

**SÜT ORJİNLİ *Lactococcus lactis* İZOLATLARININ  
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ  
VE İDENTİFİKASYONU**

**Hamdi ÖZKUL**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Tuba YILDIRIM**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Mayıs 2016**

**AMASYA**

## TEZ BİLDİRİMİ

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

Hamdi ÖZKUL

**SÜT ORJİNLİ *Lactococcus lactis* İZOLATLARININ  
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ  
VE İDENTİFİKASYONU**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hamdi ÖZKUL**

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Nisan 2016

**ÖZET**

Laktik asit bakterileri, hızlı asit oluşumu ve doğal antimikrobiyal maddeler salgılayarak ürünün raf ömrünü uzatan, tüketici sağlığını patojenlere karşı koruyan starter kültürler olarak kullanılmaktadırlar. Sütlerde *Lactococcus lactis* starterlerinin kullanımıyla fermente süt ürünlerine dönüştürülmesi bu türlerin endüstriyel önemini artırmaktadır. Bu bakteriler fermantasyonla gıdanın içeriğini, tadını ve aromasını oluşturmakla birlikte doğal antimikrobiyal maddeler (bakteriyosin) sentezlemektedir.

Bu çalışmada; Amasya'da tüketime sunulan çiğ sütlerden izole edilen *Lactococcus lactis* türlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi, fenotipik ve PZR yöntemleriyle identifikasyonu amaçlanmıştır. MRS Agar'a seri dilüsyonlarla ekilen ve koloni morfolojisi *Lactococcus lactis* olduğu düşünülen gram pozitif, katalaz negatif koloniler M17 Agar'a inokule edilerek, 77 çiğ süt örneğinden 154 adet izolat elde edilmiştir. Kuyucuk difüzyon testi uygulanan bu izolatların %40'ı (ATCC 13076) *Salmonella enteritidis*'e, %33'ü (ATCC 25923) *Staphylococcus aureus*'a, %29'u (DSM 4312) *Bacillus cereus*'a, %29'u (ATCC 6633), *Bacillus subtilis*'e ve %13'ü (ATCC 35218) *Escherichia coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. İzolatların %59'u en az bir patojene, %38'i iki, %22'si üç, %11'i dört ve %5'i ise bütün patojenlere karşı inhibitör etki göstermiştir. API 20 Strep test sonuçlarına göre; antimikrobiyal aktiviteye gösteren 34 izolatın %23'ü *Leuconostoc spp.*, %17.6'sı *Enterococcus faecalis*, %17.6 *Lactococcus lactis ssp.cremoris*, %14.7'si *Lactococcus lactis ssp. lactis*, %8.8'i *Enterococcus faecium*, %8.8'i *Aerococcus viridans*, %5.8'i *Enterococcus durans* %2.9'u *Enterococcus avium* olarak belirlenmiştir. PZR yöntemiyle 34 izolatın % 73'ünün *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, % 82'nin *Lactococcus lactis ssp. lactis* olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** *Lactococcus lactis*, Çiğ süt, Antimikrobiyal aktivite

**DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND  
IDENTIFICATION OF *Lactococcus lactis* ISOLATES FROM MILK**

**(M.Sc.Thesis)**

**Hamdi ÖZKUL**

**AMASYA UNIVERSITY**

**INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**April 2016**

**Abstract**

Lactic acid bacteria have been used as a starter culture to protect consumer health from pathogens with the help of rapid acid formation and by secreting natural antimicrobial agents for extending the product's shelf life. Use of *Lactococcus lactis* starters to produce fermented milk products increase the industrial importance of these species. These bacteria can form taste, aroma and contents of the food by fermentation and synthesized natural antimicrobial compounds (bacteriocin).

The aim of this study was to determine antimicrobial activities, identification with phenotypic and PCR methods of *Lactococcus lactis* species from raw milk samples available for consumption in Amasya. Colonies inoculated into MRS Agar with serial dilutions and colony morphology seen as a *Lactococcus lactis*, gram positive, catalase negative colonies then inoculated into M17 agar and 154 strain isolated from 77 raw milk samples. %40 of these isolates has demonstrated antimicrobial activity on (ATCC 13076) *Salmonella enteritidis*, %33 on (ATCC 25923) *Staphylococcus aureus*, %29 on (DSM 4312) *Bacillus cereus*, %29 on (DSM 4312) *Bacillus cereus*, %29 on (ATCC 6633) *Bacillus subtilis* and %13 on (ATCC 35218) *Escherichia coli* using agar well diffusion technique. %59 of isolates showed inhibitory effect on at least one pathogen, %38 on two, %22 on three, %11 on four and %5 on all pathogens. 34 isolates have antimicrobial activity and %23 of these isolates were determined as *Leuconostoc* spp., %17,6 as *Enterococcus faecalis*, %17.6 as *Lactococcus lactis* ssp.cremoris, %14.7 as *Lactococcus lactis* ssp. lactis, %8.8 as *Enterococcus faecium*, %8.8 as *Aerococcus viridans*, %5.8 as *Enterococcus durans* and %2.9 as *Enterococcus avium* according to API 20 Strep test results.

Determination were using PCR method %73 of 34 isolates typed as *Lactococcus lactis* ssp. cremoris, %82 of these typed as *Lactococcus lactis* ssp. lactis.

**Keyword: *Lactococcus lactis*, Raw milk, Antimicrobial activity**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilgi ve yardımlarını esirgemeyen tez çalışmamın belirlenmesinde, yürütülmesinde tecrübe ve bilgileriyle yol gösteren, sabrı ve anlayışıyla bana örnek olan çok değerli danışman hocam Doç.Dr. Tuba YILDIRIM'a sonsuz teşekkür ederim.

Labaratuvar çalışmalarımnda yardım ve desteğini esirgemeyen Arş.Gör. Ceren YAVUZ'a teşekkür ederim.

Çalışmamın deneysel aşamalarında kıymetli bilgileriyle bana yol gösteren Prof.Dr. Belgin SIRIKEN' e katkılarından dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

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

Laboratuvar çalışmalarım esnasında ve tez yazım aşamamda karşılaştığım her sorunda yardım ve desteğini esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarım İbrahim TÜRKELE'e, Gülşah GÜNDOĞDU'ya, İkbal MACİT'e, Dilber ÖZGÜN'e ve Ali TOKATLI'ya ve diğer tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Manevi desteklerinden dolayı sevgili annem Döne ALTUNTAŞ'a, babam Mehmet ÖZKUL'a, ablam Funda ALKALE'ye, abim Hasan ÖZKUL'a, kardeşlerim Fatma ve Fulya ÖZKUL'a ve son olarak yeğenlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**İÇİNDEKİLER**

|   | <b>Sayfa</b> |
|---|--------------|
| ÖZET  | iv           |
| ABSTRACT  | v            |
| TEŞEKKÜR  | vii          |
| İÇİNDEKİLER   | viii         |
| TABLoların LİSTESİ  | xi           |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ  | xii          |
| RESİMLERİN LİSTESİ  | xiii         |
| SİMGELER VE KISALTMALAR   | xiv          |
| 1.GİRİŞ   | 1            |
| 2. GENEL BİLGİLER   | 4            |
| 2.1. Laktik asit Bakterileri (LAB)  | 4            |
| 2.2. Sınıflandırılması  | 5            |
| 2.2.1. Lactococcus  | 6            |
| 2.2.2. Streptococcus  | 8            |
| 2.2.3. Enterococcus   | 9            |
| 2.2.4. Pediococcus  | 9            |
| 2.2.5. Leuconostoc  | 10           |
| 2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Ürettiği Antimikrobiyal Maddeler              | 10           |
| 2.3.1. Organik Asitler  | 11           |
| 2.3.2. Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )                     | 12           |
| 2.3.3. Hidrojen Sülfür (H <sub>2</sub> S) ve Karbondioksit (CO <sub>2</sub> ) | 13           |
| 2.3.4. Proteolitik Aktivite ve Reuterin                                       | 13           |
| 2.3.5. Bakteriyosin ve Bakteriyosin Benzeri Maddeler                          | 14           |
| 2.4. Lactococcus spp'de Biyokimyasal Testler                                  | 17           |
| 2.5. API Testi  | 19           |
| 2.6. Moleküler Tiplendirme Yöntemleri   | 20           |
| 2.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)                                      | 21           |
| 2.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PZR) Dayalı Tiplendirme Yöntemleri      | 20           |

|  |    |
|--|----|
| 2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonundan (PZR) Bağımsız Tiplendirme Yöntemleri | 24 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM   | 26 |
| 3.1. Gereç   | 26 |
| 3.1.1. Çiğ Süt Örnekleri   | 26 |
| 3.1.2. Bakteri Kültürleri  | 26 |
| 3.1.3. Kullanılan Çözeltiler   | 26 |
| 3.1.3.1. Peptonlu Su   | 26 |
| 3.1.3.2. Serum Fizyolojik  | 27 |
| 3.1.3.3. Gram Pozitif Bakteri Lizis Çözeltisi                                | 27 |
| 3.1.3.4. 10X TBE Tamponu   | 27 |
| 3.1.3.5. %1'lik Agaroz Jel   | 28 |
| 3.1.3.6. Etidyum Bromür Çözeltisi  | 28 |
| 3.1.4. Kullanılan Besiyerleri  | 28 |
| 3.1.4.1. De Man, Rogossa ve Sharp (MRS) Agar                                 | 28 |
| 3.1.4.2. De Man, Rogossa ve Sharp (MRS) Broth                                | 29 |
| 3.1.4.3. M-17 Agar   | 29 |
| 3.1.4.4. TSA (Tryptic Soy Agar)  | 30 |
| 3.1.4.5. Saklama Stoğu   | 30 |
| 3.2. Yöntem  | 31 |
| 3.2.1. Çiğ Süt Örneklerinin Hazırlanması                                     | 31 |
| 3.2.2. Bakterilerin İzolasyonu   | 31 |
| 3.2.3. Suşların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi                  | 32 |
| 3.2.4. Antimikrobiyal Aktivite Gösterenlerin İdentifikasyonu                 | 33 |
| 3.2.4.1. Gram Boyama   | 33 |
| 3.2.4.2. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme Testi                                  | 34 |
| 3.2.4.3. Farklı pH' larda Gelişme Testi                                      | 34 |
| 3.2.4.4. Farklı NaCl Konsantrasyonlarında Gelişme Testi                      | 34 |
| 3.2.4.5. Hemoliz Testi   | 34 |
| 3.2.4.5. API 20 Strep Testi  | 35 |
| 3.2.4.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi                           | 36 |
| 3.2.4.5.1. DNA İzolasyonu  | 36 |
| 3.2.4.5.2. Primer Dizileri   | 37 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.4.5.3. DNA' nın Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi                        | 38 |
| 4.BULGULAR   | 39 |
| 4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu                                     | 39 |
| 4.2. Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip İzolatların Belirlenmesi                  | 40 |
| 4.3. Muhtemel Laktik Asit Bakterilerinin Gram Boyama ile Kimyasal Tanımlanması | 46 |
| 4.4. Biyokimyasal Tesler   | 47 |
| 4.5. LAB' nin API 20 Strep Sistemi ile İdentifikasyon Sonuçları                | 49 |
| 4.6. <i>Lactococcus lactis</i> Alttürlerinin Klasik PZR ile İdentifikasyonu    | 52 |
| 4.6.1.Optimizasyon Çalışmaları   | 52 |
| 4.6.2. <i>Lactococcus lactis</i> Alttürlerinin İdentifikasyonu                 | 57 |
| 5.TARTIŞMA   | 61 |
| 6.SONUÇ VE ÖNERİLER  | 68 |
| 7. KAYNAKÇA  | 70 |



**TABLULARIN LİSTESİ**

| <b>Tablo</b>  | <b>Sayfa</b> |
|---|--------------|
| Tablo 3.1: PZR aşamasında kullanılan primerler  | 37           |
| Tablo 3.2: Master mix karışımı  | 37           |
| Tablo 3.3: <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> PZR ısı protokolü  | 38           |
| Tablo 3.4 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> PZR ısı protokolü  | 38           |
| Tablo 4.1: İzolatların örnek numarası ve izolat sayıları  | 39           |
| Tablo 4.2: Antimikrobiyal aktivite testi sonuçları  | 41           |
| Tablo 4.3: Gram boyama sonuçları  | 46           |
| Tablo 4.4: Biyokimyasal tanılama sonuçları  | 47           |
| Tablo 4.5: LAB' nin API 20 Strep ile identifikasyonu  | 50           |
| Tablo 4.6: API 20 Strep sistemiyle LAB' nin türlere göre dağılımı ve yüzde oranları   | 51           |
| Tablo 4.7: Kullanılan master mix karışımı   | 52           |
| Tablo 4.8: PZR ısı programı   | 53           |
| Tablo 4.9: Magnezyum klorür optimizasyonu için kullanılan farklı konsantrasyonlar   | 54           |
| Tablo 4.10: <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> ve <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> primer optimizasyonu master mix karışımı    | 56           |
| Tablo 4.11: <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> ve <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> DNA optimizasyonu master mix konsantrasyonu | 57           |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil   | Sayfa |
|---|-------|
| Şekil 2.1. LAB'nin glikoz fermentasyonu                                       | 5     |
| Şekil 2.2: <i>L. lactis</i> 'in sınıflandırılması                             | 8     |
| Şekil 4.1: <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> suş dağılım oranı     | 60    |
| Şekil 4.2: <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> suş dağılım oranı m | 60    |



## RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim  | Sayfa |
|--|-------|
| Resim 3.1: Bakteri izolasyonu  | 32    |
| Resim 3.2: Bakteriyosin testi  | 33    |
| Resim 3.3: API 20 Strep negatif test kiti  | 35    |
| Resim 3.4: API 20 Strep pozitif test kiti  | 36    |
| Resim 4.1: Antimikrobiyal aktivite deneyi  | 40    |
| Resim 4.2: API 20 Strep sribi  | 49    |
| Resim 4.3: API Strep tanılama kiti sonuç kağıdı  | 49    |
| Resim 4.4: APIWEB tanılama uygulaması  | 50    |
| Resim 4.5: Protokol denemesi jel görüntüsü   | 52    |
| Resim 4.6: <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> primer bağlanma ısı optimizasyonu  | 53    |
| Resim 4.7: <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> primer bağlanma ısı Optimizasyonu  | 54    |
| Resim 4.8: <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> primerleri için magnezyum klorür optimizasyonu bant profilleri                       | 55    |
| Resim 4.9: <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> primerleri için magnezyum klorür optimizasyonu bant profilleri                     | 55    |
| Resim 4.10: <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ve <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> primer optimizasyonu bant profili | 56    |
| Resim 4.11: <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ve <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> DNA optimizasyonu bant profili    | 57    |
| Resim 4.12: <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> primerinin suşlardaki bant profili  | 58    |
| Resim 4.13: <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> primerinin suşlardaki bant profili  | 58    |
| Resim 4.14: <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> primerinin suşlardaki bant profili  | 59    |
| Resim 4.15: <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> primerinin suşlardaki bant profili  | 59    |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

| <b>Simgeler</b>               | <b>Açıklama</b>       |
|-------------------------------|-----------------------|
| %                             | Yüzde                 |
| cm                            | Santimetre            |
| CO <sub>2</sub>               | Karbondioksit         |
| dH <sub>2</sub> O             | Distile su            |
| g                             | Gram                  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Hidrojen peroksit     |
| HCl                           | Hidrojen klorür       |
| M                             | Molar                 |
| mg/ml                         | Miligram/Mililitre    |
| ml                            | Mililitre             |
| Mm                            | Milimolar             |
| NaCl                          | Sodyum klorür         |
| NaOH                          | Sodyum hidroksit      |
| °C                            | Celcius               |
| pH                            | Asitlik bazlık birimi |
| RPM                           | Dakikada devir sayısı |
| spp                           | Species (Tür)         |
| UV                            | Ultra viyole          |
| V                             | Volt                  |
| µg                            | Mikrogram             |
| µg/ml                         | Mikrogram/mililitre   |
| µL                            | Mikrolitre            |

**Kısaltmalar****Açıklama**

|      |  |
|------|--|
| ATP  | Adenozin trifosfat                                     |
| ATTC | American Type Culture Collection                       |
| bç   | Baz çifti  |
| DNA  | Deoksiribonükleik asit                                 |
| dNTP | Deoksi nükleotid trifosfat                             |
| DSM  | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| EDTA | Ethylendinitrilotetraasetat                            |
| GRAS | Generally Recognized as Safe                           |
| LAB  | Laktik asit bakterileri                                |
| MRS  | De Man Rogosa Sharpe                                   |
| NaCl | Sodyum klorür  |
| NaOH | Sodyum hidroksit                                       |
| PCR  | Polimeraz zincir reaksiyonu                            |
| RAPD | Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA                    |
| RNA  | Ribonükleik asit                                       |
| SDS  | Sodyum dodesil sülfat                                  |
| SF   | Serum fizyolojik                                       |
| spp. | Subspecies   |
| TBE  | Tris borik asit EDTA                                   |
| TCA  | Trikloroasetik asit                                    |
| Tm   | Erime sıcaklığı  |
| TSB  | Tryptic Soy Broth                                      |

## GİRİŞ

Dünyada endüstrileşme ve globalleşmeyle orantılı olarak gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde çoğunlukla çocuklarda, gıda kökenli kronik ve akut enfeksiyonlarda artış olduğu belirtilmektedir [Tatlı, 2009].

