

**FARKLI UNLARDAN ÜRETİLEN 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 SOURDOUGHS  
PRODUCED FROM DIFFERENT WHEAT FLOURS**

**GİZEM YALGIN**

**PROF. DR. SAİT AYKUT AYTAÇ**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
olarak hazırlanmıştır.

2022

## ÖZET

# FARKLI UNLARDAN ÜRETİLEN EKŞİ HAMURLARDAN İZOLE EDİLEN *LACTOBACİLLUS BREVIS* VE *LACTOBACİLLUS PLANTARUM*'UN ANTİMİKROBİYEL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

**Gizem YALGIN**

**Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ  
Nisan 2022, 63 sayfa**

Bu tez çalışmasında, bazı gıda kaynaklı patojenlere karşı laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. “Doğal Ekşi Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması ile Bazı Probiyotik Özelliklerinin Saptanması” adlı Dr. Gizem KEZER’e ait tez kapsamında ülkemizin farklı bölgelerinden toplanmış un örneklerinden üretilen hamurlardan izole edilen ve doğal suş olduğu düşünülen 1 adet *Lactobacillus brevis* (*Levilactobacillus brevis*) (Gc3) ve 3 adet *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*)’ un (İz1, Hp2,Wz3) gıda kaynaklı patojenlerden *Escherichia coli* O104:H4, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* ve Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) üzerine etkileri incelenmiştir. Sayıları bilinen ( $\sim 10^7$  kob/mL) patojen bakteriler laktik asit bakterileriyle birlikte 37 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra antimikrobiyel aktivitelerini belirlemek amacıyla agar spot yöntemi, agar kuyucuk difüzyon yöntemi ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Agar spot yönteminde *Bacillus cereus*’a karşı en etkili LAB (laktik asit bakterisi) 1,6 cm zon ile *L. plantarum* (Hp2), *Escherichia coli* O104:H4 ve MRSA’ya karşı en etkili LAB’lar sırasıyla

1,075 cm ve 1,125 cm zon ölçümü ile *L. plantarum* (Wz3) LAB olarak belirlenmiştir. *Y. enterocolitica*'ya karşı agar spot yönteminde zon oluşumu gözlenmemiştir. Agar kuyucuk difüzyon yönteminde MRSA ve *Y. enterocolitica*'ya karşı en etkili bakteri süpernatantlarının oluşturduğu zon ölçümleri sırasıyla 0,525 cm ve 0,8625 cm ile *L. plantarum* (Hp2) LAB'a aittir. *E. coli* O104:H4'e karşı en etkili LAB süpernatantının oluşturduğu zon ölçümü 0,375 cm ile *L. plantarum* (İz1) ve *Bacillus cereus*'a karşı en etkili LAB süpernatantının oluşturduğu zon 0,625 cm ile *L. plantarum* (Wz3) LAB olarak belirlenmiştir. Sıvı mikrodilüsyon yönteminden elde edilen verilere göre *Bacillus cereus*'a karşı en etkili süpernatant *L. plantarum* (İz1) LAB'a ait olup tüm derişimlerinin inhibisyon yüzdelerinin ortalaması %81 olarak belirlenmiştir. *E. coli* O104:H4'e karşı en etkili süpernatant *L. plantarum* (Hp2) LAB'a ait olup tüm derişimlerinin inhibisyon yüzdelerinin ortalaması %80 olarak belirlenmiştir. MRSA'ya karşı en etkili süpernatant *L. plantarum* (İz1) LAB'a ait olup tüm derişimlerinin inhibisyon yüzdelerinin ortalaması %85 olarak belirlenmiştir. *Y. enterocolitica*'ya karşı en etkili süpernatant ise *L. plantarum* (Hp2) LAB'a ait olup tüm derişimlerinin inhibisyon yüzdelerinin ortalaması %77 olarak belirlenmiştir. *L. brevis* (Gc3)'in agar spot, agar kuyucuk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon deneylerinden elde edilen sonuçları diğer laktik asit bakterilerinden elde edilen sonuçlara kıyasla daha düşük olduğu için antimikrobiyel etkisinin daha az olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak incelenen tüm LAB izolatlarının gıda kaynaklı patojen bakterilere (*Yersinia enterocolitica*, MRSA, *Bacillus cereus* ve *Escherichia coli* O104:H4 karşı etkili olduğu ve bu anlamda potansiyel ticari kullanıma sahip olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Lactiplantibacillus plantarum* (*Lactobacillus plantarum*), *Levilactobacillus brevis* (*Lactobacillus brevis*), agar spot yöntemi, agar kuyucuk difüzyon yöntemi, sıvı mikrodilüsyon yöntemi, antimikrobiyel etki, gıda kaynaklı patojenlerin inhibisyonu

## ABSTRACT

# INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL EFFECTS OF *LACTOBACILLUS BREVIS* AND *LACTOBACILLUS* *PLANTARUM* ISOLATED FROM SOURDOUGHS PRODUCED FROM DIFFERENT WHEAT FLOURS

Gizem YALGIN

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ

April 2022, 63 pages

This study aimed to investigate the antimicrobial effect of lactic acid bacteria against some foodborne pathogens. Within the scope of Dr. Gizem KEZER's thesis as "Isolation and identification of lactic acid bacteria from natural sourdoughs and determination of some probiotic characteristics," 1 of *Lactobacillus brevis* (*Levilactobacillus brevis*) (Gc3) and 3 of *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) (İz1, Hp2, Wz3) were investigated on foodborne pathogens *Escherichia coli* O104:H4, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Agar spot method, agar well diffusion method, and broth microdilution method were used to determine the antimicrobial activities of pathogenic bacteria with known counts ( $\sim 10^7$  cfu/mL) after incubation with lactic acid bacteria for 24 hours at 37°C. In the agar spot method, the most effective LAB (lactic acid bacteria) against *Bacillus cereus* with a 1.6 cm zone, the most effective LABs against *L. plantarum* (Hp2), *Escherichia coli* O104:H4 and MRSA were 1.075 cm and 1.125 cm, respectively. *L. plantarum* (Wz3) was determined as LAB by zone measurement. No zone formation was observed in the agar spot method against *Y. enterocolitica*. In the agar, well diffusion method, the zone measurements formed by the bacterial supernatants most

effective against MRSA and *Y. enterocolitica* belong to *L. plantarum* (Hp2) LAB with 0.525 cm and 0.8625 cm, respectively. The zone formed by the LAB supernatant that was most effective against *E. coli* O104:H4 was determined as 0.375 cm, with *L. plantarum* (Iz1) and *L. plantarum* (Wz3) LAB with 0.625 cm, the zone formed by the most effective LAB supernatant against *Bacillus cereus*. According to the data obtained from the broth microdilution method, the most effective supernatant against *Bacillus cereus* was *L. plantarum* (Iz1) LAB, and the average inhibition percentages of all concentrations was determined as 81%. The most effective supernatant against *E. coli* O104:H4 belonged to *L. plantarum* (Hp2) LAB, and the average inhibition percentages of all concentrations were determined as 80%. The most effective supernatant against MRSA belonged to *L. plantarum* (Iz1) LAB, and the average inhibition percentages of all concentrations was determined as 85%. The most effective supernatant against *Y. enterocolitica* belonged to *L. plantarum* (Hp2) LAB, and the average inhibition percentages of all concentrations was determined as 77%. Since the results obtained from agar spot, agar well diffusion, and broth microdilution methods of *L. brevis* (Gc3) were lower than the results obtained from other lactic acid bacteria, and it was concluded that the antimicrobial effect was more minor. As a result, it is thought that all LAB isolates examined are effective against foodborne pathogenic bacteria (*Yersinia enterocolitica*, MRSA, *Bacillus cereus*, and *Escherichia coli* O104:H4) and may have potential commercial use in this sense.

**Keywords:** *Lactiplantibacillus plantarum* (*Lactobacillus plantarum*), *Levilactobacillus brevis* (*Lactobacillus brevis*), agar spot method, agar well diffusion method, broth microdilution method, antimicrobial effect, foodborne pathogens inhibition

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her türlü desteğiyle bana yardım eden ve yönlendiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ'a,

Yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca katkı ve yönlendirmelerinden dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Dilek SİVRİ ÖZAY ve Doç. Dr. Serap SÜZÜK YILDIZ'a,

Yüksek lisans sürecim boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili Gizem KEZER, Şilan TÜLLÜK, Volkan KAHRAMAN ve Özlem ALPAY'a,

Hayatım boyunca her zaman ve her koşulda yanımda olan beni desteleyen, sevgisini ve bana olan inancını hissettiren babam Sadi YALGIN'a ve manevi ablam Sevilay Candan AKSAÇ'a,

Sonsuz Teşekkürler,

Gizem YALGIN

Nisan 2022, Ankara

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Laktik Asit Bakterileri.....	3
2.1.1. Bazı Önemli Laktik Asit Bakterileri (LAB).....	4
2.1.1.1. <i>Bifidobacterium</i> spp.....	4
2.1.1.2. <i>Lactobacillus</i> spp. ....	5
2.1.1.2.1. <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ( <i>Lactobacillus plantarum</i> ).....	6
2.1.1.2.2. <i>Levilactobacillus brevis</i> ( <i>Lactobacillus brevis</i> ) .....	6
2.1.1.3. <i>Pediococcus</i> spp.....	7
2.1.1.4. <i>Enterococcus</i> spp. ....	7
2.1.1.5. <i>Leuconostoc</i> spp.....	8
2.1.1.6. <i>Streptococcus</i> spp. ....	8
2.1.1.7. <i>Lactococcus</i> spp.....	8
2.1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Etkisi.....	9
2.1.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Ürettiği Bazı Metabolitler.....	9
2.1.2.1.1. Organik asitler .....	9
2.1.2.1.1.1. Laktik Asit ( $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$ ) .....	10
2.1.2.1.1.2. Asetik Asit ( $\text{CH}_3\text{-COOH}$ ).....	11

2.1.2.1.2. Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	11
2.1.2.1.3. Karbondioksit (CO <sub>2</sub> ) .....	12
2.1.2.1.4. Aroma Bileşenleri .....	12
2.1.2.1.4.1. Diasetil (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ).....	12
2.1.2.1.4.2. Asetaldehit (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) .....	12
2.1.2.1.5. Yağ Asitleri .....	12
2.1.2.1.6. Bakteriyosin .....	13
2.1.2.1.7. Reuterin (HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CHO) .....	15
2.2. Gıda Kaynaklı Patojen Bakteriler .....	15
2.2.1. <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	16
2.2.2. Metisiline-dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ( <i>mecA</i> ).....	17
2.2.3. <i>Escherichia coli</i> O104:H4 .....	18
2.2.4. <i>Bacillus cereus</i> .....	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM .....	21
3.1. Materyal .....	21
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar .....	21
3.1.1.1. Laktik Asit Bakterileri .....	21
3.1.1.2. Gıda Kaynaklı Patojenler .....	21
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri.....	22
3.1.3. Kullanılan Cihazlar .....	22
3.1.3.1. Elisa Plate Okuyucu .....	22
3.2. Yöntem .....	23
3.2.1. Agar Spot Yöntemi .....	23
3.2.2. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi .....	24
3.2.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi .....	26
3.2.4. İstatistiksel Analiz .....	28
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA .....	29



4.1. Sonuçlar.....	29
4.1.1. Agar Spot Yöntemi Sonuçları .....	29
4.1.2. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi Sonuçları .....	34
4.1.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi Sonuçları.....	39
5. YORUM .....	54
6. KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	63

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. İz1 kodlu LAB'ın <i>Bacillus cereus</i> ' a karşı oluşturduğu zon .....	30
Şekil 4.2. Hp2 kodlu LAB'ın MRSA'ya karşı oluşturduğu zon.....	30
Şekil 4.3. Gc3 kodlu LAB'ın <i>E.coli</i> O104:H4'e karşı oluşturduğu zon.....	31
Şekil 4.4. Wz3 kodlu LAB'ın MRSA' ya karşı oluşturduğu zon .....	31
Şekil 4.5. Agar Spot Yöntemi Kullanılarak Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Zonların Yarıçapları Sütun Grafiği .....	33
Şekil 4.6. LAB'ın MRSA'ya karşı oluşturduğu zon.....	35
Şekil 4.7. LAB'ın <i>Bacillus cereus</i> 'a karşı oluşturduğu zon .....	35
Şekil 4.8. LAB'ın <i>Y. enterocolitica</i> 'ya karşı oluşturduğu zon.....	36
Şekil 4.9. LAB'ın <i>E. coli</i> O104:H4'e karşı oluşturduğu zon.....	36
Şekil 4.10. Agar Kuyucuk Difüzyonu Yöntemi Kullanılarak Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Zonların Yarıçapları Sütun Grafiği .....	38
Şekil 4.11. Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların %30, %35, %40, %45 ve %50 Derişimlerinde <i>Y. enterocolitica</i> 'yı İnhibe Etme Yüzdeleri .....	42
Şekil 4.12. Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların %30, %35, %40, %45 ve %50 Derişimlerinde <i>Bacillus cereus</i> 'u İnhibe Etme Yüzdeleri .....	45
Şekil 4.13. Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların %30, %35, %40, %45 ve %50 Derişimlerinde <i>E. coli</i> O104:H4'ü İnhibe Etme Yüzdeleri .....	48
Şekil 4.14. Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların %30, %35, %40, %45 ve %50 Derişimlerinde Metisiline-dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> 'u (MRSA) İnhibe Etme Yüzdeleri .....	52

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Laktik Asit Bakterilerine Ait Bilgiler.....	21
Çizelge 4.1. Agar Spot Yöntemi için Kullanılan Bakterilere Ait Sayım Sonuçları .....	32
Çizelge 4.2. Agar Spot Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Zon Yarıçapları (cm).....	32
Çizelge 4.3. Agar Spot Yöntemi Kullanılarak LAB'den Elde Edilen Zonların Tek yönlü Varyans Analizi Sonuçları .....	33
Çizelge 4.4. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi için Kullanılan Bakterilere Ait Sayım Sonuçları.....	37
Çizelge 4.5. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Zon Yarıçapları (cm) .....	37
Çizelge 4.6. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak LAB'den Elde Edilen Zonların Tek yönlü Varyans Analizi Sonuçları .....	38
Çizelge 4.7. <i>Yersinia enterocolitica</i> ve Laktik Asit Bakterileri Mikrobiyel Sayım Sonuçları .....	39
Çizelge 4.8. Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların <i>Yersinia enterocolitica</i> için Tek yönlü Varyans Analizi Sonuçları .....	40
Çizelge 4.9. Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların <i>Yersinia enterocolitica</i> için Ortalamaları .....	41
Çizelge 4.10. <i>Bacillus cereus</i> ve Laktik Asit Bakterileri Mikrobiyel Sayım Sonuçları.....	43
Çizelge 4.11. Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların <i>Bacillus Cereus</i> için Tek yönlü Varyans Analizi Sonuçları .....	43
Çizelge 4.12. Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların <i>Bacillus cereus</i> için Ortalamaları.....	44
Çizelge 4.13. <i>Escherichia coli</i> O104:H4 ve Laktik Asit Bakterileri Mikrobiyel Sayım Sonuçları.....	46
Çizelge 4.14. Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların <i>Escherichia coli</i> O104:H4 için Tek yönlü Varyans Analizi Sonuçları .....	46
Çizelge 4.15. Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların <i>Escherichia coli</i> O104:H4 için Ortalamaları.....	47
Çizelge 4.16. Metisiline-dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ve Laktik Asit Bakterileri Mikrobiyel Sayım Sonuçları .....	49

Çizelge 4.17. Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların Metisiline-dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) için Tek yönlü Varyans Analizi Sonuçları	49
Çizelge 4.18. Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların Metisiline-dirençli <i>S. aureus</i> (MRSA) için Ortalamaları.....	50
Çizelge 4.19. Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantlar için T- testi Sonuçları .....	51

## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
µL	Mikrolitre
µm	Mikro Metre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
cm	Santimetre
nm	Nanometre
<i>p</i>	Önem düzeyi
kob	Koloni Oluşturan Birim
rpm	Dakikada Devir Sayısı
v/v	Hacim/Hacim
nm	Nanometre

### Kısaltmalar

LAB	Laktik Asit Bakterileri
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
GRAS	Genel Olarak Güvenli
MRSA	Metisiline-dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
RNA	Ribonükleik Asit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit

NADH	Nikotinamin Adenin Dinükleotit
<i>SCCmec</i>	Stafilokok Kaset Kromozom <i>mec</i>
STEC	Shiga-benzeri Toksin Üreten <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i>
EAEC	Enteroagregatif <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvaziv <i>Escherichia coli</i>
DAEC	Diffuz Adeziv <i>Escherichia coli</i>
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
NaCl	Sodyum Klorür
G	Guanin
C	Sitozin
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HUS	Hemolitik Üremik Sendrom
NCTC	Ulusal Tür Kültürü Koleksiyonu
MRS	De Man Rogosa and Sharpe
TSB	Tryptic Soy Broth
TSA	Tryptic Soy Agar
$a_w$	Su aktivitesi



# 1. GİRİŞ

Günümüzde tüketicilerin doğal ve koruyucu madde içermeyen gıdalara yönelimi gün geçtikçe artmaktadır. Depolama şartlarına bağlı olarak bu gıdaların patojenleri barındırma riski daha yüksektir. Bu duruma fermentatif mikroorganizmaların ürettiği antimikrobiyel metabolitlerin kullanılması çözüm olarak gösterilebilmektedir [1]. Mikroorganizmaların ürettiği metabolitlerin kullanımına olan ilginin temel sebebi gıdaların bozulmasının önlenmesi ve raf ömrünün uzatılmasıdır [2].

Gıda fermantasyonunda kullanılan laktik asit bakterileri, Lactobacillaceae familyasının içerisinde yer almaktadır [3]. Bunlar; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Symbiobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium* ve *Enterococcus*'tur. *Lactobacillus* spp. en fazla türe sahip olan cinstir. Karbonhidrat bakımından zengin ortamlarda bu cinse ait türleri bulmak mümkündür [4]. Laktik asit bakterileri (LAB), fakültatif heterofermentatif, zorunlu heterofermentatif ve zorunlu homofermentatif olarak 3 sınıfa ayrılmıştır. Homofermentatif laktik asit bakterileri ana ürün olarak laktik asit üretirken, heterofermentatif laktik asit bakterileri laktik asitten farklı olarak asetik asit, etanol, mannitol ve cinse bağlı olarak başka metabolitler de üretebilmektedirler [5, 6]. Laktik asit bakterilerinin laktik fermantasyon sırasında ürettikleri bakteriyosinler, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve organik asitler bu bakterilerin antimikrobiyel aktivitesini belirlemektedir [7].

Laktik asit bakterilerinin bazı metabolik özellikleri gıda ürünlerinin tat, koku, yapısına ve besin değerine ciddi derecede katkı sağlamaktadır. Güvenli olarak kabul edilen ve GRAS listesinde bulunan laktik asit bakterileri, gıdaların muhafazası için endüstriyel açıdan önem taşımaktadır [3, 8]. LAB, ürettikleri organik asitler sayesinde pH'ı düşürebilmekte ve böylece gıdaların bozulmasına yol açan bakterilerin gelişimini engelleyebilmektedir [9].

Gıda, birçok patojenin gelişimi için uygun ortam sağlamaktadır. Gıda kaynaklı hastalıkların salgına dönüşmesinin temel sebepleri arasında antimikrobiyel dirence sahip patojenlerin artması yer almaktadır. Antimikrobiyel direnç, hastalığın iyileşme süresini uzatabileceği gibi



ölüm oranlarını da ciddi şekilde etkileyebilir [10, 11]. *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* ve *Vibrio* spp. gıda kaynaklı patojen bakterilere örnek olarak verilebilir. Belli bir sayıda gelişim göstermiş LAB, ürettikleri metabolitlerin antimikrobiyel etkisi sayesinde patojen bakterilerin gelişimini engelleyebilmektedir. Antimikrobiyel bileşiğin seviyesi patojen bakterilerin inhibisyonu için önem taşımaktadır. Laktik asit bakterilerinin bazı gıda kaynaklı patojenleri (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* vb.) inhibe etme özelliği birçok çalışmada belirtilmiştir [12].

Bu çalışmada, Dr. Gizem KEZER'in “Doğal Ekşi Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması ile Bazı Probiyotik Özelliklerinin Saptanması” adlı tez çalışmasından izole edilmiş ve doğal suş olduğu düşünülen laktik asit bakterilerinin gıda kaynaklı bazı patojenlerin içerisinde yer alan *Bacillus cereus*, Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O104:H4 üzerindeki antimikrobiyel etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB) Gram-pozitif, genellikle sporsuz, katalaz ve oksidaz negatiftirler. Şeker fermantasyonu sonucunda ana ürün olarak laktik asit üretirler [13, 14]. Aside karşı toleranslı olan LAB sitokromlardan yoksundurlar [14, 15].

Heterojen bir türü temsil eden laktik asit bakteri türleri Lactobacillales takımındadır. Lactobacillales takımı Lactocillaceae, Carnobacteraceae, Streptococcaceae, Aerococcaceae, Enterococcaceae ve Leuconostocaceae olmak üzere altı aileden oluşmaktadır [16]. Aynı zamanda LAB iki ayrı şube olan Firmicutes ve Actinobacteria'da yer alır. Firmicutes şubesi *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella*, *Alloiococcus*, *Symbiobacterium*, *Vagococcus* cinslerini içerir [17]. LAB hem çubuk hem de kok şeklindeki bakterileri içerir. Kok şeklindeki LAB'a; *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, çubuk şeklindeki LAB'a ise; *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ve *Carnobacterium* örnek verilebilir [13]. *Lactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactococcus* cinsleri adenin ve guanin içeriği düşük olan önemli LAB cinsleri arasında yer alır [18].

Laktik asit fermantasyonu, homolaktik fermantasyon ve heterolaktik fermantasyon olmak üzere iki ana şekilde tanımlanabilmektedir. LAB tarafından fosfoketolaz yolu (fosfoglukonat yolu) kullanılarak heterolaktik fermantasyon gerçekleştirilmektedir [19]. Heterofermentatif laktik asit bakterilerinin heksozları parçalamasıyla birlikte birçok farklı metabolit oluşabilmektedir [20]. Oluşan bu metabolitler ile laktik asit kombinasyon halindedir [19, 20]. Homolaktik fermantasyon Emden-Meyerhof-Parnas yolu (glükoliz) ile gerçekleşmektedir ve son ürün laktik asittir [19].

