çalışmaların;

- i. Gıda patojenlerinin tayini
- ii. Gıdalarda bozulmalara yol açan mikroorganizmaların tayini
- iii. Fermantasyon süresince mikroorganizma değişiminin izlenmesi
- iv. Potansiyel starter ya da yararlı mikroorganizmaların belirlenmesi gibi çıktıları olmaktadır.

Ülkemizde beyaz peynirin mikrobiyel kompozisyonunun belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar incelendiğinde genellikle klasik kültürel yöntemler ve biyokimyasal testlerin kullanıldığı, bunun yanında son zamanlarda 16S rRNA dizileme yönteminin öne çıktığı görülmektedir (Karakuş ve ark., 1992; Hayaloğlu ve ark., 2002; Gürsel ve ark., 2003; Çıtak ve ark., 2004; Ertürkmen ve ark., 2015; Arslan, 2017).

Ertürkmen ve Öner'in (2015) yaptığı çalışmada laboratuvar koşullarında starter kültür karışımı kullanılmadan çiğ süttten üretilen 7 adet beyaz peynir örneğinden izole edilen 145 suştan 78 tanesi klasik kültürel yöntemlerle tanımlanmış ve bunların 25 adeti Lactococcus, 22 adeti Enterococcus ve 30 adeti Lactobacillus olarak belirlenmiştir. Uygulanan biyokimyasal testler sonucunda Lactococcus cinsi olarak tanımlanmış 25 adet izolattan, 19'unun *Lc. lactis* subsp. *lactis*, 4'ünün *Lc. lactis* subsp. *cremoris* olduğu tespit edilmiştir. Enterococcus cinsi olarak tanımlanmış 22 izolattan 5 adeti *E. faecalis*, 2 adeti *E. durans*, 2 adeti *E. avium*, 4 adeti *Pediococcus pentosaceus* olarak tanımlanmıştır. Lactobacillus cinsine ait olduğu belirlenen izolatlar uygulanan şeker testleri sonucunda 7 izolat *L. plantarum* olarak, 7 izolat *L. curvatus* ve 9 izolat *L. jensenii* olarak tanımlanmıştır.

Arslan (2017) yaptığı çalışmada, Erzurum başta olmak üzere Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden topladığı beyaz peynirlerden laktik asit bakterilerinin izolasyonunu ve API, 16S rRNA gen analizi ve rep-PCR yöntemleri ile identifikasyonunu

gerçekleştirmiştir. Buna göre *Lactobacillus kefir*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *Pediococcus lolii*, *Prolinoborus fasciculus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Lysinibacillus sinduriensis*, *P. parvulus*, *L. paraplantarum*, *Staphylococcus hominis*, *L. buchneri*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus yunnanensis*, *Microbacterium paraoxydans* ve *Rothia dentocariosa* türlerine ait 42 adet izolat tanımlanmıştır.

MALDI-TOF MS analizi ile laktik asit bakterilerinin belirlenmesine yönelik yapılan bir çalışma incelenecek olursa; Dec ve ark. (2016) tarafından kümes hayvanlarından izole edilen *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin tanımlanması amacıyla yapılan çalışmada 16S-ARDRA ve MALDI-TOF yöntemleri kullanılmış ve sonuçta; *L. salivarius*, *L. johnsonii* ve *L. ingluviei* türleri baskın mikroorganizmalar olarak kaydedilmiştir. Ayrıca MALDI-TOF MS'in diğer yöntemlere kıyasla çok daha hızlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir.

Literatür incelendiğinde, çeşitli fermante gıda ürünlerinin mikrobiyotasının belirlenmesi ve fermantasyon sürecinde rolü olan mikroorganizmaların aydınlatılabilmesi amacıyla yüksek çıktılı yeni nesil dizileme yöntemleriyle çalışmalar yapıldığı görülmektedir. Bu gıda ürünleri; kefir (Nalbantoğlu ve ark., 2014; Garofalo ve ark., 2015; Walsh ve ark., 2016; Verce ve ark., 2020), piriç şarabı (Bora ve ark., 2016), tahıl sirkesi (Wu ve ark., 2017), üzüm ve şarap (Sternes ve ark., 2017; Wei ve ark., 2018; Cerutti ve ark., 2019), kakao taneleri (Illegheems ve ark., 2015; Serra ve ark., 2019), çiğ süt (Doyle ve ark., 2017), sucuk (Greppi ve ark., 2015; Ferrocino ve ark., 2018) ve peynirdir (Wolfe ve ark., 2014; Garofalo ve ark., 2015; Dalmasso ve ark., 2016; Dugat-Bony ve ark., 2016; Kable ve ark., 2016; Guidone ve ark., 2016; Escobar-Zepeda ve ark., 2016; Duru ve ark., 2018; Savaşan ve ark., 2019).

Wolfe ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada eskitilmiş peynirin kabuk kısmının mikrobiyel çeşitliliğinin belirlenebilmesi, mikroorganizmaların metabolizmalarının ve fonksiyonlarının araştırılabilmesi ve bu peynirin kabuk kısmını oluşturan mikroorganizmalara ait bir model oluşturulabilmesi amacıyla, Avrupa'dan Amerika'ya 10 farklı ülkede starter kültür kullanılarak üretilen ve olgunlaştırılan 137 adet eskitilmiş peynirin kabuk kısmında PCR bazlı ampikon dizileme yapılmıştır. Bakteri komuniteleri

için 16S rRNA ve küf komuniteleri için ITS bölgeleri dizilenmiştir. Çalışmanın sonucunda tüm örneklerde %1'den fazla bulunan ve bu oranla baskın mikroorganizma olan 14 adet bakteri ve 10 adet küf cinsi tespit edilmiştir. Tespit edilen cins sayısının sınırlı olmasının, bu mikroorganizmaların starter kültür kaynaklı olmasından ötürü olduğu bildirilmiştir. Ancak bunun yanında bakterilerin %60'ının küflerin ise %25'lik kısmının starter kültür olmayan mikroorganizmalar olduğu tespit edilmiştir. Starter kültür kaynaklı olmayan bu mikroorganizmaların çevresel kaynaklardan gelmiş olabileceği bildirilmiştir. Çevresel kaynaklardan gelen bu mikroorganizmaların peynirlerin yapı, tat, koku gibi özelliklerinin oluşmasında katkısının olabileceği bildirilmiştir.

Kable ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada ticari üretim yapılan tesislere tankerlerle transfer edilen çiğ sütlerin farklı mevsimlerdeki bakteriyel kompozisyonunun belirlenmesi ve bu transferin ve süt işlemesine mikrobiyolojik açıdan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Kaliforniya'daki iki büyük süt işleme fabrikasına gelen 899 tankerden yaz, ilkbahar ve sonbahar mevsimleri süresince çiğ inek sütü örnekleri toplanmıştır ve bu örnekler üzerinde 16S rRNA dizilemesi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda mikrobiyel olarak sayıca ve çeşitlilik yönünden en yüksek değer ilkbaharda toplanan örneklerde elde edilmiştir ve Actinobacteria bu örneklerde en baskın filum olmuştur. Bunun yanında çiğ süt örneklerinde Streptococcus ve Staphylococcus cinsi bakterilerin ve Clostridiales takımının tanımlanamayan üyelerinin baskın olduğu 29 taksonomik gruptan oluşan bir temel mikrobiyota tespit edilmiştir. Ayrıca yaz aylarında 2 gün boyunca 5 adet depolama silosu ve bu silolara süt getiren tankerlerden de süt örnekleri alınmıştır. Analizler sonucunda ulaşılan genel sonuca göre çiğ sütün içeriğinde yoğunlukla bulunan bakteri komuniteleri süt üretim tesislerinde de tespit edilmiştir. Bu sonuç işletmelerde uygulanan temizlik ve sanitasyon işlemlerinin yeniden gözden geçirilmesi konusunda bir uyarı niteliğinde olmuştur (Kable ve ark., 2016).

Guidone ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, farklı asidifikasyon yöntemleri ile üretilen yüksek nemli Mozzarella peynirlerinden alınan örneklerin mikrobiyel kompozisyonu yüksek çıktılı yöntemlerle incelenmiştir. Çalışmada piyasada bulunan 14

farklı markaya ait 20 adet peynirden örnekleme yapılmıştır. 14 farklı markadan 5'i etiket üzerinde sitrik asit, 4'ü starter kültür kullandığını belirtirken, diğer 5 markanın etiket üzerinde herhangi bir bilgi bulundurmamakla birlikte bunlardan 3'ünün içeriği belirli olmayan starter kültür kullandığı, kalan 2 marka için ise herhangi bir bilgi olmadığı bildirilmiştir. Örneklerden yapılan DNA ekstraksiyon işleminin ardından 16S rRNA genlerinin V1-V3 bölgeleri amplifiye edilmiş ve pirosekanslama yöntemi ile dizilenmiştir. Kalite kontrol ve filtreleme işlemleri QIIME 1.8.0 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, starter kültür kullanılan peynirlerde *Streptococcus thermophilus* baskın tür olarak gözlenmiştir. Bunun yanında diğer laktik asit bakterileri ve %0,01-1 oranında bozulmaya sebep olan mikroorganizmalar gözlenmiştir. Sitrik asit kullanılan 5 örnek ve etiket bilgisi olmayan 5 örnekte ise laktik asit bakterileri, psikotrofik mikroorganizmalar ve Enterobacteriaceae ailesine ait mikroorganizmalardan oluşan yüksek mikrobiyel çeşitlilik gözlenmiştir. Sonuç olarak sitrik asit kullanılan ve etiket bilgisi içermeyen peynirlerin mikrobiyel çeşitliliğinin daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu yöntemle starter kültürlerle üretilen Mozzarella peynirlerinin ayırt edilebileceği ve peynir endüstrisinde yapılan hilelerin anlaşılabilirliği belirtilmiştir.

Garofalo ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada İtalya'nın 6 farklı yöresinden 6 farklı kefir tanesi örneği toplanmış ve klasik kültürel yöntemlerle moleküler yöntemlerin bir arada kullanılmasıyla kefirin maya ve bakteri kompozisyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla seçici besiyerinde canlı hücre sayımı, elektron mikroskopu analizleri, PCR-DGGE ve pirosekanslama metotları beraber kullanılmıştır. Laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri ve mayalar için seçici besiyerleri kullanılarak uygun sıcaklık ve oksijen ortamında ekimler gerçekleştirilip mikrobiyel sayımlar yapılmıştır. Daha sonra kefirlerden DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Kefirlerden doğrudan izolasyon için PowerFood™ Microbial DNA Isolation Kit kullanılmıştır. DNA ekstraksiyon kitinin işlem mekanizması kimyasal maddelerin ve uygulanan sıcaklığın etkisiyle; hücreleri liziz etmek, lipid, polisakkarit ve inhibe edici ajanları ortadan kaldırmak, DNA protein kompleksini kırıp saf DNA elde etmektir. PCR-DGGE analizi için uygun primerler kullanılarak hedef gen bölgeleri çoğaltılır. Bakteri türleri için 16S rRNA geninin V3 bölgesi, asetik asit ve laktik asit bakterileri için 16S rRNA geninin V7-V8 bölgeleri, mayalar için 26S rRNA geninin 5' ucunun son

240 nükleotiti hedef alınmıştır. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek kontrolleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen genetik materyal pirosekanslama yöntemiyle dizilenmiştir. Biyoinformatik analizlerde ise okumalar QIIME 1.8.0 yazılımı kullanılarak filtrelenmiş, RDPII sınıflandırıcı kullanılarak sınıflandırmalar ve mikroorganizmaların birbirlerine göre bulunma yüzdeleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kefirde baskın bakteri türünün *Lactobacillus kefiranofaciens* maya türünün ise *Dekkera anomala* olduğu bulunmuştur. *St. thermophilus*, *Lc. lactis* ve *Acetobacter* türleri değişen oranlarda tespit edilmiştir (Garofalo ve ark., 2015).

Verce ve ark (2020) tarafından yapılan çalışmada, kefir mikrobiyotasının belirlenmesi amacıyla shotgun dizileme yapılmış ve yeni bir bakteri türü keşfedilmiştir. Bunun için fermantasyonun 2 farklı aşamasında hem kefir tanelerinden hem de kefirin sulu kısmından olmak üzere 4 örnek alınmıştır. Örneklerden DNA ekstraksiyonu yapılmış, shotgun dizileme Ion PGM cihazında gerçekleştirilmiş ve elde edilen diziler BLAST, Kraken ve Kaiju gibi biyoinformatik araçlar kullanılarak anlamlandırılmıştır. Çalışma sonunda kefirde *Lactobacillus harbinensis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus paracasei* ve çeşitli *Lactobacillus* türleri bulunmuştur. Bunun yanında *Bifidobacterium aquikefiri* ile *Saccharomyces cerevisiae* ve *Dekkera bruxellensis* mayaları da tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada Shothun metagenomik dizileme ile *Oenococcus oeni* ve *Oenococcus kitaharae* türleri ile ilişkili yeni bir *Oenococcus* türü tespit edildiği ve bu türün *Candidatus Oenococcus aquikefiri* olarak isimlendirildiği raporlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, endüstriyel olarak üretilen beyaz peynir mikrobiyotasının laktik asit bakterileri açısından MALDI-TOF MS temelli kültüromik yaklaşımı ve shotgun dizileme ile metagenomik yöntemi kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun yanında beyaz peynir mikrobiyotası üzerine peynirin yapıldığı işletme ekipmanının mikrobiyel katkısı da incelenmiştir.

3. MATERYAL METOT

3.1. Materyal

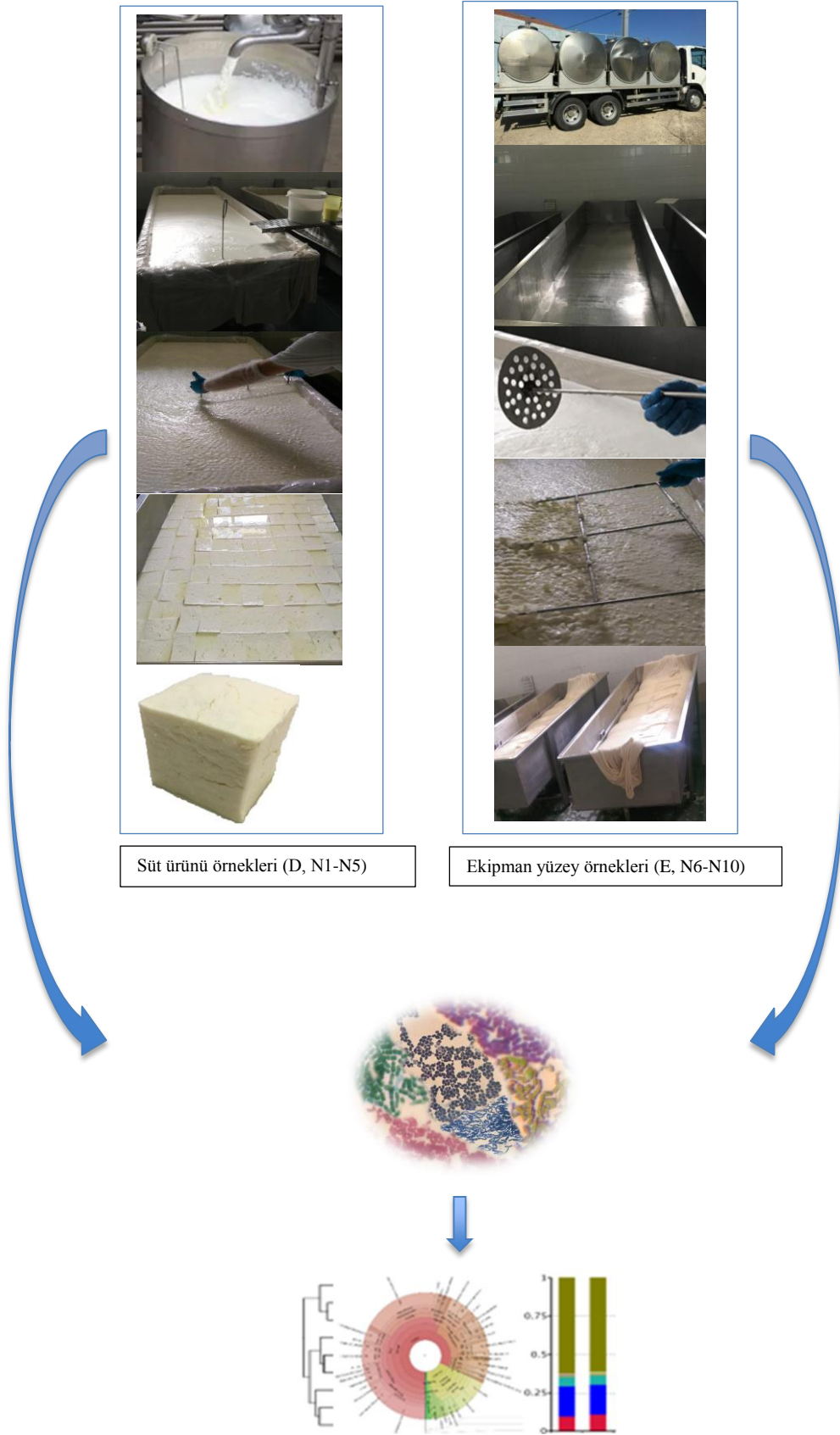
Mikroorganizmaların izolasyonunda M17 Agar (Merck) ve M17 Broth (Merck), Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) Agar (Merck) ve MRS Broth (Merck), Kanamycin Esculin Azide Agar (Merck) ve Nutrient Broth (Merck) besiyerleri kullanılmıştır. Anaerobik mikroorganizmaların geliştirilmesinde anaerobik jar (2,5 L hacimdeki kavanoz, Oxoid) ve Anaerocult® A, standart boydaki belirli hacimde anaerob ortam sağlamak için kullanılan kâğıt poşet içinde kimyasal madde karışımı, (Merck) kullanılmıştır. Örneklerin seri dilüsyonlarının hazırlanması için Ringer solüsyonu (Merck) ve stok kültürlerin hazırlanması için gliserol (Merck) kullanılmıştır. Gram boyama reaksiyonunda kullanılan Kristal viyole, lügol çözeltisi ve safranin ile Katalaz reaksiyonunda kullanılan hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi Merck firmasından temin edilmiştir.

Genomik DNA ekstraksiyonunda GeneMATRIX Bacterial& Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx, Polonya) kullanılmıştır. Yüksek verimli DNA Kütüphanesi hazırlamak için NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB E7645S/L, New England BioLabs ® Inc.) kit kullanılmıştır.

Tüm çözeltilerin hazırlanmasında çözücü olarak distile su kullanılmıştır.

3.2. Metot

Bu çalışmanın amacı, beyaz peynir üretim sürecine ilişkin süt, peynir ve çevre mikrobiyotasının dinamikleri hakkında laktik asit bakterileri açısından kapsamlı genel bir bakış sağlamaktır. Bu amaçla, bir beyaz peynir üretim hattından alınan gıda ve çevresel örneklerin içerdiği mikroorganizmalara ait toplam DNA'ya dayalı shotgun metagenom dizileme ile mikroorganizmaların tanımlanması ve kültüromik yaklaşımı ile mikroorganizmaların izolasyon ve tanımlanması yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Süt ve peynir mikrobiyotası: Shotgun metagenomik analiz ve kütyromik yaklaşımı.

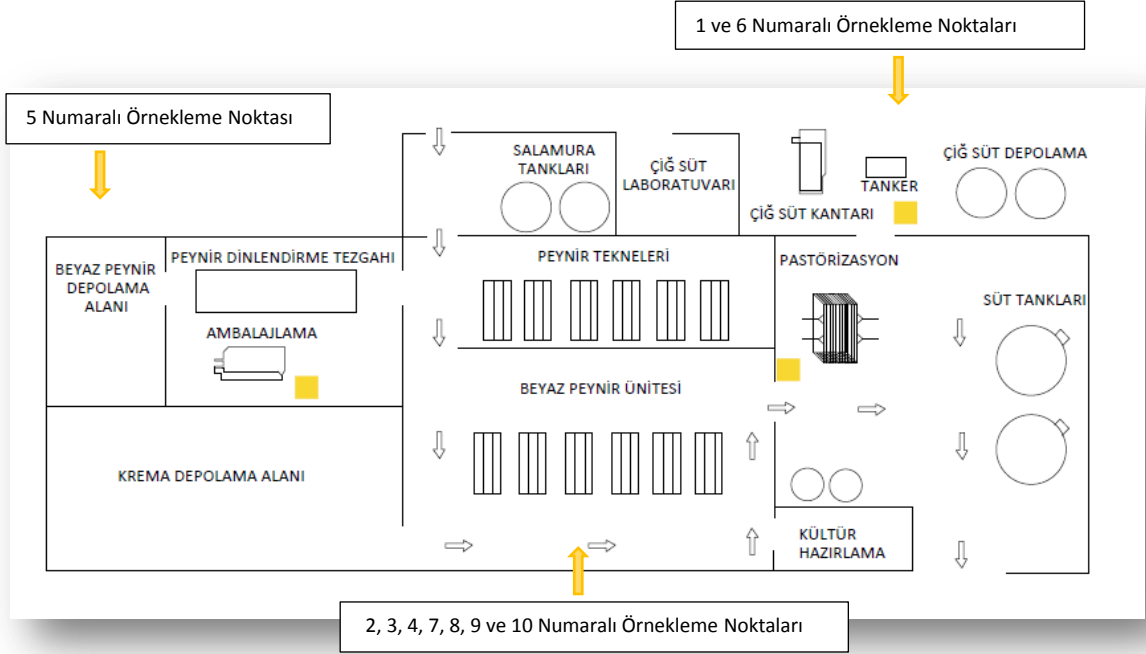
3.2.1. Örnekleme

Araştırma materyali olan süt ve süt ürünü (gıda) ve yüzey (çevresel) örnekleri, Kastamonu ilinde bulunan küçük ölçekli bir süt işleme tesisinden alınmıştır. Örnek alınan tesise işlenmek üzere Kastamonu ilinin Alparslan, Davutça, Darıbükü, Demirci, Dereköy, Elyakut, Hacıbey, Hasköy, Ömerli ve Sırasöğütler köylerinden çiğ süt gelmektedir. Köylerden tankerle gelen çiğ sütler çiğ süt tanklarında karıştırıldıktan sonra beyaz peynire işlenmektedir. İşletmede beyaz peynir üretiminde klasik akış takip edilmektedir (Şekil 2.1). Starter kültür karışımı olarak *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ve *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarından oluşan hazır liyofilize kültür kullanılmaktadır. Starter kültür karışımında suşların karışım oranı bilinmemektedir. Örnekleme işletmede beyaz peynir üretim sürecinde yapılmış, süt ve süt ürünü ile yüzey swap örnekleri olmak üzere 10 adet örnek alınmıştır (Çizelge 3.1).

Süt ve süt ürünü örnekleri (D), laktik asit bakterilerinin son ürünün elde edilmesine olan katkısını ortaya çıkarmak amacıyla Ercolini ve ark. tarafından yapılan çalışmada kullanılan örnekleme planından yola çıkılarak çiğ süttten beyaz peynir oluşana kadar 5 farklı aşamada (çiğ süt, starter kültür eklendikten sonra süt, pıhtı, teleme ve beyaz peynir) alınmıştır (Ercolini ve ark., 2004). Gıda örnekleri aseptik koşullar altında steril kavanozlara alınmış, daha sonra klasik kültürel yöntemlerle laktik asit bakterileri izolasyonu ve toplam DNA ekstraksiyonu işlemleri için buz aküleri içinde (4-8) iki ayrı laboratuvara götürülmüştür.

Yüzey swap örnekleri (E) ise beyaz peynir yapımı sırasında kullanılan ve peynire temas eden 5 farklı ekipmanın yüzeyinden tek kullanımlık steril pamuklu çubuklar (swap) kullanılarak alınmıştır. Bu ekipmanlar çiğ süt tankeri, üretimin gerçekleştiği tekne, karıştırıcı, kesme teli ve cendere bezidir. Pamuklu çubuklar her bir yüzeye sürülmüş ve daha önce deney tüpleri içerisine hazırlanmış olan Nutrient Broth besiyeri içerisine daldırılmıştır.

Örnek alınan süt işleme tesisine ait, beyaz peynir üretim ünitesinin planı Şekil 3.2’de verilmiştir. Çizelge 3.1’de her bir örneğe ilişkin bilgiler ve o örneğin alındığı işletme elemanı verilmiştir



Şekil 3.2. Örneklerin alındığı süt işleme tesisinin beyaz peynir üretim ünitesi planı

Çizelge 3.1. Örneklemeler ve işletme elemanları

Kod	Örnek tipi	Örnek adı	İşletme elemanı
N1	Süt	Çiğ süt	Çiğ süt depolama
N2	Süt	Starter kültür eklenmiş süt	Beyaz peynir ünitesi
N3	Süt ürünü	Pıhtı	Beyaz peynir ünitesi
N4	Süt ürünü	Teleme	Beyaz peynir ünitesi
N5	Süt ürünü	Beyaz peynir	Beyaz peynir depolama alanı
N6	Yüzey Swap	Çiğ süt tankeri	Tanker
N7	Yüzey Swap	Tekne	Beyaz peynir ünitesi
N8	Yüzey Swap	Karıştırıcı	Beyaz peynir ünitesi
N9	Yüzey Swap	Kesme teli	Beyaz peynir ünitesi
N10	Yüzey Swap	Cendere bezi	Beyaz peynir ünitesi

Örnek alımı 17.10.2018 ve 04.09.2019 tarihlerinde olmak üzere iki defa gerçekleştirilmiştir. Birinci örnek alımından gelen örnekler hem kültüromik hem de shotgun metagenom analizlerine, ikinci örnek alımından gelen örnekler ise sadece kültüromik analizlerine tabi tutulmuştur. Örnek alım tarihlerinin yaklaşık aynı dönem olması nedeni ile biyolojik tekrar olarak kabul edilmiştir.

3.2.2. Kültüromik yaklaşımı ile Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon ve Tanımlanması

3.2.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

İşletmeden alınan örnekler (Çizelge 3.1) soğuk zincir korunarak laboratuvara getirilmiştir. İzolasyon işlemi MAYSA Gıda Ar-Ge Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu için ilk aşama olarak örnekler Ringer solüsyonu içinde homojenize edilmiş ve seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Bunun için katı halde bulunan beyaz peynir ile yarı katı halde bulunan pıhtı ve teleme örneklerinden aseptik koşullar altında 10'ar gram alınmış, 90 mL Ringer solüsyonu ile karıştırılarak Stomacher cihazında (Seward, Almanya) homojenize edilmiştir. Sıvı halde bulunan süt ve starter kültür eklenmiş süt örneklerinden ise 10'ar mL alınarak aynı işlem uygulanmıştır (Harrigan ve Mccance, 1966). Homojenize edilen süt ürünü örnekleri ile Nutrient Broth besiyeri içinde bulunan yüzey örneklerinden 1 mL alınarak 10^{-1} lik seyreltme derecelerinde örneklerin seri dilüsyonları hazırlanmıştır (Temiz, 2016).

Laktik asit bakterilerinin izolasyonu amacıyla örneklerin seyreltilmiş dilüsyonlarından seçici besiyerlerine ilk olarak yüzeye yayma yöntemi ile ekimler yapılmıştır. Seçici besiyeri hazırlanmış olan Petri kutularına seyreltilmiş örneklerden 0,1 mL aktarılmış ve Drigalski özesi ile yayılmıştır. Daha sonra Petri kutuları hedeflenen mikroorganizmanın optimum gelişme sıcaklığında inkübe edilmiştir. Çizelge 3.2' de hedeflenen laktik asit bakterisi, kullanılan seçici besiyeri ve inkübasyon koşulları verilmiştir.

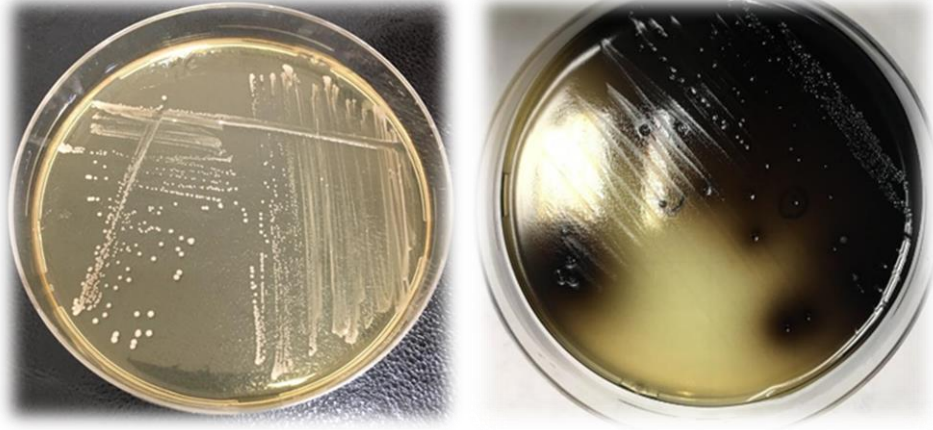
Çizelge 3.2. Hedeflenen laktik asit bakterisi, kullanılan seçici besiyeri ve inkübasyon koşulları (Sharpe, 1979).

Hedeflenen LAB	Seçici Besiyeri	İnkübasyon Koşulları
Laktokoklar Streptokoklar	M17 Agar	37°C'de Aerobik
Laktobasiller	MRS Agar	37°C'de Anaerobik
Enterokoklar	Kanamycin Esculin Azide Agar	37°C'de Aerobik

3.2.2.2. İzolatlardan Saf Kültür Elde Edilmesi ve Saf Kültürlerin Muhafazası

İnkübasyonun ardından besiyerinde gelişen kolonilerin morfolojileri incelenmiş tipik koloni morfolojisine sahip koloniler seçilerek tek koloni düşürme tekniği ile seçici besiyerlerine inoküle edilmiştir. Kolonilerin saf kültür olarak elde edilebilmesi amacıyla

tek koloni düşürme yöntemi ile ekim üç kere tekrar edilmiştir. Şekil 3.3'te tek koloni düşürme tekniği ile M17 Agar ve KAA besiyerlerinde elde edilen saf koloni örnekleri verilmiştir. Saf kültür olarak elde edilen mikroorganizmalar seçici sıvı besiyerlerinde 24 saat inkübe edilmiştir. Gelişen kültürlerin uzun süre muhafaza edilmesi için sıvı besiyerinden 0,5 mL alınarak tüpe (Eppendorf, Almanya) aktarılmış ve üzerine 0,5 mL gliserol eklenerek -80°C 'de saklanmıştır.



Şekil 3.3. Tek koloni düşürme tekniği ile M17 Agar ve KAA besiyerlerinde elde edilen saf koloni örnekleri.

3.2.2.3. İzole Edilen Saf Kültürlerin Kodlanması

Saf kültür olarak elde edilen izolatların muhafazası ve kayıt altında tutulması amacıyla kültürlerin izole edildiği laboratuvar, tarih, kaynak, suş numarası, izolasyonu yapan kişi bilgilerini içeren bir kodlama sistemi kullanılmıştır (Kurban, 2019).

Çizelge 3.3. Kodlama sistemi.

HU	F	18	Z	N1-N10	M17-M MRS-R Kanamycin-K	Petri Numarası	0	0	1
Hacettepe Üniversitesi	Laboratuvar Adı	Yıl	Kişi	Kaynak	İzolasyon Yapılan Besiyeri	Alt Kaynak	Suş Numarası		

3.2.2.4. Klasik Kültürel Yöntemlerle Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi

Elde edilen izolatlardan laktik asit bakterilerinin ayrımı için makroskobik ve mikroskobik morfoloji özellikleri incelenmiş ve Gram boyama ve katalaz testi yapılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Hedeflenen laktik asit bakterileri ve ayırım testleri

Laktik Asit Bakterileri	Makroskobik Morfoloji	Laktik Asit Bakterilerin Ayırım Testleri
Laktokoklar Streptokoklar	M17 Agar 37°C'de Aerobik	Makroskobik Morfoloji Mikroskobik Morfoloji Gram Boyama Katalaz Testi
Laktobasiller	MRS Agar 37°C'de Anaerobik	
Enterokoklar	Kanamycin Esculin Azide Agar 37°C'de Aerobik	

Makroskobik Morfoloji

Makroskobik morfolojinin belirlenmesi için Çizelge 3.4'de verilen besiyerlerine ekim yapılmış ve Laktokoklar için M17 Agar besiyerinde gelişen krem rengi, parlak veya mat özellik gösteren koloniler seçilmiştir. Laktobasiller için anaerobik şartlarda MRS Agar'da gelişen krem rengi, parlak veya mat koloniler seçilmiştir. Enterokoklar için ise KAA'da gelişen ve bu besiyerinde etrafında siyah zon oluşturan koloniler seçilerek ayrılmıştır.

Mikroskobik Morfolojinin Belirlenmesi ve Gram Boyama

Mikroorganizmaların mikroskobik morfolojilerini belirlenmesi için Gram boyama tekniğinden yararlanılmıştır. Seçici besiyerlerinde geliştirilen 18 saatlik genç kültür lam üzerine bir öze ile yayılmış, kurutulmuş ve bek alevinden hızlıca geçirilip tespit yapılarak preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatların üzerine kristal viyole eklenip 1 dakika beklenmiş ve distile su ile boya akıtılmıştır. Daha sonra preparatlar lügol çözeltisi ile kaplanıp 1 dakika bekletilmiş ve süre sonunda lügol çözeltisi saf su ile akıtılmıştır. Sonrasında preparatlar %95'lik etil alkol ile kaplanıp 15 saniye bekletilmiş ve süre sonunda distile su ile yıkanmıştır. Son aşama olarak preparatların üzerine safranin boyası eklenip 30 saniye bekletilmiş, daha sonra distile su ile yıkanmıştır. Preparatlar kuruduktan sonra üzerine immersiyon yağı damlatılarak ışık mikroskopunda incelenmiştir. İnceleme sonunda menekşe moru olarak gözlenen mikroorganizmalar Gram pozitif, pembe renkte gözlenen koloniler Gram negatif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca mikroorganizmalar hücre şekillerine göre kok ya da basil olarak da ayrılmışlardır (Sharpe, 1979; Norris ve ark., 1981, Yılmaz ve ark., 2015).

Katalaz Testi

Mikroorganizmalarda katalaz enziminin bulunup bulunmadığını tespit etmek amacıyla Katalaz testi uygulanmıştır. Sıvı besiyerinde gelişen 24 saatlik genç kültürlerin üzerine 1 mL %30'luk hidrojen peroksit (H₂O₂) eklenmiş ve gaz çıkışı olup olmadığı gözlenmiştir. Gaz çıkışı gözlenen koloniler Katalaz pozitif, gaz çıkışı gözlenmeyen koloniler ise Katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Whittenbury, 1964).

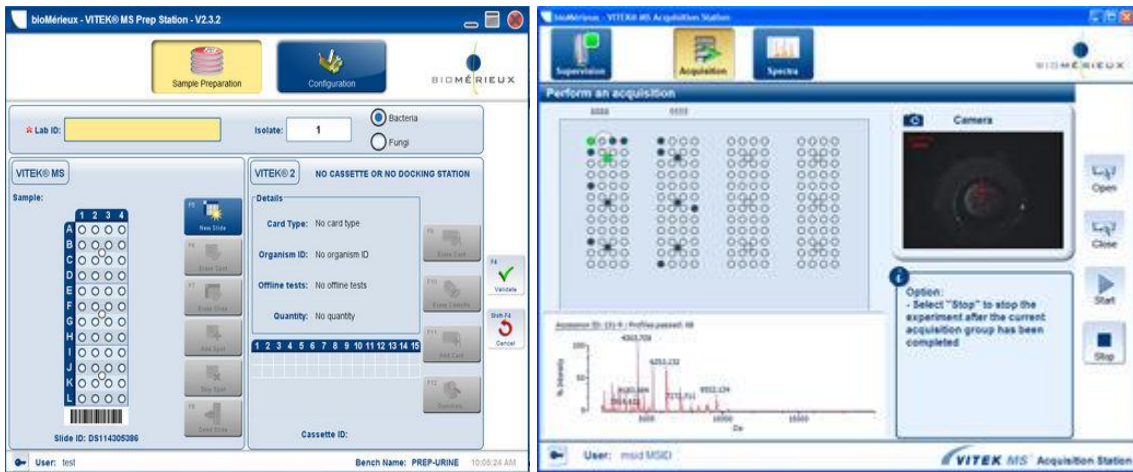
3.2.2.5. MALDI-TOF MS ile Tanımlama

Saf kültür olarak elde edilen ve cins düzeyinde tanımlanan mikroorganizmaların MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) yöntemi ile tür düzeyinde tanımlanması Tarım ve Orman Bakanlığı Bursa Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Ulusal Gıda Starter Kültür Gen Bankası bünyesinde bulunan VITEK ® MALDI- TOF MS (bioMérieux SA, Marcy- l'E'toile, Fransa) cihazı ile gerçekleştirilmiştir (Bereze ve ark., 2013; Lagier ve ark., 2018). MALDI-TOF MS cihazında tanımlama için laktik asit bakteri izolatları M17, MRS ve KAA Agar katı besiyerlerine ekilmiş ve 10 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından katı besiyerinde gelişen kültürler incelenmiş, her bir Petri kutusunda gelişen kolonilerden küçük olanlar tercih edilmiştir. Seçilen koloniler öze ile hedef plaka üzerindeki noktasal hücrelere alınmış ve kolonilerin üzeri 1 µl CHCA (α -siyano-4-hidroksisünamik asit) matriks solüsyonu ile kaplanmıştır. Oda sıcaklığında aseptik koşullar altında 2-3 dakika solüsyonun kuruması beklenmiş ve sonrasında hedef plaka cihaza yüklenmiştir (Matsuda, 2012). Şekil 3.4'te mikroorganizma kültürlerinin VITEK ® MALDI-TOF MS hedef plakası ile cihaza yüklenmesi gösterilmiştir.

Cihazın kalibrasyonu kütle spektrumu bilinen *Escherichia coli* ATCC 8739 ile yapılmıştır. Mikroorganizmaların cihaza yüklenmesinin ardından okumalar optimum ayar ile gerçekleştirilmiş ve spektrumlar elde edilmiştir. Elde edilen spektrumların değerlendirilmesi Shimadzu Biotech Launchpad v.2.9.3 yazılımı kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.4. MALDI-TOF MS plakası ve mikroorganizmaların cihaza yüklenmesi.



Şekil 3.5. VITEK® MS Acquisition Station ekran görüntüsü.

3.2.3. Shotgun Metagenom Dizileme ile Tanımlama

Bu çalışmada, gıda ve çevresel örneklerin mikrobiyel kompozisyonlarının karakterize edebilmesi amacıyla kültürömik metodu ile kültürden bağımsız yüksek çıktılı yeni nesil dizileme yöntemine dayalı shotgun metagenomik analizler eşzamanlı yürütülmüştür. Shotgun metagenom dizileme adımlarından genomik DNA ekstraksiyonu, DNA kütüphanesi hazırlama, yeni nesil dizileme ve biyoinformatik analizler hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu

Genomik DNA ekstraksiyonu, gıda ve çevresel örneklerinden direkt olarak, mikroorganizma kültürleri elde edilmeden gerçekleştirilmiştir (Cerutti ve ark., 2019). GeneMATRIX Bacterial&Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx, Polonya) kullanılmış ve kitin protokolünde minör değişiklikler yapılarak protokol takip edilmiştir (Anonim, 2019a). DNA izolasyonu protokolü iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama örneğin hazırlanması ve liziz, ikinci aşama ise DNA ekstraksiyonudur.

Örneğin hazırlanması ve liziz aşaması,

1. 200 µl örnek ve 200 µl Lyse BG 1,5 ml'lik Eppendorf tüpe eklenmiştir. Ardından karışıma 50 µl Buffer BL ve 2 µl RNase A eklenerek pipetleme yöntemiyle karıştırılmıştır.
2. Tüp 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.

