

**EKŞİ HAMURLARDAN İZOLE EDİLEN
LACTOBACILLUS BREVIS VE LACTOBACILLUS
PLANTARUM'UN ANTİMİKROBİYEL ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL EFFECTS OF
LACTOBACILLUS BREVIS AND LACTOBACILLUS
PLANTARUM ISOLATED FROM SOURDOUGH**

ŞİLAN TÜLLÜK

PROF. DR. SAİT AYKUT AYTAÇ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2021

ÖZET

EKŞİ HAMURLARDAN İZOLE EDİLEN LACTOBACILLUS BREVIS VE LACTOBACILLUS PLANTARUM'UN ANTİMİKROBİYEL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Şilan TÜLLÜK

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ

Aralık 2021, 78 sayfa

Günümüzde tüketicilerin bilinç düzeyinin artması ve daha sağlıklı ürünler tüketmek istemeleri nedeni ile güvenilir ürünlere olan ilgi artmaktadır. Endüstriyel olarak gıdaların raf ömrünün uzun olabilmesi tüketiciye, üreticiye ve market zincirlerine fayda sağlamaktadır. Uzun ömürlü ve güvenilir ürünlerin üretilebilmesi amacıyla probiyotik mikroorganizmaların koruyucu kültür olarak kullanılması ön plana çıkmaktadır. Bu tez kapsamında, doktora tezi kapsamında izole edilen ve ticari olmayan “*L. brevis* ve *L. plantarum* bakterilerinin probiyotik özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır (Tezer, 2019). Araştırma kapsamında 3 adet *Lactobacillus plantarum* (İz1, Wz3, Hp2) ve 1 adet *Lactobacillus brevis* (Gc3) izolatu kullanılmıştır. Bu izolatların bazı probiyotik özellikleri incelenmiş ve katalaz testleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda laktik asit bakterilerinin çeşitli gıda patojenlerine [*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (P1), *Listeria monocytogenes* (P2), Enterohemorajik *Escherichia coli* (P3), Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (P4)] karşı antimikrobiyel özellikleri araştırılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında incelenen laktik asit bakterilerinin dördünün de gıda patojenlerine karşı antimikrobiyel etkisi olduğu saptanmıştır. İz1 suşunun en yüksek antimikrobiyel etki gösterdiği gıda patojeni metisilin dirençli

Staphylococcus aureus, Wz3 ve Hp2 suşlarının en yüksek antimikrobiyel etki gösterdiği gıda patojeni *Listeria monocytogenes*, Gc3 suşunun en yüksek etki gösterdiği gıda patojeni ise *Salmonella* Enteritidis olmuştur. Laktik asit bakterilerinin tamamının en düşük etki gösterdiği patojen ise Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC) olmuştur. Laktik asit bakterilerinin ürettiği metabolitlerin en yüksek antimikrobiyel etki gösterdiği gıda patojeni ise *Listeria monocytogenes* olmuştur. İz1 ve Wz3 suşlarının süpernatantlarının gösterdiği en düşük etki EHEC'e karşı olmuştur. Gc3 süpernatantının gösterdiği en düşük etki metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı, Hp2 süpernatantının ise *Salmonella* Enteritidis'e karşı olmuştur. Süpernatantlar ayrıca broth mikrodilüsyon yöntemiyle patojenlere karşı test edilmiştir. Laktik asit bakterilerinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK), broth mikrodilüsyon testi ile değerlendirilmiştir. Seçilen tüm laktik asit bakterisi suşlarından süpernatantlar, \geq %30-35 oranında kullanıldıklarında patojen gelişimini %50 ve üzerinde inhibe etmişlerdir. Süpernatantlar %50 konsantrasyonda kullanıldığında ise İz1 suşunun en yüksek inhibisyonu MRSA'ya karşı, Gc3 suşunun en yüksek inhibisyonu *L. monocytogenes*'e karşı, Wz3 suşunun en yüksek inhibisyonu *S. Enteritidis*'e karşı, Hp2 suşunun en yüksek inhibisyonu ise MRSA patojenine karşı olmuştur. Laktik asit bakterilerinin probiyotik olma özelliklerinden birinin daha araştırılması amacıyla katalaz enzimi içerip içermedikleri katalaz testi ile saptanmıştır. Test sonucunda 4 laktik asit bakterisinin de katalaz-negatif olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Tez çalışmasının sonucunda ticari olmayan dört laktik asit bakterisi suşu da incelenen bu probiyotik özellikler açısından olumlu sonuç vermiş ve aksi yönde bir bulguya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada probiyotik özellikleri araştırılan laktik asit bakterilerinin, probiyotik özelliklerini kanıtlayacak çalışmalara devam edilmesi ve kanıtlandığı takdirde ticari olmayan bu suşların, gıda endüstrisinde ticari olarak kullanımı ve kültür koleksiyonuna kazandırılması önemli katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, antimikrobiyel etki.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SOME PROBIOTIC PROPERTIES OF LACTOBACILLUS BREVIS AND LACTOBACILLUS PLANTARUM ISOLATED FROM FLOURS

Şilan TÜLLÜK

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ

December 2021, 78 pages

Nowadays, the interest in safe products is increasing due to the increasing awareness of consumers and the desire of consumers to consume healthier products. Industrially, the long shelf life of foods provides benefits to consumers, producers and market chains. In order to produce long-lasting and safe products, the use of probiotic microorganisms as protective cultures comes to the fore. In this thesis, it was aimed to investigate the probiotic properties of non-commercial *L. brevis* and *L. plantarum* bacteria isolated within the scope of the doctoral thesis (Tezer, 2019). Within the scope of the research, 3 *Lactobacillus plantarum* (Iz1, Wz3, Hp2) and 1 *Lactobacillus brevis* (Gc3) isolates were used. Some probiotic properties of these isolates were investigated and catalase tests were performed. In the studies, antimicrobial properties of lactic acid bacteria against various food pathogens (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) were investigated. All four of the lactic acid bacteria used in this thesis study were found to have antimicrobial susceptibility to food pathogens. Iz1 strain showed the highest antimicrobial activity to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* pathogen, Wz3 and Hp2 strains showed the highest antimicrobial activity to

Listeria monocytogenes pathogen. The food pathogen to which Gc3 strain showed the highest antimicrobial activity was *Salmonella* Enteritidis. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) was the pathogen with the lowest effect of all lactic acid bacteria. The food pathogen to which the metabolites produced by lactic acid bacteria showed the highest antimicrobial activity was *Listeria monocytogenes*. The lowest activity shown by the cell-free supernatants of Iz1 and Wz3 strains was against EHEC. The lowest antimicrobial activity of the Gc3 supernatant was against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, and the Hp2 supernatant against *Salmonella* Enteritidis. Supernatants were also tested against pathogens by the broth microdilution method. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of lactic acid bacteria was evaluated by the broth microdilution test. Supernatants from all selected lactic acid bacteria strains inhibited pathogen growth by 50% or more when used at ≥ 30 -35%. When the cell-free supernatants were used at 50% concentration, the highest inhibition of Iz1 was against MRSA, the highest inhibition of Gc3 was against *L. monocytogenes*, the highest inhibition of Wz3 was against *S. Enteritidis*, the highest inhibition of Hp2 was against MRSA. In order to further investigate one of the properties of lactic acid bacteria, whether they contain the enzyme catalase was determined by the catalase test. It was concluded that all 4 lactic acid bacteria were catalase-negative. As a result of the thesis study, 4 non-commercial lactic acid bacteria strains also gave positive results in terms of probiotic properties and no contrary findings were found. In this study, it is aimed to continue the studies to prove the probiotic properties of lactic acid bacteria and if proven, commercial use of these non-commercial strains in the food industry and bringing them to the culture collection will make a significant contribution.

Keywords: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, antimicrobial effect.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Taksonomisi ve Sınıflandırılması.....	4
2.1.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	6
2.1.2. <i>Lactobacillus brevis</i>	7
2.2. Şeker Metabolizması.....	7
2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Kullanım Alanları	8
2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Patojen Bakteriler Üzerine Etki Mekanizması	9
2.4.1. Rekabetçi Dışlanım İlkesi	10
2.4.2. İnhibitör Bileşenlerin Üretimi.....	10
2.4.2.1. Bakteriyosinler	10
2.4.2.2. Organik Asitler	11
2.4.2.3. Etanol	11
2.4.2.4. Diasetil	12
2.4.2.5. Hidrojen Peroksit	12
2.4.2.6. Probiyotik Bakterilerin Tanımı	12
2.5. Probiyotik Bakterilerin Tanımı	12
2.6. Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özellikleri	13
2.7. Gıda Kaynaklı Patojen Bakteriler	16
2.7.1. <i>Salmonella</i> Enteritidis	17
2.7.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.7.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	18
2.7.4. <i>E. coli</i> O157:H7	19

2.8. Antimikrobiyel Duyarlılık Testleri.....	20
2.8.1. Agar Spot Deneyi	20
2.8.2. Kuyucuk Difüzyon Deneyi.....	20
2.8.3. Broth Mikrodilüsyon Testi	21
2.9. Katalaz Testi.....	21
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Laktik Asit Bakterilerine Ait Bilgiler.....	23
3.1.2. Patojen Bakterilere Ait Bilgiler.....	23
3.1.3. Besiyerleri, Kimyasallar ve Dilüsyon Sıvıları.....	24
3.1.4. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar.....	25
3.1.4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Canlandırılması ve Sayımında Kullanılan Malzemeler.....	25
3.1.4.2. Süpernatant Eldesinde Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar.....	25
3.2. Metot 28	
3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Stok Kültürlerden Canlandırılması	28
3.2.2. Patojen Bakterilerin Stok Kültürlerden Canlandırılması	28
3.2.3. Agar Spot Deneyi	28
3.2.4. Kuyucuk Difüzyon Deneyi.....	30
3.2.5. Broth Mikrodilüsyon Deneyi	31
3.2.6. Katalaz Testi.....	33
3.2.7. İstatistiksel Analizler.....	33
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	35
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Etki Spektrumlarının Belirlenmesi.....	35
4.1.1. Agar Spot Deneyi	35
4.1.2. Kuyucuk Difüzyon Deneyi.....	37
4.1.3. Broth Mikrodilüsyon Deneyi	40
4.2. Katalaz Testi.....	52
4.3. İstatistiksel Değerlendirmeler	53
5. YORUM	56
6. KAYNAKLAR.....	59
EKLER	69

EK 1 – Tez Kapsamında Kullanılan Besiyerleri ve Kullanım Amaçları	69
EK 2 – Agar Spot Deneyinin Sonuçları ile İlgili Görseller	70
EK 3 – Kuyucuk Difüzyon Deneyinin Sonuçları ile İlgili Görseller.....	75
EK 4 – Broth Mikrodilüsyon Deneyine Ait Görseller	76
EK 5 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	77
ÖZGEÇMİŞ	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Anaerobik Kavanoz.....	25
Şekil 3.2. Süpernatant Eldesinde Kullanılan Mikro Santrifüj Cihazı [Hettich (Almanya), Mikro 200]	26
Şekil 3.3. U Tabanlı 96 Kuyucuklu Plaka (OrLab).....	27
Şekil 3.4. Mikroplaka Okuyucu (Bio-Tek, ELx808)	27
Şekil 3.5. Mikroplaka Okuyucu Cihazı Örnek Yerleştirme Haznesi (Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü)	28
Şekil 3.6. Agar Spot Testi Deney Basamakları	30
Şekil 3.7. Kuyucuk Difüzyon Testi Deney Basamakları	31
Şekil 3.8. Broth Mikrodilüsyon Deney Basamakları	32
Şekil 4.1. Agar Spot Deneyinin Sonuçları	35
Şekil 4.2. Kuyucuk Difüzyon Deneyinin Sonuçları	38
Şekil 4.3. Agar Spot ve Kuyucuk Difüzyon Deneyinin Sonuçları.....	39
Şekil 4.4. LAB Süpernatantlarının <i>S. Enteritidis</i> Üzerindeki İnhibisyon Etkisi	40
Şekil 4.5. LAB Süpernatantlarının %35 Konsantrasyonda <i>S. Enteritidis</i> Üzerindeki İnhibisyon Etkisi.....	41
Şekil 4.6. LAB Süpernatantlarının %40 Konsantrasyonda <i>S. Enteritidis</i> Üzerindeki İnhibisyon Etkisi.....	42
Şekil 4.7. LAB Süpernatantlarının %50 Konsantrasyonda <i>S. Enteritidis</i> Üzerindeki İnhibisyon Etkisi.....	42
Şekil 4.8. LAB Süpernatantlarının <i>L. monocytogenes</i> Üzerindeki İnhibisyon Etkisi	43
Şekil 4.9. LAB Süpernatantlarının %30 Konsantrasyonda <i>L. monocytogenes</i> Üzerindeki İnhibisyon Etkisi.....	44
Şekil 4.10. LAB Süpernatantlarının %40 Konsantrasyonda <i>L. monocytogenes</i> Üzerindeki İnhibisyon Etkisi.....	44
Şekil 4.11. LAB Süpernatantlarının %50 Konsantrasyonda <i>L. monocytogenes</i> Üzerindeki İnhibisyon Etkisi.....	45
Şekil 4.12. LAB Süpernatantlarının EHEC Üzerindeki İnhibisyon Etkisi	46
Şekil 4.13. LAB Süpernatantlarının %30 Konsantrasyonda EHEC Üzerindeki İnhibisyon Etkisi.....	46

Şekil 4.14. LAB Süpernatantlarının %40 Konsantrasyonda EHEC	
Üzerindeki İnhibisyon Etkisi	47
Şekil 4.15. LAB Süpernatantlarının %50 Konsantrasyonda EHEC	
Üzerindeki İnhibisyon Etkisi	48
Şekil 4.16. LAB Süpernatantlarının MRSA Üzerindeki İnhibisyon Etkisi	49
Şekil 4.17. LAB Süpernatantlarının %30 Konsantrasyonda MRSA	
Üzerindeki İnhibisyon Etkisi	49
Şekil 4.18. LAB Süpernatantlarının %40 Konsantrasyonda MRSA	
Üzerindeki İnhibisyon Etkisi	50
Şekil 4.19. LAB Süpernatantlarının %50 Konsantrasyonda MRSA	
Üzerindeki İnhibisyon Etkisi	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Laktik Asit Bakteri Türlerinin Dağılımı	5
Çizelge 2.2. Probiyotik Olarak Kullanılan Laktobasil Türleri	14
Çizelge 2.3. <i>Lactobacillus brevis</i> ve <i>Lactobacillus plantarum</i> İzolatlarının Çeşitli pH'lardaki Optik Yoğunlukları	15
Çizelge 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan LAB'lerine ait Bilgiler.....	23
Çizelge 3.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Patojen Bakterilere Ait Bilgiler	24
Çizelge 4.1. Katalaz Testi Sonuçları	53
Çizelge 4.2. Normallik Testi Sonuçları	53
Çizelge 4.3. Normallik Testi Çarpıklık ve Basıklık Değerleri	54
Çizelge 4.4. Tukey Testi Analiz Sonucu	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μ	Mikron
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

CO ₂	Karbondioksit
GRAS	Genel olarak güvenli kabul edilen
LAB	Laktik Asit Bakterisi
MALDI-TOF	Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı
mL	Mililitre
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MRS	de Man, Rogosa ve Sharpe
NA	Nutrient Agar
RPM	Dakikadaki Devir Sayısı
TSB	Tryptic Soy Broth
MRSA	Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
EHEC	Enterohemorajik Eschericia coli
G	Guanin
C	Sitozin
EPS	Ekzopolisakkarit
kDa	Kilodalton
H ₂ S	Hidrojen sülfür

1. GİRİŞ

Günümüzde teknolojinin ve bilgiye ulaşılabilirliğin kolaylaşması ile doğrusal olarak tüketicilerin bilinç düzeyinin artması, güvenilir ürünlere olan ilgiyi arttırmaktadır. Ülkedeki nüfus artışına ve bu nedenle hazır gıdalara olan talebin de artmasına bağlı olarak zincir marketlerdeki gıdaların uzun raf ömrüne sahip olması istenmektedir. Endüstriyel olarak da, tüketici açısından da gıda üretimindeki en kritik noktalardan biri olan raf ömrü, çeşitli kimyasal koruyucularla arttırılabilmektedir. Fakat tüketici bilincinin gelişmesi ile birlikte, tüketiciler sağlığı olumlu yönde etkileyen ve içeriğinde koruyucu katkı maddesi bulunmayan, doğala en yakın ürünleri tercih etmek istemektedir (Dinçer, Kıvanç ve Karaca, 2009).

Gıda kontaminasyonu, gıda zehirlenmesi ve gıda kaynaklı hastalıklar gelişmekte olan ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bu nedenle gıda güvenliği ve hijyeni konusundaki farkındalık yıldan yıla artmaktadır. Probiyotik organizmaların, özellikle laktik asit bakterileri ve fermente gıdalarda ürettikleri biyoaktif bileşiklerin oynadığı roller hakkındaki farkındalık da giderek artmaktadır (Adeyemo, Agun ve Ogunlusi, 2018).

Gıdaların raf ömürlerini uzatmanın yollarından birisi de biyokoruyucuların kullanımudur. Biyolojik koruma, gıdalarda doğal olarak bulunan mikrobiyota veya sonradan eklenen mikroorganizmalar ve bunların antimikrobiyel ürünleri ile raf ömrünün uzatılması ve gıda güvenliğinin arttırılmasını ifade etmektedir. Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri ve bu bakterilerin ürettiği metabolitlerin kullanımı yaygındır. Gıdaların doğal yollarla korunması, özellikle patojen mikroorganizmaların inhibisyonunu sağlamaktadır (Dinçer, Kıvanç ve Karaca, 2009; Østergaard, Eklöv ve Dalgaard, 2014; Mejlholm ve Dalgaard, 2015). Birçok LAB'nin probiyotik özellikleri ve antimikrobiyel etkileri, LAB'lerinin gıda muhafazasında kullanılabileceğini düşündürmektedir (Gao ve ark., 2019).

Laktik asit bakterileri organik asitler, hidrojen peroksit, diasetil, bakteriyosin ve benzeri bileşikler üretebildikleri için, gıda endüstrisinde biyokoruyucu olarak kullanılabilmektedirler. Laktobasiller, probiyotik özellikte olmaları, biyokoruyucu

özelliğe sahip olmaları ve starter kültür olarak kullanılabilmeleri açısından gıda endüstrisinde önem kazanmaktadır. Bunun yanında ürettikleri bakteriyosinler ile ileride bazı antibiyotiklerin yerini alabilecekleri de düşünülmektedir (Özçelik ve Gülgör, 2014).

Probiyotik mikroorganizmaların en önemli grubu laktik asit bakterileridir. Probiyotik, modern çağın bir ifadesidir ve “yaşam için” anlamına gelmektedir. Aynı zamanda insan ve hayvan sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan bakteri ilişkisini adlandırmak için kullanılmaktadır (Bagchi, 2014).

Gıda kaynaklı patojenlere karşı gösterdikleri antagonistik etkileri sayesinde konakçı sağlığını geliştirmek ve gıda kaynaklı patojenleri kontrol etmek için yaygın olarak kullanılan probiyotik suşlar, *Lactobacillus* ve *Enterococcus* cinsinden olan laktik asit bakterileridir. Laktik asit bakterileri genellikle birbirine benzemeyen, katalaz-negatif, Gram-pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen koklar, basiller veya çubuklardır; laktik asit, CO₂ ve etanol üretmek için glikozu fermente edebilirler (Ayala vd., 2019).

Probiyotiklerin immünomodülasyon, doğrudan antagonizm veya rekabetçi dışlama gibi çok sayıda potansiyel etki mekanizması ile bağırsak mikrobiyotasını modüle ettiği ve sağlığı iyileştirdiği düşünülmektedir (Corr, Hill ve Gahan, 2009). Çeşitli in vitro ve in vivo yöntemler dahil olmak üzere, probiyotik özellikleri tespit etmek için birçok yöntem vardır. In vivo yöntemler, spot-on lawn (nokta-damlatma) metodunun çeşitli modifikasyonlarını, agar kuyu difüzyon metodunu, birlikte kültürleme yöntemlerini, hücre hatlarının kullanımını ve diğerlerini içermektedir (Fijan, 2016).

Bu çalışmada kullanılan ve temel suşlardan biri olan *Lactobacillus plantarum*'un ana antimikrobiyel bileşikleri bakteriyosinler ve organik asitlerdir. Bazı *L. plantarum* suşlarının, gıdalarda bozulma yapan mikroorganizmalara karşı yüksek antifungal aktivitesiye sahip olması dolayısıyla, gıda endüstrisinde etkili biyokoruyucu olarak kullanılabilirler. Ayrıca, bazı *L. plantarum* suşları, bazı mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde destekleyici terapötik ajanlar olarak kullanılabilirler (Dinev ve ark., 2017).

L. brevis ise ağırlıklı olarak organik asit, özellikle asetik asit ve etanol üretmektedir. Ayrıca belirli bağırsak patojenlerinin patojenik etkilerini inhibe etmek için de harekete geçebilmekte ve diğer bakterilerin varlığında da çoğalabilme özelliği gösterebilmektedir. Bazı suşlarının bazı antibiyotiklere, özellikle de eritromisin ve klindamisine dirençli olduğu belirtilmiştir (Fang ve ark., 2018).

Bu tez çalışması kapsamında öncelikle, daha önce doktora tezi kapsamında ekşi hamurlardan izole edilen *L. brevis* ve *L. plantarum* suşlarının gıda kaynaklı bazı patojenler (Enterohemorajik *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*) üzerindeki inhibisyon etkisi, aktive edilmiş laktik asit bakterileri ve canlandırılmış patojenler ile agar spot yöntemi ve agar kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılarak, zon çapı ölçümüne dayalı olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda çalışmada kullanılan patojen bakterilerin, mikrodilüsyon yöntemi ile gözle görülebilir olan gelişiminin inhibe olduğu en düşük bakteri konsantrasyonu bulunarak, Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerleri saptanmıştır. Bunların haricinde laktik asit bakterilerinin özelliklerinden biri olan katalaz-negatif olma özelliği, katalaz testi ile saptanmıştır. Deney bulgularının istatistiksel değerlendirmesi IBM SPSS Statistics 23 programı ile analiz edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Taksonomisi ve Sınıflandırılması

Laktik asit bakterileri, karbonhidrat fermantasyonu sonucunda ana veya tek ürün olarak laktik asit üreten mikroorganizmaların oluşturduğu heterojen bir gruptur. LAB, Gram-pozitif, spor oluşturmayan, katalaz-negatif, aside toleranslı, genellikle düşük Guanin + Sitozin (G + C) içeren çubuk veya kok şeklindeki mikroorganizmalardır (Mozzi, 2016).

Laktik asit bakterileri, oksijen kullanımına göre aerotolerant, mikroaerofil veya anaerobiklerdir. Genel olarak tüm laktik asit bakterileri anaerobik olarak gelişim göstermektedirler fakat oksijen varlığında aerotolerant anaerob bakteriler olarak adlandırılmaktadırlar. *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, ve *Carnobacterium* cinslerine ait birkaç tür dışında LAB'leri patojen değildir ve FDA tarafından genel olarak güvenli (GRAS) kabul edilmektedirler (Mozzi, 2016).

Mevcut taksonomik sınıflandırmaya göre LAB, Firmicutes şubesi, Bacilli sınıfı, Lactobacillales takımına aittir. Aileler arasında *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae*, *Aerococcaceae*, *Leuconostocaceae*, *Carnobacteriaceae* ve *Streptococcaceae* bulunmaktadır. LAB'nin dört ana cinsi, yani *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* ve *Pediococcus* asıl olarak tanımlanmıştır; ancak son taksonomik revizyonlar şu yeni cinsleri önermiştir: *Oenococcus*, *Alloiococcus*, *Aerococcus*, *Dolosigranulum*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Weisella*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Vagococcus* ve *Tetragenococcus*. Bahsedilen tüm cinsler arasında, laktobasiller ve karnobakterler çubuk şekilli, kalan cinsler ise *Weisella* türleri dışında kok şeklindedirler. *Weisella* türleri ise hem kok, hem de çubuk şekilli olabilmektedir. Araştırmacılar, yeni tanımlanan cinslerin bazılarını yağ asidi bileşimi ve hareketlilik özelliklerini kullanarak sınıflandırmıştır (Mozzi, 2016; Liu, Liang ve Tsai, 2018).

16S rRNA gen dizilimi ve farklı ortamların mikrobiyel çeşitliliği gibi gelişmiş moleküler metodolojilerle yapılan çalışmalarda birçok tür keşfedilmiş ve tanımlanmıştır. Dolayısıyla heterojen LAB grubu, aşağıdaki şekilde dağılan yaklaşık 450 türden oluşmaktadır. Bakteri cinslerine göre tür dağılımları Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Laktik Asit Bakteri Türlerinin Dağılımı (Mozzi, 2016)

LAB Cinsi	Bakteri Tür Sayısı
<i>Aerococcus</i>	7
<i>Alloiococcus</i>	1
<i>Carnobacterium</i>	12
<i>Dolosigranulum</i>	1
<i>Enterococcus</i>	49
<i>Globicatella</i>	2
<i>Lactobacillus</i>	189
<i>Lactococcus</i>	7
<i>Leuconostoc</i>	23
<i>Pediococcus</i>	15
<i>Oenococcus</i>	2
<i>Streptococcus</i>	101
<i>Tetragenococcus</i>	5
<i>Vagococcus</i>	8
<i>Weisella</i>	18

LAB metabolizması, fermente ettikleri hammaddede hem karbonhidrat içeriğinin azalmasına hem de laktik asit üretiminden kaynaklı pH düşüşüne neden olmaktadır. Bu hızlı asitleştirme işlemi, LAB gelişiminde en çok istenen etkilerden biridir. Birkaç yaygın insan patojeni dahil olmak üzere, bazı bozulma etkeni olan mikroorganizmaların inhibisyonunu sağlamak ve böylece fermente ürünlerin raf ömrünü uzatmaktadırlar. Laktik asit, fermente ürünlere ayırt edici, arzu edilen tadı verirken, tüketiciler tarafından reddedilebilecek ve diasetil gibi daha hassas aromaları maskeleyebilmektedir. Bu nedenle aşırı asit konsantrasyonundan kaçınmak için fermentasyon işlemi kontrol edilmelidir. Peynir yapımında laktik asit üretimi, sütün pıhtılaşmasından ve tekstür özelliklerinden sorumludur. pH düşüşü, hem koagülantların hem de doğal süt proteinazlarının proteolitik aktivitesini kontrol ederek ve diğer aroma bileşiklerinin oluşumunda yer alan biyokimyasal reaksiyonları etkileyerek, dolaylı yoldan aromayı etkilemektedir. Bu bağlamda LAB, laktoz veya diğer şekerlerin fermentasyonundan, sitrattan, süt proteinlerinin ve yağın bozunmasından ve amino asitlerin ve serbest yağ asitlerinin metabolizmasından türetilen karakteristik bir tat vererek, fermente ürünlerin organoleptik özelliklerini geliştirebilmektedir. Nihai ürünün aroması, starter

kültür ve hammaddenin bileşimi, fermantasyon tipi, olgunlaştırma ve saklama koşulları gibi çeşitli faktörlere bağlı olmaktadır (Mozzi, 2016).