Laktik asit bakterileri (LAB) Gram-pozitif, sporsuz üreyen, katalaz (-), fakültatif anaerobik ve karbonhidratları fermente ederek laktik asit sentezleyen bakterilerdir [Axelsson, 1998]. Yüzlerce yıldır fermentasyon, bozulabilir gıda ürünlerini uzun süre korumak, farklı besinlerin üretimi için kullanılmaktadır ve fermente besinlerin çeşitli tipleri üretilmektedir [Akkaya, 2009].

Laktik asit bakterilerinin birçok türü, gıda maddeleri ve geleneksel fermente gıdalarında starter kültür olarak kullanılabilirken, doğal fermentasyonlarda ise indirgen (doğal) flora olarak bulunabilmektedir. Bu bakteriler, ‘‘Generally regarded as safe (GRAS)’’ listesinde olmakla beraber, antibiyotik direnç özelliği taşıma olasılıklarından dolayı, potansiyel bir sağlık riski taşıyabilmektedirler [Mathur ve Singh, 2005; Ammor ve ark., 2007]. Son zamanlarda LAB ve starter kültürlerin biyogüvenliği konusu önem kazanmış ve çalışmalar bu yönde sürdürülmektedir [Tatlı, 2009].

19. yüzyılın sonlarında fermente süt ürünlerinin mikrobiyolojik kompozisyonu üzerinde çalışmalar yapılmış ve daha sonra da bu türlerden, fermente süt ürünlerinde ticari olarak kullanılmak üzere saf kültür üretimleri gerçekleştirilmiştir. Süt ürünlerinde yaygın olarak kullanılan ticari starter kültürlerin başlıcaları; *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* ve *Lactobacillus* gruplarıdır. Probiyotik amaçlı en sık kullanılan türleri ise; *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. delbrueckii* ve *L. johnsonii*'dir [Tatlı, 2009].

LAB'nin bağırsaktaki epitel yüzeylere yapışması; kolonizasyon, immün sistemin aktive edilmesi ve patojenlere karşı antogonistik aktivitenin ön şartı olarak dikkate alınmıştır [AHİ, 2011].

İntestinal sistemde bulunan faydalı mikroorganizmaların sistemin fizyolojik dengesine olumlu yönde katkıda bulunmasına 'probiyosis', bu mikroorganizmalara da 'probiyotik mikroorganizmalar' denilmektedir. Bu mikroorganizmalar ürettikleri maddeler yardımıyla gıdaların sindirimine, vitamin üretimine ve zararlı mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların önlenmesine yardımcı olarak doğal floranın dengesini korumaktadır. Bu özelliklerinden dolayı son yıllarda faydalı bakteriler, yoğurt, peynir ve kefir gibi fermente süt ürünlerine ilave edilerek, probiyotik ürün olarak satışa sunulmaktadır [AHİ, 2011].

Bununla beraber, laktik asit bakterileri tarafından sentezlenen peptit yapıdaki "bakteriyosin" molekülü ürünün raf ömrünün uzatılmasını sağlayan, tüketici sağlığını patojenlere karşı biyokoruyucu olarak kullanılmaktadırlar. Bakteriyosin üretebilme özelliği genellikle plazmit DNA tarafından kodlanabilen bir özelliktir. Üretim aşamasında bu özelliğin starter kültür olacak izolata transfer edilmesi ürün kalitesini artıracak için önemlidir. Dolayısıyla özellikle buzdolabı sıcaklığında çoğalabilen bazı laktik asit bakterileri de ürünler de bozulmaya sebep olmaktadır. Bu özellikler bilimsel ve endüstriyel alanda laktik asit bakterilerinde çalışmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur. Endüstriyel uygulamaları bakımından LAB'leri göz önüne alındığında, en önemli unsur kullanılabilir LAB türlerinin seçimidir. Bundan dolayı, herhangi bir türün ayrımını spesifik ve belirgin olarak sağlayan yöntemlerin uygulanması ile güvenilirliği önemlidir [Dics ve ark., 1990; Dykes ve ark., 1994]. LAB'nin tanımlanma aşamasında biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır [Akkaya, 2012].

Bu çalışmada; Amasya'da tüketime sunulan çiğ süt örneklerinden *Lactococcus lactis* bakterilerinin izolasyonu, *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (DSM 4312), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ve *Escherichia coli* (ATCC 35218) patojen mikroorganizmalar üzerindeki

antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi, bakteriyosin ve benzeri etkili izolatların Gram boyama, katalaz, API gibi biyokimyasal ve PZR yöntemleriyle tanımlanması amaçlanmaktadır.





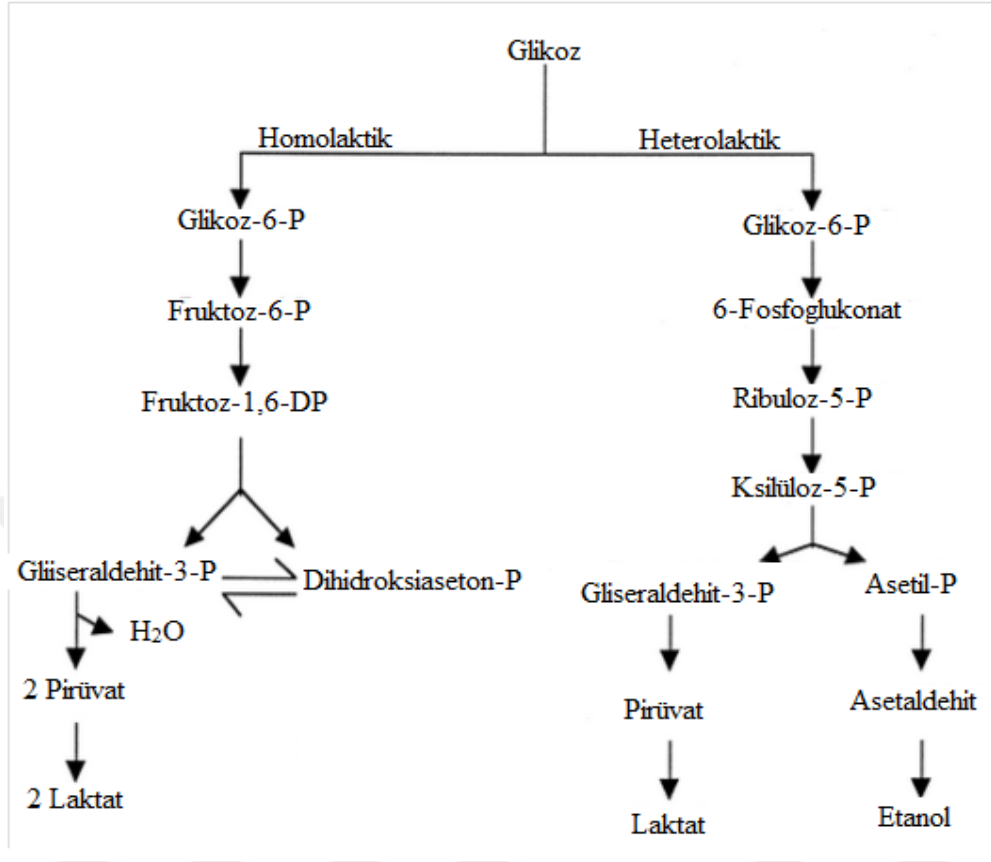
## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Laktik asit Bakterileri (LAB)**

1857' de Louis Pasteur, LAB'nin laktik asit fermentasyonunu gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur [Karagül, 2010].

Laktik asit bakterileri Orla-Jensen'a (1919) göre çubuk ya da kok şeklinde, spor oluşturmayan, genellikle katalaz (-), hareketsiz, Gram-pozitif ve karbonhidratı fermente ederek son ürün laktik asiti oluşturan bir bakteri grubudur [Demir, 2014].

Porfirinleri ve sitokromları içermedikleri için fermantasyon sonucu temel ürün olarak laktik asit sentezleyen bu bakteriler, elektron taşınmasına bağlı fosforilasyon yapamazlar, sadece substrat düzeyinde fosforilasyon ile enerji elde ederler. LAB karbohidrat fermentasyonuna göre homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere ikiye ayrılırlar. Homofermentatif grup fermentasyonla sadece laktik asit üretirken, heterofermentatif grubun üyeleri ise laktik asit, etanol ve CO<sub>2</sub> üretebilir [Demir, 2014].



Şekil 2.1. LAB'nin glüköz fermentasyonu [Demir, 2014]

LAB grubu; *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactosphaera*, *Dolosigranulum*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Alloiococcus*, *Weissella*, *Bifidobacterium*, *Globicatella*, *Vagococcus*, *Enterococcus* ve *Aerococcus* cinslerini içinde barındırmaktadır. Gıda endüstrisi açısından *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* türleri önem kazanmaktadır [Karagül, 2010].

## 2.2. Sınıflandırılması

Süt ürünlerinde bulunan başlıca LAB, laktokoklar, leuconostoklar, enterokoklar ve homofermentatif ya da heterofermentatif laktobasillerdir. Gram pozitif, katalaz negatif, arjinini hidrolize edemeyen heterofermentatif koklar *Leuconostoc*, Gram pozitif, katalaz negatif koklar ise *Lactobacillus* olarak kabul edilmektedir [Perez ve ark., 2000].

### 2.2.1. Lactococcus

*Lactococcus* cinsi, *L. piscium*, *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. raffinolactis* ve *L. plantarum* olmak üzere 5 tür içermektedir. *L. lactis* suşları arasından da sadece *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ve *L. lactis* subsp. *lactis* tereyağı, yoğurt, peynir gibi fermente süt ürünleri yapımında starter kültür olarak kullanılmaktadır [Başaran, 2001].

Mevcut taksonomik verilere göre *L. lactis* türünün altında *lactis*, *cremoris* ve *hordniae* alttürleri olmak üzere üç adet alttür bulunmaktadır. Bunlardan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* özellikle süt endüstrisi açısından önem arz etmektedir. *L. lactis* subsp. *lactis*; riboz, laktoz, maltoz, trehaloz ve eskulin fermantasyonlarını ve arjininden amonyak oluşumunu gerçekleştirebilirken, *L. lactis* subsp. *cremoris*; sadece laktoz fermantasyonunu sağlayabilmektedir. *L. lactis* subsp. *lactis* ile *L. lactis* subsp. *cremoris* suşlarının birbirlerinden ayırt edilmelerinde kullanılan fenotipik özellikler, pH 9.2'de, 40 °C'de ve % 4 tuz varlığında gelişme durumları olarak sıralanmaktadır [Corroler, 1998].

Bunun yanı sıra *L. lactis* subsp. *lactis* çok çeşitli çevrelerden izole edilebilirken, *L. lactis* 13 subsp. *cremoris* sadece fermente süt ürünlerinden izole edilebilmektedir. *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* için doğal ortamlarının yeşil bitkiler olduğu bildirilmektedir [Salama, 1995].

*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ise cottage peynirinin, kremanın ve tereyağının aromasına katkıda bulunmaktadır. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, sitratı kullanan bir LAB'sidir. Sitratın kullanılması ile birlikte CO<sub>2</sub> ve diasetil oluşmaktadır. Oluşan CO<sub>2</sub> ile bazı ürünlerin tekstürüne, diasetil ise aromaya katkıda bulunmaktadır. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris*'ten sitrattan karbondioksit oluşturması ile ayırt edilebilmektedir. *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*'in her ikisi de arjinini kullanır. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, arjinini hidrolize ettiğinde daha yoğun bir şekilde amonyak

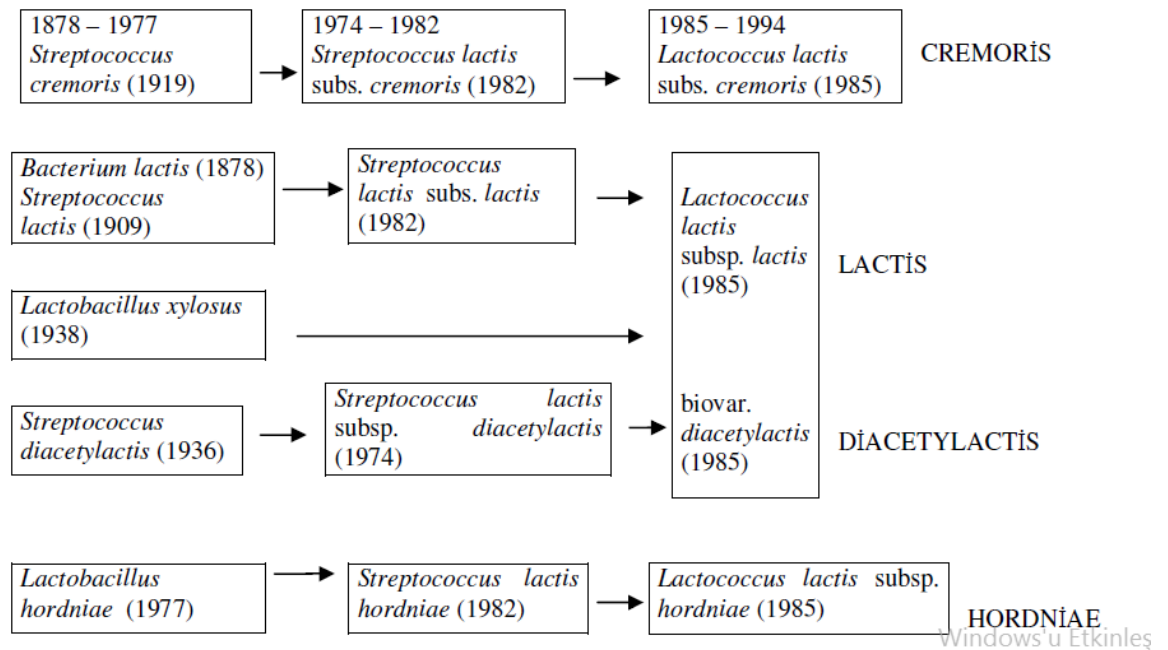
oluşturabilmektedir. Süt, ortalama 1750 mg/L miktarında sitrat içermektedir. Bunun çok büyük bir kısmı çözülmüş olduğu için peynir altı suyu ile bir miktar kaybolmaktadır. Peynir pıhtısındaki sitrat miktarı, peynir altı suyundakine oranla yaklaşık 3 kat daha fazladır. Cheddar peyniri ortalama % 0.2–0.5 düzeyinde sitrat içermektedir. Sitrat, mezofil starter kültürlerince yapılan birtakım ürünlerde aroma bileşiklerinin öncüsüdür. Sitrat, bir sitrat transport plazmidi içeren *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* tarafından metabolize edilebilmektedir. *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* ve *Ln. lactis* de sitratı metabolize edebilmektedir. Sitrat, diğer LAB tarafından metabolize edilememektedir. Sitrat metabolizması sonucu oluşan CO<sub>2</sub>, küçük gözeneklerin ve diasetil de aromanın oluşmasından sorumludur [Büyükyörük, 2007].

*Lactococcus garvieae* ve *L. piscium*, balıklarda yer alan önemli zoonozlardır. *L. garvieae* ayrıca sığır mastitisleri ile insan enfeksiyonlarından sorumlu tutulmuştur. Çalışmalar, *L. garvieae* ile *Enterococcus seriolicida*'nın benzer olduğunu göstermiştir. *L. plantarum* izolatları, erimiş ve dondurulmuş bezelyelerin bozulmasıyla ilişkilendirilmiştir. *L. raffinolactis*, pastörize edilmemiş sütlerden, havuçlardan, kaz ve sığır gastro intestinal bölgelerinden ve süt çiftliklerinden izole edilmiştir [Pu ve ark., 2002].

*L. lactis* subsp. *Lactis* biovar. *diacetylactis* Voges–Proskauer reaksiyonu ile sitrattan asetoin oluşturabilmektedir. *L. raffinolactis* ise rafinoz ve sorbitolden asit oluşturabilirken, arjinini hidrolize edememektedir. *L. raffinolactis*, laktokoklar içinde % 40–43 ile en yüksek G + C nükleik asitlerine sahiptir [Perez ve ark.,2000].

*L. garviae*, *L. raffinolactis*, *L. plantarum* ve *L. hordinae* fermente süt teknolojisinde kullanılmamaktadır. *L. garviae*, *L. lactis* subsp. *hordniae* ve *L. raffinolactis*'ten sadece *L. raffinolactis*, rafinozu fermente ederken diğer ikisi arjinini hidrolize eder. *L. hordiae*'de galaktoz, laktoz, maltoz, riboz negatiftir. *L. raffinolactis* diğer laktokoklardan melibiyoz ve rafinozu fermente etmesiyle ayırt edilmektedir. *L. plantarium* salisin, sükroz, sorbitol, trehaloz, mannitol, ve melezitoz gibi karbonhidratları fermente etmektedir. *L. plantarium* ve *L. piscium*'un her ikisi de

melezitozu fermente eder fakat *L. piscium*, *L. plantarium*'dan melibiozu fermente etmesiyle, *L. plantarium* diğer laktokoklardan melezitoz ve sorbitolu fermente etmesiyle ayırt edilebilmektedir [Carr ve ark., 2002].



Şekil 2.2. *Lactococcus lactis*'in sınıflandırılması

### 2.2.2. Streptococcus

Streptokoklar; kok şekilli bu bakteriler yara enfeksiyonlarıyla doğrudan ilişkilidir ve cins ismi *Streptococcus* ilk olarak Rosenbach (1884) tarafından zincir formunun açıklanmasında kullanılmıştır.