DNA izolasyonu aşaması;

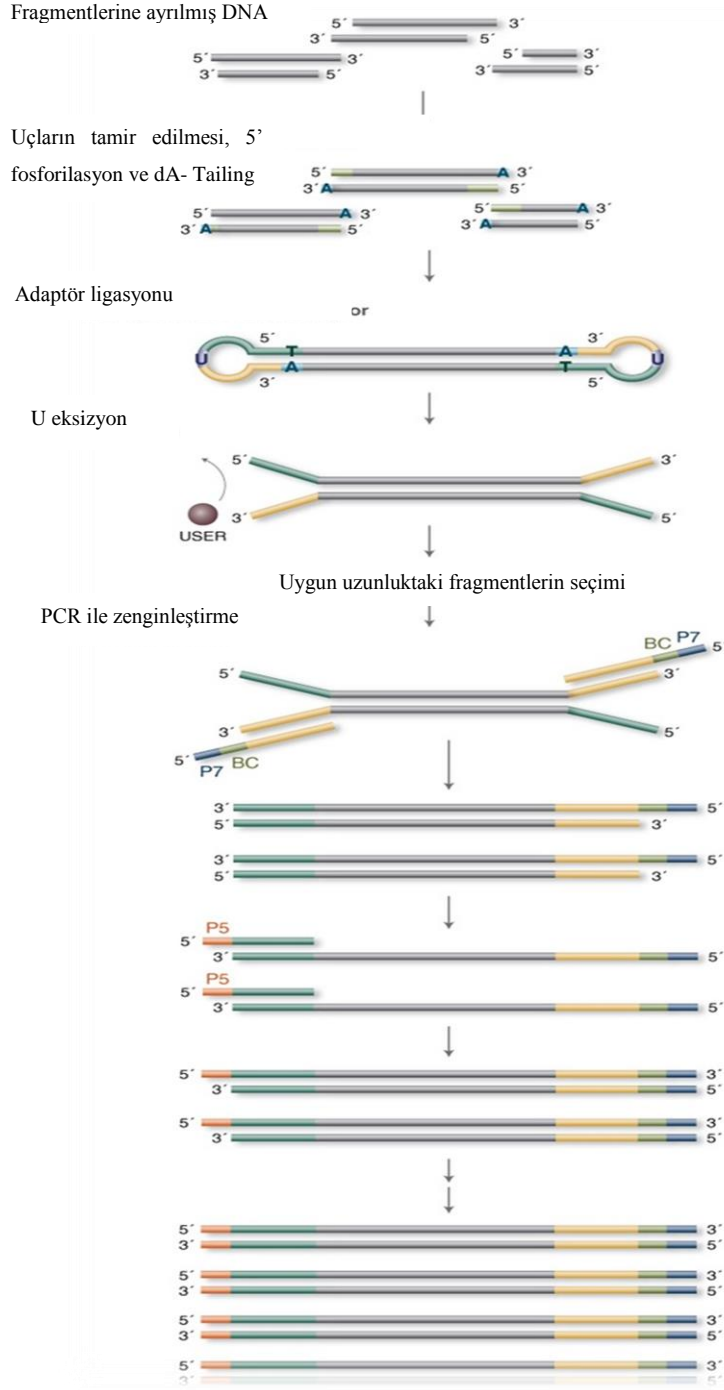
1. İnkübasyonun ardından karışıma 15 µl Proteinase K eklenmiş ve 3 saniye vortekslenmiştir.
2. Karışım 55°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında tüp birkaç kere karıştırılmıştır.
3. Tüpe 350 µl Buffer Sol BG eklenmiş ve vorteks ile 3 saniye karıştırılmıştır.
4. 55°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyonun ardından tüp vorteks yardımıyla 15 saniye karıştırılmıştır.
6. Karışım 11000 devirde 2 dakika santrifüjlenmiş, 600 µl süpernatant spin kolona alınmıştır.
7. Spin kolon 11000 devirde 1 dakika santrifüjlenmiş ardından toplama tüpünde biriken süzüntü uzaklaştırılmıştır.
8. Spin kolon aynı toplama tüpüne yerleştirilerek tekrar 11000 devirde 1 dakika santrifüjlenmiş ve toplama tüpünde biriken süzüntü uzaklaştırılmıştır. Ardından spin kolon alıcı tüpe yerleştirilmiştir.
9. Spin kolona 450 µl Wash BGX buffer eklenip 11000 devirde 1 dakika santrifüj edilmiştir.
10. Spin kolon çıkarılarak süzüntü dökülmüştür daha sonra spin kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

11. Spin kolona tekrar 450 µl Wash BGX buffer eklenip 11000 devirde 1 dakika santrifüj edilmiştir.
12. Spin kolon çıkarılarak süzüntü dökülmüştür daha sonra spin kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
13. Wash BGX bufferın tüm kalıntılarını gidermek için tüp 11000 devirde 1 dakika daha santrifüj edilmiştir.
14. Spin kolon toplama tüpünden çıkarılarak yeni bir alıcı tüpe yerleştirilir. Spin kolona DNA'nın membrandan ayırma etkinliğinin artırılması için 80°C'ye ısıtılan 50 µl Elution buffer eklenir.
15. Spin kolon ve alıcı tüp oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir.
16. Daha sonra 11000 devirde 1 dakika santrifüj edilerek genomik DNA alıcı tüpte toplanmıştır.
17. Spin kolon alıcı tüpten çıkarılarak alıcı tüpün ağzı kapatılmış ve ekstraksiyonu tamamlanan DNA -18°C'de saklanmıştır.

Her bir örnekten ekstrakte edilen genomik DNA'ların konsantrasyon ve saflık kontrolleri spektrofotometre (Nanodrop 2000c, ThermoScientific, Almanya) ile yapılmıştır.

3.2.3.2. DNA Kütüphanesi Hazırlama

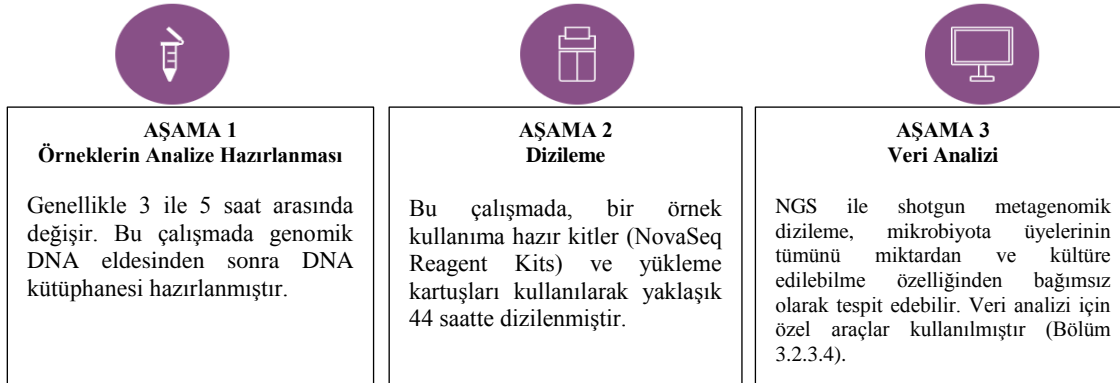
Ekstrakte edilen DNA'lardan kütüphane hazırlanırken NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB E7645S/L, New England BioLabs® Inc.) kiti kullanılmıştır (Kader ve ark., 2016). Tüm genom olarak ekstrakte edilen DNA'lar dizilenmek için 350 baz çifti uzunluğunda parçalara ayrılır. Bunun için 1 µg DNA başlangıç materyali olarak alınarak kit protokolü uygulanmış ve DNA rastgele kesim noktalarından fragmentlerine ayrılmıştır. Ardından bu fragmentlerin uçları tamir edilmiş, fosforilasyon işlemi uygulanmış ve son olarak A- tailing işlemi uygulanmıştır. Daha sonra DNA fragmentlerinin uçlarına adaptörler (NEBNext, New England® Biolabs Inc) bağlanmıştır. Daha sonra bu DNA fragmentleri uçlarına eklenmiş adaptörler sayesinde oligonükleotitlerle (P5, P7 oligonükleotitleri) kaplı akış hücrelerine bağlanmış ve PCR döngüleri ile zenginleştirilmiş kümeler oluşturulmuştur (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. NEBNext® Ultra™ II DNA kütüphanesi hazırlığı iş akışı.

3.2.3.3. Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing, NGS)

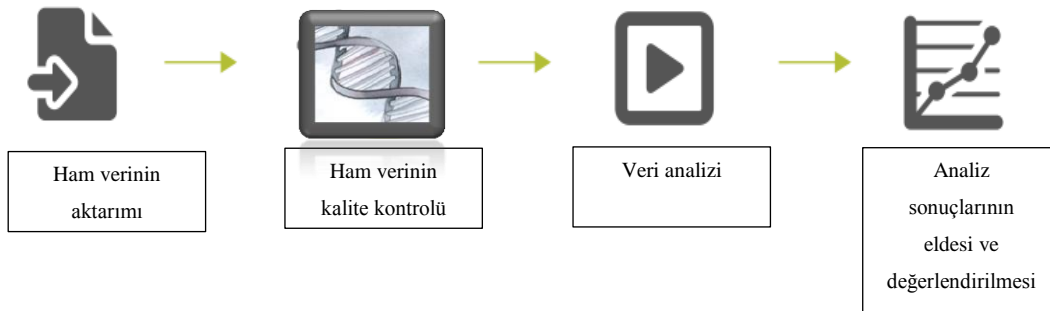
Hazırlanan kütüphaneler NGS platformu Novaseq6000 (Illumina, ABD) kullanılarak dizilenmiştir, 350 baz çifti uzunluğundaki DNA parçalarından okumalar elde edilmiştir. Dizileme işlemine ait iş akışı Şekil 3.7’de verilmiştir. Novaseq6000 cihazında okuma için ticari bir firma aracılığı ile yurt dışı hizmet alımı gerçekleştirilmiştir (Anonim, 2019b).



Şekil 3.7. Yeni nesil dizileme (NGS) iş akışı.

3.2.3.4. Biyoinformatik Analizler

Biyoinformatik analizlerle yeni nesil dizileme sonucu elde edilen ham veriler (raw data) anlamlı verilere dönüştürülmüştür (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Veri analizi iş akış şeması.

Bunun için öncelikle ham veriden adaptörler ve ev sahibi (host) genom ayrılmıştır. Daha sonra düşük kalitedeki okumaların ayrılması amacıyla filtreleme yapılmıştır. Filtreleme ve ham verinin kalite kontrolü için FastQC programı kullanılmıştır (Anonim, 2019c). FastQC, çoklu modüllerin sonuçlarını verir ve normal (yeşil onay işareti), hafif anormal (turuncu üçgen) ve çok sıradışı (kırmızı çarpı) olarak etiketlenmiş sonuçların kalitesinin hızlı bir şekilde değerlendirilmesini sağlar (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. FastQC programı özellikleri.

Fonksiyon	Dizileme verileri için bir kalite kontrol aracı
Dil	Java
Gereksinim	Java Runtime Environment Picard BAM / SAM Kütüphaneler (Picard araç seti MIT lisansı altında açık kaynak kodlu ve tüm kullanımlar için ücretsizdir)
Kodlar	Genel Kamu Lisansına sahiptir

Assembly aşamasında SOAPdenovo (Anonim, 2019d) ve MEGAHIT (Anonim, 2019e) uygulamaları kullanılmıştır. SOAPdenovo çok büyük boyutlu genomlar için bir de novo taslak düzeneği oluşturabilen yeni kısa okuma düzeneğidir. Program, Illumina cihazından elde edilen kısa okuma parçalarını birleştirmek ve özellikle bitki ve hayvan genomları ile çalışmak için özel olarak tasarlanmıştır. Referans dizileri oluşturmak ve uzun genomların analizlerini doğru bir şekilde yapmak için kullanılmaktadır. MEGAHIT ultra hızlı ve hafıza açısından verimli bir NGS veri birleştiricisidir. Metagenom verileri için optimize edilmiştir, fakat aynı zamanda jenerik tek genom düzeneği (küçük boyutta) ve mikroorganizmaların dizi verileri üzerinde iyi çalışan bir uygulamadır.

Bu çalışmada, taksonomik analizler DIAMOND yazılımı ile yapılmış olup sonuçlar Krona grafikleri ve ısı haritaları ile sunulmuştur (Escobar-Zepeda ve ark., 2015; Anonim, 2019f). Protein sekansları için de verimli olan DIAMOND, bu çalışmada DNA sekanslarını yüksek hassasiyetle hizalamak için kullanılmıştır. Illumina'dan elde edilen 100-150 bp uzunluğunda veriler için, hassas modda DIAMOND tüm eşleşmelerin %94'ünden fazlasını taksonomik olarak tanımlayabilmektedir (Buchfink ve ark., 2015).

Krona, güçlü bir metagenomik görselleştirme aracı ve anlaşılır biyoinformatik görselleştirmeler için HTML5 dilini kullanan bir grafik programıdır. Krona grafikleri, metagenomik analizlerin daha iyi yorumlanmasını sağlar, tarayıcı tabanlı bir uygulama olarak biyoinformatik uzmanı olmayanlar tarafından da kullanılabilir ve mevcut analiz paketlerine kolayca adapte olabilir. Krona açık kaynaklı lisansı ile serbestçe kullanılabilir (Ondov ve ark., 2011; Anonim, 2019g).

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Kültüromik yaklaşımı ile Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon ve Tanımlanması

Bu çalışmada kültüromik yaklaşımı, laktik asit bakterilerinin tanımlanması için seçici besiyerinde geliştirilmiş saf kültürlerin ön tanımlamasının klasik kültürel yöntemler ile yapılması ve matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS) ile tür düzeyinde tanımlanmasına izin veren bir yöntem olarak çerçevelenmiştir.

4.1.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Çalışmanın çerçevesi kapsamında, beyaz peynir üretim sürecine ilişkin süt ürünleri, peynir ve çevre mikrobiyotasının dinamikleri hakkında kapsamlı bir açıklama sağlamak amacıyla beyaz peynir üretim hattından gıda ve çevresel örnekler “süt ürünü örnekleri (D)” ve “ekipman yüzey örnekleri (E)” olmak üzere alınmıştır. Bu örnekler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada M17 Agar besiyeri, MRS Agar besiyeri ve KAA Agar besiyeri kullanılarak sırasıyla 117 adet, 64 adet ve 54 adet bakteri izole edilmiştir.

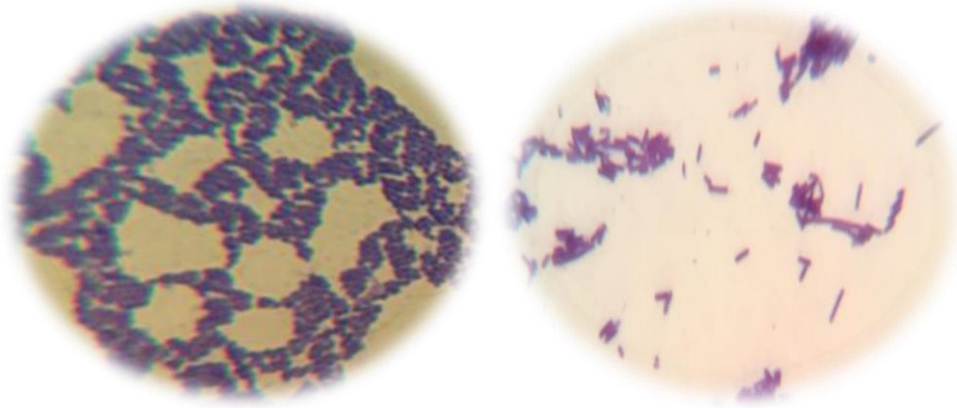
4.1.2. Klasik Kültürel Yöntemlerle Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi

İzole edilen bakterilerden laktik asit bakterisi (LAB) olanların belirlenmesi amacıyla Schilinger ve Lücke (1987)'nin tanımlama tablosundan yararlanılmıştır. Buna göre izolatların makroskopik ve mikroskopik morfolojileri incelenmiş, Gram boyama ve Katalaz testi uygulanmıştır. Gram pozitif ve Katalaz negatif olan izolatlar laktik asit bakterisi olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.1'de Gram pozitif kok ve basil şekilli bakterilerin mikroskop görüntüleri verilmiştir. M17 besiyerinden izole edilen bakterilerin 86 adedi, MRS agar besiyerinden izole edilen bakterilerin 61 adedi ve KAA agar besiyerinden izole edilen bakterilerin 54 adedi laktik asit bakterisi olarak değerlendirilmiştir.

Bu mikroorganizmaların makroskopik ve mikroskopik özellikleri ile Gram boyama ve Katalaz testi sonuçları Çizelge 4.1, Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te verilmiştir. Buna göre M17 agar besiyerinden izole edilen ve laktik asit bakterisi olarak değerlendirilen 86 izolatın, 45 adedi süt ürünü örneklerinden (D, N1-N5), 41 adedi ekipman yüzey

örneklerinden (E, N6- N10) elde edilmiştir. MRS agar besiyerinden izole edilen ve laktik asit bakterisi olarak değerlendirilen 61 adet izolatın 37 adedi süt ürünü örneklerinden, 24 adedi ekipman yüzey örneklerinden elde edilmiştir. KAA agar besiyerinden izole edilen ve laktik asit bakterisi olarak değerlendirilen 54 izolatın, 26 adedi süt ürünü örneklerinden, 28 adedi ekipman yüzey örneklerinden elde edilmiştir.

M17 ve MRS agardan izole edilen ve laktik asit bakterisi olmadığı değerlendirilen bakterilerin makroskopik ve mikroskopik özellikleri ile Gram boyama ve Katalaz testi sonuçları Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5’te verilmiştir. KAA agardan laktik asit bakterisi olmadığı değerlendirilen bakteri izole edilmemiştir. Laktik asit bakterisi olduğu ve laktik asit bakterisi olmadığı değerlendirilen izolatlardan MALDI-TOF MS yöntemi ile tür düzeyinde tanımlamaya gidilmiştir.



Şekil 4.1. Gram pozitif kok ve basillerin mikroskop görüntüleri.

Çizelge 4.1. M17 Agardan izole edilen LAB olduğu değerlendirilen izolatların makroskopik ve mikroskopik özellikleri ile Gram ve Katalaz reaksiyonu sonuçları.

No	Kaynak	İzolat kodu	Makroskopik Morfoloji	Mikroskopik Morfoloji	Gram reaksiyonu sonucu	Katalaz Testi
1.	N1	HUF19ZN1M1001	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Kısa zincir şeklinde dizilmiş koklar	+	-
2.		HUF19ZN1M1004	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
3.		HUF19ZN1M1005	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
4.		HUF18ZN1M1002	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Kısa zincir şeklinde dizilmiş koklar	+	-
5.		HUF18ZN1M1004	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-

6.		HUF18ZN1M2003	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
7.		HUF18ZN1M2004	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
8.	N2	HUF19ZN2M1007	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
9.		HUF19ZN2M1009	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Kokobasiller	+	-
10.		HUF19ZN2M1010	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Kokobasiller	+	-
11.		HUF19ZN2M1011	Krem rengi, kenarları düzgün olmayan koloniler	Çomak şekilli hücreler	+	-
12.		HUF19ZN2M1012	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Uzun zincir şeklinde dizilmiş koklar	+	-
13.		HUF19ZN2M1013	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Kısa zincir şeklinde dizilmiş koklar	+	-
14.		HUF18ZN2M1005	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
15.		HUF18ZN2M1006	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
16.		HUF18ZN2M1008	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
17.		HUF18ZN2M1009	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
18.	N3	HUF19ZN3M1014	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Kısa zincir şeklinde dizilmiş koklar	+	-
19.		HUF19ZN3M1015	Krem rengi, kenarları düzgün olmayan koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
20.		HUF19ZN3M1016	Krem rengi, kenarları düzgün olmayan koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
21.		HUF19ZN3M1017	Krem rengi, kenarları düzgün olmayan koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
22.		HUF19ZN3M1018	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
23.		HUF18ZN3M1011	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Kısa zincir şeklinde dizilmiş koklar	+	-
24.		HUF18ZN3M1012	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
25.		HUF18ZN3M1013	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Kısa zincir şeklinde dizilmiş koklar	+	-
26.		HUF18ZN3M1014	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
27.		HUF18ZN3M2004	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
28.	HUF18ZN3M2011	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-	
29.	N4	HUF19ZN4M1023	Krem rengi düzgün kenarlı küçük koloniler	Kokobasiller	+	-
30.		HUF19ZN4M1026	Krem rengi düzgün kenarlı koloniler	Kısa zincir şeklinde dizilmiş koklar	+	-
31.		HUF19ZN4M1027	Krem rengi düzgün kenarlı koloniler	Kısa zincir şeklinde dizilmiş koklar	+	-
32.		HUF18ZN4M1015	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
33.		HUF18ZN4M1017	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
34.		HUF18ZN4M1018	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
35.	N5	HUF19ZN5M1028	Krem rengi düzgün kenarlı küçük koloniler	Kokobasiller	+	-
36.		HUF19ZN5M1030	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Kokobasiller	+	-

37.		HUF19ZN5M1031	Krem rengi düzgün kenarlı orta büyüklükte koloniler	Diplokoklar	+	-
38.		HUF19ZN5M1032	Beyaz düzgün kenarlı orta büyüklükte koloniler	Gram pozitif çomak şekilli hücreler	+	-
39.		HUF19ZN5M1033	Beyaz düzgün kenarlı orta büyüklükte koloniler	Gram pozitif çomak şekilli hücreler	+	-
40.		HUF19ZN5M1034	Beyaz düzgün kenarlı orta büyüklükte koloniler	Kokobasiller	+	-
41.		HUF18ZN5M1019	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
42.		HUF18ZN5M1021	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
43.		HUF18ZN5M1022	Krem rengi düzgün kenarlı koloniler	Kısa zincir şeklinde dizilmiş koklar	+	-
44.		HUF18ZN5M2007	Beyaz düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
45.		HUF18ZN5M2020	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
46.	N6	HUF19ZN6M1035	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Büyük oval hücreler	+	-
47.		HUF19ZN6M1037	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Kokobasiller	+	-
48.		HUF19ZN6M1038	Beyaz düzgün kenarlı küçük koloniler	Kokobasiller	+	-
49.		HUF18ZN6M1025	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
50.		HUF18ZN6M2009	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Kokobasiller	+	-
51.		HUF18ZN6M2024	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
52.		N7	HUF19ZN7M1039	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş koklar	+
53.	HUF19ZN7M1041		Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Kokobasiller	+	-
54.	HUF19ZN7M1042		Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Kokobasiller	+	-
55.	HUF19ZN7M1043		Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Kısa zincir şeklinde dizilmiş koklar	+	-
56.	HUF19ZN7M1044		Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
57.	HUF18ZN7M1027		Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
58.	HUF18ZN7M1028		Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
59.		HUF18ZN7M2010	Krem rengi, düzgün kenarlı, parlak koloniler	Diplokoklar	+	-
60.	N8	HUF19ZN8M1045	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Kokobasiller	+	-
61.		HUF19ZN8M1046	Beyaz düzgün kenarlı küçük koloniler	Kokobasiller	+	-
62.		HUF19ZN8M1047	Beyaz düzgün kenarlı küçük koloniler	Kokobasiller	+	-
63.		HUF19ZN8M1049	Krem rengi, düzgün kenarlı parlak büyük koloniler	Diplokoklar	+	-
64.		HUF19ZN8M1050	Beyaz düzgün kenarlı küçük koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
65.		HUF18ZN8M1030	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
66.		HUF18ZN8M1031	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
67.		HUF18ZN8M2029	Beyaz, düzgün kenarlı orta büyüklükte koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
68.	N9	HUF19ZN9M1051	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Diplokoklar	+	-
69.		HUF19ZN9M1052	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Kokobasiller	+	-

70.		HUF19ZN9M1054	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Kokobasiller	+	-
71.		HUF19ZN9M1055	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Kokobasiller	+	-
72.		HUF18ZN9M1033	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
73.		HUF18ZN9M2011	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
74.		HUF18ZN9M2032	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
75.	N10	HUF19ZN10M1056	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
76.		HUF19ZN10M1058	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Kısa zincir şeklinde dizilmiş koklar	+	-
77.		HUF19ZN10M1059	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
78.		HUF19ZN10M1060	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
79.		HUF19ZN10M1061	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
80.		HUF18ZN10M1035	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Kısa zincir şeklinde dizilmiş koklar	+	-
81.		HUF18ZN10M1036	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
82.		HUF18ZN10M1039	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
83.		HUF18ZN10M2037	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
84.		HUF18ZN10M2040	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
85.		HUF18ZN10M2012	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
86.		HUF18ZN10M2013	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-

+ Reaksiyon sonucu pozitifdir.

- Reaksiyon sonucu negatiftir.

Çizelge 4.2. MRS Agardan izole edilen LAB olduğu değerlendirilen izolatların makroskopik ve mikroskopik özellikleri ile Gram ve Katalaz reaksiyonu sonuçları.

No	Kaynak	İzolat kodu	Makroskopik Morfoloji	Mikroskopik Morfoloji	Gram reaksiyonu sonucu	Katalaz Testi
1.	N1	HUF19ZN1R1001	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
2.		HUF19ZN1R1002	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
3.		HUF19ZN1R1003	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
4.		HUF18ZN1R1001	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
5.		HUF18ZN1R2025	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
6.		HUF18ZN1R2026	Krem rengi düzgün kenarlı koloniler	Kısa zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
7.	N2	HUF19ZN2R1004	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
8.		HUF19ZN2R1005	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
9.		HUF19ZN2R1006	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-

10.		HUF19ZN2R1007	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
11.		HUF18ZN2R1002	Krem rengi düzgün kenarlı koloniler	Kısa zincir şeklinde dizilmiş koklar	+	-
12.		HUF18ZN2R1003	Krem rengi düzgün kenarlı koloniler	Kısa zincir şeklinde dizilmiş koklar	+	-
13.		HUF18ZN2R1004	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
14.		HUF18ZN2R2027	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
15.		HUF18ZN2R2028	Krem rengi, düzgün kenarlı orta büyüklükte koloniler	Basiller	+	-
16.	N3	HUF19ZN3R1008	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
17.		HUF19ZN3R1009	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
18.		HUF19ZN3R1010	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
19.		HUF18ZN3R1005	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
20.		HUF18ZN3R2029	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
21.		HUF18ZN3R2030	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
22.	N4	HUF19ZN4R1011	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
23.		HUF19ZN4R1012	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
24.		HUF19ZN4R1013	Beyaz, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
25.		HUF18ZN4R1011	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir halinde dizilmiş basiller	+	-
26.		HUF18ZN4R2006	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
27.		HUF18ZN4R2007	Krem rengi, düzgün kenarlı orta büyüklükte koloniler	Basiller	+	-
28.		HUF18ZN4R2008	Krem rengi, düzgün kenarlı küçük koloniler	Basiller	+	-
29.	N5	HUF19ZN5R1014	Krem rengi düzgün kenarlı koloniler	Kısa basiller	+	-
30.		HUF19ZN5R1015	Krem rengi düzgün kenarlı koloniler	Orta uzunlukta basiller	+	-
31.		HUF19ZN5R1016	Krem rengi düzgün kenarlı koloniler	Basiller	+	-
32.		HUF19ZN5R1017	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
33.		HUF19ZN5R1018	Krem rengi düzgün kenarlı koloniler	Uzun basiller	+	-
34.		HUF18ZN5R2010	Krem rengi, düzgün kenarlı orta büyüklükte koloniler	Basiller	+	-

35.		HUF18ZN5R2031	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
36.		HUF18ZN5R2032	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
37.		HUF18ZN5R1018	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
38.	N6	HUF19ZN6R1019	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
39.		HUF19ZN6R1020	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
40.		HUF19ZN6R1021	Krem rengi düzgün olmayan kenarlı, parlak koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
41.		HUF18ZN6R1011	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
42.		HUF18ZN6R1014	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
43.	N7	HUF19ZN7R1022	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
44.		HUF19ZN7R1023	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
45.		HUF19ZN7R1024	Krem rengi, düzgün olmayan kenarlı koloniler	Basiller	+	-
46.		HUF18ZN7R1015	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Kısa zincir şeklinde dizilmiş koklar	+	-
47.		HUF18ZN7R2034	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Basiller	+	-
48.	N8	HUF19ZN8R1025	Krem rengi, düzgün olmayan kenarlı koloniler	Basiller	+	-
49.		HUF19ZN8R1026	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Basiller	+	-
50.		HUF19ZN8R1027	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
51.		HUF19ZN8R1028	Krem rengi düzgün kenarlı küçük koloniler	Orta uzunlukta basiller	+	-
52.		HUF18ZN8R2016	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Basiller	+	-
53.		HUF18ZN8R2017	Krem rengi, düzgün olmayan kenarlı orta büyüklükte koloniler	Basiller	+	-
54.	N9	HUF19ZN9R1029	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Basiller	+	-
55.		HUF19ZN9R1030	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Basiller	+	-
56.		HUF18ZN9R1020	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
57.		HUF18ZN9R2019	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
58.	N10	HUF19ZN10R1031	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Basiller	+	-
59.		HUF19ZN10R1032	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Basiller	+	-

60.	HUF18ZN10R2022	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-
61.	HUF18ZN10R2023	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Zincir şeklinde dizilmiş basiller	+	-

+ Reaksiyon sonucu pozitifdir.

- Reaksiyon sonucu negatifdir.

Çizelge 4.3. KAA Agardan izole edilen LAB olduğu değerlendirilen izolatların makroskopik ve mikroskopik özellikleri ile Gram ve Katalaz reaksiyonu sonuçları.

No	Kaynak	İzolat kodu	Makroskopik Morfoloji	Mikroskopik Morfoloji	Gram reaksiyonu sonucu	Katalaz Testi
1.	N1	HUF19ZN1K1001	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
2.		HUF19ZN1K1002	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
3.		HUF19ZN1K1003	Siyah zon oluşturmuş, krem rengi koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
4.		HUF18ZN1K1003	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
5.		HUF18ZN1K1020	Siyah zon oluşturmuş gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
6.		HUF19ZN1K1022	Siyah zon oluşturmuş gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
7.	N2	HUF19ZN2K1004	Siyah zon oluşturmuş, dışı krem rengi harelî siyah koloniler	Arka arkaya dizilmiş kısa basiller	+	-
8.		HUF19ZN2K1005	Siyah zon oluşturmuş, gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
9.		HUF19ZN2K1006	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
10.		HUF19ZN2K1007	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
11.		HUF19ZN2K1008	Siyah zon oluşturmuş, dışı krem rengi harelî gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
12.		HUF18ZN2K1028	Siyah zon oluşturmuş, gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
13.	N3	HUF19ZN3K1009	Siyah zon oluşturmuş, gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
14.		HUF19ZN3K1010	Siyah zon oluşturmuş, dışı krem rengi harelî gri koloniler	Kokobasiller	+	-
15.		HUF19ZN3K1011	Siyah zon oluşturmuş, dışı krem rengi harelî gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
16.		HUF19ZN3K1012	Siyah zon oluşturmuş, gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
17.		HUF18ZN3K1006	Siyah zon oluşturmuş, siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
18.	N4	HUF19ZN4K1013	Siyah zon oluşturmuş, gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
19.		HUF19ZN4K1014	Siyah zon oluşturmuş, gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
20.		HUF19ZN4K1015	Siyah zon oluşturmuş, gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-

21.		HUF19ZN4K1016	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
22.		HUF19ZN4K1017	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
23.		HUF18ZN4K1008	Siyah zon oluşturmuş gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
24.	N5	HUF19ZN5K1018	Siyah zon oluşturmuş, dışı krem rengi harelî gri koloniler	Kokobasiller	+	-
25.		HUF19ZN5K1019	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
26.		HUF18ZN5K1009	Siyah zon oluşturmuş gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
27.	N6	HUF19ZN6K1020	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
28.		HUF19ZN6K1021	Siyah zon oluşturmuş, dışı krem rengi harelî siyah koloniler	Koklar	+	-
29.		HUF19ZN6K1022	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
30.		HUF18ZN6K1013	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
31.		HUF18ZN6K1014	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
32.		HUF18ZN6K1015	Siyah zon oluşturmuş gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
33.	N7	HUF19ZN7K1023	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
34.		HUF19ZN7K1024	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
35.		HUF19ZN7K1025	Siyah zon oluşturmuş gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
36.		HUF18ZN7K1016	Siyah zon oluşturmuş gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
37.		HUF18ZN7K1017	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
38.	N8	HUF19ZN8K1026	Siyah zon oluşturmuş, dışı krem rengi harelî gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
39.		HUF19ZN8K1027	Siyah zon oluşturmuş, dışı krem rengi harelî siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
40.		HUF19ZN8K1028	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
41.		HUF18ZN8K1018	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
42.		HUF18ZN8K1019	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
43.		HUF18ZN8K1021	Siyah zon oluşturmuş krem rengi koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
44.	N9	HUF19ZN9K1029	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
45.		HUF19ZN9K1030	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-

46.		HUF18ZN9K1022	Siyah zon oluşturmuş krem rengi koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
47.		HUF18ZN9K1023	Siyah zon oluşturmuş gri koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
48.		HUF18ZN9K1024	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
49.		HUF18ZN9K1025	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
50.		HUF18ZN9K1026	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
51.	N10	HUF19ZN10K1033	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
52.		HUF19ZN10K1034	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
53.		HUF19ZN10K1035	Siyah zon oluşturmuş siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-
54.		HUF18ZN10K1027	Siyah zon oluşturmuş, siyah koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	-

+ Reaksiyon sonucu pozitifdir.

- Reaksiyon sonucu negatifdir.

Çizelge 4.4. M17 Agar'dan izole edilen LAB olmadığı değerlendirilen izolatların makroskopik ve mikroskopik özellikleri ile Gram ve Katalaz reaksiyonu sonuçları.

No	Kaynak	İzolat kodu	Makroskopik Morfoloji	Mikroskopik Morfoloji	Gram reaksiyonu sonucu	Katalaz Testi
1.	N1	HUF19ZN1M1002	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Basiller	-	+
2.		HUF19ZN1M1006	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Basiller	-	+
3.		HUF19ZN1M1003	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	+
4.		HUF18ZN1M2001	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	+
5.		HUF18ZN1M1001	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	+
6.		HUF18ZN1M1003	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Basiller	-	+
7.	N2	HUF19ZN2M1008	Krem rengi, kenarları düzgün olmayan koloniler	Büyük koklar	+	+
8.		HUF18ZN2M1007	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	+
9.	N3	HUF19ZN3M1019	Krem rengi, kenarları düzgün olmayan koloniler	Diplokoklar	+	+
10.		HUF19ZN3M1020	Krem rengi, kenarları düzgün olmayan koloniler	Zincir şeklinde çok kısa basiller	+	+
11.		HUF18ZN3M2003	Beyaz düzgün kenarlı küçük koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	+
12.		HUF18ZN3M1010	Beyaz düzgün kenarlı küçük koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	+
13.		HUF18ZN3R1004	Beyaz düzgün kenarlı küçük koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	+
14.	N4	HUF19ZN4M1021	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Basiller	-	+

15.		HUF19ZN4M1022	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Basiller	-	+
16.		HUF19ZN4M1024	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Basiller	+	+
17.		HUF19ZN4M1025	Krem rengi düzgün kenarlı koloniler	Basiller	+	+
18.		HUF18ZN4M2006	Beyaz düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	+
19.		HUF18ZN4M2005	Beyaz düzgün kenarlı koloniler	Diplokoklar	+	+
20.		HUF18ZN4M1016	Beyaz düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	+
21.	N5	HUF19ZN5M1029	Krem rengi düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	+
22.		HUF18ZN5M2008	Beyaz düzgün kenarlı koloniler	Diplokoklar	+	+
23.	N6	HUF19ZN6M1036	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Basiller	-	+
24.		HUF18ZN6M1023	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Basiller	-	+
25.	N7	HUF19ZN7M1040	Krem rengi, düzgün kenarlı parlak koloniler	Basiller	-	+
26.		HUF18ZN7M1026	Krem rengi, düzgün kenarlı parlak koloniler	Kokobasiller	-	+
27.	N8	HUF19ZN8M1048	Beyaz düzgün kenarlı küçük koloniler	Kokobasiller	+	+
28.	N10	HUF19ZN10M1057	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	+
29.		HUF18ZN10M2039	Beyaz, düzgün kenarlı küçük koloniler	Kokobasiller	+	+
30.		HUF18ZN10M1034	Krem rengi, düzgün kenarlı parlak koloniler	Kokobasiller	-	+
31.		HUF18ZN10M1038	Krem rengi, düzgün kenarlı koloniler	Tetrat oluşturmuş koklar	+	+

+ Reaksiyon sonucu pozitifdir.

- Reaksiyon sonucu negatifdir.

Çizelge 4.5. MRS Agar'dan izole edilen LAB olmadığı değerlendirilen izolatların makroskopik ve mikroskopik özellikleri ile Gram ve Katalaz reaksiyonu sonuçları.

No	Kaynak	İzolat kodu	Makroskopik Morfoloji	Mikroskopik Morfoloji	Gram reaksiyonu sonucu	Katalaz Testi
1.	N3	HUF18ZN3R1004	Krem rengi, düzgün kenarlı küçük koloniler	Toplu halde bulunan koklar	+	+
2.	N4	HUF18ZN4R1009	Krem rengi, düzgün kenarlı küçük koloniler	Basiller	-	+
3.	N10	HUF18ZN10R1024	Krem rengi, düzgün kenarlı küçük koloniler	Basiller	-	+

+ Reaksiyon sonucu pozitifdir.

- Reaksiyon sonucu negatifdir.

4.1.3. MALDI-TOF MS ile Tanımlama

MALDI-TOF MS analizi sonucunda elde edilen verilere göre, M17 agar besiyerinden izole edilen ve LAB olduğu değerlendirilen 86 adet izolattan 36 adedi tür düzeyinde tanımlanmıştır, 1 adet mikroorganizma için ise “veri tabanına göre en yakın bulunan

suş” olarak sonuç alınmıştır (Çizelge 4.6). 49 adet mikroorganizmanın tanımlaması ise gerçekleştirilememiştir.

MRS agar besiyerinden izole edilen ve LAB olduğu değerlendirilen 61 adet izolattan 33 adedi tür düzeyinde, 1 adedi cins düzeyinde tanımlanmıştır. 1 adet mikroorganizma için “veri tabanına göre en yakın bulunan suş” olarak sonuç alınmıştır (Çizelge 4.7). 26 adet mikroorganizmanın tanımlaması ise gerçekleştirilememiştir.

KAA agar besiyerinden izole edilen ve LAB olduğu değerlendirilen 54 adet izolattan 40 adedi tür düzeyinde, 8 adedi cins düzeyinde tanımlanmıştır. 2 adet mikroorganizma için “veri tabanına göre en yakın bulunan suş” olarak sonuç alınmıştır (Çizelge 4.8). 4 adet mikroorganizmanın tanımlaması ise gerçekleştirilememiştir.

İzolatlardan “Tanımlama olmadığında veri tabanına göre bulunan en yakın suş” olarak belirtilen bakteriler; *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus gallinarum* ve *Enterococcus gallinarum/Enterococcus casseliflavus* olarak verilmiştir.

Çizelge 4.6. M17 Agardan izole edilen izolatların MALDI-TOF MS tanımlama sonuçları.

	Kaynak	Kod	Tanımlama Yüzdesi (%)	Aile	Cins/ Tür	Tanımlama olmadığında veri tabanına göre bulunan en yakın suş
1.	N1	HUF18ZN1M1002	99,9	Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	
2.		HUF18ZN1M1004				<i>Enterococcus faecium</i>
3.		HUF19ZN1M1001	92,9	Lactobacillaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	
4.		HUF19ZN1M1004	92	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
5.	N2	HUF18ZN2M1005	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
6.		HUF18ZN2M1006	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
7.		HUF18ZN2M1008	75,7	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecium</i>	
8.		HUF18ZN2M1009	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
9.		HUF19ZN2M1007	90	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus paracasei</i>	
10.		HUF19ZN2M1012	77,7	Streptococcaceae	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
11.		HUF19ZN2M1013	92,8	Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	
12.	N3	HUF18ZN3M1011	90,3	Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	
13.		HUF18ZN3M1012	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	

					<i>faecalis</i>	
14.		HUF18ZN3M1013	91	Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	
15.		HUF18ZN3M1014	86,2	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
16.		HUF19ZN3M1014	92,9	Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	
17.	N4	HUF18ZN4M1015	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
18.		HUF18ZN4M1017	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
19.		HUF18ZN4M1018	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
20.		HUF19ZN4M1026	99,9	Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	
21.		HUF19ZN4M1027	85,4	Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	
22.	N5	HUF18ZN5M1019	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
23.		HUF18ZN5M1021	99,5	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
24.		HUF18ZN5M1022	97,1	Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	
25.	N6	HUF18ZN6M1025	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
26.	N7	HUF18ZN7M1027	99,2	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
27.		HUF18ZN7M1028	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
28.		HUF19ZN7M1039	80,6	Streptococcaceae	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
29.		HUF19ZN7M1043	89,4	Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	
30.		HUF19ZN7M1044	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecium</i>	
31.	N8	HUF18ZN8M1030	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
32.		HUF18ZN8M1031	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
33.	N9	HUF18ZN9M1033	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
34.	N10	HUF18ZN10M1035	93,2	Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	
35.		HUF18ZN10M1036	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
36.		HUF18ZN10M1039	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
37.		HUF19ZN10M1058	96,9	Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	

Çizelge 4.7. MRS Agardan elde edilen izolatların MALDI-TOF MS tanımlama sonuçları.

	Kaynak	Kod	Tanımlama Yüzdesi (%)	Aile	Cins/ Tür	Tanımlama olmadığında veri tabanına göre bulunan en yakın suş
1.	N1	HUF18ZN1R2025	84	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
2.		HUF19ZN1R1001	99,9	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus fermentum</i>	
3.		HUF19ZN1R1002	96	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
4.	N2	HUF18ZN2R1002				<i>Lactococcus lactis</i>
5.		HUF18ZN2R1003	91	Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	
6.		HUF18ZN2R1004	99,9	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus brevis</i>	
7.		HUF18ZN2R2027	84	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
8.		HUF19ZN2R1004	96	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	

9.		HUF19ZN2R1006	88	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
10.	N3	HUF18ZN3R1005	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
11.		HUF18ZN3R2029	80	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
12.		HUF18ZN3R2030	96	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
13.		HUF19ZN3R1008	92	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
14.		HUF19ZN3R1009	99,9	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
15.		HUF19ZN3R1010	92	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
16.		N4	HUF18ZN4R1011	90	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus paracasei</i>
17.	HUF18ZN4R2006		84	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
18.	HUF19ZN4R1011		96	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
19.	N5	HUF18ZN5R1018	85	Lactobacillaceae	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	
20.		HUF18ZN5R2031	82,8	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus crispatus</i>	
21.		HUF18ZN5R2032	84	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
22.		HUF19ZN5R1017	96	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
23.	N6	HUF18ZN6R1011	84,4	Enterococcaceae	<i>Enterococcus sp.</i>	
24.		HUF18ZN6R1014	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
25.		HUF19ZN6R1019	92	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
26.		HUF19ZN6R1020	80	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
27.		HUF18ZN6R2012	84	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
28.	N7	HUF18ZN7R1015	92,6	Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	
29.		HUF19ZN7R1022	84	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
30.		HUF19ZN7R1023	99,9	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
31.	N8	HUF19ZN8R1027	99,9	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
32.	N9	HUF18ZN9R1020	96,5	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus brevis</i>	
33.		HUF18ZN9R2019	84	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
34.	N10	HUF18ZN10R2022	92	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
35.		HUF18ZN10R2023	99,9	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	

Çizelge 4.8. KAA Agardan izole edilen izolatların MALDI-TOF MS tanımlama sonuçları.