LAB'nin fermente edilmiş ürünlerin lezzetine katkısının yanı sıra, bazı türleri son ürünün yapısına ve beslenme kalitesine katkıda bulunabilmektedir. Ayrıca, bazı LAB'leri karboksilik asitler (fenil-laktik asit ve asetik asit gibi), yağ asitleri, etanol, karbondioksit, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler gibi antifungal ve antibakteriyel bileşiklerin üretimi sayesinde doğal gıda koruyucuları salgılamaktadır (Mozzi, 2016).

Bazı laktik asit bakterileri, karbonhidrat polimerlerinden biri olan ekzopolisakkarit (EPS) üretimini gerçekleştirebilmektedir. Kimyasal kompozisyonlarına bağlı olarak EPS, tek tip monosakkarit içeren homopolisakkaritler ve farklı monosakkaritlerin tekrar eden birimlerinden oluşan heteropolisakkaritler olarak sınıflandırılabilirler. EPS sentezleme yeteneği LAB türleri arasında yaygındır; bununla birlikte, LAB üretici suşları arasında EPS yapıları ve üretilen polisakkaritlerin miktarları açısından geniş bir çeşitlilik söz konusudur. EPS üreten suşların starter kültürlerle dahil edilmesi, bu biyopolimerlerin doğal olarak süt ürünlerinde reolojik özelliklerin iyileştirilmesi, fermente sütlerin su salımının azaltılması ve ayrıca az yağlı olgun peynirlerde daha iyi pıhtı kıvamı gibi uygun teknolojik özellikler kazandırdığı için arzu edilmektedir (Mozzi, 2016). Ayrıca çoğu LAB suşunun biyofilm üretebildiği bilinmekle birlikte, ürettikleri biyofilm sayesinde patojen bakterilere karşı koruyucu etki sağladıkları da belirtilmiştir (Arık, 2018).

2.1.1. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum, spor oluşturmeyen, hareketsiz, Gram-pozitif, mikroaerofilik ve mezofilik, 10-15 °C'de gelişebilen fakat 45 °C'de gelişemeyen bakterilerdir. Hücreler, tek tek, çiftler halinde veya kısa zincirler halinde olan yuvarlak uçlu, düz çubuklardır (Corsetti ve Valmorri, 2002). Son zamanlarda, 16S rRNA tabanlı filogeni temelinde tüm genom çalışmalarına göre, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*-*Pediococcus* grubuna aittir. *Lactobacillus plantarum*, insanın mide bağırsak yolundaki doğal yerleşimi nedeniyle probiyotik uygulamasında iyi bilinmektedir ve antioksidan aktivite, biyo-koruyucu, bağışıklık modülasyonu, anti-kolesterol etkisi gibi çeşitli fonksiyonel özelliklere sahiptir. (Tamang ve ark., 2016). *Lactobacillus plantarum*,

diğer mikroorganizmalara karşı bakterisidal bir etkiye sahip olan plantarisin olarak bilinen antimikrobiyel bir bileşik üretmektedir (Song ve ark, 2014). *Lactobacillus plantarum*, Gram-pozitif patojenik bakterilere, yani *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*'a ve ayrıca *Salmonella* Typhimurium, *Klebsiella*, *Rhizophila*, *E. coli*, *Aeromonas hydrophila* ve *Yersinia* gibi Gram-negatif patojenik bakterilere karşı hem dar hem de geniş antibakteriyel aktivite spektrumuna sahiptir (Spangler ve ark., 2019; Goel, Halami ve Tamang, 2021).

2.1.2. *Lactobacillus brevis*

Lactobacillus brevis mikroaerofilik, zorunlu heterofermentatif bir laktik asit bakterisidir. Heksoz fermantasyonunun ürünleri olarak laktik asit, etanol, asetik asit ve CO₂ karışımı üretmek için fosfoketolaz yolunu kullanmaktadır. *Lactobacillus brevis*, laktobasil grubunun ikinci filogenetik gruplarından olan *Lactobacillus casei*-*Pediococcus* grubuna dahildir. Hücreleri çubuk şeklinde, uçları yuvarlak, genellikle kısa ve düzdür (0,7–1,0 2,0–4,0 mm). Ancak uzun çubuklar da her zaman mevcuttur. *Lactobacillus brevis* süt, peynir, bitkiler, kanalizasyon, tahıl ürünleri, silaj, fermente sebzeler, fermente etler, inek gübresi, dışkı, ağız, insan ve diğer hayvanların bağırsaklarından izole edilebilmektedir (Teixeira, 2014).

2.2. Şeker Metabolizması

Laktik asit bakterileri, çeşitli cinslerden oluşmasına rağmen, fermentasyonlarının son ürününe göre homofermentatif ve heterofermentatif olarak iki gruba ayrılmaktadırlar. Homofermentatif özelliğe sahip olanlar, glikoz fermantasyonunun ana ürünü olarak laktik asit üretmektedirler. Heterofermentatifler ise, glikoz fermantasyonu sonucunda laktik asidin yanı sıra karbondioksit, asetik asit ve etanol dahil üzere bir dizi farklı ürün üretmektedirler. Homofermentatifler, aldolaz enzimine sahiptir ve heterofermentatiflere kıyasla glikozu daha doğrudan laktik aside dönüştürecek şekilde fermente edebilmektedirler (Doğan, 2017). Heterofermentatifler, fosfoketolaz enzimi ile altı karbon şekerini (heksozları) beş karbon şekerine (pentoz) dönüştürerek, işlemede hem aldehit hem de diasetil - son derece arzu edilen aromatik ve lezzet artırıcı maddeler - üreten alternatif pentoz monofosfat yolunu kullanmaktadırlar. Heterofermentatifler, bu lezzet artırıcı maddelerden dolayı süt endüstrisinde sıklıkla tercih edilmektedirler (Carr, Chill ve Maida, 2008).

Fermentasyon tipi (homolaktik veya heterolaktik), önemli bir taksonomik sınıflandırma kriteridir. *Leuconostoc*, *Oenococcus* ve *Weissella* cinsi bakteriler ve *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus reuteri* gibi belirli *Lactobacillus* türleri zorunlu heterofermentatiftir. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* ve *Lactobacillus salivarius* dahil olmak üzere diğer laktobasiller zorunlu homofermentatiftir ve pentozları metabolize edememektedirler. Son olarak, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei* ve çoğu LAB, heksozları ve pentozları homofermentatif olarak fermente edebilmekte ve fakültatif heterofermentatif olarak bilinmektedir (Mozzi, 2016).

2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Kullanım Alanları

Mikrobiyel fermentasyon, bozulabilir ürünlerin raf ömrünü uzatmakla birlikte, hammaddeler ve fermente ürünlere karakteristik bir tat vermekte ve bazı yararlı mikroorganizmalar fermente ürünlerde sağlık üzerine olumlu etkiler göstermektedir (Mozzi, 2016).

Antik çağlardan beri LAB, fermente gıdaların korunması ve üretiminde deneysel olarak kullanılmaktadır. 1930'lar ve 1940'lardan beri, LAB fermente gıda endüstrisinde laktik starter kültür olarak kullanılmıştır. İmmünoloji alanındaki artan bilgi ile birlikte, bu mikroorganizmalar probiyotik olarak kullanılmaya başlanırken, laktik asit bakterilerinin oluşturdukları ilginç metabolitlerin üretilmesi için çok daha fazla çaba harcanmıştır (Mozzi, 2016).

Bu mikroorganizmalar, anaerobik metabolizmalarının ana son ürünü olarak laktik asit üretme yetenekleriyle ve fermente gıda ürünlerinin besleyici, duyuşsal ve teknolojik özelliklerini faydalı bir şekilde etkileyen çok çeşitli metabolitleri sentezleme yetenekleriyle tanınmaktadırlar. Bu nedenlerle LAB, starter kültür ve probiyotik kültür olarak kullanımlarının yanı sıra, çok yönlü metabolizmaları sayesinde nutrasötik (besinde bulunan ve etkili olduğu kabul edilen bileşeni, gıda olmayan bir taşıyıcı içerisinde besindeki miktarından çok daha yüksek miktarlarda taşıyan tablet, kapsül veya sıvı formdaki ürünler) gibi bileşenlerin üretiminde kullanılmaktadırlar (Ruiz Rodriguez ve ark., 2019).

Laktik asit bakterilerine ait birçok tür, gıda üretiminde ve sağlığın korunmasında kritik bir rol oynamaktadır. Bu türlerin, olası sağlık yararlarına yönelik önemli bir artış söz konusu olmuştur. LAB'nin söz konusu sağlık etkileri türe, suşa ve gastrointestinal kanalda bulunan bakteri miktarına bağlı olarak değişmektedir. Günümüzde tüketiciler, kimyasal koruyucular ve işlenmiş gıdalara karşı endişe duymaktadır. Bu endişelerin giderilmesinde LAB içeren veya LAB ile işlenen ürünler, gıdaları korumanın ve sağlığı desteklemenin doğal bir yolu olarak önemli rol oynamaktadır (Quinto ve ark., 2014).

LAB, fermente gıdaların korunmasında ve mikrobiyel güvenliğinde belirleyici bir rol oynamakta, böylece fermantasyonun son ürünlerinin mikrobiyel stabilitesini desteklemektedir. Gıdaların korunması, organik asit (örneğin laktik asit ve asetik asit), karbondioksit, etanol, hidrojen peroksit, diasetil; yağ asitleri ve fenilaktik asit gibi antifungal bileşikler; bakteriyosinler (reuterisiklin gibi); ve aroma bileşiklerinin üretiminden kaynaklanmaktadır. Laktik asit bakterileri, ürünlere özel bir tat ve aroma veren süt, kefir, yoğurt ve peynir gibi fermente gıda ve süt ürünlerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Laktik asit bakterileri bakteriyosinlerin üretimi sayesinde, patojen mikroorganizmalar dahil diğer mikroorganizmalar üzerinde inhibitör bir etki uygulayarak gıdaları korumaktadırlar (Karpiński ve Szkaradkiewicz, 2016).

2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Patojen Bakteriler Üzerine Etki Mekanizması

Probiyotiklerin farklı çalışmalarda ortaya çıkarıldığı gibi, suşa bağlı olarak hareket ettiği ve patojen bakterileri farklı mekanizmalarla inhibe ettiği bilinmektedir (Vieco-Saiz ve ark., 2019). Laktik asit bakterileri, aralarında geniş bir inhibitör madde yelpazesi oluşturarak ve hatta rekabetçi dışlama yaparak ve farklı metabolitler üreterek, girdikleri ortamı değiştirme yeteneklerinden dolayı probiyotik olarak kullanılabilir (FAO, 2016).

Lactobacillus türleri, probiyotik laktik asit bakterileri arasında en çok çalışılan ve kullanılan tür olmaya devam etmektedir. LAB-probiyotikler tarafından patojenlerin inhibe edilmesi, inhibitör bileşiklerin üretimi, patojenlerin yapışmasının önlenmesi, besinler için rekabet, konakçı bağışıklık sisteminin modülasyonu ve besin sindirilebilirliğinin iyileştirilmesi ve toksin biyoyararlanımının azaltılması ile sağlanmaktadır (Vieco-Saiz ve ark., 2019).

2.4.1.Rekabetçi Dışlanım İlkesi

Rekabetçi dışlama, hayvanların gastrointestinal sistemine en az bir patojen olmayan bakteri içeren herhangi bir kültürün eklenmesinden sonra meydana gelebilmektedir. Bu olay, besinler için doğrudan veya dolaylı rekabet ile bağırsaktaki bölgelere yapışma yoluyla patojen bakteri sayısını azaltmaktadır. Bu LAB-probiyotikler, biyofilm oluşturabilmekte ve otoindükleyicilerin üretilmesi ve salınması amacıyla Quorum Sensing (QS) aracılığıyla iletişim kurabilmektedirler. Böylece patojenlerin popülasyonlarının gelişimi engellenmekte ve patojen bakteriler, bağırsak mukozasına yapışmamaktadırlar (Liao ve Nyachoti, 2017).

2.4.2. İnhibitör Bileşenlerin Üretimi

LAB, patojen istilasını indirgemek için bakteriyosinler, organik asitler, etanol, diasetil, karbondioksit ve hidrojen peroksit gibi çok çeşitli inhibitör bileşikler üretebilmektedir (Liao ve Nyachoti, 2017).

2.4.2.1. Bakteriyosinler

Bakteriyosinler, hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen, ribozomal olarak sentezlenmiş antimikrobiyel maddelerdir. Burada LAB bakteriyosinleri olarak anılan LAB tarafından üretilen bakteriyosinler çoğunlukla sitotoksik özelliklerden yoksundur ve antagonistik işlevlerinin yanı sıra faydalı ek özelliklerle donatılmıştır (Belguesmia ve ark., 2010). LAB bakteriyosinleri, güçlü in vitro ve in vivo aktivitelere sahip yeni bir antibiyotik dalgası olarak ortaya çıkmaktadır. Geleneksel antibiyotiklerin aksine, LAB bakteriyosinleri belirli türleri hedeflemekte ve aynı ekosistemdeki diğer popülasyonları etkilememektedir (Vieco-Saiz ve ark., 2019).

Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler ilk kez 1993 yılında Klaenhammer tarafından sınıflandırılmıştır. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması, yapıları, amino asit dizilimleri ve etki mekanizmalarına ilişkin çalışmalara bağlı olarak sürekli değişikliklere uğramaktadır.

Gıdaların biyolojik olarak korunması için bakteriyosinlerin kullanıldığı üç tipik uygulama vardır:

(1) Gıda ürünlerine saflaştırılmış bakteriyosinlerin eklenmesi,

(2) Bir gıda ürününün LAB ile aşılması, ürünün kendisinde bakteriyosin üretmek ve
(3) Öncesinde bakteriyosin üreten bir bakteri suşu ile fermente edilmiş, gıda prosesinde yer alan bir bileşenin kullanımınıdır (Karpiński ve Szkaradkiewicz, 2016).

Bakteriyosin üretimi arzu edilen bir özelliktir. Çünkü fermente gıdalardaki mikrobiyel popülasyonları kontrol etmeye yardımcı olmakta ve böylece ürünün raf ömrünü ve güvenliğini uzatmaktadır. LAB tarafından üretilen bakteriyosinler, posttranslasyonel modifikasyonların varlığına ve tek veya iki peptid bakteriyosinler olarak aktif olmalarına göre farklı gruplara ayrılabilen, ribozomal olarak sentezlenmiş antimikrobiyel peptitlerin çeşitli bir grubudur. Nisin, Gram-pozitif gıda kaynaklı patojenleri ve bozulmaya neden olan mikroorganizmaları ve ayrıca ek koruyucularla birleştirildiğinde Gram-negatif bakterileri de inhibe edebilen geniş spektrumlu bir bakteriyosindir. Nisin, bugüne kadar en çok çalışılan ve ticari olarak uygulanan bakteriyosin olmuştur (Mozzi, 2016).

2.4.2.2. Organik Asitler

Kısa zincirli yağ asitlerinin, laktik ve formik asitler dahil olmak üzere organik asitlerin, çiftlik hayvanları için önemli olan potansiyel patojenik bakterileri inhibe ettiği gösterilmiştir. Organik asitlerin, hücre içi pH'yı düşürerek ve hücrel adenozin trifosfat (ATP) tüketimini gerektiren içerdeki fazla protonların aktif taşınmasını engelleyerek etki ettiği bilinmektedir (Ricke, 2003). Organik asitlerin ana hedefleri, bakteri hücre duvarı, sitoplazmik membran ve patojenik mikroorganizmaların bozulmalarına ve ölümlerine yol açan spesifik metabolik fonksiyonlardır (örneğin, replikasyon ve protein sentezi). LAB tarafından üretilen laktik asit, patojen bakteriler için elverişsiz bir ortam oluşmasına katkıda bulunmaktadır. Sha ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada %0,5 (hacim/hacim) laktik asit konsantrasyonunun *Salmonella* subsp., *E. coli*, *L. monocytogenes* gibi patojenlerin gelişimini tamamen engelleyebileceğini göstermiştir (Sha ve ark., 2016; Vieco-Saiz ve ark., 2019).

2.4.2.3. Etanol

Heterofermentatif LAB tarafından üretilen etanol, glikoliz yolu ile üretilmektedir. Etanol, membran akışkanlığını ve bütünlüğünü etkilemekte ve plazma membran sızıntısı nedeniyle bakteriyel hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır. Oh ve Marshall (1993),

%5 etanol konsantrasyonunun *L. monocytogenes* replikasyonunu inhibe ettiğini bildirmiştir (Oh ve Marshall, 1993; Vieco-Saiz ve ark., 2019).

2.4.2.4. Diasetil

Diasetil, laktik asit bakterilerinde sitrat alımı ve metabolizmasından üretilmektedir. Özellikle *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Enterococcus faecalis* ve esas olarak *Leuconostoc mesenteroides* ve *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*, diasetil üretebilen en yaygın olarak bilinen LAB türleridir. LAB tarafından ortamda serbest bırakılan karbondioksit, aerobik bakterilerin gelişemeyeceği anaerobik bir ortam yaratırken, diasetil, Gram-negatif bakterilerin arjinin-bağlayıcı proteini ile reaksiyona girerek hücre bölünmesinde önemli rolü olan arjininin kullanımına müdahale etmektedir (Rishi ve ark., 2018).

2.4.2.5. Hidrojen Peroksit

Bazı LAB türleri hidrojen peroksit (H_2O_2) üretebilmekte ve katalaz içermeyen patojen bakterileri inhibe edebilmektedirler. Hidrojen peroksidin bakterisidal etkisi, konsantrasyonlara ve pH, sıcaklık gibi çevresel faktörlere bağlı olmaktadır (Vieco-Saiz ve ark., 2019). *Lactococcus lactis* ve *Enterococcus faecium* türlerinin güçlü antimikrobiyel etkilere sahip hidrojen peroksit ürettiği rapor edilmiştir (Yang ve ark., 2012).

2.4.2.6. Probiyotik Bakterilerin Tanımı

Reuterin, *Lactobacillus reuteri* tarafından gliserol metabolizması ile ilişkili ikincil bir metabolittir. Bu güçlü inhibitör bileşik, pH'dan bağımsız bir şekilde uygulanan geniş bir aktivite spektrumuna sahiptir. Reuterinin DNA replikasyonunu inhibe ettiği ve proteolitik ve lipolitik enzimlere karşı dirençli olduğu bilinmektedir (Rishi ve ark., 2018). Aktivite spektrumu açısından reuterinin *E. coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida* alt türlerine karşı aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır (Vieco-Saiz ve ark., 2019).

2.5. Probiyotik Bakterilerin Tanımı

Probiyotikler, gastrointestinal sistemde kolonize olan ve konağın sindirim sistemine fayda sağlayan canlı mikroorganizmalardır (Bhargavi ve Jamil, 2012). Fuller ve ark. (2001) ve Mateova ve ark. (2008), sindirim sistemindeki mikrobiyel dengeyi

iyileştirerek konakçıya faydalı olan ve konakçıyı olumlu yönde etkileyen mikroorganizmalardan oluşan ek gıdaların probiyotik olduğunu açıklamışlardır (Utama ve ark., 2018, Bilginer ve Çetin, 2019; Prabhurajeshwar ve Chandrakanth, 2019).

Günümüzde yaygın olarak kullanılan probiyotik bakteri cinslerinden biri olan *Lactobacillus*'lar, Gram-pozitif, sporsuz ve çubuk şeklindedir. *Lactobacillus* cinsine ait olan, ince bağırsakta yaşayabilmekte ve çok sayıda bulunmaktadır (Doğan, 2011). Enterokoklar ise Gram-pozitif, sporsuz, fakültatif anaerob, genellikle diplokok veya kısa zincirli kok şeklindedirler. Sağlıklı insan ve hayvanların bağırsak mikrobiyotasında ve aynı zamanda çevrede de yaygın olarak bulunabilen bakterilerdir (Çetinkaya ve Elal Muş, 2010).

Probiyotikler deneysel olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır, ancak yalnızca son yıllarda immünolojik, gastrointestinal ve solunumla ilgili fonksiyonların modülasyonuna katkıları tam olarak takdir edilmeye ve bilimsel olarak değerlendirilmeye başlanmıştır. Bugüne kadar, mevcut ticari probiyotiklerin çoğu, esas olarak *Lactobacillus* cinslerinden ve bifidobakterilerden (laktik asit üreten ancak her zaman asetik asit ile kombinasyon halinde olan *Actinobacteria* filumuna dahil olan yüksek G+C içeriğine sahip bir bakteri grubu) oluşmaktadır. Ayrıca lökonostok, pediokok, laktokok, enterokok ve streptokok da probiyotik olarak kullanılmaktadır (Mozzi, 2016).

2.6. Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özellikleri

Probiyotikler, çoğunluk olarak laktik asit bakterilerlerinden oluşmaktadır. Yoğurt yapımında kullanılan mikroorganizmalar (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) hariç bütün LAB'leri gastrointestinal mikrobiyotada bulunmaktadır. Probiyotik ürünler, bu mikroorganizmalardan bir veya birkaçını içerebilmektedirler. Probiyotik olarak kullanım alanı olan laktobasil türleri Çizelge 2.2.'de verilmiştir (Doğan, 2011).

Çizelge 2.2. Probiyotik Olarak Kullanılan Laktobasil Türleri

Lactobacillus türleri	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus cellebiosus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i>
-----------------------	---

Bağırsak mikrobiyotası, insan sağlığı üzerine etkisi giderek daha fazla tanınan, oldukça çeşitli ve görece stabil bir ekosistemdir. Normal bileşiminden sapma, genellikle lokalize ve sistemik hastalıklarla ilişkilidir. Bağırsak mikrobiyotasının modülasyonu, sağlığın iyileştirilmesine yardımcı olabilmekte ve belirli gıda bileşenlerinden karmaşık diyetlere kadar değişen farklı beslenme konseptleriyle veya probiyotikler gibi belirli canlı mikroorganizmaların vücuda alımı ile sağlanabilmektedir (Mozzi, 2016). Bağırsak sağlığının iyileştirilmesi, bağışıklık tepkisinin güçlendirilmesi, serum kolesterolünün düşürülmesi ve kanserin önlenmesi dahil olmak üzere probiyotiklere atfedilen faydalı etkilerin lehine güçlenen kanıtlar bulunmaktadır. Bu sağlık özellikleri suşa özgüdür ve çeşitli mekanizmalardan etkilenmektedir (Kechagia ve ark., 2013).

Laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak sınıflandırılabilmesi için aşağıdaki özellikleri sağlamaları gerekmektedir:

- İnsan gastrointestinal sisteminden izole edilmesi ve burada kolonize olabilmesi
- Patojen olmaması
- Bağışıklık sisteminin aşırı uyarımına sebebiyet vermemesi
- Antibiyotik direnç genleri taşıyamaması
- Antimikrobiyel maddeler üretebilmesi
- Patojenlere karşı antimikrobiyel etki göstermesi
- Safra tuzuna direnç göstermesi
- Asidik ortamlara dirençli olması

- Hızlı metabolize olması
- Hızlı gelişebilmesi
- Gıdalarda kullanılabilmesi ve yan etkisinin olmaması
- Bağıışıklığı pozitif yönde etkilemesi
- Fermantasyon sırasında canlı kalabilmesi

(Friedman, 2005; Gönülateş, 2008; Timmerman ve ark., 2008; Abushelaibi ve ark., 2017).

Yapmış olduğumuz tez çalışmasında kullanılan *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum* izolatları düşük pH'lı ortamlarda yaşama özelliğine sahiptir. *L. brevis*, laktobrevin adı verilen antimikrobiyel bir peptit üretmekte, *L. plantarum* ise patojenik bakterilerin büyümesini engelleyebilen laktolin maddesini üretmektedir (Davis ve Stout, 1971; Utama ve ark., 2018). Utama ve ark.'nın yaptıkları çalışmada *L. brevis* ve *L. plantarum* izolatları 12 saat boyunca 2.5 pH'a direnç göstermişlerdir. *L. brevis* ve *L. plantarum* izolatlarının popülasyonları 10^8 kob/mL'den fazla bulunmuştur. Bu durum *L. brevis* ve *L. plantarum* izolatlarının düşük pH değerlerinde gelişme yeteneğinin çok iyi olduğunu kanıtlamıştır (Utama ve ark., 2018). Saarela ve ark., düşük pH'a direncin, probiyotiklerin önemli bir özelliği olduğunu belirtmişlerdir. Çizelge 2.3.'te, pH ne kadar yüksek olursa, mikroorganizmaların da o kadar fazla büyüdüğünü göstermiştir (Saarela ve ark., 2000; Utama ve ark., 2018).

Çizelge 2.3. *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum* İzolatlarının Çeşitli pH'lardaki Optik Yoğunlukları

İzolatlar	Mc Farland standardı 0.5 (10^8 CFU)	Optik Yoğunluk (OD)								
		0 sa				12 sa				
		2.5	3.5	4.5	5.5	2.5	3.5	4.5	5.5	SEM
<i>Lactobacillus brevis</i>	0,04	0,08	0,09	0,11	0,18	0,50	1,34	1,93	2,43	0,01
<i>Lactobacillus plantrum</i>	0,04	0,09	0,09	0,10	0,16	0,09	1,10	2,11	2,55	0,02

*MRS Broth besiyerinde 12 saatlik inkübasyon boyunca oluşan bakteri gelişimi, SEM: Standart hata

Davis ve Stout, antibakteriyel etki açısından, 20 mm'lik net zonların çok güçlü inhibisyonu, 10-20 mm'nin güçlü inhibisyonu, 5-10 mm'nin orta derecede inhibisyonu ve 5 mm veya daha azının ise zayıf inhibisyonu temsil ettiğini belirtmişlerdir. Davis ve

Stout, *L. brevis* izolatının, *Escherichia coli* ve *Salmonella pullorum* gelişimini güçlü bir şekilde inhibe ettiği, *L. plantarum*'un ise *Escherichia coli* gelişimini çok güçlü bir şekilde inhibe ettiği, *Salmonella pullorum* büyümesini ise güçlü bir şekilde inhibe ettiği sonucuna ulaşmışlardır (Davis ve Stout, 1971; Utama ve ark., 2018).

2.7. Gıda Kaynaklı Patojen Bakteriler

Gıda kaynaklı hastalık (gıda zehirlenmesi) genellikle bakteriler ve/veya onların toksinleri, parazitler, virüsler, kimyasallar veya diğer ajanlar tarafından kontamine olmuş gıdaların tüketilmesinden kaynaklanmaktadır. Gıda kaynaklı hastalık, bir patojen gıda ile alındığında ve insan vücudunda kendini gösterdiğinde (ve genellikle çoğaldığında) veya toksijenik bir patojen bir gıda ürününe yerleşip toksin ürettiğinde ve insan vücuduna yiyecek veya içeceklerle birlikte direkt bu toksinin alımı olduğunda ortaya çıkmaktadır (Bintsis, 2017). Zayıflamış bir bağışıklık sistemi ve yaş da dahil olmak üzere, gıda zehirlenmesinin semptomlarına ve şiddetine katkıda bulunabilecek çeşitli faktörler bulunmaktadır (Anonim c, 2020).