Gıda endüstrisinde önemli bir yere sahip olan laktik asit bakterilerinin kullanımı uzun bir geçmişe dayanmaktadır [21]. Mikroorganizma kültürleri, uygun şekilde seçilerek ham maddeye eklenebilir. Eklenen bu mikroorganizmalar fermantasyona yön verebilir. Gıda fermantasyonu alanında eklenen bu mikroorganizmalara starter kültür adı verilir [22]. Starter

kültür olarak LAB kullanılmasının ana sebepleri arasında koruma sağlama, tat, koku ve yapı geliştirme/iyileştirme yer almaktadır [22]. Bu süreçte şeker fermantasyonu, yağ ve proteinlerin parçalanması olarak üç temel yolda yer alırlar. Karbonhidrat fermantasyonu sonucunda üretilen laktik asit ana metabolik etkiye sahiptir. Bunun sonucu olarak gıda maddesinin asitliği artar [23]. Organik asitler (çoğunlukla laktik asit ve asetik asit), akut glisemik indeks ve insülin indeksini azaltıcı etki gösterebilir [24].

Gıda kaynaklı hastalıklar, yetersiz işlem görmüş ve/veya taze olarak tüketilen gıdalar ile ortaya çıkabilmektedir. Yapay koruyucu ve antibiyotiklerin yanlış kullanımı olumsuz etkilere neden olmaktadır. Patojen bakterileri etkisiz hale getirmek için gıda endüstrisinde bir takım yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan birisi antibakteriyel özelliği olan mikroorganizmaları kullanarak raf ömrünün uzatılmasıdır [25]. Gıdanın raf ömrünü uzatmak için laktik asit bakterilerinin kullanılmasının sebebi gıda bozulmaları ve gıda kaynaklı hastalıkları kontrol edebilme özelliğidir. [26]. Süt ürünlerindeki patojenlerin ve bozulma yapan mikroorganizmaların gelişmesini engelleyen ortamın oluşmasında LAB kültürleri rol oynamaktadır. LAB kültürleri laktozu laktik asite metabolize eder ve ortamın asitliğini düşürür. Sonuç olarak mikroorganizmalar için uygun olmayan bir ortam sağlanmış olur [27].

## **2.1.1. Bazı Önemli Laktik Asit Bakterileri (LAB)**

### **2.1.1.1. *Bifidobacterium* spp.**

Çoğu türü probiyotik olan bu bakteri cinsinin dallı (Y-şeklinde) bir yapısı vardır. Gram-pozitifler ve spor oluşturmazlar. Anaerobik bakterilerdir [28]. Actinobacteria filumunda yer alan bu bakteri cinsine ait türler insan ve hayvan gastrointestinal sistemlerinde bulunmaktadır [29]. Sağlığın korunmasında önemli rol oynayan probiyotik bakteri cinsleri arasında *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Enterococcus* yer almaktadır [28]. *Bifidobacterium* spp.'nin kullanımı fonksiyonel gıdaların dışında yem üretiminde de ilgi görmeye başlamıştır [30].

### 2.1.1.2. *Lactobacillus* spp.

*Lactobacillaceae* ailesine ait olan *Lactobacillus* spp. , Firmicutes filumunda ve Bacilli sınıfında yer almaktadır [27]. Gram-pozitif ve katalaz negatiftirler. Spor oluşturmeyen ve çubuk şekilli olan *Lactobacillus* spp.'ye ait türler genellikle aerotolerant veya anaerobik özellik göstermektedirler [31].

Ayrıca *Fructobacillus*, *Weisella*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus* gibi cinsler *Lactobacillaceae* ve *Leuconostocaceae* familyalarına aitlerdir. Ancak *Lactobacillus* cinsinin alt gruplarında yer almaktadırlar [32].

Bu türe ait bakteriler fermente gıdalarda önemli rol oynamaktadır [33]. *Lactobacillus* spp.'ye ait türler süt ürünlerinden izole edilerek starter kültür olarak kullanılmaktadır [34]. Aynı zamanda bu cinse ait türlerin bazılarının gıda koruyucu olarak kullanılmasının sebebi olarak güvenli bir geçmişe sahip olması gösterilebilmektedir [31, 34].

*Lactobacillus* ve *Pediococcus* cinslerine ait türlerle ilgili 2015 yılından beri kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır. Çekirdek genom filogenisine dayanarak filogenetik analiz yapılması sonucunda diğer bakteri cinslerinin ve bu cinse ait türlerin taksonomisinin uyumlu olmadığı sonucuna varılmıştır. *Lactobacillus* ve *Pediococcus*'a ait türler 272 olarak kabul görürken yeni araştırmalara göre bu sayı artış göstermektedir. Sayının artış göstermesinde *Lactobacillus* cinsine ait çeşitliliğin artması rol oynamaktadır.

*Lactobacillus* cinsine ait araştırmalar yapılırken *Lactobacillaceae* ve *Leuconostocaceae* ait taksonomiler göz önüne alınmış ve filogenetik yapıları incelenmiştir. Bu inceleme yapılırken

- Ortalama nükleotid kimliği (ANI),
- Ortalama amino asit kimliği (AAI),
- Çekirdek gene ait ortalama amino asit kimliği (cAAI),
- Çekirdek genom filogenisi,
- İmza genleri,
- Metabolik ve/veya ekolojik kriterler değerlendirilmiştir.

Yapılan çalışmalarda Lactobacillaceae familyasına ait 26 yeni soy tanımlaması yapılmıştır. *Lactobacillus* ve *Paralactobacillus* spp.'ye ait yeni tanımlar ortaya çıkmıştır [35].

#### **2.1.1.2.1. *Lactiplantibacillus plantarum* (*Lactobacillus plantarum*)**

Son yapılan çalışmalarda polifazik yaklaşıma dayanarak yapılan değerlendirmeler sonucunda *Lactobacillus* cinsine ait 25 yeni sınıflandırma önerilmiştir. Bu sınıfa *Lactiplantibacillus* cinsi de dahil olmuştur. Bu cinse ait grubu eski adıyla *Lactobacillus plantarum* temsil etmektedir.

*Lactiplantibacillus* türleri Gram-pozitif, hareketsiz ve spor oluşturmeyen çubuk şekilli bakterilerden oluşmaktadır. Geniş bir yelpazede karbonhidratları fermente edebilme yeteneğine sahiptirler. Fenolik asitleri metabolize ederken esteraz, dekarboksilaz ve redüktaz aktivitelerinden yararlanırlar. Bu türe ait bakteriler çok sayıda fermente gıdalardan izole edilebilmektedirler ve göçebe davranış özelliğiyle omurgalı bağırsak mikrobiyotasında da bulunabilirler.

*Lactiplantibacillus plantarum*, çift veya tekli kısa zincirler halindeki hücrelere sahip hareketsiz çubuk şeklindeki bakterilerdir. Bazı suşları nitratı pH 6 ve/veya daha yüksek olduğunda indirgeme özelliğine sahiptir. Bu özelliğinin yanında psödokatalaz aktivitesi de bu bakterinin ayırt edici özellikleri arasında yer almaktadır. Bu bakteri gıda fermentasyonlarında probiyotik ve starter kültür olarak kullanılabileceği için ticari öneme sahiptir. Aynı zamanda bira ve şarabın bozulmasında rol oynamaktadır [35].

#### **2.1.1.2.2. *Levilactobacillus brevis* (*Lactobacillus brevis*)**

Eski adıyla *Lactobacillus brevis* olarak bilinen bakterinin son yapılan çalışmalarda grup içi farklılıklar oluşturduğu belirlenmiştir. Bu farklılıklarda ortalama nükleotid kimliği, ortalama amino asit kimliği, çekirdek gene ait ortalama amino asit kimliği, çekirdek genom filogenisi, imza genleri ve metabolik ve/veya ekolojik kriterleri değerlendirilmiş olup *L. brevis* ve *L.collinoides* grupları için çekirdek genin ortalama amino asit kimliğinin %70'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu durum diğer kriterlerde göz önüne alındığında filogenetik ağaçlarda kendi içerisinde tutarlı olduğunu göstermiştir ve yeni taksonomisi

oluşturulmuştur. *Lactobacillus brevis* bu çalışmalara göre revize edilerek *Levilactobacillus brevis* olarak tanımlanmıştır.

Heterofermentatif olan bu türe ait bakteriler çubuk şeklindedir. Katalaz negatiftir ve aside toleranslıdırlar. Genellikle 15 °C’de, pH 4.0-7.0 aralığında gelişim gösterirler. DNA mol içeriğinin %46’sını G+C oluşturmaktadır. İnsanların bağırsaklarından, ekşi hamurdan, lahana turşusundan, süt ve süt ürünlerinden izole edilebilirler. Aynı zamanda alkollü içeceklerde bozulmaya sebep olabilirler [35].

#### **2.1.1.3. *Pediococcus* spp.**

*Pediococcus* spp. fakültatif anaerobik koklar olup spor oluşturmazlar ve hareketsizdiler [36]. Gram-pozitif ve katalaz negatif ve homofermentatiftirler [37]. Starter kültür olarak kullanımının dışında gıda patojenleri için kontrol bariyeri olarak kullanılmaktadırlar [4, 38]. *Pediococcus* spp.’nin çeşitli türleri pediosin üretmektedir. Bir protein olan pediosin bu cinse ait türlerin ürettiği antimikrobiyel özellikli bir bakteriyosindir. [36]. Bu bakteriyosin et,süt,turşu ve sosis gibi ürünlerden izole edilmiştir [39]. Pediosin termo stabilite ve geniş pH aralığında aktivite göstermesi sebebiyle istenmeyen mikroorganizmaların inhibe edilmesi ve biyokoruyucu olarak kullanılmasında avantaj sağlamaktadır [36, 39].

#### **2.1.1.4. *Enterococcus* spp.**

Düşük G+C (Guanin+Sitozin) içerikli olan *Enterococcus* spp. Firmicutes filumunda yer alan katalaz negatif ve genellikle fakültatif bakterilerdir [40, 41]. Birçok mikroorganizmanın direnç sağlayamadığı koşullara karşı direnç gösterebilen *Enterococcus* spp. suda kontaminasyon oluşumuna sebep olmaktadır. İnsan ve hayvan bağırsaklarında bulunabilmesi insan hastalıklarıyla da ilişkisi olduğunu göstermektedir [41, 42]. Antimikrobiyel ajanlara karşı direnç gösterebilmelerinin yanı sıra probiyotik olarak kullanılmaktadırlar [40, 42]. LAB’nin diğer türlerinde de olduğu gibi gıdalarda tekstürü iyileştirme, starter kültür veya koruma amaçlı olarak da kullanılmaktadırlar [40].

#### **2.1.1.5. *Leuconostoc* spp.**

Gram-pozitif, fakültatif anaerob ve heterofermentatifler. Mikroaerofilik koşullarda, glikozun fermantasyonu sonucu D(-) laktat, etanol ve karbondioksit oluşumu gözlenmektedir [37, 43]. *Leuconostoc* spp. tarafından üretilen laktik asit, asetaldehit, diasetil vb. bileşikler süt ürünlerinin duyu özelliklerine pozitif etkide bulunurlar [44-46]. *Lactococcus lactis* ile birlikte kullanıldıklarında lezzet geliştirebilirler [46]. Bakteriyosin üreten türlerinin bulunması biyokoruyucu olarak kullanılabileceğini göstermektedir [43]. Süt ürünlerinin yanı sıra turşu, Kimchi, et üretiminde de rol oynamaktadırlar [37, 43, 47].

#### **2.1.1.6. *Streptococcus* spp.**

Çift ya da zincir şeklinde olan Gram-pozitif bakterilerdir [48, 49]. Katalaz negatiftir ve hareketsizdirler [49, 50]. Bazı türleri karbondioksit kullanmayı gerektirse de genellikle fakültatif anaerobik ve homofermentatiflerdir [48, 49]. L(+) laktat fermantasyonun ana ürünü olup kemoorganotroflardır [49, 51]. *Streptococcus* spp. hayvanlarla ve insanlarla ilişkili olmasının yanı sıra bitkilerle de ilişkilidir [49, 52]. Bazı türleri öldürücü olabilir ya da ciddi hastalıklara da sebep olabilir [49].

#### **2.1.1.7. *Lactococcus* spp.**

Homofermentatif olan bu türe ait bakterilerin şekilleri oval ve/veya küredir [53]. Süt ürünlerinin üretimi için büyük öneme sahip olan bu bakteriler Gram-pozitif ve katalaz negatiftir [53-55]. Endospor oluşturmayan *Lactococcus* spp. glikoz fermantasyonu sonucunda L(+) laktat üretirler [53]. Bu son ürün sayesinde *Pediococcus* spp ve *Leuconostoc* spp.'den farklı olduğunu anlamak kolaylaşmaktadır [54]. Genellikle patojen olmayan bu tür hareketsiz ve mikroaerofiliktir [33, 53]. *Lactococcus* spp.'ye ait türlerin ürettiği bakteriyosinler antimikrobiyel aktiviteleri açısından seçici davranmaktadırlar [56]. Fermente sütlerde yer alan bu *Lactococcus* spp., starter kültür olarak da kullanılmaktadır [57]. Bu türün içerisinde yer alan *Lactococcus lactis*'in ürettiği bileşenlerden bir tanesi olan diasetil çeşitli gıda ürünlerinde aroma verici olarak yer almaktadır [58].

### **2.1.2. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyel Etkisi**

Laktik asit bakterilerinin türü ve suşuna bağlı olarak üretilen aktif metabolitler (bakteriyosin, organik asitler, hidrojen peroksit, alkol, karbondioksit, diasetil vb.) antimikrobiyel aktivelerini etkilemektedir [59, 60]. 2008 yılında EUCAST uzmanı tarafından içsel direnç, istisnai fenotipler ve bu fenotiplere ait yorumlamalar olarak 2 grup şeklinde antimikrobiyel duyarlılık testleri belirlenmiştir [61].

Gıda endüstrisi için önemli olan konuların içerisinde yer alan gıdaların raf ömrü ve bozulması, işlem görmemiş olan taze gıdaların tatlarının korunması gibi durumlarda laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etkinliklerinden yararlanılmaktadır [62]. LAB'ın yer aldığı fermente gıdaların düşük pH'a sahip olması avantaj sağlamaktadır [27].

Bazı gıda ürünlerinden elde edilmiş olan LAB'ın patojen mikroorganizmalara karşı da etkisi olduğu bilinmektedir. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* vb. örnek olarak verilebilmektedir [63, 64].

#### **2.1.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Ürettiği Bazı Metabolitler**

LAB' nin ürettiği antimikrobiyel etkiye sahip olan metabolitleri düşük ve yüksek moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırabilmek mümkündür. Düşük moleküler ağırlıklı metabolitlere örnek olarak organik asitler, hidrojenperoksit, asetaldehit, asetoin vb. verilebilmektedir. Yüksek ağırlıklı metabolitlere ise bakteriyosinler örnek gösterilebilmektedir [65].

##### **2.1.2.1.1. Organik asitler**

Laktik asit bakterileri şeker fermantasyonu sonucunda bazı antimikrobiyel bileşikler üretmektedir. Bu bileşikler içerisinde yer alan organik asitler ortamı hızlı asitleştirmektedir. Aynı zamanda diğer mikroorganizmaların gelişimini de engellemektedir [66]. Laktik asit bakterilerinin, şekerleri organik asite dönüştürebilmesi gıda endüstrisinde koruyucu olarak tercih edilmesinin sebeplerinden bir tanesidir [62].



Organik asitlerin antimikrobiyel etkisi ortamın pH'ına ve asit moleküllerine bağlı olarak değişebilmektedir. Organik asitlerin birçoğu düşük pH'da (~5.5 ve altında) etkili olmaktadır. Çünkü gelişim inhibisyonunu sağlayacak olan asit, ayrışmamış asittir ve ortamda uygun oranlarda bulunması sonucunda işlemi gerçekleştirmektedir. Bu oranı ayarlamak için ise pH'ı düşürmek gerekmektedir. pH'ın düşük olmadığı (~6 ve üzeri) durumlarda da etkili olan asitler mevcuttur. Asitlerin kendi içerisinde farklılık göstermesinin sebepleri hücreye ve etki mekanizmasına bağlı olarak değişmektedir [67]. Örneğin; zayıf asitler hücre zarına nüfuz edebilirken, kuvvetli asitler edemezler. Zayıf asitlerin lipofilik olması avantaj sağlayabilmektedir. Öncelikleri sitoplazmada pH'ı düşürmektir. Ayrışmamış asitler bu aktiviteyi destekleyici niteliktedir. Kuvvetli asitler ise pH'ı düşürmek için öncelikle hücre yüzeyindeki enzimleri denatüre etmeleri gerekmektedir. Bunun sonucunda proton geçirgenliği artmaktadır. pH'ı düşürme eylemlerini bu şekilde gerçekleştirmektedirler [68].

#### **2.1.2.1.1.1. Laktik Asit (CH<sub>3</sub>-CH(OH)-COOH)**

Laktik asit birçok farklı gıda ürünlerinde,

- Asitleştirme,
- pH tamponlama,
- Aroma verme,
- Gıdanın bozulmasını önleme vb. sebeplerle kullanılmaktadır.

Laktik asit bakterilerinin ana fermentasyonu sonucu oluşan laktik asit pH derecesine bağlı olarak ayrışmaktadır. Laktik asit sitoplazma zarı içerisinde çözünerek asitleşmeye sebep olabilmektedir. Sonuç olarak pH değişimine sebep olmaktadır ve hücrelerin gelişimi için gereken enerjinin azalmasına yol açmaktadır [20]. Ayrışmış ve ayrışmamış olan laktik asit denge durumundadır. Düşük pH' da laktik asidin büyük bir kısmı ayrışmamış durumdadır [20, 69]. Bu durumdaki laktik asit mantar, maya ve bakterilerinin birçoğu için toksik etki göstermektedir. Laktik asidin etkisi mikroorganizmalar için çeşitlilik göstermektedir. Laktik asidin stereoizomeri olan L-laktik asit, D-izomerine göre daha fazla inhibe edebilme özelliğine sahiptir ve antimikrobiyel aktiviteleri çeşitlilik göstermektedir [69].

#### **2.1.2.1.1.2. Asetik Asit (CH<sub>3</sub>-COOH)**

Laktik asidin işlevine benzeyen asetik asidin antimikrobiyel etkisi ortamın pH'nın düşük olmasından kaynaklanabilmektedir. Asetik asit ve laktik asitin farkı asit ayrışma sabitinden gelmektedir. Asetik asitin pKa'sı 4.8 iken laktik asitin 3.8'dir. Bu yüzden asetik asit çoğunlukla zayıf asidik bir ortamda ayrışmamış şekilde bulunmaktadır. Hidrofobik ve küçük bir molekül olan ayrışmamış durumdaki asetik asit bakterilerin zarından (fosfolipid çift tabaka) geçebilmektedir. Hücre içi pH'ın düşmesini sağlamaktadır. Bunu hücre içine proton aktararak yapmaktadır. Bu şekilde hücrelere zarar vermektedir [70].

Asetik asit ve propiyonik asit heterofermentatif yolla laktik asit bakterileri tarafından sentezlenmektedirler. Bu asitler hücre zarları ile etkileşime girerek hücre içinin asitleşmesine sebep olmaktadır. Bunun yanı sıra protein denatürasyonunu da gerçekleştirebilmektedirler [69].

Asetik asidin etki alanının laktik asitten daha geniş olduğu bilinmektedir. Buna ek olarak laktik asit ve asetik asit arasında sinerjik bir etki de bulunmaktadır. Örnek vermek gerekirse bu iki asidin karışımı Gram-negatif patojen olan *Salmonella typhimurium*' un gelişimini engellemektedir. Ortamın asitliğine göre mikroorganizmalar farklı tepkiler vermektedirler [66].

#### **2.1.2.1.1.2. Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Laktik asit bakterileri, ortamda oksijenin bulunması durumunda nikotinamid adenin hidroksi dinükleotid (NADH) peroksidaz veya flavoprotein oksidazların etkileşimini gerçekleştirebilmektedir. Bu eylemin sonucunda hidrojen peroksit oluşumu gözlenmektedir [66, 69]. Peroksidin etkisini güçlendirmek için ortamda laktoperoksidaz ve tiyosiyanat bulunması gerekmektedir. Bunun için doğal habitatlarında LAB bulunan gıda maddeleri (süt gibi) tercih edilmektedir. Kuvvetli oksitleyicilerin etkisi hidrojen peroksidin antimikrobiyel aktivitesini etkilemektedir [66]. Hidrojen peroksit serbest radikallerin (süperoksit ve hidroksil gibi) üretimine sebep olabilmektedir. Bu radikaller DNA' ya zarar vermektedirler [69].

### **2.1.2.1.3. Karbondioksit (CO<sub>2</sub>)**

Heterofermentatif laktik asit bakterileri tarafından üretilen CO<sub>2</sub>, anaerobik ortamı oluşturulmasında rol oynamaktadır ve enzimatik dekarboksilasyonları engelleyebilmektedir. Aynı zamanda membran lipid çift tabakasında birikerek geçirgenliği bozabilmektedir. Ancak bu etkilerine rağmen antimikrobiyel etki mekanizması henüz kesinleşmemiştir. Gıdalarda bozulma yapan mikroorganizmalarının etkinliğini veya Gram-negatif olan psikrotrofik bakterilerin gelişmesini engelleyebilme özelliğine sahiptir. Mikroorganizmalara göre CO<sub>2</sub> inhibisyon özelliği çeşitlilik gösterebilmektedir [69].

### **2.1.2.1.4. Aroma Bileşenleri**

#### **2.1.2.1.4.1. Diasetil (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>)**

LAB tarafından sitrat fermantasyonu gerçekleştirilmektedir. Bu fermantasyonun ürünü olarak diasetil üretilmektedir. Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler kıyaslandığında diasetilin Gram-negatifleri önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir [71]. Gram-negatif bakterilerin gelişmesini arginin bağlayıcı proteinin reaksiyona girmesiyle engelleyebilmektedir [69]. Fermente gıdalarda koruyucu olarak kullanabileceği gibi diğer antimikrobiyel etkiye sahip bileşenlerle sinerjetik etki de gösterebilmektedir [69, 71].