Streptokok genusunun zamanla büyük değişiklik gösterdiği görülmüştür. Kilpper-Balz ve arkadaşları (1982) serolojik grup olan D ve N streptokokkilerin 23S rRNA'ya, 16S rRNA sekans benzerliklerine dayanarak gram pozitif bakterilerden Clostridium'un evrimsel süreci ile *Streptococci* *S. sensu stricto*, *Enterococcus* ve *Lactococcus* olmak üzere üç farklı genetik gruba ayrılmıştır [Schleifer ve Klipper-Balz, 1984]. *Streptococcus* genusu içindeki diğer türler patojenik ve oral streptokoklardır [Stiles ve Holzapfel, 1997].

*S. thermophilus*, yoğurt ve peynir üretimi için başlatıcı organizma olmasından dolayı bu genus içerisinde istisnadır. *S. thermophilus* 45–50°C’de gelişir fakat 15°C’de gelişmez ve sıcaklığa oldukça dirençlidir [Stiles ve Holzapfel, 1997].

### 2.2.3. Enterococcus

Enterokoklar; tekli, ikili ya da kısa zincirler halinde bulunurlar ve 37°C’de optimum gelişme gösterirler. Mikroskopik olarak streptokok türlerinden ayırt edilemezler. Gram pozitif, kokobasil şeklinde görülebilirler, bazı türlerde pseudo-katalaz görülse de genellikle katalaz negatiftirler. Alfa, beta veya gama hemoliz yeteneğindedirler. Düşük su aktivitesi, yüksek ısı gibi çevresel koşullara, bazı antiseptiklere karşı direnç gösterirler ve cansız yüzeylerde uzun süre yaşayabilirler [Demir, 2014].

Bu mikroorganizmalar çoğunlukla insan ve hayvan intestinal florasının bileşenleri olarak kabul edilirler ve vücudun farklı ekstra intestinal bölümlerinde fırsatçı patojen olarak bulunurlar [Devlieghereve ark., 2004]. *Enterococcus* cinsi taksonomide *Firmicutes* şubesi, *Bacilli* sınıfı, *Lactobacillales* takımı, *Enterococcaceae* ailesi içerisinde yer almaktadır [Kilpper-Bälz, 1984]. Bakteriyosin üretme yeteneğinde olan birçok enterokok türünün, özellikle Gram pozitif gıda patojenlerine karşı geniş spektrumlu etki gösterdikleri bilinmektedir [Giraffa, 1995].

### 2.2.4. Pediococcus

Pediokoklar; gram pozitif, hareketsiz ve kok şeklinde hücrelere sahiptir. Bu hücreler monokok, dipkok ve tetrakok şeklinde bulunmaktadır. Bu bakterilerin sitokromları yoktur ve katalaz negatiftir. Pediokoklar amonyum tuzlarını nitrojen kaynağı olarak kullanmazlar ya da nitratları nitrite indirgeyemezler. Empden Meyerhof yolunu kullanarak glikozu fermente ederler ve DL- ya da L- formunda laktat oluştururlar, bu sırada karbondioksit üretmezler. Pediokoklar bitkilerin üzerinde, çeşitli gıdalarda laktobasillerle ve leukonostoklarla beraber bulunurlar. Ayrıca alkollü içkilerde bozulmalara sebep olmaktadır [Arslankoz, 2011].

### 2.2.5. Leuconostoc

Leukonostokların sınıflandırılması çoğunlukla morfolojilerine dayanmaktadır. Oval ya da kok şeklinde hücrelere sahiptirler. Hücreler tek, çift, kısa veya uzun zincirler şeklinde bulunmaktadır [Arslankoz, 2011].

Süt ürünlerinin, turşunun ve çeşitli et ürünlerinin fermantasyonunda yer almaktadır. Katalaz negatiftir ve sitokromları yoktur. Arjinini hidrolize edemezler ve proteolitik değildirler. Gelişimleri fermente edilebilir karbohidratların varlığına bağlıdır ve glikozun fermantasyonu sırasında heksoz-monofosfat ve fosfoketolaz yollarını birlikte kullanmaktadır. Diasetil ve çeşitli aroma maddeleri üretme kabiliyetine sahiptirler. Sebze ürünleri fermantasyonunun başlatılmasında diğer laktik asit bakterilerden daha hızlıdır [Arslankoz, 2011].

Bazı türleri oksidatif mekanizmaya sahiptirler ve etanol yerine asetik asit oluştururlar. Ramnoz, melezitoz, inulin, nişasta, gliserol, sorbitol ve inozitol'ü fermente etmezler [Kılıç, 2008].

Leuconostocların *Leu.mesenteroides*, *Leu.lactis*, *Leu.oenos* ve *Leu.paramesenteroides* olmak üzere dört türü bulunmaktadır. *Leu.dextranicum* ve *Leu.cremoris* ise *Leu.mesenteroides* 'in alt türleri olarak bildirilmiştir. [Kılıç, 2008].

### 2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Ürettiği Antimikrobiyal Maddeler

1900'lerin başlarından bugüne peynirlerin ve fermente sütlerin endüstriyel üretiminde artış söz konusudur. Laktik asit bakterileri antimikrobiyal maddeler üretmeleri nedeniyle gıdaların korunmasında eskiden beri kullanılmaktadırlar. Sümer yazıtlarına göre sütün fermentasyon yoluyla korunması İ.Ö. 6000 yıllarına dayanmaktadır. Fermentasyon kullanılabilir karbonhidrat miktarını azaltır ve antimikrobiyal etkiye sahip küçük molekül ağırlığında organik moleküllerin oluşmasını sağlar. Bu moleküllerin en bilinenleri laktik, asetik ve propiyonik asittir [Salminen ve Wright, 1998].

Laktik asit bakterilerinin ürettiği antimikrobiyal maddeler:

- düşük molekül ağırlığına sahip bileşenler (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> gibi)
- karakterize edilemeyen bileşenler
- yüksek molekül ağırlığına sahip bileşenler (bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler) olarak sınıflandırılmaktadır [Ammor ve ark.,2006; Yang, 2000].

### **2.3.1. Organik Asitler**

Fermantasyon sırasında üretilen organik asidin türü LAB çeşit ve türüne, ortamın bileşimine ve gelişme koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir [Yang, 2000; Ammor ve diğ., 2006].

Asitlerin antimikrobiyal etkisi sadece pH'yı düşürmeleri ile ilgili değildir, asidin türü de önemlidir. Asit inhibisyonu; pH, asidin iyonlaşma derecesi ve asidin tek başına toksik etkisi ile ilişkilendirilmektedir [Adams ve Nicolaides, 1997].

Asidik ortamın oluşturduğu stres özellikle, laktik asit bakterileri olmak üzere birçok bakteri türünde çalışılmıştır. Düşük pH iyonize olmayan asitlerin oluşumunu artırmaktadır. Dış ortamda pH'nın düşük olması, hücre sitoplazmasının asidifikasyonuna sebep olur ve iyonlaşmamış asit hücre zarından içeriye difüze olur. İyonlaşmamış asit elektrokimyasal proton gradiyentini etkileyerek ya da substrat transport sistemini etkileyen hücre zarı geçirgenliğini değiştirerek etkisini göstermektedir [Adams ve Nicolaides, 1997; Yang, 2000]. Organik asitler ile genellikle hücre içindeki pH düşmekte ve bu düşüş membran yapısını değiştirmekte ve pH'ya duyarlı bazı enzimlerin aktivitesini azaltmaktadır. Hücre, enerjisinin çoğunu sitoplazmik zarı proton gradiyenti oluşturarak sitoplazmayı nötralize (de-asidifiye) etmek için harcar ve bakteri gelişimi bu durumdan oldukça etkilenir [Cotter ve diğ., 2005; Charlier ve diğ., 2009].



Laktik asit pH 5’de spor oluşturan bakterilere karşı mükemmel bir inhibitör olmakla birlikte, aynı pH’da maya ve küflere karşı etkisiz kalmaktadır. Laktik asitin direk etki mekanizması üzerine yapılmış çalışmalar yetersizdir. Ancak, laktik asitin de asetik ve propiyonik asit gibi kısa zincirli yağ asitlerinin etki tarzına benzer şekilde membran potansiyeline etki ettiği ileri sürülmektedir [Çon ve Gökalp, 2002].

Laktik asit, salamura ve fermente gıdalarda mikroorganizma gelişiminin önlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Gıda sanayiinde en geniş kullanım alanı ise fermente gıdalar ve süt endüstrisidir. Laktik asit molekülleri hücre içine girdiğinde düşük pH değerlerini arttırmaktadır. Hücre içerisine giren asit molekülü, disosiyasyon olarak proton motive gücü nötralize etmektedir. Bundan dolayı da elektrokimyasal gradiente dayandırılan membrana bağlı transport işlemine müdahale etmektedir.

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

Laktik asit bakterilerinin üremeleri sonucu oluşturdukları hidrojen peroksit miktarı, laktik asit bakterilerinin cins, tür ve hatta suşlarına göre farklılık göstermektedir. Hidrojen peroksit, termodinamik bakımdan kararsız bir bileşiktir, su ve oksijene ayrışmaktadır [Çadırcı, 2003].

Oksijen varlığında laktik asit bakterileri; flavoprotein içeren oksidaz, NADH oksidaz ve süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri sonucunda hidrojen peroksit oluştururlar. Laktik asit bakterilerinin “hem” grupları (sitokrom ve katalaz) yoktur. Bu nedenle hidrojen peroksidi indirgeyemezler. Hidrojen peroksitin gram pozitif bakterilere (laktik asit bakterileri dahil) karşı bakteriyostatik, birçok gram negatif bakteriye karşı ise öldürücü etkisi bulunmaktadır [Yang, 2000].

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bakteriyal hücreler üzerinde güçlü oksitleyici özelliğinden dolayı etkili bir antimikrobiyal bileşiktir. Sülfidril grupları hücre proteinleri ve membran lipitlerini okside edebilirler. Bazı laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkileri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimlerine dayandırılır. Ancak inhibitör aktivitenin gerçekte organik asitler ve diğer metabolitlerin kombinasyonu ile sağlandığı ifade edilmektedir [Çon ve Gökalp, 2002].

Hidrojen peroksidin antimikrobiyal etkisi; sülfidril gruplarını okside ederek birçok enzimin denature olmasına sebep olması ve hücre zarı lipidlerini peroksitleyerek membran geçirgenliğini artırmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca bakterisidal etkiye sahip süperoksit ( $O_2^-$ ) ve hidroksil (OH) serbest radikallerinin oluşmasına sebep olarak da DNA'ya zarar vermektedir [Ammor ve diğ., 2006]. Çiğ sütte  $H_2O_2$ , laktoperoksidaz sistemini aktive ederek hipotiyosiyanat (OSCN), yüksek oksidasyon ürünleri ( $O_2^-$  SCN ve  $O_3^-$  SCN) ve orta oksidasyon ürünleri oluşturmaktadır. Bu ürünlerin geniş bir spektrumda gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerine inhibe edici etkisi bulunmaktadır [Yang, 2000].

### 2.3.3. Hidrojen Sülfür ( $H_2S$ ) ve Karbondioksit ( $CO_2$ )

Hidrojen sülfür çok toksik bir maddedir. Hidrojen sülfüre kükürlü hidrojen de denir. Kükürdün hidrojenle oluşturduğu renksiz, çok zehirli gaz halindeki bir bileşiktir. Hidrojen sülfür, karakteristik çürük yumurta kokusunda bir gazdır. Termodinamik bakımdan kararlı olmasına rağmen çok yüksek sıcaklıklarda ayrışması mümkündür [Yüksekdağ ve Beyatlı, 2003; Çadircı, 2003].

Sülfatların bakteriler tarafından redüksiyonu ve proteinlerin parçalanması sonucunda hidrojen sülfür oluşur. *Lactobacillus plantarum*, *L. viridescens* ve *L. coryneformis* türlerinin, peptonlu demir agarda hidrojen sülfür oluşturduğu bildirilmiştir. Besi yerinde karbon kaynağı az olduğunda da hidrojen sülfürün meydana geldiğini belirtmişlerdir [Çadircı,2003; Yüksekdağ ve Beyatlı, 2003].

### 2.3.4. Proteolitik Aktivite ve Reuterin

Proteolitik aktivite, mikroorganizmaların salgıladığı proteolitik enzimler ile proteinlerin hidrolize olması olayıdır. Proteolitik aktivite, hem starter kültürlerin asit oluşturma özelliği hem de ürünün duyuşal nitelikleri açısından önemlidir. Bu özelliğin tayininde, Hull yönteminden yararlanılır ve kazeinin parçalanması sonucu serbest kalan tiroşin ve triptofan belirlenir [Tabakoglu, 2010].

Sütteki fermantasyon prosesinde, laktik asit bakterilerinin proteolitik sistemi anahtar rol oynar çünkü bu bakterilerin sütte gelişimini ve bu nedenle başarılı bir fermantasyon sağlar [Savijoki ve ark., 2006].

Yapılan araştırmalarda, laktik asit bakterilerinde, laktik asit üretimi ve proteolitik aktivitenin cins, tür ve suşlar arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir [de Giori ve ark., 1985].

Reuterin, heterofermentatif *Lactobacillus reuterii* türü tarafından oluşturulan, düşük molekül ağırlığında, yüksek çözünürlükte bir maddedir. Reuterinin inhibitör etkisi DNA sentezi üzerindeki etkisi ile ribonükleotid redüktazın alt birimini bağlayıcı bir inhibitör gibi etki gösterdiği bulunmuştur [Evren ve ark.,2006].

### **2.3.5. Bakteriyosin ve Bakteriyosin Benzeri Maddeler**

Süt, et, tahıl ve sebzelerin fermentasyonunda rol alan laktik asit bakterilerinin ürettiği antimikrobiyal maddeler, fermente gıdalarda olabilecek patojen bakterileri inhibe edebilmektedir. Protein karakterindeki bu maddelerin adlandırılmasında 'Bakteriyosin' teriminin ilk olarak kullanımı 1953 yılında Pasteur Enstitüsü tarafından yapılan bir yayında François Jacob ve Alexander Siminovitch adlı bilim adamları tarafından yapılmıştır [Jack ve ark., 1995].

Bakteriyosinlerle ilgili olarak yapılan çalışmaların yoğunlaşmasının ardından mikroorganizmalar tarafından sentezlenen farklı yapılarda bakteriyosin ve benzeri inhibitör etkiye sahip pek çok madde keşfedilmiştir. Bu moleküllerin bir kısmının kimyasal yapısı birbirine benzerlikler gösterirken bazıları ise diğerlerinden oldukça farklıdır [Kuleaşan, 2002].

Bakteriyosinler Klaenhammer (1993) yaptığı sınıflandırmaya göre;

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

- Sınıf II: küçük, ısıya karşı stabil peptidler,
- Sınıf III: ısıya duyarlı büyük proteinler,
- Sınıf IV: kompleks bakteriosinler olarak sınıflandırılmaktadırlar [Kurt ve Zorba, 2005].

Tagg ve arkadaşları (1976)'un yaptıkları tanıma göre bakteriyosinler, protein tabiatında antagonistik maddeler olup sınırlı sayıda bakteriye, özellikle de bakteriyosin üreten bakteriye ve yakın türlere karşı bakterisidal veya bakteriyostatik aktiviteye sahip bileşiklerdir. Bu tanımdan hareketle bakteriyosinlerle antibiyotikler karıştırılmaktadır. Ancak bakteriyosinler ile antibiyotikler arasında temel farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıklar;

1. Bakteriyosinler, antibiyotiklere göre çok daha dar etki spektrumlarına sahiptir.
2. Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenen ürünlerdir, antibiyotikler ise enzimatik işleme sonucu aktif formlarını kazanırlar.
3. Bakteriyosinler genellikle gelişme fazında üretilirler ve iki bileşenli bir sistem tarafından regüle edilir. Antibiyotikler ise, gelişimin durma fazında üretilen ikincil metabolitler olarak bilinirler.
4. Her bakteriyosinin kendi bağışıklık proteini vardır. Bu bağışıklık proteinlerini kodlayan genler, bakteriyosinlerin yapısal genleri ile bağlantılıdır. Antibiyotik bağışıklığını yöneten genetik determinantlar ise yapısal antibiyotik genleri ile bağlantılı değildir [Tuncer, 2005].

#### **Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel özellikleri**

- 34 ile 57 arası aminoasitten oluşan katyonik peptide sahiptirler,
- Membran fonksiyonları stabilizasyonunu bozarak hücre ölümüne neden olurlar,
- Gram (+) bakterilere karşı bakterisidal etki gösterirler,
- Proteolitik enzimler bakterisidal etkiyi engelleyebilir,

- Bakterisidal etki genel olarak geniş pH aralığına ve yüksek sıcaklığa karşı dirençlidir,
- Bakteriyosine duyarlı gram pozitif bakteriler, kendi üretmiş olduğu bakteriyosine dirençlidir,
- Bakterisidal spektrum azdan çoğa doğrudur,
- Gram (+) suşa ait hücreler bir bakteriyosine duyarlı iken bir başkasına dirençli olabilirler,
- Duyarlı bir suş bakteriyosin varlığında gelişirken geçici dirençlilik gösterebilir,
- Üretici hücreler genetik olarak, kendi üretmiş oldukları bakteriyosinlere karşı bağışıklık kazanmıştır,
- Bakteriyosin molekülü, üretici hücreleri içeren gram pozitif bakterilerin hücre yüzeyinden absorbe edilmektedir [Jack ve ark.,1995].