Bazı patojen bakteriler spor oluşturma yeteneğine sahiptir ve bu nedenle ısıya oldukça dayanıklıdır (örn. *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*). Bazıları ısıya dayanıklı toksinler üretebilmektedir (örneğin *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*). Çoğu patojen, 20 °C ile 45 °C arasında optimum büyüme sıcaklığı aralığındadır ve mezofildir. Bununla birlikte, *Listeria monocytogenes* ve *Yersinia enterocolitica* gibi bazı gıda kaynaklı patojenler (psikrotroflar), 10 °C'nin altındaki sıcaklıklarda veya buzdolabındaki koşullarda çoğalma yeteneğine sahiptir (Bintsis, 2017).

Gıda enfeksiyonlarına ve intoksikasyonlarına sebebiyet veren bakterilerden en önemlileri *Salmonella* alt türleri, *Campylobacter* alt türleri, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium* alt türleri, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella* alt türleri, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* alt türleri, *Brucella* alt türleri ve *Aeromonas* alt türleri olarak bilinmektedir (CDC, 2005; Sağlam ve Şeker, 2016).

Bu tez kapsamında çalışılan *Salmonella* Enteritidis, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 bakterilerinin morfolojisi, hangi gıdalardan izole edildikleri ve diğer özellikleri açısından incelenerek aşağıda özetlenmiştir.

2.7.1. *Salmonella* Enteritidis

Enterobacteriaceae familyasında yer alan çubuk şeklinde, Gram-negatif, sporsuz, çoğu hareketli, fakültatif anaerob, katalaz-pozitif ve oksidaz-negatif, H₂S üretebilen, karbonhidratlardan asit ve gaz oluşturabilen, optimum gelişme sıcaklığı 35-37°C olan bir bakteridir (Vazgeçer ve Temiz, 2005, Sağlam ve Şeker, 2016). *S. enterica*, hayvanları, insanları ve bitkileri başarılı bir şekilde kolonize edebilmekte ve ayrıca çevrede de bulunmaktadır (Knodler ve Elfenbein, 2019). *Salmonella* türleri ısıya duyarlı olup, 60 °C'de 1-6 dakika arasında inaktive olmaktadır (Vazgeçer ve Temiz, 2005, Sağlam ve Şeker, 2016).

Et ve tavuk ürünleri, salatalar, süt ve süt ürünleri, yumurta, tavuk karkasları, çiğ kıyım, deniz ürünleri, çocuk mamaları *Salmonella* bulaşısında rol alan gıdalardır. Bu gıdalarda en çok karşılaşılan *Salmonella* türleri ise *Salmonella enterica* ve *Salmonella Typhimurium*'dur (Finstad ve ark. 2012).

2.7.2. *Staphylococcus aureus*

Üzüm salkımını andıran ve mikroskopik kümeler şeklinde görünen, Gram-pozitif, kok şekilli, sporsuz, hareketsiz, bazı suşları kapsüllü, fakültatif anaerob, uygun koşullarda 7-48 °C arasında gelişebilen, optimum 30-37°C'de gelişim gösteren mezofilik bir bakteridir (Sağlam ve Şeker, 2016). İnsanların ve hayvanların yaklaşık %25'inin derisinde ve burnunda *Staphylococcus aureus* bulunmaktadır. Sağlıklı insanlarda genellikle hastalığa neden olmaz, ancak *Staphylococcus aureus*, gıda zehirlenmesine neden olabilecek toksinleri üretme yeteneğine sahiptir (Anonim b, 2018).

Birden fazla antibiyotik sınıfına direnç kazanma yeteneği, *S. aureus*'u tedavi edilmesi zor bir patojen yapmaktadır. MRSA olarak adlandırılan, metisilin dirençli *S. aureus* suşlarının ortaya çıkması ve yayılması, yüksek morbiditeye, yüksek mortaliteye ve tedavi maliyetlerinin artmasına neden olmuştur. Vankomisin, yıllarca bu suşların

üstesinden gelmek için altın standart ilaç olarak kullanılmış, ancak bu antibiyotiğe karşı direncin ortaya çıkması klinik kullanımını kısıtlamıştır. Bununla birlikte, patojenin yeni ilaçları tanıdıktan hemen sonra direnç kazanma yeteneği göz önüne alındığında, MRSA ile mücadele için yeni antibiyotik keşif çabaları ve antibiyotik dışı yaklaşımlar devam etmektedir (Gnanamani, Hariharan ve Paul- Satyaseela, 2017).

Gıdalara *Staphylococcus aureus* bulaşmışsa, bakteriler gıdalarda çoğalabilmekte ve insanları hasta edebilecek toksinler üretebilmektedirler. *Staphylococcus aureus* bakterileri ısı ile öldürülebilmekte, ancak toksinleri yüksek ısıya dayanıklıdır. Bu nedenle pişirme sıcaklığında yok olmamakta ve hastalığa neden olabilmektedirler. *Staphylococcus aureus*'un toksinlerini içeren gıdalar kötü kokuya, bozuk görünüme veya bozuk tada sahip olmayabilmektedir (Anonim b, 2018). Tüketime hazır olan et ve tavuk ürünleri, tütülenmiş veya ısı ile işlem görmüş etler, yumurta ile hazırlanan ürünler ve pişmiş yumurta ve süt ve süt ürünleri, mayonezli salatalar stafilokoktan kaynaklanan intoksikasyonlara sebep olan aracı gıdalar olarak görülmüşlerdir. Bahsedilen gıdaların benzer yanı sıra çoğunlukla ısı ile işlem görmeleri, elle hazırlanmaları ve tüketime kadar buzdolabında muhafaza edilmeleridir (Anonim d, 2020).

2.7.3. *Listeria monocytogenes*

Listeria alt türleri, Gram-pozitif, çubuk şekilli (0,5-4 µm çapında ve 0,5-2 µm uzunluğunda), spor oluşturmeyen, fakültatif anaerob, katalaz-pozitif ve oksidaz-negatif mikroorganizmalardır. *L. monocytogenes*'in optimum büyüme sıcaklığı 30–37°C'dir, ancak 0 ile 45°C arasında da yaşayabilmektedir. *L. monocytogenes* buzdolabı sıcaklıklarında çoğalabilmektedir ve dezenfektanlara karşı dayanıklıdır. İşleme tesislerine girdikten sonra hayatta kalabilmekte ve olumsuz koşullar altında uzun süre yaşamını sürdürebilmektedir (Jamshidi ve Zeinali, 2019).

Gıda endüstrisinde *Listeria monocytogenes*, biyofilm oluşturabilmesi nedeniyle potansiyel bir kontaminasyon kaynağı olarak görülmektedir. *Listeria monocytogenes*, doğada yaygın olarak bulunan bir mikroorganizmadır. Ayrıca sağlıklı insan ve hayvanlardan veya enfekte evcil ve vahşi hayvanlardan da izole edilmiştir. Pastörize edilmemiş süt ve bu sütte yapılan yumuşak peynirler, çiğ meyve ve sebzeler, yemeye

hazır soğuk mezeler, salatalar ve işlenmiş etler, *L. monocytogenes* için bulaşı kaynağıdır (Jamshidi ve Zeinali, 2019).

2.7.4. *E. coli* O157:H7

Escherichia coli, Gram-negatif, kısa çubuk şeklinde, mezofilik, fakültatif anaerob, sporsuz, bazı suşları hareketli olan, Enterobacteriaceae ailesinde yer alan en önemli türdür. 4 °C ile 45 °C arasında gelişme göstermektedir. Optimum gelişme sıcaklığı ise 37°C'dir (Sağlam ve Şeker, 2016).

E. coli O157:H7, hemolitik üremik sendrom (HÜS) ve trombotik trombositopenik purpura (TTP) dahil yaşamı tehdit eden durumlarla sonuçlandığı bilinen, dünya çapında gıda kaynaklı önemli bir patojen haline gelmiştir. Epidemiyolojik araştırmalara göre, evcilleştirilmiş hayvanlarda, özellikle besi sığırlarında bulunmaktadır. Çiftliklerdeki geviş getiren hayvanlar, *E. coli* O157:H7'nin doğal rezervuarı olarak tanımlanmıştır. *E. coli* O157:H7'nin bulaşısı, az pişmiş et veya yetersiz pastörize edilmiş süt ürünleri veya Shiga toksijenik Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) ile yüklü kontamine yüzeylerle temastan sonra meydana gelmektedir. Shiga toksijenik Enterohemorajik *E. coli*'nin diğer bulaşı kaynakları ise içilebilir su kaynakları, yüzme havuzlarından ve göllerden gelen kontamine su, yetersiz pişirilmiş etler gibi kontamine gıdalar, yeterli yıkama işlemi uygulanmamış yapraklı yeşillikler ve meyveler, elma suyu dahil pastörize edilmemiş içecekler ve evcil hayvan çiftliklerinde kontamine hayvanlar ile direkt temastır. Taze meyve ve sebzelerin kontaminasyonu, tarımsal sulama suyundaki veya akarsudaki fekal kontaminasyona bağlı olarak meydana gelmektedir. HÜS, bazı farklı bakteriler tarafından oluşturulabilmekle birlikte yaygın olarak Enterohemorajik *E. coli*, özellikle *E. coli* O157:H7'nin Shiga toksin üreten *E. coli* serotipleri ile enfeksiyondan sonra ortaya çıkmaktadır. *E. coli* O157:H7, ortak *E. coli* suşlarında bulunanlardan daha dayanıklı hayatta kalma özelliklerine sahiptir ve bu durum EHEC'in insan gıda zincirinde sıklıkla karşılaşılan çok çeşitli zorlu koşullarda hayatta kalmasını sağlamaktadır (Ameer ve Salen, 2021).

E. coli O157:H7, insanlara öncelikle çiğ veya az pişmiş kıyma ürünleri ve çiğ süt gibi kontamine gıdaların tüketimi yoluyla bulaşmaktadır. Su ve diğer gıdaların fekal kontaminasyonu ve gıda hazırlama sırasında çapraz bulaşı (sığır eti ve diğer et ürünleri,

kontamine yüzeyler ve mutfak gereçleri ile) da enfeksiyona yol açmaktadır. *E. coli* O157:H7'nin bulaşı kaynakları arasında az pişmiş hamburgerler, pastörize edilmemiş ve taze toplanmış elmalardan elde edilen fermente elma suyu içeceği (Apple cider), yoğurt ve çiğ süttten yapılmış peynir yer almaktadır (Tosun ve Gönül, 2003).

2.8. Antimikrobiyel Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyel duyarlılık testleri, bir antimikrobiyel ajanın belirli bir bakteri türüne karşı *in vitro* etkinliğini saptamak amacıyla uygulanmaktadır. Antimikrobiyel duyarlılık testlerinde dilüsyon ve difüzyon olmak üzere iki farklı test yöntemi bulunmaktadır. Difüzyon testleri disk difüzyon test yöntemi ile veya E-test yöntemi ile yapılabilmektedir. Dilüsyon testleri ise tüp dilüsyon yöntemi veya agar dilüsyon yöntemi ile yapılabilmektedir. Dilüsyon yöntemi ile test edilecek olan bakterinin MİK değeri bulunabilmektedir (Jorgensen ve Turnidge, 2015). Bu çalışmada antimikrobiyel aktivite, agar spot testi, kuyucuk difüzyon deneyi ve broth mikrodilüsyon yöntemleri ile incelenmiştir.

2.8.1. Agar Spot Deneyi

Agar spot yöntemi, bir agar difüzyon yöntemi olarak sınıflandırılmaktadır. Bu yöntemde test edilecek olan bakteri kültürü, daha önceden test mikroorganizması inoküle edilmiş olan agar yüzeyinden difüze olmaktadır. Agar üzerine test edilecek bakteri kültürü yayılıp, daha sonrasında üzerine 2-10 µL miktarında antimikrobiyel ajan veya antimikrobiyel madde üreten bakterinin nokta ekimi gerçekleştirilmektedir. Test edilen bakteri mikrobiyel olarak aktif ise, inkübasyondan sonra nokta ekim yapılmış olan kültürün çevresinde inhibisyon bölgesi meydana gelmektedir. İnhibisyon bölgesi, bakteriyel gelişimin inhibe edilmesi sonucunda oluşan berrak bir bölgedir. İnhibisyon bölgesinin çapı, nokta ekimi gerçekleştirilen bileşiklerin antimikrobiyel gücünü tanımlamaktadır (Horváth ve ark., 2016).

2.8.2. Kuyucuk Difüzyon Deneyi

Agar kuyucuk difüzyon yöntemi, mikrobiyel ekstraktların antimikrobiyel etkinliğini saptayabilmek adına yaygın olarak kullanılmaktadır. Agar spot yönteminde kullanılan deney prosedürüne benzer şekilde, agar plakası yüzeyine mikrobiyel kültür inoküle edilmektedir. Daha sonra agar yüzeyine steril bir mantar delici veya bir uç ile aseptik

olarak 6 ile 8 mm çapında bir delik açılıp, kuyulara istenilen konsantrasyonda ve belirli bir hacimde (20–100 µL) antimikrobiyel madde veya özüt çözeltisi verilmektedir. Daha sonra agar plakaları, test mikroorganizmasına bağlı olarak uygun koşullar altında inkübe edilmektedir. Antimikrobiyel ajan, agar ortamında yayılmakta ve test mikroorganizmasının gelişimini engellemektedir (Balouiri, Sadiki ve Ibsouda, 2016).

2.8.3. Broth Mikrodilüsyon Testi

Seyreltme yöntemleri, antimikrobiyel ajanların minimum inhibisyon konsantrasyonlarını (MİK) belirlemek için kullanılmaktadır ve antimikrobiyel etkinlik testi için kullanılan referans yöntemlerdir. Seyreltme testlerinde mikroorganizmalar, antimikrobiyel ajanların seri dilüsyonlarını içeren kültürlerinin mikrotitrasyon plakası kuyularında görünür gelişme yetenekleri açısından test edilmektedir. MİK, bir mikroorganizmanın gelişimini engelleyen bir antimikrobiyel maddenin en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır (Rodriguez-Tudela ve ark., 2002).

Broth mikrodilüsyon, en temel antimikrobiyel duyarlılık test yöntemlerinden biridir. Prosedür, 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakası (OrLab) kullanılarak 2 mL'den daha küçük hacim içeren tüplere dağıtılan bir sıvı gelişim ortamında antimikrobiyel ajanın iki kat seyreltilerinin hazırlanmasını (örn. 1, 2, 4, 8, 16 ve 32 µg/mL) içermektedir. Daha sonra her kuyu, standart mikrobiyel süspansiyonun seyreltilmesinden sonra aynı ortamda hazırlanan bir mikrobiyel inokulum ile inoküle edilir. İnoküle edilmiş 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakası, test mikroorganizmasına bağlı olarak uygun koşullar altında (çoğunlukla çalkalamadan) inkübe edilmekte ve inkübasyon sonrası bakterinin gelişimini inhibe eden en düşük konsantrasyon MİK olarak belirlenmektedir (Demirpek, 2012; Balouiri, Sadiki ve Ibsouda, 2016).

2.9. Katalaz Testi

Katalaz-pozitif bakteriler, fakültatif anaerobların yanı sıra zorunlu aerobları da içermektedir, ancak bunların hepsi terminal elektron alıcısı olarak oksijen kullanarak solunum yapma yeteneğine sahiptir. Katalaz-negatif bakteriler anaerob veya terminal elektron alıcısı olarak oksijeni kullanıp solunum yapmayan ve yalnızca fermente olan fakültatif anaeroblar da olabilmektedir (Anonim a, 2021).

Katalaz testi, bir lam üzerine bakterinin 24 saatlik kültürünün yayılıp, üzerine %3'lk hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatılması ile gerçekleştirilmektedir. Katalaz testinin pozitif reaksiyonu, bakterilerin hidrojen peroksidi suya ve oksijene dönüştüren katalaz enzimini ürettiğini gösteren oksijen kabarcıklarının oluşumu ile karakterize edilmektedir (İsmail, Yulvizar ve Mazhitov, 2019).

Laktik asit bakterileri, hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştüren katalaz enzimini retmemektedirler. Laktik asit bakterileri anaerobik bakteri grubuna dahil olup, gelişim sırasında oksijene ihtiyaç duymamaktadırlar. Katalaz reaksiyonu, O₂ gazı oluşumunu gösteren hava kabarcıkları oluştuğunda pozitif, gaz kabarcıkları oluşmuyorsa negatif katalaz reaksiyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu bakteriler, laktik asit bakterilerinin özelliklerinden biri olan hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştürmek için gerekli olan katalaz enzimini retememektedirler (İsmail, Yulvizar ve Mazhitov, 2019).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

3.1.1. Laktik Asit Bakterilerine Ait Bilgiler

Bu tez kapsamında çalışılan laktik asit bakterilerinin tamamı, daha önce bir doktora tez çalışması kapsamında ekşi mayalı hamurlardan izole edilmiş olan ve doğal suş olduğu düşünülen laktik asit bakterileridir. Hp2 kodlu bakteri Çorum bölgesinden temin edilen buğday örneğinden, Wz3 kodlu bakteri Avusturya bölgesinden temin edilen buğday örneğinden, İz1 kodlu bakteri İzmir bölgesinden temin edilen buğday örneğinden, Gc3 kodlu bakteri ise Kayseri bölgesinden temin edilen buğday örneğinden ekşi hamur örneği oluşturularak izole edilmişlerdir. Laktik asit bakterilerine ait bilgiler Çizelge 3.1.'de yer almaktadır.

Çizelge 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan LAB'lerine Ait Bilgiler

İzolatuın Kodu	Alındığı yer	İzole Edildiği Un Türü	Bakteri Türü	Gen Bank No
Hp2	Çorum	Buğday	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MN826739
Wz3	Avusturya	Buğday	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MN826745
İz1	İzmir	Buğday	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MN826740
Gc3	Kayseri	Buğday	<i>Lactobacillus brevis</i>	MN826738

Toplam LAB Sayısı: 4

3.1.2. Patojen Bakterilere Ait Bilgiler

Tez kapsamında kullanılacak olan patojen bakterilerden *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, *Listeria monocytogenes* ve *E.coli* O157:H7, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiştir. MRSA [ATCC 13552 mecC (+)] ise, Ankara Halk Sağlığı Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir (Çizelge 3.2.)

Çizelge 3.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Patogen Bakterilere Ait Bilgiler

İzolatuın Kodu	Alındığı yer	Bakteri Suşu	METU ID
P1	ODTÜ	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	MET S1-001
P2	ODTÜ	<i>Listeria monocytogenes</i>	MET L1-001
P3	ODTÜ	<i>E.coli</i> O157:H7	MET K1-029
P4	Ankara Halk Sağlığı Laboratuvarı	MRSA ATCC 13552 mecC (+)	
Toplam Bakteri Sayısı		4	

3.1.3. Besiyerleri, Kimyasallar ve Dilüsyon Sıvıları

Çalışmada laktik asit bakterileri ve patojen bakterilerin sayımlarının yapılması amacıyla dilüsyon sıvıları hazırlanmıştır. Dilüsyonların hazırlanmasında serum fizyolojik [%0,85 (w/v)] kullanılmıştır.

Patojen bakteriler için hazırlanan dilüsyonlardan sayım yapılması amacı ile NA (Nutrient Agar) (Merck) besiyerine ekim yapılmıştır. Laktik asit bakterilerinin sayımlarının yapılması amacıyla ise serum fizyolojik ile hazırlanan dilüsyonlardan MRS (De Man, Rogosa And Sharpe) Agar (Merck) besiyerine ekim yapılmıştır. MRS Agar (Merck), NA (Merck) ve %0,33 agar içeren yumuşak agarlı TSB besiyeri (Merck), bakterilerin antimikrobiyel özelliklerinin incelenmesinde kullanılmıştır.

Patojen bakterilerin canlandırılması ve geliştirilmesi amacıyla TSB (Tryptic Soy Broth) (Merck) besiyeri kullanılmıştır. Laktik asit bakterilerinin canlandırılması ve geliştirilmesi amacıyla ise MRS Broth (De Man, Rogosa And Sharpe Broth) (Merck) besiyeri kullanılmıştır. Elde edilen saf kolonileri -70 °C'de stoklamak için gliserollü MRS Broth ve gliserollü TSB besiyerleri kullanılmıştır.

Laktik asit bakterilerine uygulanan katalaz testi için ise MRS Agar ve %3'lük hidrojen peroksit çözeltisi kullanılmıştır.

Analizlerde kullanılmış olan besiyerleri, hazırlanma talimatları takip edilerek besiyerlerinin tartımı yapıldıktan sonra saf su içinde çözüdüürölüp, otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edildikten sonra kullanımları sağlanmıştır.

3.1.4. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

3.1.4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Canlandırılması ve Sayımında Kullanılan Malzemeler

Laktik asit bakterilerinin anaerobik ortam koşullarında gelişiminin sağlanabilmesi için anaerobik kavanoz (OrLab, Merck) kullanılmıştır (şekil 3.1.).



şekil 3.1. Anaerobik Kavanoz

3.1.4.2. Süpernatant Eldesinde Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

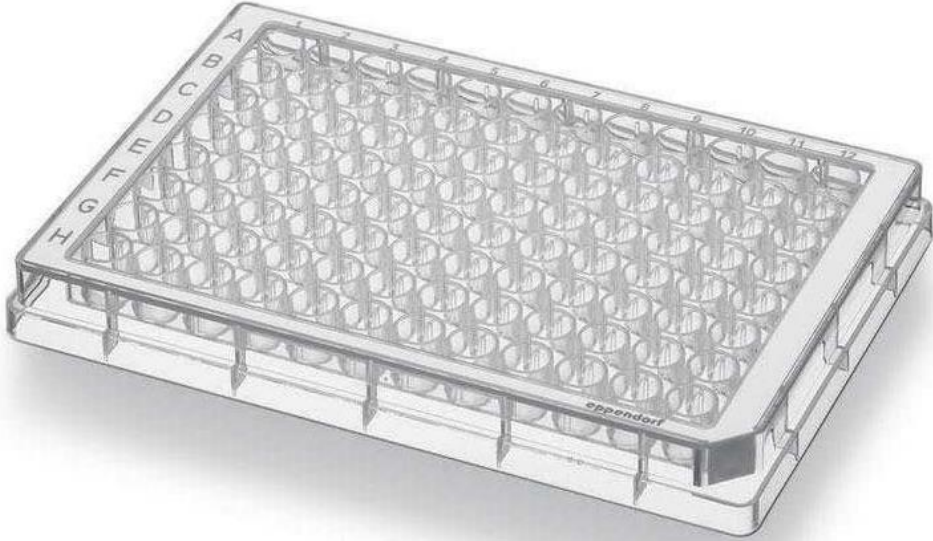
Laktik asit bakterilerinden süpernatantların eldesinin ilk basamağında santrifüj cihazından [Hettich, (Almanya), Mikro 200] yararlanılmıştır (şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Süpernatant Eldesinde Kullanılan Mikro Santrifüj Cihazı

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel özelliklerinin incelenmesi amacıyla santrifüj edilen [Hettich, (Almanya), Mikro 200] bakterilerden süpernatant eldesi için 0.2 µm por çapına sahip olan steril filtreler kullanılmıştır.

Mikrodilüsyon deneyinde minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) saptanabilmesi amacıyla U tabanlı mikropalakalar kullanılmıştır (Şekil 3.3.).

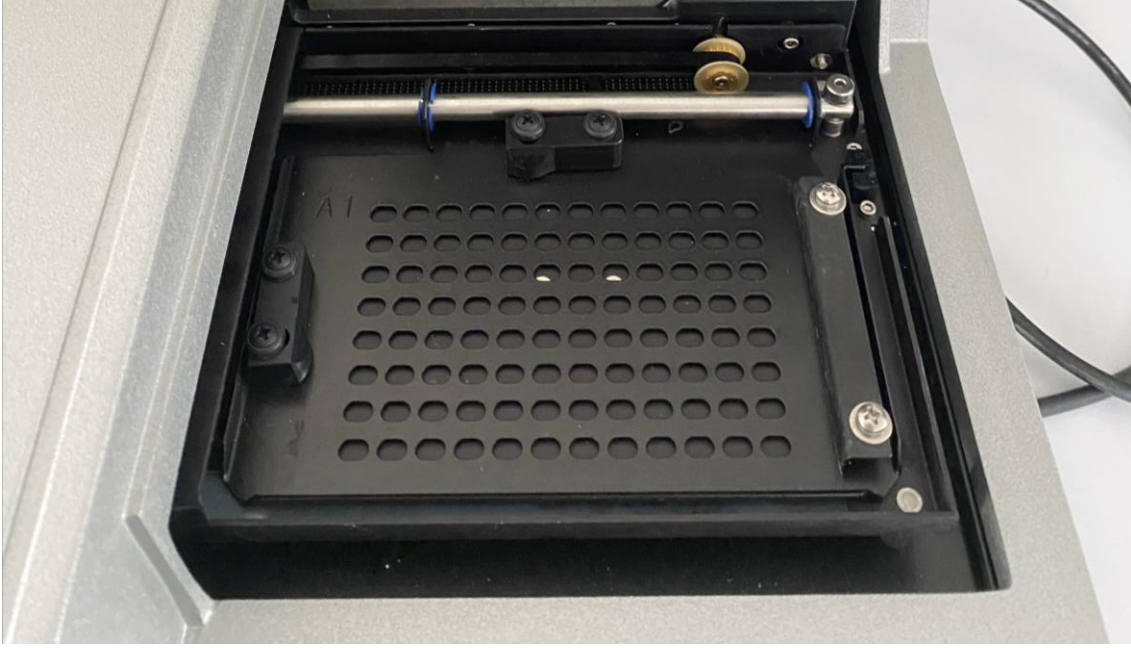


Şekil 3.3. U Tabanlı 96 Kuyucuklu Plaka

Minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesinde 96 kuyucuklu plaka okuyucu (OrLab) kullanılmıştır (Şekil 3.4.; 3.5.).



Şekil 3.4. Mikroplaka Okuyucu



Şekil 3.5. Mikroplaka Okuyucu Cihazı Örnek Yerleştirme Haznesi

Katalaz testinin gerçekleştirilebilmesi için, MRS Agar'dan öze yardımıyla alınan bakterilerin hidrojen peroksit ile muamele edilebilmesi amacıyla lam kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Stok Kültürlerden Canlandırılması

Mikrosantrifüj tüplerde gliserollü MRS Broth'ta (%50-%50) -70 °C'de stoklanan laktik asit bakterileri oda sıcaklığında 5 dakika bekletilip sıvı forma geçmeleri sağlandıktan sonra, kültürlerin her birinden 100'er µL alınarak MRS Broth besiyerine ekimleri gerçekleştirilmiş ve 30 °C'de 24 saat, anaerobik ortamda canlandırılmaları sağlanmıştır.