#### **2.1.2.1.4.2. Asetaldehit (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)**

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, treonini, asetaldehit ve glisini aldolaz sayesinde ayırabilmektedir. Bunun sonucunda asetaldehiti meydana getirebilmektedir. Süt ürünlerinde bulunan *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*' nin gelişimini önleyebilmektedir (10-100 ppm asetaldehit) [69].

#### **2.1.2.1.5. Yağ Asitleri**

Laktik asit bakterilerinin bazı cinsleri lipolitik aktiviteye sahiptir. Bunlardan laktobasiller ve laktokoklar yağ asitlerini önemli düzeyde üretebilmektedirler. Yağ asitleri antimikrobiyel etki gösterebilmektedir. Bu etkinin ayrışmamış olan molekülden olabileceği düşünülmektedir. pH düşük iken inhibisyon özelliğinin daha etkili olduğu bilinmektedir. Bu durum antimikrobiyel etkinin anyondan kaynaklanmadığını göstermektedir [72]. Yağ asitlerinin konsantrasyonu ve zincir uzunluğu, ortamın pH' ı antifungal etkisini

değiştirmektedir. Aynı zamanda doymamış yağ asitlerinin Gram-pozitif bakterilere karşı etkili olduğu bilinmektedir [69].

#### **2.1.2.1.6. Bakteriyosin**

Laktik asit bakterilerinin ürettiği metabolitler arasında yer alan bakteriyosinler antibakteriyel etki gösterebilmektedir. Gıdaların bozulmasını önleme, patojen bakterilerin gelişmesini engelleme gibi özelliklere sahip olması doğal koruyucu olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir [73]. Mikrobiyel savunma mekanizması sayesinde laktik asit bakterilerinden elde edilen bakteriyosinler üzerinde en çok çalışılan alanlardandır [74].

Proteinli bileşik olan bakteriyosinler, ribozomal şekilde sentezlenen peptitlerdir. İlgili oldukları organizmanın gelişmesini ve/veya yaşanabilirliğini etkileyebilmektedirler. Bakteriyosin ile hedeflenen hücrenin yok edilmesinde yer alan mekanizmalar hücre duvarı sentezi, inhibisyonu ve gözenek oluşumudur. Hücre duvarının biyosentezini inhibe etmek için nisin ile lipid II kompleks yapı oluşturarak peptitleri bir araya getirmektedir. Bunun sonucunda bakteri zarında gözenek oluşumu gerçekleşmektedir. Bakteriyosin üretimi rekabet ortamı yaratmaktadır. Bu da antimikrobiyel aktivitenin bir sonucunu oluşturmaktadır. Bunun yanında gastrointestinal patojenleri de inhibe etmede rol oynamaktadır [75].

İnsan mikrobiyomuna zarar veren, antibiyotiğe direnç gösteren patojenlere ya da patojenik bakterilerin tedavisinde alternatif olarak saflaştırılmış haldeki bakteriyosinler kullanılabilir [76].

Gıda koruyucu olarak bakteriyosinin tercih edilmesinin sebepleri;

- Geniş pH toleransı,
- Proteolitik aktivite,
- Isı stabilitesi gibi önemli özelliklere sahip olmasıdır [73].

Laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinler,

- Katyonik,
- Isıya dayanıklı,
- Amfifilik,
- Membran geçirgenleştirici peptitler olarak bilinmektedirler [77].

Boyutları genellikle 3-6 kDa (<10 kDa) olarak bilinen bu küçük peptitler 3 ana sınıfa ayrılmaktadırlar. [77, 78]. Bunlar;

- **Birinci Sınıf Bakteriyosinler (Lanbiyotikler):** Polisiklik tiyoeter aminoasitlerini (lantiyonin ve metillantiyonin) ve doymamış aminoasitleri (dehidroalanin ve 2-aminoizobutirik asit) içermektedirler [38, 77]. Isıya karşı dayanıklı olan bu peptitler lantiyonin ve 3-metillantiyoninin translasyonu sonucunda çeşitli kalıntılar içermektedirler. Aminoasitlerin iç halkalar oluşturması sonucunda meydana gelen bu kalıntılar spesifik özelliklerin oluşmasına katkı sağlamaktadırlar. Lanbiyotikler içerisinde en çok çalışılan bakteriyosin varyantı nisin A içermektedir [79, 80]. Lanbiyotikler kendi içerisinde Tip A ve Tip B olmak üzere 2 alt gruba ayrılmaktadırlar. Uzun ve pozitif yüklü olanlar Tip A grubuna ait iken, küresel ve yüksüz moleküller Tip B grubuna dahildirler [81].
- **İkinci Sınıf Bakteriyosinler (Isıya Daha Az Dayanıklı / Lanbiyotik Olmayanlar):** Lantiyonin içermezler ve kısmen ısıya dayanıklıdırlar [77]. Herhangi bir modifikasyon içermemektedirler. Katyonik ve hidrofobiktirler. LAB için bakteriyosinlerin çoğu bu sınıfa aittir. Pediosinler, enterosinler, laktosinler vb. bu gruba örnek olarak gösterilebilmektedirler [81]. Bu gruba ait bakteriyosinler kendi içersinde 4 alt gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar; alt grup II a (Pediosin benzeri bakteriyosinler ve Listeria aktif peptitler bu grupta yer almaktadır.), alt grup II b (İki peptit bakteriyosinler), alt grup II c (Dairesel bakteriyosinler), alt grup II d (Büyük proteinlerden oluşan antimikrobiyel peptitler ve diğer bakteriyosinler) [38, 81, 82].
- **Üçüncü Sınıf Bakteriyosinler (Yüksek Isıya Dayanıksız Bakteriyosinler):** Büyük molekül ağırlığına (>30 kDa) sahiptirler. Isıya dayanıksızdırlar [77]. Hidrofiliktirler

[81]. Helvetisin ve enterolizin bu grubun temsilcisi olarak görülen bakteriyosinler içerisinde yer almaktadır [77].

- **Dördüncü Sınıf Bakteriyosinler (Döngüsel Bakteriyosinler) [83]:** Kompleks bakteriyosinlerdir. Aktif hale gelebilmek için proteine ihtiyaç duyarlar. Buna alternatif olarak daha fazla kimyasal kısımdan (lipit, karbonhidrat gibi) oluşabilmektedirler [38].

#### 2.1.2.1.7. Reuterin (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHO)

*Lactobacillus reuteri*, heterofermentatif bir türdür. İnsanların ve hayvanların gastarointestinal sistemlerinde bulunmaktadır. Bu tür tarafından reuterin üretilmektedir. Bu bakteri tarafından gliserol reuterine dönüştürülmektedir. Dönüşümünde gliserol dehidratazin etkisi bulunmaktadır. Anaerobik gelişim sırasında bu dönüşüm gerçekleşmektedir. Antimikrobiyel aktivitesi geniş bir kitleyi kapsamaktadır. Bazı Gram-pozitif, Gram-negatif bakterilerin yanı sıra maya, mantar ve protozoalara etki etmektedir [69]. *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* ve *Trypanosoma* türlerinin reuterine karşı duyarlılığı tespit edilmiştir [84].

## 2.2. Gıda Kaynaklı Patojen Bakteriler

Gıda kaynaklı patojenler, insan sağlığı üzerinde ciddi etkilere sahiptir. Önem arz eden çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır [85]. Bazı önemli salgınlar gıda kaynaklı patojenleri içermektedir. Bu duruma örnek olarak *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Cronobacter sakazakii*, *Esherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp. ve *Yersinia enterocolitica* vb. bakteriler gösterilebilmektedir. Bazı gıda kaynaklı bakteriler spor oluşturabilme, ısıya dayanıklı olabilme ve toksin üretebilme yeteneklerine sahiptirler. Çoğu patojen mezofilik karakterli (20°C- 45°C gelişebilme yeteneği) iken, bazı patojen bakteriler ise 10°C' de altında da gelişim gösterebilmektedir [86].

Gıda güvenliği ulusal/uluslararası öneme sahiptir. Güvenli gıda üretimi sağlanması için sadece araştırma ve eğitim önemli olmamalıdır. Farklı bilim dallarına da sorunlar ve sonuçlar

sunularak çözümler aranmalıdır [85]. Güvenli gıdanın devamlılığı için gıda kaynaklı patojenik bakterilerin tespiti çok önemlidir. Hızlı, hassas ve spesifik özelliklere sahip yeni yöntemlerin takibi sağlanmalıdır [87].

### **2.2.1. *Yersinia enterocolitica***

Enterobacteriaceae familyasına ait, Gram-negatif bakterilerdir. Çubuk şekindedirler. [86, 88, 89]. Aerobik ve anaerobik koşullarda üreyebilirler ancak fakültatif anaerob olarak kabul edilen bakterilerdir. Gastrointestinal bir patojendir. Peritrik kamçılara sahiptir ancak 22-30°C'de hareket edebilmektedir. 37°C'de hareket yeteneğine sahip değildir. *Yersinia enterocolitica*, kanalizasyonla kontamine olan sudan, süt ve süt ürünlerinden, deniz ürünlerinden, haşlanmış mantardan, sebzeden, tofudan, topraktan ve birçok sıcak kanlı hayvanlardan izole edilebilmektedir [86, 90]. 25-30 °C aralığında optimum gelişme göstermektedir. Ek olarak 0-45°C aralığında da gelişebilmektedir. Sodyum klorürün %5'e kadar olan konsantrasyonlarında da gelişim gösterebilmektedir [86].

Tüm serotipleri enteropatojenik değildir. Tanımlanan 6 biyotip patojeniteleri baz alınarak sınıflandırma yapılmıştır. Bunlar; 1A, 1B, 2, 3, 4 ve 5'tir. 1B ve 2 ve 5 biyotipleri patojenik olarak kabul edilmiştir. Bunun sebebi enterotoksin Yst (*Yersinia stabil toksin*), Myf antijeni, ail adhesin gibi virülans işaretlerine sahip olmalarıdır. Biyotip 1B ve serolojik grup O:8 insanlar için çok tehlikeli olabilir. Öldürücü olduğu düşünülmektedir. Gastrointestinal sistemin mukozasında ülserasyona yol açabilirler.

*Y. enterocolitica*, bağırsak lümeninde çoğalmaktadır. İnce bağırsakların mukozasına tutunabilmektedir. Yersiniosis semptomları 4-7 gün sonra ortaya çıkmaktadır. Bu semptomlar 3 hafta ve üzerinde görülebilmektedir. Gıdalarda ürünlerinde ısıya dayanıklı toksinin varlığı tehlike arz etmektedir. Bu gıda ürününün tüketilmesi sonucunda ise gıda zehirlenmesi görülmektedir. Ateş, ishal, mide kasılmaları, kusma, hematüri semptomlar arasındadır. Genellikle bu semptomlar kendiliğinden geçmektedir. Mezenterik lenfadenit, distal ince bağırsak ve çekum iltihabına hatta ölüme sebep olan sepsise de neden olabilmektedir. Semptomları küçük yaştaki çocukların (7 yaş altı) apandisit şikayetleriyle de karıştırılmaktadır [91].

### 2.2.2. Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) (*mecA*)

Gram-pozitif olan bu bakteri üzüm salkımı görünümündedir. Hareketsizdir [86]. Fakültatif aerobik olup 7-48°C aralığında gelişim gösterebilmektedir. 10-46°C aralığında enterotoksin üretebilmektedir. %15'e kadar olan sodyum klorür (NaCl) konsantrasyonlarında gelişim gösterdiği bilinmektedir [86, 92].

Doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Aynı zamanda süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri, istridye gibi deniz ürünleri vb. gıdalarda bulunabilmektedir. Spor oluşturmamasına rağmen kuru halde ( $\alpha_w = 0.83$ ) uzun süre hayatta kalabilme özelliğinden dolayı en dirençli patojenler arasında yer almaktadır. İnsanlar bu bakteri için aracı konumundadır. Gıdalara bulaşı direk temas yoluyla olabilirken; deri parçalarıyla, solunum yoluna ait damlacıklarla da bulaşı gerçekleşebilmektedir [86]. *S.aureus*, memelilerin ve kuşların derilerinde, burun ve solunum yolunda bulunmaktadır. Solunum ve idrar yolu, yara ve yanık vb. enfeksiyonlardan da sorumludur [86, 93]. Enterotoksinin vücuda alınması sonucu semptomlar ortaya çıkmaktadır. Bu semptomlar (mide bulantısı, kusma, baş ağrısı ve dönmesi, halsizlik, ishal gibi) 6-10 saat aralığında görülmeye başlamaktadır.

Bu bakteriye ait enterotoksinler, pirojenik toksin olarak bilinmektedirler. Süperantijenler olarak hareket edebilmektedirler. T hücrelerini yüksek bir yüzdeyle uyarmaları daha geniş bir toksin ailesine dahil olmalarını sağlamaktadır. Isı ile inaktive edilmeleri oldukça güçtür. Toksini yok etmek için gereken sıcaklık mikroorganizmayı yok etmek için gerekenden daha fazladır [86].

*S.aureus*, bazı antibiyotik ajanlarına karşı direnç göstermektedir. Metisiline-dirençli *S.aureus* (MRSA), bu antibiyotik ajanlarından metisiline karşı direnç gösteren kısmı temsil etmektedir. Antibiyotik ajanlarına karşı dirençli olmaları patojenitelerini arttıracığı için dikkate alınması gerekmektedir [93]. MRSA, penisilin bağlayıcı protein PBP2'yi kodlayan *mecA* genine sahip olabilmektedir. Bu protein penisilin veya sefalosporini bağlayamamaktadır [94]. Stafilokok Kaset Kromozom *mec* (*SCCmec*) ile *mecA* geni, MRSA bakterilerinde bulunmaktadır. Bu genetik bölüm virüent özelliklerin gösterilmesinden sorumludur. Hastane ortamındaki MRSA bakterileri genellikle bu özelliğindedir. Lökosit



toksinleri MRSA bakterileri tarafından üretilmektedir. Bu özellik Panton-Valentine lökositinin (PVL) MRSA bakterilerinin patojenitesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir [93].

Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) biyofilmlerinin tedavisinde bakteriyosinlerden Nukasin ISK-1'İN etkili olduğu gösterilmiştir. Bu bakteriyosin *Staphylococcus warneri* tarafından üretilmektedir [95].

### **2.2.3. *Escherichia coli* O104:H4**

Enterobacteriaceae familyasına ait, Gram-negatif, katalaz pozitif olan çubuk şekilli bakteri türüdür. Fakültatif anaerobtur [86, 96]. Ayrıca Enterobacteriaceae familyası üyeleri glikoz ve laktozu fermente edebilmektedir. Peritrik flagella, fimbria, pili vb. yapıları sahip olmaları bu bakteri türünün hareketli olabileceğinin kanıtıdır. 35-37°C aralığında optimum gelişme göstermektedirler. Oksidaz negatiftir. Nitriti nitrate indirgeyebilmektedirler [96].

Bu bakteri insan ve hayvanların bağırsak mikroflorasında bulunabilmektedir. İnsan ve hayvanların dışkıları su ve yiyecekleri kontamine edebilmektedir. Tarımsal gübreler, ürünleri veya suları kontamine edebilmektedir. Hayvansal ürünler ise kesim ve işleme sırasında kontamine olabilmektedir. Bu şekilde çevreye yayılabilmekte, meyve ve sebzeleri kontamine edebilmektedirler [86, 96].

Virotip sınıflandırması için;

- Virülans faktörü,
- Memeli hücrelerinin etkileşimi,
- Memeli hücrelerinde adezyon (tutunma/ yapışma) ve/veya invazyon,
- Toksin üretimi için hücre sinyalleme olayları dikkate alınmaktadır [96].

*E. coli*, patojenik açıdan 2 gruba ayrılmaktadır. Biri gastrointestinal sistemi enfeksiyonuna (ishal yapıcı) sebep olurken diğeri septisemiye (beyin ve dolaşım sistemi, idrar yolu ve böbrekleri etkileyen enfeksiyon/ ekstraintestinal sistem enfeksiyonu) yol açmaktadır. Diyarejenik *E. coli* 6 gruba ayrılmaktadır [86, 96]:

1. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC),
2. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC, Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC)),
3. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC),
4. Enteroagregatif *E. coli* (EAEC),
5. Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC),
6. Diffuzadeziv *E. coli* (DAEC).

Heterojen bir grup olan Enteroagregatif *E. coli* (EAEC) yetişkin ve çocuklarda ishale sebep olmaktadır. *E. coli* O104:H4, bu gruba dahildir [97]. Bu ishal türü 14 günden fazla sürebildiği gibi kalıcı hale de gelebilmektedir. Bu kalıcı ishal gelişmiş ülkelerde HIV bulaşmış kişilerde daha sık görülmektedir. Çocuklarda bu ishal türü, hafif geçmesine rağmen mukozal hasar önemli düzeyde olabilmektedir. EAEC'nin semptomları arasında bu ishal türünün yanında karın ağrısı, bulantı, kusma, ateş görülebilmektedir. EAEC O104:H4 tarafından oluşan enfeksiyon hemolitik üremik sendrom (HUS), böbrek yetmezliği ve ölüme sebep olabilmektedir [96]. En büyük ikinci salgın olmasının yanında en ölümcül olan bu salgın *E.coli* O104:H4 suşu tarafından 2011 yılında meydana gelmiştir. Bu salgında hemolitik üremik sendromlu hastalarda nörolojik semptomlar ortaya çıkmıştır. Araştırmalara göre, enteroagregatif *E. coli*'nin özelliklerini taşıyan ve aynı zaman da Shiga toksini üretme yeteğine sahip patojenden kaynaklanan bir salgın olduğu ileri sürülmüştür.

#### **2.2.4. *Bacillus cereus***

Gram-pozitif olan bu bakteri Bacillaceae familyasına aittir. Aerobik, hareketli ve çubuk şeklindedir [86, 98]. Spor oluşturabilme yeteneğine sahiptir. *Bacillus* spp. çevrede hemen hemen her yerde bulunabilir. Buna tatlı ve deniz suları da dahildir. Bakterinin ürettiği sporlar pililere (kamçı benzeri yapılara) sahiptir. Aynı zamanda bu bakteriye ait sporlar hidrofobiktir. Bu özellikleri yüzeye daha iyi tutunmayı sağladığı için temizlik ve sanitasyon sırasında direnç gösterebilmektedir [86]. Bu bakteriye ait vejetatif suşlar 4-15 °C' de gelişme gösterebilmekte, ancak genellikle 30-40°C sıcaklıkları tercih etmektedir. Sıcaklık aralığı 35-55°C arasında değişim gösterebilmektedir.

*B. cereus* 2 farklı toksin üretmektedir. Bunun sonucunda emetik (kusma) sendromu ve diyarel (ishal) sendromu olarak 2 farklı hastalığa sebep olmaktadır. Gıdada gelişim sırasında

bakteriler tarafından kusturucu toksin üretiliyorsa emetik sendrom görülmektedir. Eğer ince bağırsakta gelişim sırasında ishal toksinleri gelişim gösteriyorsa diyarel sendrom olarak nitelendirilmektedir. Yeterli ısı işlem görmemesi ve/veya ısı işlem sırasında hayatta kalan bakterilerin endosporları, bu sendromlardan birine yol açabilmektedir. Vejetatif hücreler depolama sürecinde çimlenir ve hücreler artış gösterir (proliferasyon). Semptomların kuluçka dönemi 8-16 saatlik bir dilimi kapsamaktadır. Diyarel semptomlar 12-24 saatten fazla görülmemektedir. Isıya dayanıklı olan bir enterotoksik kompleksin etkisi sonucunda diyarel sendrom tipi gıda zehirlenmesi görülmektedir. Karın ağrısı, bulantı, ishal şeklinde semptom göstermektedir. Diyarel tipi gıda zehirlenmesine yol açan gıda ürünleri arasında süt ve süt ürünlerinin yanında et ürünleri, soslar, çorbalar da yer almaktadır. Emetik sendrom semptomlarının kuluçka aralığı 1-5 saatlik dilimi içermektedir. Isıya dayanıklı bir toksinin etkisiyle görülen bu sendrom tipinin başlıca belirtileri bulantı ve kusmadır. 6-24 saat aralığında semptomlar görülmektedir. Bu sendroma sebep olan gıdalar arasında pişmiş pirinç, hamur işleri (makarna, erişte vb.) yer almaktadır [86].

Çapraz ve işlem sonrası kontaminasyon sonucunda gıda zehirlenmeleri meydana gelmektedir. Biyofilm ve endospor sebebiyle kontaminasyonlar tekrarlanabilmektedir. Bütün bunlar insan sağlığı açısından ciddi sorunlar oluşmasının yanı sıra ekonomik olarak kayıplara sebep olmaktadır [99]. Süt, krema, pişmiş pirinç gibi gıdaların bozulmasına sebep olmaktadır. Bozulmuş gıdanın tüketimi sonucunda gıda zehirlenmesi gerçekleşmektedir.. Çin’ de yapılan istatistiksel verilere göre bu bakteriden gerçekleşen zehirlenme oranlarının fazla olduğu görülmüştür [100].

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

###### 3.1.1.1. Laktik Asit Bakterileri

Bu tez çalışmasında kullanılan laktik asit bakterileri, “Doğal Ekşi Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması ile Bazı Probiyotik Özelliklerinin Saptanması” adlı Dr. Gizem KEZER’e ait tez kapsamında izole edilmiş olan *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum* bakterileridir. Kullanılan laktik asit bakterilerine ait bilgiler Çizelge 3.1’de verilmiştir [101].

**Çizelge 3.1.** Laktik Asit Bakterilerine Ait Bilgiler

Bakteri Kodu	Temin Edildiği Yer	Bakteri Türü
Gc3	Gacemer	<i>Lactobacillus brevis</i>
İz1	İzmir	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Wz3	Weizen	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Hp2	Hatap	<i>Lactobacillus plantarum</i>

###### 3.1.1.2. Gıda Kaynaklı Patojenler

Çalışmada laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel etkilerini belirlemek için kullanılan gıda kaynaklı patojenlerden *Bacillus cereus*, Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus* (mecA (+) NCTC 124493) ve *Escherichia coli* (STEC O104:H4) T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı Merkez Laboratuvarı, Doç. Dr. Serap Süzük Yıldız’dan temin edilmiştir. *Yersinia enterocolitica* Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Laboratuvarından temin edilmiştir.