	Kaynak	Kod	Tanımlama Yüzdesi (%)	Aile	Cins/ Tür	Tanımlama olmadığında veri tabanına göre bulunan en yakın suş
1.	N1	HUF18ZN1K1003	86,3	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
2.		HUF18ZN1K1020	80	Enterococcaceae	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
3.		HUF19ZN1K1022	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
4.		HUF19ZN1K1001	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	

5.		HUF19ZN1K1002	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
6.		HUF19ZN1K1003	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus durans</i>	
7.	N2	HUF18ZN2K1028	84	Enterococcaceae	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
8.		HUF19ZN2K1005	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
9.		HUF19ZN2K1006	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
10.		HUF19ZN2K1007	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
11.	N3	HUF18ZN3K1006	81,4	Enterococcaceae	Enterococcus sp.	
12.		HUF19ZN3K1009	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
13.		HUF19ZN3K1010	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus durans</i>	
14.		HUF19ZN3K1011	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecium</i>	
15.		HUF19ZN3K1012	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
16.	N4	HUF18ZN4K1008	80	Enterococcaceae	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
17.		HUF19ZN4K1013	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
18.		HUF19ZN4K1014	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
19.		HUF19ZN4K1015	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
20.		HUF19ZN4K1016	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
21.		HUF19ZN4K1017	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
22.	N5	HUF18ZN5K1009	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
23.		HUF19ZN5K1018	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus durans</i>	
24.		HUF19ZN5K1019	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
25.	N6	HUF18ZN6K1013	88,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
26.		HUF18ZN6K1014	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
27.		HUF18ZN6K1015				<i>Enterococcus gallinarum</i>
28.		HUF19ZN6K1020	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
29.		HUF19ZN6K1022	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
30.	N7	HUF18ZN7K1016	92	Enterococcaceae	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
31.		HUF18ZN7K1017	75,7	Enterococcaceae	Enterococcus sp.	
32.		HUF19ZN7K1023	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
33.		HUF19ZN7K1024	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
34.		HUF19ZN7K1025	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus gallinarum</i>	
35.	N8	HUF18ZN8K1018	87,3	Enterococcaceae	Enterococcus sp.	
36.		HUF18ZN8K1019	78,6	Enterococcaceae	Enterococcus sp.	
37.		HUF18ZN8K1021	99,9	Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	
38.		HUF19ZN8K1026	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecium</i>	
39.		HUF19ZN8K1028	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
40.	N9	HUF18ZN9K1022	99,9	Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i>	
41.		HUF18ZN9K1023				<i>Enterococcus gallinarum/ Enterococcus casseliflavus</i>
42.		HUF18ZN9K1024	93,2	Enterococcaceae	Enterococcus sp.	
43.		HUF18ZN9K1025	90,1	Enterococcaceae	Enterococcus sp.	
44.		HUF18ZN9K1026	84,3	Enterococcaceae	Enterococcus sp.	
45.		HUF19ZN9K1029	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
46.		HUF19ZN9K1030	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
47.	N10	HUF18ZN10K1027	75,7	Enterococcaceae	Enterococcus sp.	
48.		HUF19ZN10K1033	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
49.		HUF19ZN10K1034	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	
50.		HUF19ZN10K1035	99,9	Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i>	

Çizelge 4.9’da LAB olmayan mikroorganizmaların MALDI-TOF MS analizi sonuçları verilmiştir. Bu mikroorganizmaların 17 adedi M17, 3 adedi MRS agardan izole edilmiştir. Toplamda 18 adet mikroorganizma tür düzeyinde, 2 adet mikroorganizma ise aile düzeyinde tanımlanmıştır.

Çizelge 4.9. Schilinger ve Lücke (1987)’ye göre laktik asit bakterisi olmadığı değerlendirilen izolatların MALDI-TOF MS ile tanımlama sonuçları.

	Kaynak	Kod	Tanımlama Yüzdesi (%)	Aile	Cins/ Tür	Tanımlama olmadığına veri tabanına göre bulunan en yakın suş
1.	N1	HUF19ZN1M1002	86,5	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter cloacae</i>	
2.		HUF19ZN1M1006	75,4	Enterobacteriaceae	ND	
3.		HUF18ZN1M1001	99,9	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i>	
4.		HUF18ZN1M1003	78,4	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter cloacae</i>	
5.	N2	HUF18ZN2M1007	99,9	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i>	
6.	N3	HUF18ZN3M1010	99,9	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i>	
7.		HUF18ZN3R1004	97,2	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus hominis</i>	
8.	N4	HUF19ZN4M1021	85,8	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
9.		HUF19ZN4M1022	98,6	Enterobacteriaceae	ND	
10.		HUF18ZN4M1016	99,9	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i>	
11.		HUF18ZN4R1009	99,9	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i>	
12.	N5	HUF19ZN5M1029	81,8	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
13.	N6	HUF19ZN6M1036	99,9	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i>	
14.		HUF18ZN6M1023	99,9	Enterobacteriaceae	<i>Proteus mirabilis</i>	
15.	N7	HUF19ZN7M1040	76,8	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter cloacae</i>	
16.		HUF18ZN7M1026	99,9	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter pittii</i>	
17.	N10	HUF19ZN10M1057	82,7	Micrococcaceae	<i>Kocuria kristinae</i>	
18.		HUF18ZN10M1034	99,2	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter sp.</i>	
19.		HUF18ZN10M1038	99,9	Micrococcaceae	<i>Micrococcus luteus</i>	
20.		HUF18ZN10R1024	99,9	Enterobacteriaceae	<i>Proteus mirabilis</i>	

Süt ürünü ve yüzey örneklerinden Lactococcus, Lactobacillus ve Enterococcus cinslerine ait en yüksek oranda izole edilen mikroorganizmaların MALDI-TOF MS’te gösterdikleri spektrumlar Ek 2’de verilmiştir.

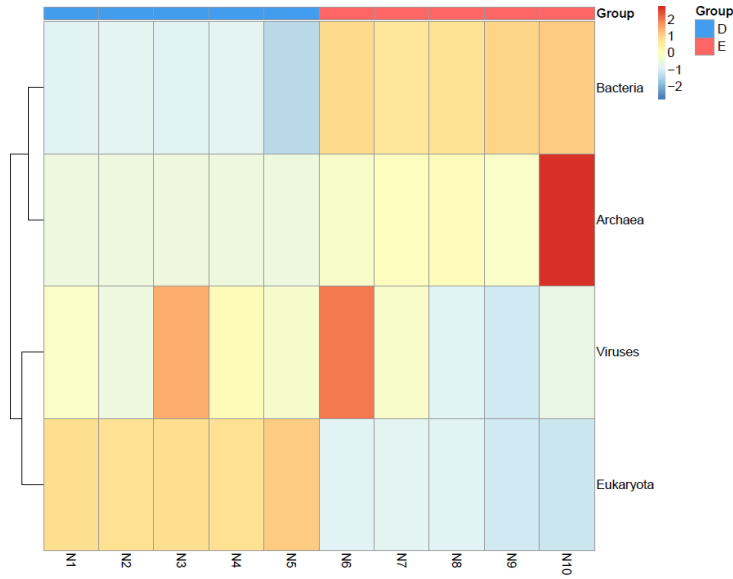
4.2. Shotgun Metagenom Dizileme ile Tanımlama Sonuçları

4.2.1. Biyoinformatik Analiz Verileri

Shotgun Metagenom Dizileme sonucu elde edilen ham verilerin (raw data) anlamlı verilere dönüştürülmesi amacı ile biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir. Biyoinformatik analizler sonucu elde edilen istatistiksel değerlendirme iş akışı EK 1’de verilmiştir. Buna göre, ham veri (31886 Mbp) filtrelenerek adaptörler ayrılmış temiz data (31781 Mbp) elde edilmiştir. Ham datanın etkinliği %99,67 bulunmuştur. Temiz

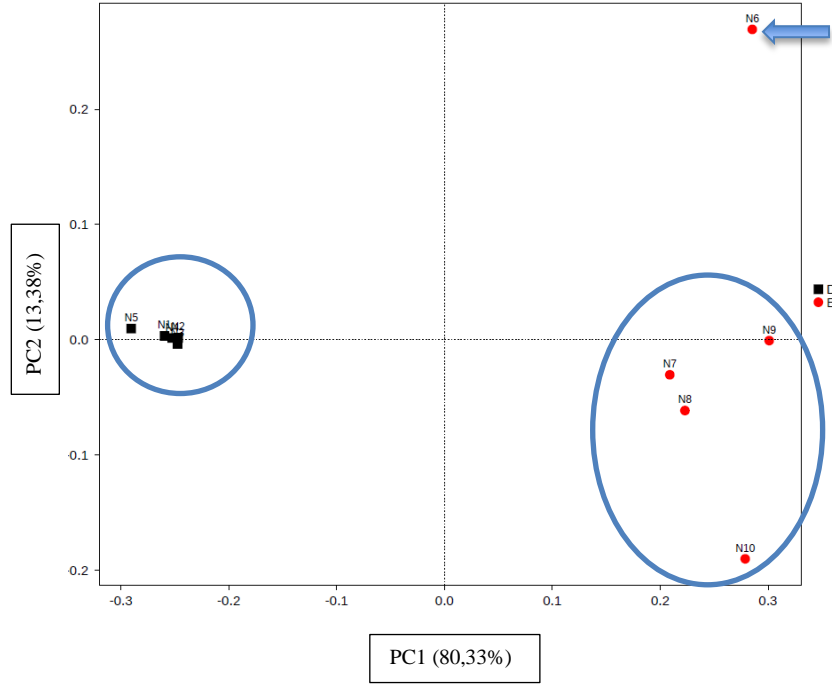
datadan ev sahibi (host) genom ayrıldıktan sonra 30051,8 Mbp'lik dizi elde edilmiş ve bu dizinin guanin (G) ve sitozin (C) oranı (%GC) %50,17 olarak belirlenmiştir. Taksonomik karakterizasyon, âlem düzeyinde %84,30; filum düzeyinde %82,68; sınıf düzeyinde %80,61; takım düzeyinde %78,62; aile düzeyinde %76,27; cins düzeyinde %70,09 ve tür düzeyinde ise %44,49 oranında gerçekleştirilmiştir. Sınıflandırma yapılamayan mikroorganizmaların oranı ise %15,70'tir. Taksonomik analizler DIAMOND yazılımı ile yapılmış ve sonuçlar Krona grafikleri ve ısı haritaları ile sunulmuştur.

Alem düzeyinde süt ürünü örnekleri (D, N1-N5) ve ekipman yüzey örneklerinin (E, N6-N10) mikrobiyotalarında belirlenen prokaryot (bakteri ve arkea), ökaryot ve virüslerin dağılımı Şekil 4.2'de verilmiştir. İki grupta toplanan örnekler arasında, bakteri aleminin intensity değerleri ekipman yüzey örneklerinde (E) 0 ile +2 arasında bulunmaktadır ve haritada kırmızı tonlarında gösterilmektedir. Bakteri alemi süt ürünü örneklerinde (D) ise mavi tonlarında gösterilmiş olup bu grupta yüzey örneklerine kıyasla daha az yoğunlukta bulunmaktadır. Ökaryot organizmalar ise süt ürünü örneklerinde kırmızı tonlarında gösterilmiş olup bu grupta yüzey örneklerine kıyasla daha yoğun bulunduğu görülmektedir. Bunun nedeni, filtreleme işleminde toplam genomdan yalnızca bir tür ev sahibi genom ayrılmıştır. Süt ürünlerindeki ökaryot organizmaların kaynağı ham madde olarak farklı türlerde hayvanların sütünün karıştırılıp kullanılmasıdır.

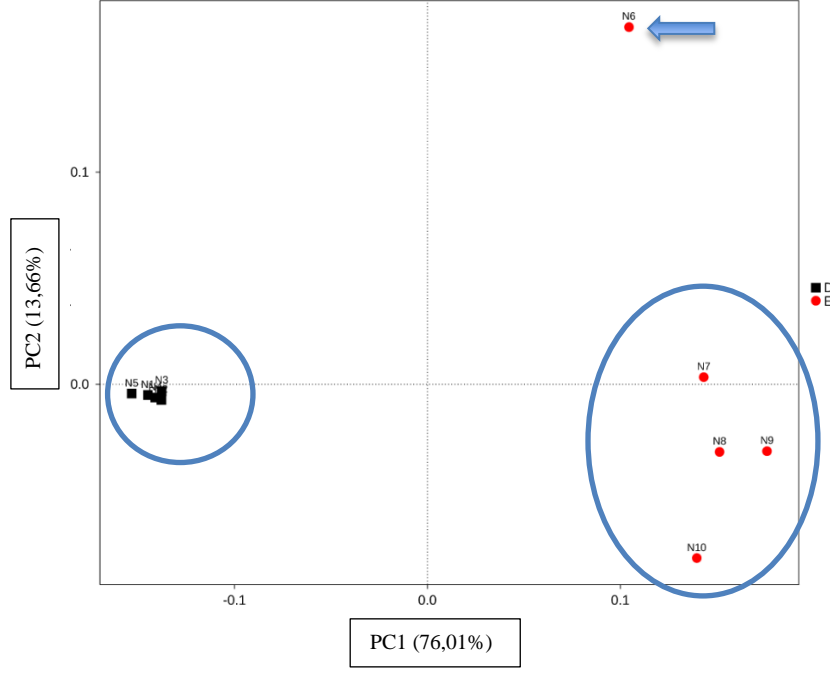


Şekil 4.2. Örneklerin alem düzeyinde ısı haritası. D: Dairy (Süt ürünü örnekleri), E: Equipmant (Ekipman yüzey örnekleri).

İki grup arasında cins ve tür düzeyinde yapılan karşılaştırma PCoA grafikleri ile verilmiştir. Buna göre örneklerin mikrobiyota dağılımı karşılaştırıldığında, cins ve tür düzeyinde süt ürünü örneklerinin (D) mikrobiyotasının birbirleriyle benzer dağılımda olduğu görülmektedir. Ekipman yüzeyi örnekleri (E) incelendiğinde; N7, N8, N9 ve N10 örneklerinin mikrobiyotasının da kendi içinde benzer dağılımda olduğu, N6 (Tanker) örneğinin mikrobiyotasının ise hem ekipman yüzeyi örneklerinden hem de süt ürünü örneklerinden ayrı durduğu gözlenmektedir (Şekil 4.3, Şekil 4.4). N6 örneği çiğ sütün işletmeye getirildiği tankerin yüzeyidir. Tankerin dışarıdan gelmesi (Harici numune, External sample), etkin temizlenmemesi, çiğ süt kalıntılarının yüzeyde birikmesi ve kalıntı oluşturmasının burada kendine özgü bir mikrobiyota oluşumuna sebep olabileceğini söylemek mümkündür.



Şekil 4.3. Örneklerin cins düzeyinde PCoA Grafiği.



Şekil 4.4. Örneklerin tür düzeyinde PCoA grafiği.

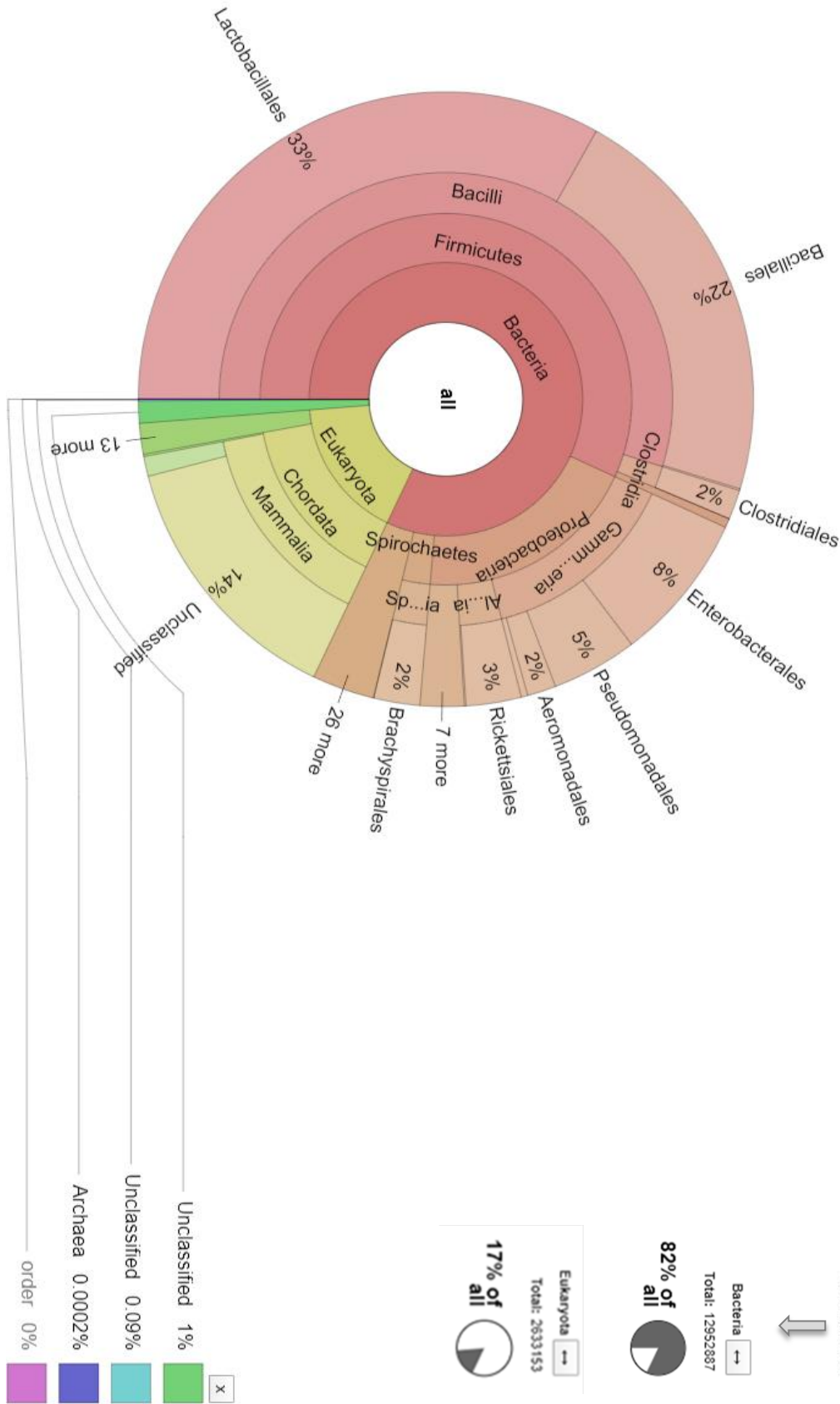
Örneklerin mikrobiyotalarının ayrıntılı değerlendirilmesi “Krona” tabloları aracılığı ile yapılmıştır. Buna göre, öncelikle alem düzeyinde mikrobiyota dağılımlarını incelenmek üzere süt ürünü örneklerinden N1 (Çiğ süt) ve N5 (Beyaz peynir), yüzey örneklerinden N6 (Tanker) ve N8 (Karıştırıcı) seçilmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8). Bu seçim çiğ süt-tanker, çiğ süt-beyaz peynir, beyaz peynir-karıştırıcı mikrobiyotası arasındaki ilişkinin alem düzeyinde belirlenebilmesi amacıyla yapılmıştır.

Şekil 4.5’te N1 (Çiğ süt) örneğinin alem düzeyinde mikrobiyotası verilmiştir. Buna göre, çiğ sütte “Bacteria” alemi örnekteki toplam mikrobiyotanın %82’sini oluşturmaktadır. Çiğ sütün içerdiği toplam bakteri sayısının yaklaşık 1.3×10^7 olduğu görülmektedir. Çiğ sütte laktik asit bakterilerinin dahil olduğu Firmicutes toplam bakterilerin %69’unu oluşturmakta ve en yoğun filum olarak bulunmaktadır. “Firmicutes” filumu içinde ise “Bacilli” sınıfı en yoğun sınıf olarak (%96) bulunmaktadır.

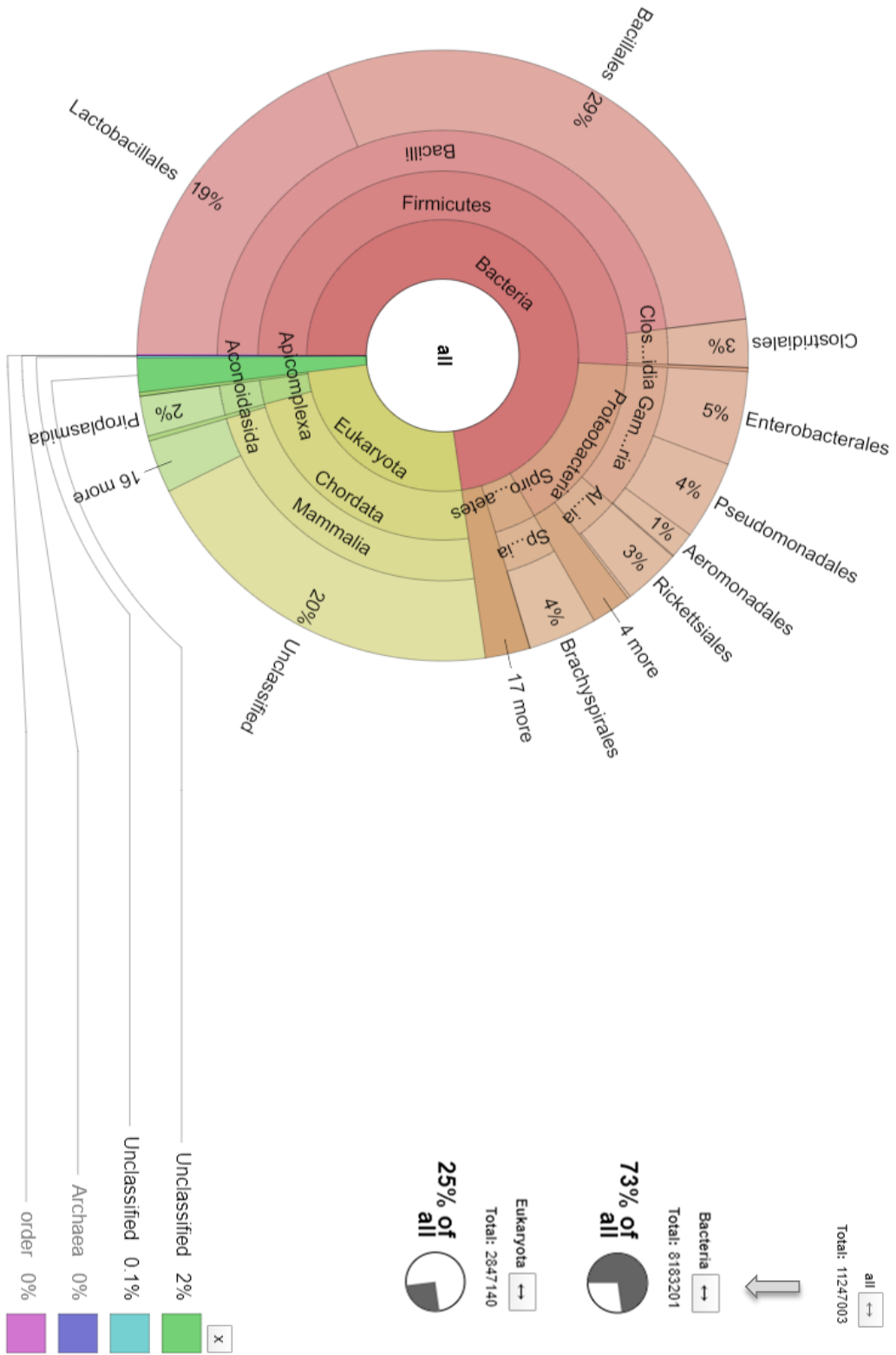
Şekil 4.6’da N5 (Beyaz peynir) örneğinin alem düzeyinde mikrobiyotası verilmiştir. Buna göre, beyaz peynirde “Bacteria” alemi örnekteki toplam mikrobiyotanın %73’ünü

oluşturmaktadır. Beyaz peynirin içerdiği toplam bakteri sayısının $8,2 \times 10^6$ olduğu görülmektedir. Firmicutes çiğ sütte olduğu gibi beyaz peynirde de “Bacteria” alemi içinde en yoğun filum (%70) olarak bulunmaktadır. Bacilli sınıfı Firmicutes filumu içinde %95 oranla en yoğun sınıftır.

N1 ve N5 örneklerinin toplam mikrobiyotasına bakıldığında; çiğ sütte %82 oranla bulunan “Bacteria” aleminin yanı sıra, %17 oranında “Eukaryota” (Ökaryot) alemi bulunmaktadır. Ökaryot alemi içindeki Mammalia (Memeliler) sınıfı ise toplam mikrobiyotanın %15’ini oluşturmaktadır. Beyaz peynir ise %73 oranla içerdiği “Bacteria” aleminin yanında %25 oranında “Eukaryota” (Ökaryot) alemi içermektedir. Memeliler sınıfı beyaz peynirde toplam mikrobiyotanın %23’ünü oluşturmaktadır. Yüzey örnekleri incelendiğinde, Memeliler tankerde toplam mikrobiyotanın %3’ünü, karıştırıcıda ise %2’sini oluşturmaktadır (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8)



Şekil 4.5. N1 örneğinin alem düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



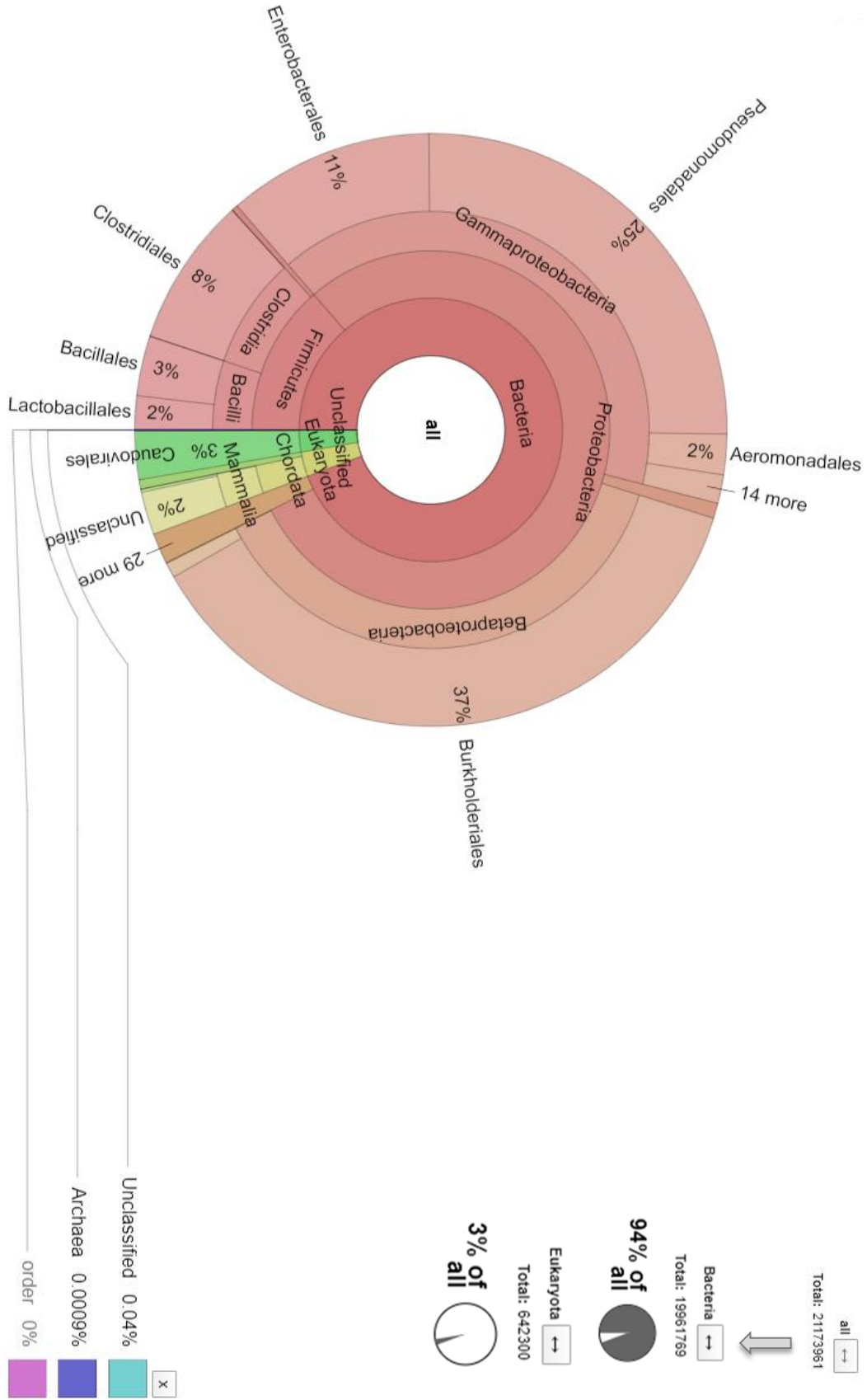
Şekil 4.6. N5 örneğinin alem düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.

Şekil 4.7’de N6 (Tanker) örneğinin alem düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre “Bacteria” alemi tankerin toplam mikrobiyotasının %94’ünü oluşturmaktadır. Tankerin içerdiği toplam bakteri sayısı yaklaşık 2×10^7 ’dir. Proteobacteria bakteri alemi içinde %84 oranla baskın filumdur. Proteobacteria filumu içinde Gammaproteobacteria sınıfı %51, Betaproteobacteria sınıfı ise %48 oranında bulunmaktadır. Firmicutes filumu ise tankerde bakteri aleminin %14’ünü oluşturmaktadır.

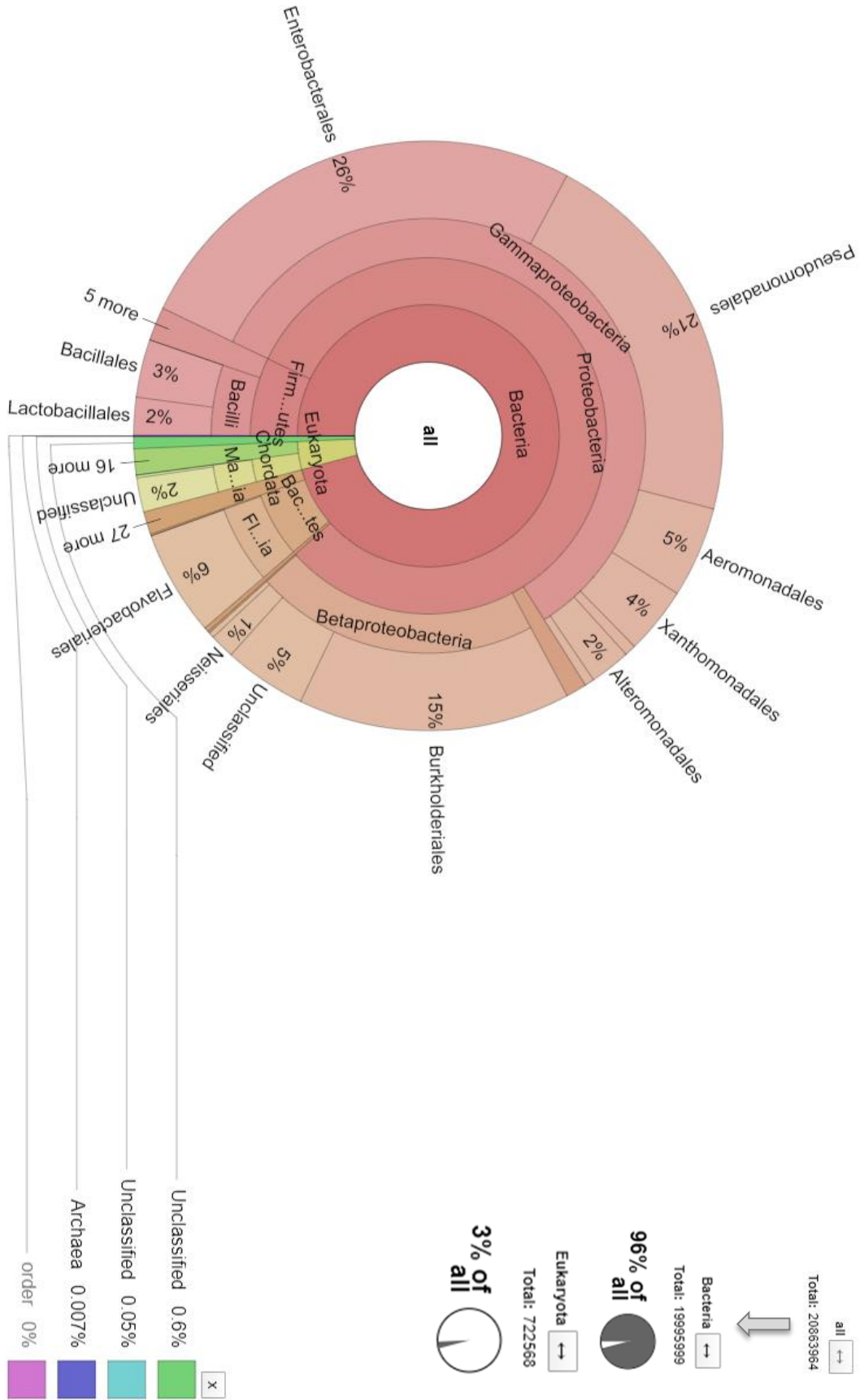
Şekil 4.8’de N8 (Karıştırıcı) örneğinin alem düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre “Bacteria” alemi karıştırıcının toplam mikrobiyotasının %96’sını oluşturmaktadır. Karıştırıcının içerdiği toplam bakteri sayısı yaklaşık 2×10^7 ’dir. Proteobacteria bakteri alemi içinde en baskın filumdur ve %85 oranında bulunmaktadır. Proteobacteria içinde Gammaproteobacteria %72 oranla en baskın sınıfı oluşturmaktadır. Firmicutes ise karıştırıcıda bakteri aleminin %7’sini oluşturmaktadır.

Süt ürünü örnekleri incelendiğinde, “Bacteria” alemi çiğ sütte toplam mikrobiyotanın %82’sini, beyaz peynirde %72’sini oluşturmaktadır. Yüzey örneklerinde ise “Bacteria” alemi tanker mikrobiyotasının %94’ünü, karıştırıcı mikrobiyotasının %96’sını oluşturmaktadır. Süt ürünü örnekleri ile yüzey örnekleri karşılaştırıldığında, örneklerin bakteri içeriğinin toplam mikrobiyotaya oranının, yüzey örneklerinde süt ürünü örneklerine göre yüksek olduğu görülmektedir.

Örneklerin “Bacteria” alemi düzeyinde mikrobiyotaları incelendiğinde, Firmicutes süt ürünü örneklerinin tamamında en yoğun filum (%63-70) olarak bulunmuştur. Yüzey örneklerinde Firmicutes %5-14 oranında değişim göstermekte, Proteobacteria ise %84-89 arasında değişen oranla en yoğun filum olarak bulunmaktadır. Örneklerin bakteri içerikleri tür düzeyinde karşılaştırıldığında; *S. aureus*’un çiğ süt ve beyaz peynirde en baskın tür olduğu görülmektedir. Çiğ sütte %24, beyaz peynirde ise %37 oranında bulunmaktadır. *S. aureus* tankerde ve karıştırıcıda %3 oranında bulunmaktadır (Ek 3). *Lc. lactis* çiğ süt ve beyaz peynirde *S. aureus*’tan sonra ikinci baskın tür olup tüm bakteriler arasında çiğ sütte %14, beyaz peynirde ise %7 oranında bulunmaktadır.



Şekil 4.7. N6 örneğinin alem düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



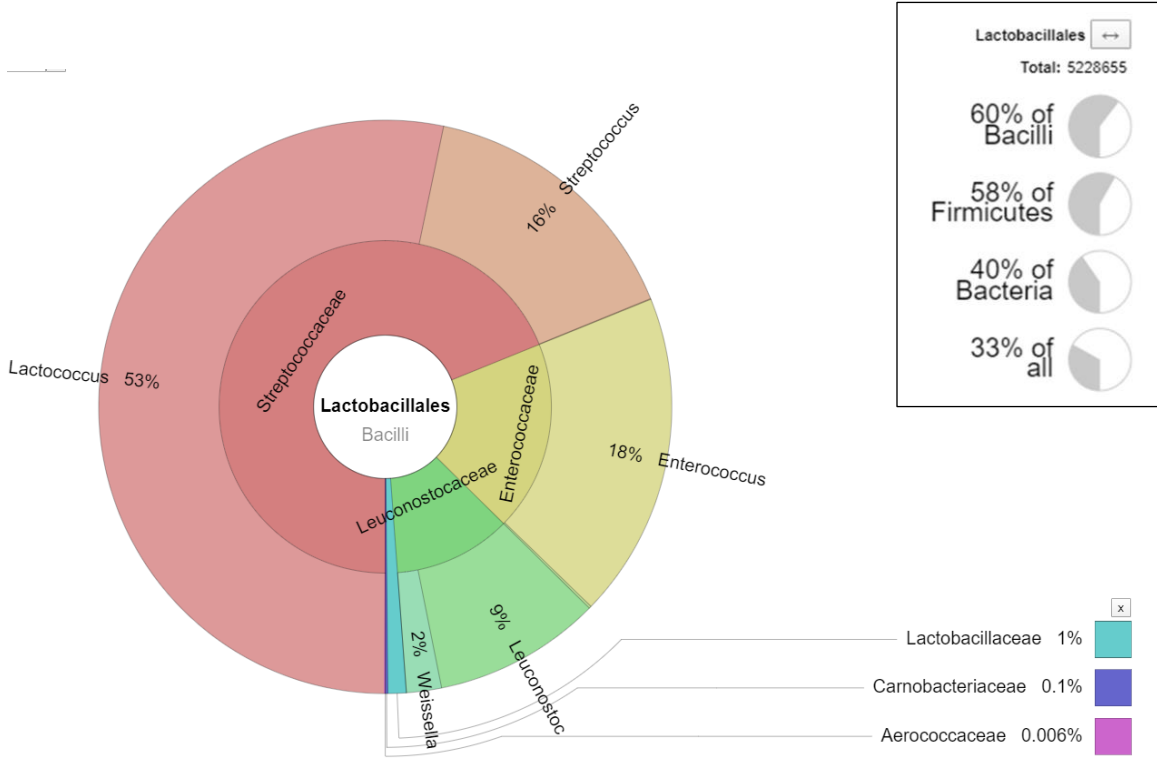
Şekil 4.8. N8 örneğinin alem düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.

Laktik asit bakterilerinin üyesi olduğu Lactobacillales takımı düzeyinde inceleme yapılabilmesi amacıyla yine N1 (Çiğ süt), N5 (Beyaz peynir), N6 (Tanker) ve N8 (Karıştırıcı) örnekleri seçilmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12).