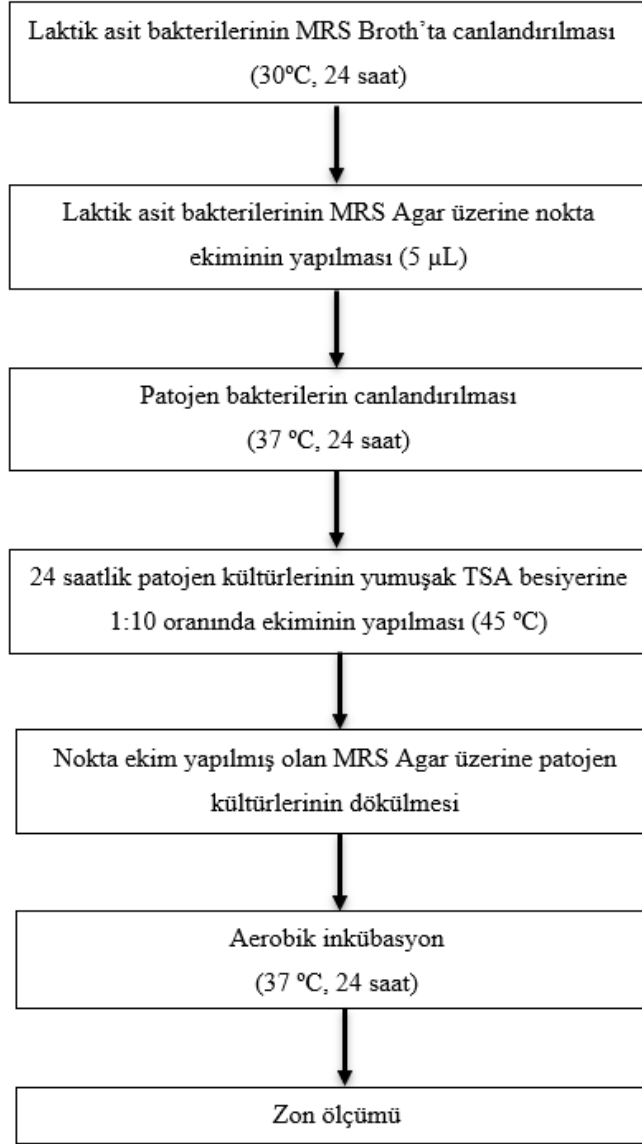
3.2.2. Patojen Bakterilerin Stok Kültürlerden Canlandırılması

Mikrosantrifüj tüplerde gliserollü TSB'de (%50-%50) -70 °C'de stoklanan patojen bakteriler, oda sıcaklığında 5 dakika bekletilip sıvı forma geçmeleri sağlandıktan sonra, kültürlerin her birinden 100'er µL alınarak TSB besiyerine ekimleri gerçekleştirilmiş ve 37 °C'de 24 saat, aerobik ortamda canlandırılmaları sağlanmıştır.

3.2.3. Agar Spot Deneyi

İzole edilmiş laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etkisi, ilk olarak agar spot deneyi ile belirlenmiştir. Bu deney, Arena ve ark. (2016) tarafından tanımlanan yöntem baz

alınarak gerçekleştirilmiştir. Deneyde, Arena ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak seyreltme oranı 1:100 değil, 1:10 olarak uygulanmıştır. Nokta ekim miktarı ise 5 µL yerine 2 µL olarak uygulanmıştır. Deneyde izolatların 18-24 saatlik kültürlerinden MRS Agar üzerine nokta ekim yapılmış olup (2 µL), petriler anaerobik koşullarda 24 saat 30 °C’de koloni gelişimi amacıyla inkübasyona bırakılmıştır. Patojen bakterilerin TSB’de geliştirilmiş 18-24 saatlik kültürlerinden 0,5 mL alınarak, içerisinde 5 mL’lik yumuşak agarlı TSA bulunan tüplere aktarılmış (%0,33 agar) ve 1:10 oranında seyreltme işlemi uygulanmıştır. Daha sonrasında tüplerdeki patojen içeren yumuşak agarlı TSA besiyerleri vortexlenip, nokta ekim yapılmış olan laktik asit bakterilerinin bulunduğu petrilerin üzerine dökülmüştür. İçerisinde patojen bulunan 5 mL yumuşak agarlı TSA ile kaplanan, nokta ekim yapılmış olan petriler, 24 saat 37 °C’de aerobik olarak inkübasyona bırakılmıştır. Petrilerin inkübasyonu sonrasında oluşan zonlar, laktik asit bakterisinin oluşturduğu koloninin dış köşesinden, şeffaf zonun bitimine kadar olan kısma kadar ölçülmüştür. Deney basamakları şematik olarak Şekil 3.6.’da gösterilmiştir.



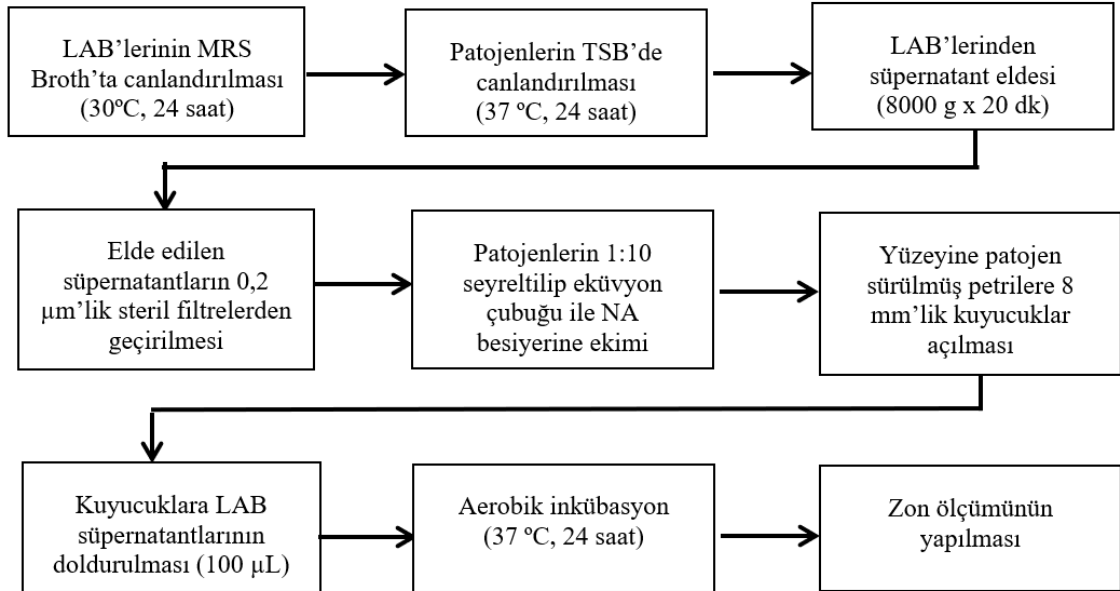
Şekil 3.6. Agar Spot Deney Basamakları

3.2.4. Kuyucuk Difüzyon Deneyi

Agar spot deneyi uygulanan bakterilerin süpernatantları, kuyucuk difüzyon deneyine tabi tutulmuştur. Bu deneyde Arena ve arkadaşlarının deney yöntemi (Arena ve ark., 2016) referans alınmıştır. Laktik asit bakterileri, MRS broth besiyerine ekilerek, 30 °C'de 18-24 saat inkübe edilmişlerdir. Patojen bakteriler ise TSA besiyerinde 18-24 saat, 37 °C'de inkübe edilmiştir. Laktik asit bakterilerinin 24 saatlik kültürleri, mikro santrifüj cihazında [Hettich (Almanya), Mikro 200] 8000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen bakteriler steril şırıngalarla çekilerek, 0,2 mikrometre por çaplı steril membran filtrelerden geçirilmiş, böylece süpernatant eldesi sağlanmıştır. Her bir patojen bakterinin 18-24 saatlik kültürleri 1:10 oranında seyreltilerek NA

besiyerine steril eküvyon çubuğu ile ekimleri yapılmıştır. Ekim yapılmış petrilere, patojen bakterilerin yüzeye difüze olması için 10 dk oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra petrilere 8 mm'lik kuyucuklar açılmıştır. Bu kuyucuklara, elde edilen laktik asit bakterilerinin süpernatantları 100'er µL olacak şekilde doldurulmuştur ve 37 °C'de aerobik koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan zonlar, kuyunun dış köşesinden berrak zonun bitimine kadar olan kısma kadar ölçülmüştür.

Bir petriye beş kuyucuk açılmış olup, bir kuyucuk kontrol örneği olan MRS broth'u içerirken, diğer dört kuyucuk ise dört farklı laktik asit bakterisinin süpernatantını içermektedir. Deney basamakları Şekil 3.7.'deki gibidir.

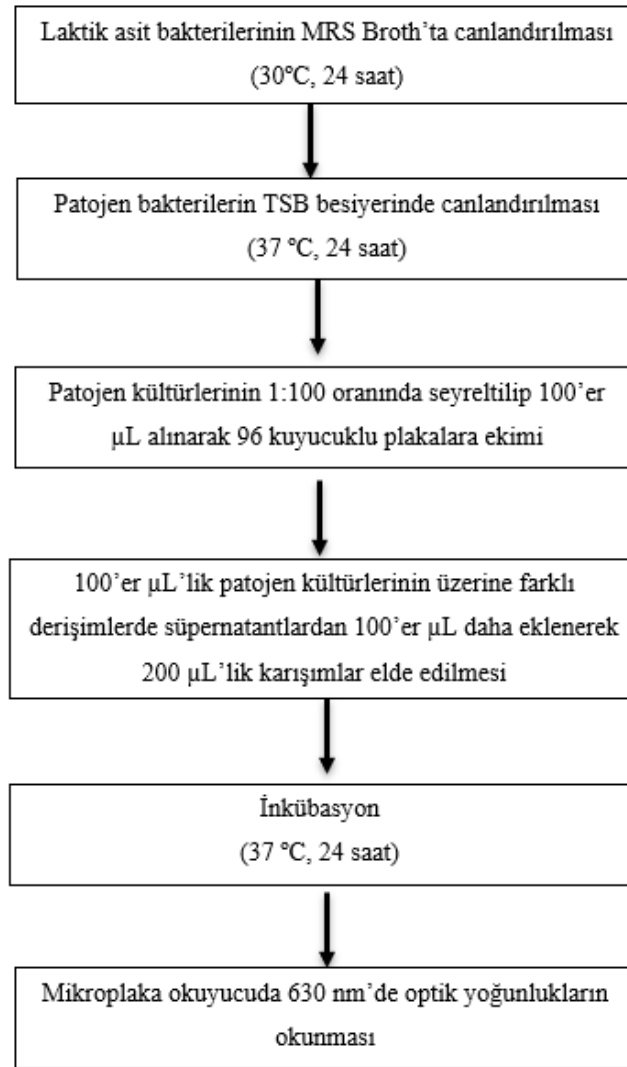


Şekil 3.7. Kuyucuk Difüzyon Deney Basamakları

3.2.5. Broth Mikrodilüsyon Deneyi

Agar spot ve kuyu difüzyon testi gerçekleştirilen bakterilere, daha sonra minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesi amacıyla broth mikrodilüsyon deneyi uygulanmıştır. Bu deneyde 24 saatlik patojen kültürlerinin 1:100 oranında TSB besiyerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra seyreltilen patojen kültürlerinden 100'er µl alınarak U tabanlı 96 kuyucuklu plakalara (OrLab) ekimi gerçekleştirilmiştir. 100'er µl'lik patojen kültürlerinin üzerine farklı derişimlerde (%5, %10, %15.... %50) süpernatantlardan 100'er µl daha eklenerek, toplamda 200 µl'lik karışımlar

elde edilmiştir. Elde edilen 200 µl'lik karışımlar, 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra mikropilaka okuyucuda (Bio-Tek, ELx808) 630 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçümü yapılmıştır. Literatürde okumanın gerçekleştirildiği geleneksel dalga boyu 600 nm'dir. Fakat Ted Quigley yaptığı bir çalışmada 600 nm ve 630 nm arasında, okuma sonuçları açısından çok fark olmadığı, okumanın farklı dalga boylarında da yapılabileceği sonucuna ulaşmıştır (Quigley, 2008). Noskova ve ark. (2021) ise LAB'lerinin *E. coli*'ye karşı oluşturduğu MİK değerleri üzerine yaptığı araştırmada 625 nm'de optik yoğunluk okumuştur. Deney basamakları Şekil 3.8.'de yer almaktadır.



Şekil 3.8. Broth Mikrodilüsyon Deney Basamakları

Elde edilen absorbans değerleri, kontrol örnekleriyle (süpernatant içermeyen karışım) karşılaştırılarak % inhibisyon değerleri saptanmıştır. İnhibisyon yüzdeleri, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{şahit}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{şahit}}] \times 100$$

Burada;

$A_{\text{şahit}}$: Süpernatant içermeyen karışımların absorbans değeri

$A_{\text{örnek}}$: Süpernatant ve patojen bakteri içeren karışımların absorbans değeri

Her bir seyreltme faktörü için (%5, %10, %15,..., %50) laktik asit bakterilerinin patojenler üzerine yaptığı inhibisyon etkisi yukarıdaki hesaplama yöntemi ile bulunmuş olup, veriler grafiğe geçirilmiştir. Verilerin grafikleri çizilip, %50 ve üzerinde inhibisyon sağlanan konsantrasyonlardan bazıları seçilip, bu konsantrasyonlara özel daha detaylı inceleme yapabilmek adına bar grafikleri oluşturulmuştur.

3.2.6. Katalaz Testi

Laktik asit bakterisi izolatlarının katalaz enzim aktivitesi bu testle belirlenmiştir. Çalışmada laktik asit bakterilerinin katalaz enzimlerinin var-yok analizini gerçekleştirebilmek adına öncelikle laktik asit bakterileri, MRS Agar üzerine tek koloni düşürme yöntemiyle inoküle edilip, anaerobik olarak 30 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyondan sonra koloniler temiz bir lam üzerine alınıp, üzerlerine %3’lük H₂O₂ (Hidrojen peroksit) çözeltisi damlatılmıştır. Gaz çıkışının gözlenip gözlenmemesine bağlı olarak sonuçlar negatif veya pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.7. İstatistiksel Analizler

Laktik asit bakterilerinin patojen bakteriler üzerindeki antimikrobiyel aktivitelerinin değerlendirilebilmesi amacıyla agar spot testindeki zon ölçümleri baz alınarak istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel analiz sonuçları, iki tekrar ve iki paralel olarak yapılan deneylerin bütün sonuçlarını içermektedir. Bütün istatistiksel analizler IBM SPSS Statistics 23 programı

kullanılarak yürütülmüştür. Öncelikle verilerin dağılımının normal olup olmadığının değerlendirilebilmesi adına normallik testi uygulanmıştır. Normallik düzeyine göre, parametrik istatistiksel analiz uygulamasının yapılması uygun bulunmuştur.

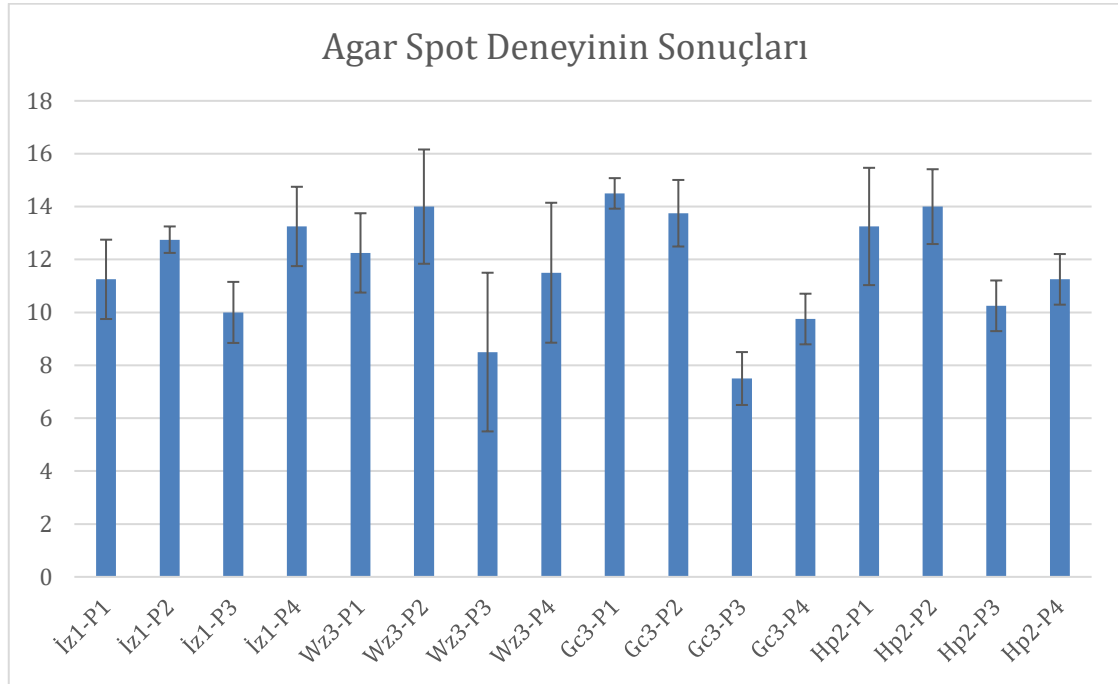
Bu amaçla öncelikle iki yönlü ANOVA (Two Way ANOVA) metodu kullanılmıştır. Grupların kendi içinde önemli bir farklılığının olup olmadığının belirlenebilmesi ve eğer var ise bu farklılıkların nereden kaynaklandığını anlayabilmek adına tek yönlü varyans analiz metodu olan Tek Yönlü ANOVA (One Way ANOVA) kullanılıp, ANOVA sonucunda anlamlı bir farklılık oluşması durumunda, farklılıkların nereden kaynaklandığını anlayabilmek adına varyansların homojen veya heterojen olma durumuna göre Post Hoc testi uygulanmıştır. ANOVA testlerinde %95 güven aralığı esas alınmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Etki Spektrumlarının Belirlenmesi

4.1.1. Agar Spot Deneyi

Bu çalışmada 3 farklı *Lactobacillus plantarum* (İz1, Hp2, Wz3) türünün ve 1 adet *Lactobacillus brevis* (Gc3) türünün, 4 ayrı patojene [*Salmonella* Enteritidis (P1), *Listeria monocytogenes* (P2), *E. coli* O157:H7 (P3), metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* ATCC 13552 mecC(+) (P4)] karşı gösterdikleri antimikrobiyel aktiviteleri araştırılmıştır. Agar spot deneyi gerçekleştirilen LAB izolatları, hem suşlarına hem de ilgili patojene bağlı olarak farklı antimikrobiyel etki seviyeleri göstermişlerdir. Veriler, Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Deney görselleri EK 2'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Agar Spot Deneyinin Sonuçları

Sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek inhibisyon zonunun Gc3 laktik asit bakterisi tarafından *S. Enteritidis*'e (P1) karşı (14,5 mm), en düşük inhibisyon zonunun ise yine Gc3 laktik asit bakterisi tarafından EHEC'e (P3) karşı (7,5 mm) oluşturulduğu görülmektedir. İnhibisyon zonları 7,5 mm ile 14,5 mm arasında geniş bir dağılım göstermektedir.

LAB'lerinden İz1 tarafından, en yüksek inhibisyon zonu MRSA (P4) patojenine karşı (13,25 mm) oluşturulmuştur. En düşük inhibisyon zonu ise EHEC (P3) patojenine karşı (10,0 mm) oluşmuştur. Wz3 LAB'si en yüksek inhibisyon zonunu *L. monocytogenes* (P2) patojenine karşı (14,0 mm) oluşturmuş olup, en düşük inhibisyon zonunu ise EHEC'e (P3) karşı (8,5 mm) oluşturmuştur. Hp2 laktik asit bakterisi ise en yüksek zonu *L. monocytogenes*'e (P2) karşı (14,0 mm) oluşturmuş, en düşük zonu ise EHEC (P3) (10,25 mm) patojenine karşı oluşturmuştur.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, incelenen LAB'lerinin genel olarak EHEC'e (P3) karşı düşük antimikrobiyel aktivite, *L. monocytogenes*'e (P2) karşı ise yüksek antimikrobiyel aktivite gösterdikleri söylenebilmektedir. LAB'lerinin patojenlere karşı gösterdikleri etki seviyeleri zon büyüklükleri açısından farklılık gösterse de, düşük ve yüksek etki gösterdikleri patojen türleri LAB'leri arasında benzerlik göstermektedir.

Bu konuda yapılmış bir çalışmada çiğ keçi sütünden elde edilmiş *L. plantarum*'un, çeşitli patojen bakterilere karşı gösterdiği etki agar spot yöntemi ile incelenmiştir (Anas, Ahmet ve Mebrouk, 2014). Çalışma sonucunda *L. plantarum*'un en az etki gösterdiği patojen *Salmonella* Enteritidis (3 mm), en yüksek etki gösterdiği patojen ise *S. aureus* ATCC 25923 (22 mm) olmuştur. Çalışma sonuçları, antimikrobiyel etkinliğin farklı bakteriler üzerine farklı etkileri olması nedeniyle bu tez kapsamındaki çalışma sonuçları ile benzerlik göstermemektedir.

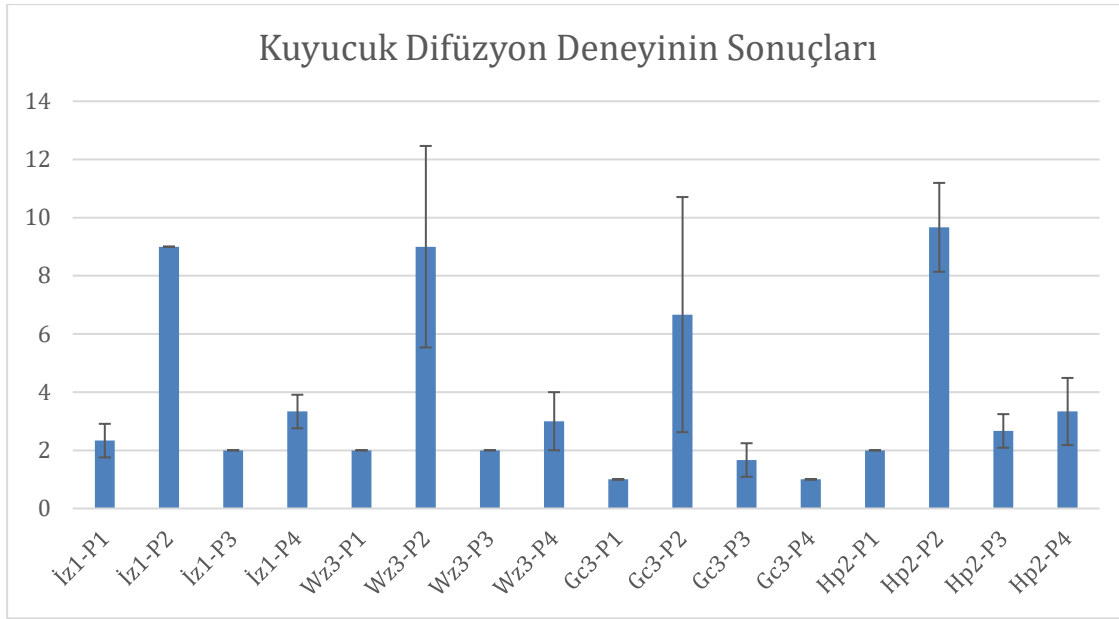
Erdoğan ve Bostancı (2020), yaptıkları bir çalışmada ise kefir örneklerinden elde ettikleri probiyotik bakterilerin (*Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus durans* ve *Enterococcus faecium*) çeşitli patojen bakteriler üzerindeki antimikrobiyel etkisini değerlendirmişlerdir. Erdoğan ve Bostancı'nın yapmış olduğu bu çalışma, deney yöntemi açısından bu tez çalışması ile benzerlik göstermektedir. Erdoğan ve Bostancı'nın çalışmasında kullanılan *Lactobacillus fermentum*, *E. coli*'ye karşı 5-10 mm arasında antimikrobiyel etki gösterirken, bu tez çalışması kapsamında kullanılan laktobasil suşlarının *E. coli* O157:H7'ye karşı gösterdikleri antimikrobiyel etkiye bağlı olan zon çapları 7,5 ile 10,25 mm arasında değişim göstermektedir. Erdoğan ve Bostancı'nın çalışmasının sonucunda *Lactobacillus fermentum* tarafından *L. monocytogenes*'e karşı gösterilen antimikrobiyel etki 15 mm ile 20 mm arasında değişirken, bu tez kapsamında çalışılan laktobasil suşlarının *L. monocytogenes*'e karşı

gösterdikleri etki 12 mm ile 14 mm arasında değişiklik göstermektedir. Her iki çalışmanın sonucunda da laktobasil suşları tarafından *E. coli* O157:H7'ye karşı daha düşük antimikrobiyel etki gözlenirken, *L. monocytogenes*'e karşı daha yüksek antimikrobiyel etki gözlenmiştir.

Bir başka benzer çalışmada ise şarap ve üzüm şirasından elde edilen çeşitli *L. plantarum* suşlarının, 7 ayrı patojen bakteriye karşı antimikrobiyel etki mekanizması agar spot deneyi ile test edilmiştir (Arena ve ark. 2016). Zon büyüklükleri 1 mm ile 17 mm arasında değişiklik gösterirken, inhibisyon zonu 5 mm ve üstü olan bakteriler, güçlü antimikrobiyel etkiye sahip olarak kabul edilmiştir. Çalışmada bir *L. plantarum* suşu *L. monocytogenes*'e karşı yüksek antimikrobiyel etki gösterirken, iki farklı *L. plantarum* suşunun *E. coli* O157:H7'ye karşı antimikrobiyel etkisinin yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır. 4 farklı *L. plantarum* suşu tarafından *S. Enteritidis* ve *S. aureus*'un çeşitli suşlarına karşı olan inhibisyon ise etkili bulunmuştur. 3 farklı *L. plantarum* suşu ise *S. aureus*'un farklı suşlarına karşı hiçbir antimikrobiyel etki göstermemiştir. Bu tez kapsamındaki araştırma sonuçlarımız ile benzer olarak, Arena ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonucunda da farklı laktobasil suşlarının farklı patojenler üzerine daha yüksek antimikrobiyel etkide bulunabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Arena ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada zon büyüklükleri 1 mm ile 17 mm arasında değişiklik gösterirken, yapmış olduğumuz tez çalışmasında zon büyüklükleri 7,5 mm ile 14,5 mm arasında değişiklik göstermektedir.