### **3.1.2. Kullanılan Besiyerleri**

Laktik asit bakterilerini aktif hale getirmek için MRS Broth (De Man Rogosa and Sharpe Broth, Merck) besiyeri, gıda kaynaklı patojenlerin aktiveşirmesi için ise TSB (Tryptic Soy Broth, Merck) besiyeri kullanılmıştır.

Agar spot, agar kuyucuk difüzyonu ve sıvı mikrodilüsyon yöntemlerinden önce aktiveşirilen mikroorganizmaların sayımını yapmak amacıyla Maximum Recovery Diluent (Merck) kullanılarak dilüsyonları hazırlanmıştır. Laktik asit bakterilerinin sayımı için MRS Agar (Merck), gıda kaynaklı patojen bakterilerin sayımı için ise TSA (Tryptic Soy Agar, Merck) kullanılmıştır.

Antimikrobiyel etkilerinin belirlenmesi amacıyla uygulanan yöntemlerden agar spot yöntemi için Agar-agar (Merck), MRS agar (Merck); kuyu difüzyonu yöntemi için Nutrient Agar kullanılmıştır. Mikrodilüsyon yönteminde ise TSB (Merck), Maximum Recovery Diluent (Merck), MRS Broth (Merck) besiyerleri kullanılmıştır.

### **3.1.3. Kullanılan Cihazlar**

#### **3.1.3.1. Elisa Plate Okuyucu**

Sıvı mikrodilüsyon yönteminde hazırlanan farklı derişimdeki bakteri ve LAB süpernatantlarına ait mikropalakardaki absorbands değerenlerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Absorbans Okuyucu BioTek ELx808' e ait görüntü şekil 3.1' de verilmiştir.

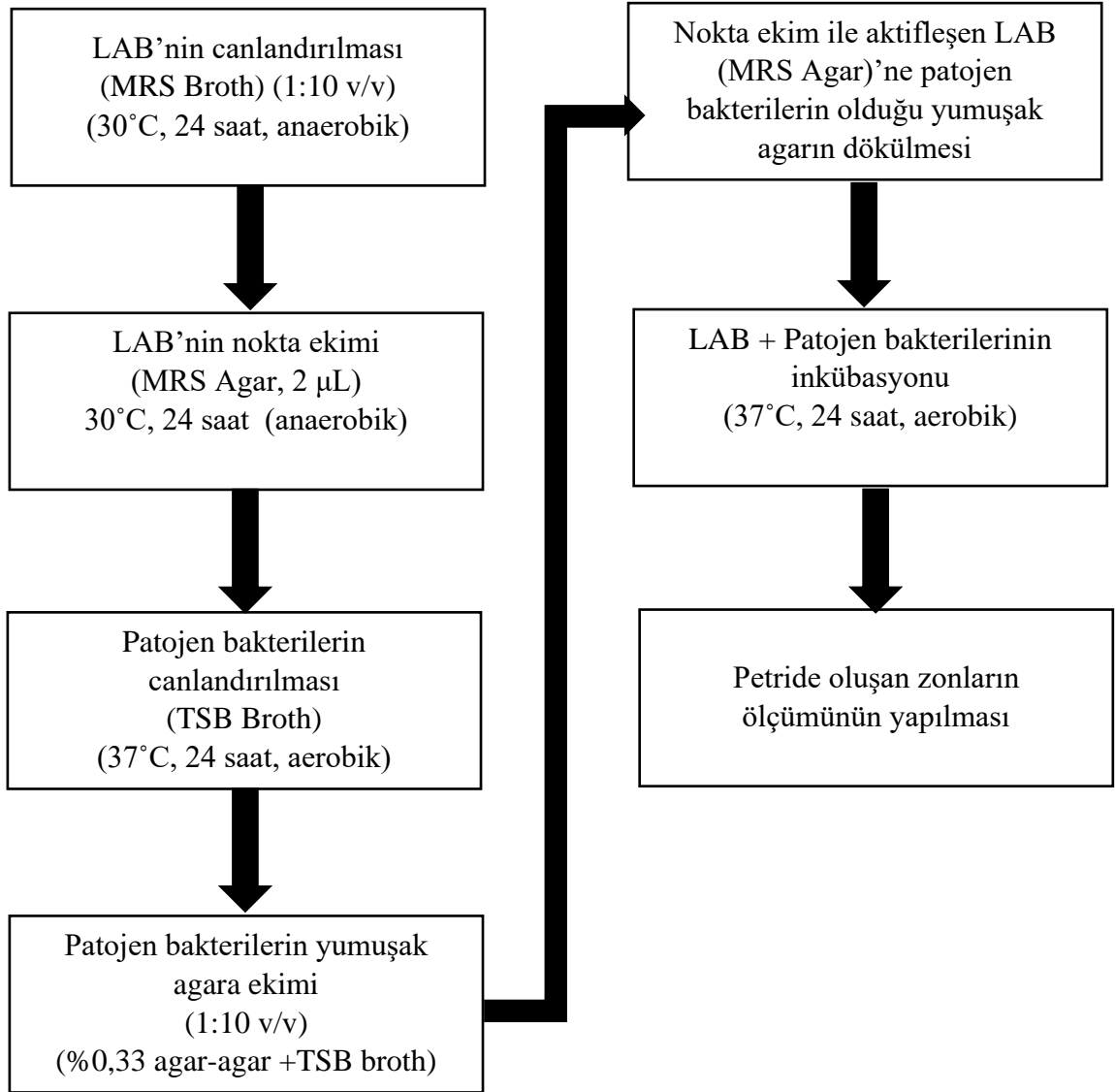


**Şekil 3.1.** Absorbans Okuyucu BioTek ELx808

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Agar Spot Yöntemi**

LAB izolatlarını (1:10 v/v) aktifleştirmek üzere MRS Broth (Merck) besiyerine ekim yapılmıştır. 30°C’ de 24 saat anaerobik ortamda inkübe edilmiştir. *Bacillus cereus*, Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli* (STEC O104:H4) ve *Yersinia enterocolitica* ‘nın ayrı ayrı TSB (Merck) besiyerine ekimi yapılmıştır ve 37°C’ de 24 saat aerobik ortamda inkübe edilmiştir. Aktifleşen LAB izolatlarının ve gıda kaynaklı patojenlerin her biri için sayım yapılmıştır. Sayım sonuçları belirlenen LAB izolatları MRS agar besiyerine 2 µL’lik nokta olacak şekilde yerleştirilmiş ve 30°C’ de anaerobik ortamda 24 saat inkübe edilmiştir. 5 mL’lik yumuşak agar hazırlamak için %0,33 agar-agar ve TSB besiyeri kullanılmıştır. Aktifleştirilen gıda kaynaklı patojenlerin her birinden 500 µL alınarak yumuşak agara yerleştirilmiştir. Nokta ekim ile aktifleştirilmiş laktik asit bakterilerinin bulunduğu petrilerin üzerine hazırlanan yumuşak dökülmüştür. Petriler 37°C’de aerobik ortamda 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda petrilerdeki zon yarıçaplarının ölçümü yapılmıştır [102, 103]. Bu deneye ait akım şeması şekil 3.2’de verilmiştir.

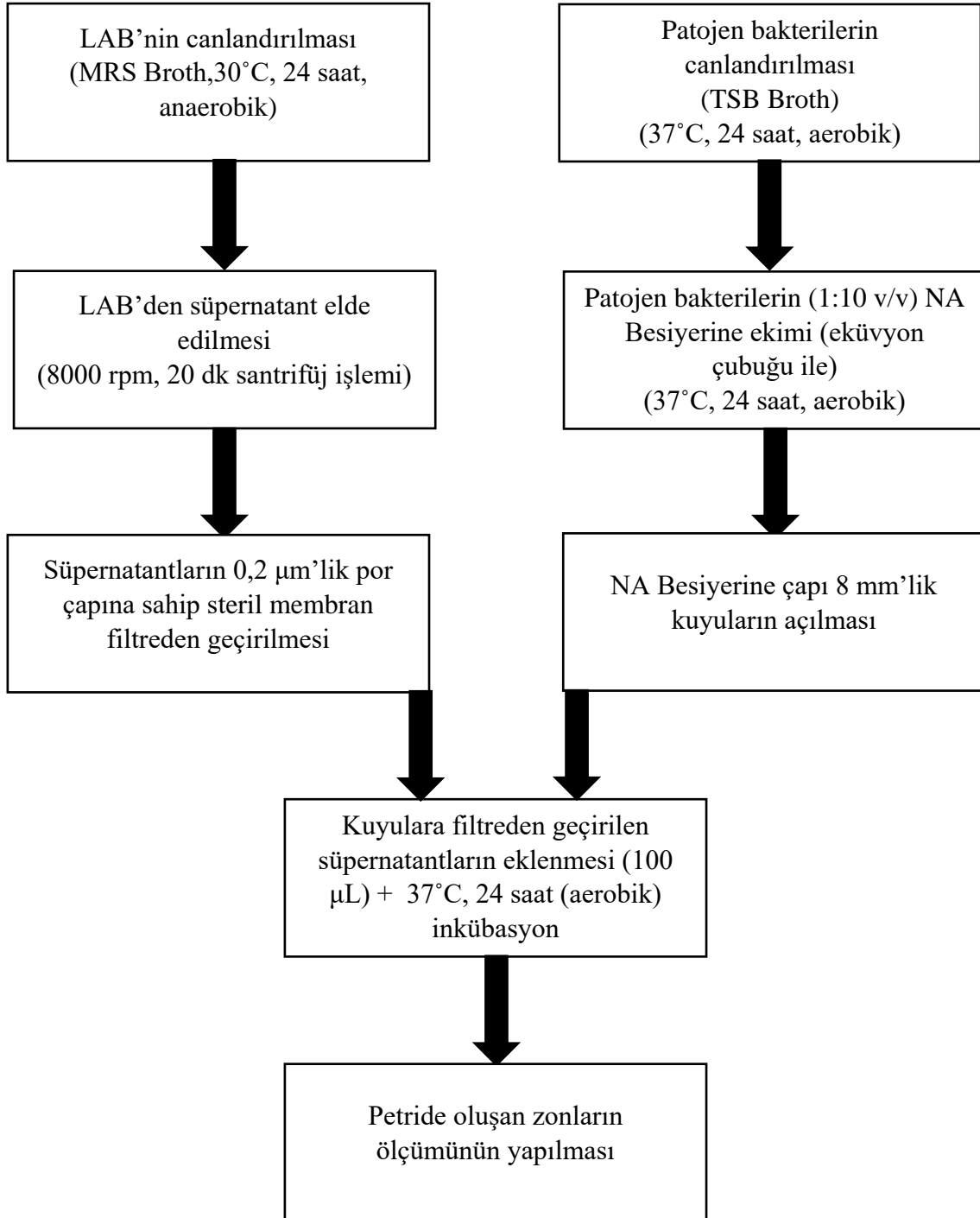


**Şekil 3.2.** Agar Spot Yöntemi Akım Şeması

### 3.2.2. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi

LAB izolatları MRS Broth (Merck) besiyerinde 30°C'de 24 saat (anaerobik), gıda kaynaklı patojen bakteriler ise TSB (Merck) besiyerinde 37°C' de 24 saat (aerobik) inkübe edilmiştir. Aktifleştirilen mikroorganizmaların sayımı yapılmıştır. LAB'leri 8000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatantlar 0,2 µm'lik por çapına sahip steril membran filtreden (Minisart Syringe filter, hydrophilic) geçirilmiştir. Nutrient agar besiyeri steril Petrilere hazırlanmıştır. Besiyerinin seviyesi Petrinin kapak hizasına gelecek şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan Petrilere aktifleştirilmiş patojen bakteriler 1:10 v/v olacak şekilde seyreltilerek eküvyon çubuğu ile ekimi yapılmıştır. Bu Petrilere çapı 8 mm olacak şekilde kuyucuklar açılmıştır. Bu kuyucuklara hazırlanmış olan LAB'lerinin

süpernatantlarından (cell free supernatant) 100'er µL ekleyerek 37°C' de 24 saat (aerobik) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda Petrilerdeki zon yarıçapları ölçülmüştür [102, 103]. Bu deneye ait akım şeması Şekil 3.3'te gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi Akım Şeması

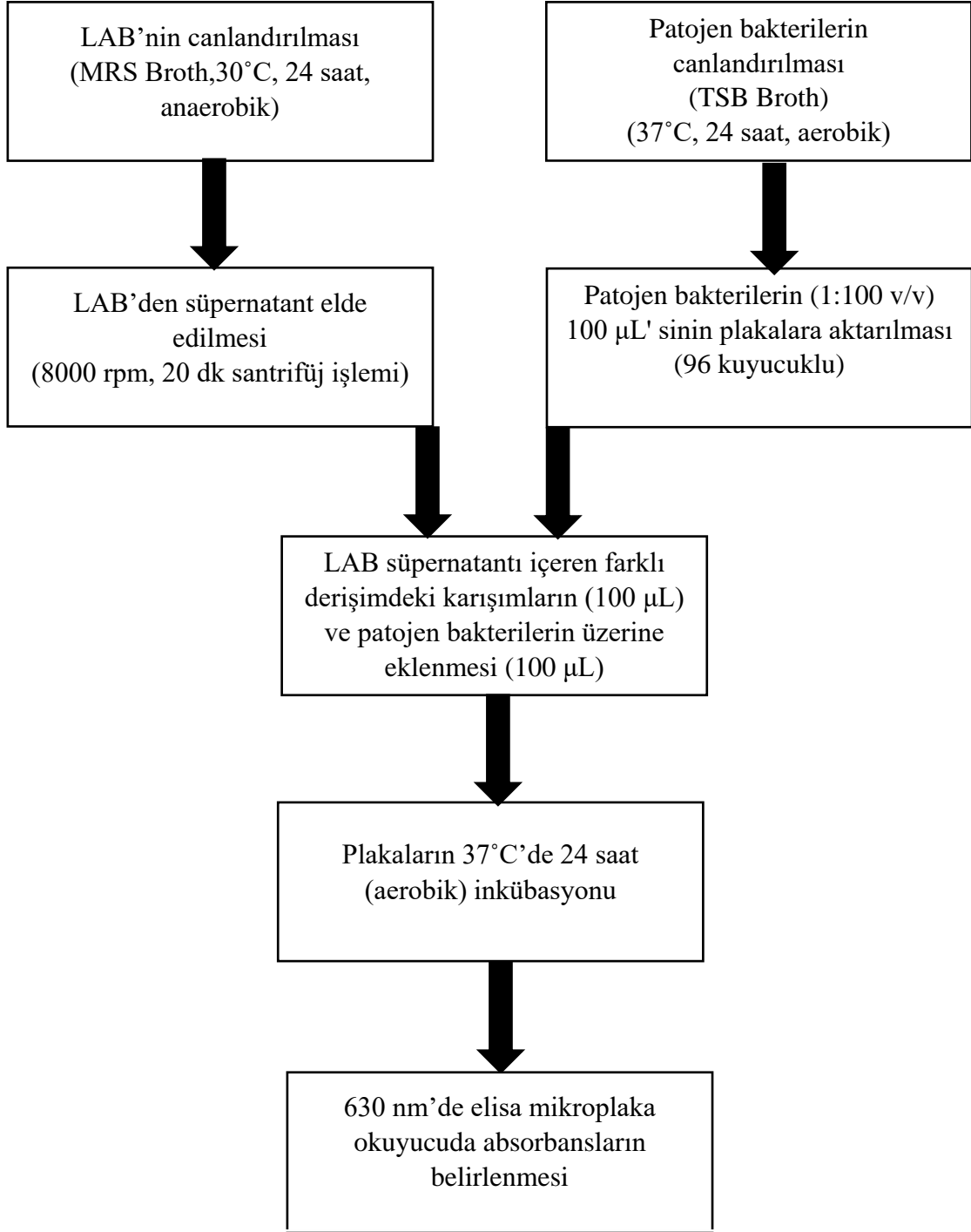


### 3.2.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Çalışmada kullanılan patojen bakteriler TSB (Merck) besiyerinde 37°C' de 24 saat (aerobik), LAB izolatları ise MRS Broth (Merck) besiyerinde 30°C'de 24 saat (anaerobik) inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda mikroorganizmaların her biri için sayım yapılmıştır. Aktifleştirilen laktik asit bakterilerine 8000 rpm'de 20 dakika olacak şekilde santrifüj işlemi uygulanmıştır. Bu işlemin sonucunda elde edilen süpernatantlar 0,2 µm'lik por çapına sahip steril membran filtreden (Minisart Syringe filter, hydrophilic) geçirilmiştir. Elde edilen süpernatantlardan (cell free supernatant) farklı yüzdelerde (%5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50) dilüsyon hazırlanmıştır. Bu dilüsyon seyreltme işlemi için Maximum Recovery Diluent (Merck) besiyeri kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna aktifleştirilen patojen bakterilerden 100 µL (1:100 v/v) ve hazırlanan farklı dilüsyon miktarına sahip süpernatantlardan (cell free supernatant) 100 µL olacak şekilde toplam 200 µL'lik karışımlar hazırlanmıştır. Hazırlanan plakalar 37°C'de aerobik ortamda 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda 630 nm'de elisa mikropilaka okuyucuda absorbanslar belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarla süpernatantların patojen bakterileri inhibisyon yüzdesi belirlenmiştir [103, 104]. İnhibisyon yüzdesi için kullanılan aşağıda gösterilmektedir.

$$\%İnhibisyon = [(I_{KONTROL} - I_{ÖRNEK}) / I_{KONTROL}] \times 100$$

$I_{KONTROL}$ , LAB'a ait süpernatantı içermeyen karışımların absorbans değerini,  $I_{ÖRNEK}$  ise LAB'sine ait süpernatantı ve patojen bakteriyi içeren 200 µL'lik karışımı temsil etmektedir. Bu yöntemle ait akım şeması Şekil 3.4' de gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi Akım Şeması

### 3.2.4. İstatistiksel Analiz

Laktik asit bakterilerinden elde edilen süpernatantların, gıda kaynaklı patojen bakterilere karşı etkisini gözlemek amacıyla uygulanan sıvı mikrodilüsyon yöntemi, agar spot yöntemi ve agar kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile araştırılmıştır. Her bir bakteri için mikrobiyel sayım yapılmıştır. Sayım sonucu belirlenen bakterilerin analizi iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Sıvı mikrodilüsyon yönteminde, gruplar arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak üzere Dunnett t (2-sided) çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Ayrıca bağımsız gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek amacıyla ise t- test kullanılmıştır. İstatistiksel analizler SPSS 21.0 istatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizlerin sonuçları için önemlilik düzeyi  $p < 0.05$  ve  $p < 0.01$  olarak belirlenmiştir.

## 4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

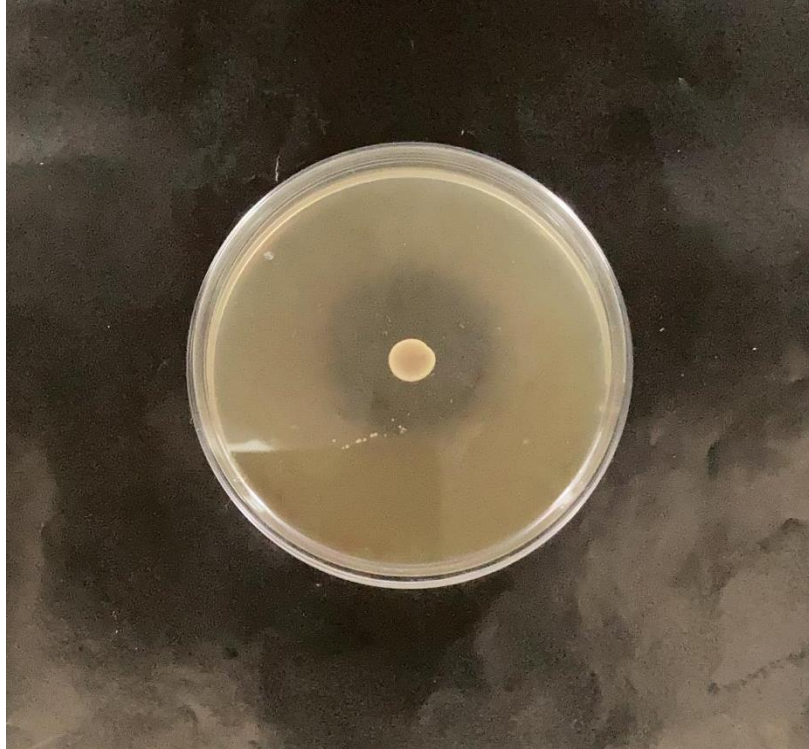
### 4.1. Sonuçlar

#### 4.1.1. Agar Spot Yöntemi Sonuçları

Çizelge 4.1’de belirtilen bakterilerin sayım sonuçlarına göre; LAB’dan Hp2 kodlu *L. plantarum*, *Bacillus cereus*’a karşı en büyük zonu 1,6 cm ile oluşturmuştur. En küçük zonu ise 1,075 cm ile Gc3 kodlu *L. brevis*’e ait bakteri oluşturmuştur. Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus*’a karşı en büyük zonu 1,125 cm ile LAB’dan Wz3 kodlu *L. plantarum*, en küçük zonu 0,95 cm ile Gc3 kodlu *L. brevis* ve İz1 kodlu *L. plantarum* oluşturmaktadır. *Escherichia coli* O104:H4’e karşı en büyük zonu ise 1,075 cm ile Wz3 kodlu *Lactobacillus plantarum*, en küçük zonu 0,6 cm ile İz1 kodlu *L. plantarum* oluşturmaktadır. *Yersinia enterocolitica*’ya karşı bir zon oluşumu gözlenmemiştir. Bu yöntemden elde edilen zon yarıçaplarının patojen bakteriler için standart sapması hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre oluşturulan sütun grafiği şekil 4.5’te verilmiştir. Yönteme ait görüntüler şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4’ de gösterilmektedir. Ayrıca sonuçlar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile araştırılmıştır ve çizelge 4.3’teki sonuçlar elde edilmiştir. Çizelge 4.2’de elde edilen zonların değeri verilmiştir. Bu sonuçlara göre LAB, tüm patojen bakterilere karşı istatistiksel açıdan önemli bir farklılık yarattığı sonucuna varılmıştır.