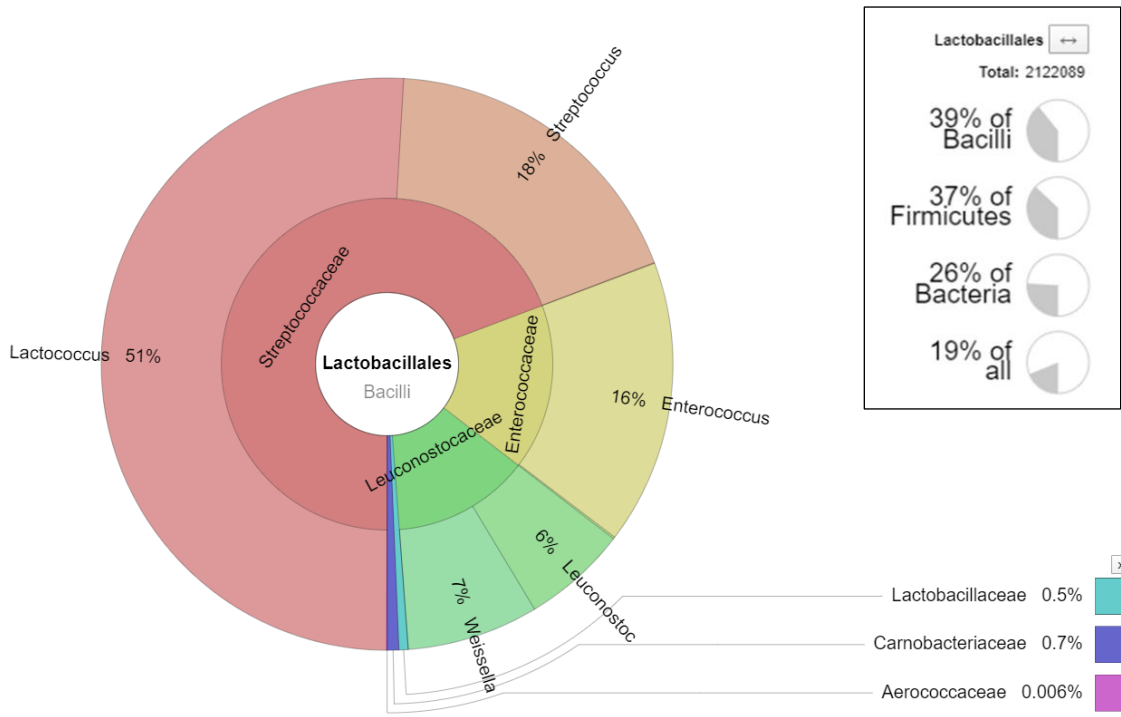
N1 (Çiğ süt) örneğinde Lactobacillales takımı “Bacteria” aleminin %40’ını oluşturmaktadır. Lactobacillales takımı içinde baskın olan aileler sırasıyla Streptococcaceae, Enterococcaceae, Leuconostocaceae ve Lactobacillaceae’dir ve bu aileler Lactobacillales takımının sırasıyla %69, %19, %11 ve %1’ini oluşturmaktadır (Şekil 4.9). Lactobacillales takımı N5 (Beyaz peynir) örneğinde “Bacteria” aleminin %26’sını oluşturmaktadır. Streptococcaceae, Enterococcaceae, Leuconostocaceae ve Lactobacillaceae aileleri Lactobacillales takımında sırasıyla %69, %16, %13 ve %0.5 oranında bulunmaktadır (Şekil 4.10).

N6 (Tanker) örneğinde Lactobacillales takımı “Bacteria” aleminin %2’sini oluşturmaktadır. Streptococcaceae, Enterococcaceae, Leuconostocaceae, Lactobacillaceae aileleri Lactobacillales takımının sırasıyla %80, %16, %2 ve %1’ini oluşturmaktadır (Şekil 4.11). Lactobacillales takımı N8 (Karıştırıcı) örneğinde de tankerde olduğu gibi “Bacteria” aleminin %2’sini oluşturmaktadır. Karıştırıcıda Streptococcaceae, Enterococcaceae, Leuconostocaceae, Lactobacillaceae aileleri Lactobacillales takımının sırasıyla %70, %26, %3 ve %0.8’ini oluşturmaktadır (Şekil 4.12).

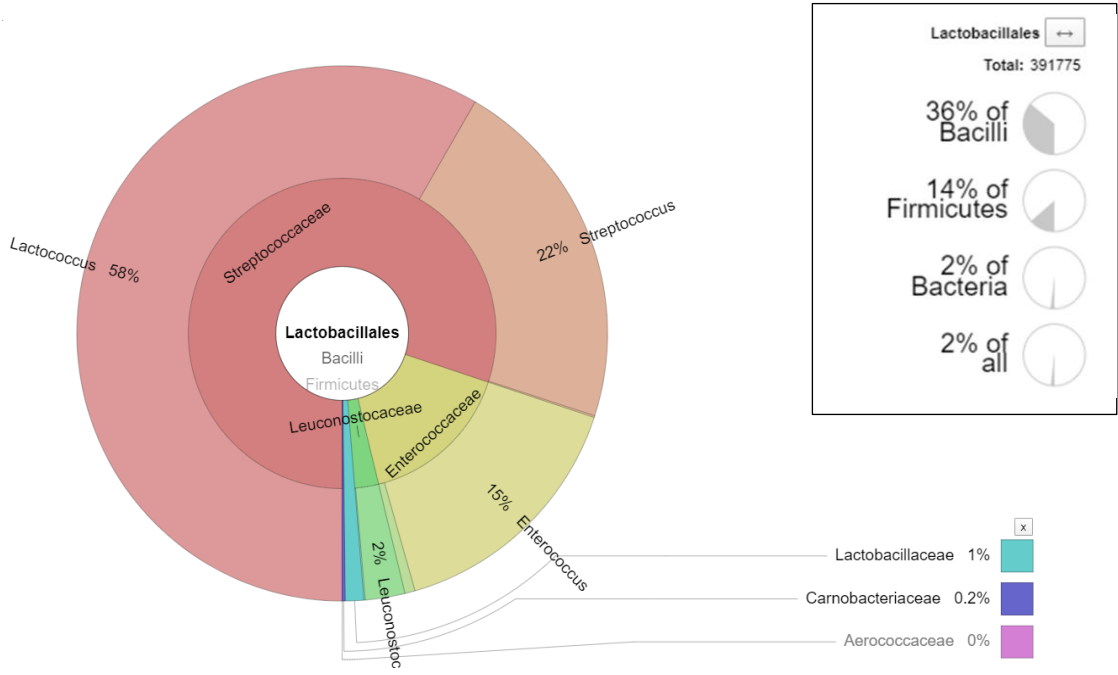
Lactobacillales; Streptococcaceae, Enterococcaceae, Leuconostocaceae ve Lactobacillaceae gibi laktik asit bakterilerini üye olarak bulunduran bir takımdır. Bu takımın örneklerde bulunma oranları incelendiğinde “Bacteria” aleminin, N1’de %40’ını, N5’te %26’sını, N6’da %2’sini ve N8’de %2’sini oluşturmaktadır ve süt ürünü örneklerinde laktik asit bakterilerinin oranı yüksek iken yüzey örneklerinde bu oran düşmektedir. Buna göre, süt ürünü örneklerinin laktik asit bakteri içeriğinin yüzey örneklerine kıyasla daha yüksek olduğu söylenebilir.



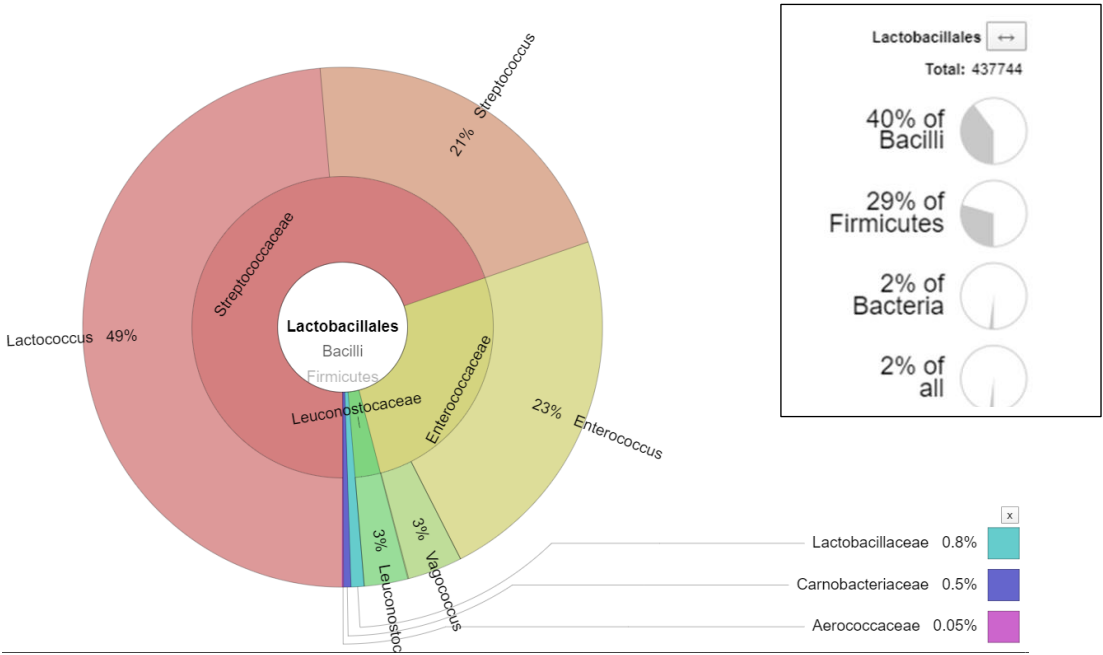
Şekil 4.9. N1 örneğinin Lactobacillales düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



Şekil 4.10. N5 örneğinin Lactobacillales düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu



Şekil 4.11. N6 örneğinin Lactobacillales düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



Şekil 4.12. N8 örneğinin Lactobacillales düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.

Streptococcaceae ailesinin üyesi olan *Lactococcus* cinsi bakterilerin örneklerde hangi oranlarda bulunduğunu görebilmek amacıyla tüm süt ürünü örnekleri (D, N1-N5) ve ekipman yüzey örneklerinin (E, N6-N10) *Lactococcus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonları incelenmiştir. *Lactococcus* cinsi süt ürünü örneklerinde “Bacteria” alemi içinde yüksek bir oranda bulunmaktadır (N1 ve N4’te %22, N2’de %21, N3’te %20 ve N5’te %13). Ekipman yüzey örneklerinde ise bu oran dramatik olarak düşmektedir (N6, N7 ve N8’de %1, N9’da %0,4 ve N10’da %0,5).

Tüm örneklerde *Lactococcus* cinsine ait 11 tür tanımlanmış olup, bu bakteri türleri her örnekte farklı yoğunluklarda bulunmaktadır. *Lactococcus* cinsi bakteriler tüm örneklerde bu cins içinde %0.0007-72 arasında değişen oranlarda bulunmaktadır. *Lc. lactis* süt ürünü ve yüzey örneklerinde “Bacteria” alemi içinde en yoğun bulunan türdür. Tüm örnekler arasında en yoğun bulunduğu N4 (Teleme) örneğinde toplam bakterilerin %15’ini oluşturmaktadır (Şekil 4.17). Örneklerde en az yoğunlukta tanımlanan *Lactococcus* cinsi bakteri *Lc. termiticola* olup, tüm örnekler arasında en düşük yoğunlukta N9 (Kesme teli) örneğinde tanımlanmış, bu örnekte *Lactococcus* cinsinin %0,02’sini, toplam bakterinin ise %0,00009’unu oluşturmaktadır (Şekil 4.22).

Şekil 4.13’te örneklerin *Lactococcus* cinsi düzeyinde bar grafiği verilmiştir. Buna göre, N10 örneği hariç tüm örneklerde *Lc. lactis* en yüksek oranda bulunmaktadır. N10 örneğinde ise *Lc. piscium* en yüksek oranda bulunmaktadır.

Şekil 4.14’te N1 (Çiğ süt) örneğinin *Lactococcus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre, çiğ sütte *Lc. lactis* en yüksek oranda *Lactococcus* cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %65’ini oluşturur. *Lc. raffinolactis* ve *Lc. piscium* %19 ve %12 oranı ile *Lc. lactis*’i izlemektedir. Geri kalan %3’lük kısmı başta *Lc. chungangensis* olmak üzere diğer *Lactococcus* cinsi bakteriler oluşturmaktadır.

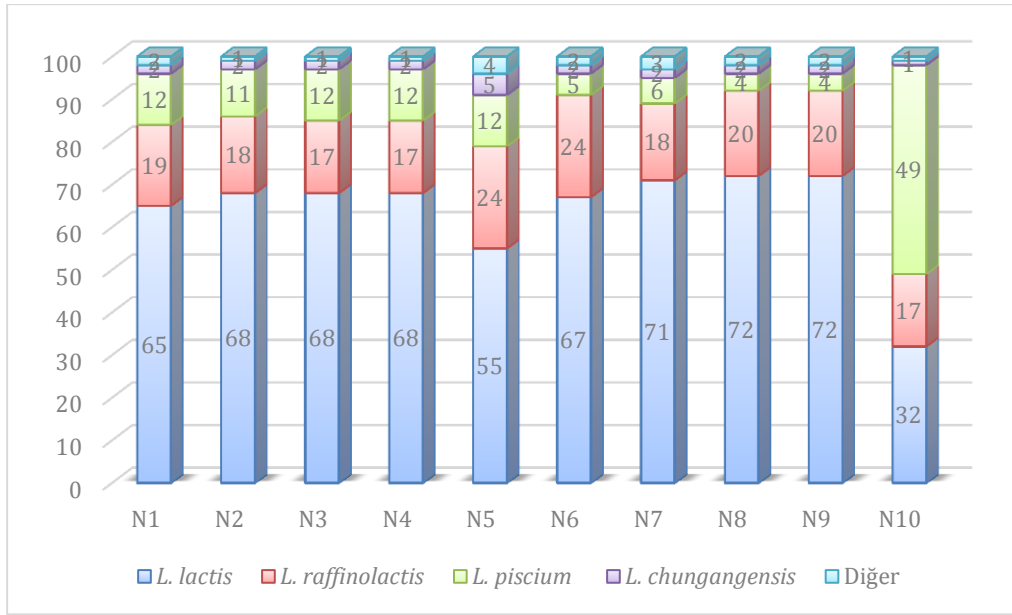
Şekil 4.15’te N2 (Starter kültür eklenmiş süt) örneğinin *Lactococcus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre, *Lc. lactis* starter kültür eklenmiş sütte *Lactococcus* cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %68’ini oluşturur. *Lc.*

raffinolactis ve *Lc. piscium* %18 ve %11 oranı ile *Lc. lactis*'i izlemektedir. Geri kalan %3'lük kısmı başta *Lc. chungangensis* olmak üzere diğer Lactococcus cinsi bakteriler oluşturmaktadır.

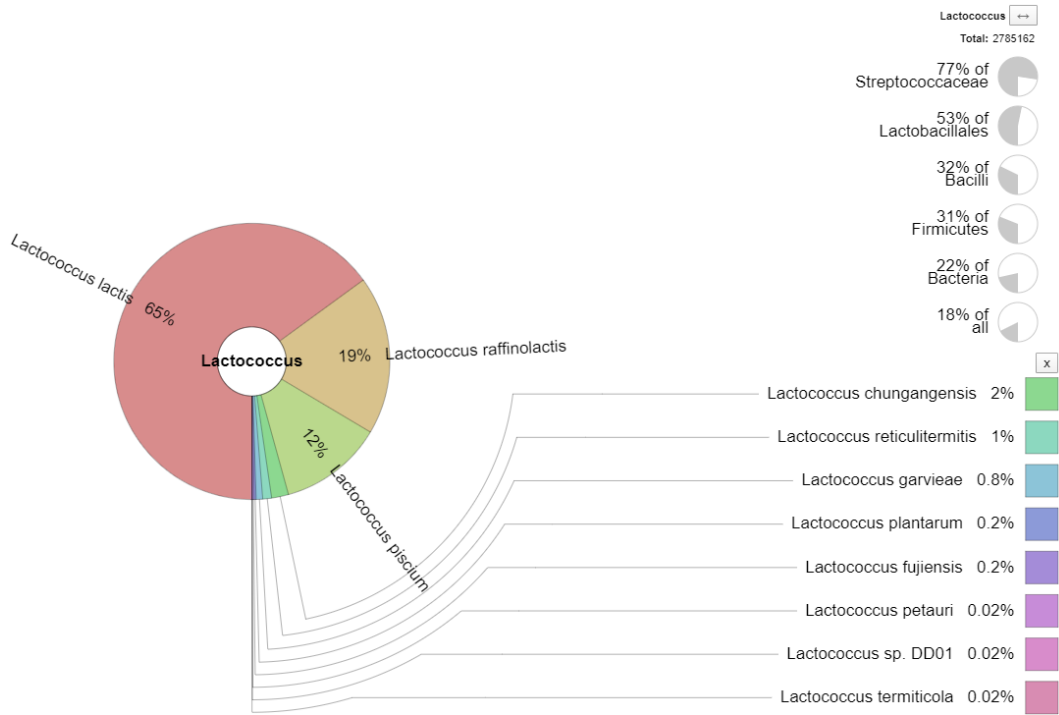
Şekil 4.16'da N3 (Pıhtı) örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre, *Lc. lactis* pıhtıda Lactococcus cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cins içinde bulunma oranı %68'dir. *Lc. raffinolactis* ve *Lc. piscium* %17 ve %12 oranı ile *Lc. lactis*'i izlemektedir. Geri kalan %3'lük kısmı *Lc. chungangensis* olmak üzere diğer türler oluşturmaktadır.

Şekil 4.17'de N4 (Teleme) örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre, telemede de Lactococcus cinsi içerisinde en baskın tür *Lc. lactis*'tir ve %68 oranında bulunur. *Lc. raffinolactis* %17 ve *Lc. piscium* %12 bulunma oranı ile *Lc. lactis*'i izlemektedir. Geri kalan %3'lük kısmı başta *Lc. chungangensis* olmak üzere diğer Lactococcus cinsi bakteriler oluşturmaktadır.

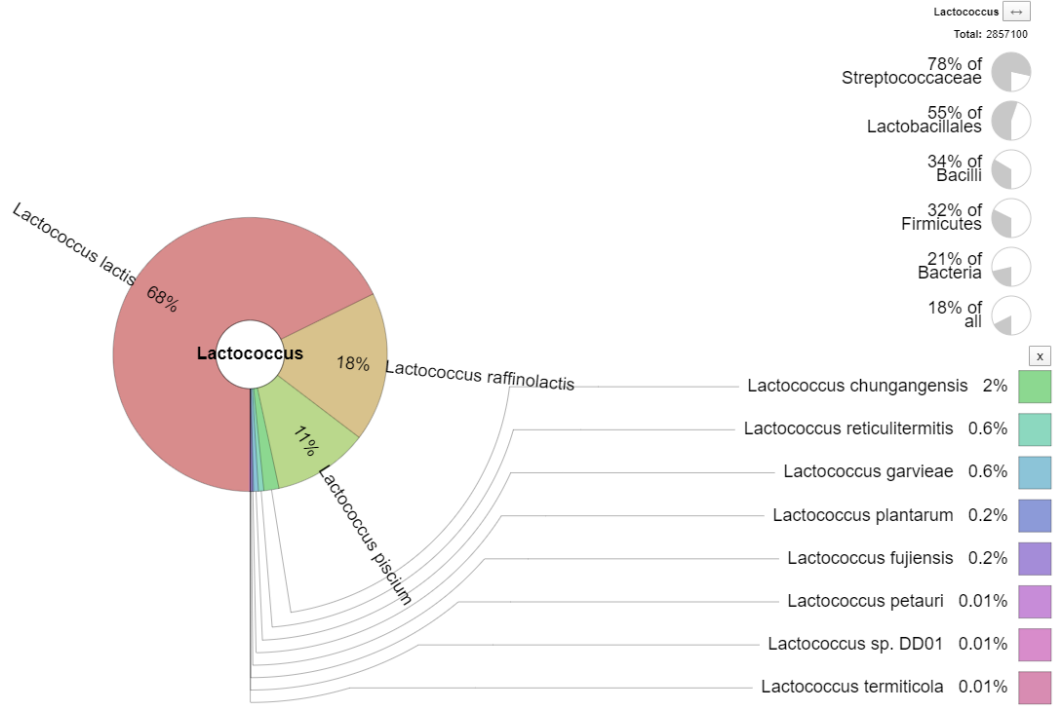
Şekil 4.18'de N5 (Beyaz peynir) örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre, *Lc. lactis* son ürün beyaz peynirde Lactococcus cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %55'ini oluşturur. *Lc. raffinolactis*, *Lc. piscium* ve *Lc. chungangensis* %24, %12 ve %5 oranı ile *Lc. lactis*'i izlemektedir. Geri kalan %4'lük kısmı başta *Lc. reticulitermitis* olmak üzere diğer Lactococcus cinsi bakteriler oluşturmaktadır.



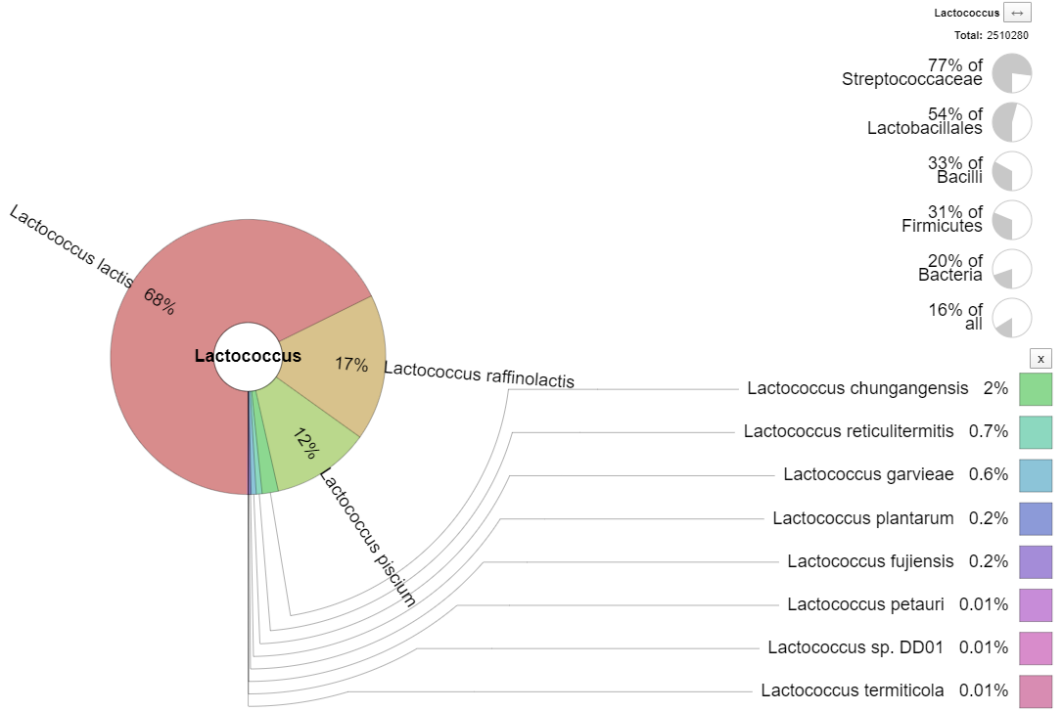
Şekil 4.13. Örneklerin *Lactococcus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



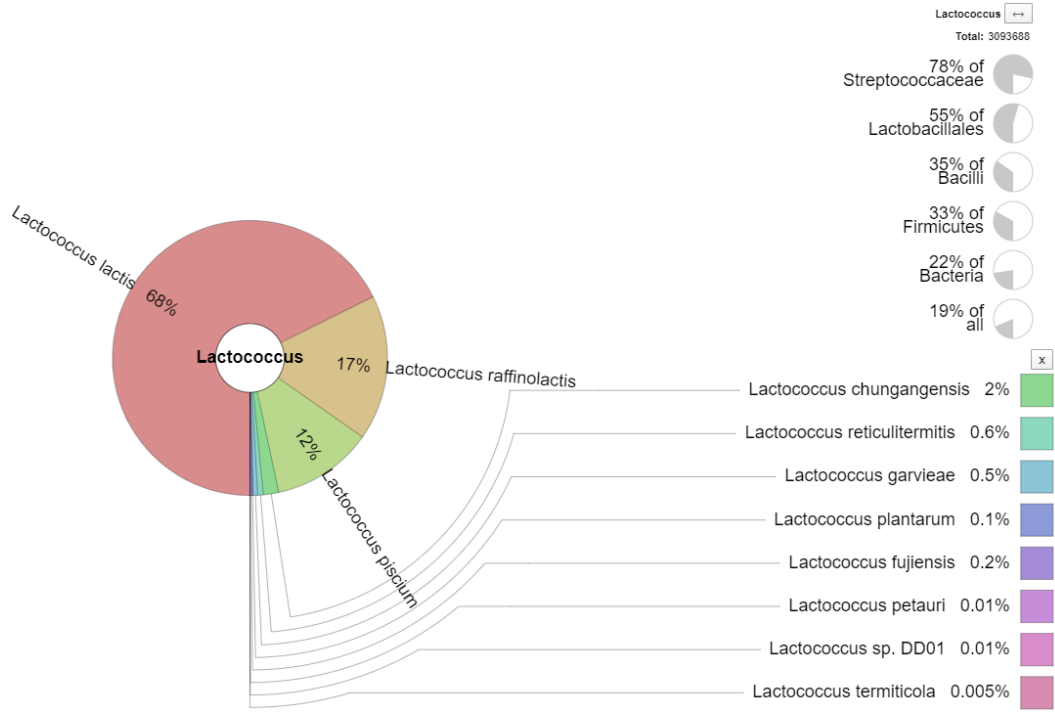
Şekil 4.14. N1 örneğinin *Lactococcus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



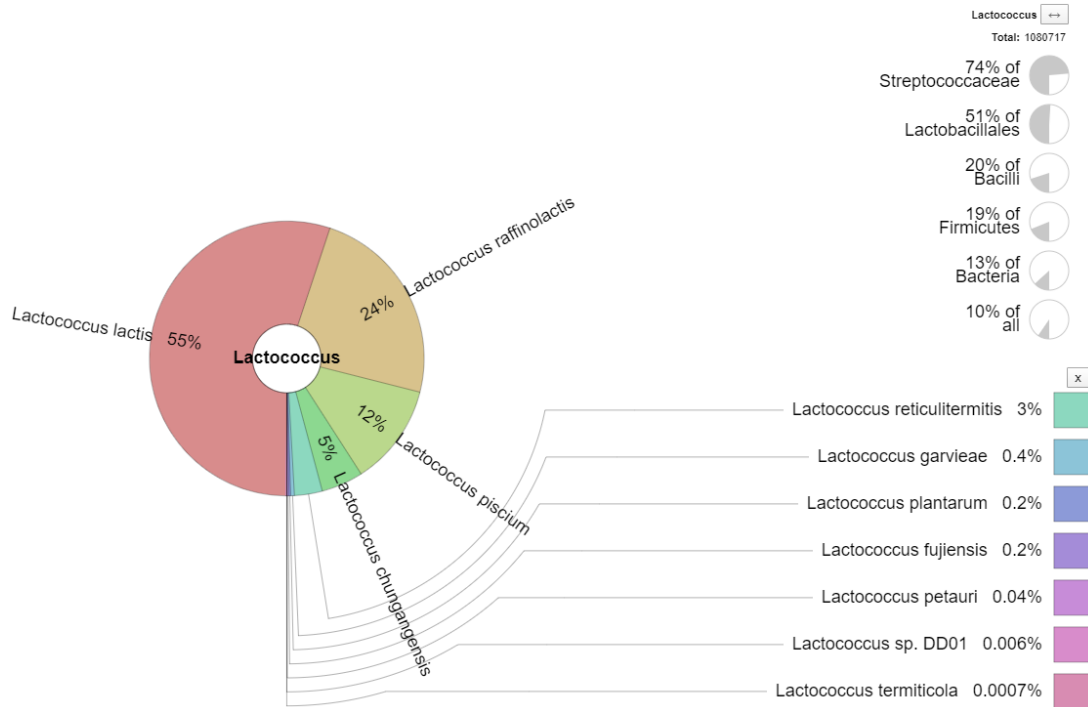
Şekil 4.15. N2 örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



Şekil 4.16. N3 örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



Şekil 4.17. N4 örneğinin *Lactococcus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



Şekil 4.18. N5 örneğinin *Lactococcus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.

Şekil 4.19'da N6 (Tanker) örneğinin *Lactococcus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre, *Lc. lactis* tanker iç yüzeyinde *Lactococcus* cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %67'sini oluşturur. *Lc. raffinolactis* ve *Lc. piscium* %24 ve %5 oranı ile *Lc. lactis*'i izlemektedir. Geri kalan %4'lük kısmı başta *Lc. chungangensis* olmak üzere diğer *Lactococcus* cinsi bakteriler oluşturmaktadır.

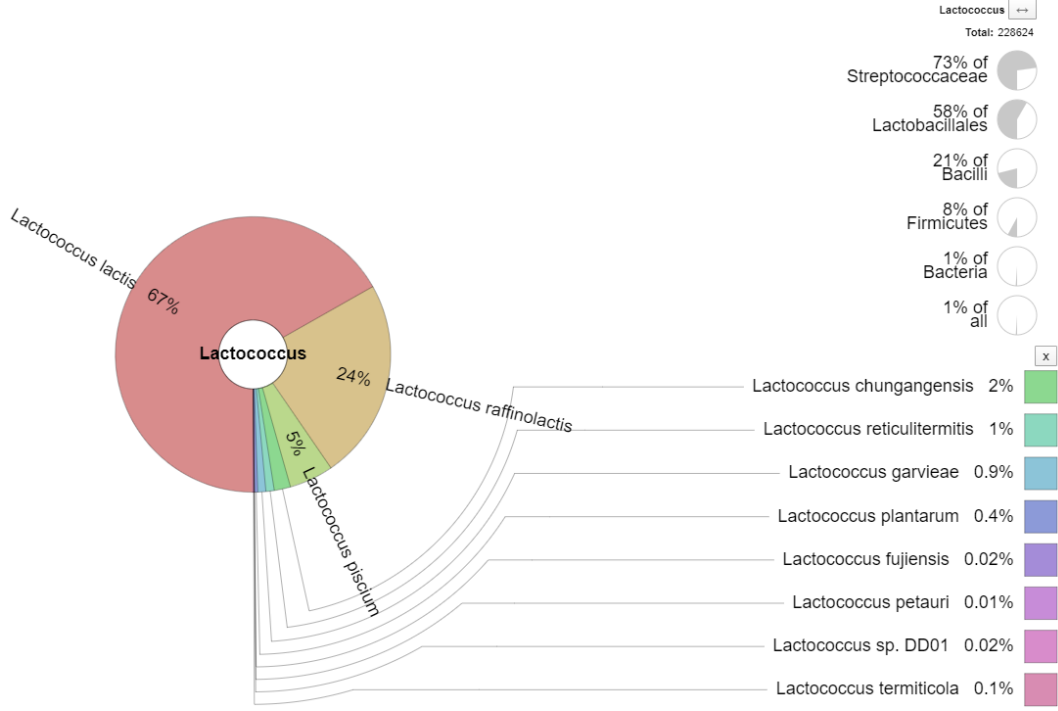
Şekil 4.20'de N7 (Tekne) örneğinin *Lactococcus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre, *Lc. lactis* tekne yüzeyinde *Lactococcus* cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %71'ini oluşturur. *Lc. raffinolactis* ve *Lc. piscium* %18 ve %6 oranı ile *Lc. lactis*'i izlemektedir. Geri kalan %5'lik kısmı başta *Lc. chungangensis* olmak üzere diğer *Lactococcus* cinsi bakteriler oluşturmaktadır.

Şekil 4.21'de N8 (Karıştırıcı) örneğinin *Lactococcus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre, *Lc. lactis* karıştırıcı yüzeyinde *Lactococcus* cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %72'sini oluşturur. *Lc. raffinolactis* ve *Lc. piscium*, %20 ve %4 oranı ile *Lc. lactis*'i izlemektedir. Geri kalan %4'lük kısmı başta *Lc. chungangensis* olmak üzere diğer *Lactococcus* cinsi bakteriler oluşturmaktadır.

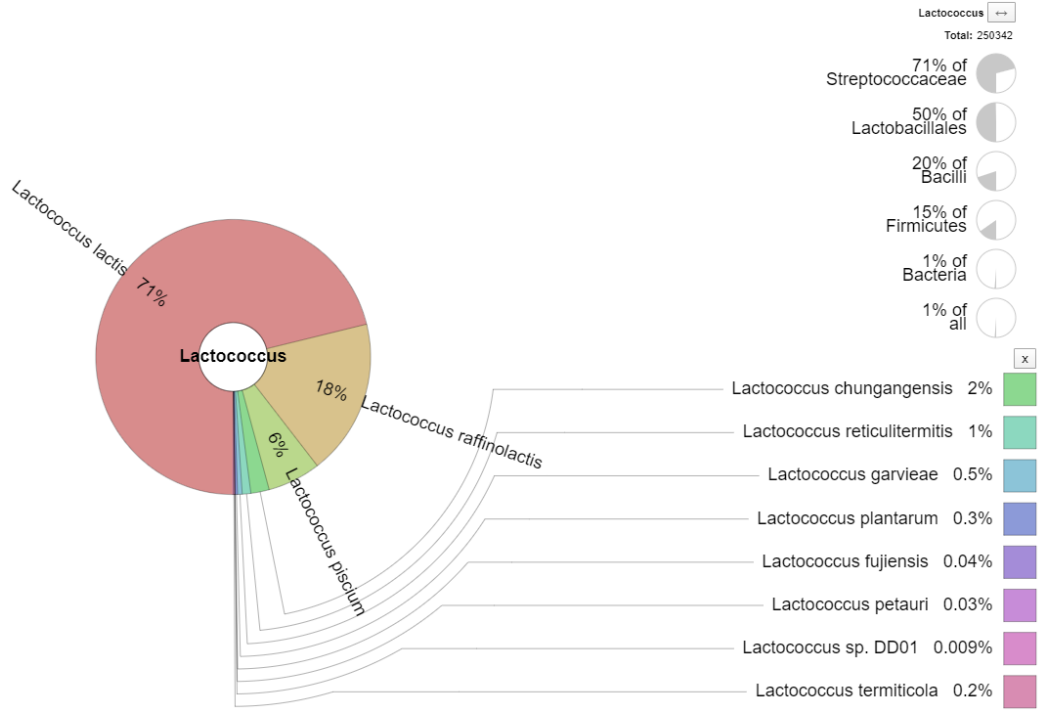
Şekil 4.22'de N9 (Kesme teli) örneğinin *Lactococcus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre, *Lc. lactis* kesme teli yüzeyinde *Lactococcus* cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %72'sini oluşturur. *Lc. raffinolactis* ve *Lc. piscium* %20 ve %4 oranı ile *Lc. lactis*'i izlemektedir. Geri kalan %4'lük kısmı başta *Lc. chungangensis* olmak üzere diğer *Lactococcus* cinsi bakteriler oluşturmaktadır.

Şekil 4.23'te N10 (Cendere bezi) örneğinin *Lactococcus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Diğer örneklerden farklı olarak cendere bezi yüzeyinde *L. piscium* *Lactococcus* cinsi içerisinde en yaygın türdür. *Lc. piscium* bu cinsin %49'unu oluşturur. *Lc. lactis* ve *Lc. raffinolactis* %32 ve %17 oranı ile *Lc. piscium*'u izlemektedir. Geri kalan %2'lik kısmı başta *Lc. chungangensis* olmak üzere diğer *Lactococcus* cinsi bakteriler oluşturmaktadır.

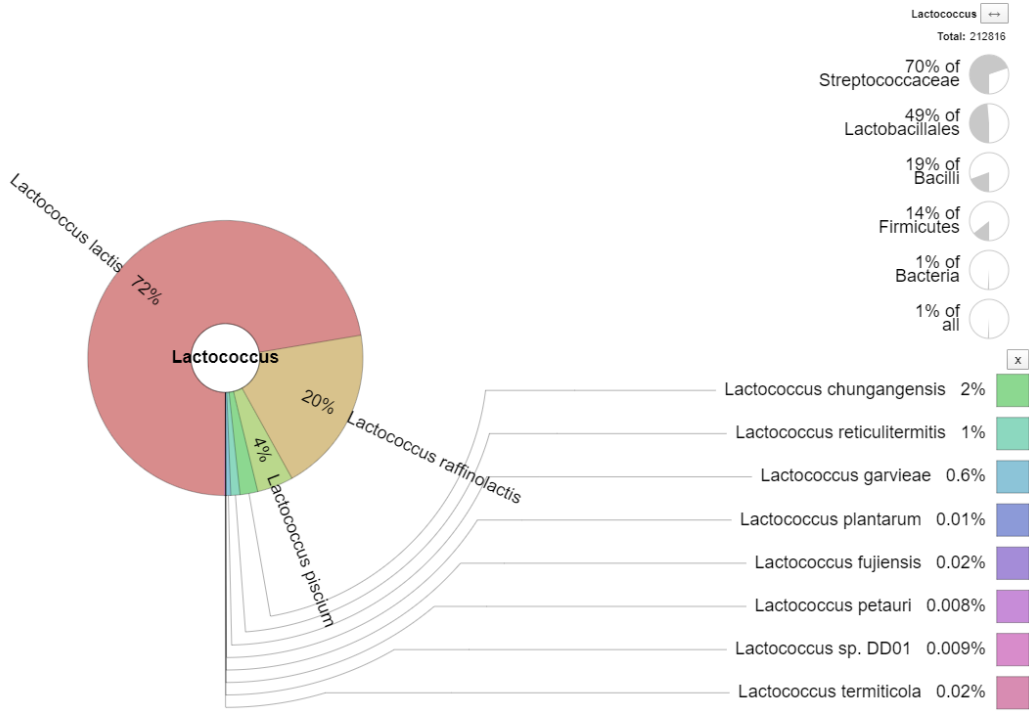
Örneklerin içerdikleri *Lactococcus* cinsi türler karşılaştırıldığında, N10 (Cendere bezi) örneği dışında diğer tüm örneklerde *Lc. lactis*'in bu cins içinde baskın tür olduğu ve *Lc. raffinolactis* ve *Lc. piscium*'un *Lc. lactis*'i izlediği görülmektedir. N10'da ise bu cins içinde baskın tür *Lc. piscium*'dur ve onu *Lc. lactis* ve *Lc. raffinolactis* izlemektedir.



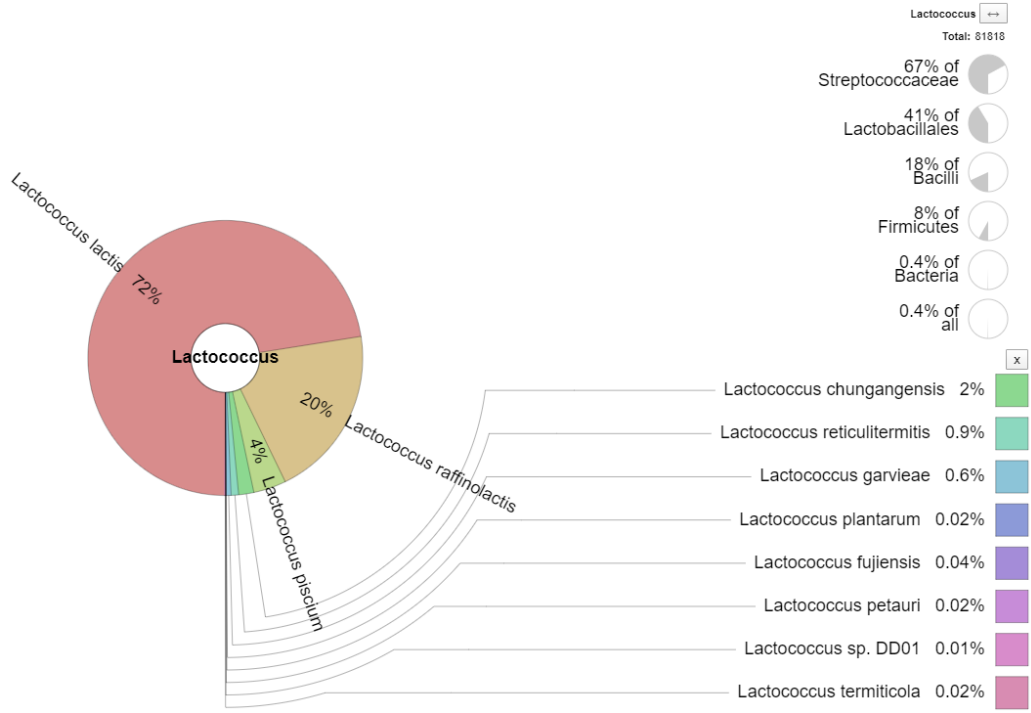
Şekil 4.19. N6 örneğinin *Lactococcus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu



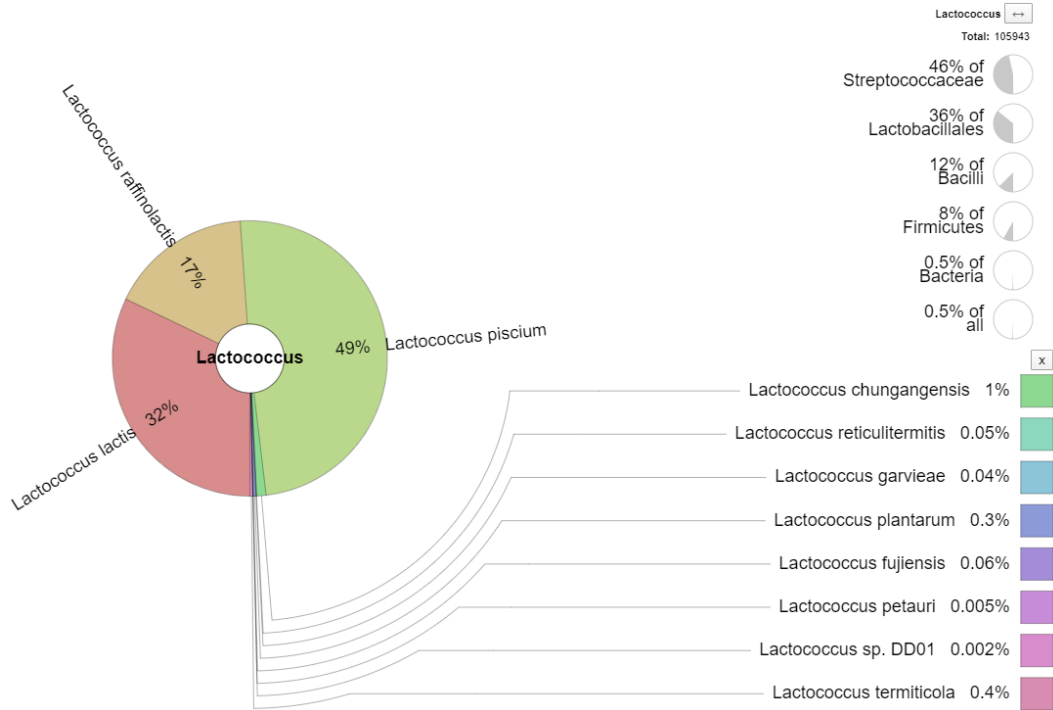
Şekil 4.20. N7 örneğinin *Lactococcus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu



Şekil 4.21. N8 örneğinin *Lactococcus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



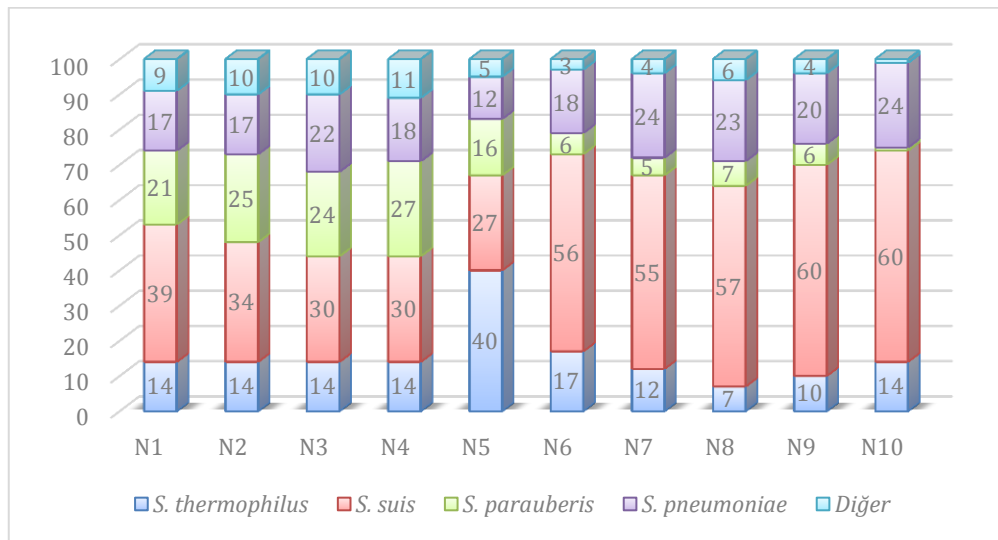
Şekil 4.22. N9 örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



Şekil 4.23. N10 örneğinin Lactococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.