4.1.2. Kuyucuk Difüzyon Deneyi

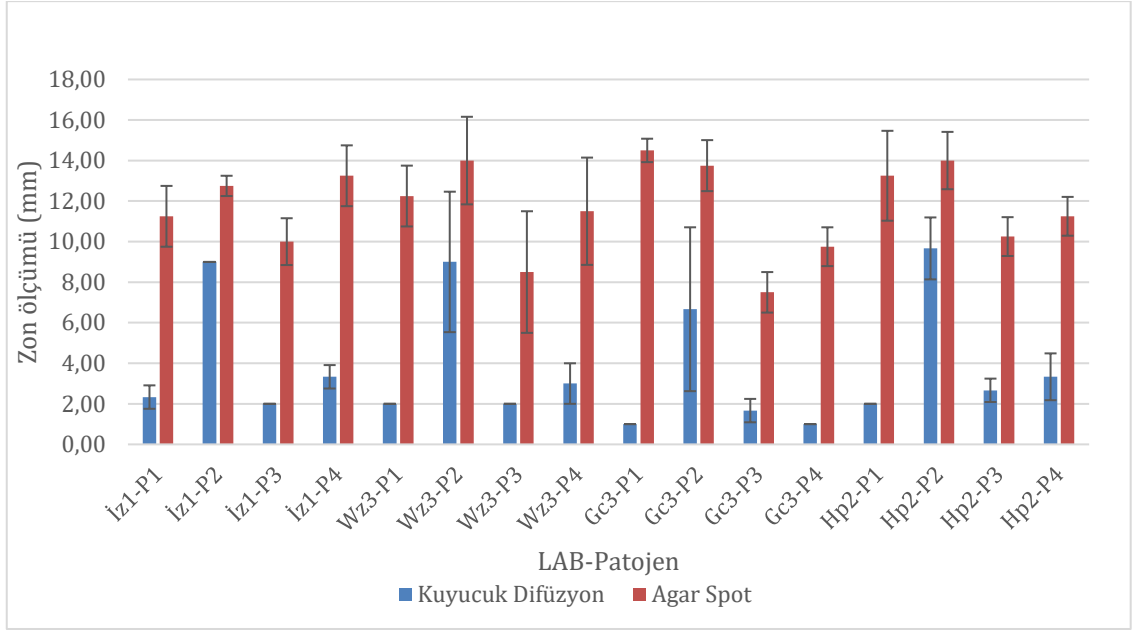
Kuyucuk difüzyon deneyi, agar spot deneyinden farklı olarak, LAB'lerinin oluşturduğu metabolitlerin patojen bakteriler üzerindeki antimikrobiyel etkisini görebilmek adına uygulanmıştır. Bu deneyde, LAB'lerinin ürettiği süpernatantların patojen bakterilere karşı gösterdikleri antimikrobiyel aktivite saptanmıştır. Deney görselleri EK 3'te verilmiştir. Sonuçlar ise Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Kuyucuk Difüzyon Deneyinin Sonuçları

Sonuçlara bakıldığında, LAB'lerinin süpernatantları tarafından en yüksek antimikrobiyel etki *L. monocytogenes*'e (P2) karşı oluşturulmuştur. Zon büyüklüğü *L. monocytogenes*'e (P2) karşı İz1 ve Wz3 süpernatantı tarafından 9,0 mm gözlenmişken, Gc3 süpernatantı tarafından 6,7 mm, Hp2 süpernatantı tarafından ise 9,7 mm gözlenmiştir. LAB'lerinin süpernatantları tarafından *S. Enteritidis*, EHEC ve MRSA'ya karşı oluşturulan etki ise 1 mm ile 3,3 mm arasında değişiklik göstermekte olup, birbirlerine yakın bulunmuştur.

İki antimikrobiyel dirençlilik testinin sonuçlarının karşılaştırması Şekil 4.3.'te gösterilmiştir. Sonuçlar birbiriyle tam olarak paralellik göstermemektedir. Kuyucuk difüzyon deneyinde süpernatantların oluşturduğu antimikrobiyel etki, agar spot deneyinde bakterilerin oluşturduğu antimikrobiyel etkiden daha zayıf bulunmuştur. Agar spot ve kuyucuk difüzyon deneylerinin sonuçlarına bakılarak bakterinin kendisinin patojen bakterilere karşı gösterdiği antimikrobiyel etkinin, hücresiz süpernatantlarının gösterdiği etkiden daha kuvvetli olduğu sonucuna ulaşılabilmektedir. LAB'lerinin ve hücresiz süpernatantlarının *L. monocytogenes*'e karşı gösterdikleri etki iki deneyde de, diğer patojen bakterilere karşı gösterilen antimikrobiyel etkiden daha yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.3. Agar Spot ve Kuyucuk Difüzyon Denejlerinin Sonuçları

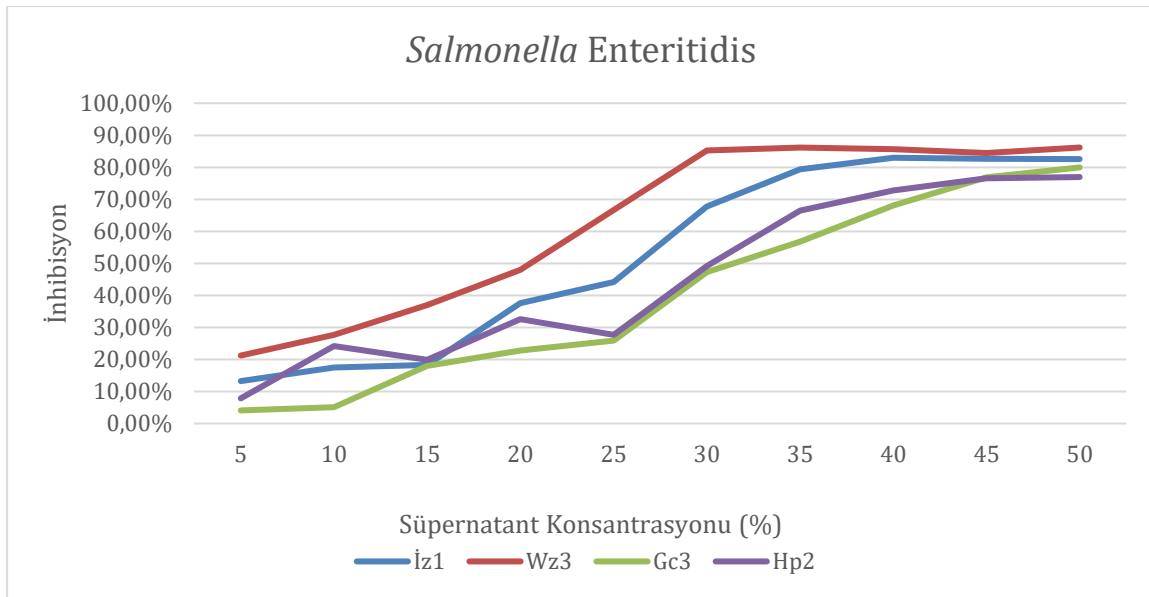
Presti ve arkadaşlarının (2015) yaptıkları bir çalışmada laktobasil ve bifidobakterlerin çeşitli suşları, çeşitli patojen bakterilere karşı kuyucuk difüzyon deneyine tabi tutulmuştur. Antimikrobiyel etki gözlenen bakteri süpernatantlarına ileri analizler uygulanmıştır. İleri analizde antimikrobiyel etkinlik, kültür süpernatantlarının varlığında ve yokluğunda, 24 saat içinde antagonistlerin gelişiminin kob/mL olarak inhibisyon oranlarının karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak ise antagonistlerin süpernatant içermeyen kültürleri kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda *L. acidophilus* ve *L. plantarum*'un, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *Escherichia coli*'yi güçlü bir şekilde inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır. Presti ve arkadaşlarının çalışmasındaki sonuçlardan farklı olarak, yürütmüş olduğumuz tez çalışmasında ise laktobasil suşları, kuyucuk difüzyon deneyinde MRSA ve *E. coli* O157:H7'ye karşı düşük antimikrobiyel etki göstermiştir.

Bir başka çalışmada kefir örneklerinden elde edilen laktobasil ve enterokokların çeşitli suşları, belirli patojenlere karşı kuyucuk difüzyon testine tabi tutulmuştur (Erdoğan ve Bostancı, 2020). Çalışma sonucunda laktobasil suşları *L. monocytogenes* ATCC 1911'e karşı yüksek antimikrobiyel aktivite göstermiş olup, en düşük antimikrobiyel aktiviteyi ise *E. coli* ATCC 35218'e karşı göstermişlerdir. Çalışma sonuçları yürütmüş olduğumuz tez çalışması ile en yüksek etkinin *L. monocytogenes*'e karşı oluşturulması ve *E. coli*'ye karşı düşük etki gözlenmesi nedeniyle benzerlik göstermektedir.

Benzer bir çalışmada ise Arena ve ark. (2016) tarafından şarap ve üzüm şirasından elde edilen çeşitli *L. plantarum* suşlarının farklı gıda patojenlerine karşı (*L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*, *S. aureus*) antimikrobiyel etkileri araştırılmıştır. Deneysel sonucunda hiçbir süpernatant, patojen bakteriler üzerinde inhibisyon etkisi göstermemiştir. Bu nedenle süpernatantlar liyofilizasyon işlemi ile 10 kat daha konsantre hale getirildikten sonra deney tekrar yapılmıştır. *L. plantarum*'un patojen bakterilere karşı oluşturdukları antimikrobiyel etkileri suşa bağlı olarak değişiklik göstermekte olup, inhibisyon zonları 0 - 11 mm arası değişiklik göstermiştir. Çoğu *L. plantarum* suşu tarafından en yüksek antimikrobiyel etki *L. monocytogenes*'e karşı oluşmuş iken, en düşük antimikrobiyel etki ise *S. aureus*'a karşı oluşmuştur. Arena ve arkadaşlarının sonucu ile benzer olarak, bu çalışmada da kuyucuk difüzyon deneyinde laktobasil suşları arasında en yüksek antimikrobiyel etki *Listeria monocytogenes*'e karşı oluşmuştur.

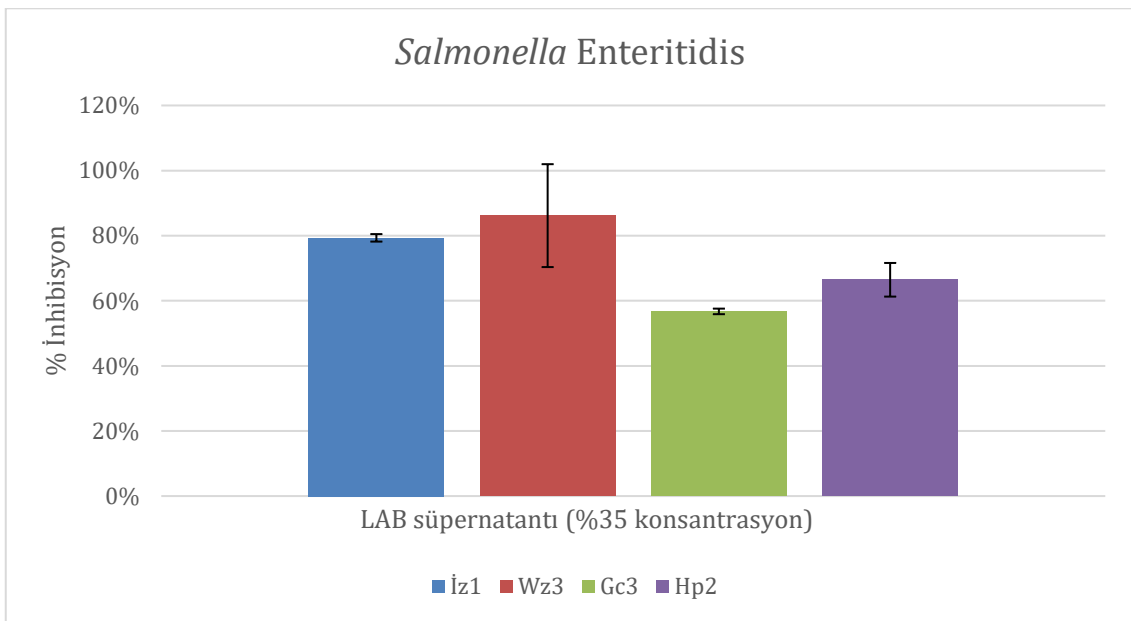
4.1.3. Broth Mikrodilüsyon Deneyi

Broth mikrodilüsyon deneyi, LAB'lerinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değerlerinin saptanabilmesi adına uygulanmıştır. LAB'lerinin *Salmonella* Enteritidis'e karşı olan inhibisyon etkileri Şekil 4.4.'te gösterilmiştir. Deneysel görselleri EK 4'te verilmiştir.



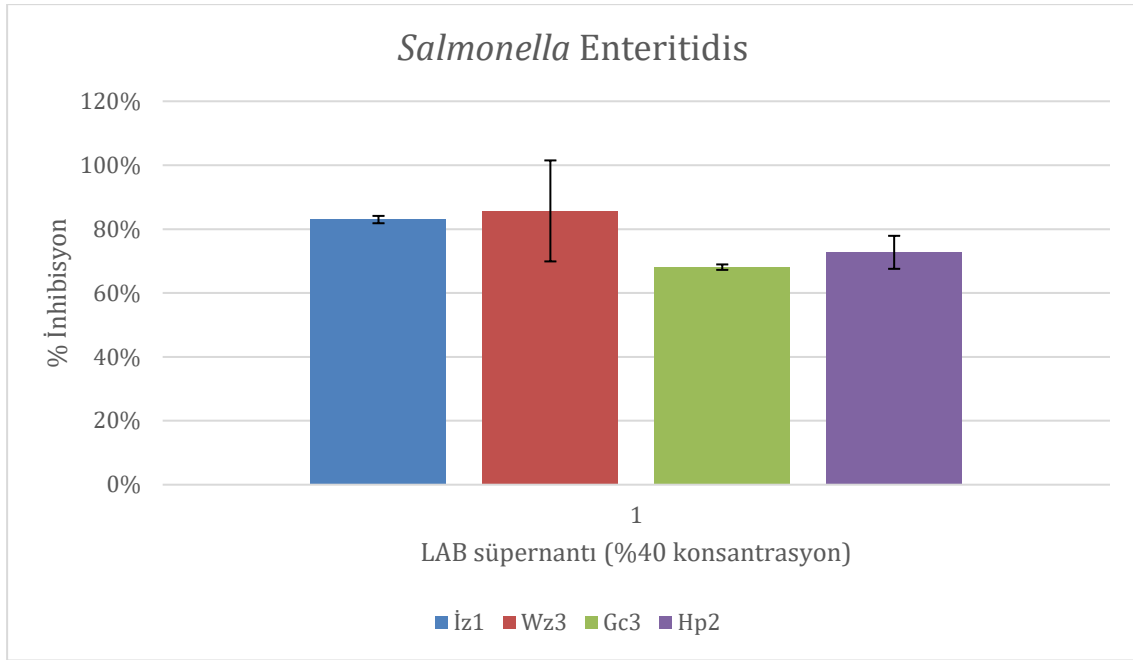
Şekil 4.4. LAB Süpernatantlarının *S. Enteritidis* Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

LAB'lerinin *Salmonella* Enteritidis'e karşı gösterdikleri inhibisyon mekanizmaları incelendiğinde bütün LAB konsantrasyonlarında en iyi inhibisyon yeteneğinin Wz3 bakterisinin süpernatantında olduğu görülmektedir. Gc3 bakterisinin süpernatantı %45'e kadar olan bütün konsantrasyonlarda en düşük inhibisyonu sağlamış olsa da, %50 konsantrasyonda Hp2 bakterisinden daha yüksek bir inhibisyon sağlamıştır. Bütün süpernatantlar, %35 LAB süpernatant konsantrasyonunda *Salmonella* Enteritidis'e karşı %50'nin üzerinde inhibisyon sağlamışlardır. %50'nin üzerinde inhibisyonun sağlandığı konsantrasyonların daha detaylı gösterimi Şekil 4.5., Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.'de mevcuttur.



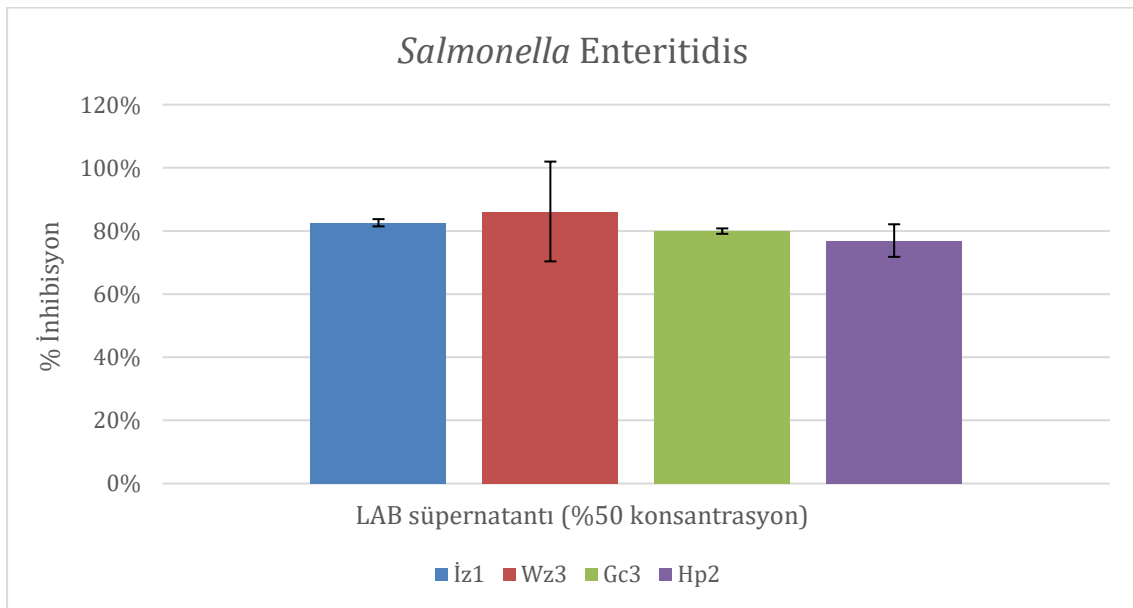
Şekil 4.5. LAB Süpernatantlarının %35 Konsantrasyonda *S. Enteritidis* Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

%35 süpernatant konsantrasyonunda en yüksek inhibisyonu Wz3 bakterisinin süpernatantı sağlarken (%86,15), Gc3 bakterisinin süpernatantı ise en düşük inhibisyon yüzdesine sahiptir (%56,73).



Şekil 4.6. LAB Süpernantlarının %40 Konsantrasyonda *S. Enteritidis* Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

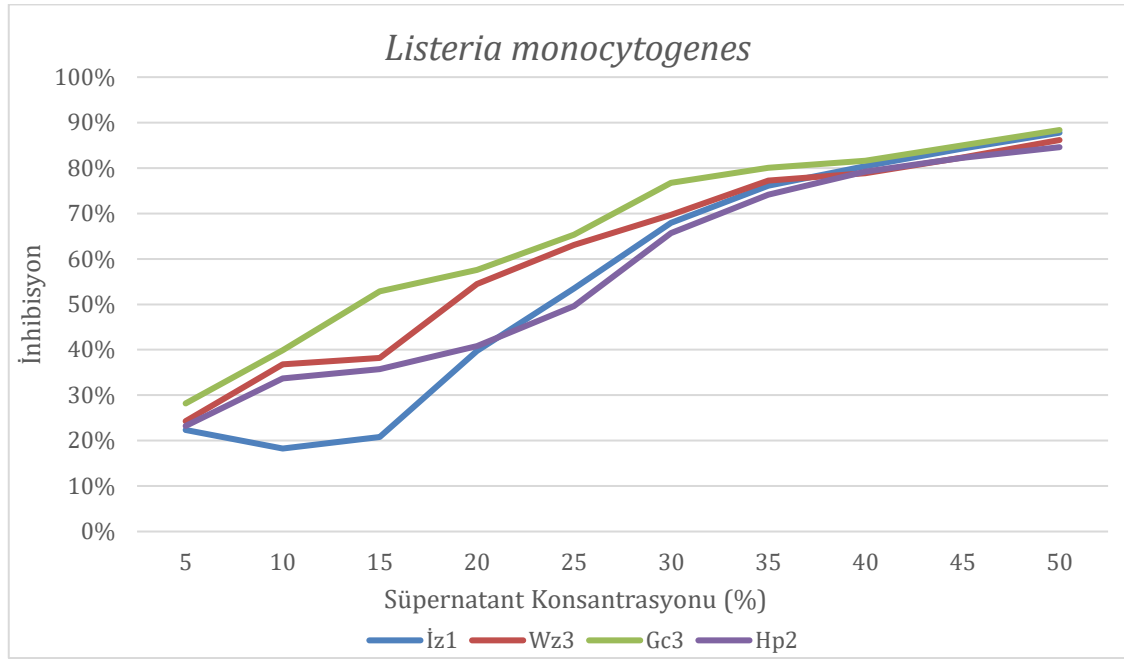
%40 süpernant konsantrasyonundaki inhibisyon yüzdeleri göz önüne alındığında İz1 ve Wz3 süpernantlarının inhibisyon yüzdeleri birbirine çok yakın olmakla birlikte, en yüksek inhibisyonu Wz3 bakterisinin süpernantı sağlamıştır (%85,69). En düşük inhibisyonu ise Gc3 süpernantı sağlamıştır (%68,09).



Şekil 4.7. LAB Süpernantlarının %50 Konsantrasyonda *S. Enteritidis* Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

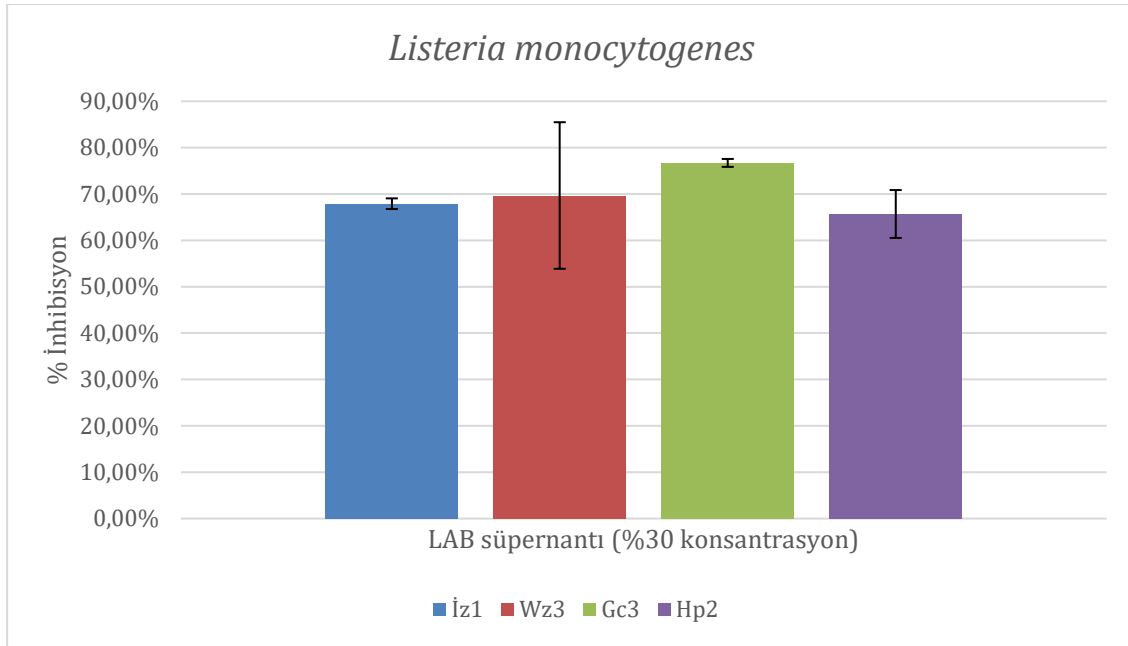
%50 süpernatant konsantrasyonu içeren karışımlara bakıldığında en yüksek inhibisyon yine Wz3 süpernatantı tarafından sağlanırken (%86,18), en düşük inhibisyon ise Hp2 bakterisinin süpernatantı tarafından sağlanmıştır (%76,96).

LAB'lerinin *Listeria monocytogenes*'e karşı olan inhibisyon yüzdeleri Şekil 4.8.'de gösterilmiştir.



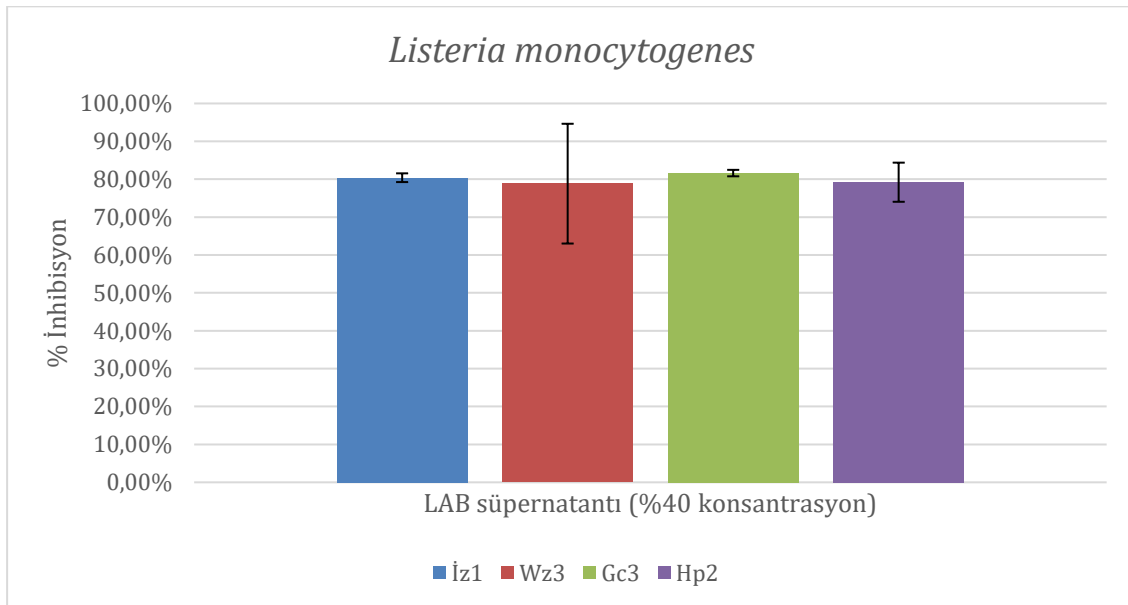
Şekil 4.8. LAB Süpernatantlarının *Listeria monocytogenes* Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

Laktik asit bakterilerinin *Listeria monocytogenes*'e karşı gösterdikleri inhibisyon etkisi, %30 oranında süpernatant konsantrasyonu içeren kültür kullanıldığında bütün LAB'leri için %50'nin üzerinde bulunmuştur. İnhibisyon etkisinin %50 ve üzerinde olduğu konsantrasyonların daha detaylı gösterimi Şekil 4.9., Şekil 4.10., ve Şekil 4.11.'de yer almaktadır.



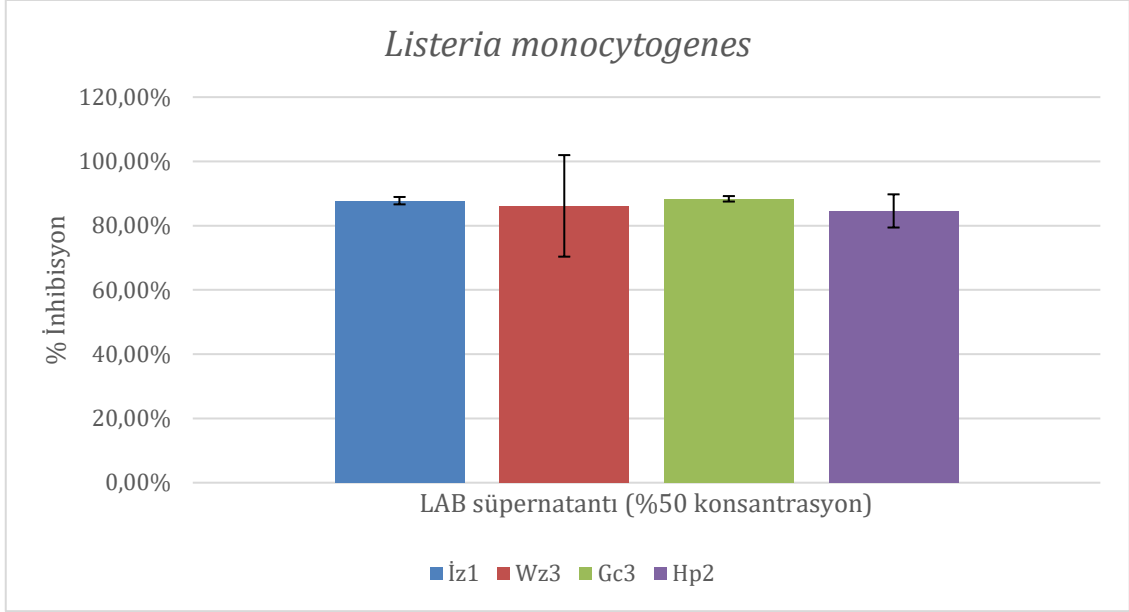
Şekil 4.9. LAB Süpernatantlarının %30 Konsantrasyonda *L. monocytogenes* Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

%30 süpernatant konsantrasyonu içeren karışımda, *Listeria monocytogenes*'e karşı en yüksek inhibisyon (%76,71) Gc3 bakterisinin süpernatantı tarafından sağlanmış olup, en düşük inhibisyon (%65,69) ise Hp2 bakterisi tarafından gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.10. LAB Süpernatantlarının %40 Konsantrasyonda *L. monocytogenes* Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

%40 süpernatant konsantrasyonu içeren karışımda, *Listeria monocytogenes*'e karşı sağlanan en yüksek inhibisyonu Gc3 (%81,62) bakterisinin süpernatantı, en düşük inhibisyonu (%78,83) ise Wz3 bakterisinin süpernatantı gerçekleştirmiştir.