### **Bakteriyosin testleri**

Bir bakterinin bakteriyosin üretilip üretilmediği çeşitli yöntemlerle belirlenebilir [Bayram, 2005]

**Spot-On Lawn Testi:** Sıvı besiyerinde geliştirilen tüplerin santrifüjlenmesi, nötralize ve filtrasyonu ile elde edilen süpernatantın indikatör organizmayı barındıran petri agarın üzerine nokta şeklinde (5-50 mikrolitre) ve inkübasyonun ardından inhibisyon zonunu inceleyerek yapılır.

**Agar-Kuyucuk Difüzyon Testi:** Spot-on lawn tekniğindeki aşamalar izlenir. Elde edilen süpernatant indikatör organizma barındıran petri agara kuyucuk açılarak içine enjekte edilir ve inkübasyonun ardından inhibisyon zonu incelenir.

**Sandviç (Overlay) Yöntemi:** Bakteriyosin üreten bakteriler katı besiyerinde kolonileri gözle görülecek kadar geliştirilir bunun üzerine indikatör bakteriyi içeren yumuşak agar ikinci tabaka şeklinde ilave edilir ve inkübasyondan sonra inhibisyon zonu ölçülür.

## 2.4 *Lactococcus lactis*'de Biyokimyasal Testler

Heksozları fermente ederek laktat oluşturan bakteriler laktik asit bakterileridir [Tunail, 2009]. Laktik asit bakterilerini tanımlamada kullanılan biyokimyasal karakterler; minimum, optimum ve maksimum çoğalma ısısı, süt veya diğer besi ortamlarıyla fermente edildiğinde laktik asit miktarı, oksijene toleransı, gaz ve uçucu aroma bileşikleri üretme yetenekleri, farklı NaCl yoğunluklarına gösterdikleri tolerans ile pH'ya olan toleransıdır. Ayrıca laktik asit bakterilerinin sütü asitleştirme yeteneği de ayırıcı bir kriterdir. Çünkü sentezlediği laktik asit miktarı potansiyel olarak stabil olmayan plazmitlerde kodlanabilir. Buna karşın laktik asit bakterileri türlerini ayırmada oluşturdukları laktik asit izomerlerinin saptanması daha geçerli bir kriter kabul edilmektedir [Kılıç, 2008].

Bakteriler gelişecekleri ortamın pH'sı açısından daha seçicidirler. Mikroorganizmaların gelişebildiği pH aralığı aynı cinsin türlerine, hatta aynı türün farklı suşlarına, üreme ortamına, ortamın bileşimine ve diğer çevre faktörlerine bağlı olarak değişmektedir. *Lactobacillus* türleri gelişme ortamındaki sitrik, hidroklorik, fosforik ve tartarik asitlerin varlığında, asetik asit ve laktik asit varlığına kıyasla daha düşük pH değerlerinde gelişebilmektedir. Uygun olmayan pH değerlerinde mikroorganizmaların enzim aktiviteleri ve membran geçirgenliği olumsuz yönde etkilenir. Bakteri hücreleri normalde negatif yük fazlalığına sahip olma eğilimindedirler [Temiz, 1999].

Streptokoklar homofermentatif olarak glukozu L(+) laktik asite dönüştürürler. Bazı türleri malik ve sitrik asit gibi organik asitleri, serin ve arginin gibi aminoasitleri fermente ederler. Beslenme gereksinimleri genelde komplekstir, fakat değişkenlik gösterir [Stiles ve Holzapfel,1997]. Aminoasit, purin, pirimidin, peptid, vitaminler ve ara sıra yağ asitlerine gereksinimleri vardır. Optimum gelişme sıcaklığı 37 °C'dir. Maksimum ve minimum gelişme sıcaklıkları ise türlere göre değişir [Kılıç, 2008]. *S.thermophilus* bu genusta ayrı bir öneme sahiptir çünkü yoğurt ve peynir üretimi için önemli starter bir organizmadır. Sherman tarafından viridans grubuna yerleştirilmiştir. Spesifik antijen grubu yoktur. *S.thermophilus* 45 °C ve 50 °C'ye

kadar olan sıcaklıklarda gelişirler fakat 15 °C' de gelişmezler ve nispeten sıcaklığa dirençlidirler [Tabakoğlu, 2010].

Laktokoklar, homofermentatif özellikte olup, ana enerji kazanım mekanizmaları şekerlerin fermentasyonu ile gerçekleşmekte ve başlıca son ürün olarak L (+) laktik asit ve aroma maddeleri üretmektedirler. Çoğalabilmeleri için azot kaynakları başta olmak üzere çok sayıda besin maddesine ihtiyaç duyarlar. Laktokoklar optimum 30°C'de gelişirler. 10°C' nin altında, 45°C ve üstünde, %6,5 NaCl içeren ortamlarda ve pH 9,6' da üreme gösterememektedirler. İzolasyon kaynakları süt, süt ürünleri ve bitkisel materyallerdir [Tabakoğlu, 2010].

Enterokoklar kemoorganotrofik organizmalardır ve heksozlardan homofermentatif laktik asit fermentasyonu ile L-laktik asit oluştururlar. Ayrıca aminoasitlerin parçalanmasından enerji elde ederler [Stiles ve Holzapfel, 1997]. Enterokoklar Sherman tarafından 10 °C ve 45 °C' de, %6,5 NaCl ve pH 9,6'da gelişebilen organizmalar olarak tanımlanmıştır. 60 °C'ye kadar yaşamlarını devam ettirebilirler. Bu özelliklerinden dolayı streptokok ve laktokok gibi diğer Gram (+) ve katalaz (-) homofermentatif koklardan kolaylıkla ayrılabilirler [Stiles ve Holzapfel, 1997; Moreno ve ark., 2006]. Grup D anti serumu ile bazı türler (*E.avium*, *E.faecalis*, *E.gallinarum*) reaksiyon verirler ancak reaksiyon vermeyen bazı türler (*E.cecorum*, *E.columbae*, *E.dispar*) de vardır [Klein, 2003].

*Leuconostoc* suşları mezofilik laktokoklar gibi 30 °C' de gelişebilirler fakat düşük sıcaklıklarda 4°C ve 10 °C' de gelişen suşları da vardır. *Leuconostoc*lar fonksiyonel sitokromlara sahip değildir ve krebs çemberinin bazı enzimleri eksiktir. Sadece fermentasyonla enerji elde ederler. Diğer bütün laktik asit bakterileri laktik asit, CO<sub>2</sub>, etanol veya asetat üretirler. Sitrat ve malat *Leuconostoc* tarafından metabolize edilen iki temel organik asittir [Hemme ve Foucaud-Scheunemann, 2004].

*Pediokoklar* homofermentatifdirler. Bütün türler glukozdan D- laktat üretirler [Kılıç, 2008]. Bazı türler pH ve NaCl'ye ekstrem tolerans gösterirler. Örneğin, *P. acidilactici* 50 °C' de gelişir ve sıcaklığa toleranslıdır. *P. damnosus* ve *P. parvulus*

asiti tolere ederler ve düşük sıcaklıklarda gelişirler fakat genellikle diğer suşlardan daha anaerob gelişme ortamına ihtiyaç duyarlar. Dasetil üretimi *P. damnosus* için tanımlayıcıdır, fakat sınırlı büyüme koşulları altında asetoin ve /veya dasetil üretilebilir [Stiles ve Holzapfel, 1997].

LAB gıdanın içerisinde yüksek tuz gibi çeşitli ozmotik streslere maruz kalmaktadır. Bu durumlarda, özellikle turgor basıncı (şişme) ve hidrasyon (su kaybetme) bu bakteriler için çok önemlidir [Dikici, 2009].

Tuzun mikroorganizmalar üzerindeki en önemli etkisi osmotik basıncı artırması ve böylece hücre geçirgenliğini artırarak mikroorganizma etkinliğini azaltması veya önlemesidir. Ancak bunun için gerekli olan tuz konsantrasyonu; pH, sıcaklık, protein oranı ve protein niteliği, karbohidrat miktarı, metal iyonları varlığı gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Düşük tuz konsantrasyonlarında (% 5-8) fermantasyon hızlı, yüksek tuz konsantrasyonlarında (% 10 ve üzeri) yavaş olarak gerçekleşir veya hiç gerçekleşmez. Tuz konsantrasyonunun fermantasyonda rol alan mikroorganizmaların faaliyetleri üzerine etkisi seçici özellik göstermektedir. Bu bakımdan ürüne ve prosese göre ayarlanması önem taşımaktadır [Aktan 1998].

## 2.5. API Testi

Biyokimyasal tanımlamayı pratik hale getirmek için yarı otomatik ve otomatik tanımlama sistemleri kullanılmaktadır. Otomatik sistemler hazır test kitleri şeklinde bulunmaktadır. Ticari olarak temin edilen tanımlama kitleri organizmaların bir dizi substratı fermente etmesine veya asimile etmesine dayanmaktadır. Örnek olarak API (bioMerieux) (API-50CHL veya API-20 strep) ve BBL CRYSTAL verilebilir. Mikroorganizmaların tanımlamasının çabuk ve doğru bir şekilde yapılması için hazır kitler kullanılmaktadır. Bu kitlerin avantajları; birçok biyokimyasal testin bir arada çalışılması, az miktarda malzeme ve örnek kullanımıyla kısa sürede sonuç vermesi, tekrarlanabilir olması ve yüksek doğrulukta sonuç vermesidir. Dezavantajları ise; yoğun hücre kültürü kullanılması, hücre morfolojisinin önceden belirlenmesinin



gereği ve pahalı olmasıdır. Bu yöntemler çok yaygın bir tanımlama yöntemi olarak uzun yıllardan beri kullanılmaktadır [Elçioğlu, 2011].

API 20 strep geniş bir kapasiteye sahip 20 biyokimyasal testi kombine eden standart bir yöntemdir. Birçok Streptococcaceae veya benzer organizmaların grup veya tür düzeyinde tanımlanmasını sağlamaktadır. API 20 sribi şekerlerin enzimatik aktivitesi ya da fermantasyonu belirlenmesi için dehidrate substratları içeren 20 mikrotüpten oluşur. Enzimatik testler, enzimatik substratları yeniden hidrate etmesi için saf kültürden yapılmış yoğun bir organizma süspansiyonu inkübe edilir. Ortaya çıkan son ürünler spontan ya da reaktif eklenerek renk değişikliği oluşur ve sonuçlar bu renk değişimine göre değerlendirilir.

## **2.6 Moleküler Tiplendirme Yöntemleri**

Moleküler taksonomi; canlı varlıklarda bulunan molekül yapıları ile ilgili bilgileri toplayarak, sınıflandırmaya ve uygulanabilir bir sistemde bu bilgileri organize etmeyi sağlamaktadır. Doğal bir sınıflandırma yapmak için filogeniye dayanan bir sınıflandırmadan söz edildiğinde moleküllerin sıralanışında bir karşılaştırma işlemi yapılması gerekir. Moleküler terminolojide bu sıralanışlar benzer bireysel grupların ve gruplar arasında filogenik akrabaların tanınmasına yardım eden yönlendirici bir zincir meydana getirmektedir.

Farklı bireysellikten ileri gelen iki DNA arasındaki olası bir benzerliğin ilk koşulu onların içerdiği % (G+C) oranlarının eşitliğidir. Bu uygun koşul iki DNA arasındaki homolojinin daha önceden ayrılmış basit heterolog kısımlarının tekrar yeniden biraraya gelme oranları ile değerlendirilir [Kılıç, 2008].

Nükleotit sekanslarının kullanımını içeren genotipik teknikler kromozomal DNA molekülünün delesyon ve insersiyonu, restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerinin yaratılmasına veya ekstrakromozomal DNA'nın kazanılması/kaybedilmesi veya kesim bölgelerini elimine eden rastgele mutasyonlardan etkilenebilmektedir. Bununla birlikte, bu yöntemler oldukça pratik yöntemler olup besiyerindeki

değişikliklerden etkilenmemeleri açısından fenotipik tanımlama tekniklerine göre oldukça önemli üstünlükler sağlamaktadır. Doğal varyasyona daha az maruz kalmaktadırlar [Moschetti, 1998; Bush ve Nitschko, 1999].

Günümüzde, laktik asit bakterilerinin identifikasyon aşamalarında ilgi odağı fenotipik tekniklere göre çok daha hassas ve kesin sonuçlar veren genotipik yöntemlere doğru yönelmiştir. DNA bazlı genotipik teknikler filogeni araştırmalarında mikroorganizmaların birbirleri ile akrabalıklarının belirlenmesinde yoğunlukla başvurulan yaklaşımlardandır. Kullanılan tekniğe göre genus seviyesinden suş seviyesine kadar mikroorganizmaların farklı düzeylerde tiplendirmesinde kullanılmaktadır.

İdeal bir tanımlama sistemi şu özellikleri kapsamalıdır;

- Ayrım gücü yüksek olmalı,
- Geniş çeşitlilikteki izolatları tiplendirebilmeli,
- Laboratuvar koleksiyonlarına ilaveten doğal izolatlara kolayca uygulanabilmeli,
- Farklı merkezlerde uzun zaman sonra bile sonuçlar tekrarlanabilir olmalı,
- Elektronik veri tabanı ve bilgisayara endeksli analiz ile uyumlu olmalı,
- Hızlı olmalı,
- Pahalı veya çok karmaşık olmamalıdır [Babalola, 2003].

### **2.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Polimeraz zincir reaksiyonu; virüs, bakteri, fungus, protozoon ve parazit gibi hastalık etkenlerinin içerdiği gen bölgelerinin, primerler (özgül tamamlayıcı oligonükleotitler) ile yüksek ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri kullanılarak in vitro ortamda amplifiye edilmesini sağlayan güvenilir ve özgün bir yöntemdir. Çalışmada kullanılan genetik materyal, birçok ilgisiz DNA moleküllerinin arasında ve hatta çok az sayıda olsa bile kopyalanabilir, homojen bir genetik materyal haline dönüştürülebilir ve böylelikle kolayca identifiye edilebilir. Seçilen DNA dizisi

çoğaltılırken istenmeyen diziler baskılanabilir ve böylece DNA dizisinin tanımlanması kolaylaşır [Çetinkaya ve Ayhan 2012].

PZR; kalıp DNA, primer, polimeraz enzimleri, deoksinükleotit-trifosfat (dNTP) bileşenlerinden oluşmaktadır.

**Kalıp DNA:** Çoğaltılacak baz dizisine sahip gen birimidir. Bunun yerine RNA'da kullanılabilir. Bu durumda önceden RNA dizisi revers transkriptaz enzimi vasıtasıyla komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülerek kullanılır.

**Primerler:** Hedef DNA'ya özgü genelde 4-20 nükleotitden oluşan tek zincirli DNA molekülleridir. Hedefe özgü olması başka DNA'lar ile çapraz reaksiyon vermesini engelleyerek doğruluk oranını artırır.

**Polimeraz Enzimleri:** *Thermus aquaticus'* tan izole edilen ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimleridir. Sıcaklığa karşı gösterdiği bu direnç açısından diğer enzimlere göre daha kullanışlıdır.

**Deoksinükleotit-Trifosfat:** İçerisinde 4 farklı nötralize nükleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) barındıran kalıp zincirin uzamasını sağlayan karışımlardır.

Bunun dışında DNA sentezini sağlamak için ortam sıcaklığı dögüsel olarak değişmektedir. Bu aşamalarda sırasıyla çift iplikli DNA birbirinden ayrılır (denatürasyon), primerler DNA'ya bağlanır (bağlanma) ve son olarak baz dizilerinin her birinin 3' OH ucuna uygun nükleotidler bağlanır [Türkyılmaz ve Esendal, 2002].

### 2.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PZR) Dayalı Tiplendirme Yöntemleri

**Rastgele Artırılmış Polimorfik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD PCR):** Bu teknikte, rasgele dizilimdeki kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA üzerinde belirlenen parçacıklar çoğaltılmakta olup, reaksiyonun gerçekleşmesi için araştırılan genomun baz dizilimi hakkında herhangi bir ön bilgiye ihtiyaç yoktur.

Rastgele primerlerin genomdaki sayısız bölgeyi çoğaltabilme potansiyeli ve çoğalan DNA parçacıklarının genetik sınıflara özgü durumu RAPD tekniğini genetik uzaklık ve filogenetik araştırmalar için tercih edilir hale getirmiştir. Bu yöntem son zamanlarda LAB içeren probiyotik suşların identifikasyonu için kullanılan bir yöntemdir [Tabakoğlu, 2010].

**Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi (AFLP):** Genelde akraba türlerin analizlerinde kullanılan AFLP tekniği bakteriyel sınıflandırmayı açıklamakta DNA-DNA melezleşme tekniğiyle birlikte kullanılır. AFLP tekniği temelde RAPD-PZR ve RFLP yöntemlerinin beraber kullanıldığı ve tanılamada PAPD-PZR ve ARFLP kadar tür ve alttür seviyesinde yüksek doğruluk oranı sağlayan ve günümüzde diğer moleküler tekniklerin alternatifi olarak görülen güncel bir tekniktir. Uygun koşullarda çoğaltılacak olan DNA'yı elde etmek amacıyla DNA parçalarının uçlarına bağlanan ikili zincir kromozomal DNA adaptörlerini tanıyabilen primerler ile spesifik çoğalmayı gerekli kıldığından alınan sonuçlar tekrar edilebilir özelliktedir [Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011].