Streptococcaceae ailesinin diğ er bir üyesi olan Streptococcus cinsi bakterilerin örneklerde hangi oranlarda bulunduğ unu görebilmek amacıyla tüm süt ürünü örnekleri (D, N1-N5) ve ekipman yüzey örneklerinin (E, N6-N10) Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonları incelenmiştir. Streptococcus cinsi süt ürünü örneklerinde “Bacteria” alemi içinde N1, N2, N3 ve N4’te %6, N5’te %5 oranında bulunmaktadır. Ekipman yüzey örneklerinde ise N6’da %0,4; N7 ve N8’de %0,5, N9’da %0,2 ve N10’da %0,6 oranında bulunmaktadır.

Tüm örneklerde Streptococcus cinsine ait 64 tür tanımlanmış olup, bu bakteri türleri her örnekte farklı yoğunluklarda bulunmaktadır. Streptococcus cinsi bakteriler tüm örneklerde bu cins içinde %0.0004-60 arasında değ iş en oranlarda bulunmaktadır. *S. suis* süt ürünü ve yüzey örneklerinde “Bacteria” alemi içinde en yoğun bulunan türdür. Tüm örnekler arasında en yoğun bulunduğ u N1, N2, N3 ve N4’te toplam bakterilerin %2’sini oluşturmaktadır (Ş ekil 4.25, Ş ekil 4.26, Ş ekil 4.27, Ş ekil 4.28). Örneklere en az yoğunlukta tanımlanan Streptococcus cinsi bakteri *St. constellatus* olup, tüm örnekler arasında en düşük yoğunlukta N3 örneğ inde olup, bu örnekte Streptococcus cinsinin %0,0004’ünü, toplam bakterinin ise %0,00002’sini oluşturmaktadır (Ş ekil 4.27). Ş ekil 4.24’te örneklerin Streptococcus cinsi düzeyinde (%) bar grafiğ i verilmiştir. Buna göre, N5 örneğ i hariç tüm örneklerde *S. suis* en yüksek oranda bulunmaktadır. N5 örneğ inde ise *St. thermophilus* bu cins içinde en yüksek oranda bulunmaktadır.



Ş ekil 4.24. Örneklerin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.

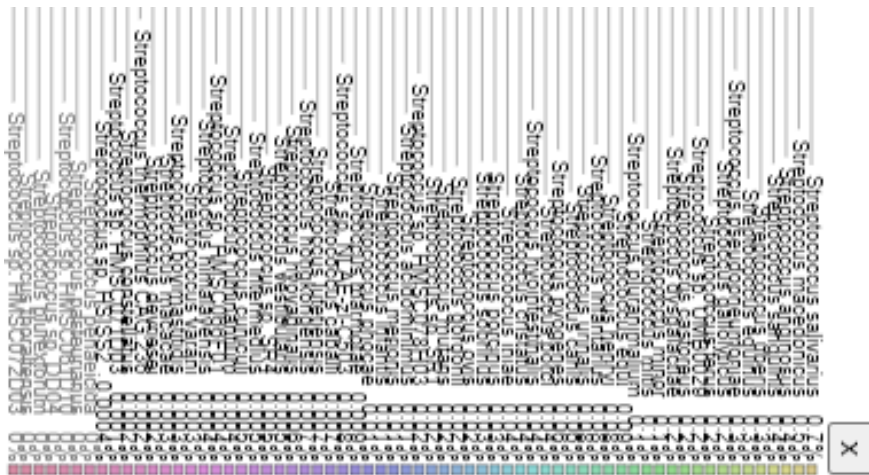
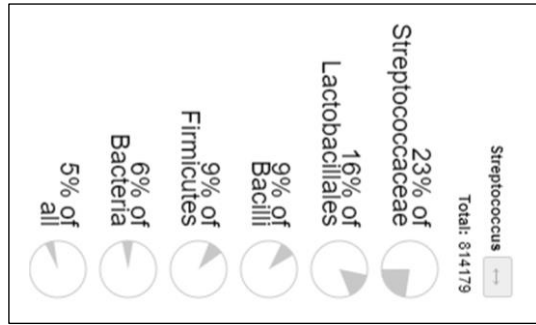
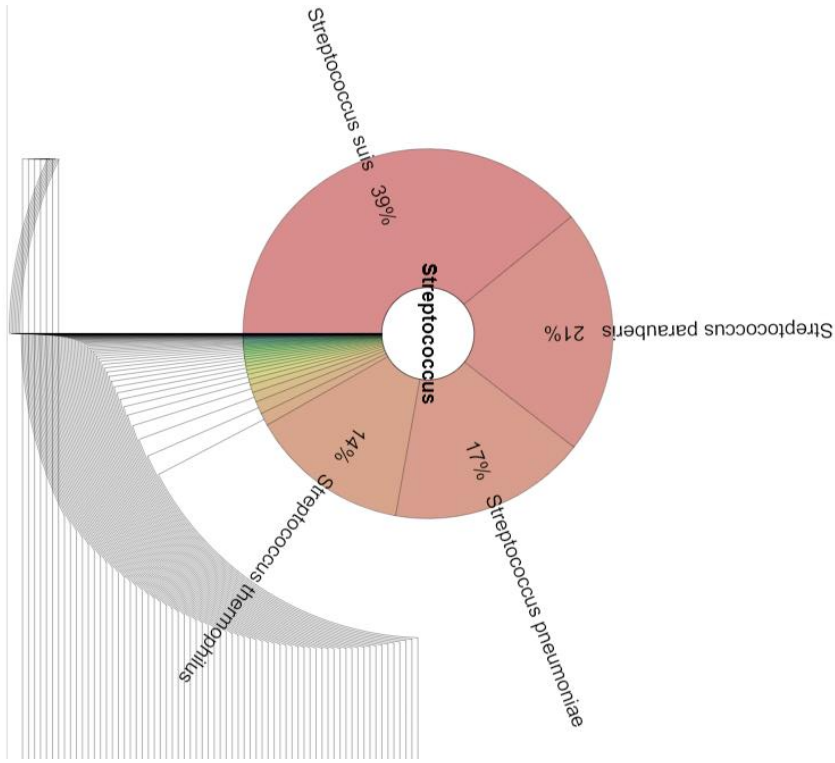
Şekil 4.25'te N1 (Çiğ süt) örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. *St. suis* çiğ sütte Streptococcus cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %39'unu oluşturur. *St. parauberis* ve *St. pneumoniae* %21 ve %17 oranı ile *St. suis*'i izlemektedir. Bunun yanında başta *St. thermophilus* olmak üzere diğer Streptococcus türleri de çiğ sütte çeşitli oranlarda yer almaktadır.

Şekil 4.26'da N2 (Starter kültür eklenmiş süt) örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. *St. suis* starter kültür eklenmiş sütte Streptococcus cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %34'ünü oluşturur. *St. parauberis* ve *St. pneumoniae* %25 ve %17 oranı ile *St. suis*'i izlemektedir. Bunun yanında başta *St. thermophilus* olmak üzere diğer Streptococcus türleri de starter kültür eklenmiş sütte çeşitli oranlarda yer almaktadır.

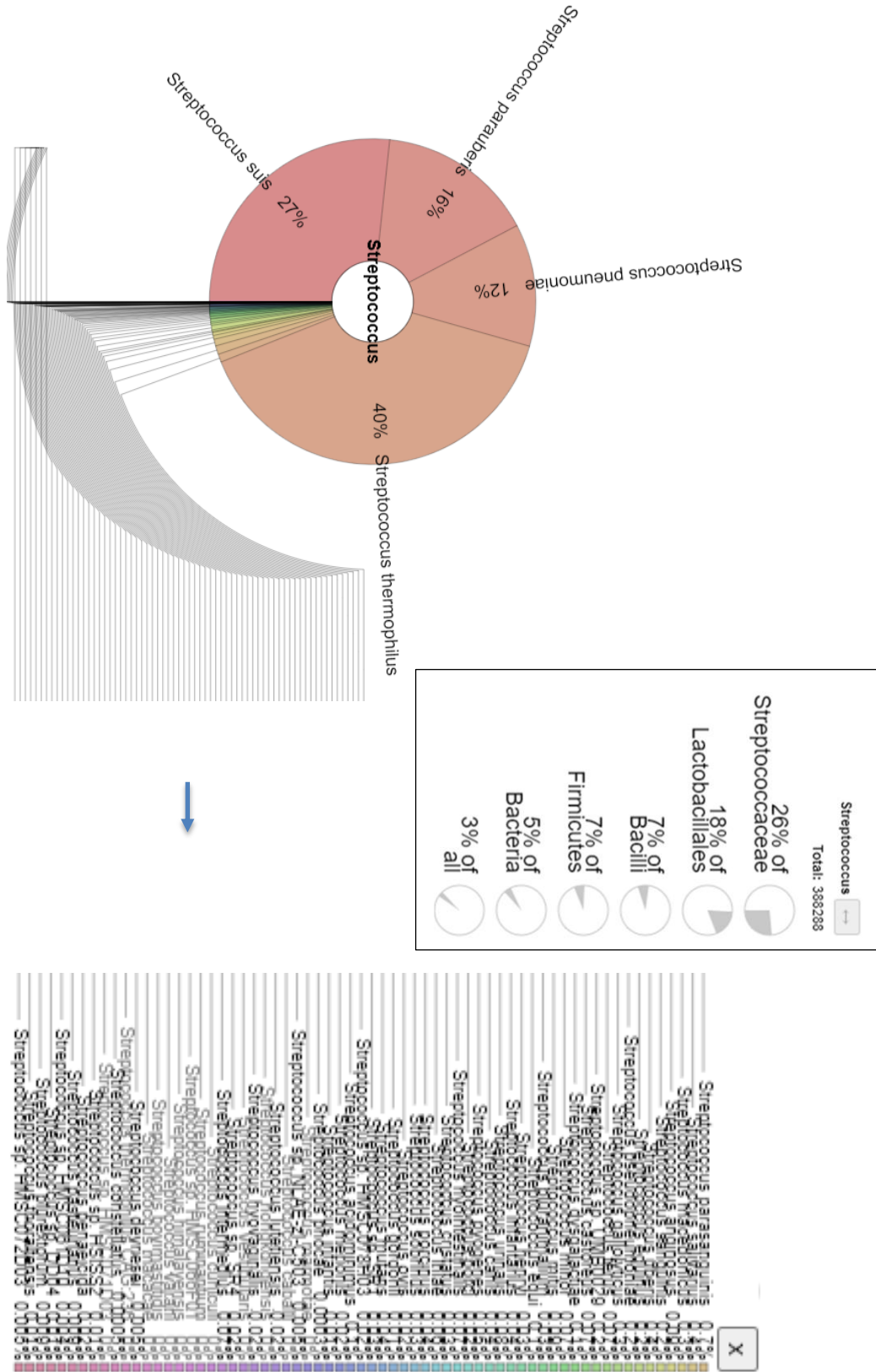
Şekil 4.27'de N3 (Pıhtı) örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. *St. suis* pıhtıda Streptococcus cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %30'unu oluşturur. *St. parauberis* ve *St. pneumoniae* %24 ve %12 oranı ile *St. suis*'i izlemektedir. Bunun yanında başta *St. thermophilus* olmak üzere diğer Streptococcus türleri de pıhtıda çeşitli oranlarda yer almaktadır.

Şekil 4.28'de N4 (Teleme) örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. *St. suis* telemede Streptococcus cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %30'unu oluşturur. *St. parauberis* ve *St. pneumoniae* %27 ve %18 oranı ile *St. suis*'i izlemektedir. Bunun yanında başta *St. thermophilus* olmak üzere diğer Streptococcus türleri de telemede çeşitli oranlarda yer almaktadır.

Şekil 4.29'da N5 (Beyaz peynir) örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. *St. thermophilus* beyaz peynirde Streptococcus cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %40'ını oluşturur. *St. suis* ve *St. parauberis* ve %27 ve %16 oranı ile *St. thermophilus*'u izlemektedir. Bunun yanında başta *St. pneumoniae* olmak üzere diğer Streptococcus türleri de beyaz peynirde çeşitli oranlarda yer almaktadır.



Şekil 4.25. N1 örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



Şekil 4.29. N5 örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.

Şekil 4.30'da N6 (Tanker) örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. *St. suis* tankerde Streptococcus cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %56'sını oluşturur. *St. pneumoniae* ve *St. thermophilus* %18 ve %17 oranı ile *St. suis*'i izlemektedir. Bunun yanında *St. parauberis* başta olmak üzere diğer Streptococcus türleri de tanker iç yüzeyinde çeşitli oranlarda yer almaktadır.

Şekil 4.31'de N7 (Tekne) örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. *St. suis* teknede Streptococcus cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %55'ini oluşturur. *St. pneumoniae* ve *St. thermophilus* %24 ve %12 oranı ile *St. suis*'i izlemektedir. Bunun yanında başta *St. parauberis* olmak üzere diğer Streptococcus türleri de tekne yüzeyinde çeşitli oranlarda yer almaktadır.

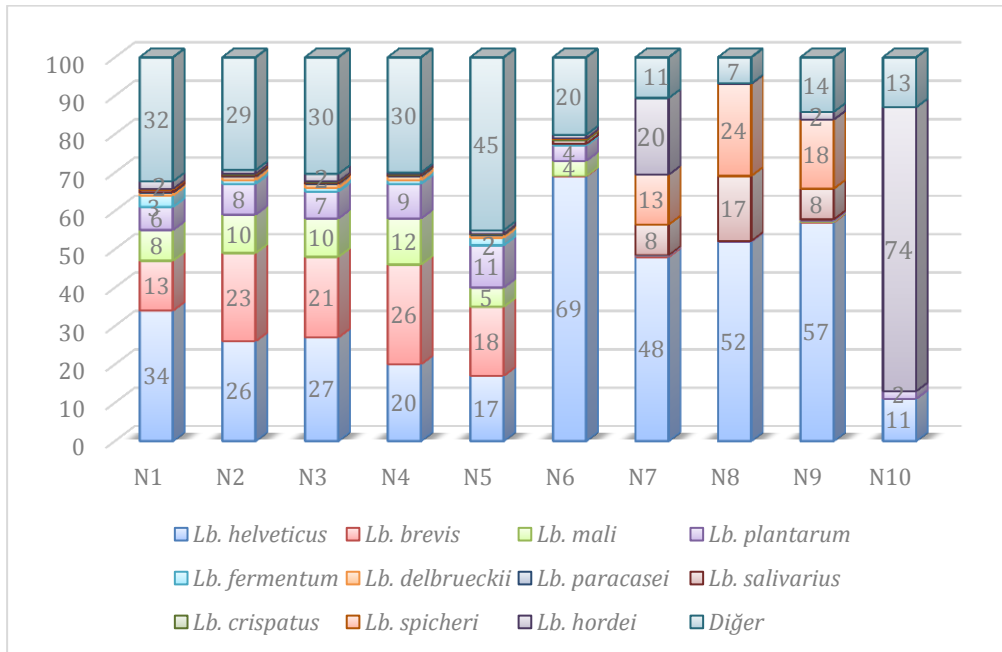
Şekil 4.32'de N8 (Karıştırıcı) örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. *St. suis* karıştırıcıda Streptococcus cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %57'sini oluşturur. *St. pneumoniae* %24, *St. thermophilus* ve *St. parauberis* %7 oranı ile *St. suis*'i izlemektedir. Bunun yanında başta *St. minor* olmak üzere diğer Streptococcus türleri de karıştırıcı yüzeyinde çeşitli oranlarda yer almaktadır.

Şekil 4.33'te N9 (Kesme teli) örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. *St. suis* kesme telinde Streptococcus cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %60'ını oluşturur. *St. pneumoniae* ve *St. thermophilus* %20 ve %10 oranı ile *St. suis*'i izlemektedir. Bunun yanında başta *St. parauberis* olmak üzere diğer Streptococcus türleri de kesme teli yüzeyinde çeşitli oranlarda yer almaktadır.

Şekil 4.34'te N10 (Cendere bezi) örneğinin Streptococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. *St. suis* cendere bezinde Streptococcus cinsi içerisinde en baskın türdür ve bu cinsin %60'ını oluşturur. *St. pneumoniae* ve *St. thermophilus* %24 ve %14 oranı ile *St. suis*'i izlemektedir. Bunun yanında başta *St. parauberis* olmak üzere diğer Streptococcus türleri de cendere bezinde çeşitli oranlarda yer almaktadır.

Lactobacillaceae ailesinin üyesi olan Lactobacillus cinsinin örneklerde bulunma oranının belirlenebilmesi amacıyla tüm süt ürünü örnekleri (D, N1-N5) ve ekipman yüzey örnekleri (E, N6-N10) incelenmiştir. Lactobacillus cinsi “Bacteria” alemi içinde süt ürünü ve ekipman yüzey örneklerinde, Lactococcus cinsine kıyasla düşük oranlarda bulunmaktadır. Süt ürünü örneklerinde Lactobacillus cinsi “Bacteria” alemi içinde N1 ve N2’de %0,4, N3 ve N4’te %0,3, N5’te %0,1 yüzey örneklerinde ise N6 ve N8’de %0,02; N7’de %0,03; N9’da %0,007 ve N10’da %0,004 oranında bulunmaktadır.

Tüm örneklerde Lactobacillus cinsine ait 54 tür tanımlanmış olup, bu türlere ait bakteriler her örnekte farklı yoğunluklarda bulunmaktadır. Lactobacillus cinsi bakteriler örneklerde bu cins içinde %0.002-74 arasında değişen oranlarda bulunmaktadır. Tüm örnekler içinde “Bacteria” alemi içinde en yoğun bulunan tür *L. helveticus* olup en fazla çiğ sütte bulunmakta ve toplam bakterilerin %0,1’ini oluşturmaktadır. Şekil 4.35’te örneklerin Lactobacillus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonları verilmiştir. Buna göre, örneklerde bulunan Lactobacillus cinsi bakteriler çok çeşitli olmakla birlikte, bu cins içinde en baskın türler *L. helveticus*, *L. brevis* ve *L. hordei*’dir.



Şekil 4.35. Örneklerin Lactobacillus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.

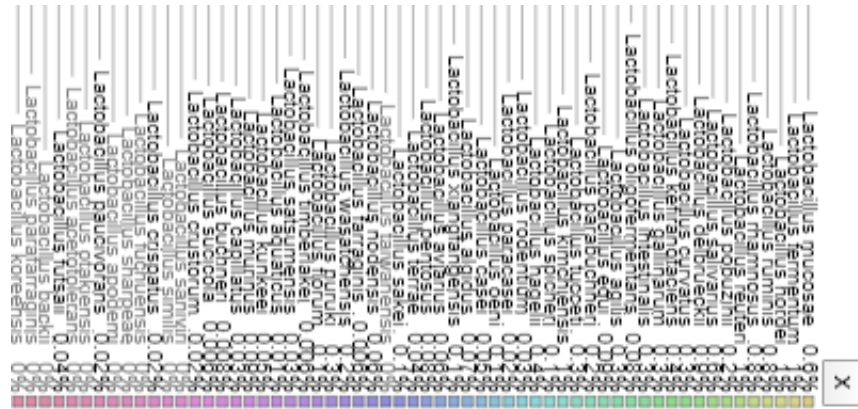
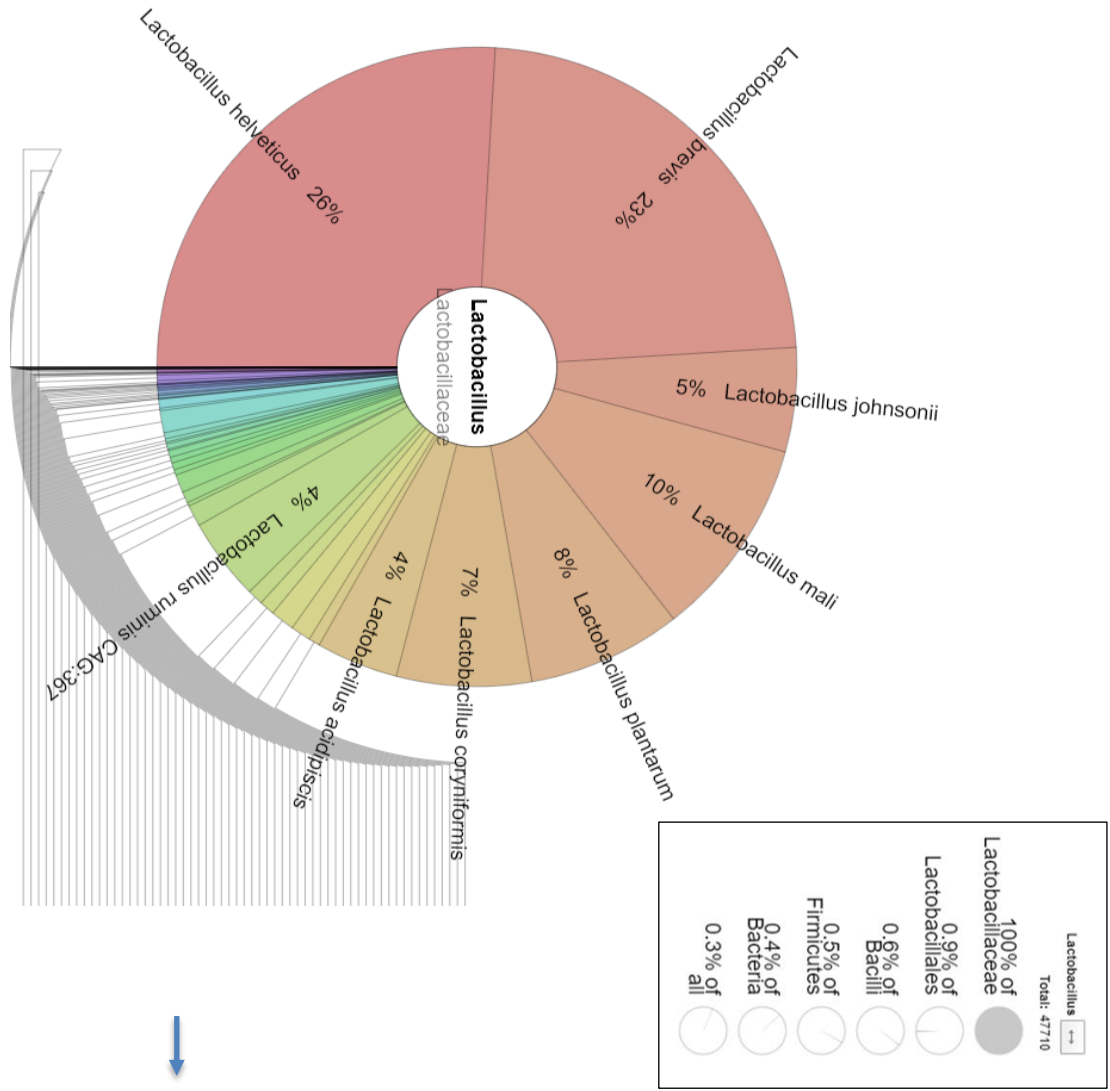
Şekil 4.36'da N1 (Çiğ süt) örneğinin *Lactobacillus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre çiğ sütte *L. helveticus* *Lactobacillus* cinsinin %34'ünü oluşturur ve bu cins içinde en yoğun bulunan türdür. Bunu *L. brevis* %13, *L. johnsonii* ve *L. mali* %8 oranı ile takip etmektedir. Bunun yanında başta *L. plantarum*, *L. coryniformis* ve *L. acidipiscis* olmak üzere diğer *Lactobacillus* türleri de çiğ sütte çeşitli oranlarda yer almaktadır.

Şekil 4.37'de N2 (Starter kültür eklenmiş süt) örneğinin *Lactobacillus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre starter kültür eklenmiş sütte *Lactobacillus* cinsi içinde *L. helveticus* %26, *L. brevis* %23 oranında bulunmaktadır. Bunları %10 bulunma oranı ile *L. mali* izlemektedir. Bunun yanında başta *L. coryniformis* ve *L. acidipiscis* olmak üzere diğer *Lactobacillus* türleri de starter kültür eklenmiş sütte çeşitli oranlarda yer almaktadır.

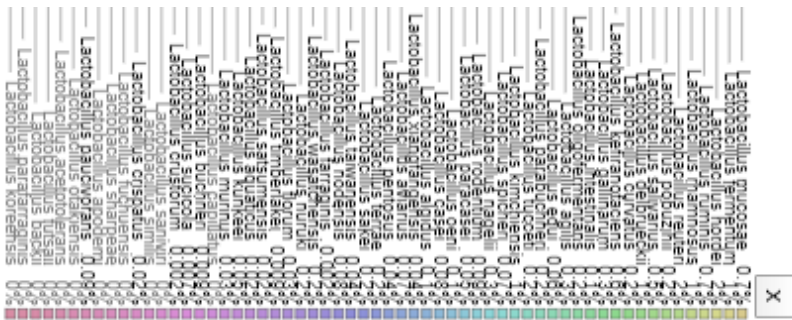
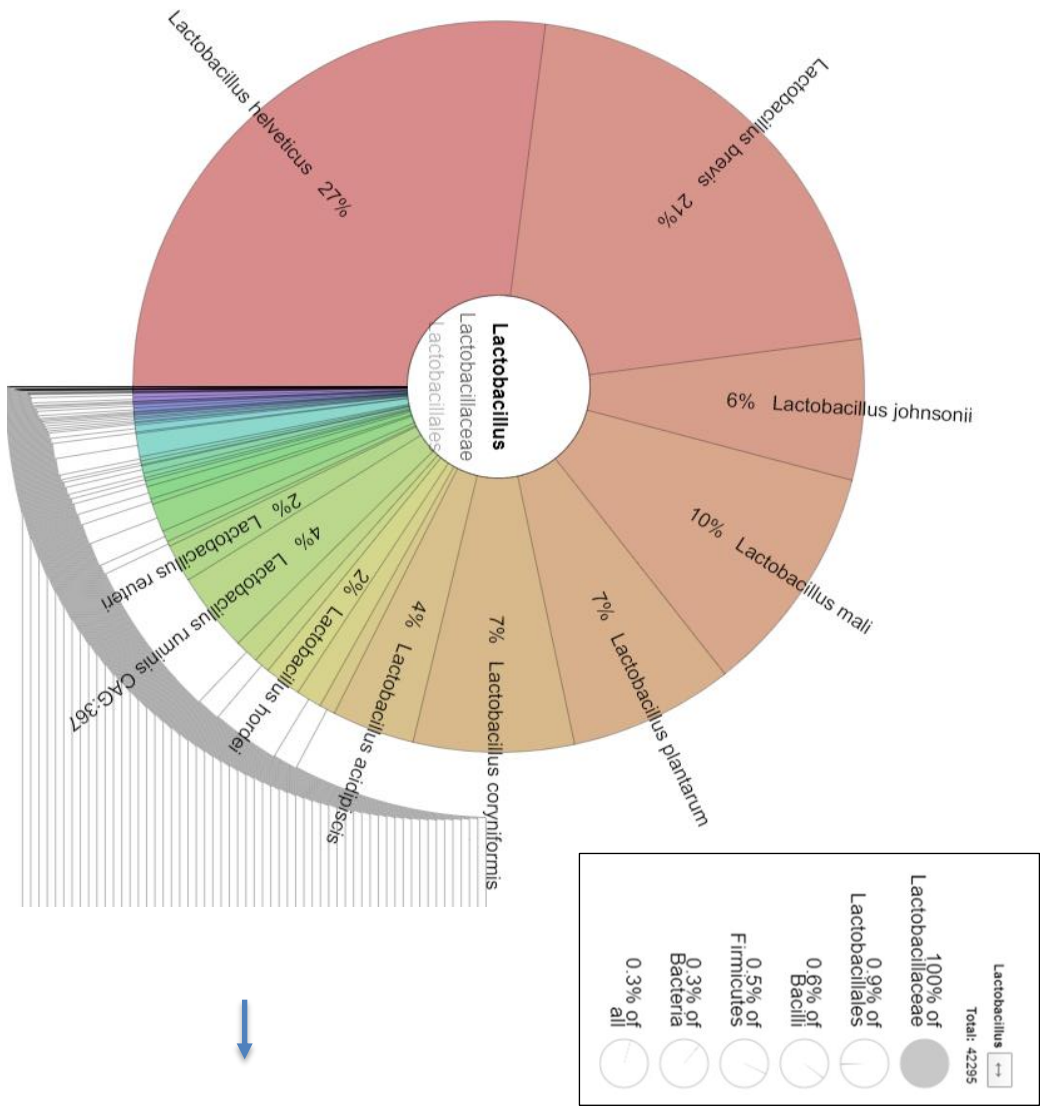
Şekil 4.38'de N3 (Pıhtı) örneğinin *Lactobacillus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre pıhtıda *L. helveticus* %27, *L. brevis* %21, *L. mali* %10 oranında bulunmaktadır. Başta *L. plantarum*, *L. coryniformis* ve *L. acidipiscis* olmak üzere diğer *Lactobacillus* türleri de pıhtıda çeşitli oranlarda yer almaktadır.

Şekil 4.39'de N4 (Teleme) örneğinin *Lactobacillus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. *L. brevis* %26 bulunma oranı ile telemedeki en yoğun bulunan *Lactobacillus* cinsi bakteridir. Bunu *L. helveticus* %20, *L. mali* %12 bulunma oranı ile izlemektedir. Bunun yanında başta *L. plantarum*, *L. coryniformis* ve *L. acidipiscis* olmak üzere diğer *Lactobacillus* türleri de telemede çeşitli oranlarda yer almaktadır.

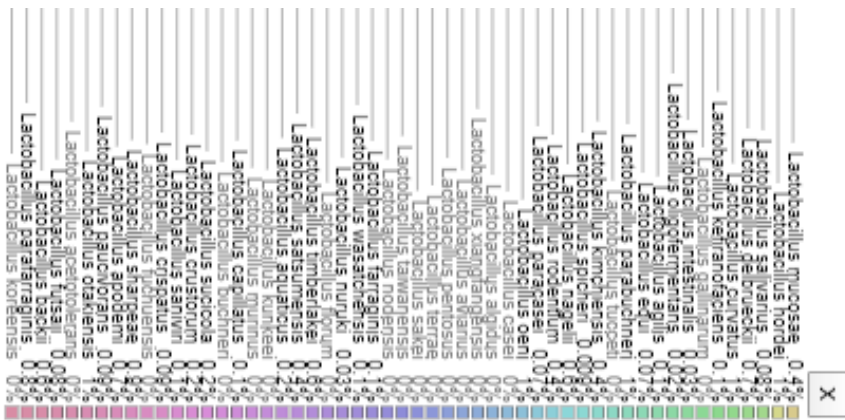
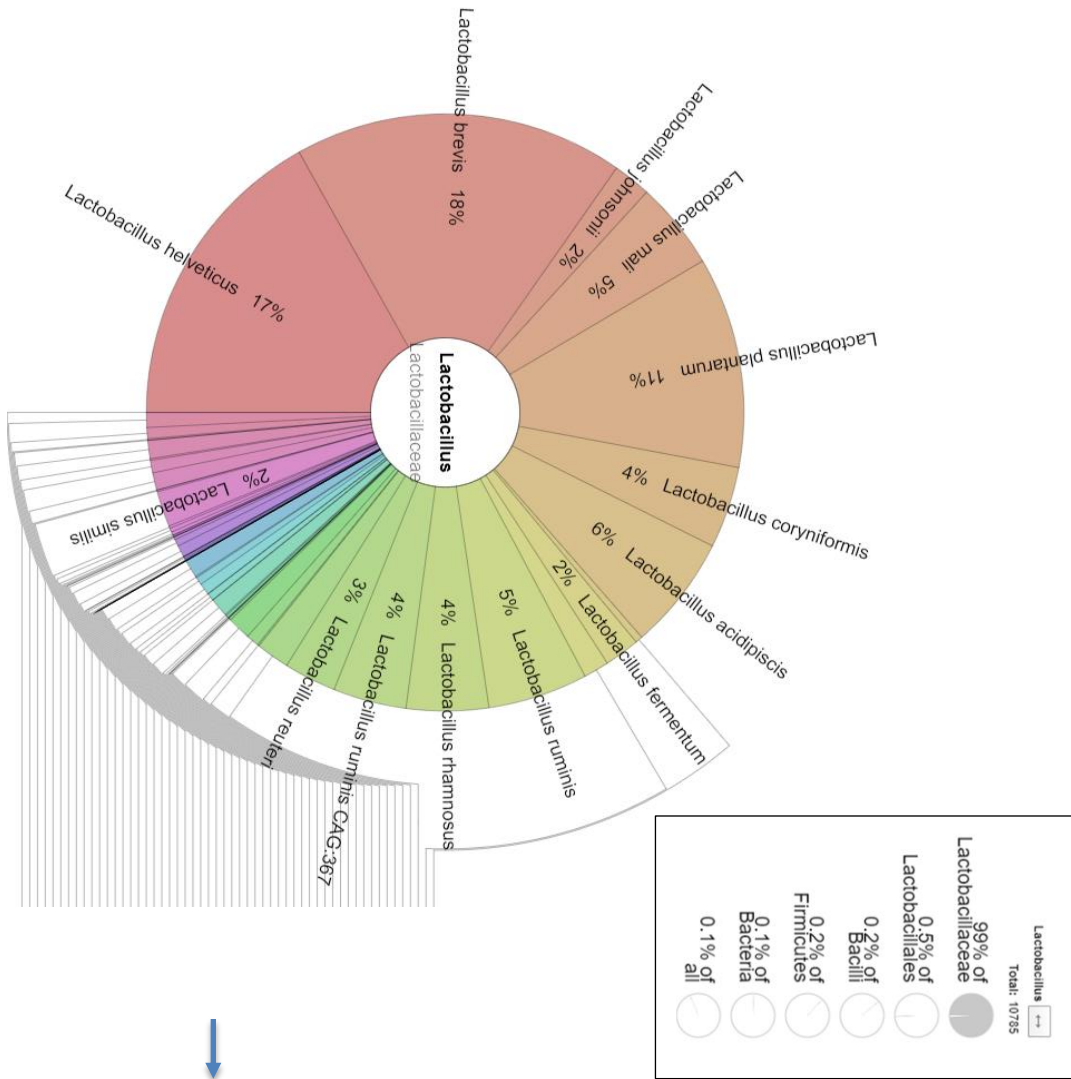
Şekil 4.40'ta N5 (Beyaz peynir) örneğinin *Lactobacillus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre son ürün beyaz peynirde *L. brevis* *Lactobacillus* cinsinin %18'ini, *L. helveticus* %17'sini, *L. plantarum* %11'ini oluşturmaktadır. Bunun yanında başta *L. mali*, *L. coryniformis* ve *L. acidipiscis* olmak üzere diğer *Lactobacillus* türleri de beyaz peynirde çeşitli oranlarda yer almaktadır.



Şekil 4.37. N2 örneğinin Lactobacillus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



Şekil 4.38. N3 örneğinin *Lactobacillus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



Şekil 4.40. N5 örneğinin Lactobacillus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.

Şekil 4.41’de N6 (Tanker) örneğinin *Lactobacillus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre tanker iç yüzeyinde *L. helveticus* *Lactobacillus* cinsinin %69’unu oluşturur ve bu cins içinde en yoğun bulunan türdür. Bunu *L. koreensis* %5, *L. intestinalis*, *L. mali*, *L. plantarum* ve *L. reuteri* %4 oranı ile takip etmektedir. Diğer *Lactobacillus* türleri de tankeriç yüzeyinde çeşitli oranlarda yer almaktadır.

Şekil 4.42’de N7 (Tekne) örneğinin *Lactobacillus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre tekne yüzeyinde *L. helveticus* *Lactobacillus* cinsinin %48’ini oluşturur ve bu cins içinde en yoğun bulunan türdür. Bu cins içinde *L. hordei* %20, *L. spicheri* %13 ve *L. salivarius* %8 oranında bulunmaktadır. Başta *L. buncheri*, *L. nodensis*, *L. pobuzihii* olmak üzere diğer *Lactobacillus* türleri de tekne yüzeyinde çeşitli oranlarda yer almaktadır.

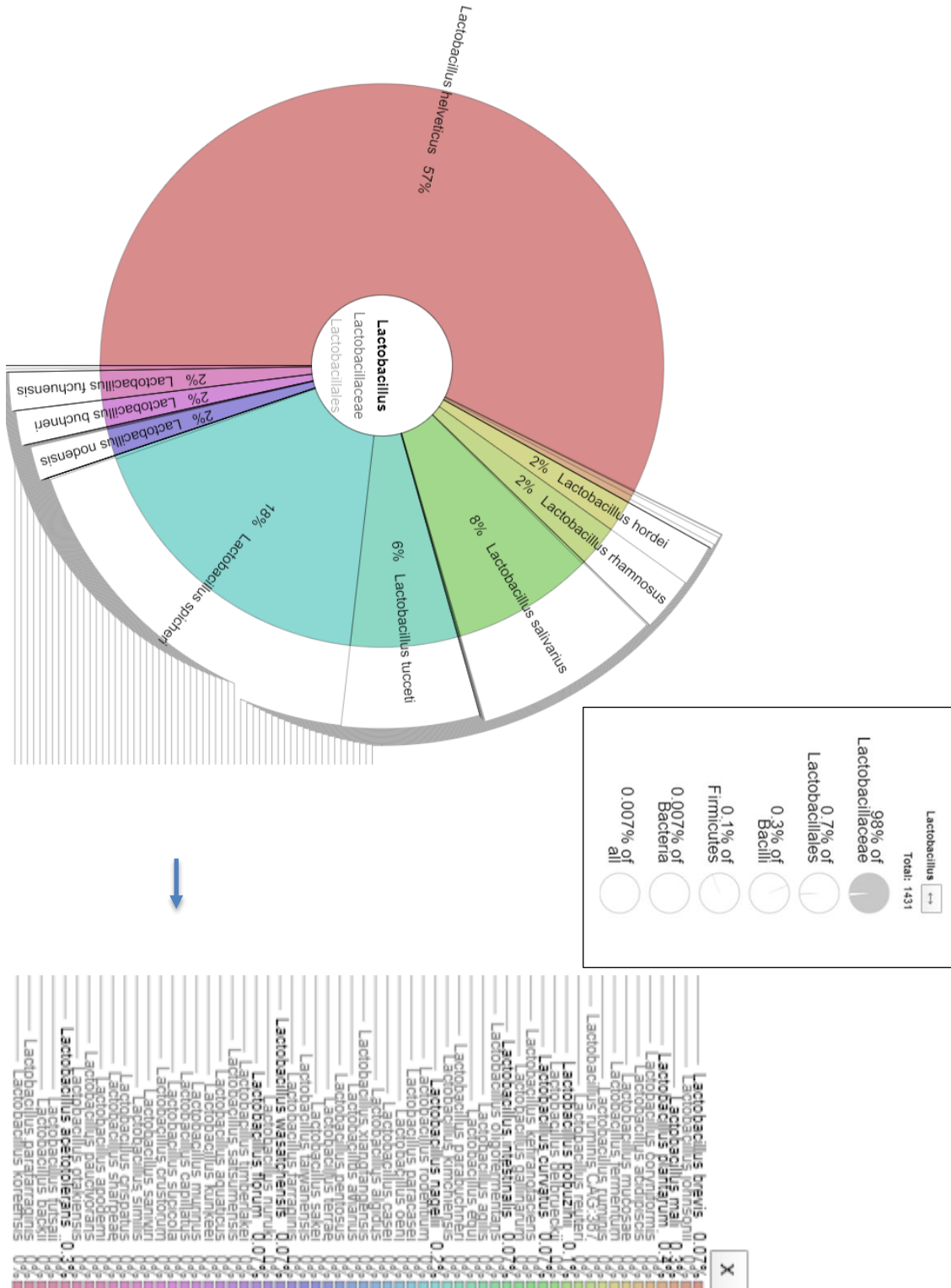
Şekil 4.43’te N8 (Karıştırıcı) örneğinin *Lactobacillus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre karıştırıcı yüzeyinde *L. helveticus* *Lactobacillus* cinsinin %52’sini oluşturur ve bu cins içinde en yoğun bulunan türdür. *L. spicheri* *Lactobacillus* cinsinin %24’ünü, *L. salivarius* ise %17’sini oluşturmaktadır. Başta *L. pobuzihii*, *L. buncheri*, *L. rhamnosus* olmak üzere diğer *Lactobacillus* türleri de karıştırıcı yüzeyinde çeşitli oranlarda yer almaktadır.