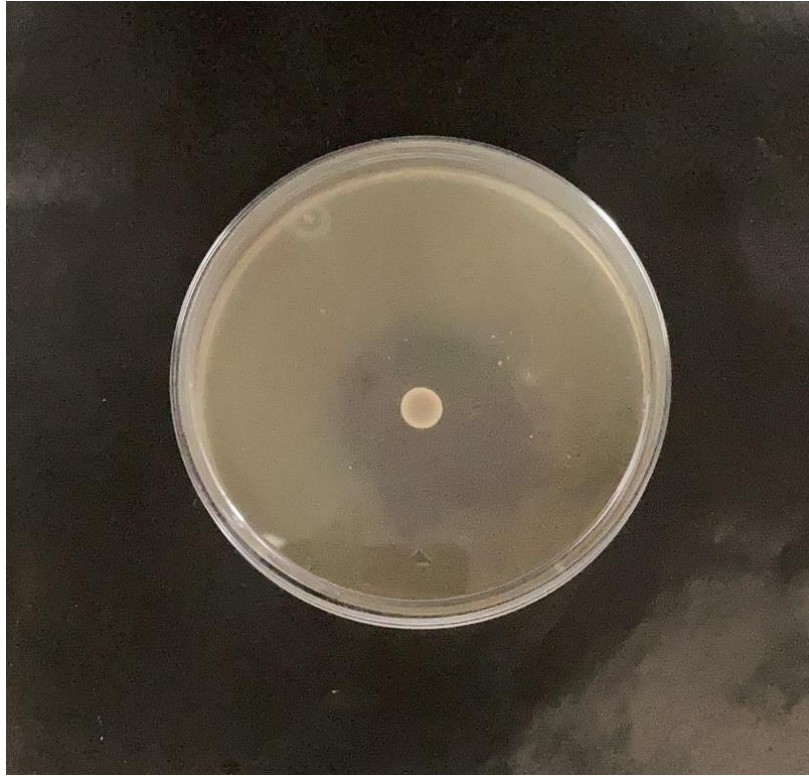
**Şekil 4.1.** İz1 kodlu LAB'ın *Bacillus cereus*' a karşı oluşturduğu zon



**Şekil 4.2.** Hp2 kodlu LAB'ın MRSA'ya karşı oluşturduğu zon



**Şekil 4.3.** Gc3 kodlu LAB'ın *E.coli* O104:H4'e karşı oluşturduğu zon



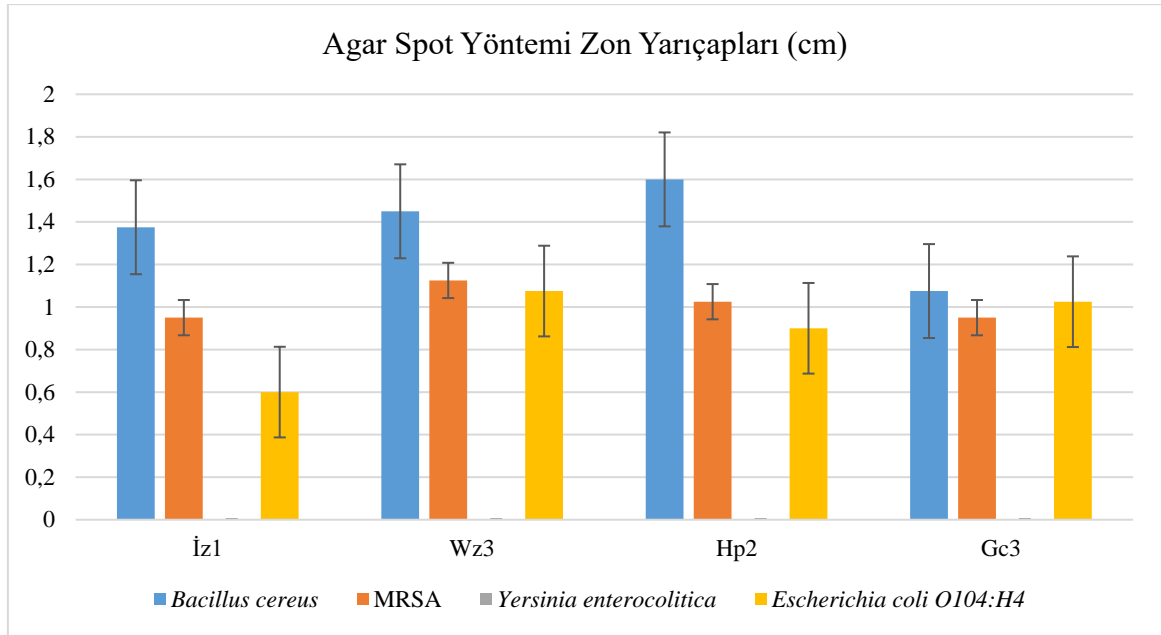
**Şekil 4.4.** Wz3 kodlu LAB'ın MRSA' ya karşı oluşturduğu zon

**Çizelge 4.1.** Agar Spot Yöntemi için Kullanılan Bakterilere Ait Sayım Sonuçları

Sayım Sonuçları	kob/mL
<b>Wz3</b>	1,14×10 <sup>10</sup>
<b>Hp2</b>	1,07×10 <sup>10</sup>
<b>İz1</b>	1,26×10 <sup>10</sup>
<b>Gc3</b>	9,6×10 <sup>9</sup>
<i>B. cereus</i>	8,85×10 <sup>7</sup>
<b>MRSA</b>	1,2×10 <sup>9</sup>
<i>Y. enterocolitica</i>	5×10 <sup>6</sup>
<i>E.coli</i> O104:H4	6,2×10 <sup>9</sup>

**Çizelge 4.2.** Agar Spot Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Zon Yarıçapları (cm)

LAB Türleri	Kodları	Patojen Mikroorganizmalar			
		<i>Bacillus cereus</i>	MRSA	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Escherichia coli</i> O104:H4
<i>L. plantarum</i>	İz1	1,375	0,95	-	0,6
<i>L. plantarum</i>	Wz3	1,45	1,125	-	1,075
<i>L. plantarum</i>	Hp2	1,6	1,025	-	0,9
<i>L. brevis</i>	Gc3	1,075	0,95	-	1,025



**Şekil 4.5.** Agar Spot Yöntemi Kullanılarak Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Zonların Yarıçapları Sütun Grafiği

**Çizelge 4.3.** Agar Spot Yöntemi Kullanılarak LAB'den Elde Edilen Zonların Tek yönlü Varyans Analizi Sonuçları

LAB	Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	Önem Düzeyi (p)
İz1	Dirençlilik	3	1,026	0,342	12,132	0,018*
	Hata	4	0,113	0,028		
	Genel	7	1,139			
Wz3	Dirençlilik	3	2,386	0,795	16,969	0,010*
	Hata	4	0,188	0,047		
	Genel	7	2,574			
Hp2	Dirençlilik	3	2,628	0,876	9,837	0,026*
	Hata	4	0,356	0,089		
	Genel	7	2,985			
Gc3	Dirençlilik	3	1,566	0,522	30,938	0,003**
	Hata	4	0,068	0,017		
	Genel	7	1,634			

İstatistiksel açıdan önemli, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

Benzer bir çalışmada, *L.plantarum*'un agar spot yöntemiyle birden fazla mikroorganizmayı inhibe ettiği tespit edilmiştir. İnhibe edilen mikroorganizmalar arasında *Y. enterocolitica* ve *Bacillus cereus* yer almaktadır. Ancak kuyu difüzyon sonucunda inhibisyon gözlemlenmemiştir [105]. Çalışmamızda elde edilen verilere göre *Y. enterocolitica*'da agar

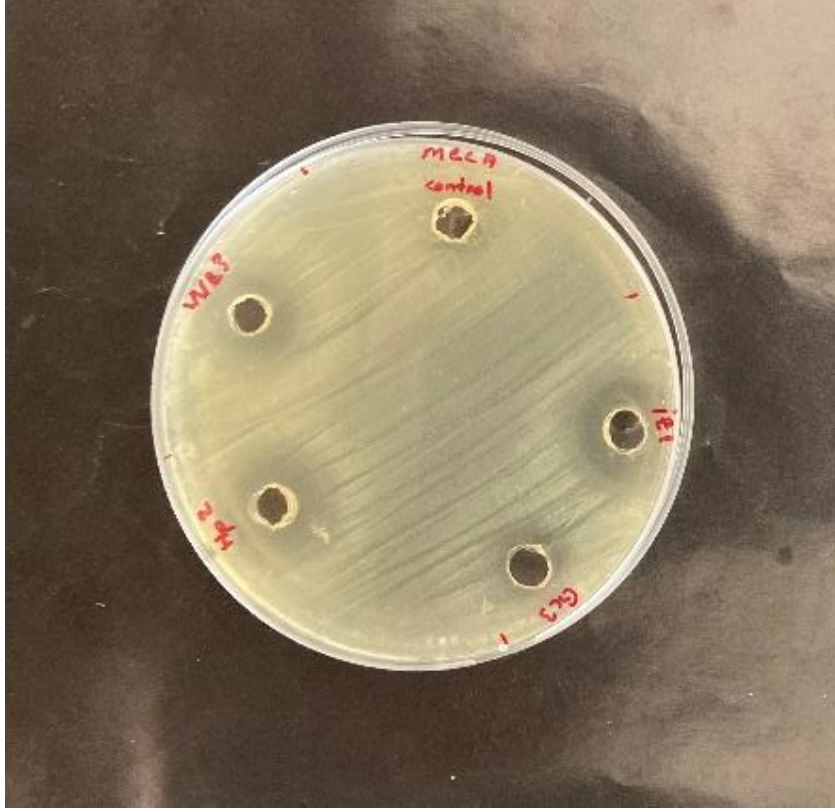


spot testinde zon gözlenmemiştir. Ancak agar kuyucuk difüzyon yönteminde bu bakteriye ait zon gözlemlenmiştir. *Bacillus cereus* için agar spot ve agar kuyucuk difüzyon yönteminde zon oluşumu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre *Bacillus cereus* için agar spot yöntemi sonuçlarımız benzerlik gösterirken, *Y. enterocolitica* için sonuçlarımız benzerlik göstermemektedir.

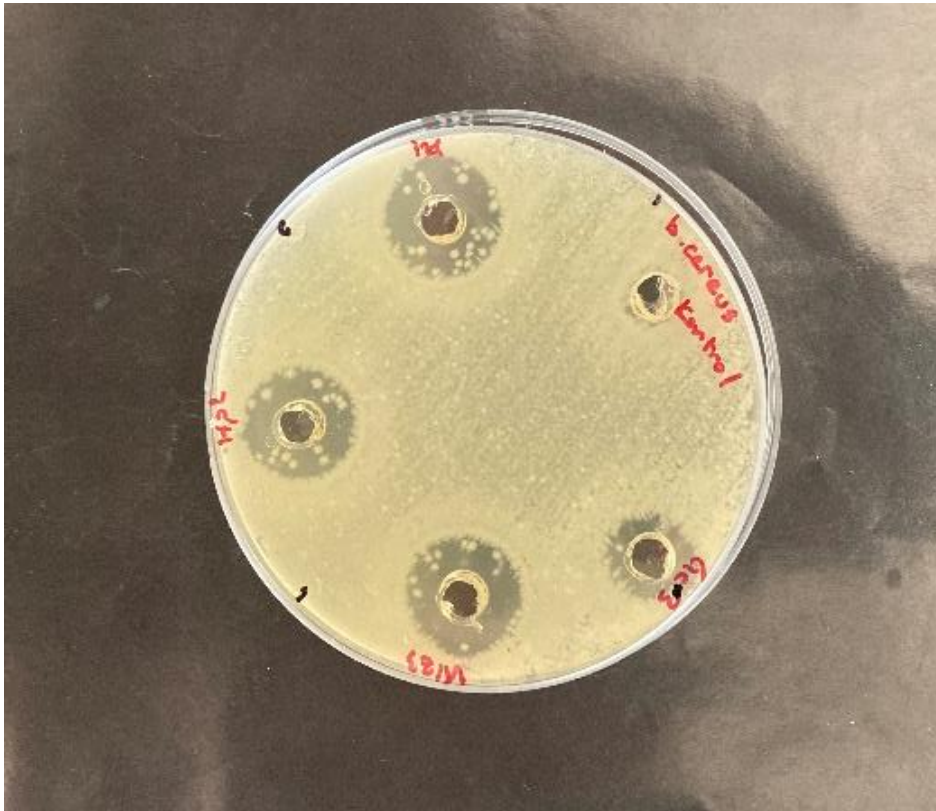
#### 4.1.2. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi Sonuçları

Çizelge 4.4' de belirtilen bakterilerin sayım sonuçlarına göre; Wz3 kodlu *L. plantarum*, *Bacillus cereus*'a karşı en büyük zonu 0,625 cm ile oluştururken, en küçük zonu 0,575 cm ile Gc3 kodlu *L. brevis* oluşturmaktadır. Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı en büyük zonu 0,525 cm ile Hp2 kodlu *L. plantarum*, en küçük zonu 0,5 cm ile Gc3 kodlu *L. brevis* ve İz1 kodlu *L. plantarum* oluşturmaktadır. *Escherichia coli* (O104:H4)'e karşı en büyük zonu 0,375 cm ile İz1 kodlu *L.s plantarum*, en küçük zonu 0,2875 ile Wz3 kodlu *L. plantarum* oluşturmaktadır. *Yersinia enterocolitica*'ya karşı en büyük zonu 0,8625 cm ile Hp2 kodlu *L. plantarum*, en küçük zonu 0,6 cm ile Gc3 kodlu *L. brevis* oluşturmaktadır. Oluşan zonların değerleri çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

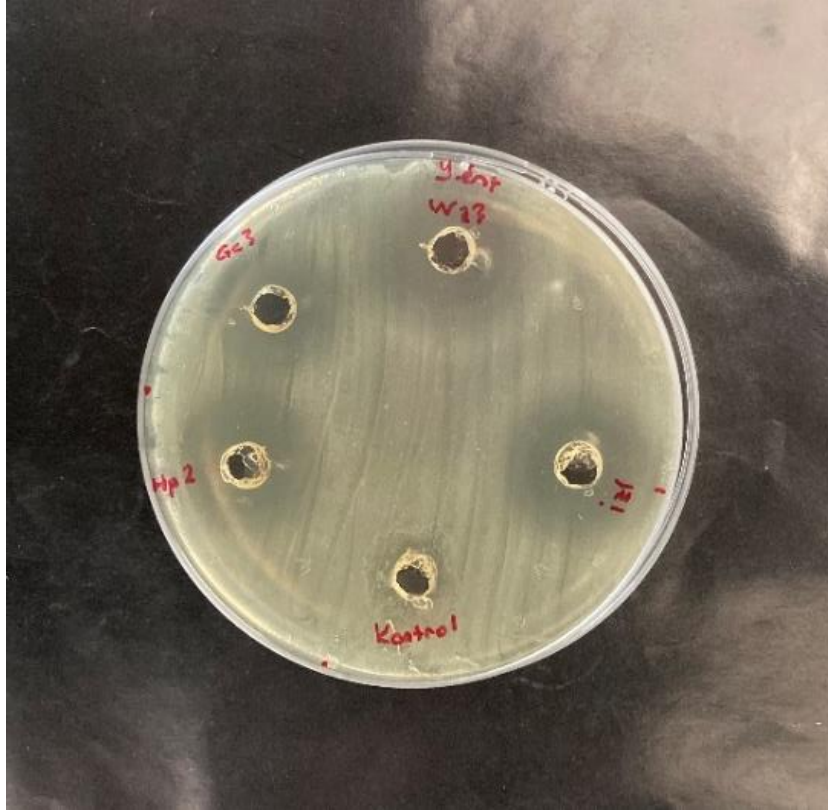
Bu yöntemden elde edilen zon yarıçaplarının patojen bakteriler için standart sapması hesaplanmıştır. Sonuçlara göre oluşturulan sütun grafiği şekil 4.10'da verilmiştir. Yönteme ait görüntüler şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4,9' da gösterilmektedir. Ayrıca sonuçlar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile araştırılmıştır ve çizelge 4.6' da görülen veriler elde edilmiştir. Bu verilere göre LAB'den, patojen bakterilere karşı *L. plantarum* (Hp2) ve *L. brevis* (Gc3)'in istatistiksel açıdan önemli bir farklılık yarattığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.6. LAB'ın MRSA'ya karşı oluşturduğu zon



Şekil 4.7. LAB'ın *Bacillus cereus*'a karşı oluşturduğu zon



Şekil 4.8. LAB'ın *Y. enterocolitica*'ya karşı oluşturduğu zon



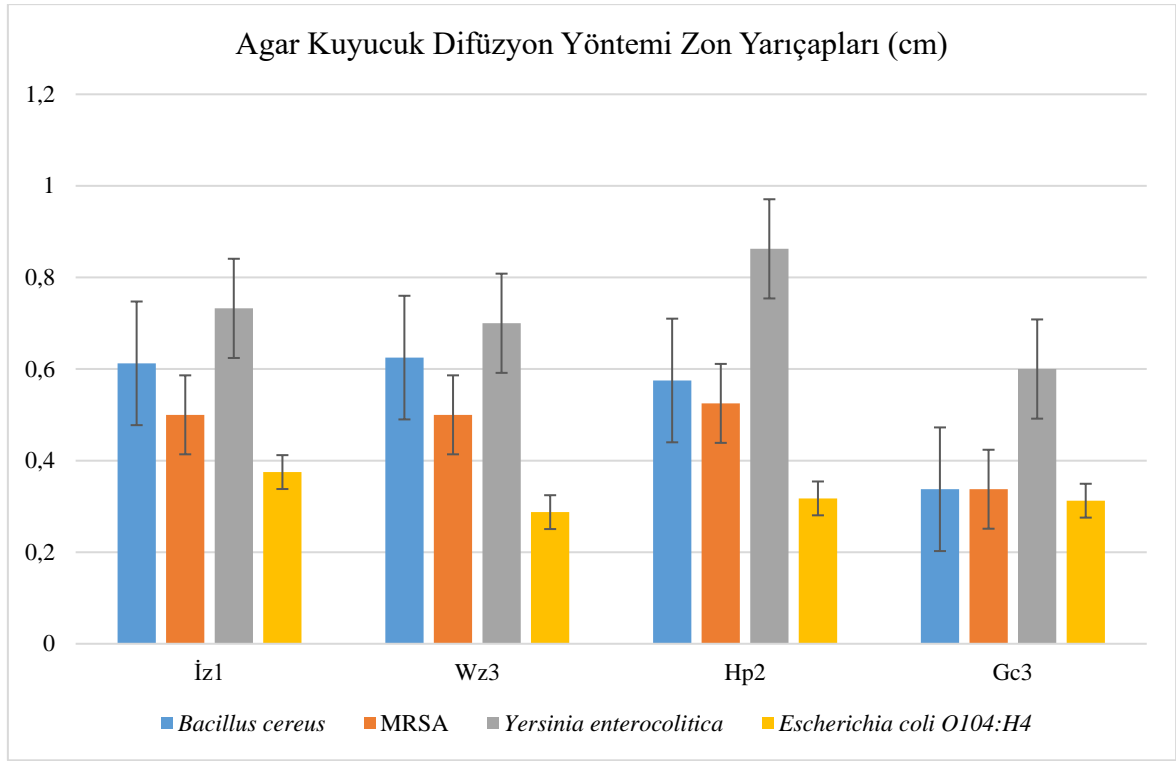
Şekil 4.9. LAB'ın *E. coli* O104:H4'e karşı oluşturduğu zon

**Çizelge 4.4.** Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi için Kullanılan Bakterilere Ait Sayım Sonuçları

Sayım Sonuçları	kob/mL
<b>Wz3</b>	$1,3 \times 10^{10}$
<b>Hp2</b>	$1,54 \times 10^{10}$
<b>İz1</b>	$1,14 \times 10^{10}$
<b>Gc3</b>	$9,85 \times 10^9$
<i>B. cereus</i>	$1,6 \times 10^7$
<b>MRSA</b>	$2,7 \times 10^8$
<i>Y. enterocolitica</i>	$8,2 \times 10^8$
<i>E.coli</i> <b>O104:H4</b>	$8,8 \times 10^{10}$

**Çizelge 4.5.** Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak Elde Edilen Zon Yarıçapları (cm)

		Patojen Mikroorganizmalar			
LAB Türleri	Kodları	<i>Bacillus cereus</i>	MRSA	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Escherichia coli</i> <b>O104:H4</b>
<i>L. plantarum</i>	<b>İz1</b>	0,6125	0,5	0,7325	0,375
<i>L. plantarum</i>	<b>Wz3</b>	0,625	0,5	0,7	0,2875
<i>L. plantarum</i>	<b>Hp2</b>	0,575	0,525	0,8625	0,3175
<i>L. brevis</i>	<b>Gc3</b>	0,3375	0,3375	0,6	0,3125



**Şekil 4.10.** Agar Kuyucuk Difüzyonu Yöntemi Kullanılarak Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Zonların Yarıçapları Sütun Grafiği

**Çizelge 4.6.** Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi Kullanılarak LAB'den Elde Edilen Zonların Tek yönlü Varyans Analizi Sonuçları

LAB	Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	Önem Düzeyi (p)
İz1	Dirençlilik	3	0,144	0,048	2,346	0,214
	Hata	4	0,082	0,020		
	Genel	7	0,226			
Wz3	Dirençlilik	3	0,195	0,065	3,345	0,137
	Hata	4	0,078	0,019		
	Genel	7	0,273			
Hp2	Dirençlilik	3	0,303	0,101	6,792	0,048*
	Hata	4	0,059	0,015		
	Genel	7	0,362			
Gc3	Dirençlilik	3	0,111	0,037	4,778	0,082*
	Hata	4	0,031	0,008		
	Genel	7	0,142			

İstatistiksel açıdan önemli, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

Daha önce yapılan bir çalışmada, agar difüzyon yöntemi sonuçlarına göre *L.acidophilus* ve *L.casei*'nin MRSA'yı %99 inhibe ettiği gözlemlenmiştir [106]. Bu çalışma kapsamında kullanılan bakteriler farklılık göstermektedir. Ancak yapılan deneyler sonucunda MRSA (mecA)'ya karşı antimikrobiyel etkinin bulunması sonucu açısından benzerlik göstermektedir.