**Tekrarlanan Palindrom Dayalı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Rep-PZR):** Ökaryotik canlılarda Rep olarak adlandırılan ve DNA içinde farklı sayıda tekrarlayan bu gen bölgeleri bakterilerde merkezi korunmuş palindromik yapıda olan bölümlerdir. Günümüzde tekrarlanan DNA sekanslarının 3 türü belirlenmiştir. Bunlardan ilki tekrarlanan ekstrasjenik palindromik (REP) diye isimlendirilen 35-40 baz çifti uzunluğunda ve çeşitli halkaları içeren birimlerdir. Enterobakteriyal tekrarlanan interjenik palindromik konsensus (ERIC) ise merkezi korunmuş ve 124-127 baz çifti büyüklüğünde palindromik yapıya sahip sekanslardır. BOX dizisi ise; 154 baz çiftlik box A, box B, ve box C şeklinde isimlendirilmiş korunmuş alt ünitelere sahip elementlerdir. Toplu halde bu yöntemler Rep-PZR genomik parmak izi tekniği olarak tanımlanmaktadır. Bu teknikle tekrarlanan elementler PZR ile değişik boyutlarda DNA fragmentleri üretmek için çoğaltılmaktadır. PZR ürünleri daha sonra boyutlarına göre agaroz jel elektroforezinde ayrılmakta ve spesifik DNA parmak izi bantları oluşturulmaktadır. Daha sonra bu bantlar tanımlayıcı bilgisayar programı kullanılarak analiz edilmektedir. Rep veya ERIC dizilerinden kaynaklanan

primerlerle yapılan PZR kolay uygulanabilmesi, çok sayıda izolat ile çalışılabilmesi, ayırt ediciliğinin yüksek olması nedeni ile en yaygın kullanılan moleküler tiplendirme yöntemleri arasındadır [Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011].

### **2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonundan (PZR) Bağımsız Tiplendirme Yöntemleri**

#### **Dalgalı Alan Jel Elektrofrez (PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis):**

Moleküler tiplendirme yöntemlerinin en başarılısı olarak kabul edilen bu yöntemde sıvı veya katı besiyerinde üretilen bakteriler, düşük erime ısıyla agarozla karıştırılıp küçük kalıplar içine dökülmektedir. Agaroz içine karıştırılan bakteri hücreleri, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak DNA izolasyonuna tabi tutulmaktadır. PFGE’de bozulmamış DNA gerekli olduğundan, DNA’da kırılmalara yol açabilen geleneksel DNA izolasyonu uygun değildir. Liziz işlemini takiben agaroz kalıpları iyice yıkanarak veya diyalize edilerek protein ve karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Kromozomal DNA agaroz jel içinde kalmaktadır. Agaroz içindeki bakteriyel DNA nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmaktadır. Daha sonra içinde kesime uğratılmış DNA parçaları bulunan kalıplar, elektrofrez uygulanacak jel içindeki uygun çukurlara yerleştirilmekte ve belli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulmaktadır. Bu tip bir elektrik akımı 10-800 kb’lık DNA fragmanlarının net olarak ayırt edilmesini sağlamaktadır. Elektrofrez sonucunda jel etidyum bromürle boyanarak her bir izolata ait bant profili görünür hale getirilmektedir. Bu bant profilleri bilgisayar programları yardımıyla değerlendirilerek suşların birbiriyle ilişkileri ortaya konulmaktadır [Moschetti ve ark., 2001].

**Ribotiplendirme:** Ribotiplendirmede total genomik DNA bir restriksiyon enzimiyle daha küçük fragmentlere parçalanmakta ve bu parçalar jel elektrofrezile birbirinden ayrılmaktadır. Fragmentler jelden bir membrana transfer edilmekte ve ribozomal 16S ve 23S rRNA’yı kodlayan genlerin korunmuş bölgelerine spesifik işaretlenmiş evrensel bir proba hibridizasyona tabi tutulmaktadır. Hibridizasyondan sonra fragmentleri göstermek için problemlerin hibridize olduğu yerde probdaki işaret

gözlenmektedir. Ribotip denilen bu bantlar, referans bir tür veri bankasıyla karşılaştırılarak izolatların tanımlanması için kullanılabilir. Yöntemin ayırım gücü kullanılan oligonükleotit problemlerin ve restriksiyon enzimlerinin sayısına ve tipine bağlıdır. PFGE ile karşılaştırıldığında ribotiplendirme, alttür ve suş identifikasyonu için yetersiz kalmaktadır buna rağmen türlerin ayırımında uygulanabilir bir yöntemdir [Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011].

**Plazmid Profil Analizleri:** Plazmidler ekstrakromozomal, replike olabilen, küçük, halkasal çift iplikli DNA molekülleridir. Alkali lizis prosedürlerini kullanan geleneksel plazmid izolasyonu ve çok sayıda türetilmiş yöntemlerin kullanımı, plazmid izolasyonu ve analizlerini mikrobiyoloji ve moleküler biyoloji laboratuvarlarında düzenli olarak kullanılan teknikler haline getirmiştir. Bu yüzden, plazmid profilleri bakteriyel tiplendirme için yardımcı analizler olarak kullanılmaktadır. Aynı türe ait olan suşların sahip oldukları plazmidlerin sayı ve büyüklüklerindeki varyasyonları olarak bilinen plazmid profili analizi, LAB'ların tiplendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Çünkü bu gruba ait suşların çoğu birçok plazmid içermektedir. Plazmid profilleri önceleri tür içi ayırımın tiplendirilmesinde uygun olarak görülmüştür [Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011].

**Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (RFLP);** Restriksiyon enzimleri (RE), çift iplikçikli DNA'da spesifik bölgelerden kesim yaparak, DNA'dan bir genin veya gen taşıyan bir DNA segmentinin çıkarılmasında etkin fonksiyonları olan enzimlerdir. DNA'nın bu enzimlerden bir veya birkaçı ile kesime uğratıldıktan sonra, agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve sonra etidyum bromid ile boyanan jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe RFLP adı verilmektedir [Eroğlu, 2006]. RFLP yöntemi uygulanması nispeten kolay olan, ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Fakat birden fazla fragment oluşması ve bunların jel üzerinde birbirine yakın görünmesi nedeniyle bu fragmentin ayırımı güçlenmektedir. Bundan dolayı tutarlı sonuçların oluşması için birkaç tane restriksiyon enziminin kullanımına ihtiyaç duyulabilmektedir [Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011].

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Çiğ Süt Örnekleri

Bu çalışmada, Amasya'da bulunan mandıralardaki çiğ sütlerden örnekler alındı. İzolasyon için 77 farklı çiğ süttten farklı zamanlarda bu örnekler sağlandı. Örnekler aseptik koşullar altında laboratuvara getirildi ve izolasyon aşamasına geçildi. Örnekler analiz işlemine kadar +4<sup>0</sup>C'de buzdolabında muhafaza edildi.

##### 3.1.2. Bakteri Kültürleri

Çiğ sütlerden elde edilen izolatların bazı patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri ile morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle türlerini belirlemek için *Lactococcus lactis ssp lactis* (ATCC 19435), *Lactococcus lactis ssp cremoris* (ATCC 1925) numaralı standart suşlar kullanıldı. Test mikroorganizmaları olarak *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (DSM 4312), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ve *Escherichia coli* (ATCC 35218) patojen suşları kullanıldı. Bu çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve standart suşlar Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü moleküler mikrobiyoloji laboratuvarından temin edildi.

##### 3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

###### 3.1.3.1. Peptonlu Su

|                |           |
|----------------|-----------|
| Total Nitrojen | 12% ± 0.5 |
| Amino Nitrojen | 5% ± 0.5  |

İzolatların eldesi için dilüsyon sıvısı olarak peptonlu su kullanıldı. Peptonun (LabM Mco24) 1 gramı 1 litre distile (Millipore Direct-Q) suda çözüldü. 10 ml'lik deney

tüplerine 9 ml konularak, otoklavda (Nüve OT 90 L) 121 derecede 1 atmosfer basınçta 15 dakika steril edildi.

### 3.1.3.2. Serum Fizyolojik

Bu çözelti test mikroorganizmalarının Mc Farland (Den-1B) değerini sabitlemek için kullanıldı. 1000 ml distile suya 0.85 gram NaCl eklenerek çözüldü. 10 ml şişelere 7 ml dispense edildi. Otoklavda 121 derecede 1 atmosfer basınçta 15 dakika steril edildi.

### 3.1.3.3. Gram Pozitif Bakteri Lizis Çözeltisi

Bu çözelti DNA izolasyonu aşamasında kullanıldı. 20 mM Tris-HCL (Sigma T5941) 2mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma E5134) ve %1.2' lik Triton-X 100 (Sigma E5134) ile karıştırıldı, pH'ı 8'e ayarlandı ve +4°C' de stoklandı. Kullanılacağı zaman 20 mg/ml lizozim eklendi.

### 3.1.3.4. 10X TBE Tamponu

|       |             |
|-------|-------------|
| 0.89M | Trizma Base |
| 0.89M | Borik Asit  |
| 0.02M | EDTA        |

Bu çözelti elektroforez aşamasında jel yürütmede kullanıldı. Trizma base (Sigma T1503), borik asit (Sigma B6768) ve (Sigma E5134) EDTA kimyasal maddeleri belirtilen molaritelerde alınarak 1 litre saf suda çözüldü. 10X olarak hazırlanan stok +4 derecede saklandı. Kullanım aşamasında 1X'e dilüe edildi. pH metre (Hanna HI2211) ile pH'ı 8.4'e ayarlandı.



### 3.1.3.5. % 1' lik Agaroz Jel

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Agaroz (Prona Biomax) | 1,0 g  |
| 1X TBE                | 100 mL |

PZR ürünlerinin elektroforez işlemiyle görüntülenmesi için kullanıldı. Agaroz üzerine 1X TBE tamponu eklendi ve mikrodalga (Bosch) fırında ısıtılarak homojen hale getirildi. Soğutulduktan sonra elektroforez tankına döküldü.

### 3.1.3.6. Etidyum Bromür Çözeltisi

|                |        |
|----------------|--------|
| Etidyum bromür | 20 µl  |
| Distile su     | 200 ml |

Etidyum bromür (Sigma E1510) çözeltisi DNA dizilerini jelde görüntülemek için kullanıldı. Etidyum bromür interkalar bir ajan olduğu ve kanserojen etkisi dikkate alınarak çalışıldı. Çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

### 3.1.4. Kullanılan Besiyerleri

#### 3.1.4.1. De Man, Rogossa ve Sharp (MRS) Agar

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| Pepton kazeyin             | 10 g/lt   |
| Et ekstraktı               | 10 g/lt   |
| Maya ekstraktı             | 4 g/lt    |
| D (+) glukoz               | 20 g/lt   |
| diPotasyum hidrojen sülfat | 0,2 g/lt  |
| Tween 80                   | 1 g/lt    |
| di Amonyum hidrojen sitrat | 2 g/lt    |
| Sodyum asetat              | 5 g/lt    |
| Magnezyum sülfat           | 0,2 g/lt  |
| Manganez sülfat            | 0,04 g/lt |

|           |         |
|-----------|---------|
| Agar agar | 14 g/lt |
|-----------|---------|

Bu besiyerinin (Merck 1.10660.0500) 68,2 gramı 1 litre distile suda çözüldü, pH'ı 5.7 'ye ayarlanarak su banyosunda (İsolab I.602.02.001) bekletildi. Daha sonra 121°C'de 15 dk. otoklavlanarak steril edildi. 45°C'ye soğutularak petri kaplarına döküldü. Bu besiyeri laktik asit bakterilerinin izolasyonu için kullanıldı.

### 3.1.4.2. De Man, Rogossa ve Sharp (MRS) Broth

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| Pepton kazeyin             | 10 g/lt   |
| Et ekstraktı               | 8 g/lt    |
| Maya ekstraktı             | 4 g/lt    |
| D (+) glukoz               | 20 g/lt   |
| Dipotasyum hidrojen fosfat | 2 g/lt    |
| Tween 80                   | 1 g/lt    |
| di-Amonyum hidrojen sitrat | 2 g/lt    |
| Sodyum asetat              | 5 g/lt    |
| Magnezyum sülfat           | 0,2 g/lt  |
| Manganez sülfat            | 0,04 g/lt |

Ticari olarak elde edilen bu besiyerinin (Merck 1.10661.0500) 52,2 gramı 1 litre distile suda çözüldü, pH'ı 5.5'e ayarlanarak su banyosunda bekletildi. Daha sonra 121°C'de 15 dk. otoklavlanarak steril edildi. Bu besiyeri laktik asit bakterilerini aktifleştirmek için kullanıldı.

### 3.1.4.3. M-17 Agar

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| Tripton                              | 5.0 g/lt  |
| Soya peptonu                         | 5.0 g/lt  |
| Maya ekstraktı                       | 2.5 g/lt  |
| Sindirilmiş et                       | 5.0 g/lt  |
| Disodyum b-gliserofosfat pentahidrat | 19.0 g/lt |

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| Magnezyum sülfat       | 0.25 g/lt |
| Askorbik asid          | 0.5 g/lt  |
| Agar                   | 11 g/lt   |
| % 10 Laktoz monohidrat | 50 ml     |

Bu besiyerinin (Oxoid CM0785) 48,25 gramı 950 ml distile suda çözüldü, pH'ı 6.9'a ayarlanarak su banyosunda bekletildi. Supplement olarak 50 ml %10'luk laktoz monohidrat çözeltisi hazırlandı. Daha sonra 121°C'de 15 dk. otoklavlanarak steril edildi. 45°C'ye kadar soğutulan sıvı haldeki besiyerine steril edilen laktoz monohidrat çözeltisi eklendi ve petri kaplarına döküldü. Bu besiyeri *Lactococcus lactis* türlerinin izolasyonu için kullanıldı.

#### 3.1.4.4. TSA (Tryptic Soy Agar)

|                             |          |
|-----------------------------|----------|
| Pepton kazeyin              | 17 g/lt  |
| Soya pepton                 | 3 g/lt   |
| D (+) glukoz                | 2,5 g/lt |
| Sodyum klorit               | 5 g/lt   |
| di-Potasyum hidrojen fosfat | 2,5 g/lt |
| Agar agar                   | 14 g/lt  |

Bu besiyerinin (Merck 1.05459.0500) 30 gramı 1 litre distile suda su banyosunda çözüldü, pH:7.1'e ayarlanarak 121°C'de 15 dk. otoklavlanarak steril edildi. İndikatör mikroorganizmaların üremesi ve aktifleştirilmesi için kullanıldı.

#### 3.1.4.5. Saklama Stoğu

52.2 gram MRS Broth  
 200 ml Gliserol (Acros Organics A0322433)  
 800 ml distile su

MRS Broth'a saf su ve gliserol eklenerek çözüldürüldü. Daha sonra 121°C'de 15 dk. otoklavlanarak steril edildi. Suşların aktiveleştirme işlemine kadar saklama stoğu -20°C'de saklandı.

## **3.2. Yöntem**

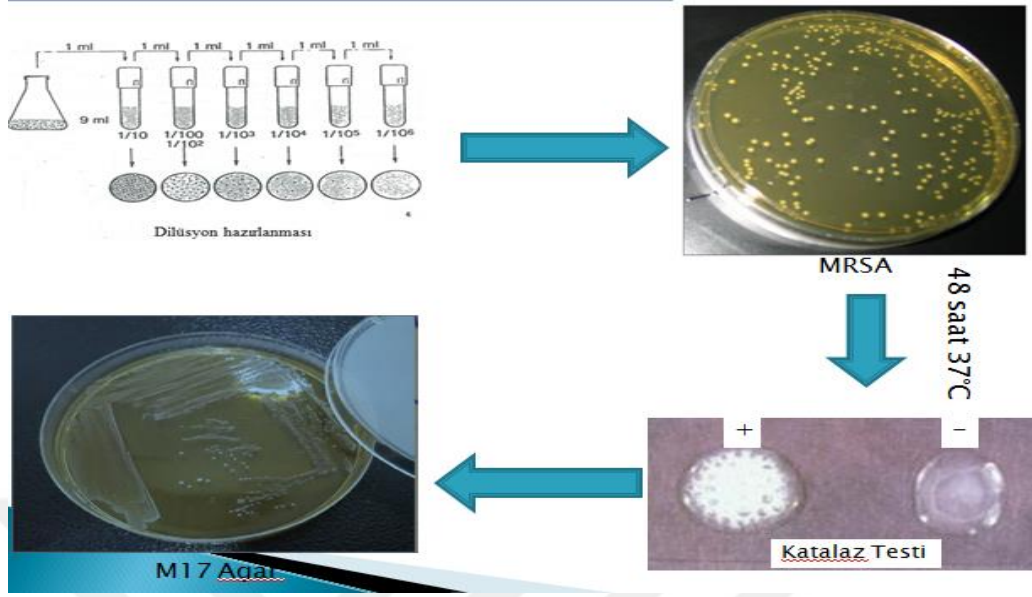
### **3.2.1. Çiğ Süt Örneklerinin Hazırlanması**

Çiğ süt örnekleri steril kaplarda laboratuvara getirildi. Bek alevi kullanılarak steril pipetler ile 10 ml alındı 90 ml %0.1'lik peptonlu su bulunan steril poşetlere aktarıldı. Karıştırıcıda (Stuart orbital shaker SSL1) 30 dakika homojenize edildi. Son olarak 9 ml steril peptonlu su bulunan tüplere aktararak 10<sup>-4</sup>e kadar seri dilüsyon yapıldı.