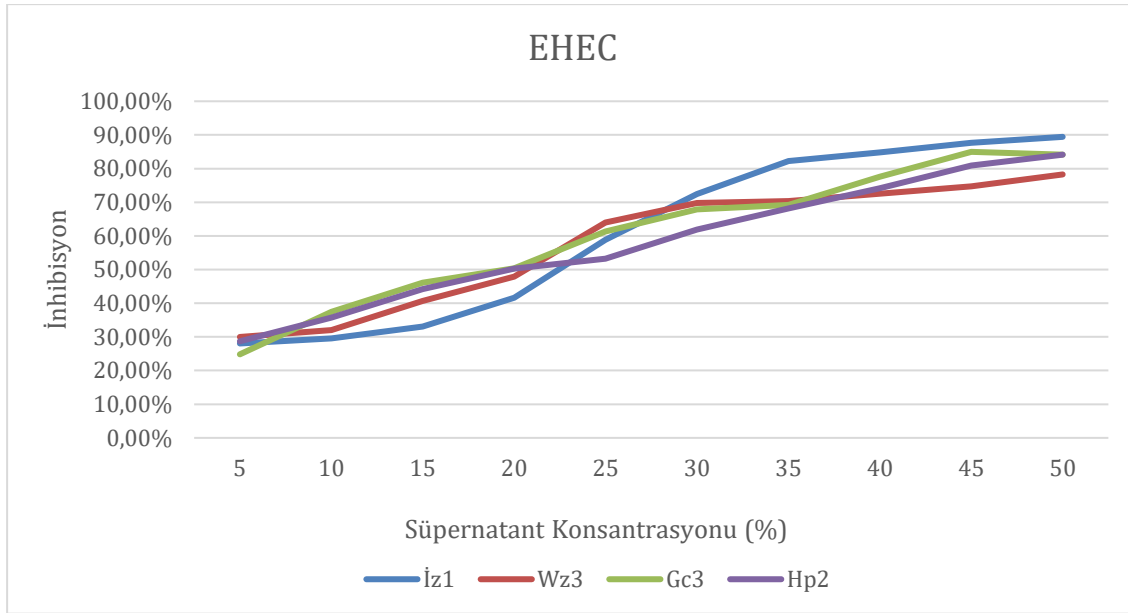


Şekil 4.11. LAB Süpernatantlarının %50 Konsantrasyonda *L. monocytogenes* Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

Maksimum konsantrasyon olan %50 süpernatant konsantrasyonu içeren karışımda ise *Listeria monocytogenes* üzerinde en yüksek inhibisyonu Gc3 süpernatantı (%88,36), en düşük inhibisyonu ise Hp2 süpernatantı (%84,58) sağlamıştır.

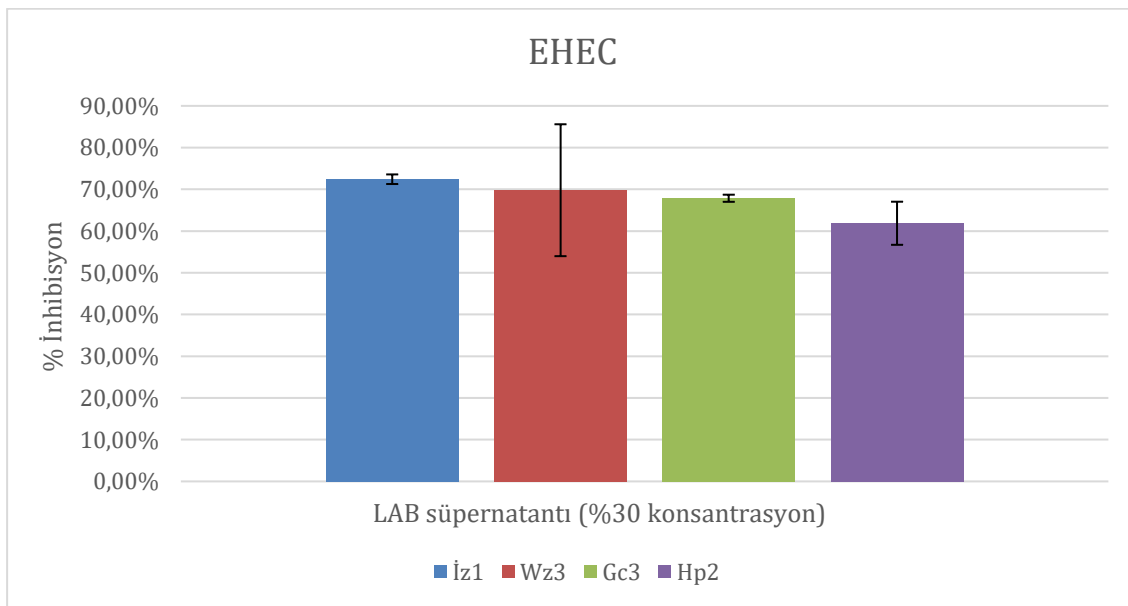
LAB'lerinin *Listeria monocytogenes*'i inhibe etme yeteneklerine bakıldığında ve %5- %50 LAB konsantrasyonlarının hepsi değerlendirildiğinde Gc3 süpernatantının, diğer LAB'lerinin süpernatantlarından çok daha hızlı ve yüksek inhibisyon sağladığı sonucuna ulaşılmaktadır.

Süpernatantların EHEC üzerindeki inhibisyon etkileri 4.12.'de gösterilmiştir.



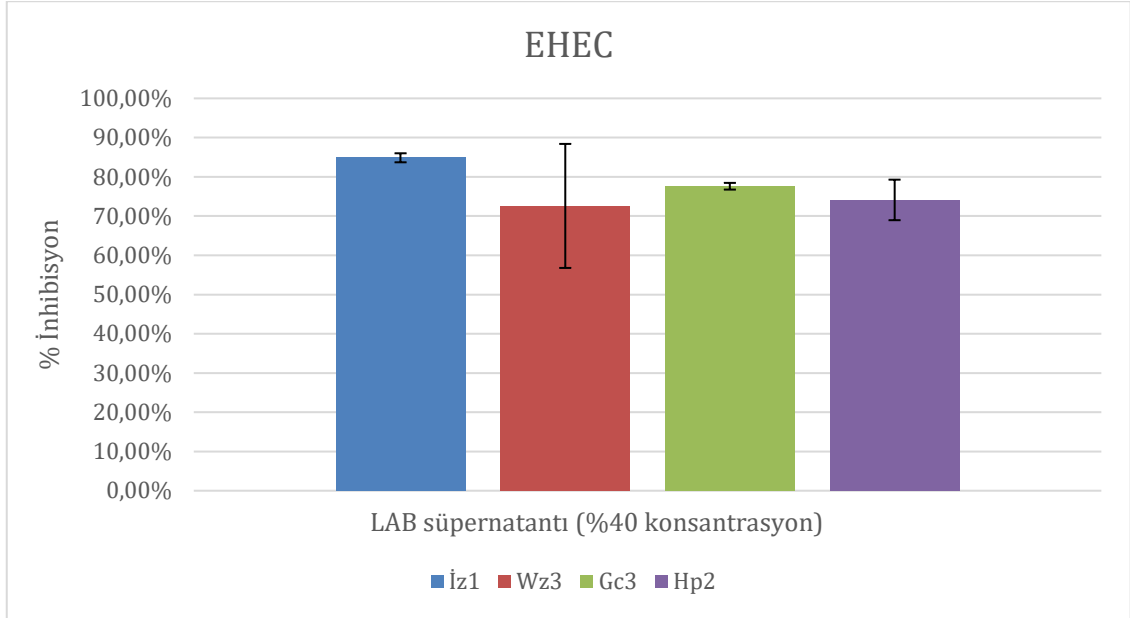
Şekil 4.12. LAB Süpernatantlarının EHEC Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

LAB süpernatantlarının EHEC üzerine yaptığı inhibisyon etkisine bakıldığında bütün süpernatantların neredeyse benzer şekilde inhibisyon yüzdelерinin arttığı görülmektedir. Grafiğe bakıldığında %50 ve üzeri patojen inhibisyonun sağlandığı en düşük LAB konsantrasyonunun %25 olduğu görülmektedir. %50 ve üzeri inhibisyonun sağlandığı konsantrasyondaki grafikler daha detaylı olarak Şekil 4.13., Şekil 4.14. ve Şekil 4.15.'te incelenmiştir.



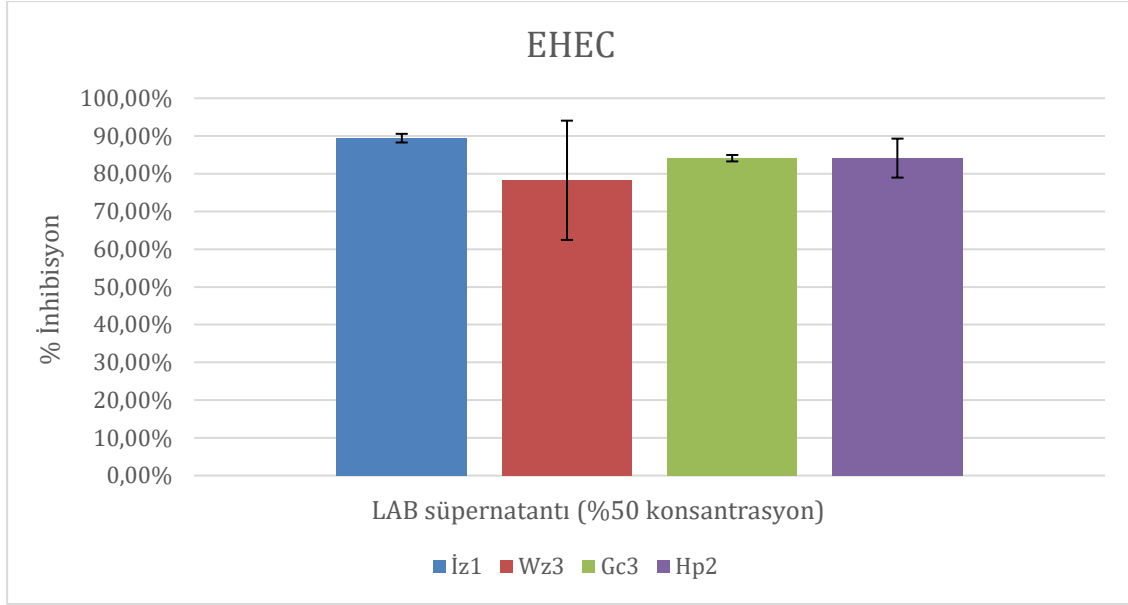
Şekil 4.13. LAB Süpernatantlarının %30 Konsantrasyonda EHEC Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

%30 LAB konsantrasyonu içeren karışımlarda en yüksek inhibisyonu İz1 süpernatantı sağlamış olup (%72,42), en düşük inhibisyonu ise Hp2 süpernatantı sağlamıştır (%61,87). Wz3 ve Gc3 süpernatantlarının inhibisyon yüzdeleri birbirine yakın bulunmuştur.



Şekil 4.14. LAB Süpernatantlarının %40 Konsantrasyonda EHEC Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

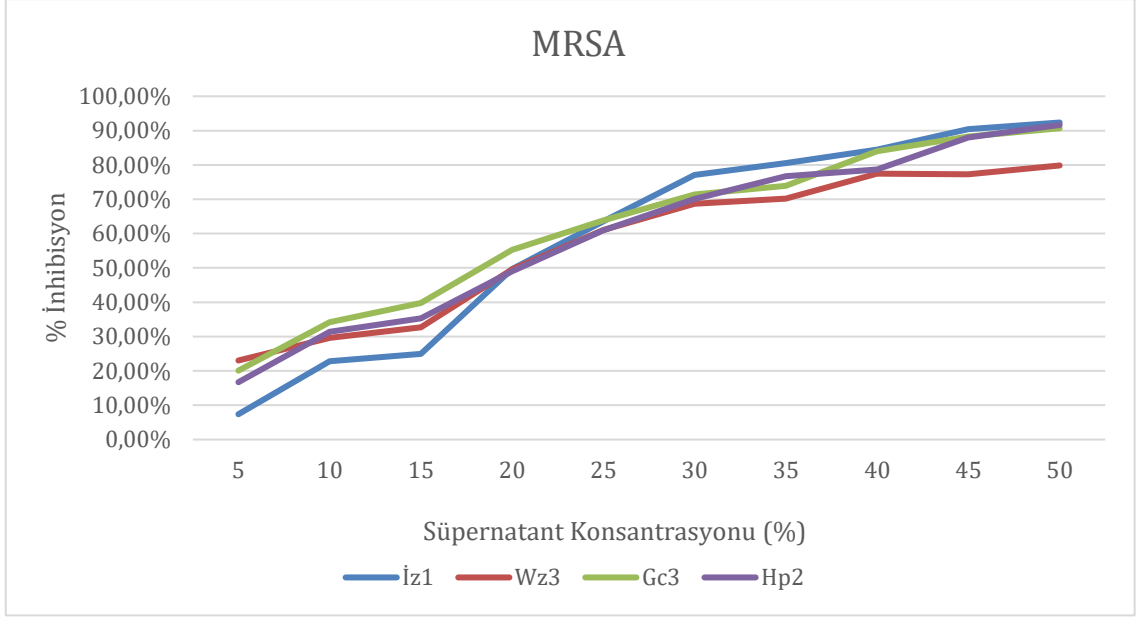
%40 LAB konsantrasyonu içeren karışımlara bakıldığında yine en yüksek inhibisyonu İz1 süpernatantının sağladığı görülmektedir (%84,86). En düşük inhibisyonu ise Wz3 süpernatantı sağlamıştır. İz1, Wz3 ve Gc3 süpernatantlarının inhibisyon yüzdeleri arasındaki fark, %30 süpernatant konsantrasyonu içeren karışıma göre artmıştır.



Şekil 4.15. LAB Süpernatantlarının %50 Konsantrasyonda EHEC Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

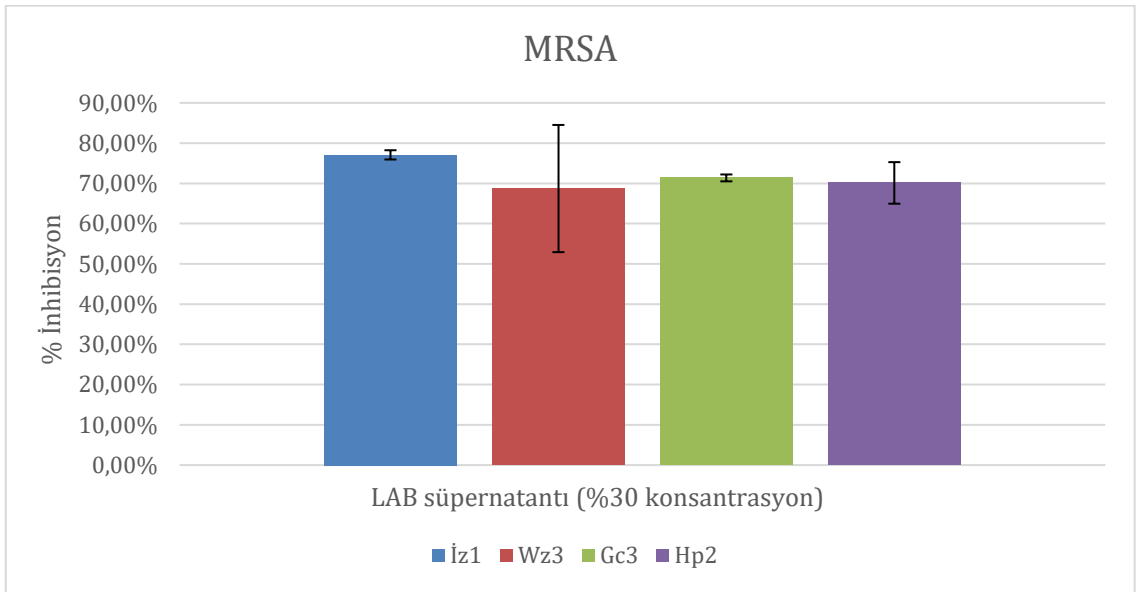
Maksimum süpernatant konsantrasyonu olan %50 süpernatant konsantrasyonu içeren karışımlara bakıldığında EHEC'e karşı en yüksek inhibisyon yüzdesi yine İz1 süpernatantında gözlenmiştir (%89,43). En düşük inhibisyon ise yine Wz3 süpernatantı tarafından sağlanmıştır (%78,26). Gc3 ve Hp2'nin inhibisyon yüzdeleri ise birbiriyle aynı bulunmuştur (%84).

LAB'lerinin süpernatantlarının MRSA üzerindeki inhibisyon etkisi Şekil 4.16.'da gösterilmiştir.



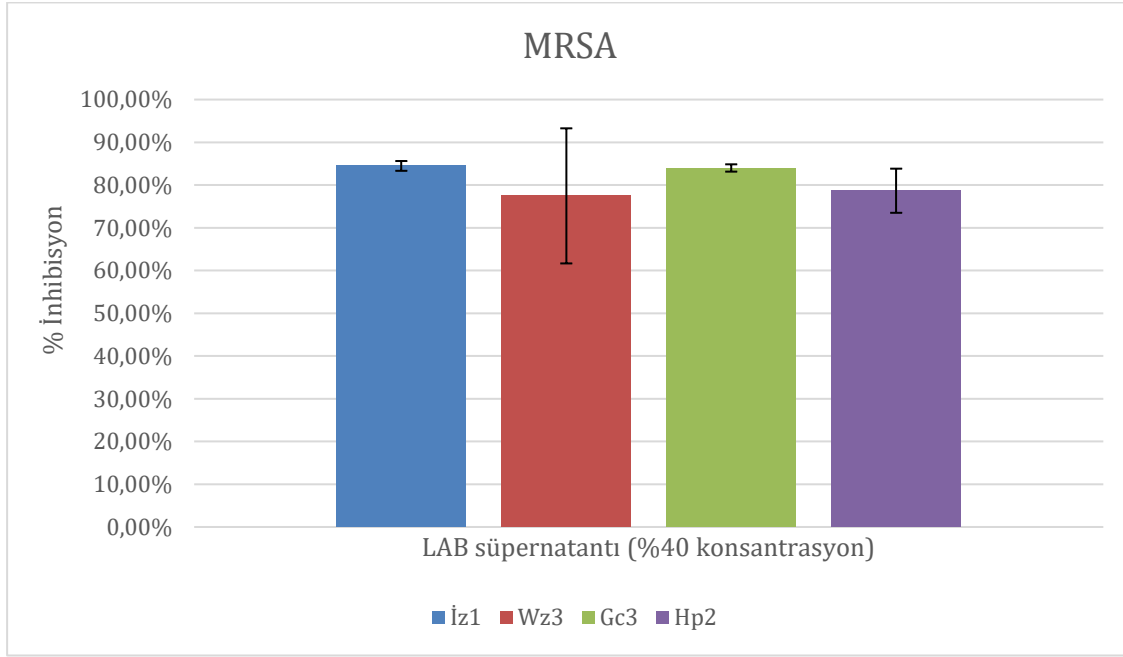
Şekil 4.16. LAB Süpernatantlarının MRSA Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

Süpernatantların MRSA üzerine uyguladıkları inhibisyon etkisi, %25 ve üzeri konsantrasyonda süpernatant içeren karışımlarda %50'nin üzerinde bulunmuştur. Süpernatantların hepsinin inhibisyon miktarları bütün konsantrasyonlar göz önüne alındığında birbiriyle neredeyse paralel şekilde ilerlemiştir. %50 ve üzeri inhibisyonun sağlandığı konsantrasyonların detaylı gösterimi Şekil 4.17., Şekil 4.18. ve Şekil 4.19.'da mevcuttur.



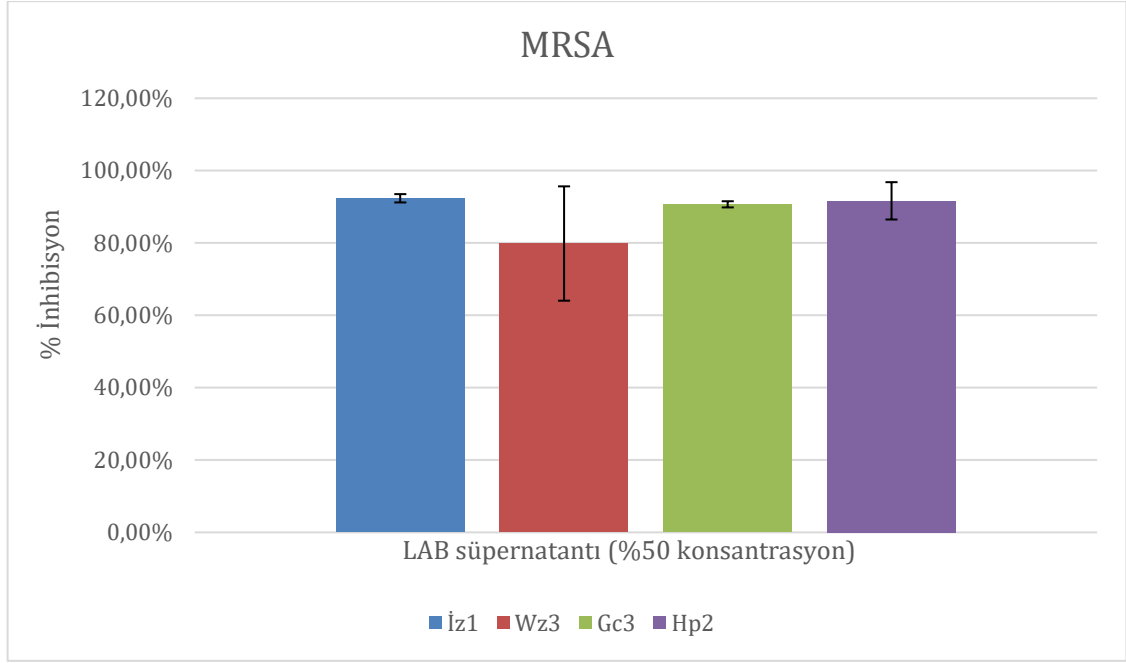
Şekil 4.17. LAB Süpernatantlarının %30 Konsantrasyonda MRSA Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

%30 süpernatant konsantrasyonunda MRSA'ya karşı en yüksek inhibisyon İz1 süpernatantı tarafından (%77,08), en düşük inhibisyon ise Wz3 süpernatantı tarafından sağlanmıştır (%68,71). En düşük inhibisyonu Wz3 süpernatantı sağlamış olmasına rağmen Wz3, Gc3 ve Hp2'nin patojenler üzerindeki inhibisyon oranları açısından büyük bir farklılık bulunmamaktadır.



Şekil 4.18. LAB Süpernatantlarının %40 Konsantrasyonda MRSA Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

%40 süpernatant konsantrasyonunda en yüksek inhibisyonu yine İz1 süpernatantı sağlamıştır (%84,48). İz1 ve Gc3 süpernatantları neredeyse aynı miktarda inhibisyon sağlamışlardır. Bununla birlikte MRSA patojenine karşı en düşük inhibisyonu ise yine Wz3 süpernatantı sağlamıştır (%77,47).



Şekil 4.19. LAB Süpernatantlarının %50 Konsantrasyonda MRSA Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

%50 süpernatant konsantrasyonunda en yüksek inhibisyon yine İz1 süpernatantı tarafından (%92,36), en düşük inhibisyon ise yine Wz3 tarafından sağlanmıştır (%79,85). İz1, Wz3 ve Hp2 süpernatantlarının inhibisyon oranları birbirine çok yakın bulunmuştur.

Laktobasil suşlarının patojen bakterilere karşı gösterdiği inhibisyon etkileri değerlendirildiğinde İz1 süpernatantının 4 farklı patojene karşı %50 konsantrasyonda gösterdiği en yüksek inhibe ettiği patojen MRSA (%92,36), en düşük inhibe ettiği patojen ise *Salmonella* Enteritidis (%82,60) olmuştur.

Wz3 süpernatantının %50 süpernatant konsantrasyonundaki inhibisyon yüzdelerine bakıldığında en yüksek inhibisyonun *Listeria monocytogenes* (%86,16) ve *Salmonella* Enteritidis'e karşı gözlemlendiği (%86,18), en düşük inhibisyonun ise EHEC'e karşı gözlemlendiği görülmüştür (%78,26).

Gc3 süpernatantının %50 süpernatant konsantrasyon değerleri göz önüne alındığında en yüksek inhibisyonun MRSA patojenine karşı gözlemlendiği, en düşük inhibisyonun ise *Salmonella* Enteritidis'e karşı gözlemlendiği saptanmıştır.

Hp2 süpernatantının %50 konsantrasyonda 4 farklı patojene karşı gösterdiği inhibisyon yüzdeleri değerlendirildiğinde en yüksek inhibisyonun MRSA patojenine karşı (%91,65), en düşük inhibisyonun ise *Salmonella* Enteritidis'e karşı gözlemlendiği (%76,96) bulgusuna ulaşılmıştır.

Laktobasil suşlarının dört patojene karşı gösterdiği en yüksek inhibisyon etkileri göz önüne alındığında *L. monocytogenes* Gc3 suşu tarafından (%88,36), *S. Enteritidis* Wz3 suşu tarafından (%86,18), MRSA ve EHEC ise İz1 suşu tarafından (%92,36 ve %89,43) inhibe edilmiştir.

Arena ve arkadaşlarının (2016) yaptıkları çalışmada yer alan *L. plantarum* suşlarının süpernatantları %25 konsantrasyonda kullanıldıklarında *E. coli* O157:H7'yi %70 ile %93 arasında, *L. monocytogenes*'i %90 oranında, *S. Enteritidis*'i %96 oranında ve *S. aureus* suşlarından birini ise %99 oranında inhibe edebildiği sonucuna ulaşılmıştır. Yapmış olduğumuz tez araştırmasında laktobasil süpernatantları %25 konsantrasyonda kullanıldıklarında en fazla %65 oranında inhibisyon sağlarken, %50 konsantrasyonda kullanıldıklarında inhibisyon yüzdeleri sırasıyla *E. coli* O157:H7 için %78 ile %90 arasında, *L. monocytogenes* için %84 ile %88 arasında, *S. Enteritidis* için %77 ile %86 arasında, MRSA için ise %80 ile %92 arasında değişiklik göstermektedir. Arena ve arkadaşlarının %25 süpernatant konsantrasyonu kullandıklarında elde ettikleri inhibisyon yüzdelerinin benzerlerine, bu tez çalışmasında %50 süpernatant konsantrasyonu kullanıldığında ulaşılabilmiştir. Bunun sebebi patojen bakterilerin virülans farklılıkları, genetik farklılıklar, LAB süpernatantlarının ürettiği etken maddelerin yoğunluğu ve patojen bakterilerin bu metabolitlere karşı olan duyarlılığı olarak düşünülebilir.