Başka bir çalışmada, agar kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılarak *Lactobacillus plantarum* TF711' in *Bacillus cereus*' a karşı antimikrobiyel etki ettiği tespit edilmiştir [107]. Çalışmamızda kullanılan bakteriler farklılık göstermektedir. Ancak yapılan deneylerde *Bacillus cereus*'a karşı antimikrobiyel etki gözlemlenmiştir. Bu açıdan çalışmamız benzerlik göstermektedir.

#### 4.1.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi Sonuçları

Laktik asit bakterilerinden elde edilen sayım sonuçları çizelge 4.7, süpernatantların *Yersinia enterocolitica* için sonuçları ise çizelge 4.8 ve çizelge 4.9'da verilmiştir. Bu yöntemden elde edilen sonuçların inhibisyon yüzde grafiği şekil 4.11'de verilmiştir.

**Çizelge 4.7.** *Yersinia enterocolitica* ve Laktik Asit Bakterileri Mikrobiyel Sayım Sonuçları

Sayım Sonuçları	kob/mL
Wz3	1,286×10 <sup>10</sup>
Hp2	9,5×10 <sup>9</sup>
İz1	9,7×10 <sup>9</sup>
Gc3	4,3×10 <sup>9</sup>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3,45×10 <sup>8</sup>

**Çizelge 4.8.** Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların *Yersinia enterocolitica* için Tek yönlü Varyans Analizi Sonuçları

Derişim (%)	Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	Önem Düzeyi (p)
%5	Dirençlilik	4	0,033	0,008	0,553	0,707
	Hata	5	0,075	0,015		
	Genel	9	0,108			
%10	Dirençlilik	4	0,035	0,009	0,750	0,598
	Hata	5	0,059	0,012		
	Genel	9	0,094			
%15	Dirençlilik	4	0,125	0,031	76,081	0,000**
	Hata	5	0,002	0,000		
	Genel	9	0,127			
%20	Dirençlilik	4	0,537	0,134	0,961	0,502
	Hata	5	0,699	0,140		
	Genel	9	1,127			
%25	Dirençlilik	4	0,353	0,088	1,031	0,473
	Hata	5	0,428	0,086		
	Genel	9	0,782			
%30	Dirençlilik	4	0,087	0,022	14,862	0,006**
	Hata	5	0,007	0,001		
	Genel	9	0,094			
%35	Dirençlilik	4	0,074	0,019	4,490	0,065
	Hata	5	0,021	0,004		
	Genel	9	0,095			
%40	Dirençlilik	4	0,037	0,009	12,640	0,008**
	Hata	5	0,004	0,001		
	Genel	9	0,041			
%45	Dirençlilik	4	0,173	0,043	2,801	0,144
	Hata	5	0,077	0,015		
	Genel	9	0,250			
%50	Dirençlilik	4	0,175	0,044	4,146	0,075
	Hata	5	0,053	0,011		
	Genel	9	0,228			

*İstatistiksel açıdan önemli- t- test, \*p<0.05, \*\*p<0.01*

**Çizelge 4.9.** Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların *Yersinia enterocolitica* için Ortalamaları

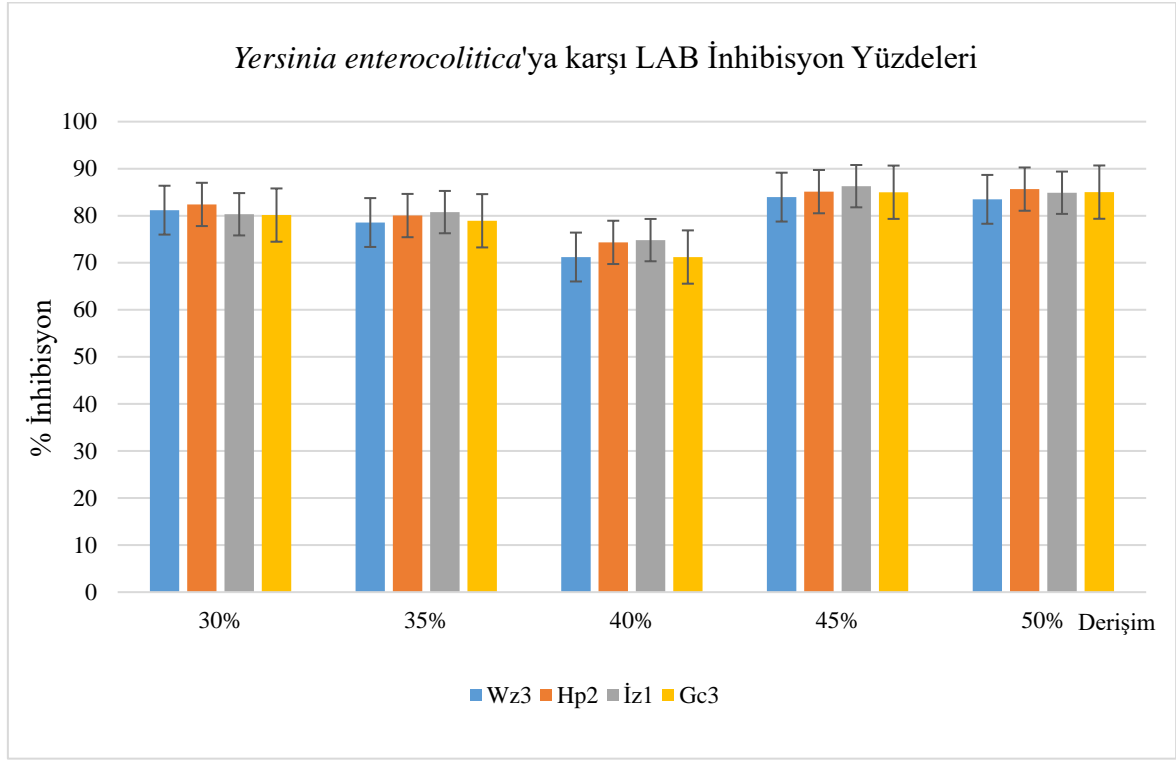
Derişim (%) (Ortalama $\pm$ S.H.)	LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ					
	Kontrol	Wz3	Hp2	İz1	Gc3	Toplam
<b>%5</b>	0,4250 $\pm$ 0,1030	0,4115 $\pm$ 0,0265	0,2795 $\pm$ 0,0475	0,3270 $\pm$ 0,0550	0,4125 $\pm$ 0,1445	0,3711 $\pm$ 0,346
<b>%10</b>	0,281 $\pm$ 0,0515	0,4115 $\pm$ 0,0265	0,2795 $\pm$ 0,0475	0,327 $\pm$ 0,055	0,4125 $\pm$ 0,1445	0,3422 $\pm$ 0,324
<b>%15</b>	0,3295 $\pm$ 0,0125c	0,058 $\pm$ 0,007a	0,0515 $\pm$ 0,0015a	0,048 $\pm$ 0,002a	0,1985 $\pm$ 0,0285b	0,1371 $\pm$ 0,0375
<b>%20</b>	0,3255 $\pm$ 0,0975	0,0515 $\pm$ 0,0015	0,049 $\pm$ 0,001	0,049 $\pm$ 0,000	0,633 $\pm$ 0,583	0,2216 $\pm$ 0,1172
<b>%25</b>	0,3235 $\pm$ 0,0265	0,0545 $\pm$ 0,0025	0,0555 $\pm$ 0,0075	0,0535 $\pm$ 0,0055	0,5130 $\pm$ 0,4620	0,2000 $\pm$ 0,0932
<b>%30</b>	0,287 $\pm$ 0,0600b	0,054 $\pm$ 0,0010a	0,505 $\pm$ 0,0005a	0,0565 $\pm$ 0,0015a	0,0570 $\pm$ 0,0060a	0,1010 $\pm$ 0,0322a
<b>%35</b>	0,2705 $\pm$ 0,1015	0,0580 $\pm$ 0,001	0,054 $\pm$ 0,001	0,052 $\pm$ 0,004	0,057 $\pm$ 0,002	0,0983 $\pm$ 0,3246
<b>%40</b>	0,2085 $\pm$ 0,0425b	0,06 $\pm$ 0,002a	0,0535 $\pm$ 0,0005a	0,0525 $\pm$ 0,0025a	0,06 $\pm$ 0,004a	0,0869 $\pm$ 0,0213a
<b>%45</b>	0,3865 $\pm$ 0,1965	0,0620 $\pm$ 0,003	0,0575 $\pm$ 0,0005	0,053 $\pm$ 0,002	0,058 $\pm$ 0,002	0,1234 $\pm$ 0,0527
<b>%50</b>	0,3905 $\pm$ 0,1625	0,0645 $\pm$ 0,0015	0,3905 $\pm$ 0,1625	0,059 $\pm$ 0,005	0,0585 $\pm$ 0,0005	0,1257 $\pm$ 0,0504

S.H.=Standart Hata.

Çizelge 4.8 'de yer alan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve çizelge 4.9' da bakterilerin farklı konsantrasyonlardaki ortalamaları yer almaktadır. Birbirinden farklı bakterilerin farklı derişimlerdeki gıda kaynaklı patojen olan *Yersinia enterocolitica* ile etkileşiminin istatistiksel olarak önemli bir farklılık oluşturup oluşturmadığına bakılmıştır. %15, %30 ve %40 derişimlerdeki süpernatantların önemli bir farklılık yarattığı sonucuna varılmaktadır ( $p < 0,05$ ). Kontrol grubu için en düşük ortalama %40 derişimde, Wz3 (*L. plantarum*) kodlu laktik asit bakterisine ait süpernatant için en düşük ortalama %20 derişimde, Hp2 (*L. plantarum*) kodlu laktik asit bakterisine ait süpernatant için en düşük ortalama %25 derişimde, İz1 (*L. plantarum*) kodlu laktik asit bakterisine ait süpernatant için en düşük ortalama %15 derişimde, Gc3 (*L. brevis*) kodlu laktik asit bakterisine ait süpernatant için en



düşük ortalama %30 derişimde bulunurken toplam ortalama en düşük %40 derişimde hesaplanmıştır.



**Şekil 4.11.** Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların %30, %35, %40, %45 ve %50 Derişimlerinde *Y. enterocolitica*'yı İnhibe Etme Yüzdeleri

Sıvı mikrodilüsyon yönteminden elde edilen sonuçlara göre inhibisyon yüzleri hesaplanmıştır. Sonuçlara göre *L. brevis* (Gc3) 'e ait süpernatantın inhibisyon derişimi *Y. enterocolitica* için %45 olarak belirlenmiş olup, bu derişimde  $\geq$  %80 oranında inhibisyon gözlenmiştir. Diğer tüm LAB için ise %15 derişimde  $\geq$  %75-80 oranında inhibisyon olduğu sonucuna varılmıştır.

Laktik asit bakterileri ve *Bacillus cereus* için yapılan sayım sonuçları çizelge 4.10'da verilmiştir. Laktik asit bakterilerinden elde edilen süpernantların *Bacillus cereus* için oluşturduğu sonuçlar çizelge 4.11 ve çizelge 4.12'de gösterilmiştir. Bu yöntemden elde edilen sonuçların inhibisyon yüzde grafiği şekil 4.12'de verilmiştir.

**Çizelge 4.10.** *Bacillus cereus* ve Laktik Asit Bakterileri Mikrobiyel Sayım Sonuçları

Sayım Sonuçları	kob/mL
Wz3	1,286×10 <sup>10</sup>
Hp2	9,5×10 <sup>9</sup>
İz1	9,7×10 <sup>9</sup>
Gc3	4,3×10 <sup>9</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	1,6×10 <sup>8</sup>

**Çizelge 4.11.** Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların *Bacillus Cereus* için Tek yönlü Varyans Analizi Sonuçları

Derişim (%)	Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	Önem Düzeyi (p)
%5	Dirençlilik	4	0,033	0,008	0,553	0,707
	Hata	5	0,075	0,015		
	Genel	9	0,108			
%10	Dirençlilik	4	0,035	0,009	0,750	0,598
	Hata	5	0,059	0,012		
	Genel	9	0,094			
%15	Dirençlilik	4	0,125	0,031	76,081	0,000**
	Hata	5	0,002	0,000		
	Genel	9	0,127			
%20	Dirençlilik	4	0,537	0,134	0,961	0,502
	Hata	5	0,699	0,140		
	Genel	9	1,127			
%25	Dirençlilik	4	0,353	0,088	1,031	0,473
	Hata	5	0,428	0,086		
	Genel	9	0,782			
%30	Dirençlilik	4	0,087	0,022	14,862	0,006**
	Hata	5	0,007	0,001		
	Genel	9	0,094			
%35	Dirençlilik	4	0,074	0,019	4,490	0,065
	Hata	5	0,021	0,004		
	Genel	9	0,095			
%40	Dirençlilik	4	0,037	0,009	12,640	0,008**
	Hata	5	0,004	0,001		
	Genel	9	0,041			
%45	Dirençlilik	4	0,173	0,043	2,801	0,144
	Hata	5	0,077	0,015		
	Genel	9	0,250			
%50	Dirençlilik	4	0,175	0,044	4,146	0,075**
	Hata	5	0,053	0,011		
	Genel	9	0,228			

İstatistiksel açıdan önemli- *t*-test, \**p*<0.05, \*\**p*<0.01

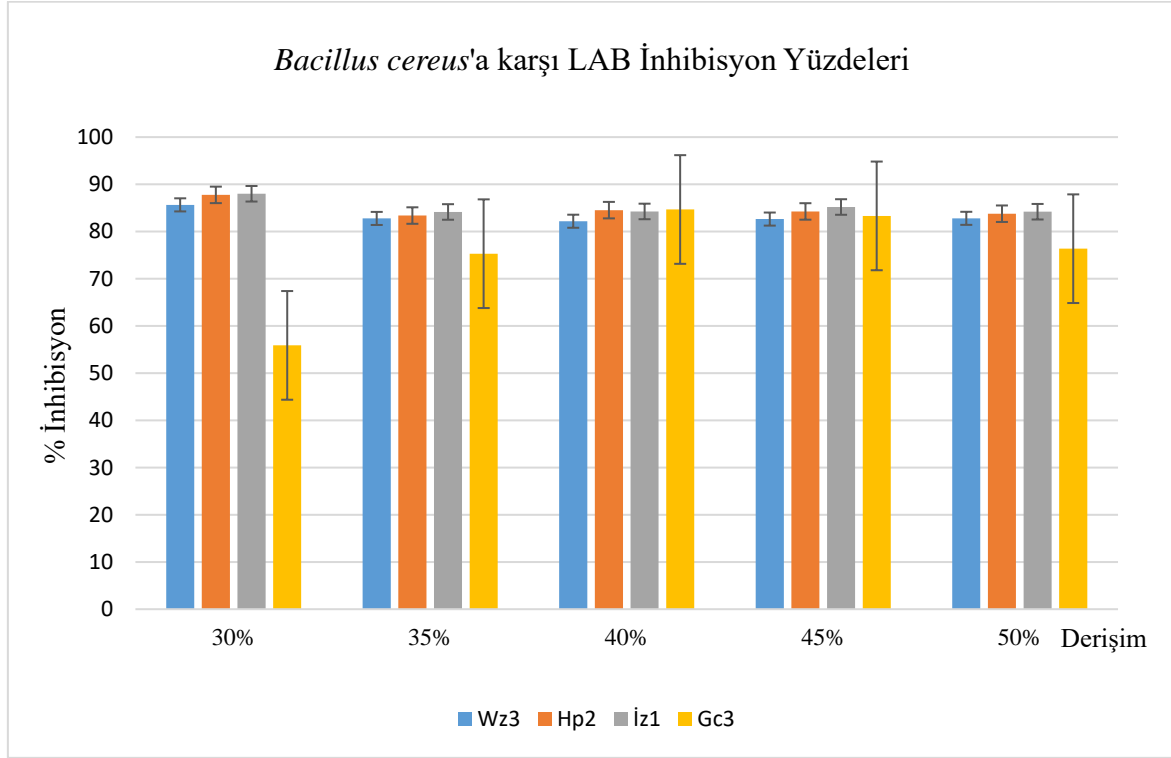
**Çizelge 4.12.** Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların *Bacillus cereus* için Ortalamaları

Derişim (%) (Ortalama ± S.H.)	LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ					
	Kontrol	Wz3	Hp2	İz1	Gc3	Toplam
<b>%5</b>	0,490 ± 0,118	0,343 ± 0,04	0,3565 ± 0,495	0,3305 ± 0,0365	0,7315 ± 0,2825	0,4503 ± 0,069
<b>%10</b>	0,458 ± 0,031b	0,049 ± 0,003a	0,0485 ± 0,0015a	0,047 ± 0,001a	0,431 ± 0,064 b	0,2067 ± 0,0656
<b>%15</b>	0,468 ± 0,043b	0,05 ± 0,001a	0,0475 ± 0,0005a	0,0475 ± 0,0005a	0,4015 ± 0,0145b	0,2029 ± 0,0638
<b>%20</b>	0,4875 ± 0,0525 b	0,053 ± 0,003a	0,0555 ± 0,0015a	0,054 ± 0,006a	0,3965 ± 0,0045b	0,2093 ± 0,6454
<b>%25</b>	0,408 ± 0,038b	0,0585 ± 0,0025a	0,053 ± 0,001a	0,0595 ± 0,0115a	0,3455 ± 0,0415b	0,1849 ± 0,0533
<b>%30</b>	0,425 ± 0,013c	0,061 ± 0,002a	0,052 ± 0,001a	0,051 ± 0,002a	0,1875 ± 0,235b	0,1553 ± 0483
<b>%35</b>	0,328 ± 0,036b	0,0565 ± 0,0005a	0,0545 ± 0,0005a	0,052 ± 0,001a	0,081 ± 0,27a	0,1144 ± 0,0364
<b>%40</b>	0,362 ± 0,01b	0,0645 ± 0,0055a	0,056 ± 0,00a	0,057 ± 0,00 a	0,0555 ± 0,0015 a	0,119 ± 0,0406
<b>%45</b>	0,3715 ± 0,0055b	0,0645 ± 0,0035 a	0,0585 ± 0,0035 a	0,055 ± 0,00a	0,062 ± 0,004a	0,1223 ± 0,0416
<b>%50</b>	0,3575 ± 0,225b	0,0615 ± 0,0005a	0,058 ± 0,002a	0,0565 ± 0,0005a	0,0845 ± 0,0205 a	0,1236 ± 0,0394

S.H.=Standart Hata.

Çizelge 4.11’de yer alan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve çizelge 4.12’ de bakterilerin farklı konsantrasyonlardaki ortalamaları yer almaktadır. Birbirinden farklı bakterilerin farklı derişimlerdeki gıda kaynaklı patojen olan *Bacillus cereus* ile etkileşiminin istatistiksel olarak önemli bir farklılık oluşturup oluşturmadığına bakılmıştır. %15, %30 ve %40 derişimlerdeki süpernatantların önemli bir farklılık yarattığı sonucuna varılmaktadır (p<0,05). Kontrol grubu için en düşük ortalama %35 derişimde, Wz3 (*L.plantarum*) kodlu laktik asit bakterisine ait süpernatant için en düşük ortalama %10 derişimde, Hp2 (*L.plantarum*) kodlu laktik asit bakterisine ait süpernatant için en düşük ortalama %30 derişimde, İz1 (*L.plantarum*) kodlu laktik asit bakterisine ait süpernatant için en düşük

ortalama %10 derişimde, Gc3 (*L. brevis*) kodlu laktik asit bakterisine ait süpernatant için en düşük ortalama %40 derişimde bulunurken toplam ortalama en düşük %35 derişimde hesaplanmıştır.



**Şekil 4.12.** Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların %30, %35, %40, %45 ve %50 Derişimlerinde *Bacillus cereus*'u İnhibe Etme Yüzdeleri

Şekil 4.12'ye göre *L. brevis* (Gc3)'e ait süpernatantın gerçekleştirdiği inhibisyon %40 derişimde  $\geq$ %80 olarak belirlenmiştir. %5, %10, %15, %20, %25, %30 ve %35 derişimlerinde inhibisyon değeri  $\geq$ %80'i göstermemektedir. *L. plantarum* (İz1, Hp2, Wz3)'a ait süpernatantlar %5 derişimde  $\geq$ %80 inhibisyon göstermezken %10, %15, %20, %25 derişimde  $\geq$ %80 inhibisyon gerçekleştirmiştir. İnhibisyon değerinin  $\geq$ %80 olarak belirtilmesinin sebebi tüm laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının patojen bakteriye karşı aynı seviyede ve en yüksek etkiye sahip inhibisyon yüzdesi olmasıdır.

Laktik asit bakterileri ve *Escherichia coli* O104:H4 için yapılan sayım sonuçları çizelge 4.13'de verilmiştir. Laktik asit bakterilerinden elde edilen süpernatantların *Escherichia coli* O104:H4 için istatistiksel değerlendirmeye ait sonuçları çizelge 4.14 ve çizelge 4.15'de,

bakterilere ait sayım sonuçları ise Çizelge 4.13'te verilmiştir. Bu yöntemden elde edilen sonuçların inhibisyon yüzde grafiği şekil 4.13'de verilmiştir.