Şekil 4.44’te N9 (Kesme teli) örneğinin *Lactobacillus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre kesme teli yüzeyinde *L. helveticus* *Lactobacillus* cinsinin %57’sini oluşturur ve bu cins içinde en yoğun bulunan türdür. *L. spicheri* *Lactobacillus* cinsinin %18’ini, *L. salivarius* %8’ini *L. tuceti* ise %6’sını oluşturmaktadır. Başta *L. buncheri*, *L. hordei*, *L. rhamnosus*, *L. nodensis*, *L. fuchuensis* olmak üzere diğer *Lactobacillus* türleri de kesme teli yüzeyinde çeşitli oranlarda yer almaktadır.

Şekil 4.45’te N10 (Cendere bezi) örneğinin *Lactobacillus* cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre cendere bezi yüzeyinde *L. hordei* %74 bulunma

oranı ile *Lactobacillus* cinsinin en baskın türüdür. Bunu %11 bulunma oranı ile *L. helveticus* ve *L. florum* takip etmektedir. Başta *L. plantarum* olmak üzere diğer *Lactobacillus* türleri de cendere bezi yüzeyinde çeşitli oranlarda yer almaktadır.

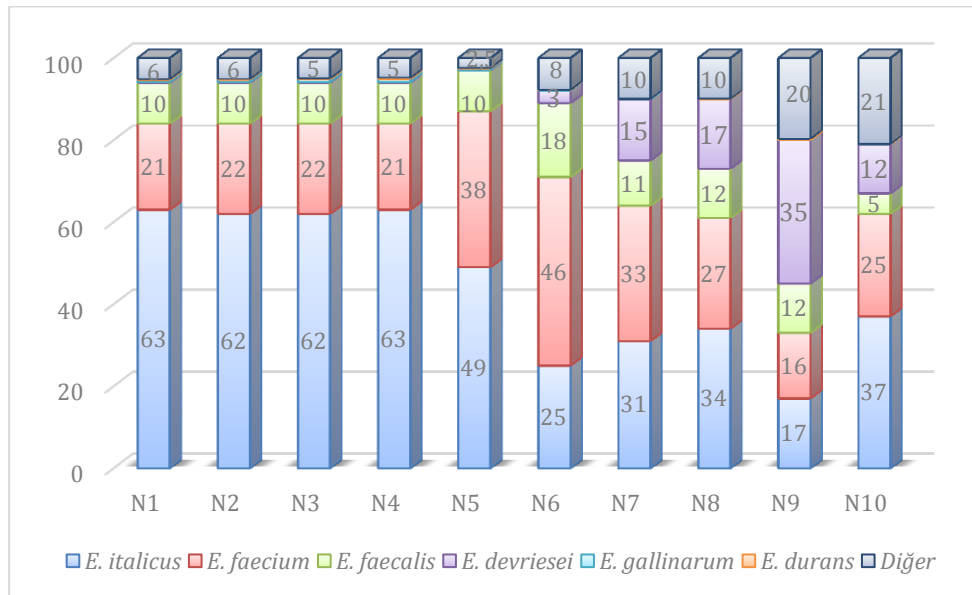
Süt ürünü örneklerinde *Lactobacillus* cinsi içinde en baskın iki tür *L. helveticus* ve *L. brevis*'tir. Yüzey örneklerinde ise N10 dışındaki örneklerde baskın tür *L. helveticus*, N10'da ise baskın tür *L. hordei*'dir.



Şekil 4.44. N9 örneğinin Lactobacillus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.

Enterococcaceae ailesinin üyesi olan Enterococcus cinsi bakterilerin örneklerde hangi oranlarda bulunduğunu görebilmek amacıyla tüm süt ürünü örnekleri (D, N1-N5) ve ekipman yüzey örneklerinin (E, N6-N10) Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonları incelenmiştir. Buna göre Enterococcus cinsi süt ürünü örneklerinde “Bacteria” alemi içinde N1, N2 ve N3’te %7; N4’te %8 ve N5’te %4, ekipman yüzey örneklerinde ise N6, ve N9’da %0,3; N7 ve N8’de %0,5 ve N10’da %0,3 oranlarında bulunmaktadır.

Tüm örneklerde Enterococcus cinsine ait 46 tür tanımlanmış olup bu bakteri türleri her örnekte farklı yoğunluklarda bulunmaktadır. Enterococcus cinsi bakteriler örneklerde bu cins içinde %0.0001-63 arasında değişen oranlarda bulunmaktadır. Buna göre, tüm örneklerde “Bacteria” alemi içinde bu cinse ait en baskın bulunan bakteri *E. italicus* olup en yoğun bulunduğu çiğ süt ve telemde toplam bakterilerin %5’ini oluşturmaktadır. Süt ürünü örneklerinde *E. italicus*’u *E. faecium* ve *E. faecalis* izlemektedir. En az yoğunlukta tanımlanan Enterococcus cinsi bakteri *E. pallens* olup, en az yoğunlukta bulunduğu kesme telinde toplam bakterilerin %0,0002’sini oluşturmaktadır. Şekil 4.46’da örneklerin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonları verilmiştir. Buna göre, süt ürünü örneklerinde en baskın tür *E. italicus*’tur ve onu *E. faecium* ve *E. faecalis* izlemektedir. Ekipman yüzeyi örneklerinde ise bu üç tür dışında *E. devriesei* göze çarpmaktadır.



Şekil 4.46. Örneklerin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonları.

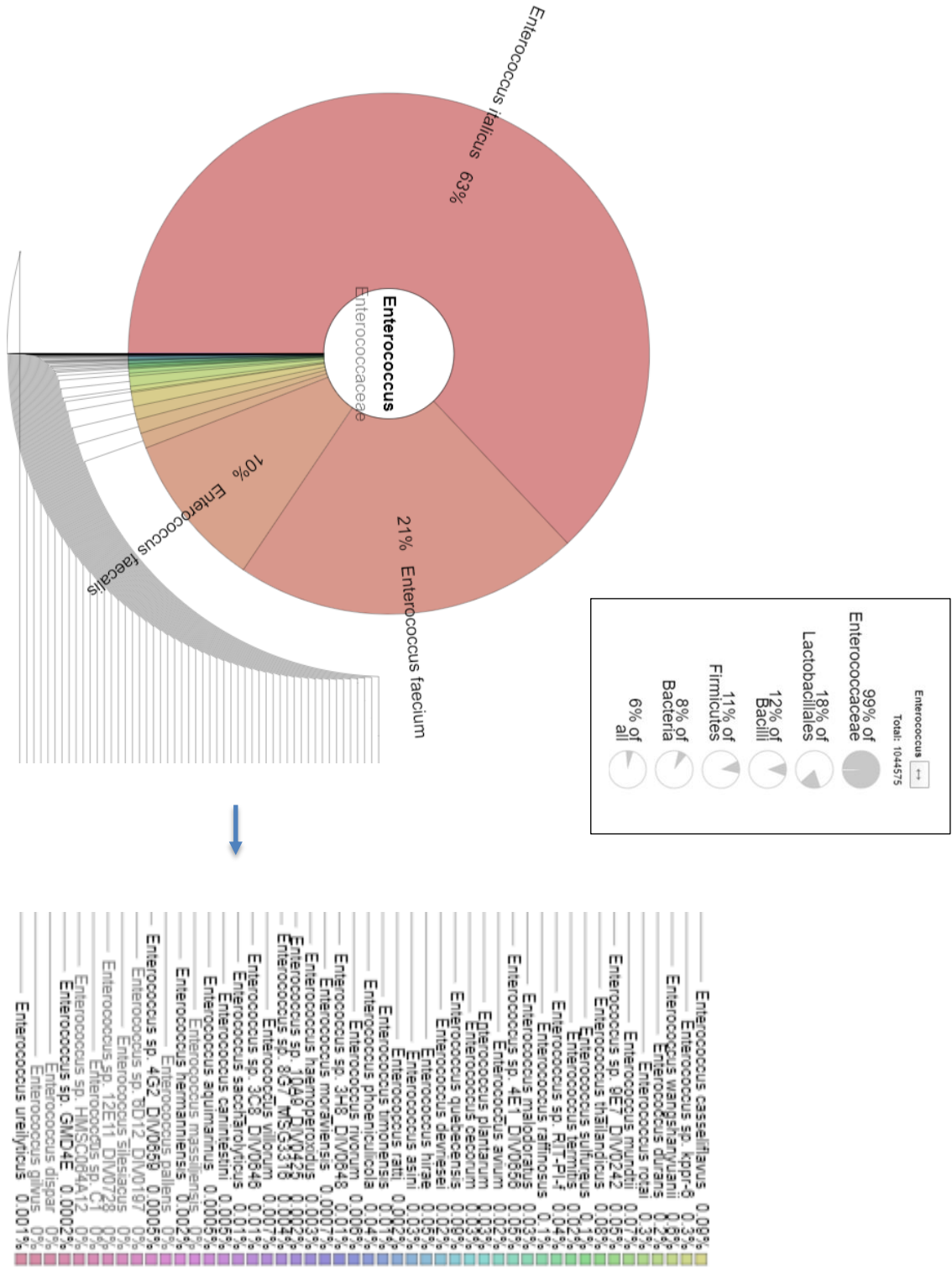
Şekil 4.47'de N1 (Çiğ süt) örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre çiğ sütte *E. italicus* Enterococcus cinsinin %63'ünü oluşturur ve bu cins içinde en yoğun bulunan türdür. Bu cins içinde *E. faecium* %21 ve *E. faecalis* %10 oranında bulunmaktadır. Geriye kalan %6'luk kısmı başta *E. pseudoavium* ve *E. gallinarum* olmak üzere diğer türler oluşturmaktadır.

Şekil 4.48'de N2 (Starter kültür eklenmiş süt) örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre starter kültür eklenmiş sütte *E. italicus* Enterococcus cinsinin %62'sini oluşturur ve bu cins içinde en yoğun bulunan türdür. Bu cins içinde *E. faecium* %22 ve *E. faecalis* %10 oranında bulunmaktadır. Geriye kalan %6'luk kısmı başta *E. pseudoavium* ve *E. gallinarum* olmak üzere diğer türler oluşturmaktadır.

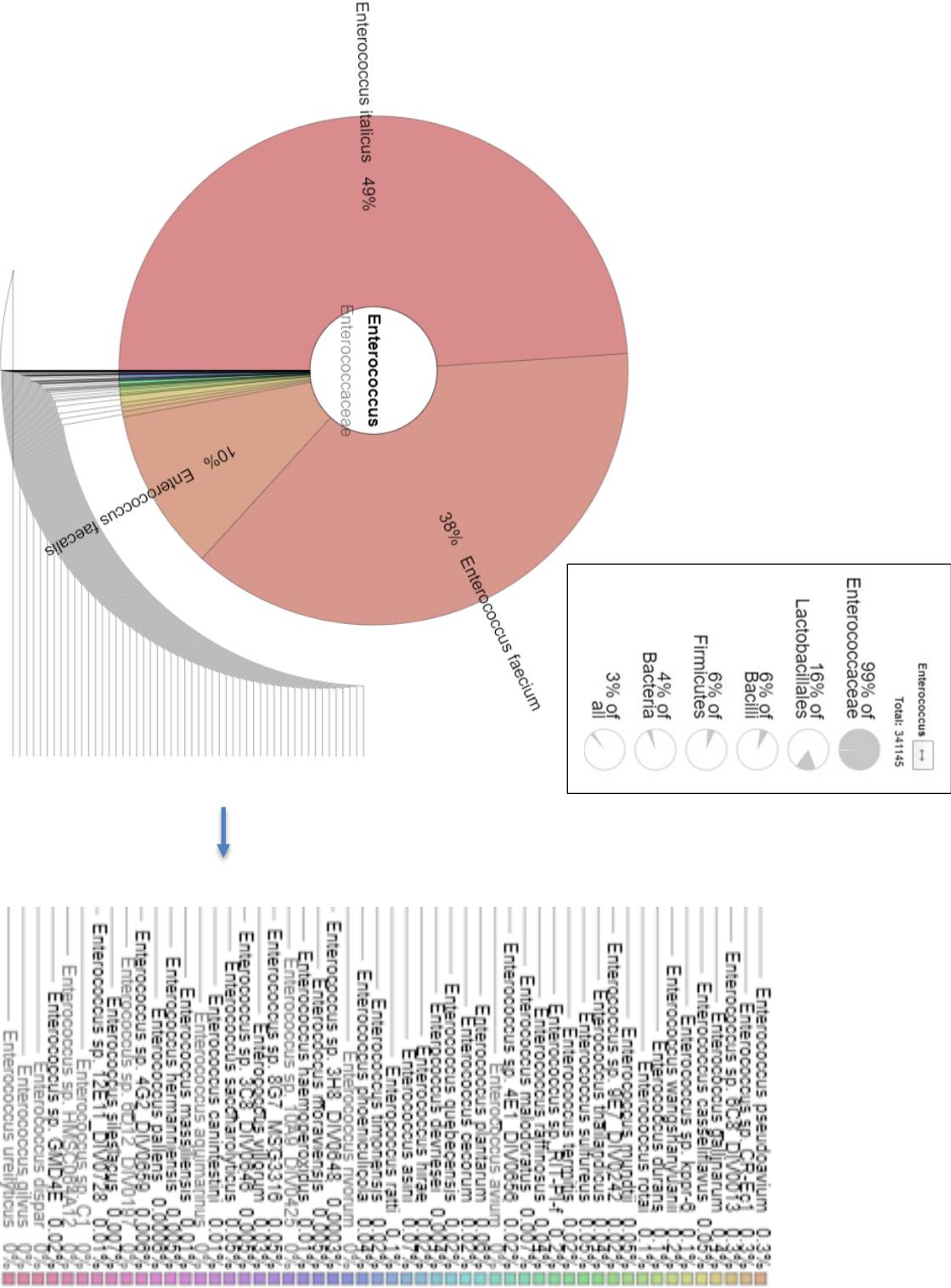
Şekil 4.49'da N3 (Pıhtı) örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre pıhtıda *E. italicus* Enterococcus cinsinin %62'sini oluşturur ve bu cins içinde en yoğun bulunan türdür. Bu cins içinde *E. faecium* %22 ve *E. faecalis* %10 oranında bulunmaktadır. Geriye kalan %6'luk kısmı başta *E. pseudoavium* ve *E. gallinarum* olmak üzere diğer türler oluşturmaktadır.

Şekil 4.50'de N4 (Teleme) örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre telemede *E. italicus* Enterococcus cinsinin %63'ünü oluşturur ve bu cins içinde en yoğun bulunan türdür. Bu cins içinde *E. faecium* %21 ve *E. faecalis* %10 oranında bulunmaktadır. Geriye kalan %6'luk kısmı başta *E. pseudoavium* ve *E. gallinarum* olmak üzere diğer türler oluşturmaktadır.

Şekil 4.51'de N5 (Beyaz peynir) örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre beyaz peynirde *E. italicus* Enterococcus cinsinin %49'unu oluşturur ve bu cins içinde en yoğun bulunan türdür. Bu cins içinde *E. faecium* %38 ve *E. faecalis* %10 oranında bulunmaktadır. Geriye kalan %3'lük kısmı başta *E. pseudoavium* ve *E. gallinarum* olmak üzere diğer türler oluşturmaktadır.



Şekil 4.50. N4 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



Şekil 4.51. N5 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.

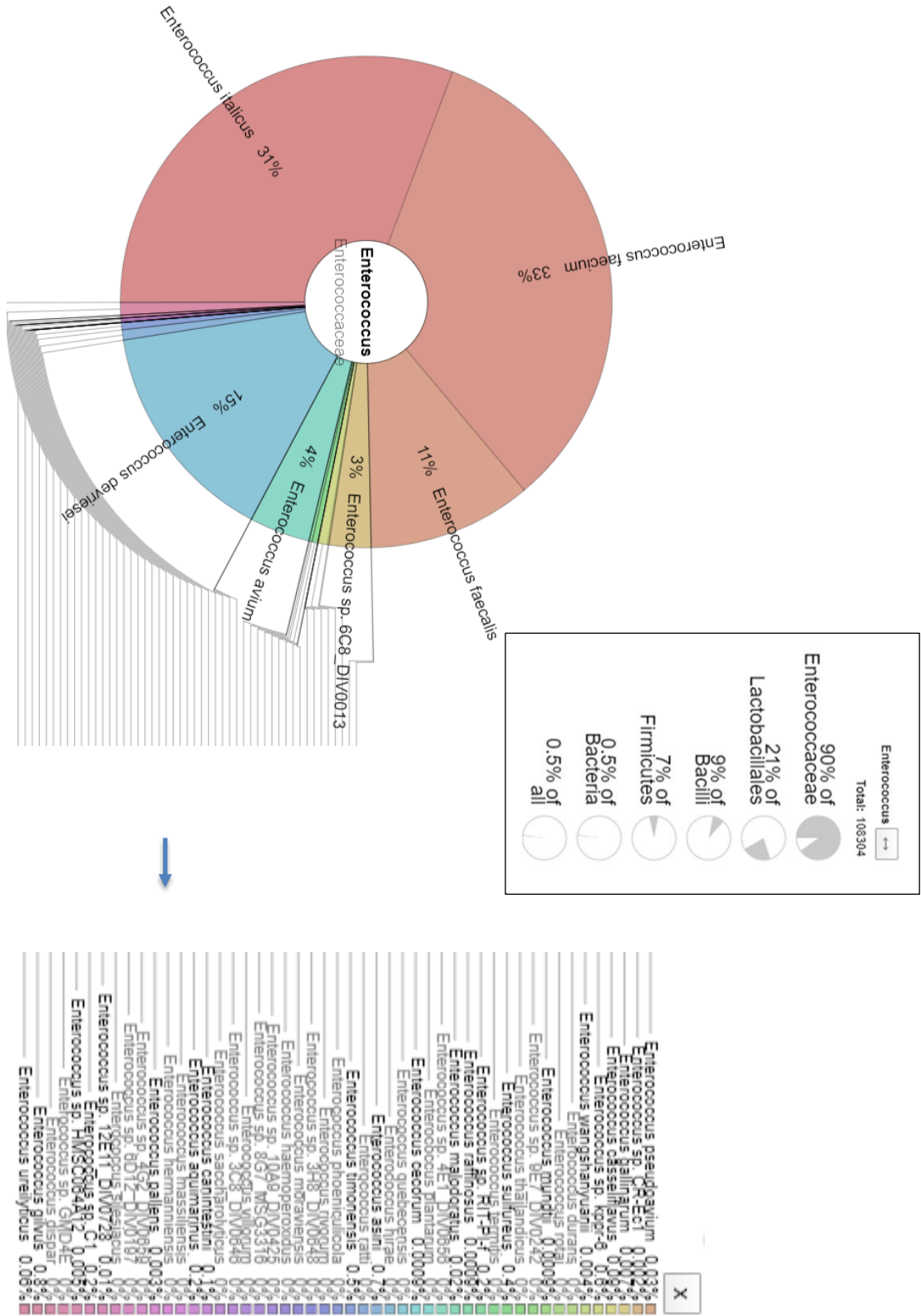
Şekil 4.52’de N6 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre tanker iç yüzeyinde *E. faecium*, Enterococcus cinsinin %46’sını oluşturur ve bu cins içinde en yoğun bulunan türdür. Bunu, *E. italicus* %25, *E. faecalis* %18 ve *E. devrisei* %3 oranı ile takip etmektedir. Geriye kalan %8’lik kısmı başta *E. avium* olmak üzere diğer türler oluşturmaktadır.

Şekil 4.53’te N7 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre tekne yüzeyinde *E. faecium*, Enterococcus cinsinin %33’ünü oluşturur ve bu cins içinde en yoğun bulunan türdür. Bu cins içinde *E. italicus* %31, *E. devrisei* %15 ve *E. faecalis* %11 oranında bulunmaktadır. Geriye kalan %10’luk kısmı başta *E. avium* olmak üzere diğer türler oluşturmaktadır.

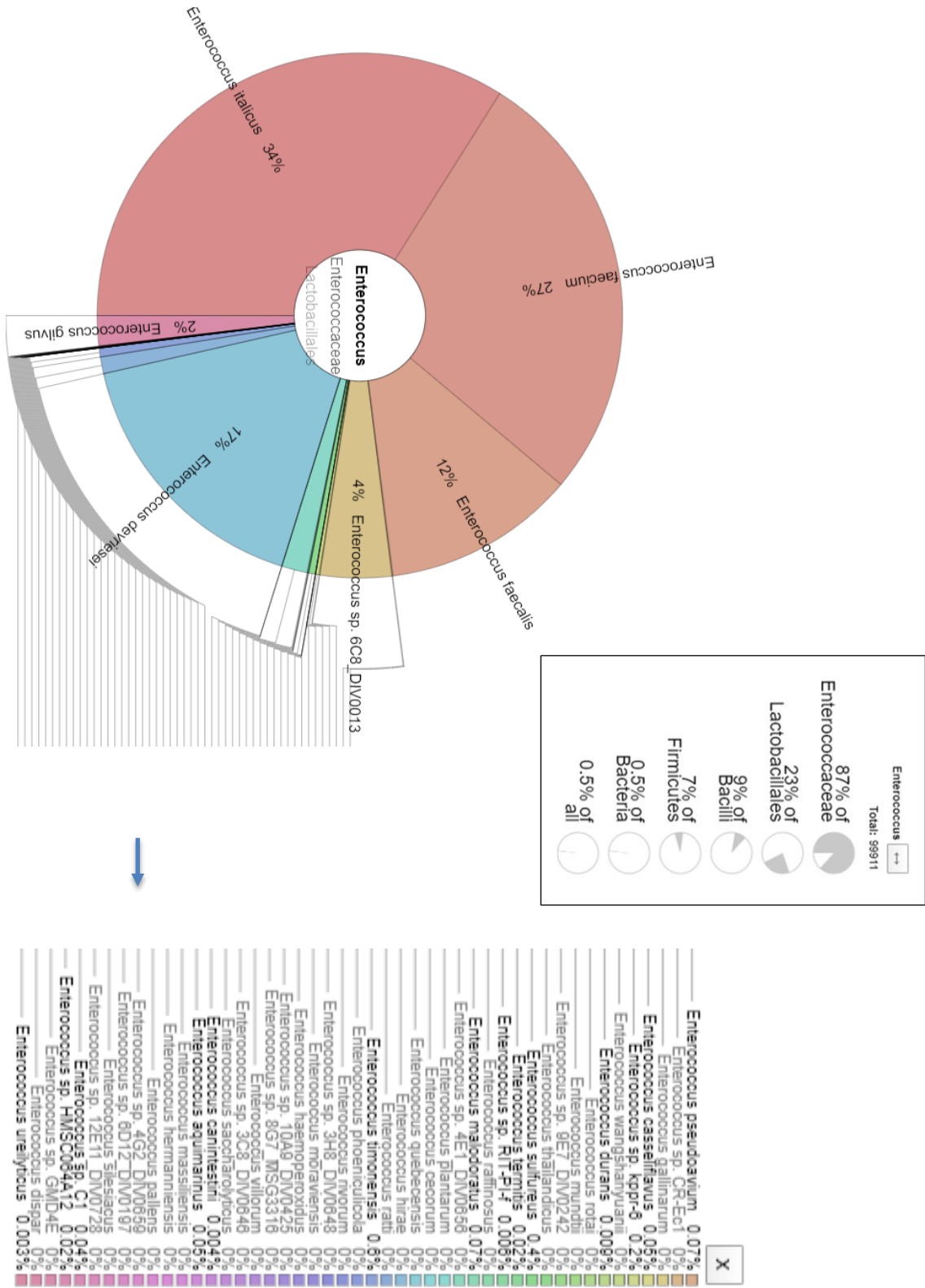
Şekil 4.54’te N8 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre karışırıcı yüzeyinde *E. italicus*, Enterococcus cinsinin %34’ünü oluşturur ve bu cins içinde en yoğun bulunan türdür. *E. faecium*, Enterococcus cinsinin %27’sini, *E. devrisei* %17’sini ve *E. faecalis* %12’sini oluşturmaktadır. Geriye kalan %10’luk kısmı başta *E. avium* ve *E. gilvus* olmak üzere diğer türler oluşturmaktadır.

Şekil 4.55’te N9 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre kesme teli yüzeyinde *E. devrisei* Enterococcus cinsinin %35’ini oluşturur ve bu cins içinde en yoğun bulunan türdür. *E. italicus*, Enterococcus cinsinin %17’sini, *E. faecium* %16’sını, *E. faecalis* %12’sini oluşturmaktadır. Geriye kalan %20’lik kısmı başta *E. malodarutus* ve *E. gilvus* olmak üzere diğer türler oluşturmaktadır.

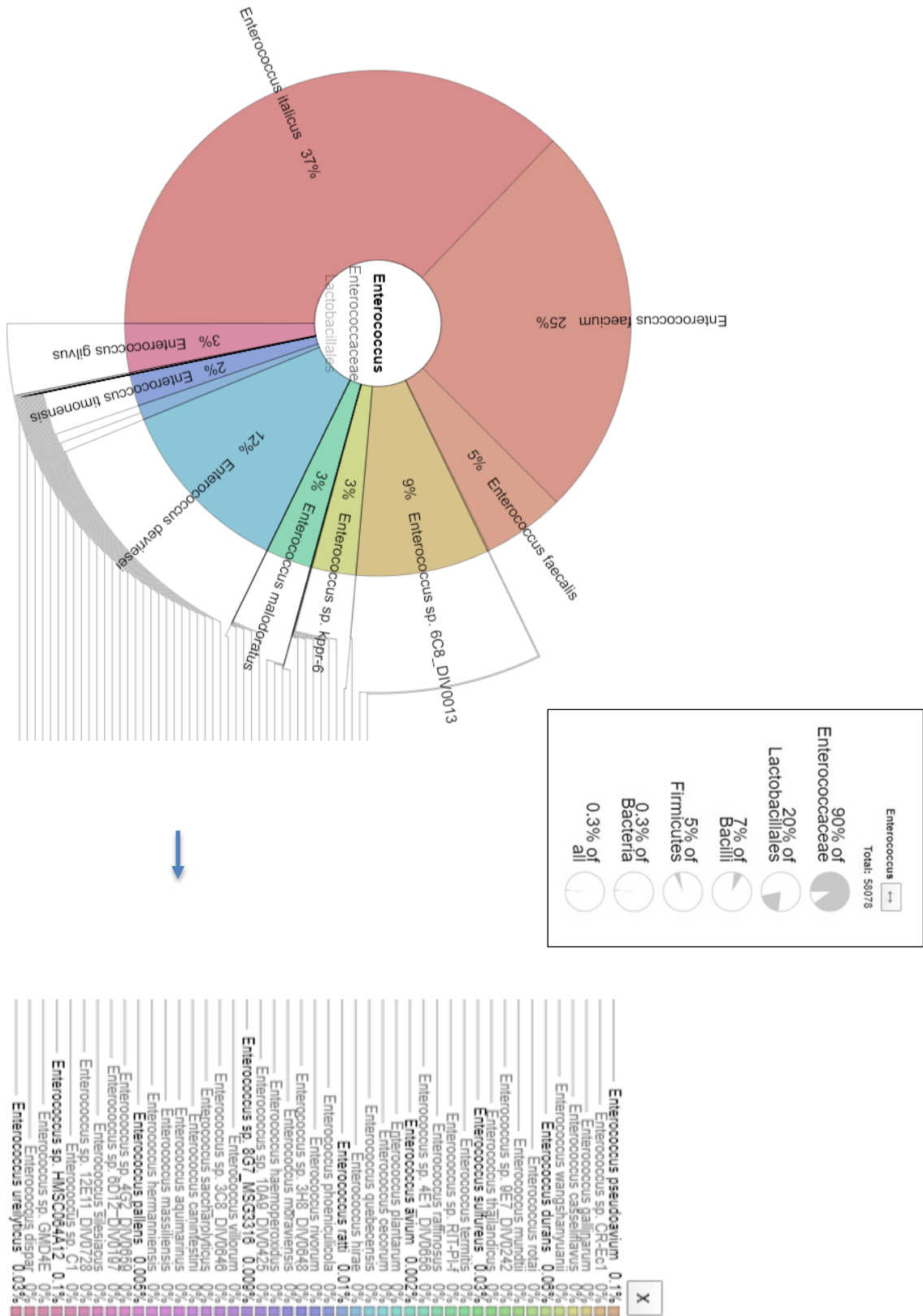
Şekil 4.56’da N10 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu verilmiştir. Buna göre cendere bezi yüzeyinde *E. italicus*, %37 bulunma oranı ile Enterococcus cinsinin en baskın türüdür. Bunu %25 ile *E. faecium*, %12 ile *E. devrisei* ve %5 ile *E. faecalis* takip etmektedir. Geriye kalan %21’lik kısmı başta *E. malodarutus* ve *E. gilvus* olmak üzere diğer türler oluşturmaktadır.



Şekil 4.53. N7 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



Şekil 4.54. N8 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.

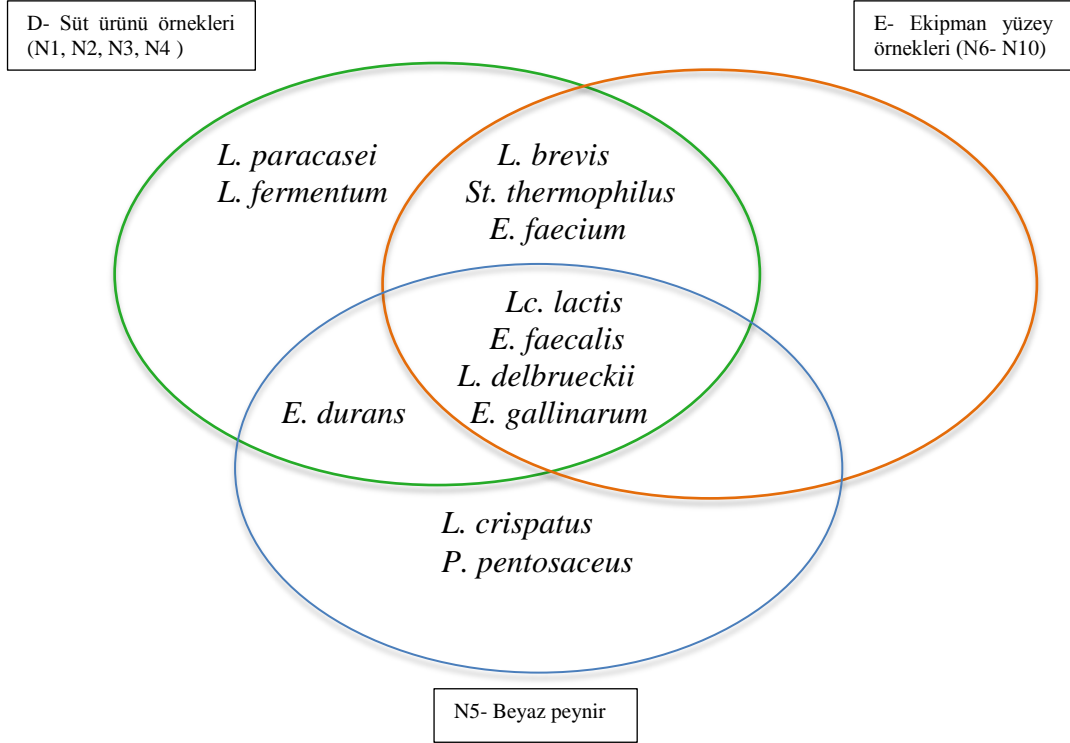


Şekil 4.56. N10 örneğinin Enterococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.

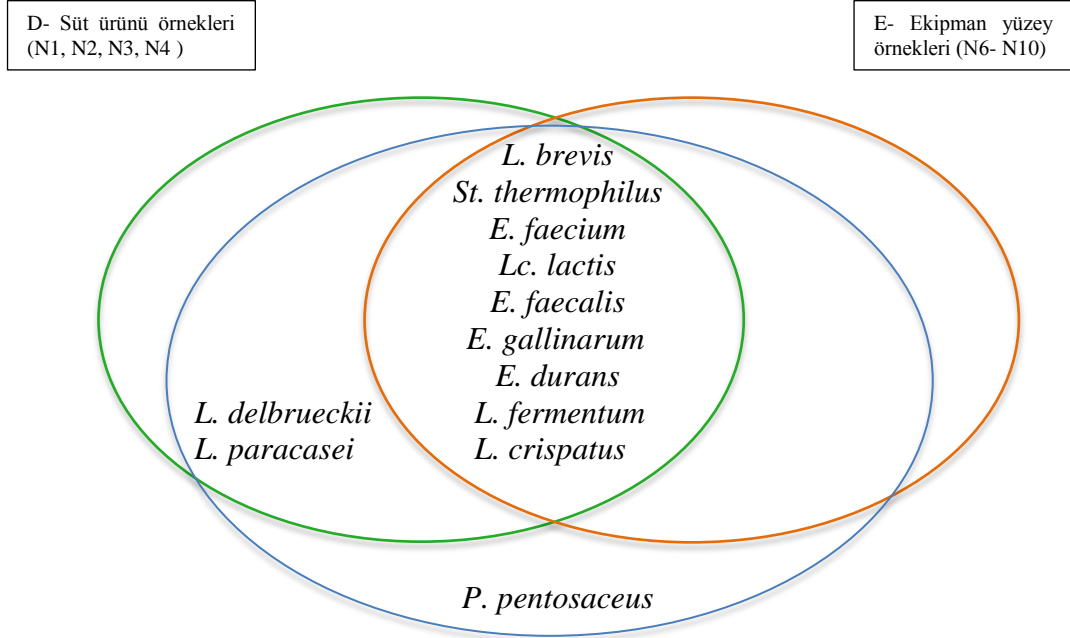
4.3. Kültüromik ve Metagenomik Analiz Sonuçlarının Karşılaştırmalı Değerlendirmesi

Çalışmanın bu bölümünde kültüromik ve yeni nesil shotgun metagenomik analiz sonuçlarının karşılaştırmalı değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, öncelikle MALDI-TOF MS kullanılarak tamamlanan kültüromik analiz sonuçları Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11’de derlenmiştir. Ayrıca, elde edilen metadatanın karşılaştırılması için *BacDive* (Bacterial Diversity) Bakteriyel Çeşitlilik Meta Veritabanından yararlanılmıştır (BacDive, 2020). Bu bakteriyel meta veritabanı geniş bir yelpazedeki bakteriyel ve arkeal suşlar arasında meta veriyi işler, yapılandırır ve yeniden kullanıma sunar. Çizelge 4.12’de örneklerde kültüromik ve yeni nesil shotgun metagenomik dizileme yöntemleri ile tanımlanan bazı mikroorganizmaların *BacDive* meta veritabanı bilgileri verilmiştir.

MALDI-TOF MS ile örneklerden 118 adet laktik asit bakterisi izole edilip tanımlanmıştır (Çizelge 4.10). Bunun %13,55’ini *Lactococcus*, %25,42’sini *Lactobacillus*, %58,45’ini *Enterococcus*, %1,69’unu *Streptococcus* ve %0,85’ini ise *Pediococcus* cinsine ait bakteri türleri oluşturmaktadır. Şekil 4.57’de MALDI-TOF MS ile süt ürünü örnekleri (D- N1, N2, N3, N4), ekipman yüzey örnekleri (E- N6, N7, N8, N9, N10) ve beyaz peynirde (N5) tanımlanan laktik asit bakterilerinin dağılımı verilmiştir. Buna göre, *Lc. lactis*, *E. faecalis*, *L. delbrueckii* ve *E.gallinarum* her üç grupta da tanımlanmıştır. *L. paracasei* ve *L. fermentum* sadece süt ürünün örneklerinde tanımlanmış olup beyaz peynir ve ekipman yüzey örneklerinden izole edilmemiştir. *L. brevis*, *St. thermophilus* ve *E. faecium* süt ürünü ve ekipman yüzey örneklerinden izole edilip tanımlanmıştır. *E. durans* süt ürünü örnekleri ve beyaz peynirden tanımlanmış, *L. crispatus* ve *P. pentosaceus* ise süt ürünü ve ekipman yüzey örneklerinden izole edilmemiş, sadece beyaz peynirden izole edilip tanımlanmıştır. Şekil 4.58’de ise MALDI-TOF MS ile örneklerden izole edilen bakterilerin shotgun metagenomik ile elde edilen dağılımları verilmiştir. Buna göre *L. brevis*, *St. thermophilus*, *E. faecium*, *L. fermentum* ve *L. crispatus* MALDI-TOF MS ile N5 (Beyaz peynir) örneğinden izole edilememiştir ancak shotgun dizileme ile bu örnekte de bulunduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.57. MALDI-TOF MS ile D- Süt ürünü örnekleri (N1, N2, N3, N4), E- Ekipman yüzey örnekleri (N6, N7, N8, N9, N10) ve N5- Beyaz peynir örneğinde tanımlanan mikroorganizmaların dağılımı.



Şekil 4.58. MALDI-TOF MS ile D- Süt ürünü örnekleri (N1, N2, N3, N4), E- Ekipman yüzey örnekleri (N6, N7, N8, N9, N10) ve N5- Beyaz peynir örneğinde tanımlanan mikroorganizmaların shotgun metagenomik dağılımı.

Çizelge 4.10’da MALDI-TOF MS ile örneklerden izole edilen laktik asit bakterisi sayıları verilmiştir. Buna göre, tanımlanan laktik asit bakterileri içerisinde %13.55 oranında *Lc. lactis* olduğu ve N6 dışında tüm örneklerden izole edilerek tanımlandığı belirlenmiştir. *Lc. lactis* kültüromik yaklaşımı ile izole edilip tanımlanan Lactococcus cinsine ait tek türdür. Shotgun metagenom analiz sonuçlarına göre ise, örneklerde Lactococcus cinsine ait 11 çeşit tür tanımlanmıştır. Lactococcus cinsi Lactobacillales takımı içinde tüm örneklerde %36 (N10) ile %58 (N6) arasında değişen oranlarda bulunmaktadır. Kültüromik yaklaşımı ile N6 hariç tüm örneklerden izole edilip tanımlanan *Lc. lactis* türünün, shotgun metagenom analiz ile tüm örneklerde Lactococcus cinsi içinde %32-72 arasında değişen oranlarda bulunduğu tespit edilmiştir. *Lc. lactis*’in *Lc. lactis* subsp. *lactis* ve *Lc. lactis* subsp. *cremoris* suşları gıda endüstrisinde beyaz peynir starter kültürü olarak kullanılmaktadır (Çizelge 2.2). Çizelge 4.12 incelendiğinde, *Lc. lactis*, Alman sınıflandırma sistemine göre Risk Grubu 1’de yer almaktadır. Bu grupta yer alan bakteriler için “İnsanda hastalığa yol açma ihtimali bulunmayan biyolojik etkenler” tanımı yapılmaktadır. Ancak bunun yanında *Lc. lactis*’in bazı suşlarının potansiyel insan patojeni olduğu bilgisi yer almaktadır. Literatür incelendiğinde, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*’in sebep olduğu bildirilen koryoamniyonit ve kolanjit vaka raporları olduğu görülmektedir (Davies ve ark., 2009; Azouzi ve ark., 2015). *Lc. lactis* subsp. *lactis*’ten elde edilen nisin Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından GRAS (Generally recognized as safe) olarak kabul edilmekte ve patojen bakterilerin ve sporlarının gelişimini inhibe etmesi özelliğinden dolayı gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Çizelge 4.10. MALDI-TOF MS sonuçlarına göre örneklerden izole edilen LAB sayıları.