4.2. Katalaz Testi

Laktik asit bakterilerine uygulanan katalaz testinin sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Katalaz Testi Sonuçları

LAB	Katalaz Testi Sonucu
İz1	Negatif
Wz3	Negatif
Gc3	Negatif
Hp2	Negatif

Laktik asit bakterileri, hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştüren katalaz enzimini üretmemektedirler (İsmail, Yulvizar ve Mazhitov, 2019). Sonuçlara bakıldığında tez çalışmasında kullanılan laktik asit bakterilerinin tümü katalaz-negatif olup, katalaz enzimi içermemektedirler. Bu özellik, laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri açısından doğrulayıcı bir sonuçtur.

4.3. İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel değerlendirme, iki paralelli ve iki tekerrürlü agar spot deneyinin sonuçları kullanılarak, IBM SPSS 23.0 programı ile gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıp dağılmadığının anlaşılabilmesi adına öncelikle normallik testi uygulanmıştır. Normallik testi sonuçları Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Normallik Testi Sonuçları

Patojen	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	İstatistik	Serbestlik Derecesi	Anlamlılık	İstatistik	Serbestlik Derecesi	Anlamlılık
P1	0,175	16	0,200	0,941	16	0,356
P2	0,167	16	0,200	0,945	16	0,414
P3	0,215	16	0,046	0,854	16	0,016
P4	0,137	16	0,200	0,969	16	0,830

Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testlerinin sonucuna göre veriler arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p < 0,05$). Normallik testinde yer alan çarpıklık ve basıklık değerleri Çizelge 4.3.'te gösterilmiştir. Çarpıklık ve basıklık değerleri, Tabachnick ve Fidell'e göre $-1,5/+1,5$ arasında yer alıyor ise, George ve Mallery'e göre $-2/+2$ arasında yer alıyor ise verilerin eşit dağıldığı sonucuna varılmaktadır (George ve Mallery, 2010; Tabachnick ve Fidell, 2013). Bu referanslar göz önünde bulundurulduğunda çalışmada yer alan veriler eşit dağılmaktadır.

Çizelge 4.3. Normallik Testi Çarpıklık ve Basıklık Değerleri

Patojen	Çarpıklık	Std. Hata	Basıklık	Std. Hata
P1	-0,4	0,564	-1,138	1,091
P2	-0,21	0,564	-0,795	1,091
P3	-0,594	0,564	-0,735	1,091
P4	0,076	0,564	-0,553	1,091

İki farklı bağımsız değişken içeren verilerin değerlendirilebilmesi adına yapılan iki yönlü ANOVA sonucunda gruplar arası varyanslar ile grup içi varyanslar arasında anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p < 0,05$).

İki yönlü ANOVA testinde varyanslar arasında anlamlı bir farklılık bulunması nedeniyle tek yönlü varyans analizleri yapılmıştır. Laktik asit bakterilerinin zon üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde varyanslar arasında bir anlamlı farklılık saptanmış olup, ANOVA sonucuna göre ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Patojenlerin zon üzerindeki etkisini anlayabilmek adına tek yönlü varyans analizi yapılmıştır. Bu analizin sonucunda varyanslar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. ANOVA sonucuna göre ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmaktadır. Farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu anlayabilmek adına Post Hoc testlerinden biri olan Tukey Testi gerçekleştirilmiştir. Tukey testi sonucu Çizelge 4.4.'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Tukey Testi Analiz Sonucu

Patojen	N	1	2	3
P3	16	0,9062		
P4	16		1,1438	
P1	16		1,2813	1,2813
P2	16			1,3625

Patojen bakterilerin zonlar üzerindeki etkileşimini incelemek adına yapılan Tukey testi sonucu incelendiğinde P3 bakterisinin diğer üç patojenden, P2 bakterisinin ise P3 ve P4 patojenlerinden farklılaştığı görülmektedir. İstatistiksel değerlendirmelere göre P1 patojeni, P2 ve P4 patojenlerine yakın sonuçlar vermiştir. P3 patojeni ise inhibisyon zonları açısından diğer üç patojenden farklılık göstermektedir.

5. YORUM

Bu tez çalışmasında daha önce ekşi hamurlardan izole edilmiş olan ve ticari olmayan *L. brevis* ve *L. plantarum* bakterilerinin, ileride ticari olarak kullanılabilmesi ve kültür koleksiyonuna kazandırılması amacıyla antimikrobiyel etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir

Araştırma kapsamında 3 adet *Lactobacillus plantarum* (İz1, Wz3, Hp2) ve 1 adet *Lactobacillus brevis* (Gc3) izolatu kullanılmıştır. Bu izolatların antimikrobiyel etkileri incelenmiştir. Bu bağlamda çeşitli antimikrobiyel testler ve katalaz testi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel özellikleri, çeşitli gıda patojenlerine (*Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*) karşı gösterdikleri antimikrobiyel etki ile ölçülmüştür.

Agar spot deneyinin sonucunda laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etkisi değerlendirildiğinde en yüksek etki İz1 suşu tarafından metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'a, Wz3 ve Hp2 suşları tarafından *Listeria monocytogenes*'e, Gc3 suşu tarafından *Salmonella* Enteritidis'e karşı gösterilmiştir. Çalışılan dört laktik asit bakterisinin de en az antimikrobiyel etki gösterdiği gıda kaynaklı patojen bakteri ise *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC) olmuştur. Deney sonuçlarına göre bu çalışmada kullanılan dört LAB suşu da, Arena ve arkadaşları (2016) ve tarafından yapılan sınıflandırmaya göre, 5 mm'nin üzerinde zon büyüklüğüne sahip olduklarından dolayı çok güçlü inhibitörler olarak tanımlanmıştır.

Kuyucuk difüzyon deneyi, LAB'lerinin hücresiz süpernatantlarının antimikrobiyel etki kapasiteleri konusunda ön izlenim elde edebilmek amacı ile uygulanmıştır (Arena ve ark., 2016; Erdoğan ve Bostancı, 2020). Kuyucuk difüzyon deneyinin sonucunda laktik asit bakterilerinin ürettiği metabolitlerin etkileri, agar spot deneyine göre daha düşük olmakla birlikte, yine en yüksek etki bütün LAB suşları tarafından *L. monocytogenes*'e karşı gösterilmiştir. *S. Enteritidis*, EHEC ve MRSA'ya karşı ise dört LAB süpernatantı tarafından da daha düşük bulunmuş olup, zon çapları 1 mm ile 3,25 mm arasında değişiklik göstermiştir.

Broth mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan laktik asit bakterilerinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK), patojenlere karşı gösterdikleri inhibisyon etkisi ile test edilmiştir. LAB süpernatantlarının %50 ve üzerinde inhibisyon gösterdiği konsantrasyonlar MİK değeri olarak seçilmiştir (Arena ve ark., 2016). Seçilen tüm laktik asit bakteri süpernatantlarının, \geq 30-%35 oranında kullanıldığında patojen gelişimini %50 ve üzerinde inhibe ettikleri gözlenmiştir. Süpernatantlar patojenlere karşı %50 konsantrasyonda kullanıldığında ise İz1, Hp2 ve Gc3'ün en yüksek inhibisyon gösterdiği patojen MRSA (%92,36, %91,65 ve %90,69), Wz3'ün en yüksek inhibisyon gösterdiği patojen ise *S. Enteritidis* (%86,18) ve *L. monocytogenes* (%86,16) olmuştur.

Laktik asit bakterilerinin özelliklerinden birinin daha araştırılması amacıyla katalaz enzimi içerip içermedikleri katalaz testi ile saptanmıştır. Laktik asit bakterileri katalaz enzimine sahip değildirler. Test sonucunda 4 laktik asit bakterisinin de katalaz-negatif olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Deney, çalışmada kullanılan ve probiyotik olduğu düşünülen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etkileri açısından olumlu sonuçlanmıştır.

Bu çalışmada, ticari olmayan LAB suşlarının probiyotik özelliklerinden bazıları antimikrobiyel testler ile ortaya koyulmuştur. Yapılan testler sonucunda laktik asit bakterilerinin patojenler üzerine etkili olmasının yanı sıra, ürettikleri metabolitlerin de patojen bakteriler üzerinde etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Hücresiz süpernatantlar (CFS), özellikle *L. monocytogenes* gibi psikrotrofik bakterilerin gelişebildiği fakat laktik asit bakterilerinin gelişimi için uygun olmayan, soğuk koşullarda muhafaza edilen gıdalarda patojen bakterilerin gelişiminin engellenebilmesi için kullanılabilir (Arena ve ark., 2016). Çalışmanın sonucunda, LAB izolatlarının farklı deney düzeneklerinde *L. monocytogenes*, MRSA ve *S. Enteritidis* ve EHEC üzerinde farklı seviyelerde antimikrobiyel etki gösterdikleri, süpernatantların ise sıvı besiyeri ortamında, katı besiyeri ortamından daha yüksek inhibisyon sağlayabildikleri sonucuna ulaşılmıştır. Katalaz testlerinin sonucu ise laktik asit bakterilerinin taşınması gereken katalaz-negatif özelliğini doğrular niteliktedir.

LAB'lerinin gıda patojenleri üzerindeki etki mekanizması tam olarak netlik kazanmamıştır. Bununla birlikte, LAB'lerinin patojenler üzerindeki inhibisyon etkisinin

en önemli faktörünün ürettikleri asitler olduğu düşünülmektedir. Çeşitli araştırmacılar tarafından raporlanan antimikrobiyel etki mekanizmalarındaki farklılıklar, test edilen bakteri suşlarının gen ekspresyonu veya moleküler yapılarındaki çeşitliliğe bağlı olarak asit toleransı, hidrojen peroksit toleransı ve bakteriyosinlere karşı olan duyarlılıklarının farklı oluşu ile açıklanabilir (Gao ve ark., 2019).

Yapılan bu tez çalışmasının ışığında, daha sonraki çalışmalarda tez kapsamında kullanılmış olan, ticari olmayan laktik asit bakterilerinin diğer probiyotik özelliklerinin araştırılması, in vitro testlerin yanında in vivo testlerinin de gerçekleştirilmesi, ekşi hamur örneklerinden elde edilen bu suşların, gıda endüstrisinde ticari olarak kullanımı ve kültür koleksiyonuna kazandırılması hedeflenmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abushelaibi, A., AlMahdin, S., El-Tarabily, K., Shah, N.P., Ayyash, M., Characterization of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Camel Milk, 10:1382, **2016**.

Adeyemo S.M., Agun T.F., Ogunlusi E.D., Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from ‘Pupuru’: An African Fermented Staple against Food Borne-Pathogens, Journal of Molecular Biology and Biotechnology, Vol.3: No.1:5, **2018**.

Adley, C.C., Ryan, M.P., The Nature and Extent of Foodborne Disease, Antimicrobial Food Packaging, Chapter 1, Pages 1-9, **2016**.

Ameer, M.A., Wasey A., Salen P., Escherichia Coli (E Coli 0157 H7), StatPearls, Treasure Island, **2021**.

Anas, M., Ahmed, K., Mebrouk, K., Study of the Antimicrobial and Probiotic Effect of Lactobacillus Plantarum Isolated from Raw Goat’s Milk from the Region of Western Algeria, International Journal of Sciences: Basic and Applied Research, 13(1):18-27, **2014**.

Angelakis, E., Million, M., Henry, M., Raoult, D., Rapid and Accurate Bacterial Identification in Probiotics and Yoghurts by MALDI-TOF Mass Spectrometry, Journal of Food Science, 76(8):M568-72, **2011**.

Anonim a, Catalase Test, <https://learn.chm.msu.edu/vibl/content/catalase.html#:~:text=The%20catalase%20test%20is%20used,by%2Dproducts%20of%20oxygen%20metabolism.%20catalase%20test> (Erişim Tarihi: **10 Mayıs 2021**).

Anonim b, Staphylococcal Food Poisoning, <https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/staphylococcal.html> (Erişim Tarihi: **8 Haziran 2021**).

Anonim c, Foodborne Pathogens, <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/foodborne-pathogens>, (**Erişim Tarihi: 15 Temmuz 2021**).

Anonim d, Staph Food Poisoning, <https://www.uofmhealth.org/health-library/te6322spec> (**Erişim Tarihi: 17 Temmuz 2021**).

Anonim e, Campylobacter, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter> (**Erişim Tarihi: 5 Ağustos 2021**).

Arena, M.P., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G., Fiocco, D., Use of *Lactobacillus plantarum* Strains as a Bio-Control Strategy against Food-Borne Pathogenic Microorganisms, *Frontiers in Microbiology*, Volume 7, **2016**.

Arık, G., Doktora Tezi, Çeşitli Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması ve Biyofilm Oluşturma Yetenekleri İle Antibiyotik Dirençliliklerinin Araştırılması, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2018**.

Ayala D.I., Cook P.W., Franco J.G., Bugarel, M., Kottapalli, K.R., Loneragan G.H., Brashears, M.M., Nightingale K.K., A Systematic Approach to Identify and Characterize the Effectiveness and Safety of Novel Probiotic Strains to Control Foodborne Pathogens, *Frontiers in Microbiology*, 10:1108, **2019**.

Bagchi, T., Traditional Food & Modern Lifestyle: Impact of Probiotics, *The Indian Journal of Medical Research*, 140(3):333-335, **2014**.

Bajagai, Y.S., Klieve, A.V., Dart, P.J., Bryden, W.L., FAO, Probiotics in Animal Nutrition: Production, impact and regulation, **2016**.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K., Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, Volume 6, Issue 2, Pages 71-79, **2016**.

Bhargavi, B., Jamil, K., Floor, T., Bhawan, B., Road, M.G., Identification and Characterization of Probiotics from New Sources, International Journal of Science and Research, 3(6), **2014**.

Bilginer, H , Çetin, B., Probiyotikler ve Belirlenmelerinde Kullanılan in vitro Testler, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 50(3):312-325, **2019**.

Bintsis T., Foodborne pathogens. AIMS Microbiology, 29;3(3):529-563, **2017**.

Bintsis, T., Lactic acid bacteria: their applications in foods. Journal of Bacteriology & Mycology, Volume 6, Issue 2, Pages 89-93, **2018**.

Carr, F.J., Chill, D., Maida, N., The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. Critical Reviews in Microbiology, 28(4):281-370, **2002**.

Centers for Disease Control and Prevention, Bacterial Foodborne and Diarrheal Disease National Case Surveillance, Annual Report, Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention;2, **2005**.

Çetinkaya F., Elal Muş, T., Yararları ve Riskleriyle Enterokoklar, Uludağ University Journal of Research in Veterinary Medicine, 29(1):77-83, **2010**.

Davis, W.W., Stout, T.R., Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay, Applied Microbiology, Pages 659-665, Volume 22, No:4, **1971**.

Demirpek, U., Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri, Klimik Dergisi, 49:107-112, **2012**.

Diñçer, E., Kıvanç, M., Karaca, H., Biyokoruyucu Olarak Laktik Asit Bakterileri, The Journal of Food, 35(1):1-8, **2010**.

Dinev, T., Beev, G., Denev, S., Dermendzhieva, D., Tzanova, M., Valkova, E., Antimicrobial Activity of *Lactobacillus acidophilus* Against Pathogenic and Food Spoilage Microorganisms: A Review, Agricultural Science and Technology 2017 9(1): 3-9, **2017**.

Dogan, M., Probiyotik Bakterilerin Gastrointestinal Sistemdeki Etki Mekanizması, 7(1):20-27, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, **2012**.

Doğan, M., Doktora Tezi, Bazı Gıdalardan İzole Edilen Bakterilerin Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması, İstanbul Aydın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2017**.

Doğan, M., Probiyotik Bakterilerin Etki Mekanizması, ABMYO Dergisi, 21:98-102, **2011**.

Erdoğan, S.F., Bostancı, B., Kefir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antimikrobiyel Etkinliklerinin Değerlendirilmesi, The Journal of Food, 45(1):72-80, **2020**.

Evren, M., Albayram, C., Apan, M., Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu, Laktik Asit Bakterilerinin Oluşturduğu Antimikrobiyel Maddeler, 977-980, **2006**.

Fang, F., Xu, J., Li, Q., Xia, X., Du, G., Characterization of a *Lactobacillus brevis* strain with potential oral probiotic properties, BMC Microbiology 18, 221, **2018**.

Fijan S., Antimicrobial Effect of Probiotics against Common Pathogens, Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health, Venketeshwer Rao and Leticia G. Rao, IntechOpen, **2016**.

Finstad, S., O'Bryan, C.A., Marcy, J.A., Crandall P.G., Ricke, S.C., *Salmonella* and Broiler Processing in the United States: Relationship to Foodborne Salmonellosis, Food Research International, Vol. 45, No. 2, Pages 789-794, **2012**.

Friedman, G., Probiotics, Prebiotics, and Commensal Bacteria: Perspectives and Clinical Applications in Gastroenterology, Gastroenterology Clinics of North America, 34(3):13-16, **2005**.

Gao, Z., Daliri, E.B., Wang, J., Liu, D., Chen, S., Ye, X., Ding, T., Inhibitory Effect of Lactic Acid Bacteria on Foodborne Pathogens: A Review, *Journal of Food Protection*, 82(3):441-453, **2019**.

George, D., Mallery, P., *SPSS for Windows Step by Step: A Simple Guide and Reference*, 10th Edition, **2010**.

Gnanamani, A., Hariharan, P., and Paul Satyaseela, M., *Staphylococcus aureus: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach*, *Frontiers in Staphylococcus aureus*, IntechOpen, **2017**.

Goel, A., Halami P.M., Tamang, J.P., *Genome Analysis of Lactobacillus plantarum Isolated From Some Indian Fermented Foods for Bacteriocin Production and Probiotic Marker Genes*, *Frontiers in Microbiology*, Volume 11, Pages 40, **2020**.

Gönülateş, N., *Doktora Tezi, Kefirin İnsanlar Üzerindeki İmmünomodülatör Etkilerinin Araştırılması*, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, **2008**.

Gülgör, G., Özçelik, F., *Bakteriyosin Üreten Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Amaçlı Kullanımı*, *Akademik Gıda*, 12(1):63-68, **2014**.

Gülseren, G., *Yüksek Lisans Tezi, Boza Kaynaklı Laktik Asit Bakterilerinin Laktik Asit Miktarlarının ve Staphylococcus aureus Üzerine Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi*, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2012**.

Havenaar, R., Huis int Veld, J.H.J., *Probiotics: A General View*, In: Wood B.J.B. (eds) *The Lactic Acid Bacteria Volume 1*, 151-170, **1992**.

Horváth, Gy., Bencsik, T., Acs, K., Kocsis, B., *Sensitivity of ESBL-Producing Gram-Negative Bacteria to Essential Oils, Plant Extracts, and Their Isolated Compounds*, Chapter 12, Pages 239-269, **2016**.

Hossain, M.I., Sadekuzzaman, M., Ha, S., probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review, *Food Research International*, 100:63-73, **2017**.

İsmail, Y.S., Yulvizar, C., Mazhitov, B., Characterization of Lactic Acid Bacteria from Local Cow's Milk Kefir, 130(1), **2018**.

Jamshidi A., Zeinali, T., Significance and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in Poultry Products, *International Journal of Food Science*, Volume 2019, (3):1-7, **2019**.

Jorgensen, J.H., Turnidge, J.D., Susceptibility Test Methods: Dilution and disk diffusion methods, Eleventh Edition American Society of Microbiology, 1253-1273, **2015**.

Karpiński, T.M., Szkaradkiewicz, A.K., Bacteriocins, *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, Pages 312-319, **2016**.

Kator, H., Rhodes, M., Detection, enumeration and identification of environmental microorganisms of public health significance, School of Marine Science, College of William and Marry, Virginia VA 23062, USA, *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, Elsevier, Academic Press, Pages 113-144, **2003**.

Kechagia M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, N., Fakiri, E.M., Health Benefits of Probiotics: A Review, *ISRN Nutrition*, **2013**.

Kıvanç, M., Yılmaz, M., Çakır, E., Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Boza, and Their Microbial Activity Against Several Reporter Strains, *Turkish Journal of Biology*, 35, 313-324, **2011**.

Kim, T.H., Raiz, A., Unni, A.D., Murhekar, S., Donose, B.C., Floetenmeyer, M., Cock, I.E., Brown, C.L., Combating Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacteria Strains with Tetracycline-Conjugated Carbon Nanoparticles. *Advanced Biosystems*, Sep;4(9), **2020**.

Knodler, L.A., Elfenbein, J.R., *Salmonella enterica*, Trends in Microbiology, Volume 28, Number 1, 964-965, **2019**.

Liao, S.F., Nyachoti, M., Using Probiotics to Improve Swine Gut Health and Nutrient Utilization, Animal Nutrition, Volume 3, Issue 4, Pages 331-343, **2017**.

Liu, Y.W., Liong, M.T. Tsai, Y.C., New perspectives of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic: The gut-heart-brain axis, Journal of Microbiology, Volume 56, Number 9, Pages 601-613, **2018**.

Mejlholm, O., Dalgaard, P., Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and psychrotolerant lactic acid bacteria in processed seafood and mayonnaise-based seafood salads, Food Microbiology, 46:1-14, **2015**.

Mozzi, F., Lactic Acid Bacteria, Encyclopedia of Food and Health, **2016**.

Noskova, S., Sukhikh, S., Babich, O., Bulgakova, O., Determination of Minimum Inhibitory Concentrations of Lactic Acid Bacteria and Other Antagonist Microorganisms, E3S We Conferences 291, **2021**.

Oh, Deog-Hwan., Marshall, D.L., Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*, International Journal of Food Microbiology, Volume 20, Issue 4, Pages 239-246, **1993**.

Østergaard, N.B., Eklöv, A., Dalgaard, P., Modelling the Effect of Lactic Acid Bacteria from Starter- and Aroma Culture on Growth of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese, International Journal of Food Microbiology, 1;188:15-25, **2014**.

Prabhurajeshwar, C., Chandrakanth, K., Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic *Lactobacilli* strains isolated from commercial yoghurt, Clinical Nutrition Experimental, Volume 23, Pages 97-115, **2019**.

Presti, I., D’Orazio, G., Labra, M., La Ferla B., Mezzasalma, V., Bizzaro, G., Giardina, S., Michelotti, A., Tursi, F., Vassallo, M., Di Gennaro, P., Evaluation of the probiotic properties of new Lactobacillus and Bifidobacterium strains and their in vitro effect, Applied Microbiology and Biotechnology, 99, 5613–5626, **2015**.

Quigley, T., Monitoring the Growth of *E. coli* with Light Scattering Using the Synergy 4 Multi-Mode Microplate Reader with Hybrid Technology, BioTek, **2008**.

Quinto, E.J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., Girbes, T., Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. Food and Nutrition Sciences, 5, 1765-1775, **2014**.

Ricke, S.C., Perspectives on the Use of Organic Acids and Short Chain Fatty Acids as Antimicrobials, Poultry Science, 82(4):632-639, **2003**.

Rishi, P., Preet Singh, A., Garg, N., Rishi, M., Evaluation of Nisin– β -lactam Antibiotics Against Clinical Strains of *Salmonella enterica* serovar Typhi, The Journal of Antibiotics 67, 807–811, **2014**.

Rodriguez-Tudela, J.L. Barchiesi, F., Bille, J., Chryssanthou, E., Cuenca-Estrella, M., Denning, D., Donnelly, J.P., Dupont, B., Fegeler, W., Moore, C., Richardson, M., Verweij, P.E., Method For The Determination Of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) By Broth Dilution Of Fermentative Yeasts, EUCAST Discussion Document E.Dis., 7.1, Volume 9, Issue 8, Pages 1-8, **2002**.

Ruiz Rodríguez, L.G., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E.M., Mozzi, F., Diversity and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated From Wild Fruits and Flowers Present in Northern Argentina, Frontiers in Microbiology, Volume 10, **2019**.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, Tiina, Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties, Journal of Biotechnology, Volume 84, Issue 3, Pages 197-215, **2000**.

Sağlam, D., Şeker, E., Gıda Kaynaklı Bakteriye Patojenler, Kocatepe Veteriner Dergisi, 9(2): 105-113, **2016**.

Sha, Y., Wang, L., Liu, M., Jiang, K., Xin, F., Wang, B., Effects of lactic acid bacteria and the corresponding supernatant on the survival, growth performance, immune response and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*, Aquaculture, Volume 452, Pages 28-36, **2016**.

Song, D-F., Zhu, M-Y., Gu, Q., Purification and Characterization of Plantaricin ZJ5, a New Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5, **2014**.

Spangler, J.R., Dean, S.N., Leary, D.H., Walper, S.A., Response of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 to the Gram-Negative Pathogen-Associated Quorum Sensing Molecule N-3-Oxododecanoyl Homoserine Lactone, Frontiers in Microbiology, 5;10:715, **2019**.

Tabachnick, B.G., Fidell, L.S., Using Multivariate Statistics, Seventh Edition, 2013.

Tamang, J.P., Watanabe, K., Holzapfel, W.H., Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages, Frontiers in Microbiology, 7:377, **2016**.

Teixeria, P., Lactobacillus: Lactobacillus brevis, Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), **2014**.

Tezer, G., Doktora Tezi, Doğal Ekşi Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması İle Bu Bakterilerin İmmunojenik Aktivitelerinin Ve Bazı Probiyotik Özelliklerinin Saptanması, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **2019**.

Timmerman, H.M., Koning, C.J.M., Mulder, L., Rombouts, F.M., Beynen, A.C., Monostrain, Multistain and Multispecies Probiotics - A Comparison of Functionality and Efficacy, International Journal of Food Microbiology, 15;96(3):219-33, **2004**.

Tosun, H., Gönül Aktuğ, Ş., Escherichia Coli O157: H7 Prevalence and Control in Foods, The Journal of Food, 31(5):267-273, **2006**.

Utama, C.S., Zuprizal, Hanim, C., Wihandoyo, Probiotic Testing of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum* from Fermented Cabbage Waste Juice, *Pakistan Journal of Nutrition*, 17:323-328, **2018**.

Vazgeçer, B., Temiz, A., *Salmonella İzolasyonu ve Tanımlanması*, *OrLan Online Mikrobiyoloji Dergisi*, Cilt: 03, Sayı:4, 1-27, **2005**.

Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., Drider, D., Benefits and Inputs from Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins as Alternatives to Antibiotic Growth Promoters During Food-Animal Production, *Frontiers in Microbiology*, 10:57, **2019**.

Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., Antimicrobial Activity of Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Cheeses and Yogurts. *AMB Express*, 10;2(1):48, **2012**.

Yangılar, F., Use of Probiotic Microorganisms for Bio-Protective Aims, *Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering*, 20(1):119, **2015**.