**Çizelge 4.13.** *Escherichia coli* O104:H4 ve Laktik Asit Bakterileri Mikrobiyel Sayım Sonuçları

Sayım Sonuçları	kob/mL
Wz3	1,286×10 <sup>10</sup>
Hp2	9,5×10 <sup>9</sup>
İz1	9,7×10 <sup>9</sup>
Gc3	4,3×10 <sup>9</sup>
<i>Escherichia coli</i> O104:H4	1,125×10 <sup>10</sup>

**Çizelge 4.14.** Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların *Escherichia coli* O104:H4 için Tek yönlü Varyans Analizi Sonuçları

Derişim (%)	Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	Önem Düzeyi (p)
%5	Dirençlilik	4	0,245	0,061	1,088	0,452
	Hata	5	0,282	0,056		
	Genel	9	0,527			
%10	Dirençlilik	4	1,028	0,257	40,597	0,001**
	Hata	5	0,032	0,006		
	Genel	9	1,059			
%15	Dirençlilik	4	2,643	0,661	65,467	0,000**
	Hata	5	0,050	0,010		
	Genel	9	2,693			
%20	Dirençlilik	4	2,925	0,731	43,220	0,000**
	Hata	5	0,085	0,017		
	Genel	9	3,010			
%25	Dirençlilik	4	2,686	0,672	246,942	0,000**
	Hata	5	0,014	0,003		
	Genel	9	2,700			
%30	Dirençlilik	4	2,205	0,551	46,810	0,000**
	Hata	5	0,059	0,012		
	Genel	9	2,264			
%35	Dirençlilik	4	1,795	0,449	168,125	0,000**
	Hata	5	0,013	0,003		
	Genel	9	1,809			
%40	Dirençlilik	4	1,696	0,424	11,222	0,010**
	Hata	5	0,189	0,038		
	Genel	9	1,885			

<b>%45</b>	<b>Dirençlilik</b>	4	1,900	0,475	491,250	0,000**
	<b>Hata</b>	5	0,005	0,001		
	<b>Genel</b>	9	1,905			
<b>%50</b>	<b>Dirençlilik</b>	4	1,455	0,364	522,017	0,000**
	<b>Hata</b>	5	0,003	0,001		
	<b>Genel</b>	9	1,458			

İstatistiksel açıdan önemli- t- test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

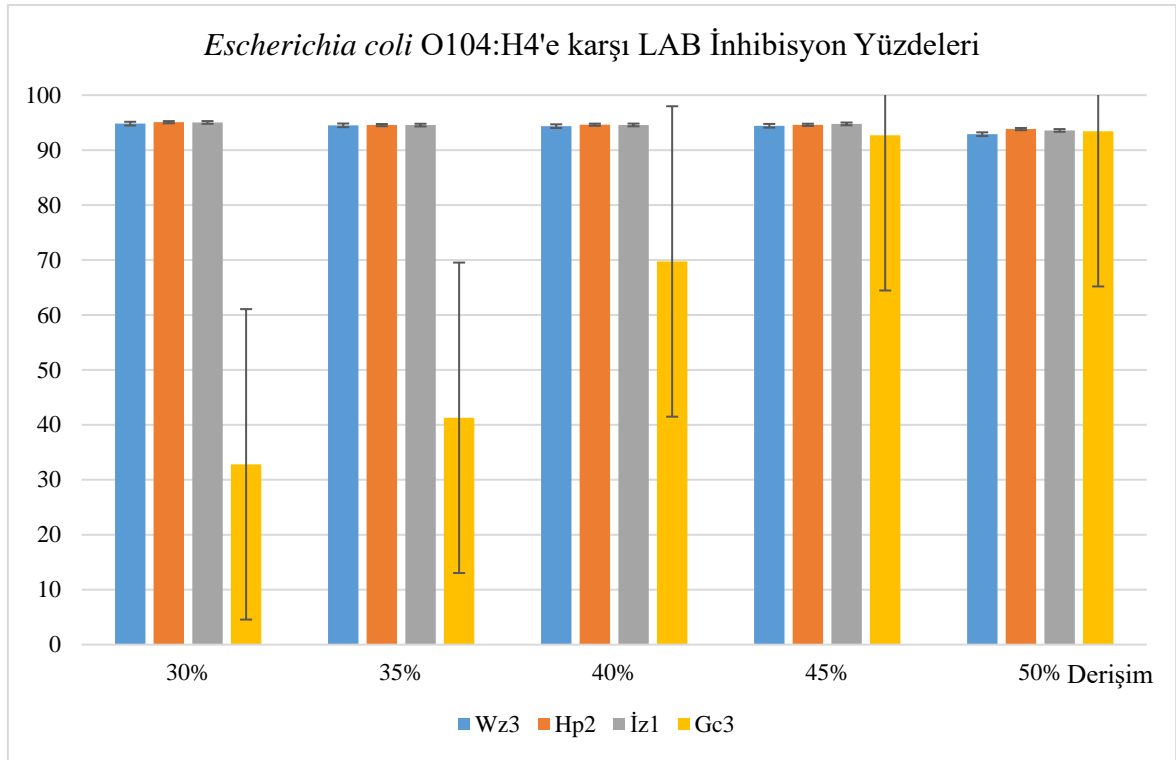
**Çizelge 4.15.** Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların *Escherichia coli* O104:H4 için Ortalamaları

Derişim (%) (Ortalama ± S.H.)	LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ					
	Kontrol	Wz3	Hp2	İz1	Gc3	Toplam
<b>%5</b>	1,192 ± 0,119	1,206 ± 0,278	1,2015 ± 0,1375	1,3025 ± 0,1745	1,3012 ± 0,004	1,3012 ± 0,0765
<b>%10</b>	1,173 ± 0,0220	0,728 ± 0,014	0,6595 ± 0,0855	0,601 ± 0,001	1,4135 ± 0,0885	0,915 ± 0,1085
<b>%15</b>	1,074 ± 0,137	0,079 ± 0,019	0,063 ± 0,004	0,056 ± 0,001	1,154 ± 0,078	0,4852 ± 0,173
<b>%20</b>	1,208 ± 0,123	0,085 ± 0,03	0,056 ± 0,004	0,054 ± 0,003	1,127 ± 0,162	0,506 ± 0,1828
<b>%25</b>	1,242 ± 0,072	0,0625 ± 0,0025	0,0575 ± 0,0025	0,0565 ± 0,0015	0,96 ± 0,04	0,4757 ± 0,1732
<b>%30</b>	1,178 ± 0,154	0,061 ± 0,004	0,058 ± 0,003	0,0585 ± 0,0025	0,7915 ± 0,0755	0,4294 ± 0,1586
<b>%35</b>	1,101 ± 0,041	0,0605 ± 0,0051	0,06 ± 0,002	0,06 ± 0,004	0,6465 ± 0,0705	0,3856 ± 0,1417
<b>%40</b>	1,125 ± 0,144	0,0635 ± 0,0015	0,0605 ± 0,0035	0,061 ± 0,003	0,3405 ± 0,2715	0,3301 ± 0,1447
<b>%45</b>	1,1575 ± 0,0485	0,0645 ± 0,0015	0,0625 ± 0,0045	0,0605 ± 0,0055	0,0845 ± 0,0035	0,2859 ± 0,1455
<b>%50</b>	1,0205 ± 0,0405	0,0725 ± 0,0065	0,063 ± 0,005	0,0655 ± 0,0055	0,067 ± 0,002	0,2577 ± 0,1273

S.H.=Standart Hata.

Çizelge 4.14' de yer alan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Çizelge 4.15' de bakterilerin farklı konsantrasyonlardaki ortalamaları yer almaktadır. Birbirinden farklı bakterilerin farklı derişimlerdeki gıda kaynaklı patojen olan *Escherichia coli* O104:H4 ile

etkileşiminin istatistiksel olarak önemli bir farklılık oluşturup oluşturmadığına bakılmıştır. %5 derişim dışındaki tüm derişimlerde süpernatantların önemli bir farklılık yarattığı sonucuna varılmaktadır ( $p < 0,05$ ). Kontrol grubu için en düşük ortalama %50 derişimde, Wz3 (*L.plantarum*) kodlu laktik asit bakterisine ait süpernatant için en düşük ortalama %35 derişimde, Hp2 (*L.plantarum*) kodlu laktik asit bakterisine ait süpernatant için en düşük ortalama %20 derişimde, İz1 (*L.plantarum*) kodlu laktik asit bakterisine ait süpernatant için en düşük ortalama %20 derişimde, Gc3 (*L. brevis*) kodlu laktik asit bakterisine ait süpernatant için en düşük ortalama %50 derişimde bulunurken toplam ortalama en düşük %50 derişimde hesaplanmıştır.



**Şekil 4.13.** Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların %30, %35, %40, %45 ve %50 Derişimlerinde *E. coli* O104:H4'ü İnhibe Etme Yüzdeleri

*L. brevis* (Gc3), %5, %10, %15, %20, %25, %30, %35 ve %40 derişimlerinde patojen bakteriye karşı herhangi bir etki göstermemiştir. Grafiğe yansıtıldığında bu etkinin ancak %30 derişimde olduğu gözlenmektedir. Hata payının yüksek olması derişimler arası değerlerin farklılık göstermesinden kaynaklanmaktadır.

Şekil 4.13'e göre *L. brevis* (Gc3), %45 derişimde  $\geq$  %90 oranında inhibisyon gerçekleştirmiştir. *L. plantarum* (İz1, Hp2, Wz3)'a ait süpernatantların %5 ve %10 derişimde patojen bakteriye karşı %80'e varan etkisi görölmediğinden grafiğeyan stılmamıştır. %15 derişimde  $\geq$ %90 oranında *L. plantarum* (İz1, Hp2, Wz3)'a ait süpernatantların inhibisyon gerçekleştirdiğiyörölmemektedir. Sonuçların uyuzmazlığı sebebiyle en etkisiz bakterinin *E.coli* 0104:H4'e karşı hangisi olduğı hakkında kesin bir sonuca varmak mümkün olmamaktadır.

Laktik asit bakterileri ve Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) için yapılan sayım sonuçları çizelge 4.16'da verilmiştir. Laktik asit bakterilerinden elde edilen süpernatantların Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) için sonuçları Çizelge 4.17 ve Çizelge 4.18 'de ve bu yöntemden elde edilen sonuçların inhibisyon yüzde grafiğı şekil 4.14'de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.16.** Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve Laktik Asit Bakterileri Mikrobiyel Sayım Sonuçları

Sayım Sonuçları	kob/mL
Wz3	$1,286 \times 10^{10}$
Hp2	$9,5 \times 10^9$
İz1	$9,7 \times 10^9$
Gc3	$4,3 \times 10^9$
MRSA	$1,66 \times 10^7$

**Çizelge 4.17.** Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) için Tek yönlü Varyans Analizi Sonuçları

Derişim (%)	Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	Önem Düzeyi (p)
%5	Dirençlilik	4	0,184	0,046	3,557	0,098
	Hata	5	0,065	0,013		
	Genel	9	0,248			
%10	Dirençlilik	4	0,476	0,119	23,514	0,002**
	Hata	5	0,025	0,005		
	Genel	9	0,501			
%15	Dirençlilik	4	0,397	0,099	31,495	0,001**
	Hata	5	0,016	0,003		
	Genel	9	0,413			



%20	Dirençlilik	4	0,331	0,083	31,093	0,001**
	Hata	5	0,013	0,003		
	Genel	9	0,345			
%25	Dirençlilik	4	0,315	0,079	32,374	0,001**
	Hata	5	0,012	0,002		
	Genel	9	0,327			
%30	Dirençlilik	4	0,221	0,055	30,045	0,001**
	Hata	5	0,009	0,002		
	Genel	9	0,231			
%35	Dirençlilik	4	0,225	0,056	14,337	0,006**
	Hata	5	0,020	0,004		
	Genel	9	0,245			
%40	Dirençlilik	4	0,298	0,074	102,821	0,000**
	Hata	5	0,004	0,001		
	Genel	9	0,301			
%45	Dirençlilik	4	0,287	0,072	310,207	0,000**
	Hata	5	0,001	0,000		
	Genel	9	0,288			
%50	Dirençlilik	4	0,470	0,117	4449,167	0,000**
	Hata	5	0,000	0,000		
	Genel	9	0,470			

İstatistiksel açıdan önemli- t- test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

**Çizelge 4.18.** Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların Metisiline-dirençli *S. aureus* (MRSA) için Ortalamaları

Derişim (%) (Ortalama ± S.H.)	LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ					
	Kontrol	Wz3	Hp2	İz1	Gc3	Toplam
%5	0,608 ± 0,11	0,286 ± 0,013	0,4165 ± 0,1335	0,2455 ± 0,0125	0,511 ± 0,045	0,4134 ± 0,0525
%10	0,5875 ± 0,795	0,1125 ± 0,0385	0,0845 ± 0,0045	0,064 ± 0,00	0,4595 ± 0,0695	0,2616 ± 0,07464
%15	0,436 ± 0,035	0,053 ± 0,003	0,0505 ± 0,0005	0,054 ± 0,002	0,4805 ± 0,0815	0,2148 ± 0,06773
%20	0,4495 ± 0,0715	0,059 ± 0,005	0,05 ± 0,00	0,055 ± 0,00	0,4 ± 0,039	0,2027 ± 0,0618
%25	0,4655 ± 0,0245	0,0535 ± 0,0005	0,0545 ± 0,0015	0,054 ± 0,001	0,352 ± 0,074	0,1959 ± 0,0603
%30	0,429 ± 0,052	0,054 ± 0,00	0,054 ± 0,003	0,057 ± 0,00	0,0635 ± 0,435	0,1315 ± 0,0506
%35	0,436 ± 0,099	0,0555 ± 0,0005	0,0555 ± 0,0025	0,057 ± 0,001	0,077 ± 0,004	0,1362 ± 0,0522

<b>%40</b>	0,4895 ± 0,0425	0,059 ± 0,00	0,0585 ± 0,0005	0,0575 ± 0,0015	0,058 ± 0,00	0,1445 ± 0,0578
<b>%45</b>	0,4865 ± 0,0205	0,0645 ± 0,0055	0,0615 ± 0,0025	0,058 ± 0,00	0,069 ± 0,011	0,1479 ± 0,0566
<b>%50</b>	0,6045 ± 0,0015	0,0605 ± 0,0005	0,0625 ± 0,0035	0,0655 ± 0,0065	0,062 ± 0,003	0,171 ± 0,0723

S.H.=Standart Hata.

Çizelge 4.17’de yer alan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Çizelge 4.18’ de bakterilerin farklı konsantrasyonlardaki ortalamaları yer almaktadır. Birbirinden farklı bakterilerin farklı derişimlerdeki gıda kaynaklı patojen olan Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus* ile etkileşiminin istatistiksel olarak önemli bir farklılık oluşturup oluşturmadığına bakılmıştır. %5 derişim dışındaki tüm derişimlerde süpernatantların önemli bir farklılık yarattığı sonucuna varılmaktadır ( $p < 0,05$ ). Kontrol grubu için en düşük ortalama %30 derişimde, Wz3 (*L. plantarum*) kodlu laktik asit bakterisine ait süpernatant için en düşük ortalama %15 derişimde, Hp2 (*L. plantarum*) kodlu laktik asit bakterisine ait süpernatant için en düşük ortalama %15 ve %20 derişimlerinde, İz1 (*L. plantarum*) kodlu laktik asit bakterisine ait süpernatant için en düşük ortalama %15 derişimde, Gc3(*L. brevis*) kodlu laktik asit bakterisine ait süpernatant için en düşük ortalama %40 derişimde bulunurken toplam ortalama en düşük %30 derişimde hesaplanmıştır.

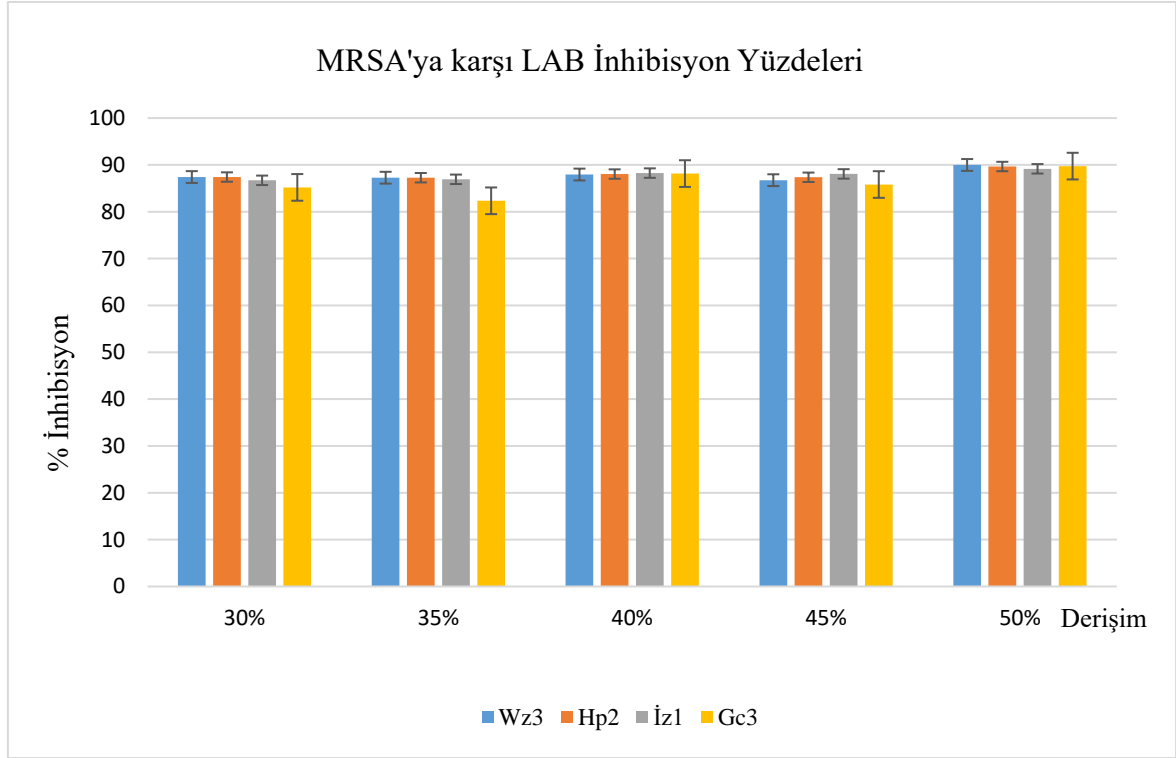
**Çizelge 4.19.** Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantlar için T- testi Sonuçları

<b>Bakteri- Süpernatant</b>	<b>(Ortalama ± S.H.)</b>	<b>Serbestlik Derecesi</b>	<b>Önem Düzeyi (p)</b>
<b>Kontrol- Wz3</b>	0,1942 ± 0,04	19	0,000**
<b>Kontrol- Hp2</b>	0,2241 ± 0,0321	19	0,000**
<b>Kontrol- İz1</b>	0,215 ± 0,035	19	0,000**
<b>Kontrol- Gc3</b>	0,0767 ± 0,0811	19	0,356

İstatistiksel açıdan önemli- t- test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , S.H. = Standart Hata.

Çizelge 4.19’de yer alan t- testi analizi sonuçlarında bağımsız gruplar arasında farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. *L. plantarum* (Wz3, Hp2, İz1)’dan elde edilen süpernatantların absorbanlarının tüm patojen bakterilere ait kontrol grubu absorbanlarına karşı önemli bir

farklılık oluşturduğu gözlemlenmektedir ( $p<0,05$ ). Çizelgede kontrol grubu olarak ifade edilen patojen bakterilere ait absorbans ölçümleridir.



**Şekil 4.14.** Laktik Asit Bakterilerinden Elde Edilen Süpernatantların %30, %35, %40, %45 ve %50 Derişimlerinde Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus*'u (MRSA) İnhibe Etme Yüzdeleri

Şekil 4.14'e göre *L. plantarum* (İz1, Hp2, Wz3) 'dan elde edilen süpernatantların %5 ve %10 derişimlerinde inhibisyonu  $\geq$  %80 olarak görülmemektedir. Ancak %15 derişimde  $\geq$  %85 oranında inhibisyon gerçekleştirdiği görülmektedir. Gc3 kodlu bakteriye ait süpernatantta bu derişim %30 olarak belirlenmiş ve  $\geq$  %80 oranında inhibisyon gözlemlenmiştir.

Tüm deney sonuçlarına göre, %10-15 derişimde bulunan *L. plantarum* (Wz3, Hp2, İz1)'a ait süpernatantların en yüksek inhibisyon değerine sahip olduğu görülmektedir. *L. brevis* (Gc3)'e ait süpernatant için bu derişim %45 olarak belirlenmiştir. Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* ve *Bacillus cereus*'a karşı %10-15 ve üzerindeki derişimlerde *L. plantarum* (Wz3, Hp2, İz1)'un antimikrobiyel açıdan etkisi

olduğu sonucuna varılmaktadır. Ancak *Escherichia coli* 0104:H4'e karşı bu laktik asit bakterilerinden etkili olanın sadece *L. plantarum* (Hp2) olduğu sonucuna varılmaktadır.

Bu konuda yapılmış bir çalışmada, çeşitli kaynaklardan izole edilmiş birçok lactobasil ve bifidobakteri suşlarının in vitro olarak *Staphylococcus aureus* ve Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus*' un klinik izolatlarının gelişmesini engellediğini belirtmiştir [108]. Çalışma sonucunda elde edilen verilerde farklı bakteriler kullanılmıştır. Kullanılan bu bakterilerin Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyel etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonuçları bu açıdan benzerlik göstermektedir.

Yapılan başka bir çalışma da, *L. plantarum*'un *Y. enterocolitica* üzerinde inhibisyon yeteneğine sahip olduğundan bahsedilmiştir [109]. Çalışma sonuçları agar spot ve agar kuyucuk difüzyon deneylerinde farklılık göstermiştir. Ancak sıvı mikrodilüsyon ve agar kuyucuk difüzyon deneyinden elde edilen verilerde inhibisyon gözlenmiştir. Bu iki deney sonuçları açısından çalışmamız benzerlik göstermektedir.

Daha önce yapılan bir diğer çalışma ise probiyotik ve bifidobakteriler tarafından Shiga toksininin (enteroagregatif *E. coli*) bağırsak mukozasından taşınmasına müdehale ettiğini göstermiştir [110]. Bu alışma kapsamında *E.coli* 0104:H4'e karşı antimikrobiyel açıdan laktik asit bakterilerinin etkili olduğu belirlenmiştir. Bu açıdan sonuçlarımız benzerlik göstermektedir.

Antimikrobiyel etki kapsamındaki çalışmalardan bir diğeri, bazı *Lactobacillus* spp.'ye ait türlerin *Bacillus* spp.' ye ait türlere karşı güçlü bir etkiye sahip olduğunu belirtmiştir [111]. Yapılan tez çalışmasında elde edilen sonuçlar literatürde yer alan bu sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

## 5. YORUM

Bu çalışmada, “Doğal Ekşi Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması ile Bazı Probiyotik Özelliklerinin Saptanması” adlı Dr. Gizem KEZER’e ait tez kapsamında ülkemizin farklı bölgelerinden toplanmış un örneklerinden üretilen hamurlardan izole edilen *L. brevis* (Gc3) ve *L. plantarum*’ un (İz1, Hp2, Wz3), *Escherichia coli* O104:H4, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* ve Metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)’a karşı antimikrobiyel etkileri araştırılmıştır. Agar spot yöntemi, agar kuyucuk difüzyon yöntemi ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak elde edilen verilere göre Gc3 kodlu LAB’nin diğer LAB’ne göre daha zayıf olduğu görülmektedir.