	LAB	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	Toplam
1.	<i>Lactococcus lactis</i>	2	2	3	2	1	-	2	1	1	2	16 (%13,55)
2.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	3	3	5	2	2	3	2	1	1	2	24 (%20,34)
3.	<i>Lactobacillus paracasei</i>	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2 (%1,69)
4.	<i>Lactobacillus brevis</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	2 (%1,69)
5.	<i>Lactobacillus crispatus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1 (%0,85)
6.	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (%0,85)
7.	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1 (%0,85)
8.	<i>Streptococcus thermophilus</i>	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	2 (%1,69)
9.	<i>Enterococcus faecalis</i>	3	5	3	6	3	6	4	3	3	5	41 (%34,74)
10.	<i>Enterococcus faecium</i>	-	1	1	-	-	-	1	1	-	-	4 (%3,39)
11.	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2	2	2	3	1	-	2	-	-	-	12 (%10,16)
12.	<i>Enterococcus durans</i>	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	3 (%2,54)
13.	<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	1	-	-	1	1	2	3	1	9 (%7,62)
	Toplam	12	16	16	14	10	10	13	8	9	10	118 (%100)

Kültüromik ile tanımlanan toplam LAB içerisinde *Lactobacillus* cinsi bakterilerin %25,42 oranında olduğu ve bunun içinde de %20,34 oranında bulunan *L. delbrueckii*'nin tüm örneklerden izole edilip tanımlandığı görülmektedir. *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. crispatus* ve *L. fermentum* türlerinin ise yalnızca bazı örneklerden düşük oranda izole edilip tanımlandığı görülmektedir (Çizelge 4.10). Shotgun metagenom analiz sonuçlarına göre, örneklerde toplam 54 çeşit *Lactobacillus* cinsine ait tür tanımlanmıştır. *Lactobacillus* cinsi *Lactobacillales* takımı içinde tüm örneklerde %0,3 (N10) ile %1 (N1, N6, N7) arasında değişen oranlarda bulunmaktadır. Literatür incelendiğinde bu cinse ait *L. casei*, *L. plantarum* ve *L. helveticus* türlerinin beyaz peynir starter kültürü olarak kullanımı üzerine çeşitli çalışmalar yapıldığı görülmektedir (Üçüncü 1999; Gürsoy ve ark., 2001; Ertürkmen ve ark., 2015) (Çizelge 2.2).

Kültüromik ile tüm örneklerden izole edilip tanımlanan *L. delbrueckii*'nin shotgun metagenom analiz sonuçlarına göre, süt ürünü örneklerinde %0,7-1 arasında değişen oranlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Ekipman yüzey örneklerinde ise *L. delbrueckii* tespit edilememiştir. Çizelge 4.12 incelendiğinde, *L. delbrueckii*'nin yoğurt, peynir, süt, tahıl mayşesi ve tahıl püresi kaynaklarından izole edildiği görülmektedir. Biyogüvenlik seviyesi Risk Grubu 1'de olup insan ve hayvanlar için patojen özellik göstermemektedir. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşunun beyaz peynir starter kültürü olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Çizelge 2.2).

Kültüromik ile N2 ve N4 örneklerinden izole edilip tanımlanan *L. paracasei*'nin, shotgun metagenom analiz ile N2 örneğinde tür içinde %0,02 oranında, N4 örneğinde ise tür içinde %0,1 oranında bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *L. paracasei* diğer süt ürünü örneklerinde (N1, N3, N5) tür içinde %0,05-0,1 arasında değişen oranlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Ekipman yüzey örneklerinde ise *L. paracasei* tespit edilmemiştir. *L. paracasei* süt ürünleri, silaj, kanalizasyon ve insan klinik bulguları kaynaklarından izole edilmiştir. Biyogüvenlik seviyesi Risk Grubu 1'de yer almaktadır (Çizelge 4.12).

Kültüromik ile N2 ve N9 örneklerinden izole edilen *L. brevis*'in shotgun metagenom analiz ile N2 örneğinde tür içinde %23 oranında, N9 örneğinde ise %0,07 oranında

bulunduğu tespit edilmiştir. *L. brevis*, N8 ve N10 örneklerinde saptanmazken, diğer örneklerde tür içinde %0,02-26 arasında değişen oranlarda saptanmıştır. *L. brevis* süt, peynir, lahana turşusu, ekşi maya, silaj, inek gübresi, dışkı, insan ve sıçanların bağırsak yolu kaynaklarından izole edilmiş olup biyogüvenlik seviyesi Risk Grubu 1'dedir (Çizelge 4.12).

L. crispatus kültüromik ile sadece N5 örneğinden izole edilip tanımlanmıştır. Shotgun metagenom analiz ile *L. crispatus*'un N5 örneğinde tür içinde %0,09 oranında bulunduğu, N1, N7, N8, N9 ve N10'da bulunmadığı, diğer örneklerde (N2, N3, N4, N6) ise %0,02-0,2 arasında değişen oranlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Biyogüvenlik seviyesi Risk Grubu 1 olan *L. crispatus*'un Çizelge 4.12'ye göre göz, hindi dışkısı, insan dışkısı, vajına ve idrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan izole edildiği anlaşılmaktadır.

Kültüromik ile sadece N1 örneğinden izole edilen *L. fermentum*'un shotgun metagenom analiz ile N1 örneğinde tür içinde %3 oranında bulunduğu tespit edilmiştir. *L. fermentum*'un N8, N9 ve N10 örneklerinde bulunmazken diğer örneklerde (N2, N3, N4, N5, N6, N7) tür içinde %0,03-2 arasında değişen oranlarda bulunduğu tespit edilmiştir. *L. fermentum* süt ürünleri, ekşi maya, fermente bitki materyali, gübre, kanalizasyon, insan ağzı ve dışkı kaynaklarından izole edilmiştir. Biyogüvenlik seviyesi Risk Grubu 1'dedir ve insan ve hayvanlarda patojenite göstermemektedir (Çizelge 4.12).

Kültüromik ile *Pediococcus pentosaceus* türü yalnızca N5 örneğinden, *Streptococcus thermophilus*'un ise N2 ve N7 örneklerinden izole edilip tanımlanmıştır (Çizelge 4.10). Shotgun metagenom analiz sonuçlarına göre *P. pentosaceus* diğer tüm örneklerde hiç saptanamazken yalnızca N5 örneğinde saptanmış olup Lactobacillales takımı içinde %0,05 oranında bulunan *Pediococcus* türünün %53'ünü oluşturmaktadır. Shotgun metagenom analiz ile diğer örneklerde saptanan tek *Pediococcus* türü ise *P. acidilactici*'dir. *P. pentosaceus* Amerikan bira mayasından izole edilmiştir ve biyogüvenlik seviyesi Risk Grubu 1'dedir. Bunun yanında potansiyel insan patojeni olabileceği bildirilmiştir (Çizelge 4.12). Shotgun metagenom analiz ile *Streptococcus* cinsi Lactobacillales takımı içinde %15 (N2, N4) ile %41 (N10) arasında değişen

oranlarda bulunmaktadır. Örneklerde bu cinse ait 65 çeşit tür tanımlanmıştır. *Streptococcus thermophilus* ise bütün örneklerde saptanmıştır. *St. thermophilus* N5 örneğinde Streptococcus türü içinde %40 oranında bulunmakta olup diğer örneklerde bu cins içinde %7-17 arasında değişen oranlarda saptanmıştır. *St. thermophilus* yoğurttan izole edilmiştir biyogüvenlik seviyesi Risk Grubu 1'dedir (Çizelge 4.12). *St. thermophilus* endüstride kullanılan bazı beyaz peynir starter kültürü karışımlarının içeriğinde bulunmaktadır (Çizelge 2.2).

Kültüromik ile tanımlanan LAB içerisinde Enterococcus cinsi %61,45 oranla en fazla tanımlanan cinstir. *E. faecalis* türü ise tüm örneklerden tanımlanmış (41 adet) ve %37,74 oranı örneklerde en fazla tanımlanan bakteridir. *E. gallinarum*, *E. faecium* ve *E. durans* ise tanımlanan diğer Enterococcus cinsi bakterilerdir (Çizelge 4.10). Shotgun metagenom analiz sonuçlarına göre, örneklerde toplam 46 çeşit Enterococcus cinsine ait tür tanımlanmıştır. Enterococcus cinsi Lactobacillales takımı içinde tüm örneklerde %15-28 arasında değişen oranlarda bulunmaktadır. Shotgun metagenom analiz ile *E. faecalis* türü tüm örneklerde tanımlanmış ve tanımlanma oranının bu cins içinde %5 (N10) ile %18 (N6) arasında değiştiği saptanmıştır. Kültüromik ile *E. faecium*, N2, N3, N7 ve N8 örneklerinde 1'er adet olmak üzere genel içinde %3,39 oranında izole edilip tanımlanmıştır. Shotgun metagenom analiz sonuçlarına göre *E. faecium* türü bütün örneklerde *E. faecalis*'ten daha yüksek oranda saptanmakla birlikte N2, N3, N7 ve N8 örneklerinde sırasıyla %22, %22, %33 ve %27 oranında saptanmıştır. *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin BacDive tarafından Risk Grubu 2'de gösterilmesi önemlidir (Çizelge 4.12). Bu biyogüvenlik grubunda yer alan bakteriler için “insanda hastalığa neden olabilecek ve bulaştığı kişiler için tehlike oluşturabilecek biyolojik ajan” tanımı yapılmakla birlikte; toplumda yayılma olasılığı düşüktür ve etkili önleme veya tedavi genellikle mümkündür. Enterokoklar düşük virulanslı mikroorganizmalar olmalarına karşın özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda önemli etkenlerdir. *E. faecalis* ve *E. faecium*'un bazı suşları tarafından üretilen sitolizin insan ve hayvan eritrositleri için hemolizin aktivitesi gösterir. *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri tarafından üretilen agregasyon maddesinin enterokokların kalp kapakları ve renal hücrelere bağlanmasını kolaylaştırdığı bilinmektedir. Ayrıca *E. faecalis*'te görülen biyofilm oluşumu bu mikroorganizmaların üriner sisteme, vasküler kateterlere ve kalp kapaklarına kolonize olmasını kolaylaştırmaktadır (Yıldırım, 2007). Literatürde *E. faecium*'un bazı suşlarının

beyaz peynir starter kültürü ya da starter kültürle birlikte ek kültür olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (Çizelge 2.2). *E. faecium*'un Risk Grubu 2'de olduğu görülmektedir ve *E. faecium*'un günümüzde sağlığı tehdit eden suşlarının da bulunduğu bildirilmiştir (Çizelge 4.12). Çok sayıda ilaca karşı dirençli olmaları ve bu direncin gittikçe artması rapor edildiğinden bir mikroorganizmanın starter kültür özelliklerinin belirlenmesi için asit oluşturma yeteneği, proteolitik aktivite ve dekarboksilaz aktivitelerinin yanı sıra antibiyotik direnç testlerinin de yapılması gerekmektedir. Bunun yanında starter kültür özellikleri belirlenirken bakterinin suş düzeyinde tanımlanmış olması önemlidir.

Kültüromik ile *E. gallinarum* türü bakteri N1, N2, N3 ve N7 örneklerinde 2'şer adet, N4 örneğinde 3 adet, N5 örneğinde 1 adet olmak üzere genel içinde %10,16 oranında izole edilip tanımlanmıştır (Çizelge 4.10). Shotgun metagenom analiz ile ise, çiğ süt örneği dahil olmak üzere bütün süt ürünü örnekleri ile ekipman yüzey örneklerinden N6 ve N7 örneklerinde tanımlanmıştır. Tüm süt ürünü örneklerinde *Enterococcus* içinde %0,4 (N5) ile %0,9 (N4) oranında, ekipman örneklerinde N6 ve N7'de sırasıyla %0,01 ve %0,007 oranında bulunduğu saptanmıştır. Çizelge 4.12 incelendiğinde *Enterococcus gallinarum*'un Risk Grubu 2'de yer aldığı ve insan ve hayvan için patojen olduğu görülmektedir. *E. gallinarum*, vankomisin antibiyotiğine doğal, düşük seviyeli bir direnç göstermektedir ve Vankomisine Dirençli Enterokok (VRE) özelliği taşımaktadır. Enterokokların, bakteriyolojik kaynaklı olduğu belirlenmiş menenjit ve neonatal sepsis bulgularının %13'ünde etken olduğu rapor edilmiştir. *E. gallinarum*, VRE enfeksiyonu taşıdığı belirlenen çocuklar için hastalık etkeni olabileceği bildirilen bir türdür (Yıldırım, 2007). Kültüromik ile *E. durans* N1, N3 ve N5'ten 1'er adet genel içinde %2,54 oranında izole edilip tanımlanmıştır (Çizelge 4.10). Shotgun metagenom analiz ile ise, N7 dışındaki tüm örneklerde tanımlanmıştır. N1 ve N3'te %0,2 ve N5'te %0,1 oranında olmak üzere diğer örneklerde %0,009 (N8) ile %0,3 (N9) oranları arasında tanımlanmıştır. *E. durans*'ın daha önce süt tozundan izole edildiği bildirilmiştir (Çizelge 4.12). Çizelge 4.12 incelendiğinde *E. durans* Risk Grubu 2'de yer almaktadır ve insan ve hayvan için patojen olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.11’de ise kültüromik ile örneklerden izole edilen laktik asit bakterisi olmayan bakteriler verilmiştir. Buna göre, örneklerden 20 adet laktik asit bakterisi olmayan ve patojen olan bakteri izole edilmiştir. *Staphylococcus aureus* N1, N2, N3 ve N4 örneklerinden birer adet izole edilmiştir. Shotgun metagenom analiz sonuçlarına göre ise *S. aureus* tüm örneklerde tanımlanmış olup süt ürünü örneklerinde (D, N1-N5) yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir. N1, N2, N3 ve N4 örneklerinde tüm bakteriler içinde sırasıyla %24, %22 ve %21 ve %21 oranında *S. aureus* tanımlanmıştır. *Staphylococcus* cinsi içinde ise *S. aureus* %95 (N1, N4) ile %99 (N6) oranları arasında bulunmaktadır. Kültüromik ile *S. hominis* N3 örneğinden 1 adet, *S. haemolyticus* N5 örneğinden 1 adet izole edilip tanımlanmıştır. Shotgun metagenom analiz sonuçlarına göre ise, *S. hominis* N3 örneğinde bu cins içinde %0,0008 oranında, *S. haemolyticus* N5 örneğinde bu cins içinde %0,007 oranında bulunmaktadır. Örneklerden izole edilen laktik asit bakterisi olmayan diğer mikroorganizmalar *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Acinetobacter pittii* ve *Kocuria kristinae*’dir.

Çizelge 4.11. MALDI-TOF MS sonuçlarına göre örneklerden izole edilen LAB olmayan mikroorganizmalar.

	Mikroorganizma	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	Toplam
1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	4 (%20)
2.	<i>Staphylococcus hominis</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1 (%5)
3.	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1 (%5)
4.	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	3 (%15)
5.	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	2 (%10)
6.	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	2 (%10)
7.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1 (%5)
8.	Enterobacteriaceae	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2 (%10)
9.	<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1 (%5)
10.	<i>Acinetobacter pittii</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1 (%5)
11.	<i>Acinetobacter sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1 (%5)
12.	<i>Kocuria kristinae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1 (%5)
	Toplam											20 (%100)

Çizelge 4.12. Örneklerde tanımlanan bazı mikroorganizmaların BacDive veritabanı bilgileri.

Kod	Bilimsel Ad*	Önceki Adı	Biyolojik orijin	Patojenite	Biyogüvenlik Seviyesi **
14702	<i>Lactococcus lactis</i> (Lister 1873) Schleifer et al. 1986	<i>Lactobacillus xylosum</i> , <i>Streptococcus diacetylactis</i> , <i>Streptococcus lactis</i>	Süt ve süt ürünleri	Patojenite (insan)	Risk Grubu 1
150688	<i>Lactococcus raffinolactis</i> (Orla-Jensen and Hansen 1932) Schleifer et al. 1988	<i>Streptococcus raffinolactis</i>	Çiğ süt	-	Risk Grubu 1
155285	<i>Lactococcus piscium</i> Williams et al. 1990	-	-	-	Risk Grubu 1

24600	<i>Lactococcus fujiensis</i> Cai et al. 2011	-	Çin lahanasının dış yaprakları	-	Risk Grubu 1
14709	<i>Lactococcus chungangensis</i> Cho et al. 2008	-	Aktif çamur, atık su	-	Risk Grubu 1
6471	<i>Lactobacillus helveticus</i> (Orla-Jensen 1919) Bergey et al. 1925 <i>Lactobacillus helveticus</i> (Zheng ve ark., 2020)	<i>Lactobacillus suntoryeus</i>	Ekşi süt, Emmental peynir, viski maltı, içki fabrikaları	-	Risk Grubu 1
134998	<i>Lactobacillus brevis</i> (Orla-Jensen 1919) Bergey et al. 1934 Levilactobacillus brevis (Zheng ve ark., 2020)	-	Süt, peynir, lahana turşusu, ekşi maya, silaj, inek gübresi, dışkı, insan ve sıçanların bağırsak yolu	-	Risk Grubu 1
151560	<i>Lactobacillus mali</i> Carr and Davies 1970 emend. Kaneuchi et al. 1988 <i>Liquorilactobacillus mali</i> (Zheng ve ark., 2020)	<i>Lactobacillus yamanashiensis</i>	Elma, elma suyu, şarap	-	Risk Grubu 1
6493	<i>Lactobacillus plantarum</i> (Orla-Jensen 1919) Bergey et al. 1923 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (Zheng ve ark., 2020)	<i>Lactobacillus arizonensis</i>	Süt ürünleri, silaj, lahana turşusu inek gübresi, insan ağızı, bağırsak yolu, dışkı, kanalizasyon.	Patojenite (insan)	Risk Grubu 1
138043	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (Leichmann 1896) Beijerinck 1901 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> (Zheng ve ark., 2020)	-	Yoğurt, peynir, süt, tahıl mayşesi ve tahıl püresi	-	Risk Grubu 1
135185	<i>Lactobacillus paracasei</i> Collins et al. 1989 Lacticaseibacillus paracasei (Zheng ve ark., 2020)	-	Süt ürünleri, silaj kanalizasyon, insan klinik bulguları	-	Risk Grubu 1
6458	<i>Lactobacillus fermentum</i> Beijerinck 1901 emend. Dellaglio et al. 2004 Limosilactobacillus fermentum (Zheng ve ark., 2020)	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	Süt ürünleri, ekşi maya, fermente bitki materyali, gübre, kanalizasyon, insan ağızı ve dışkı	-	Risk Grubu 1
6442	<i>Lactobacillus crispatus</i> (Brygoo and Aladame 1953) Moore and Holdeman 1970 emend. Cato et al. 1983 Lactobacillus crispatus (Zheng ve ark., 2020)	-	Göz, hindi dışkısı, insan dışkısı, vajina, idrar yolu enfeksiyonu olan hastalar	-	Risk Grubu 1
6665	<i>Lactobacillus salivarius</i> Rogosa et al. 1953 <i>Ligilactobacillus salivarius</i> (Zheng ve ark., 2020)	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	Tükürük, İnsan ve hamsterin ağız ve bağırsak yolu, tavuk ve domuzun bağırsak yolu, süt ürünleri	-	Risk Grubu 1
6595	<i>Lactobacillus spicheri</i> Meroth et al. 2004 <i>Levilactobacillus spicheri</i> (Zheng ve ark., 2020)	-	Pirinç ekşi mayası	-	Risk Grubu 1
6673	<i>Lactobacillus hordei</i> Rouse et al. 2008 Liquorilactobacillus hordei (Zheng ve ark., 2020)	-	Arpa maltı	-	Risk Grubu 1
6565	<i>Lactobacillus gallinarum</i> Fujisawa et al. 1992 <i>Lactobacillus gallinarum</i> (Zheng ve ark., 2020)	-	Tavuk dışkısı, tavuk ve köpek bağırsağı	-	Risk Grubu 1
6393	<i>Pediococcus pentosaceus</i> Mees 1934	-	Amerikan bira mayası	Patojenite (insan)	Risk Grubu 1

14784	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> (Orla-Jensen 1919) Farrow and Collins 1984	-	Yoğurt	-	Risk Grubu 1
5342	<i>Enterococcus italicus</i> Fortina et al. 2004	<i>Enterococcus saccharominimus</i>	Peynir, insan kanı	-	Risk Grubu 1
130943	<i>Enterococcus faecalis</i> (Andrewes and Horder 1906) Schleifer and Kilpper-Bälz 1984	<i>Streptococcus faecalis</i>	TCRMOG92-106/I-As transgenic (RR) SJL/J fare	-	Risk Grubu 2
5301	<i>Enterococcus faecium</i> (Orla-Jensen 1919) Schleifer and Kilpper-Bälz 1984	<i>Streptococcus faecium</i>	-	-	Risk Grubu 2
5314	<i>Enterococcus gallinarum</i> (Bridge and Sneath 1982) Collins et al. 1984	<i>Streptococcus gallinarum</i>	Tavuk bağırsağı	Patojenite (insan ve hayvan)	Risk Grubu 2
5278	<i>Enterococcus durans</i> (ex Sherman and Wing 1937) Collins et al. 1984	<i>Streptococcus durans</i>	Süt tozu	Patojenite (insan ve hayvan)	Risk Grubu 2
5348	<i>Enterococcus devriesei</i> Svec et al. 2005	-	Sığır	-	Risk Grubu 1
14487	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach 1884	-	İnsan plevral sıvısı	Patojenite (insan ve hayvan)	Risk Grubu 2
14636	<i>Staphylococcus hominis</i> Kloos and Schleifer 1975 emend. Kloos et al. 1998	-	İnsan derisi	-	Risk Grubu 2
14544	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> Schleifer and Kloos 1975	-	İnsan derisi	Patojenite (insan ve hayvan)	Risk Grubu 2
4373	<i>Enterobacter cloacae</i> (Jordan 1890) Hormaeche and Edwards 1960	-	Omurilik sıvısı	Patojenite (insan ve hayvan)	Risk Grubu 2
5058	<i>Proteus mirabilis</i> Hauser 1885	-	-	Patojenite (insan ve hayvan)	Risk Grubu 2
4907	<i>Escherichia coli</i> (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919	-	İdrar	Patojenite (insan ve hayvan)	Risk Grubu 2
4959	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Schroeter 1886) Trevisan 1887	-	-	Patojenite (insan ve hayvan)	Risk Grubu 2
7673	<i>Micrococcus luteus</i> (Schroeter 1872) Cohn 1872 emend. Nouioui et al. 2018	<i>Micrococcus lysodeikticus</i> <i>Sarcina citrea</i> <i>Sarcina flava</i> <i>Sarcina lutea</i>	-	-	Risk Grubu 1
8146	<i>Acinetobacter pittii</i> Nemec et al. 2011	-	İnsan beyin omurilik sıvısı	-	Risk Grubu 2
7637	<i>Kocuria kristinae</i> (Kloos et al. 1974) Stackebrandt et al. 1995	<i>Micrococcus kristinae</i>	İnsan derisi	Patojenite (insan)	Risk Grubu 1

* *Lactobacillus* cinsine ait bakteri türlerinin bilimsel adlarında Zheng ve arkadaşlarının 2020 yılında yayımladığı makalede yer alan değişiklikler de göz önüne alınmıştır.

** Alman sınıflandırma sistemine (<https://www.baua.de/EN/Topics/Work-design/Biological-agents/Classification.html>) göre verilmiştir. Risk Grubu 1'deki biyolojik ajanlar en düşük enfeksiyon riskini gösterirken, Risk Grubu 4'teki biyolojik ajanlar en yüksek riski taşır.

5. YORUM

Bu çalışmada, bir süt işletmesinde beyaz peynir üretimi sırasında oluşan süt ürünlerinin, beyaz peynirin ve üretimde kullanılan işletme ekipmanının mikrobiyotaları kültüromik ve yeni nesil shotgun metagenomik dizileme yaklaşımı kullanılarak belirlenmiş ve laktik asit bakterileri açısından değerlendirilmiştir. Çalışma ile omik teknolojiler kullanılarak süt ürünleri, peynir ve ekipman yüzeyinin araştırılmasında kapsamlı bir bakış açısı sağlanmıştır.

Metagenomik yaklaşım, çevresel bir örnekte bulunan tüm mikrobiyel komuniteyi hedefler ve bu komunitenin taksonomik çeşitliliği ve potansiyel metabolomik bilgileri hakkında bilgi vermeyi amaçlar. Bu çalışma, örneklerde bulunan mikrobiyel DNA'nın izolasyonu aşaması ile başlamış, DNA'nın dizilenmesi ve dizilerin anlamlı verilere dönüştürülmesini kapsayan yeni nesil shotgun metagenomik dizileme çalışması sunucunda büyük veri elde edilmiştir. Kültüre dayalı (culture-dependent) bir yöntem olan kültüromik yaklaşımı ile elde edilen veriler ile karşılaştırıldığında metagenomik yaklaşımı ile önemli düzeyde farklılıklar ve çok daha yüksek çıktılar elde edilmiştir.

Kültüromik yaklaşımı ile örneklerde Lactococcus cinsine ait 1 tür (*Lc. lactis*), Streptococcus cinsine ait 1 tür (*St. thermophilus*), Lactobacillus cinsine ait 5 tür (*L. delbrueckii*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. crispatus* ve *L. fermentum*), Enterococcus cinsine ait 4 tür (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. durans*) ve Pediococcus cinsine ait 1 tür (*P. pentosaceus*) tanımlandığı görülmektedir. Metagenomik yaklaşımı ile ise örneklerde Lactococcus cinsine ait 11 tür (Şekil 4.14-Şekil 4.23), Streptococcus cinsine ait 64 tür (Şekil 4.25-Şekil 4.34), Lactobacillus cinsine ait 54 tür (Şekil 4.36-Şekil 4.45) ve Enterococcus cinsine ait 46 tür (Şekil 4.47-Şekil 4.56) ve Pediococcus cinsine ait 2 tür (*P. pentosaceus*, *P. acidilactici*) tanımlanmıştır. Bu sonuçlara göre, shotgun metagenomik dizileme ile elde edilen mikrobiyel çeşitlilik (biyoçeşitlilik) kültüromik yaklaşımına göre elde edilen biyoçeşitlilikten çok daha yüksektir. Kültüromik yaklaşımında MALDI-TOF MS analizi ile örneklerden, 16 adet *Lc. lactis*, 24 adet *L. delbrueckii*, 2 adet *L. paracasei*, 2 adet *Lb brevis*, 1 adet *L. crispatus*, 1 adet *L. fermentum*, 41 adet *E. faecalis*, 4 adet *E. faecium*, 12 adet *E. gallinarum*, 3 adet *E. durans*, 1 adet *P. pentosaceus* ve 2 adet *St. thermophilus* olmak üzere 109 adet tür

düzeyinde ve 9 adet cins düzeyinde (*Enterococcus*) olmak üzere toplam 118 adet laktik asit bakterisi tanımlanmıştır. Metagenomik yöntemlerle örneklerde düşük oranda (toplam bakterilerin ortalama %0,1'i) bulunduğu belirlenen *Lactobacillus* cisine ait bakterilerin kültüromik yaklaşımı ile de izole edilip tanımlanabildiği görülmektedir. Buna göre, tanımlanmak istenen mikroorganizma için uygun besiyeri ve ortam şartları sağlandığında örneklerde baskın olmayan ve düşük oranda bulunan mikroorganizmaların da kültüre dayalı yöntemlerle izole edilip tanımlanabileceği görülmektedir. Bu doğrultuda gıda örneklerinde mikrobiyota belirlenmesine yönelik çalışmalarda, öncelikle metagenomik yaklaşım ile büyük verinin elde edilip analiz edilmesi ve mikrobiyotanın belirlenmesi, ardından ileri çalışmalar için kültüre dayalı yöntemlerle hedeflenen mikroorganizmaların izole edilip tanımlanması yolu önerilmektedir.

Büyük veri eldesi ile sonuçlanan dizileme yöntemlerinin avantajlarının yanısıra bazı dezavantajları da vardır. Bunlar; örneğin içerdiği canlı mikroorganizmaların yanında cansız mikroorganizmaların da genetik materyalinin dizilenip tanımlanması, ileri çalışmalarda kullanılmak üzere kültürlerin saf olarak elde edilememesi ve maliyetinin yüksek olmasıdır. Ayrıca bu çalışma için kullanımda olan dizileme meta veritabanlarında süt ve süt ürünü mikrobiyotasına dair verilerin halen gelişmekte olması biyoinformatik analizler için önemli bir dezavantaj olarak gösterilebilir.

Lc. lactis shotgun metagenomik dizileme ile örneklerde en baskın oranda bulunan laktik asit bakterisi olmuştur. Kültüromik ile de tanker hariç tüm örneklerden izole edilmiştir. Bu çalışmada örnek alınan işletmede beyaz peynir üretiminde kullanılan starter kültür karışımının *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ve *St. salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarını içermesi bakımından bu beklenen sonuçu. Endüstriyel beyaz peynir üretiminde çiğ süte uygulanan ısıl işlem ile çiğ sütte bulunan mikroorganizmaların tamamının yok edilmediği bildirilmiştir. Kültüromik ile süt ürünü örneklerinden izole edilen diğer laktik asit bakterilerinin varlığı bu bakterilerin çiğ süte uygulanan ısıl işleme direndiği ve çiğ süt kaynaklı olduğu ya da üretimde kullanılan ekipmandan süte geçtiği sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

Şekil 4.46'da gösterildiği üzere *E. faecalis*, *L. delbruecki*, *E. faecium*, *E. durans*, *L. brevis*, *E. gallinarum*, *L. paracasei* ve *L. fermentum* starter kültür karışımında bulunmayan fakat süt ürünü örneklerinden izole edilen laktik asit bakterileridir. Bu bakterilerden *E. faecalis* ve *L. delbruecki* tüm örneklerden izole edilmiştir (Çizelge 4.10). Bu nedenle bu bakterilerin çiğ süt ya da ekipman yüzeyi kaynaklı olabileceği söylenebilir.

E. faecium kültüromik ile N2 (Starter kültür eklenmiş süt), N3 (Pıhtı) ve N7 (Tekne) örneklerinden izole edilmiştir. Shotgun metagenomik analiz sonuçları incelendiğinde ise bu bakterinin tüm süt ürünü ve ekipman yüzey örneklerinde bulunduğu görülmektedir. Bu nedenle bu bakterinin çiğ süt ya da ekipman yüzeyi kaynaklı olduğu söylenebilir.

E. durans kültüromik ile N1 (Çiğ süt), N3 (Pıhtı) ve N5 (Beyaz peynir) örneklerinden izole edilmiştir. Shotgun metagenomik analiz sonuçlarına göre ise tüm süt ürünü örnekleri ve tekne hariç diğer ekipman yüzey örneklerinde bulunduğu görülmektedir. Bu nedenle bu bakterinin çiğ süt ya da ekipman yüzeyi kaynaklı olabileceği sonucuna varılmaktadır.

E. gallinarum kültüromik ile tüm süt ürünü örnekleri ve N7 (Tekne) örneğinden izole edilmiştir. Shotgun metagenomik analiz sonuçlarına göre ise tüm süt ürünü örnekleri ile yüzey örneklerinden tanker ve tekne de bulunmaktadır. Buna göre bu bakterinin çiğ süt kaynaklı ya da tekne yüzeyinden süte geçmiş olabileceği söylenebilir.

L. brevis kültüromik ile N2 (Starter kültür eklenmiş süt) ve N9 (Kesme teli) örneklerinden izole edilmiştir. Shotgun metagenomik analiz sonuçlarına göre ise tüm süt ürünü örneklerinde ve yüzey örneklerinden N6 (Tanker), N7 (Tekne) ve N9 (Kesme teli) örneklerinde bulunduğu görülmektedir. Buna göre bu bakterinin çiğ süt tekne ya da kesme teli kaynaklı olduğu söylenebilir.

L. paracasei ise kültüromik ile N2 (Starter kültür eklenmiş süt) ve N4 (Teleme) örneklerinden izole edilmiştir. Shotgun metagenomik sonuçları incelendiğinde bu

bakterinin süt ürünlerinde bulunup ekipman yüzey örneklerinin hiçbirinde olmadığı görülmektedir. Buradan bu bakterinin ısıl işleme direndiği ve çiğ süt kaynaklı olduğu sonucu çıkarılabilmektedir.

L. crispatus ve *P. pentosaceus* ise kültüromik ile yalnızca beyaz peynirden izole edilmiştir. *L. crispatus* için shotgun metagenomik analiz sonuçları incelendiğinde, bu bakterinin çiğ sütte hiç bulunmadığı ancak diğer süt ürünü örneklerinde ve ekipman yüzey örneklerinden teknede bulunduğu grlmştir. Buradan bu bakterinin tekne yüzeyinden süte geçmiş olabileceği sonucuna varılabilmektedir. *P. pentosaceus* ise hem kültüromik hem de shotgun metagenomik analiz sonuçlarına göre sadece N5 (Beyaz peynir) rneğinde bulunmuştur. Buna göre bu bakterinin bu çalışma kapsamındaki örnekler dışında başka bir çevresel örnekten gelmiş olabileceği düşünülmektedir.

Bu sonuçlara dayanarak daha önce literatürde bildirilen ve beyaz peynir mikrobiyotasına starter kültür dışındaki bakterilerin de etkisinin olabileceği görüşü doğrulanmış olmaktadır. Buradan beyaz peynirin kendine özgü tat ve koku özelliklerinin oluşmasında bu bakterilerin de katkısının olabileceği yorumu yapılabilmektedir.

Çiğ süt dışındaki süt ürünü örneklerinden (starter kültür eklenmiş süt, pıhtı, teleme, beyaz peynir) izole edilen patojen *S. aureus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, Enterobacteriaceae ailesine ait koliform grubu bakterilerden *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* ve ekipman yüzey örneklerinden izole edilen *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter pittii*, *Kocuria kristinae*, *Micrococcus luteus*, *E. cloacae* ve *E. coli* bakterileri işletmede uygulanan ısıl işlem uygulamalarının yetersizliği, hijyen ve sanitasyon işlemlerinin yanlış veya eksik uygulanması ve ısıl işlem sonrası kontaminasyona işaret etmektedir.

Sonuç ve gelecek perspektifi; MALDI-TOF MS analizi ile tanımlanamayıp ‘‘Tanımlama olmadığında veri tabanına göre bulunan en yakın suş’’ olarak sonuç alınan ve *Lactococcus lactis* olarak belirlenen HUF18ZN2R1002, *Enterococcus faecium* olarak belirlenen HUF18ZN1M1004, *Enterococcus gallinarum* olarak belirlenen HUF18ZN6K1015, *Enterococcus gallinarum/Enterococcus casseliflavus* olarak

belirlenen HUF18ZN9K1023 izolatlarının ileri araştırmalar yapılarak yeni bir laktik asit bakterisi türü olma potansiyelinin belirlenmesi planlanmaktadır. Bunun için bu bakterinin tüm genom dizisi belirlenecek, ardından biyoinformatik analizlerle veri tabanlarında da bulunan genom dizileri ile karşılaştırılarak yeni bir bakteri türü olma potansiyeli incelenecektir.

Beyaz peynirin endüstriyel boyutta üretilmesi ve üretimde starter kültür kullanımının peynirin gıda güvenliği ve kalite standardizasyonu açısından elzem olduğu bildirilmektedir. TAGEM/18/AR-GE/31 numaralı “Beyaz Peynir ve Süt İşleme Tesisinden İzole Edilen Mikrobiyotanın Karakterizasyonu, Yerli Starter Kültür Eldesi ve Prototip Ürün Üretimi” projesi kapsamında bu çalışma sonucunda laktik asit bakterisi olarak tanımlanan izolatların starter kültür özellikleri incelenerek potansiyel bir starter kültür olma ihtimalinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bunun için, *Lc. lactis* ve *St. thermophilus*’un yanı sıra örneklerden izole edilen ve starter kültür dışında çiğ süt ve/veya çevresel örneklerden kaynaklandığı belirlenen *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. crispatus*, *P. pentosaceus* olarak tanımlanan izolatların starter kültür özelliklerinin belirlenerek bu sonuçlar ışığında kültür kombinasyonları yapılması ve bir beyaz peynir starter kültürü elde edilmesi planlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

Akın, N., Aydemir, S., Koçak, C. and Yıldız, M.A. Changes of free fatty acid contents and sensory properties of white pickled cheese during ripening. *Food Chemistry*, 80 (2003) 77–83.

Almeida, M., Hébert, A., Abraham, A. L., Rasmussen, S., Monnet, C., Pons, N., Construction of a dairy microbial genome catalog opens new perspectives for the metagenomic analysis of dairy fermented products. *BMC Genomics* 15:1101 (2014).

Anonim, Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü Müdürlüğü (TEPGE) 2017-2018 Süt ve Süt Ürünleri Durum Tahmin Raporu, <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Durum-Tahmin%20Raporlar%C4%B1/2017-2018%20Durum-%20Tahmin%20Raporlar%C4%B1/S%C3%BCt%20Durum%20Tahmin%20Raporu%202017-2018-305.pdf> (Erişim tarihi: **15 Mart 2020**).

Anonim, Ulusal Süt Konseyi 2018 Süt Raporu, https://ulusalsutkonseyi.org.tr/wp-content/uploads/Sut_Raporu_2018_Web_Kapakli.pdf (Erişim tarihi: **15 Mart 2020**).

Anonim, GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit Universal kit for isolation of total DNA from bacteria Gram +, Gram - and yeast, https://roboklon.com/pdf/81_det_en.pdf (Erişim tarihi: **2 Aralık 2019a**).

Anonim, MacroGen Humanizing Genomics, <https://dna.macrogen.com/eng/> (Erişim tarihi: **21 Aralık 2019b**).

Anonim, fastQCtoolkit, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (Erişim tarihi: **10 Aralık 2019c**).

Anonim, Manual of SOAPdenovo-V2.04, <https://vcru.wisc.edu/simonlab/bioinformatics/programs/soap/SOAPdenovo2MANUAL.txt> (**18 Aralık 2019d**).

Anonim, MEGAHIT, <http://www.metagenomics.wiki/tools/assembly/megahit> (**18 Aralık 2019e**).

Anonim, DIAMOND - high throughput protein alignment, <https://uni-tuebingen.de/fakultaeten/mathematisch-naturwissenschaftlichefakultaet/fachbereiche/informatik/lehrstuehle/algorithms-in-bioinformatics/software/diamond/> (Erişim Tarihi **18 Aralık 2019f**).

Anonim, Krona Hierarchical data browser, <http://krona.sourceforge.net> (Erişim Tarihi **18 Aralık 2019g**).

Anonim, Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ (Tebliğ No:2009/68). Resmi Gazete: 8 Ocak 2010, Sayı: 27456, Ankara. (Erişim Tarihi: **2 Mayıs 2020**).

Anonim, TUİK, Süt ve Süt Ürünleri Raporu, Sayı: 33697 (Erişim Tarihi: **10 Mayıs 2020**).

Ateş G., Patır B. Starter Kültürlü Tulum Peynirinin Olgunlaşması Sırasında Duyusal, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Niteliklerinde Meydana Gelen Değişimler Üzerine Araştırmalar. F.Ü.Sağlık Bil.Dergisi, 15(1) (**2001**) 45-56.

Azouzi, F., Chahed, C., Marzouk, M., Ferjani, A., Hannechi, N., Fekih, M., Ben Salem, Y., Boukadida, J., Chorioamnionitis due to *Lactococcus lactis cremoris*: A case report. Case Reports in Women's Health 7 (**2015**) 1-2.

BacDive, The Bacterial Diversity Metadatabase, <https://bacdive.dsmz.de> (Erişim Tarihi **15 Mart 2020**).

Beresford, T. and Williams A., 'The Microbiology Of Cheese Ripening', In Cheese Chemistry, Physics And Microbiology, Vol 1, Gneral Aspects, 3rd Edition, Fox P F, Mcsweeney P L H, Cogan T M And Guinee T P, Eds. London: Elsevier. (**2004**) 287-318.

Bereza, Przemysław L., Alicja Ekiel, Aleksandra Auguściak-Duma, Małgorzata Aptekorz, Iwona Wilk, Damian J. Kusz, Piotr Wojciechowski & Gayane Martirosian, Identification of silent prosthetic joint infection: preliminary report of a prospective controlled study. International Orthopaedics 37 (**2013**) 2037–2043.

Bora, S.S., Keot, J., Das, S. Sarma, K., Barooah, M., Metagenomics analysis of microbial communities associated with a traditional rice wine starter culture (*Xaj-pitha*) of Assam, India. 3 Biotech 6:153 (**2016**).