### **3.2.2. Bakterilerin İzolasyonu**

İzolasyon işleminde Tabakoğlu (2010) yöntemi modifiye edilerek kullanıldı. Çiğ süt örneklerinden bakteri izolasyonu için De Man Rogossa Sharpe (MRS) Agar ve laktokok seçici besiyeri olarak M17 Agar kullanıldı. Hazırlanan dilüsyonlardan 100 µl alınarak MRS agara aktarıldı ve drigalski çubuğu ile yayma ekim yapıldı. Örnekler 37°C'de anaerobik jarda, 48-72 saat etüvde (Thermo Heratherm) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra çıplak gözle morfolojik olarak laktik asit bakterilerine (LAB) benzeyen tek kolonilere katalaz testi uygulandı ve katalaz negatif olanlar M17 agara ekildi ve 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra katalaz testi tekrar edildi. Katalaz negatif olanlar muhtemel LAB sayılıp %20 gliserollü MRS broth saklama stoğuna çekilerek -20°C'de (Bosch) saklamaya alındı.

İzolasyon basamağında 3 aylık süre içerisinde toplanan 77 çiğ süt numunesinden 48'i üreme gösterdi ve toplam 154 izolat elde edildi.



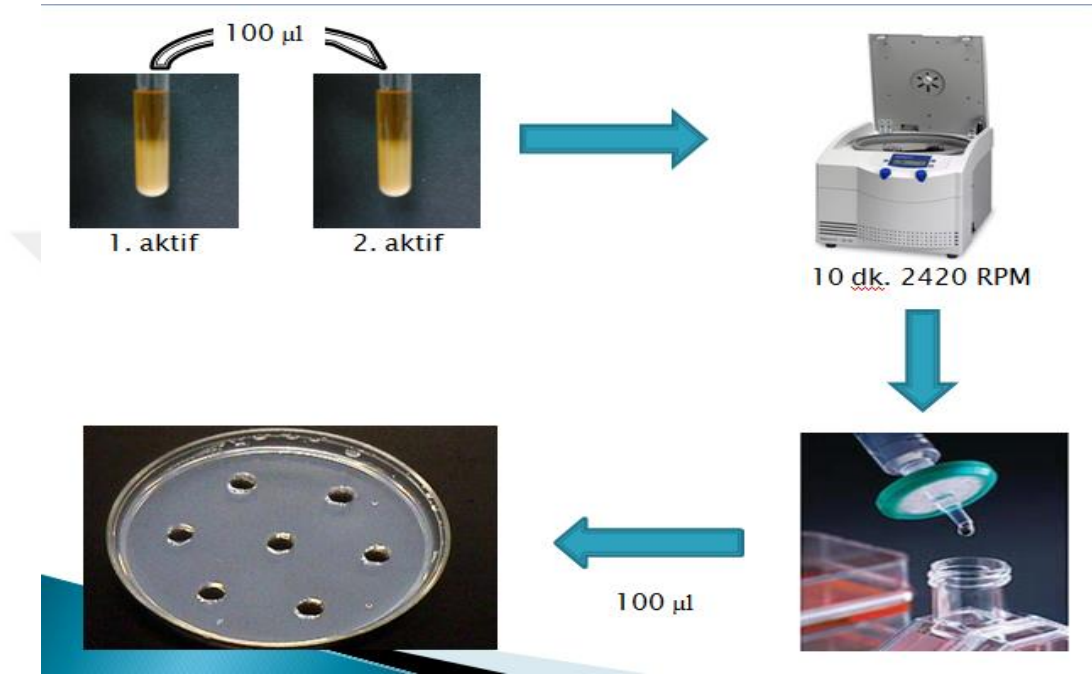
Resim 3.1: Bakteri izolasyonu

### 3.2.3. Suşların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Literatür araştırmalarına göre laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitelerinin genelde yakın türlerin inhibisyonunda etkili olduğu bildirilmektedir. Elde edilen izolatların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (DSM 4312), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ve *Escherichia coli* (ATCC 35218) standart suşlar kullanıldı.

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için kuyu difüzyon yöntemi uygulandı. İzolatlar MRS broth besiyerine inoküle edildi, 24 saat anaerobik jarda 37°C'de etüvde inkübasyona bırakılarak aktifleştirildi. Aktifleştirilen kültürler steril santrifüj tüplerine aktararak, 2420 rpmde 20 dakika +4°C'de santrifüj işlemiyle (Sigma 3-30K) süpernatantlar elde edildi ve 0.45 µm enjektör filtreden (Minisart16555k) geçirildi. Birgün önceden triptik soy agarda aktifleştirilen standart suşlar steril fizyolojik su ile sulandırılarak 0.5 Mc Farland'a ayarlandı. Steril eküvyonla triptik soy agar bulunan petrilere yayma ekim yapıldı ve steril delici yardımıyla 6 mm çapında kuyucuklar açıldı. Bu kuyucuklara izolatlardan elde edilen filtralardan 100

$\mu\text{l}$  yüklendi. Petriler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edildikten sonra oluşan inhibisyon zonları bir kumpas yardımı ile ölçüldü. En az 3 farklı patojen suşta zon oluşturan izolatların süpernatantlarının pH'ları nötrlenerek deney tekrarı yapıldı [Tabakoğlu, 2010].



Resim 3.2: Bakteriyosin testi

### 3.2.4. Antimikrobiyal Aktivite Gösterenlerin İdentifikasyonu

Kuyucuk difüzyon testi ile en az üç patojen suşta zon oluşturan izolatların identifikasyonu yapıldı. İdentifikasyonda morfolojik, biyokimyasal ve API testleri kullanıldı. Morfolojik olarak Gram boyama, optimum gelişme sıcaklığı ve pH'sı, gelişebildiği NaCl konsantrasyonu testleri ve API 20 Strep (Bimerieux 20600) testi uygulandı.

#### 3.2.4.1. Gram Boyama

İdentifikasyon amacıyla Gram boyama (Kimsan Kimya) kiti kullanıldı. İzolatların 24 saatlik genç kültürlerine Gram boyama işlemi uygulandı ve mavi-mor renkli

koloniler Gram pozitif, kırmızı-pembe renkli koloniler ise Gram negatif olarak değerlendirildi.

#### **3.2.4.2. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme Testi**

İzolatlar MRS sıvı besiyerine 70 µl ilave edilerek 4°C'de, 15°C'de ve 45°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda 24. ve 48. saatler de çıplak gözle incelendi. Gelişme gösterenler pozitif, gelişme göstermeyenler negatif olarak işaretlendi. Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen MRS sıvı besiyeri kullanıldı.

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

İzole edilen mikroorganizmalar 5 M ve 0,01 M HCl asit ve NaOH ile pH:3.9 ve pH:9,6'ya ayarlanan MRS sıvı besiyerlerine 70 µl inokule edilerek 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda çıplak gözle değerlendirme yapıp gelişme gösterenler pozitif, göstermeyenler ise negatif olarak değerlendirildi. Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen MRS sıvı besiyeri kullanıldı.

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

İzolatlar % 4, %7.5 ve %10 tuz konsantrasyonu içeren MRS sıvı besiyerine 70 µl oranında inoküle edilip 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Gelişme gösterenler pozitif, göstermeyenler ise negatif olarak kabul edildi. Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen MRS sıvı besiyeri kullanıldı.

#### **3.2.4.5. Hemoliz Testi**

Hemoliz testi, streptokokları ve stafilokokları ayırmak için kullanılmaktadır. Streptokoklar çeşitli hemoliz enzimlerine sahiptirler ve kanlı agar besiyerinde farklı özellikte hemolizlere neden olurlar. Streptokoklar, kanlı agar besiyerinde meydana getirdikleri bu farklı hemolizlere göre;  $\beta$ -hemolitik,  $\alpha$ - hemolitik ve  $\gamma$ - hemolilik streptokoklar olarak üçe ayrılmaktadır.  $\beta$ -hemolitik streptokoklar hemoglobini tam

olarak hemoliz ederler. Tam hemolizde, kanlı agar besiyerinde gelişen bakteri kolonilerinin etrafında düzgün bir hatla çevrilmiş temiz ve berrak bir hemoliz zonu meydana gelir.  $\alpha$ - hemolitik streptokokların kanlı agar besiyerindeki kolonilerinin etrafında, kenarları keskin hatlı olmayan, bulanık ve yeşilimsi bir hemoliz zonu oluşur.  $\gamma$ - hemolitik streptokoklar hemolizin enzimlerine sahip değildir, dolayısıyla da kanlı agar besiyerinde hemoliz oluşturmazlar (KORUCU, D., 2012).

Hemoliz testi, bir sonraki identifikasyon aşaması olan API 20 Strep testi için 21. test olarak gerekmektedir. Bu aşamada izolatların kanlı agara çizgi ekimleri yapıldı. Anaerobik jarda 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Kolonilerin etrafında beyaz halka oluşturanlar pozitif, oluşturmayanlar ise negatif olarak kabul edildi.

### 3.2.4.5. API 20 Strep Testi

API 20 Strep testi geniş bir mikroorganizma tanımlama kapasitesine sahip 20 kimyasal test içeren bir yöntemdir. Nemli bir ortam oluşturmak için strip ile beraber gelen peteğe 5 ml steril deiyonize su eklendi ve stripler inkübasyon kutusuna konuldu. Kanlı agara ekilen 24 saatlik taze kültürlerden, API Suspension Medium'a 4 Mc Farland değerinden daha yoğun olacak şekilde steril eküvyon vasıtasıyla süspense edildi. API Suspension Mediumdan, VP'den ADH küpülüne kadar her küpüle 100  $\mu$ l, ADH küpülünün ise tamamına hava kabarcığı kalmayacak şekilde yüklendi. API Suspension Mediumdan kalanı API GP Medium'a aktarıldı. Stribin ikinci yarısındaki RIB 'den GLYG testine kadar bu süspansiyon yüklendi. RIB 'den GLYG testine kadar olan küpüllerin ağzı mineral yağ ile kapatıldı. Stripde belirtilen yönergelere göre sonuçlar değerlendirildi.



**Resim 3.3:** API 20 Strep negatif test kiti





**Resim 3.4:** API 20 Strep pozitif test kiti

### 3.2.4.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi

#### 3.2.4.5.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu kitle (Thermo GeneJet DNA Purification) önerilen basamaklara göre yapıldı.

1. Bir gün önce aktifleştirilen kültürden 2 ml santrifüj tüpüne alınarak 5000 g' de 10 dakika santrifüj (Hettich Mikro120) edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı.
2. Pellete 180 µl Gram-pozitif lizis çözeltisi eklendi ve 30 dakika 37 °C' de inkübe edildi.
3. İnkübasyondan sonra üzerine 200 µl lizis solüsyonu ve 20 µl proteinaz K ilave edilerek pipetlendi.
4. Daha sonra 56 °C'de kuru blok ısıtıcıda (Finepcr termobath ALB128) 5 dakika aralıklarla vortekslenerek (Ika Vortex 4) yaklaşık 30 dk inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonucunda üzerine 20 µl RNase A solüsyonu inoküle edilip vortekslenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
6. Daha sonra lizat GeneJet Genomic DNA Purification kolonuna yüklendi ve kolon koleksiyon tüpüne takıldı.
7. 1 dakika 6000 g' de santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atıldı ve kolona yeni bir steril koleksiyon tüpü takıldı.
8. Kolonun üzerine 500 µl Wash Buffer 1 eklendi. 8000 g' de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Kolona 500 µl Wash Buffer 2 ilave edildi. 14000 g' de 3 dakika santrifüj edildi.
10. Kolona 200 µl Elution Buffer yüklendi. 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyonun ardından 8000 g' de 1 dakika santrifüj edildi.

11. Koleksiyon tüpünden DNA elde edildi ve PZR aşamasına kadar -20°C'de saklandı.

### 3.2.4.5.2. Primer dizileri

Primerler IDT firması tarafından sağlandı. Liyofilize haldeki primerler embriyolojik saf su ile 100 µM stok olacak şekilde sulandırıldı.

| Primer         | 5'-Primer dizisi-3'   | Tür   | Baz uzunluğu/<br>Referans       |
|----------------|-----------------------|---|---------------------------------|
| <b>LACToF</b>  | GCGGCGTGCCTAATACATGC  | <i>Lactococcus lactis</i> spp.<br><i>lactis</i>   | 700 bp<br>MAMSIN, A.,<br>(2015) |
| <b>LACToR</b>  | ATCTACGCATTTCACCGCTAC |   |                                 |
| <b>LACTo1F</b> | ACGCGAAGAACCTTACCAGG  | <i>Lactococcus lactis</i> spp.<br><i>cremoris</i> | 600 bp<br>T. ODAMAKI<br>(2011)  |
| <b>LACTo1R</b> | CACCTTCCGATACGGCTACC  |   |                                 |

**Tablo 3.1:** PZR aşamasında kullanılan primerler

| Master Mix              | Miktar µl   | Konsantrasyon    |
|-------------------------|-------------|------------------|
| Saf Su(Lactis/Cremoris) | 18.05/17.55 |                  |
| Buffer                  | 3.0         | 10X (Thermo)     |
| MgCl <sub>2</sub>       | 2.5         | 25 mM (Thermo)   |
| dNTP mix                | 0.5         | 10 mM (Thermo)   |
| İleri Primer            | 0.25        | 10 pMol (Thermo) |
| Geri Primer             | 0.25        | 10 pMol (Thermo) |
| Taq DNA Polimeraz       | 0.2         | 5U (Thermo)      |
| DNA (Lactis/Cremoris)   | 0.25/0.75   |                  |
| Toplam                  | 25          |                  |

**Tablo 3.2:** Master mix karışımı

PZR karışımı 25 µl olarak hazırlandı. Master mix biyo güvenlik (Esco Class 2) kabininde DNase-RNase free mikro santrifüj tüpünde Çizelge 3.2'de verilen miktarlarda hazırlandı ve son olarak üzerlerine DNA örnekleri ilave edildi. Hazırlanan tüpler çizelge 3.3 belirtilen sıcaklıklarda ve periyotlarda termal cycler (Thermo Arktik) cihazına yerleştirildi.

### **Amplifikasyon programı**

| <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> |           |           |           |           |
|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 3 dakika                             | 30 saniye | 30 saniye | 40 saniye | 10 dakika |
| 95 °C                                | 95 °C     | 59 °C     | 72 °C     | 72 °C     |
| 1 döngü                              | 30 döngü  |           |           | 1 döngü   |

**Tablo 3.3:** *Lactococcus lactis ssp lactis* PZR ısı protokolü

| <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> |           |           |           |           |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 3 dakika                                | 30 saniye | 30 saniye | 40 saniye | 10 dakika |
| 95 °C                                   | 95 °C     | 55 °C     | 72 °C     | 72 °C     |
| 1 döngü                                 | 30 döngü  |           |           | 1 döngü   |

**Tablo 3.4** *Lactococcus lactis ssp. cremoris* PZR ısı protokolü

### **3.2.4.5.3. DNA' nın Jelde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi**

Hazırlanan jel tanka (Thermo Easycast B2) yerleştirildi ve üzerine 1X TBE ilave edildi. PZR ürünlerinden 10 µl alınarak üzerine 2 µl 6X yükleme tamponu (Thermo Gene Ruler) ilave edildi ve %1' lik agaroz jele yüklendi. Baz büyüklüğü tespiti için 100 baz çiftlik belirteç (Thermo Scientific Generuler 100 bp) kullanıldı. Güç kaynağı (Biorad Powerpack) 80 volt 400 miliampere ayarlanarak jel 90 dakika yürütüldü. Bu işlemin ardından 5 mg/ml etidyum bromür çözeltisi ilave edilerek orbital karıştırıcıda 50 RPM'de 20 dakika jel boyandı. UV görüntüleme cihazında (Vilber Lourmat TCP-20.MC) jelin görüntüsü fotoğraflandı ve bant büyüklükleri belirteçle karşılaştırılarak değerlendirildi.