Agar spot yönteminde laktik asit bakterilerinin direkt kullanımıyla elde edilen sonuçlara göre *Bacillus cereus*’a karşı en etkili LAB *L. plantarum* (Wz3), *Escherichia coli* O104:H4’e karşı en etkili LAB *L. plantarum* (İz1), MRSA ve *Yersinia enterocolitica*’ya karşı en etkili LAB *L. plantarum* (Hp2) olarak belirlenmiştir.

Agar kuyucuk difüzyon yöntemi ve sıvı mikrodilüsyon yönteminde bakterilerin oluşturduğu metabolitlerin etkisi gözlemlenmiştir. Agar kuyucuk difüzyon yönteminden elde edilen sonuçlara göre *Bacillus cereus* için *L. plantarum* (Wz3), *Escherichia coli* için *L. plantarum* (İz1), MRSA ve *Yersinia enterocolitica* için *L. plantarum* (Hp2) laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının en etkili sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemine göre *Bacillus cereus* için *L. plantarum* (İz1)’a ait süpernatant %81 inhibisyon yüzdesine, *Escherichia coli* ve *Yersinia enterocolitica* için *L. plantarum* (Hp2)’a ait süpernatantlar sırasıyla %80 ve %77 inhibisyon yüzdesine, MRSA için *L. plantarum* (İz1)’a ait süpernatantın %85 inhibisyon yüzdesiyle etki ettiği belirlenmiştir. *L. brevis* (Gc3) antimikrobiyel etkiye sahip olup diğer bakterilere oranla daha az etki göstermiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda LAB’ların antagonist etki gösterdiği ve bunların metabolitlerinin gıdalarda istenmeyen mikroorganizmaların gelişmesini engellediği ve inaktive ettiği tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmaların doğal koruyucu olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar artmaktadır. Laktik asit bakterileri ve bu bakterilerin

ürettiği antimikrobiyel metabolitler (organik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin vb.) alternatif yöntemler arasında gösterilmektedir [20]. Bu tez kapsamında kullanılan *L. plantarum* (İz1, Hp2, Wz3) ve *L. brevis* (Gc3)'in meydana getirdiği metabolitlerin tezde çalışılan gıda kaynaklı patojenler üzerine antimikrobiyel etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır ve bu anlamda teknolojik özelliklerinin de uygun olması durumunda ticari alanda kullanılma potansiyelinin yüksek olduğu düşünölmektedir.

Laktik asit bakterilerinin patojen bakterilere karşı antagonistik etkisi, ürettikleri metabolitlerin tümünün bir arada olmasından ve/veya bu metabolitlerin sadece bir tanesinin etkili olmasından kaynaklanabilmektedir [112]. *L. plantarum* (İz1, Wz3, Hp2) ve *L. brevis* (Gc3)'e ait süpernatantların oluşturdukları etkiler belirlenmiştir. Bu bakterilerin ürettikleri metabolitlerin (organik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin vb.) tespit edilerek, bir arada ve/veya birbirinden ayrı olacak şekilde gıda kaynaklı patojen bakterilere karşı etki mekanizmaları ve kullanılacak olan metabolitlerin derişimlerinin belirlenmesiyle antimikrobiyel etki için kullanım alanına alternatif oluşturacağı düşünölmektedir.

Aynı zamanda laktik asit bakterilerinin ürettikleri bakteriyosin vb. metabolitler insanlarda görölen enfeksiyonlara karşı antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilir. Bu tez kapsamında antimikrobiyel direnci belirlenmiş olan *L. plantarum* (İz1, Hp2, Wz3) ve *L. brevis* (Gc3)'in metabolitlerinin belirlenmesi gün geçtikçe antibiyotiğe direnç kazanan patojen bakterilere karşı kullanılması antimikrobiyel açıdan potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] A. Soomro, T. Masud, K. Anwaar, Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health-a review, 1, **2002**, 20-24.
- [2] L. Topisirovic, M. Kojic, D. Fira, N. Golic, I. Strahinic, J. Lozo, Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation, 112, **2006**, 230-235.
- [3] Y. Widyastuti, A. Febrisiantosa, The role of lactic acid bacteria in milk fermentation, 2014, **2014**.
- [4] W. Liu, H. Pang, H. Zhang, Y. Cai, Biodiversity of lactic acid bacteria. *Lactic acid bacteria*, (eds: Springer, Place, Published, 103-203, **2014**.
- [5] T. Müller, Comparison of methods for differentiation between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria, 145, **1990**, 363-366.
- [6] B. E. Terzaghi, W. Sandine, Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages, 29, **1975**, 807-813.
- [7] S. A. Gharib, Antimicrobial activity and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented dairy products, 2, **2020**, 40-48.
- [8] E. A. Pfeiler, T. R. Klaenhammer, The genomics of lactic acid bacteria, 15, **2007**, 546-553.
- [9] W. P. Hammes, P. S. Tichaczek, The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food, 198, **1994**, 193-201.
- [10] D. G. Newell, M. Koopmans, L. Verhoef, E. Duizer, A. Aidara-Kane, H. Sprong, M. Opsteegh, M. Langelaar, J. Threlfall, F. Scheutz, Food-borne diseases—the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge, 139, **2010**, S3-S15.
- [11] Z. Gürel, D. Aslan, Foodborne crisis and preventive approach in public health perspective, **2019**.
- [12] F. Daliri, A. A. Aboagye, E. B.-M. Daliri, Inactivation of Foodborne Pathogens by Lactic Acid Bacteria, 35, **2020**, 419-429.
- [13] E. Sablon, B. Contreras, E. Vandamme, Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis, **2000**, 21-60.
- [14] W. H. Holzapfel, P. Haberer, R. Geisen, J. Björkroth, U. Schillinger, Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition, 73, **2001**, 365s-373s.
- [15] D. Yang, Y. Zhang, L. Zhao, Y. Wang, L. Rao, X. Liao, Pressure-resistant acclimation of lactic acid bacteria from a natural fermentation product using high pressure, 69, **2021**, 102660.
- [16] E. Kosmerl, D. Rocha-Mendoza, J. Ortega-Anaya, R. Jiménez-Flores, I. García-Cano, Improving human health with milk fat globule membrane, lactic acid bacteria, and bifidobacteria, 9, **2021**, 341.
- [17] B. Wedajo, Lactic acid bacteria: benefits, selection criteria and probiotic potential in fermented food, 3, **2015**.
- [18] G. Klein, A. Pack, C. Bonaparte, G. Reuter, Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria, 41, **1998**, 103-125.
- [19] S. Wittouck, Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria, **2021**.
- [20] J. Reis, A. Paula, S. Casarotti, A. Penna, Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications, 4, **2012**, 124-140.

- [21] J. E. van Hylckama Vlieg, J. L. Rademaker, H. Bachmann, D. Molenaar, W. J. Kelly, R. J. Siezen, Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*, 17, **2006**, 183-190.
- [22] M. P. Arena, V. Capozzi, P. Russo, D. Drider, G. Spano, D. Fiocco, Immunobiosis and probiosis: antimicrobial activity of lactic acid bacteria with a focus on their antiviral and antifungal properties, 102, **2018**, 9949-9958.
- [23] T. Bintsis, Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics, 4, **2018**, 665.
- [24] L. Mikušová, P. Gereková, M. Kocková, E. Šturdík, M. Valachovičová, A. Holubková, M. Vajdák, L. Mikuš, Nutritional, antioxidant, and glycaemic characteristics of new functional bread, 67, **2013**, 284-291.
- [25] D. Ren, J. Zhu, S. Gong, H. Liu, H. Yu, Antimicrobial characteristics of lactic acid bacteria isolated from homemade fermented foods, 2018, **2018**.
- [26] S. Nebbia, C. Lamberti, G. Lo Bianco, S. Cirrincione, V. Laroute, M. Coccagn-Bousquet, L. Cavallarin, M. G. Giuffrida, E. Pessione, Antimicrobial Potential of Food Lactic Acid Bacteria: Bioactive Peptide Decrypting from Caseins and Bacteriocin Production, 9, **2021**, 65.
- [27] S. A. Ibrahim, Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: Other Species, **2016**.
- [28] R. Kammara, A. Cheruvari, Z. E. B. Aka, Authenticity of Commercial Probiotics and Taxonomic strategies of *Bifidobacteria* spp, 5, **2021**, 325-336.
- [29] A. B. Shori, Application of *Bifidobacterium* spp in beverages and dairy food products: an overview of survival during refrigerated storage, **2021**.
- [30] D. Cizeikiene, J. Jagelaviciute, Investigation of Antibacterial Activity and Probiotic Properties of Strains Belonging to *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Genera for Their Potential Application in Functional Food and Feed Products, **2021**, 1-17.
- [31] E. Salvetti, S. Torriani, G. E. Felis, The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update, 4, **2012**, 217-226.
- [32] V. Monedero, A. Revilla-Guarinos, M. Zuniga, Physiological role of two-component signal transduction systems in food-associated lactic acid bacteria, 99, **2017**, 1-51.
- [33] C. Devirgiliis, P. Zinno, G. Perozzi, Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species, 4, **2013**, 301.
- [34] A. Kumar, D. Kumar, Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties, 33, **2015**, 117-123.
- [35] J. Zheng, S. Wittouck, E. Salvetti, C. M. Franz, H. Harris, P. Mattarelli, P. W. O'Toole, B. Pot, P. Vandamme, J. Walter, A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*, **2020**.
- [36] S. Skariyachan, S. Govindarajan, Biopreservation potential of antimicrobial protein producing *Pediococcus* spp. towards selected food samples in comparison with chemical preservatives, 291, **2019**, 189-196.
- [37] F. J. Carr, D. Chill, N. Maida, The lactic acid bacteria: a literature survey, 28, **2002**, 281-370.
- [38] T. R. Klaenhammer, Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, 12, **1993**, 39-85.
- [39] M. C. W. Porto, T. M. Kuniyoshi, P. Azevedo, M. Vitolo, R. S. Oliveira, *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers, 35, **2017**, 361-374.
- [40] G. Klein, Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract, 88, **2003**, 123-131.



- [41] A. Manero, A. R. Blanch, Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key, 65, **1999**, 4425-4430.
- [42] M. Khattab, H. Ebeid, Isolation of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus cecorum* from Bovine rumen using modern techniques, 4, **2014**, 514-519.
- [43] S.-Y. Shin, N. S. Han, *Leuconostoc* spp. as starters and their beneficial roles in fermented foods. *Beneficial microorganisms in food and nutraceuticals*, (eds: Springer, Place, Published, 111-132, **2015**.
- [44] Á. Alegría, S. Delgado, A. B. Flórez, B. Mayo, Identification, typing, and functional characterization of *Leuconostoc* spp. strains from traditional, starter-free cheeses, 93, **2013**, 657-673.
- [45] P. Nieto-Arribas, S. Seseña, J. M. Poveda, L. Palop, L. Cabezas, Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture, 27, **2010**, 85-93.
- [46] C. Server-Busson, C. Foucaud, J.-Y. LEVEAU, Selection of dairy *Leuconostoc* isolates for important technological properties, 66, **1999**, 245-256.
- [47] S. Y. Mun, Y. J. Seo, H. C. Chang, Characterization of the Psychrotrophic Lactic Acid Bacterium *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* LS4 Isolated from Kimchi Based on Comparative Analyses of Its Genomic and Phenotypic Properties, 10, **2021**, 1899.
- [48] M. Haenni, A. Lupo, J.-Y. Madec, Antimicrobial resistance in *Streptococcus* spp, 6, **2018**, 6.2. 09.
- [49] R. A. Whiley, J. M. Hardie, *Streptococcus*, **2015**, 1-86.
- [50] B. Pot, W. Ludwig, K. Kersters, K.-H. Schleifer, Taxonomy of lactic acid bacteria. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, (eds: Springer, Place, Published, 13-90, **1994**.
- [51] M. d. Toit, M. Huch, G. S. Cho, C. M. Franz, The genus *Streptococcus*, **2014**, 457-505.
- [52] P. Bridge, P. Sneath, Numerical taxonomy of *Streptococcus*, 129, **1983**, 565-597.
- [53] M. Teuber, *Lactococcus*, **2015**, 1-21.
- [54] M. Teuber, A. Geis, The genus *lactococcus*, 4, **2006**, 205-228.
- [55] T. Odamaki, S. Yonezawa, M. Kitahara, Y. Sugahara, J. Z. Xiao, T. Yaeshima, K. Iwatsuki, M. Ohkuma, Novel multiplex polymerase chain reaction primer set for identification of *Lactococcus* species, 52, **2011**, 491-496.
- [56] G. Daba, N. Ishibashi, T. Zendo, K. Sonomoto, Functional analysis of the biosynthetic gene cluster required for immunity and secretion of a novel *Lactococcus*-specific bacteriocin, lactococcin Z, 123, **2017**, 1124-1132.
- [57] M. Zamfir, M. Vancanneyt, L. Makras, F. Vaningelgem, K. Lefebvre, B. Pot, J. Swings, L. De Vuyst, Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products, 29, **2006**, 487-495.
- [58] G. La, The citrate metabolism in homo-and heterofermentative LAB: a selective means of becoming dominant over other microorganisms in complex ecosystems, 2014, **2014**.
- [59] R. Rahmeh, A. Akbar, M. Kishk, T. Al-Onaizi, A. Al-Azmi, A. Al-Shatti, A. Shajan, S. Al-Mutairi, B. Akbar, Distribution and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from raw camel milk, 30, **2019**, 100560.
- [60] I. M. Helander, A. von Wright, T. Mattila-Sandholm, Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria, 8, **1997**, 146-150.
- [61] R. Leclercq, R. Cantón, D. F. Brown, C. G. Giske, P. Heisig, A. P. MacGowan, J. W. Mouton, P. Nordmann, A. C. Rodloff, G. M. Rossolini, EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing, 19, **2013**, 141-160.

- [62] J. Šušković, B. Kos, J. Beganović, A. Leboš Pavunc, K. Habjanič, S. Matošić, Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria, 48, **2010**, 296-307.
- [63] Z. Hladíková, J. Smetanková, G. Greif, M. Greifová, Antimicrobial activity of selected lactic acid cocci and production of organic acids, 5, **2012**, 80-85.
- [64] B. F. Okorhi, Anti-pseudomonas activity of organic acids produced by lactic acid bacteria, 2350, **2014**, 1588.
- [65] M. Moradi, R. Molaei, J. T. Guimarães, A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria, 143, **2021**, 109722.
- [66] L. Stoyanova, E. Ustyugova, A. Netrusov, Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties, 48, **2012**, 229-243.
- [67] I. T. Kadim, O. Mahgoub, Postharvest handling of red meat. *Handbook of food preservation*, (eds: CRC Press, Place, Published, 191-220, **2007**.
- [68] M. S. Rahman, Food preservation: overview, **2007**, 21-36.
- [69] Z. Yang, Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Book Z. Yangs, (eds: Vol.Number, Citeseer, Place, Chapter Number, **2000**.
- [70] S. Nakano, H. Ebisuya, Physiology of *Acetobacter* and *Komagataeibacter* spp.: acetic acid resistance mechanism in acetic acid fermentation. *Acetic Acid Bacteria*, (eds: Springer, Place, Published, 223-234, **2016**.
- [71] J. M. Jay, Antimicrobial properties of diacetyl, 44, **1982**, 525-532.
- [72] M. Stratford, T. Eklund, Organic acids and esters. *Food preservatives*, (eds: Springer, Place, Published, 48-84, **2003**.
- [73] O. B. OLORUNJUWON, O. B. OLUBUKOLA, A. MOBOLAJÍ, O. F. MUIBAT, K. B. TEMÍTOPE, Partial Purification Characterization and Application of Bacteriocin from Bacteria Isolated *Parkia biglobosa* Seeds, 3, **2018**, 72-94.
- [74] A. Ołdak, D. Zielińska, Bacteriocins from lactic acid bacteria as an alternative to antibiotics, 71, **2017**, 328-338.
- [75] B. K. Bajaj, I. J. Claes, S. Lebeer, Functional mechanisms of probiotics, 2021, **2021**, 321-327.
- [76] J. L. Arqués, E. Rodríguez, S. Langa, J. M. Landete, M. Medina, Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens, 2015, **2015**.
- [77] M. Zacharof, R. Lovitt, Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article, 2, **2012**, 50-56.
- [78] A. Savadogo, A. C. Ouattara, H. I. Bassole, S. A. Traore, Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview, 5, **2006**.
- [79] J. L. Parada, C. R. Caron, A. B. P. Medeiros, C. R. Soccol, Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives, 50, **2007**, 512-542.
- [80] R. H. Perez, T. Zendo, K. Sonomoto, Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications, 13, **2014**, 1-13.
- [81] D. Beshkova, G. Frengova, Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry, 12, **2012**, 419-432.
- [82] D. K. Malik, D. Bhatia, A. Nimbriya, S. Kumar, Lactic acid bacteria and bacteriocin: a review, 5, **2012**, 2510-2513.
- [83] I. F. Nes, S.-S. Yoon, D. B. Diep, Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review, 16, **2007**, 675-690.
- [84] L. Axelsson, T. Chung, W. Dobrogosz, S. Lindgren, Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*, 2, **1989**, 131-136.

- [85] S. P. Oliver, Foodborne pathogens and disease special issue on the national and international PulseNet network, 16, **2019**, 439-440.
- [86] T. Bintsis, Foodborne pathogens, 3, **2017**, 529.
- [87] Y. Wang, Z. Ye, Y. Ying, New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria, 12, **2012**, 3449-3471.
- [88] E. J. Bottone, *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates, 1, **1999**, 323-333.
- [89] M. Bucher, C. Meyer, B. Grötzbach, S. Wacheck, A. Stolle, M. Fredriksson-Ahomaa, Epidemiological data on pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Southern Germany during 2000–2006, 5, **2008**, 273-280.
- [90] V. Gupta, P. Gulati, N. Bhagat, M. Dhar, J. Viridi, Detection of *Yersinia enterocolitica* in food: an overview, 34, **2015**, 641-650.
- [91] A. Zadernowska, W. Chajęcka-Wierzchowska, Ł. Łaniewska-Trokenheim, *Yersinia enterocolitica*: a dangerous, but often ignored, foodborne pathogen, 30, **2014**, 53-70.
- [92] J. Tang, R. Zhang, J. Chen, Y. Zhao, C. Tang, H. Yue, J. Li, Q. Wang, H. Shi, Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food markets, 65, **2015**, 279-286.
- [93] Z. Abdolmaleki, Z. Mashak, F. Safarpour Dehkordi, Molecular and virulence characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteria recovered from hospital cockroaches, 12, **2019**, e98564.
- [94] E. F. S. Authority, Technical specifications on the harmonised monitoring and reporting of antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food-producing animals and food, 10, **2012**, 2897.
- [95] V. L. Cavera, T. D. Arthur, D. Kashtanov, M. L. Chikindas, Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics, 46, **2015**, 494-501.
- [96] A. K. Bhunia, Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. Book A. K. Bhunias, (eds: Vol.Number, Springer, Place, Chapter Number, **2018**).
- [97] D. Safwat Mohamed, E. Farouk Ahmed, A. Mohamed Mahmoud, R. M. Abd El-Baky, J. John, Isolation and evaluation of cocktail phages for the control of multidrug-resistant *Escherichia coli* serotype O104: H4 and *E. coli* O157: H7 isolates causing diarrhea, 365, **2018**, fnx275.
- [98] R. Bennett, *Bacillus cereus*. Book R. Bennetts, (eds: Vol.Number, John Wiley and Sons, New York, Place, Chapter Number, **2001**).
- [99] L. Zhao, F. Duan, M. Gong, X. Tian, Y. Guo, L. Jia, S. Deng, (+)-Terpinen-4-ol Inhibits *Bacillus cereus* Biofilm Formation by Upregulating the Interspecies Quorum Sensing Signals Diketopiperazines and Diffusing Signaling Factors, 69, **2021**, 3496-3510.
- [100] M. Diao, D. Qi, M. Xu, Z. Lu, F. Lv, X. Bie, C. Zhang, H. Zhao, Antibacterial activity and mechanism of monolauroyl-galactosylglycerol against *Bacillus cereus*, 85, **2018**, 339-344.
- [101] G. Kezer, *Doğal Ekşi Hamurlardan Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması ile Bazı Probiyotik Özelliklerinin Saptanması*. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **2019**.
- [102] S. F. Erdoğan, B. BOSTANCI, KEFİR ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ, 45, **2020**, 72-80.
- [103] M. P. Arena, A. Silvain, G. Normanno, F. Grieco, D. Drider, G. Spano, D. Fiocco, Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms, 7, **2016**, 464.

- [104] T. Quigley, Monitoring the growth of *E. coli* with light scattering using the synergy™ 4 Multi-Mode Microplate Reader with Hybrid Technology™, **2008**.
- [105] A. H. Çon, H. Y. Gökalp, Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples, *55*, **2000**, 89-96.
- [106] B. Karska-Wysocki, M. Bazo, W. Smoragiewicz, Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *165*, **2010**, 674-686.
- [107] D. Hernandez, E. Cardell, V. Zarate, Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711, *99*, **2005**, 77-84.
- [108] H. Sikorska, W. Smoragiewicz, Role of probiotics in the prevention and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections, *42*, **2013**, 475-481.
- [109] J. Coronel-León, A. López, M. Espuny, M. Beltran, A. Molinos-Gómez, X. Rocabayera, A. Manresa, Assessment of antimicrobial activity of N $\alpha$ -lauroyl arginate ethylester (LAE®) against *Yersinia enterocolitica* and *Lactobacillus plantarum* by flow cytometry and transmission electron microscopy, *63*, **2016**, 1-10.
- [110] M. Muniesa, J. A. Hammerl, S. Hertwig, B. Appel, H. Brüssow, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4: a new challenge for microbiology, *78*, **2012**, 4065-4073.
- [111] S. Afrin, M. A. Hoque, A. K. Sarker, M. A. Satter, M. N. I. Bhuiyan, Characterization and profiling of bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria from cheese samples, *3*, **2021**.
- [112] A. H. Çon, H. Y. Gökalp, Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Fiekilleri, **2000**.