- Breitwieser, F. P., Lu, J., Salzberg, S. L., A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Briefings in Bioinformatics*, 20:4 (2019) 1125–1136.
- Buchfink, B., Xie, C. & Huson, D. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods* 12 (2015) 59–60.
- Cerutti, F., Cravero, D., Costantini, A., Pulcini, L., Modesto, P., Acutis, P. L., Vaudano, E., & Peletto, S., Impact of DNA purification method and primer selection on 16S rRNA gene metabarcoding on wine. *OENO One*, 53:3 (2019).
- Cocolin, L. ve Ercolini, D. Zooming into food-associated microbial consortia: a ‘cultural’ evolution. *Current Opinion in Food Science* 2, (2015) 43-50.
- Çelik Ş., Uysal Ş. Beyaz Peynirin Bileşim, Kalite, Mikroflora ve Olgunlaşması. *Atatürk Üniv.Ziraat Fak. Derg.* 40 (1) (2009) 141-151.
- Dalmaso, A., Rio, Dolores, M.D.L.S.D., Civera, T., Pattono, D., Cardazzo, B., Botteroa, M.T., Characterization of microbiota in Plaisentif cheese by high-throughput sequencing. *LWT - Food Science and Technology* 69 (2016) 490-496.
- Davies, J., Burkitt, M.D., Ascending, A.W, Ascending cholangitis presenting with *Lactococcus lactis cremoris* bacteraemia: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 3:3 (2009).
- Dec, M., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R., Wernicki, A. 16S-ARDRA and MALDI-TOFF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. *BMC Microbiol.* 16:105 (2016).
- Del Chierico, F., Gnani, D., Vernocchi, P., Petrucca, A., Alisi A., Dallapiccola, B., Nobili, V., Lorenza, P., Meta-omic platforms to assist in the understanding of NAFLD gut microbiota alterations: tools and applications. *Int J Mol Sci.*, 15(1) (2014) 684-711.
- Deurenberg, R. H., Bathoorn, E., Monika A.Chlebowicz, M.A., Couto, N., Ferdous, M., García-Cobosa¹, S., Kooistra-Smid, A.M.D., Raangs, E.C., Rosema, S., Veloo, A.C.M., Zhouc, K., Friedrich, A. W., Rossena, J.W.A., Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *Journal of Biotechnology* 243, (2017) 16-24.

Doyle, C.J., Gleeson, D., O'Toole, P.W., Cotter, P.D., Impacts of seasonal housing and teat preparation on raw milk microbiota: a high-throughput sequencing study. *Appl Environ Microbiol* 83 (2017) e02694-16.

Dugat-Bony, E., Garnier, L., Denonfoux, J., Ferreira, S., Sarthou, A.S., Bonnarne, P., Irlinger F., Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology*, 238 (2016) 265–273.

Duru, I.C., Laine, P., Andreevskaya, M., Paulin, L., Kananen, S., Tynkkynen, S., Auvinen, P., Smolander, O.P., Metagenomic and metatranscriptomic analysis of the microbial community in Swiss-type Maasdam cheese during ripening. *International Journal of Food Microbiology* 281 (2018) 10-22.

Ercolini, D., Mauriello, G., Blaiotta, G., Moschetti, G., Coppola, S., PCR–DGGE Fingerprints Of Microbial Succession During A Manufacture Of Traditional Water Buffalo Mozzarella Cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 96(2) (2004) 263-70.

Ercolini, D., High-Throughput Sequencing And Metagenomics: Moving Forward In The Culture-Independent Analysis Of Food Microbial Ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (2013) 3148–3155.

Ertürkmen, P., Öner, Z., "Beyaz Peynir Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Başlatıcı (Starter) Kültür Özelliklerinin Biyokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi". *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 19 (2015) 9-16.

Escobar-Zepeda, A., Vera-Ponce De León, A. and Sanchez-Flores, A., The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. *Frontiers in Genetics*, 6 (2015).

Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., Barucha, M. Q., Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology* 57 (2016) 116-127.

Escobar-Zepeda, A., Godoy-Lozano, E.E., Raggi, L. et al. Author Correction: Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: Defining standards for progressive metagenomics. *Scientific Reports* 10: 4259 (2020).

Ferrocino, I., Bellio, A., Giordano, M., Macori, G., Romano, A., Rantsiou, K., Decastelli, L., Cocolin, L., Shotgun Metagenomics and Volatilome Profile of the Microbiota of Fermented Sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 84:3 (2018) e02120-17.

Fox, P. F., Guinne, T. P., Cogan, T. M., and McSweeney, P. L. H., “Microbiology of cheese ripening,” in *Fundamentals of Cheese Science*, eds P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan, and P. L. H. McSweeney (Boston, MA: SpringerUS), (2000) 206–235.

Garofalo C., Bacteria And Yeast Microbiota In Milk Kefir Grains From Different Italian Regions, *Food Microbiology* 49 (2015) 123-133.

Greppi, A., Ferrocino, I., Storia, A.L., Rantsiou, K., Ercolini, D., Cocolin, L., Monitoring of the microbiota of fermented sausages by culture independent rRNA-based approaches. *International Journal of Food Microbiology* 212 (2015) 67-75.

Guidone A., Zotta, T., Matera, A., Ricciardi, A., Filippis, F.D., Ercolini, D., Parente, E., The microbiota of high-moisture mozzarella cheese produced with different acidification methods. *International Journal of Food Microbiology* 216 (2016) 9–17.

Hayaloglu, A.A., Güven, M., P. F. Fox. Microbiological, Biochemical and Technological Properties Of Turkish White Cheese ‘Beyaz Peynir’. *International Dairy Journal*, 12 (8) (2002) 635-648. DOI: 10.4172/2572-4134.1000117.

Hayaloğlu, A. A., Güven, M., Fox, P. F. and McSweeney P.L.H., Influence of starters on chemical, biochemical and sensory changes in Turkish White-Brined cheese. *J. Dairy Sci.*, 88 (2005) 3460-3467.

Handelsman, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4) (2004) 669-685.

Harrigan, F.W., Mccance, E.M., *Laboratory Methods In Microbiology*. Academic Press London, New York (1966) 285.

Hayaloğlu, A. A., Güven M., Fox, P. F., Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White Cheese Beyaz Peynir. *Int. Dairy J.*, 12 (2002) 635-648.

Illegheems, K., Weckx, S., Vuyst, L.D., Applying meta-pathway analyses through metagenomics to identify the functional properties of the major bacterial communities of a single spontaneous cocoa bean fermentation process sample. *Food Microbiology* 50 (2015) 54-63.

Jagadeesan, B., Peter Gerner-Smidt, Marc W. Allard, Sébastien Leuillet, Anett Winkler, Yinghua Xiao, Samuel Chaffron, Jos Van Der Vossen, Silin Tang, Mitsuru Katase, Peter McClure, Bon Kimura, Lay Ching Chai, John Chapman, Kathie Grant The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. 79 (2019) 96-115.

Jillian, K., Jorgenson J., Bennett, A., Burk, S., V., A Comparative Study of Equine Gut Microbiomes Using 16S and 18S rRNA Sequencing, *Biochemistry and Molecular Biology*, 484.8 (2019).

Jonnala, B.R.Y., McSweeney, P.L.H., Sheehan, J.J., Cotter, P.D., Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry. *Frontiers in Microbiology* 9: 1020 (2018).

Jongman, M., Carmichael, P.C., Bill, M., Technological Advances in Phytopathogen Detection and Metagenome Profiling Techniques, *Current Microbiology* 77 (2020) 675–681.

Kable M. E., Srisengfa Y., Laird M., Zaragoza J., McLeod J., Heidenreich J., Marco M.L., The Core and Seasonal Microbiota of Raw Bovine Milk in Tanker Trucks and the Impact of Transfer to a Milk Processing Facility. *American society for microbiology. MBio* 7(4) (2016).

Kader, T., Goode, D. L., Wong, S. Q., Connaughton, J., Rowley, S. M., Devereux, L., Byrne, D., B. F., Stephen, Arnau, G. M., Tothill, R. W., Campbell I. G., Gorringer, K. L., Copy number analysis by low coverage whole genome sequencing using ultra low-input DNA from formalin-fixed paraffin embedded tumor tissue, *Genome Medicine* 8 (121) (2016).

KEGG GENOME Database, Organisms and ecosystems with genome sequence information. <https://www.genome.jp/kegg/genome.html> (Erişim tarihi: 20 Şubat 2020).

Knight R., Vrbanac, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolk, T., McCall, L. I., McDonald, D., Melnik, A. V., Morton, J. T., Navas, J., Quinn, R.A., Sanders, J. G., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Tripathi, Xu, Z. Z., Zaneveld, J. R., Zhu, Q., Caporaso J. G. & Dorrestein, P. C., Best practices for analysing microbiomes, *Nature Reviews Microbiology*, 16 (2018) 410–422.

Kurban, M., *Saccharomyces cerevisiae* DNA Barkodunun Belirlenmesi ve Ulusal Veri Tabanının Oluşturulması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (2019).

Lagier, J., Dubourg, G., Million, M., Cadoret, F., Bilen, M., Fenollar, F., Levasseur, A., Rolain, J.M., Fournier, P.E., Raoult, D., Culturing the human microbiota and culturomics. *Nature Reviews Microbiology* 16 (2018) 540–550.

Lederberg J. "Ome Sweet'Omics--A Genealogical Treasury of Words". *The Scientist* 15(7):8 (2001).

Liu X., Microbiome. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 89(3) (2016) 275–276.
Maes S., Huu S.N., Heyndrickx M., Weyenberg S.V., Steenackers H., Verplaetse A., Vackier T., Sampers I., Raes K., Reu K., Evaluation of Two Surface Sampling Methods for Microbiological and Chemical Analyses To Assess the Presence of Biofilms in Food Companies. *J Food Prot. Dec*;80(12) (2017) 2022-2028.

Matsuda, N., Matsuda, M., Notake, S., Yokokawa, H., Kawamura, Y., Hiramatsu K. and Kikuchi. K., Evaluation of a Simple Protein Extraction Method for Species Identification of Clinically Relevant Staphylococci by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry, *J Clin Microbiol.* 50 (2012) 3862- 3866.

Metzker, M. Sequencing Technologies- the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11:1 (2009) 31-46.

Morey, M., Fernández-Marmiesse, A., Castiñeiras, D., Fraga, J., Couce, M. And Cocho, J. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Molecular Genetics and Metabolism*, 110(1-2) (2013). 3-24.

Nair, H.P., Bhat, S.G., Metagenomic data on bacterial diversity profiling of Arabian sea sediment by amplicon sequencing, *Data in Brief* (2020).

- Nacef, M., Chevalier, M., Chollet, S., Drider, D., Flahaut, C., MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. *International Journal of Food Microbiology* 247 (2017) 2-8.
- Nalbantoğlu, U., Cakar, A., Dogan, H., Abaci, N., Ustek, D., Sayood, K., Can, H., Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. *Food Microbiology* 41 (2014) 42-51.
- Norris, J. R., Berkeley, Rcw., Logan, N.A. and O'Donnell, A. G, The Genara Bacillus And Sporolactobacillus In: Starr, Mp Stolp, H, Trüper, Hg (1981).
- Ondov B.D., Bergman N.H., Phillippy A.M. Interactive metagenomic visualization in a Web browser, *BMC Bioinformatics*, 12(1): 385 (2011).
- Ottman, N., Smidt, H., deVos, W.M., Belzer, C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2:104 (2012).
- Patel R., MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases, *Clin Chem.*, 61(1) (2015) 100-111.
- Prescott S. L., History of medicine: Origin of the term microbiome and why it matters. *Human Microbiome Journal*, 4 (2017) 24- 25.
- Proctor, L. M., Creasy, H. H., Fettweis, J. M., Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Zhou, W., Buck, G.A., Snyder, M.P., Strauss III, J.F., Weinstock, G. M., White O., Huttenhower, C. (The Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium), The Integrative Human Microbiome Project *Nature*, 569 (2019) 641–648.
- Ranjan, R., Rani A., Metwally, A., McGee H. S., Perkins D. L., Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469 (2016) 967-977.
- Sarıman, M., Ekmekci, S., Abacı, N., Çakiris, A., Paçal, F., Emrence, Z., Üstek, D., Öztürk, Ş., Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi İle Transkriptom Analizi. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi* 5 (2015) 51-59.
- Savaşan S., Beyaz B., Erken Olgunlaşma Dönemindeki Geleneksel Peynir Mikrobiyomunun Metagenomik Analizi. *Etlik Vet Mikrobiyol Dergisi* 30 (1) (2019) 27-35.

Serra J. L., Gomez F., Gilberto, M., Pereira, G. M., Soccol, C. R., Rogez, H., Darnet, S., Determination of the microbial community in Amazonian cocoa bean fermentation by Illumina-based metagenomic sequencing. *LWT - Food Science and Technology* 106 (2019) 229- 239.

Sharpe, M.E., Identification of The Lactic Acid Bacteria. In: F.A. Skinner and D.W. Lovelock, Editors. *Identification Methods For Microbiologists*, Academic Press, London, (1979) 244–259.

Sharpton, T.J., An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in Plant Science* 5:209 (2014).

Sielaff, A.C., Urbaniak, C., Mohan, G. B. M., Stepanov, V. G., Tran, Q., Wood, J. M., Minich, J., McDonald, D., Mayer, T., Knight, R., Karouia, F., Fox G. E. & Venkateswaran, K., Characterization of the total and viable bacterial and fungal communities associated with the International Space Station surfaces. *Microbiome* 7: 50 (2019).

Stellato, G., Filippis, F. D., Storia, A. L., Ercolini, D., Coexistence of Lactic Acid Bacteria and Potential Spoilage Microbiota in a Dairy Processing Environment. *Applied and Environmental Microbiology* 81:22 (2015) 7894- 7904.

Sternes, P.R., Lee, D., Kutyna, D.R., Borneman, A.R., A combined meta-barcoding and shotgun metagenomic analysis of spontaneous wine fermentation. *GigaScience* 6:7 (2017).

Stewart, E., Growing Unculturable Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 194(16) (2012) 4151-4160.

Temiz, A., Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, Hatipoğlu Basın Yayın San. Tic. Ltd. Şti., 2016.

Tiloccaa, B., Costanza, N., Morittua, V. M., Antonella, A., Alessio, S., Brittia, D., Roncadaa, P., Pirasc C., Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics* 210: 103534 (2020).

Togay, S.O., Capece, A., Siesto, G., Aksu, H., Altunatmaz, S.S., AKSU, F.Y., Romano, P., Yüceer, Y.K., Molecular characterization of yeasts isolated from traditional Turkish cheeses. *Food Science and Technology* ISSN 0101-2061 (2020).

Topçu A., Saldamlı İ., Proteolytical, Chemical, Textural and Sensorial Changes During the Ripening of Turkish White Cheese Made of Pasteurized Cows' Milk. *International Journal of Food Properties* 9: 4 (2007) 665-678.

TSE, Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği (Tebliğ No: 2015/6). T.S. Enstitüsü, 2015, Resmi Gazete: Ankara.

Tunail, N., Mikrobiyoloji, Pelin Ofset, Ankara, 2009.

Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.M., Knight R., Gordon JI. The Human Microbiome Project: Exploring the microbial part of ourselves in a changing world, *Nature* 449 (7164) (2007) 804-810.

Üçüncü M., Süt teknolojisi, Ege Üniversitesi Muhendislik Fakültesi Yayınları, İzmir 1999.

Üçüncü M., Süt ve Mamülleri Teknolojisi 5. Bölüm, Sidas Yayınları, 2015.

Üstek D., Abacı N., Sırma S., Çakiris A., New Generation DNA Sequencing., *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi* 1:1 (2011) 11-18.

Vartoukian, S., Palmer, R. and Wade, W. Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. (2010).

Verce, M., Vuyst, L.D., Weckx, S., The metagenome-assembled genome of *Candidatus Oenococcus aquikefiri* from water kefir represents the species *Oenococcus sicerae*. *Food Microbiology* 88 (2020) 1034022.

Walsh, A.M., Crispie, F., Kilcawley, K., O'Sullivan, O., O'Sullivan, M.G., Claesson, M.J., Cotter, P.D., Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage Kefir. *MSystems* 1:5 (2016) e00052-16.

Wei, Y.J., Wu, Y., Yan, Y.Z., Zou, W., Xue, J., Ma, W.R., Wang, W., Tian, G., Wang, L.Y., High-throughput sequencing of microbial community diversity in soil, grapes, leaves, grape juice and wine of grapevine from China. *PloS one*, 13:3 (2018) e0193097.

Whiteside, S.A., Razvi, H., Dave, S., Reid G., Burton, J.P. The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. *Nature Reviews Urology* 12 (2015) 81–90.

Whittenbury, R., Hydrogen Peroxide Formation and Catalase Activity In The Lactic Acid Bacteria. *Journal Of General Microbiology*, 35 (1964) 13-26.

Wolfe, B.E., Button, J.E., Santarelli, M., Dutton, R.J. Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell*, 158(2), (2014) 422–433.

Wu, L.H., Lu, Z.M., Zhang, X.J., Wang, Z.M., Yu, J.Y., Shi, J.S., Xu, Z.H., Metagenomics reveals flavour metabolic network of cereal vinegar microbiota. *Food Microbiology* 62 (2017) 23-31.

Wyres K. L., Conway, T.C., Garg, S., Queiroz, C., Reumann, M., Holt, K., Rusu, L.I. WGS Analysis and Interpretation in Clinical and Public Health Microbiology Laboratories: What Are the Requirements and How Do Existing Tools Compare? *Pathogens* 3(2) (2014) 437-458.

Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.H. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*. 12 (2014) 635–645.

Yıldırım, M., Enterokoklar ve Enterokoklarla Gelisen İnfeksiyonlar. *Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2 (2007) 46-52.

Yılmaz R., Temiz, A. Açık, L., Çelebi Keskin, A. Genetic Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* Strains Isolated from Raw Milk Samples Collected from Different Regions of Turkey, *Food Biotechnology* 29:4 (2015) 336-355.

Zhang, L., Loh, K. C., Lim, J. W., Zhangb, J., Bioinformatics analysis of metagenomics data of biogas-producing microbial communities in anaerobic digesters: A review, 100 (2019) 110-126.

Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M.A.P., Harris H.M.B., Mattarelli P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinckii* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70:4 (2020) 2782–2858.

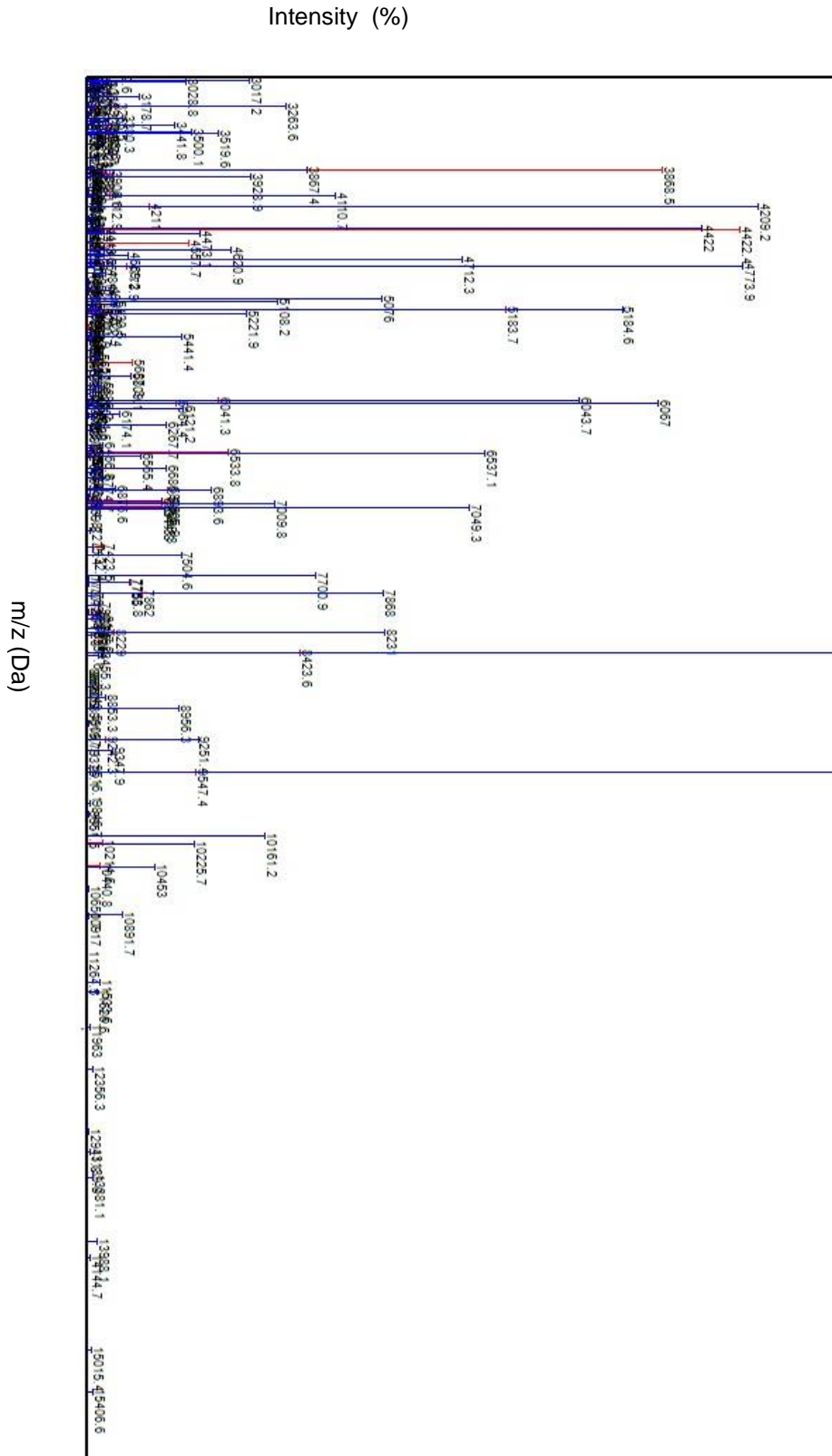
EKLER

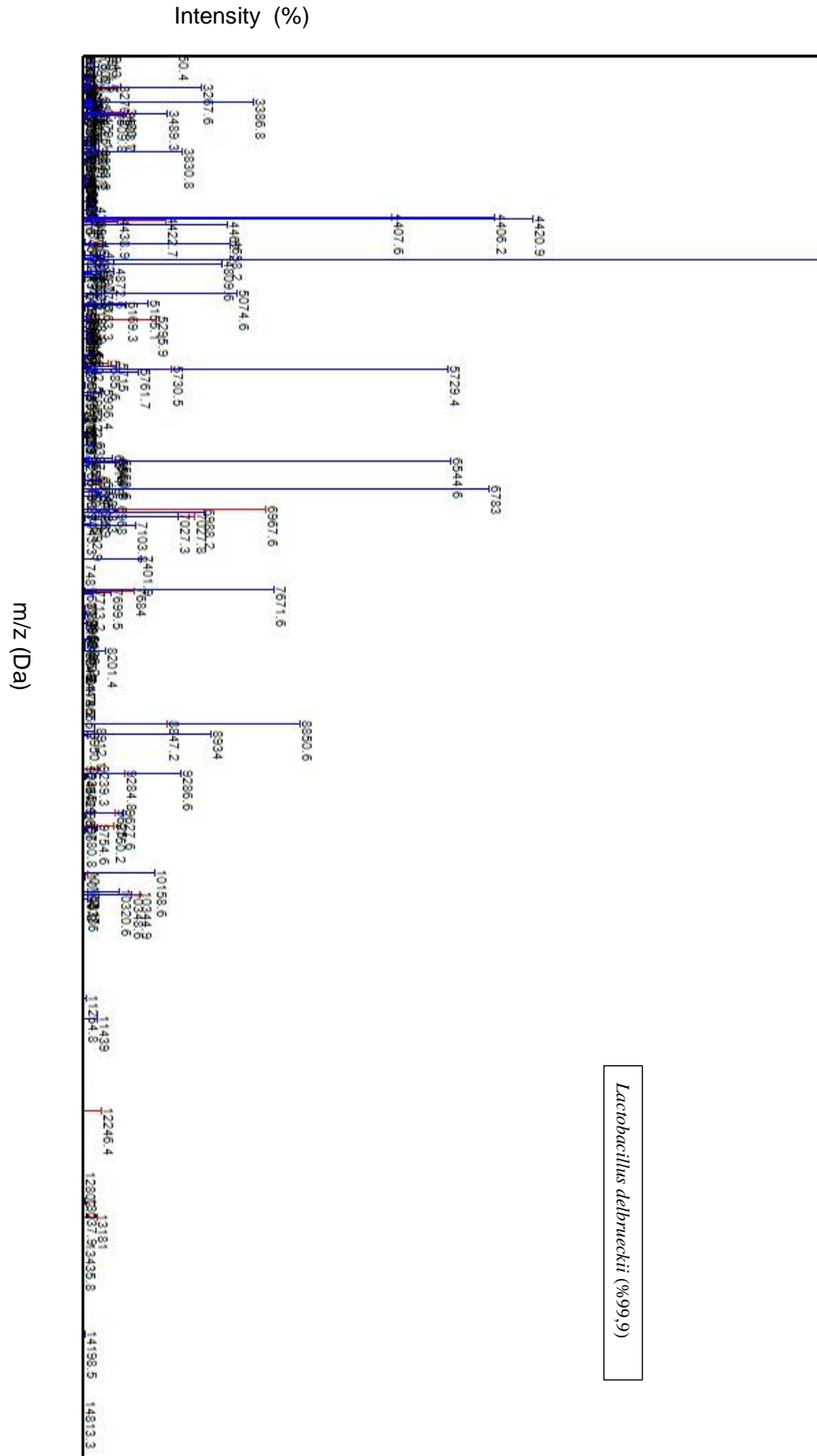
EK 1 – İstatistiksel Bilgiler- Total Stat Info

Çizelge Ek 1.1 İstatistiksel Bilgiler.

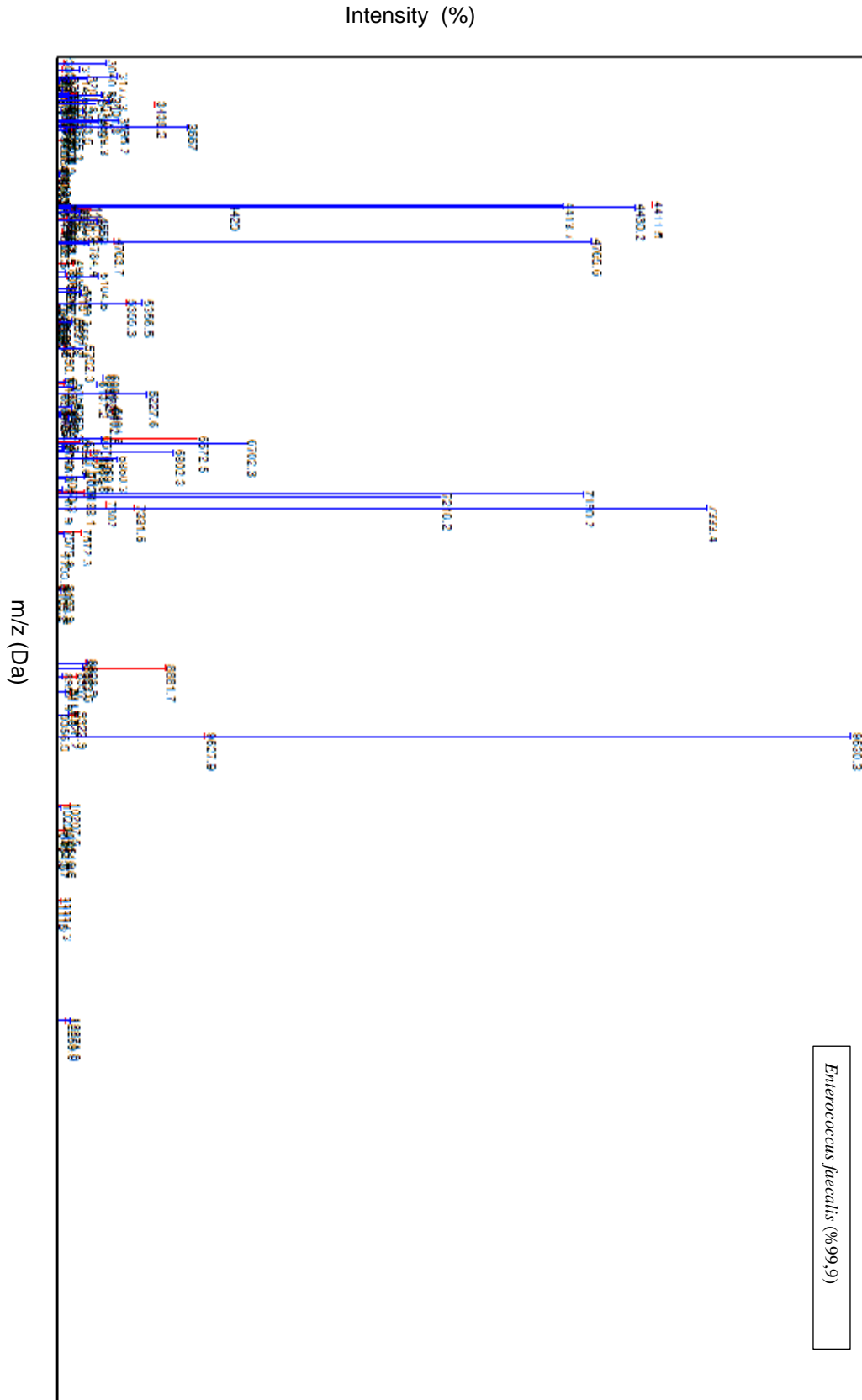
Data Clean					
Total Raw Data	31886 Mbp				
Average Raw Data	3189 Mbp				
Total Clean Data	31781 Mbp				
Average Clean Data	3178 Mbp				
Effective percent	99,67%				
Total Nohost Data	30051,8 Mbp				
Average Nohost Data	3005,18 Mbp				
Taxonomic Annotation					
Gene catalogue	1543593				
Annotated on Unclassified	15,70%				
Annotated on Kingdom level	84,30%				
Annotated on Phylum level	82,68%				
Annotated on Class level	80,61%				
Annotated on Order level	78,62%				
Annotated on Family level	76,27%				
Annotated on Genus level	70,09%				
Annotated on Species level	44,49%				
Assigned Phyla (Top 5)	Proteobacteria	Firmicutes	Chordata	Bacteroidetes	Spirochaetes

EK 2 –LAB MALDI-TOF MS Spektrumları



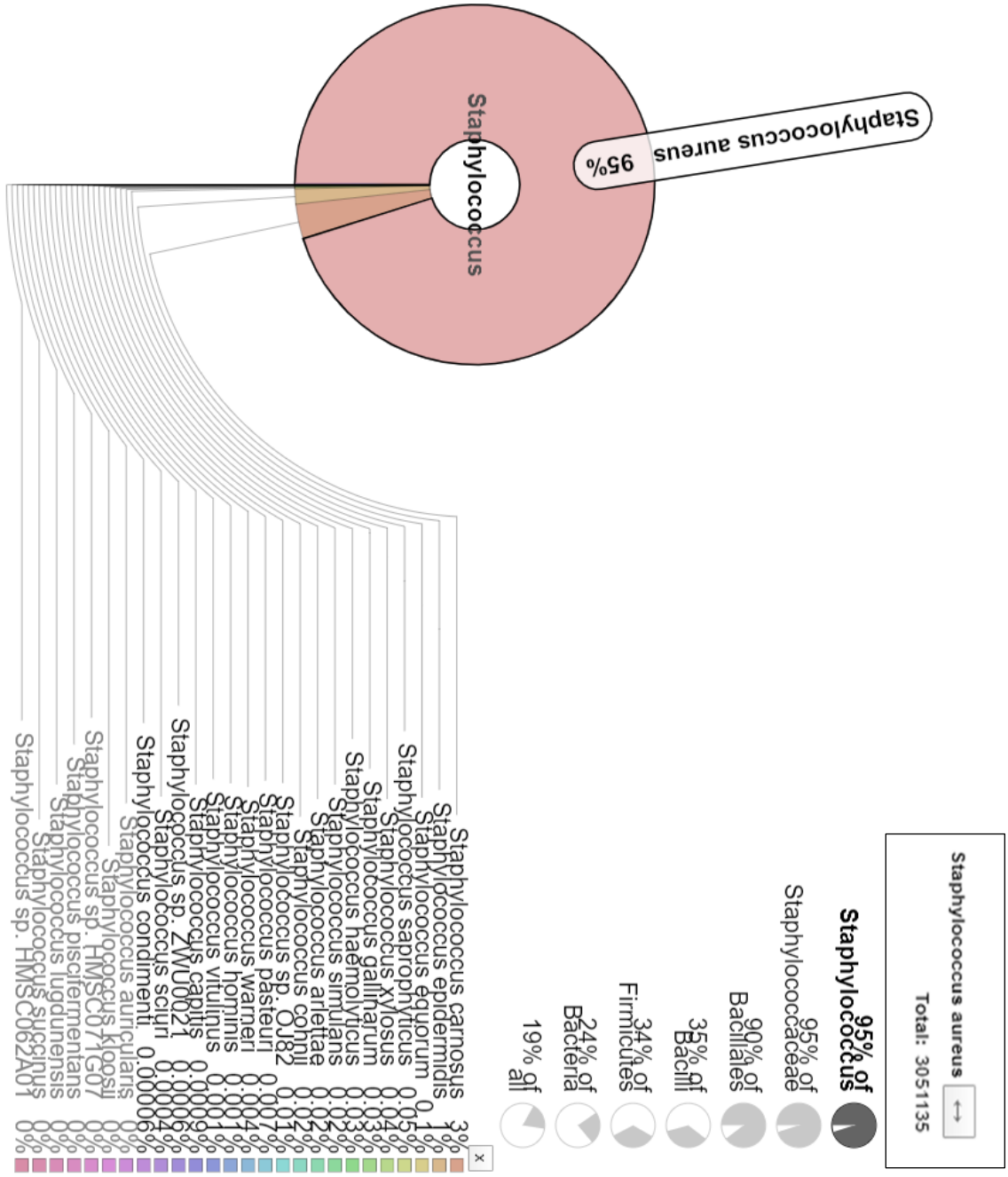


Şekil Ek 2.2. HUF19ZN1R1001 izolatının MALDI-TOF MS spektrumu (*Lactobacillus delbrueckii*, %99,9).

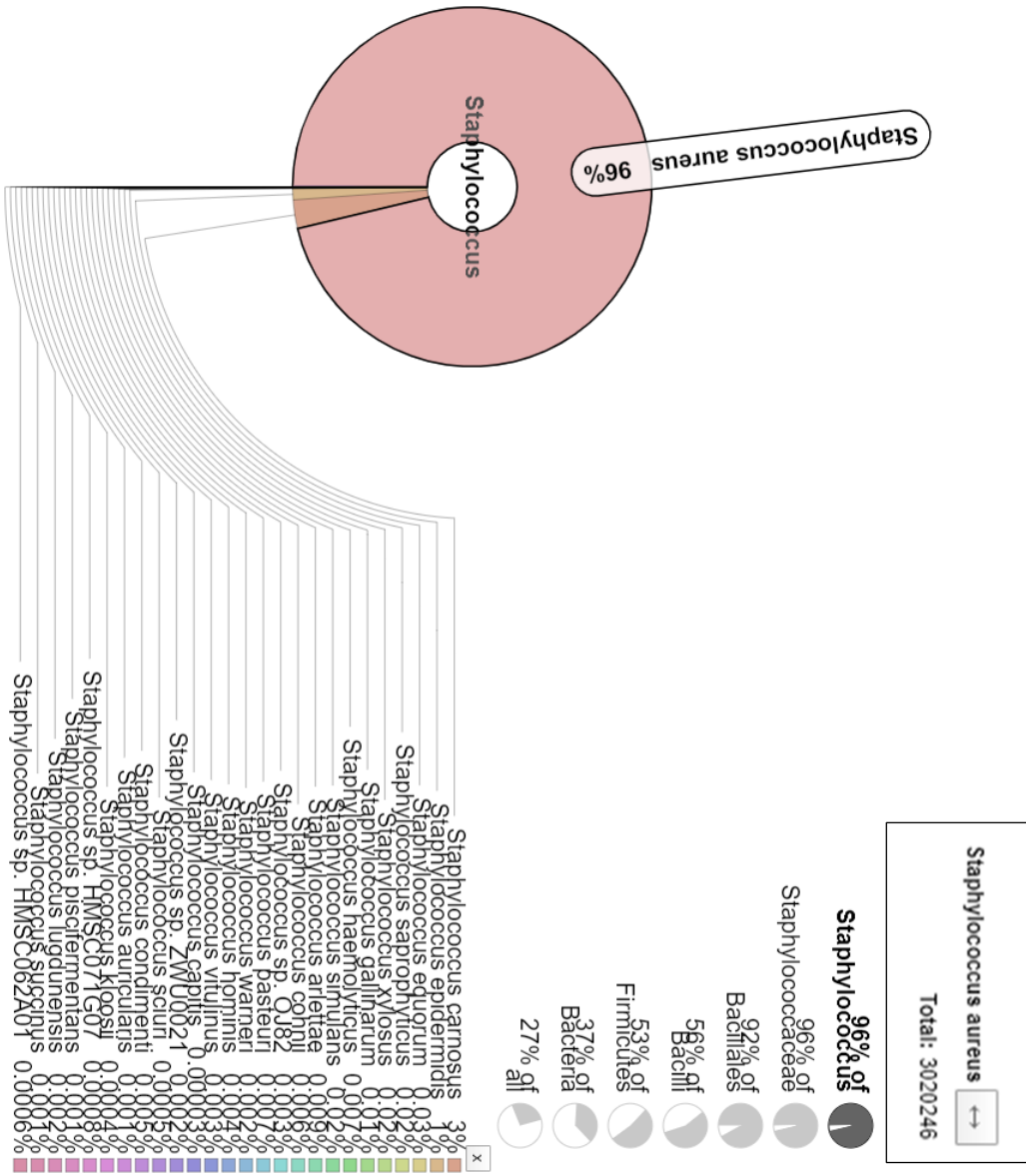


Şekil Ek 3.3. HUF19ZN1K1001 izolatının MALDI-TOF MS spektrumu (*Enterococcus faecalis*, %99,9).

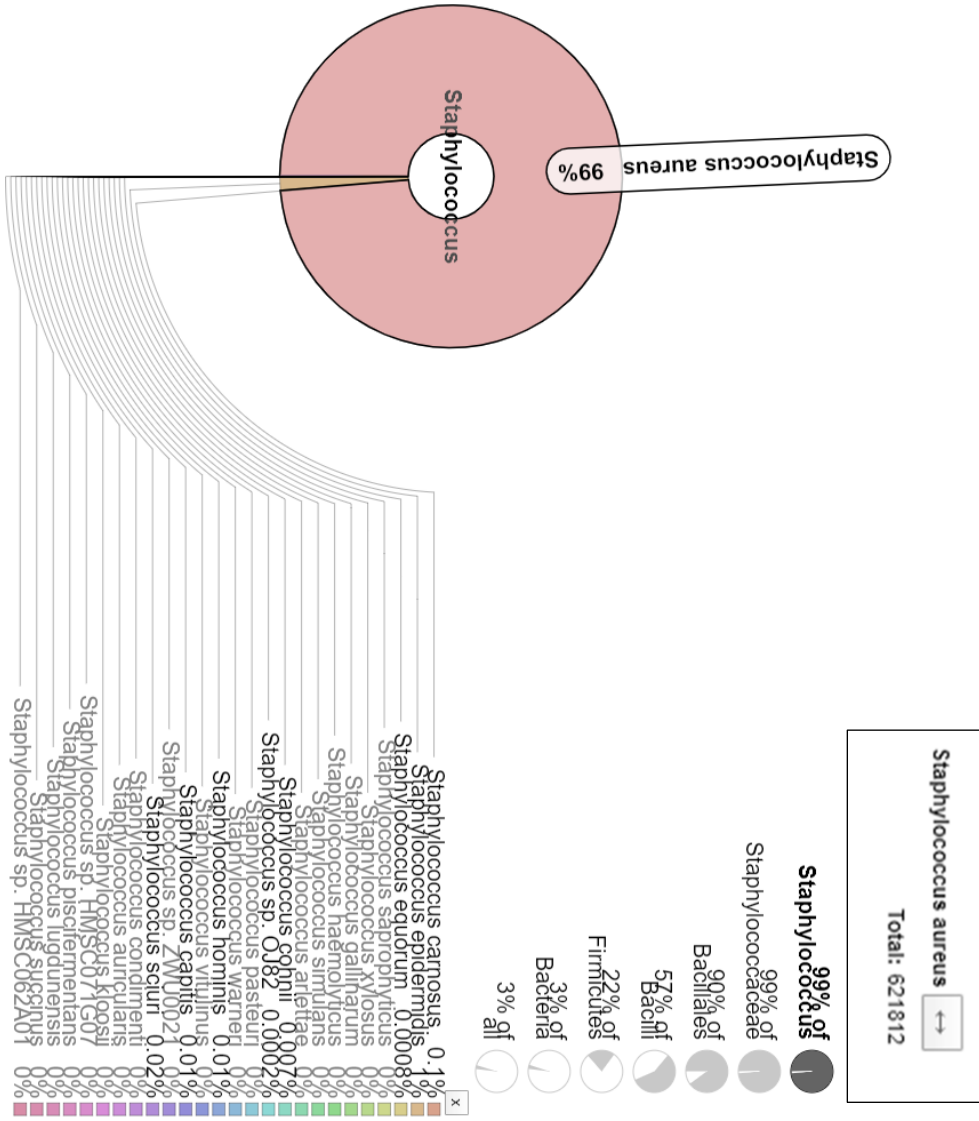
EK 3 – Örneklerin Staphylococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu



Şekil Ek 3.1. N1 (Çiğ süt) örneğinin Staphylococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



Şekil Ek 3.2. N5 (Beyaz peynir) örneğinin Staphylococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.



Şekil Ek 3.3. N6 (Tanker) örneğinin Staphylococcus cinsi düzeyinde mikrobiyel kompozisyonu.

EK 4 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

Cerit, Z.G., Baloğlu, M.C., Yılmaz, R., Culturomics: A New Approach To Identify The Lactococcus and Enterococcus Species Isolated From The Dairy Plant. 20. Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi, (2019, Ocak) Ankara.