## 4.BULGULAR

### 4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

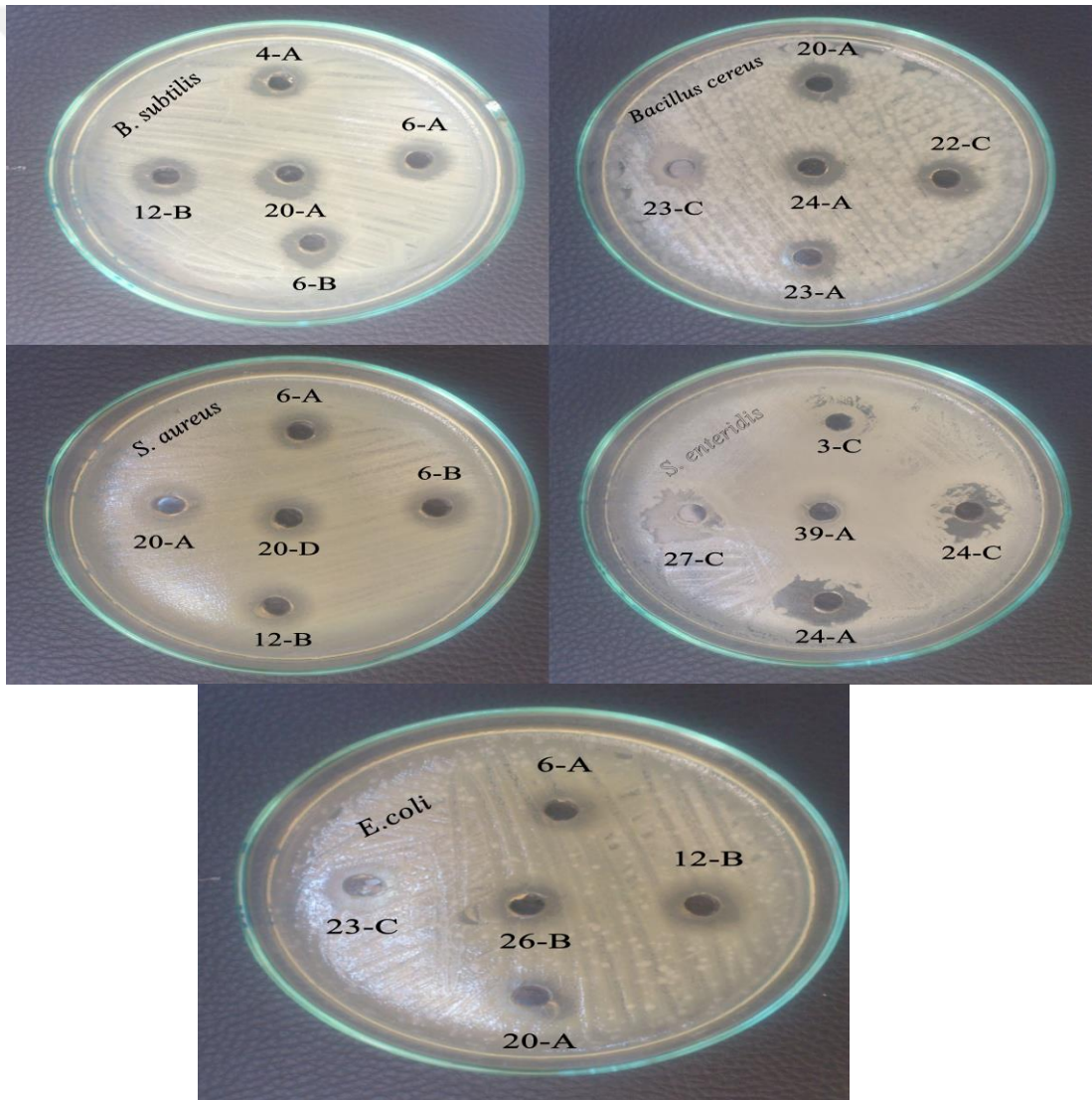
Amasya il ve ilçelerindeki mandıralardan elde edilen 77 çiğ süt örneğinden 154 izolat seçildi. Bu izolatlar patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini tespit etmek için incelendi. Laktik asit bakterisi olduğu düşünülen izolatlara katalaz testi uygulandı ve katalaz negatif olanlar selektif besiyeri olan M17 besiyerine ekilip tekrar katalaz testine tabi tutuldu. Katalaz negatif bulunanlar stoğa çekilip daha sonra kullanılmak üzere -20°C' de saklandı. Tablo 4.1'de örnek numaraları ve izolat sayıları verilmiştir.

|    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| A  | A  | A  | A  | A  | A  | A  |    | A  | A  |    | A  | A  | A  | A  |
| B  | B  | B  | B  | B  | B  | B  |    |    | B  |    | B  | B  |    |    |
|    |    | C  | C  | C  |    | C  | C  | C  | C  | C  | C  | C  | C  |    |
|    |    | D  |    |    | D  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
|    |    | A  | A  | A  |    | A  |    | A  | A  |    | A  | A  | A  | A  |
| B  |    |    |    | B  | B  |    |    | B  | B  | B  | B  | B  | B  |    |
|    | C  |    | C  | C  | C  | C  |    | C  | C  | C  | C  | C  | C  |    |
|    |    |    |    | D  |    |    |    |    |    | D  |    |    |    |    |
| 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 |
| A  | A  |    |    | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A  |    | A  | A  | A  |
| B  | B  |    | B  |    | B  | B  | B  | B  | B  | B  | B  | B  | B  |    |
|    | C  | C  |    |    |    | C  | C  | C  |    | C  | C  | C  | C  | C  |
|    | D  | D  | D  | D  |    |    | D  |    |    |    | D  | D  | D  | D  |
| 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 |    |    |    |    |
| A  | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A  | A  |    |    |    |    |
| B  | B  |    | B  | B  | B  |    | B  | B  | B  | B  |    |    |    |    |
| C  | C  |    | C  | C  | C  | C  | C  | C  | C  | C  |    |    |    |    |
| D  | D  |    | D  |    |    |    | D  |    | D  | D  |    |    |    |    |

**Tablo 4.1:** İzolatların örnek numaraları ve izolat sayıları

#### 4.2. Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip İzolatların Belirlenmesi

Laktik asit bakterisi olduğu düşünülen 154 izolatın antimikrobiyal aktivite potansiyeli ölçülmüştür. Bu aşamada kuyucuk difüzyon tekniği kullanılmıştır [Tabakoğlu, 2010]. İzolatların antimikrobiyal etkisini ölçmek için 3.2.3' deki yöntem uygulanmıştır. Test mikroorganizmaları olarak *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (DSM 4312), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ve *Escherichia coli* (ATCC 35218) patojen mikroorganizmaları kullanılmıştır.



**Resim 4.1:** Antimikrobiyal aktivite deneyi

| <b>İzolat<br/>Numarası</b> | <b><i>Staphylococcus<br/>aureus</i> (ATCC<br/>25923)</b> | <b><i>Salmonella<br/>enteritidis</i><br/>(ATCC<br/>13076)</b> | <b><i>Escherichia<br/>coli</i> (ATCC<br/>35218)</b> | <b><i>Bacillus<br/>subtilis</i><br/>(ATCC<br/>6633)</b> | <b><i>Bacillus<br/>cereus</i><br/>(DSM<br/>4312)</b> |
|----------------------------|--|---|---|---|--|
| 1-A                        | 0  | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 1-B                        | 0  | 0   | 0   | 0   | 7.7  |
| 2-A                        | 0  | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 2-B                        | 11.3   | 0   | 9.2   | 0   | 0  |
| 3-A                        | 11.7   | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 3-B                        | 11.4   | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 3-C                        | 11.4   | 0   | 9   | 0   | 0  |
| 3-D                        | 0  | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 4-A                        | 0  | 9.6   | 0   | 8.5   | 7.6  |
| 4-B                        | 9.2  | 0   | 0   | 8.2   | 0  |
| 4-C                        | 9.9  | 9.6   | 0   | 9   | 0  |
| 5-A                        | 0  | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 5-B                        | 0  | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 5-C                        | 9.2  | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 6-A                        | 12.1   | 17.1  | 10.3  | 14.1  | 12.2   |
| 6-B                        | 9.7  | 10.3  | 0   | 8.9   | 0  |
| 6-D                        | 0  | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 7-A                        | 10.1   | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 7-B                        | 0  | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 7-C                        | 10.2   | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 8-C                        | 9.6  | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 9-A                        | 0  | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 9-C                        | 10.2   | 9.5   | 0   | 0   | 0  |
| 10-A                       | 9.5  | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 10-B                       | 9.8  | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 10-C                       | 0  | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 11-C                       | 0  | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 12-A                       | 0  | 0   | 0   | 0   | 0  |
| 12-B                       | 13.1   | 12.6  | 12.6  | 10.8  | 11.8   |

|      |      |      |      |      |      |
|------|------|------|------|------|------|
| 12-C | 9.2  | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 13-A | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 13-B | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 13-C | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 14-A | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 14-C | 0    | 8    | 0    | 0    | 0    |
| 15-A | 0    | 8    | 0    | 0    | 0    |
| 16-B | 0    | 8.4  | 0    | 0    | 0    |
| 17-C | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 18-A | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 19-A | 0    | 8.7  | 0    | 0    | 0    |
| 19-C | 0    | 8.5  | 0    | 9.5  | 0    |
| 20-A | 13.4 | 11.4 | 12.5 | 12.2 | 10.4 |
| 20-B | 0    | 6.9  | 0    | 8.8  | 0    |
| 20-C | 0    | 7.5  | 0    | 7.8  | 0    |
| 20-D | 9.7  | 9.1  | 0    | 9.1  | 0    |
| 21-B | 0    | 8.9  | 0    | 7.9  | 0    |
| 21-C | 0    | 7.6  | 0    | 0    | 0    |
| 22-A | 0    | 8.2  | 0    | 8    | 0    |
| 22-C | 11.1 | 8.7  | 0    | 0    | 7.8  |
| 23-A | 11.1 | 10.7 | 0    | 8.1  | 9.9  |
| 23-B | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 23-C | 12   | 11.2 | 9.6  | 11   | 11.5 |
| 24-A | 10.8 | 8.7  | 0    | 8.8  | 8.6  |
| 24-C | 0    | 6.8  | 0    | 0    | 0    |
| 25-A | 0    | 7.3  | 0    | 0    | 7.3  |
| 25-B | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 25-C | 9.8  | 0    | 0    | 0    | 8.4  |
| 26-B | 10.6 | 9.7  | 10.2 | 8.6  | 11.1 |
| 26-C | 0    | 0    | 0    | 8.5  | 8.3  |
| 26-D | 0    | 8    | 0    | 9.3  | 8    |
| 27-A | 0    | 8.1  | 0    | 9.8  | 8    |
| 27-B | 0    | 0    | 0    | 8.4  | 8.4  |

|      |      |      |      |      |      |
|------|------|------|------|------|------|
| 27-C | 10.6 | 9    | 0    | 8.4  | 10.2 |
| 28-A | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 28-B | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 28-C | 0    | 12.5 | 0    | 0    | 0    |
| 29-A | 0    | 9.2  | 0    | 0    | 0    |
| 29-B | 0    | 9.2  | 0    | 10   | 0    |
| 29-C | 0    | 10.2 | 0    | 0    | 0    |
| 30-A | 0    | 0    | 0    | 9    | 0    |
| 30-D | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 31-A | 0    | 0    | 10.8 | 9    | 0    |
| 31-B | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 32-A | 0    | 0    | 0    | 11.1 | 9.2  |
| 32-B | 0    | 0    | 0    | 11.7 | 0    |
| 32-C | 0    | 0    | 0    | 10.5 | 0    |
| 32-D | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 33-C | 0    | 10.7 | 0    | 0    | 8.5  |
| 33-D | 0    | 12.8 | 0    | 9    | 0    |
| 34-B | 0    | 0    | 0    | 8    | 0    |
| 35-A | 11   | 18.9 | 14   | 13   | 17   |
| 35-D | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 36-A | 0    | 15   | 9    | 0    | 10   |
| 36-B | 0    | 14   | 0    | 0    | 10   |
| 37-A | 11.3 | 16   | 13   | 12   | 15   |
| 37-B | 11.5 | 18   | 13   | 12   | 14   |
| 37-C | 0    | 10   | 10   | 0    | 9    |
| 38-A | 0    | 15   | 12   | 12   | 15   |
| 38-B | 10.6 | 17   | 14   | 13   | 15   |
| 38-C | 12   | 0    | 0    | 11   | 9.5  |
| 38-D | 0    | 9    | 0    | 0    | 12   |
| 39-A | 11.5 | 0    | 9    | 11   | 10   |
| 39-B | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 39-C | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 40-A | 9    | 0    | 10   | 12   | 10   |



|      |    |      |    |    |      |
|------|----|------|----|----|------|
| 40-B | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    |
| 41-A | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    |
| 41-B | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    |
| 41-C | 0  | 0    | 0  | 0  | 9    |
| 42-B | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    |
| 42-C | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    |
| 42-D | 0  | 0    | 0  | 0  | 8.5  |
| 43-A | 0  | 8    | 0  | 0  | 10   |
| 43-B | 0  | 9    | 0  | 0  | 10.5 |
| 43-C | 0  | 0    | 0  | 0  | 10   |
| 43-D | 0  | 9    | 0  | 0  | 9    |
| 44-A | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    |
| 44-B | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    |
| 44-C | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    |
| 44-D | 0  | 8    | 0  | 8  | 8    |
| 45-A | 0  | 13   | 0  | 11 | 10   |
| 45-C | 0  | 12   | 12 | 11 | 11   |
| 45-D | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    |
| 46-A | 0  | 12   | 12 | 0  | 9    |
| 46-B | 0  | 12.5 | 11 | 0  | 0    |
| 46-C | 0  | 12   | 0  | 0  | 0    |
| 46-D | 0  | 10   | 0  | 0  | 0    |
| 47-A | 0  | 11   | 0  | 0  | 0    |
| 47-B | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    |
| 47-C | 0  | 110  | 0  | 0  | 0    |
| 47-D | 0  | 10   | 11 | 0  | 9    |
| 48-A | 10 | 11   | 0  | 8  | 9    |
| 49-A | 9  | 9    | 0  | 0  | 0    |
| 49-B | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    |
| 49-C | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    |
| 49-D | 0  | 0    | 0  | 0  | 0    |
| 50-A | 0  | 10   | 0  | 9  | 9    |
| 50-B | 0  | 9    | 0  | 10 | 8    |

|      |   |   |   |   |   |
|------|---|---|---|---|---|
| 50-C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 51-A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 51-B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 51-C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 52-A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 52-C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 53-A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 53-B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 53-C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 53-D | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 54-A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 54-B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 54-C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 55-A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 55-B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 55-C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 55-D | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 56-A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 56-B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 56-C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 56-D | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 57-A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 57-B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 57-C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**Tablo 4.2:** Antimikrobiyal aktivite testi sonuçları

Bu izolatlar yüzde olarak hesaplandığında %40'ı *Salmonella enteritidis'* e, %33'ü *Staphylococcus aureus'* a, %29'u *Bacillus cereus'*a, %29'u *Bacillus subtilis'*e ve %13'ü *Escherichia coli'* ye karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. İzolatların birden çok patojen üzerindeki etkisi incelendiğinde; %59'u en az bir patojene karşı inhibitör etki gösterirken, %38'i iki patojene, %22'si üç patojene, %11'i dört patojene, %5'i ise bütün patojenlere karşı inhibitör etki göstermiştir.

Çalışmanın devamında antimikrobiyal aktivitenin organik asitlerden oluşup oluşmadığını tespit etmek amacıyla, en az üç patojene karşı inhibisyon zonu oluşturan izolatların, pH nötrlenip kuyucuk difüzyon tekniği tekrar uygulanmıştır. İzolatlardan hiçbirinin zon oluşturmadığı gözlenmiştir.

#### 4.3. Laktik Asit Bakterilerinin Gram Boyama ile Kimyasal Tanımlanması

Laktik asit bakterisi olduğu düşünülen izolatların morfolojik ve biyokimyasal yöntemlerle identifikasyonu yapılmıştır. Bu izolatlara Gram boyama tekniği uygulandıktan sonra morfolojik olarak mikroskopta (100x büyütmeyle) incelenmiştir.

| İzolat Numarası | Gram Boyama | Morfolojisi | İzolat Numarası | Gram Boyama | Morfolojisi |
|-----------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|
| 4-A             | Pozitif     | Kok         | 36-A            | Pozitif     | Basil       |
| 4-C             | Pozitif     | Kok         | 37-A            | Pozitif     | Basil       |
| 6-A             | Pozitif     | Kok         | 37-B            | Pozitif     | Kok         |
| 6-B             | Pozitif     | Kok         | 37-C            | Pozitif     | Kok         |
| 12-B            | Pozitif     | Kok         | 38-A            | Pozitif     | Kok         |
| 20-A            | Pozitif     | Kok         | 38-B            | Pozitif     | Kok         |
| 20-D            | Pozitif     | Kok         | 38-C            | Pozitif     | Kok         |
| 22-C            | Pozitif     | Kok         | 39-A            | Pozitif     | Kok         |
| 23-A            | Pozitif     | Basil       | 40-A            | Pozitif     | Kok         |
| 23-C            | Pozitif     | Kok         | 44-D            | Pozitif     | Kok         |
| 24-A            | Pozitif     | Kok         | 45-A            | Pozitif     | Basil       |
| 24-B            | Pozitif     | Kok         | 45-C            | Pozitif     | Basil       |
| 26-B            | Pozitif     | Kok         | 46-A            | Pozitif     | Kok         |
| 26-D            | Pozitif     | Kok         | 47-D            | Pozitif     | Kok         |
| 27-A            | Pozitif     | Kok         | 48-A            | Pozitif     | Kok         |
| 27-C            | Pozitif     | Kok         | 50-A            | Pozitif     | Kok         |
| 35-A            | Pozitif     | Basil       | 50-B            | Pozitif     | Kok         |

**Tablo 4.3:** Gram boyama sonuçları



|      |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| 38-B | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| 38-C | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| 39-A | +++ | +++ | -   | +++ | +++ | +++ | +++ | -   | - |
| 40-A | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| 44-D | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | -   | - |
| 45-A | +++ | +++ | ++  | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| 45-C | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| 46-A | +++ | +++ | -   | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| 47-D | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| 48-A | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| 50-A | +++ | +++ | -   | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| 50-B | +++ | +++ | -   | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |

**Tablo 4.4:** Biyokimyasal test sonuçları

(+++ : üreme var, ++: az üreme, +: çok az üreme, -: üreme yok)

İzole edilen laktik asit bakterilerinin biyokimyasal test sonuçları değerlendirildiğinde, bütün izolatların %4' lük NaCl' de ürediği, fakat %7.5' lik NaCl'de 4-A ve 36-A numaralı izolatın üremediği gözlenmiştir. %10'luk NaCl'de 4-A, 4-C, 26-D, 27-A, 37-C, 39-A, 46-A, 50-A ve 50-B numaralı izolatların üremediği tespit edilmiştir.