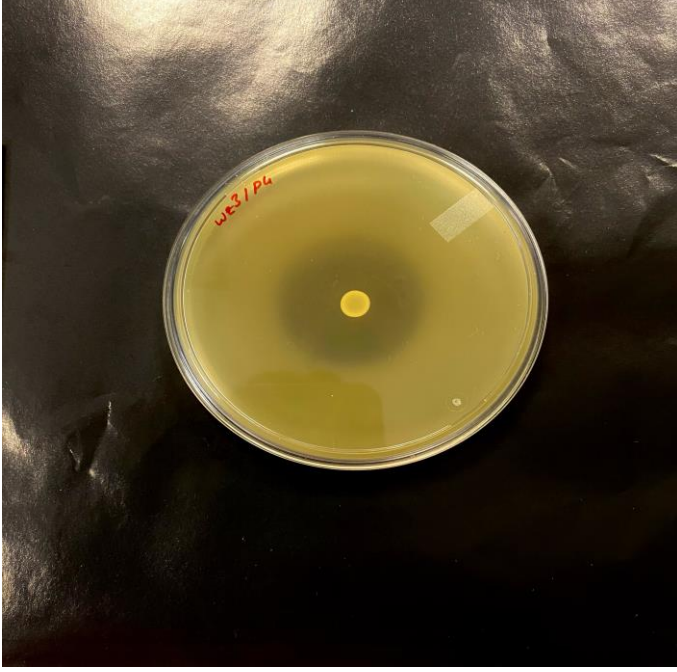
Zeinali, T., Jamshidi, A., Bassami, M., Rad, M., Isolation and Identification of *Listeria* spp. In Chicken Carcasses Marketed in Northeast of Iran, *International Food Research Journal*, 24(2):881-887, **2017**.

EKLER

EK 1 – Tez Kapsamında Kullanılan Besiyerleri ve Kullanım Amaçları

Kullanılan Besiyeri/Kimyasal Adı	Kullanım Amacı
MRS Broth (De Man Rogosa and Sharpe Broth, Merck-Millipore)	Laktik asit bakterilerinin gelişimi
MRS Agar (De Man Rogosa and Sharpe Broth, Merck-Millipore)	Laktik asit bakterilerinin izolasyonu
Fizyolojik Tuzlu Su (% 0.85)	Dilüsyon Hazırlama
NA (Nutrient Agar, Merck-Millipore)	Patojen bakterilerin sayımı, izolasyonu ve antimikrobiyel özelliklerin saptanması
TSB (Tryptic Soy Broth, Merck-Millipore)	Patojen bakterilerin gelişimi
Yumuşak Agarlı TSB (Merck-Millipore)	Antimikrobiyel özelliklerin saptanması
Gliserollü TSB	
Gliserollü MRS Broth	Patojen bakterilerin stoklanması LAB'lerinin stoklanması

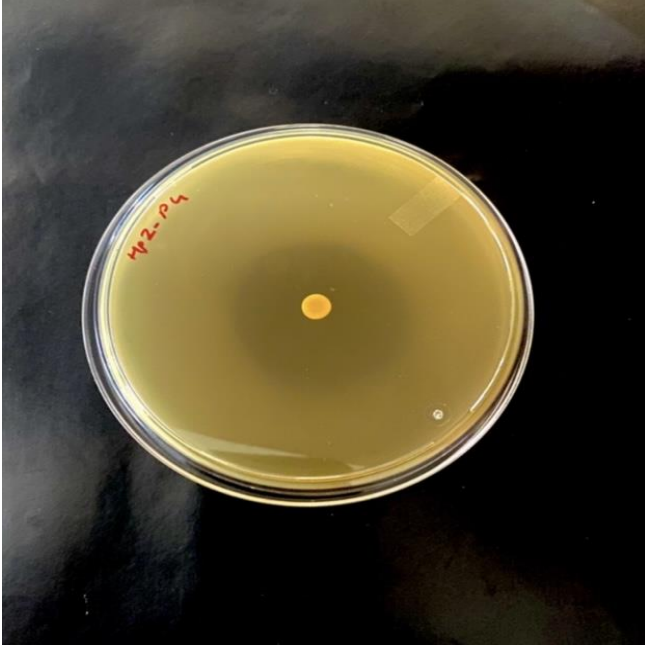
EK 2 – Agar Spot Deneyinin Sonuçları ile İlgili Görseller



Wz3 suşunun P4 patojenine karşı antimikrobiyel etkisi



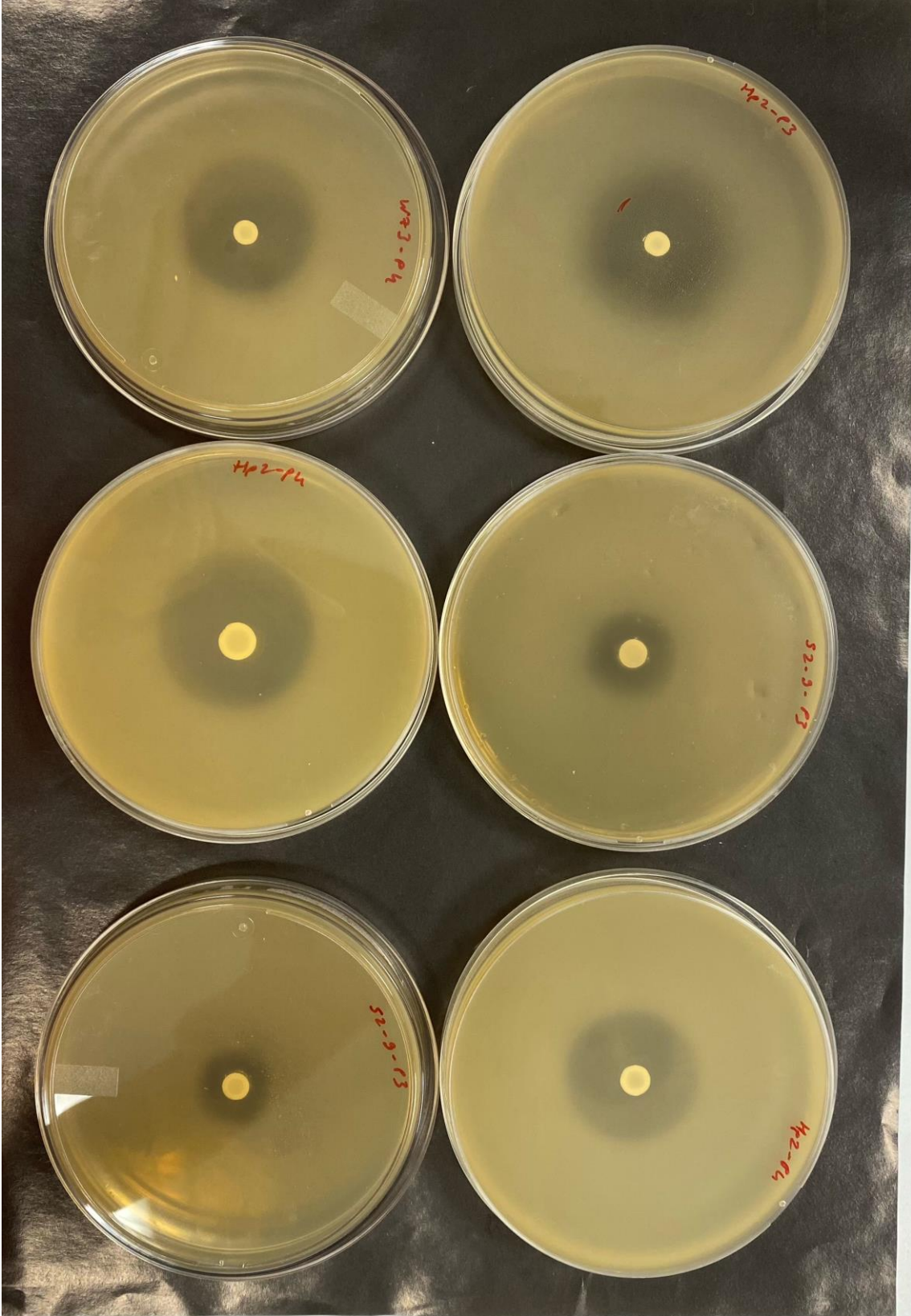
Wz3 suşunun P2 patojenine karşı antimikrobiyel etkisi



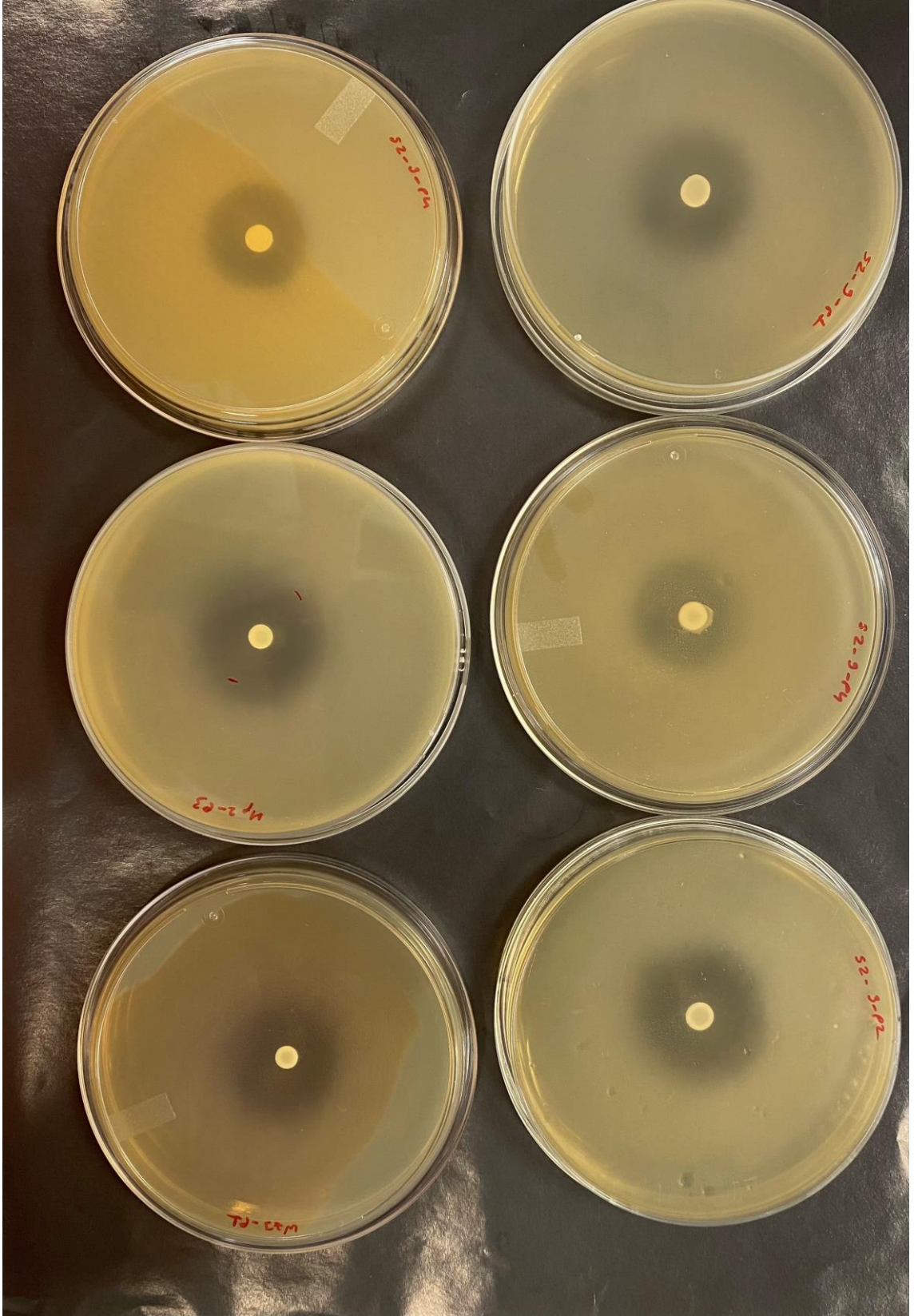
Hp2 suşunun P4 patojenine karşı antimikrobiyel etkisi



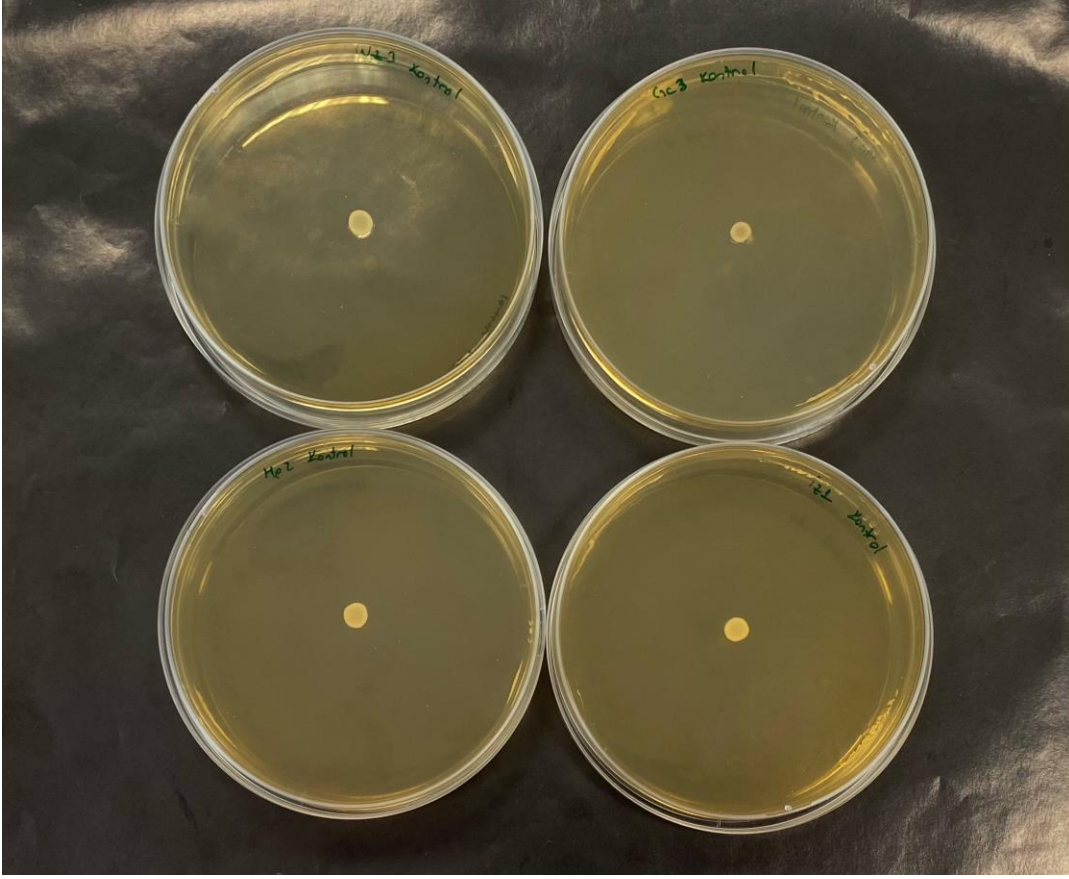
Hp2 suşunun P2 patojenine karşı antimikrobiyel etkisi



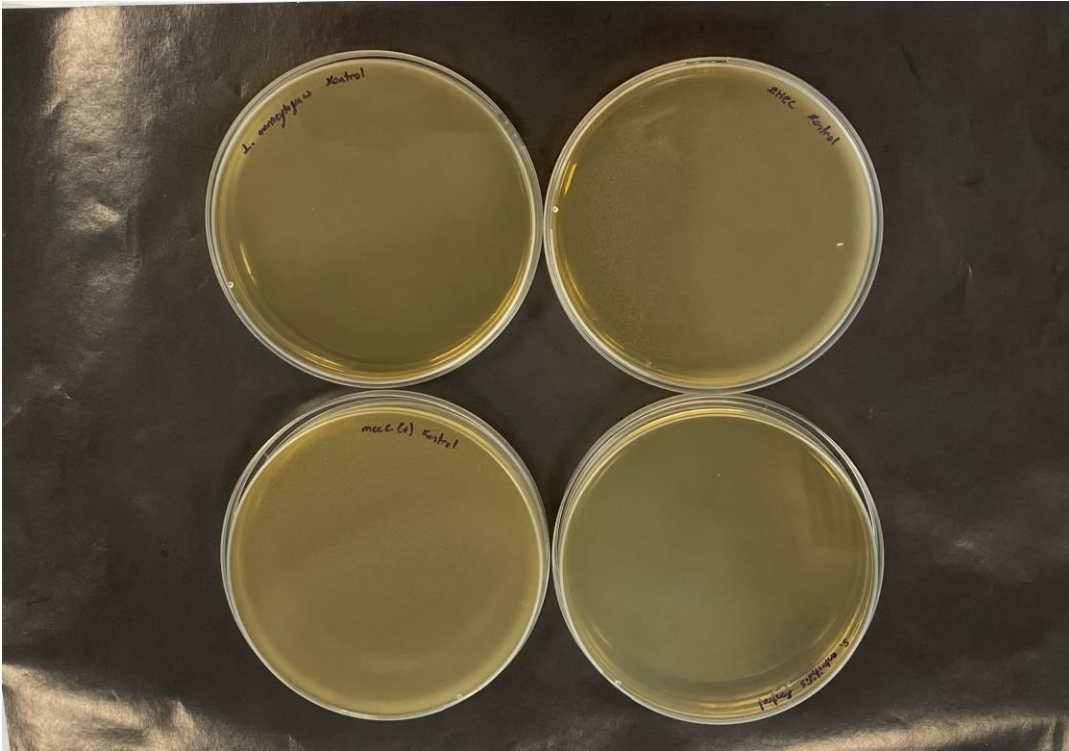
Agar Spot Deneyinin Grselleri



Agar Spot Deneyinin Görselleri

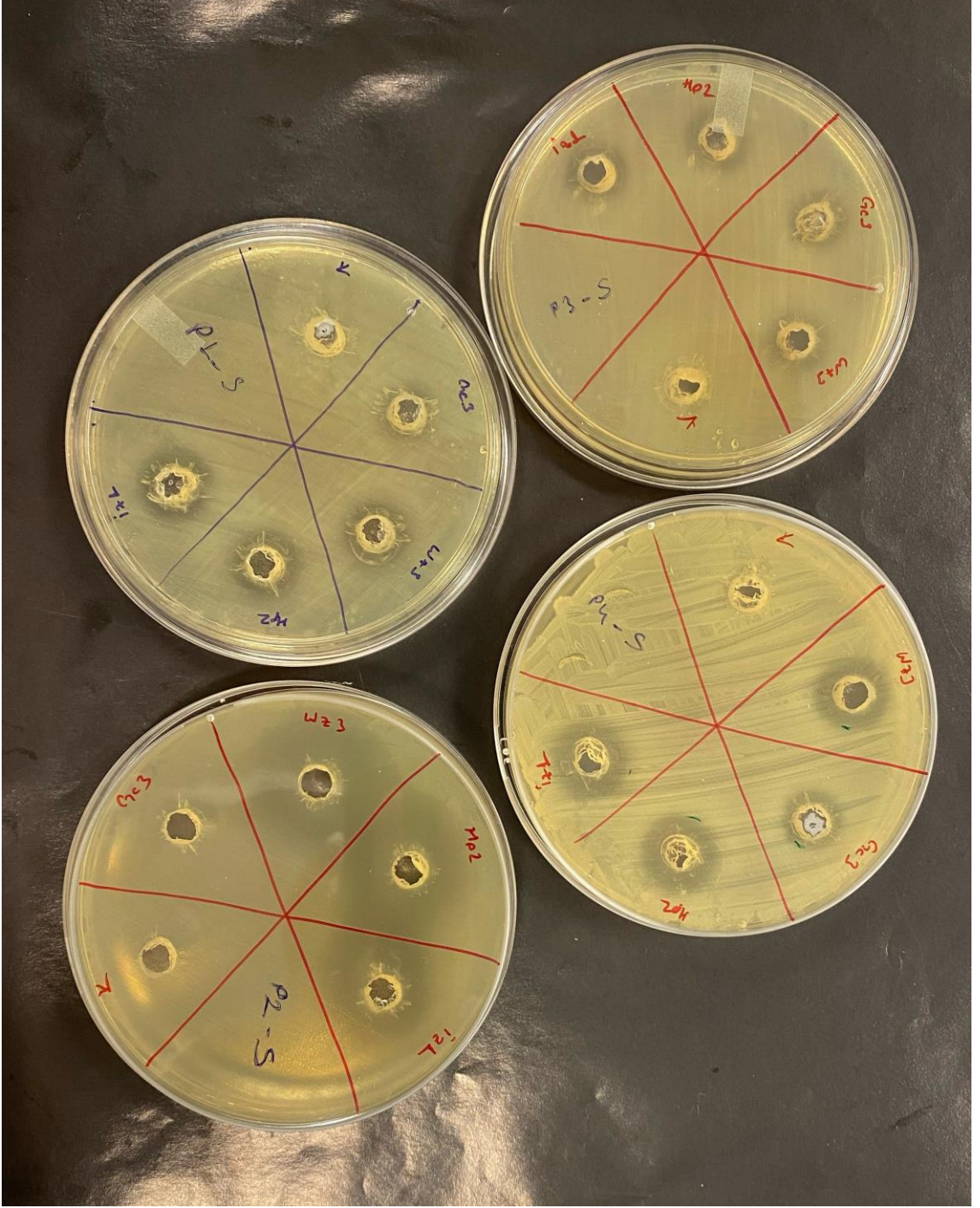


LAB'lerine ait kontrol örnekleri



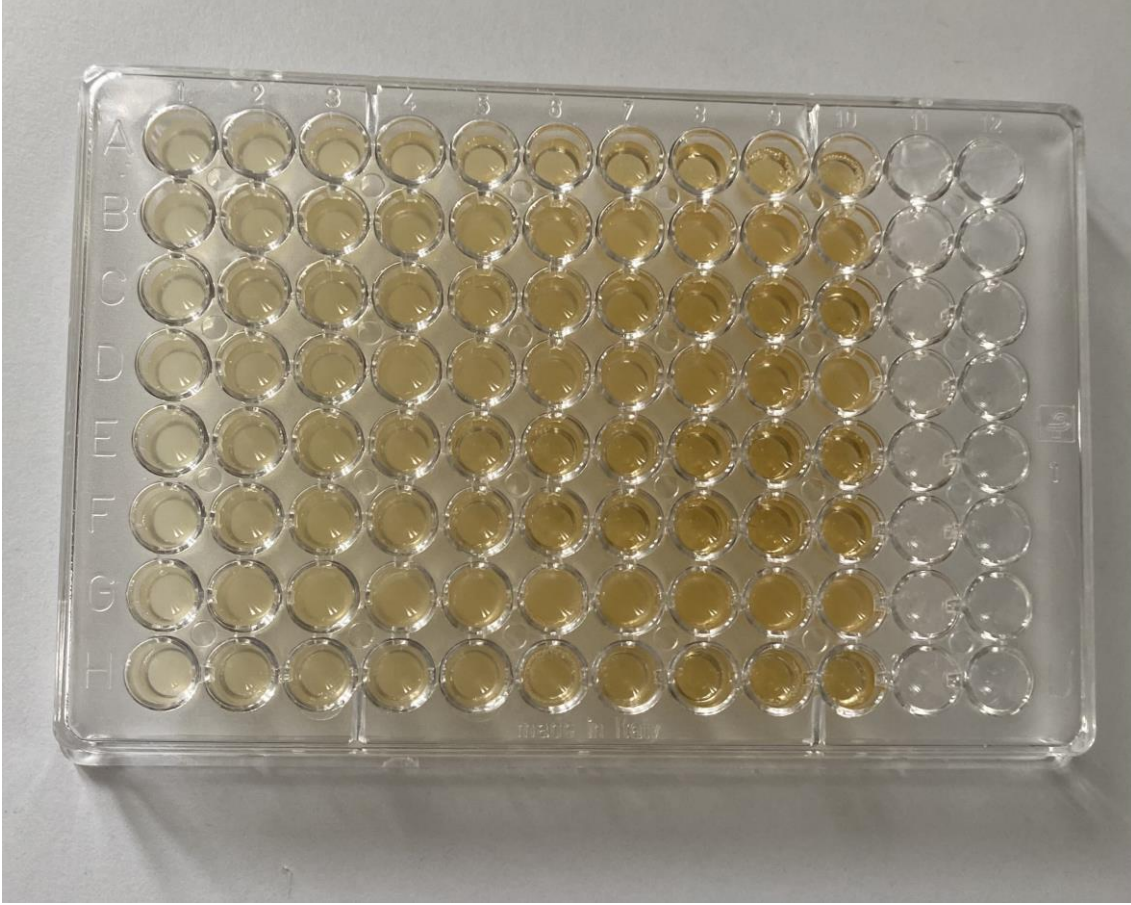
Patojen bakterilere ait kontrol örnekleri

EK 3 – Kuyucuk Difüzyon Deneyinin Sonuçları ile İlgili Görseller

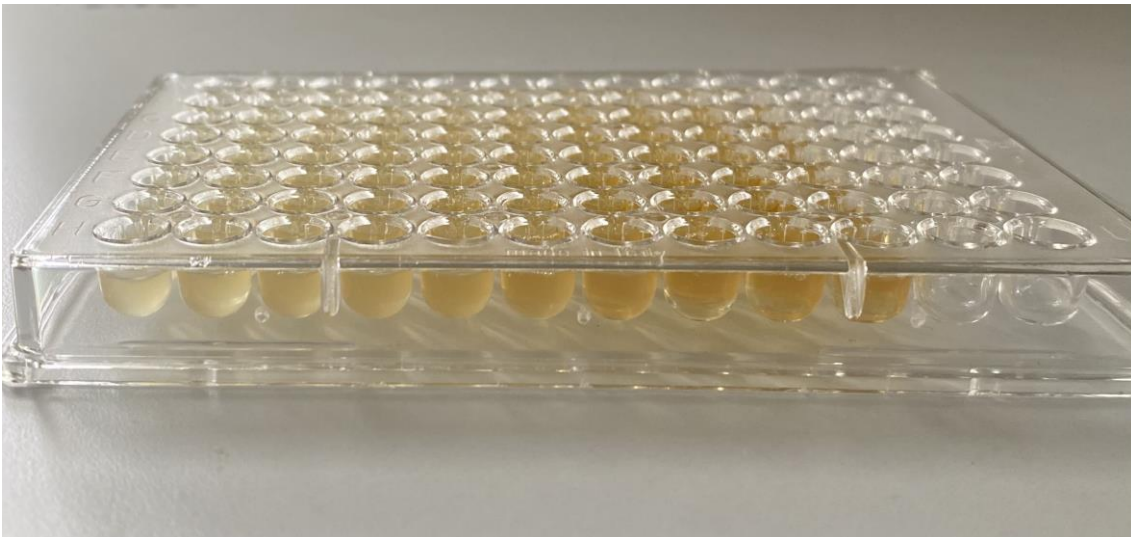


LAB Süpernatantlarının Patojen Bakteriler Üzerindeki Etkisi

EK 4 – Broth Mikrodilüsyon Deneyine Ait Görseller



Broth mikrodilüsyon deneyinin gerçekleştirildiği mikrolakanın görseli



Broth mikrodilüsyon deneyinin gerçekleştirildiği mikrolakanın görseli