Asitlik bazlık değişiminin incelenmesinde ise pH 3.9'da 4-A, 4-C, 6-B, 12-B, 20-A, 23-A, 26-B, 27-C, 35-A ve 37-A numaralı izolatlarında üreme görülmemiş, pH:9.6'da tüm izolatların ürediği saptanmıştır.

Ortam ısısının suşların üremesine etkileri incelenmiştir. +4<sup>0</sup>C'de 4-A, 4-C, 20-D, 24-A, 24-B, 27-A, 27-C ve 36-A numaralı izolatlarda üreme görülmemiştir. 15<sup>0</sup>C'de izolatların üremelerinde herhangi bir olumsuz etki gözlenmemiştir. 45<sup>0</sup>C'de 4-A, 4-C, 6-B, 12-B, 36-A, 37-B, 39-A ve 44-D numaralı izolatlar ürememiştir.

Biyokimyasal testler tür tanımlamada kullanılırken, bu testlerin bir aşaması da tür tanımlama kitlerindeki yardımcı test veya doğrulama yüzdesini artırmak için kullanılmaktadır.

#### 4.5. LAB'nin API 20 Strep Sistemi ile İdentifikasyon Sonuçları

Antimikrobiyal ve biyokimyasal testler tamamlandıktan sonra izolatların identifikasyonu için API 20 Strep kitleri kullanıldı. Oluşan renk değişimlerine göre API test +/- şeklinde değerlendirildi ve API Strep V8.0 uygulaması kullanılarak tür tespiti yapıldı.



Resim 4.2: API 20 Strep sribi

CE 07226 B REF: 27-A

Origine / Source / Herkunft /  
Origen / Origen / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

|      |    |     |     |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |
|------|----|-----|-----|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| 4 h  | +  | -   | +   | +    | -    | -    | -    | -   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   | +   | -   | -    |      |
| 24 h | 1  | 2   | 4   | 1    | 2    | 4    | 1    | 2   | 4   | 1   | 2   | 4   | 1   | 2   | 4   | 1   | 2   | 4   | 1   | 2    | 4    |
|      | VP | HIP | ESC | PYRA | αGAL | βGUR | βGAL | PAL | LAP | ADH | RIB | ARA | MAN | SOR | LAC | TRE | INJ | RAF | AMD | GLYG | βHEM |
| 4 h  |    |     |     |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |
| 24 h |    |     |     |      |      |      |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |

Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Imprimé en France / Printed in France

Resim 4.3: API Strep tanımlama kiti sonuçları



## API

API 10S  
API 20 A  
API 20 C AUX  
API 20 E  
API 20 NE  
API 20 STREP  
API 50 CHB  
API 50 CHE  
API 50 CHL  
API CAMPY  
API CANDIDA  
API CORYNE  
API LISTERIA  
API NH  
API STAPH  
RAPID 20 E

## ID32

AMASYA UNIVERSITY - AMASYA



apiweb

## API 20 STREP V8.0

Printout

Export

New test

Modify

REFERENCE 27-A DATE

COMMENT

## GOOD IDENTIFICATION TO THE GENUS

|         |  |
|---------|--|
| Strip   | API 20 STREP V8.0  |
| Profile | 5 1 4 7 7 1 1  |
| Note    | POSSIBILITY OF Ent.gallinarum OR Ent.casseliflavus IF VancoR |

| Significant taxa      | % ID | T    | Tests against |         |  |
|-----------------------|------|------|---------------|---------|--|
| Enterococcus faecalis | 74.3 | 0.67 | ARA 1%        |         |  |
| Enterococcus faecium  | 24.4 | 0.74 | BGAL 89%      | SOR 18% |  |

| Next taxon                    | % ID | T    | Tests against |        |  |
|-------------------------------|------|------|---------------|--------|--|
| Lactococcus lactis ssp lactis | 0.9  | 0.49 | ARA 15%       | SOR 1% |  |

| Complementary test(s)      | GLYCEROL | YELLOW | IRHAMNOSE | dMLZ |
|----------------------------|----------|--------|-----------|------|
| Enterococcus faecalis      | +        | -      | v         | +(-) |
| Enterococcus casseliflavus | +        | +      | +         | -    |
| Enterococcus faecium       | -        | -      | v         | -    |
| Enterococcus gallinarum    | -        | -      | -         | -    |

Resim 4.4: APIWEB tanımlama uygulaması

| İzolat Numarası | Cins Tür/Tür altı Tanımlama             |
|-----------------|---|
| 4-A             | <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>   |
| 4-C             | <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>   |
| 6-A             | <i>Leuconostoc spp.</i>                 |
| 6-B             | <i>Leuconostoc spp.</i>                 |
| 12-B            | <i>Leuconostoc spp.</i>                 |
| 20-A            | <i>Enterococcus avium</i>               |
| 20-D            | <i>Enterococcus durans</i>              |
| 22-C            | <i>Enterococcus durans</i>              |
| 23-A            | <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>   |
| 23-C            | <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>   |
| 24-A            | <i>Enterococcus faecalis</i>            |
| 24-B            | <i>Enterococcus faecalis</i>            |
| 26-B            | <i>Aerococcus viridans</i>              |
| 26-D            | <i>Leuconostoc spp.</i>                 |
| 27-A            | <i>Enterococcus faecalis</i>            |
| 27-C            | <i>Enterococcus faecalis</i>            |
| 35-A            | <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>   |
| 36-A            | <i>Enterococcus faecium</i>             |
| 37-A            | <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> |

|      |   |
|------|---|
| 37-B | <i>Enterococcus faecalis</i>            |
| 37-C | <i>Enterococcus faecalis</i>            |
| 38-A | <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> |
| 38-B | <i>Leuconostoc spp.</i>                 |
| 38-C | <i>Leuconostoc spp.</i>                 |
| 39-A | <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> |
| 40-A | <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>   |
| 44-D | <i>Leuconostoc spp.</i>                 |
| 45-A | <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> |
| 45-C | <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> |
| 46-A | <i>Aerococcus viridans</i>              |
| 47-D | <i>Enterococcus faecium</i>             |
| 48-A | <i>Leuconostoc spp.</i>                 |
| 50-A | <i>Aerococcus viridans</i>              |
| 50-B | <i>Enterococcus faecium</i>             |

**Tablo 4.5:** LAB'nin API 20 Strep ile identifikasyonu

| Tür adı                                 | İzolat numaraları                               | Tür sayısı | Dağılım yüzdesi |
|---|---|------------|-----------------|
| <i>Leuconostoc spp.</i>                 | 6-A, 5-B, 12-B, 26-D,<br>38-B, 38-C, 44-D, 48-A | 8          | %23             |
| <i>Enterococcus faecalis</i>            | 24-A, 24-B, 27-A,<br>27-C, 37-B, 37-C           | 6          | %17.6           |
| <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> | 37-A, 38-A, 3<br>9-A, 45-A, 45-C                | 5          | %14.7           |
| <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>   | 4-A, 4-C, 23-A,<br>23-C, 35-A, 40-A             | 6          | %17.6           |
| <i>Enterococcus faecium</i>             | 36-A, 47-D, 50-B                                | 3          | %8.8            |
| <i>Aerococcus viridans</i>              | 26-B, 46A, 50-A                                 | 3          | %8.8            |
| <i>Enterococcus durans</i>              | 20-D, 22-C                                      | 2          | %5.8            |
| <i>Enterococcus avium</i>               | 20-A  | 1          | %2.9            |

**Tablo 4.6:** API 20 Strep sistemiyle LAB'nin türlere göre dağılımı ve yüzde oranları

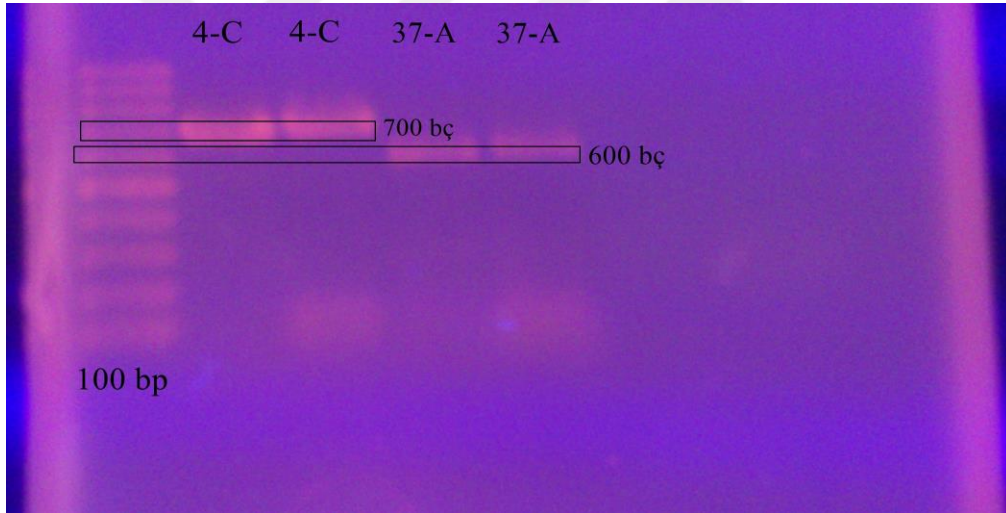


API 20 Strep testi sonuçlarına göre %23'ü *Leuconostoc spp.*, %17.6'sı *Enterococcus faecalis*, %17.6 *Lactococcus lactis ssp.cremoris*, %14.7'si *Lactococcus lactis ssp. lactis*, %8.8'i *Enterococcus faecium*, %8.8'i *Aerococcus viridans*, %5.8'i *Enterococcus durans* ve %2.9'u *Enterococcus avium* olarak belirlenmiştir.

#### 4.6. *Lactococcus lactis*'in PZR ile İdentifikasyonu

##### 4.6.1. Optimizasyon Çalışmaları

Antimikrobiyal aktivitesi belirlenen 34 adet izolatın PZR optimizasyon koşullarının sonuçları verilmiştir.



**Resim 4.5:** Protokol optimizasyon çalışması jel görüntüsü

| MASTER MİX        |      |
|-------------------|------|
| Saf su            | 17,3 |
| MgCl <sub>2</sub> | 2    |
| 10XTaq Buffer     | 2,5  |
| dNTPmix           | 0,5  |
| Taq DNA Polimeraz | 0,2  |
| Primer F          | 1    |
| Primer R          | 1    |
| DNA               | 0,5  |

**Tablo 4.7:** PZR karışımı [Özteber, 2013]

|           |           |           |           |           |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1         | 30 döngü  |           |           | 1         |
| 95 derece | 95 derece | 55 derece | 72 derece | 72 derece |
| 3 dakika  | 30 saniye | 30 saniye | 40 saniye | 10 dakika |

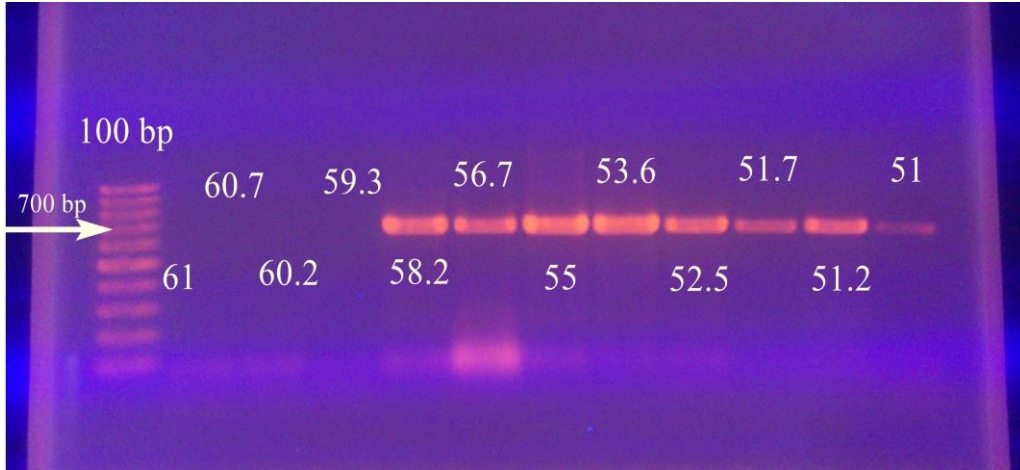
**Tablo 4.8:** PZR ısı programı

### **Elektroforez**

Elde edilen PZR ürünlerinden 10 µl alınarak, 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılıp % 1.5'lik agaroz jele yüklenmiştir. 80 V 400 mA elektrik akımında 90 dakika yürütülerek elektroforez işlemi uygulanmıştır. Jel (% 0.1) ethidium bromide ile 10 dakika boyandıktan sonra UV transilüminatörde incelenmiştir.

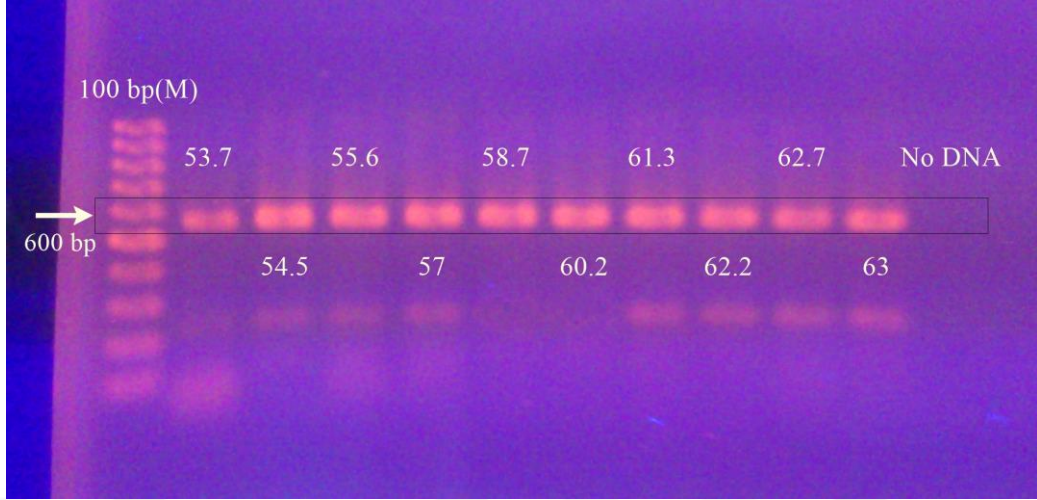
### ***Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* İzolatlarının Primer Bağlanma Isısı Optimizasyonu**

*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* primer bağlanma ısısının belirlenmesi için yapılan optimizasyon çalışmasında 51°C-61°C ısı aralığı kullanıldı. Primerlerin bağlanma sıcaklığı 55°C olarak belirlendi ve elde edilen bant profili Resim 4.6'da verilmiştir.



**Resim 4.6:** *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* primer bağlanma ısı optimizasyonu

*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* için primer bağlanma ısısının belirlenmesi için yapılan optimizasyon çalışmasında 53°C-63°C ısı aralığı kullanıldı. Primerlerin bağlanma sıcaklığı 58°C olarak belirlendi ve elde edilen bant profili Resim 4.7'de verilmiştir.



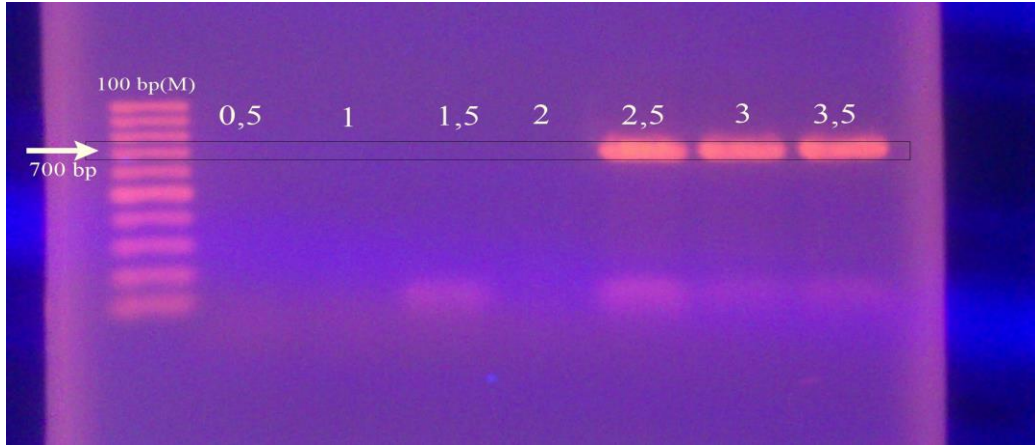
**Resim 4.7:** *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* primer bağlanma ısı optimizasyonu

### ***Lactococcus lactis* ssp *lactis* ve *Lactococcus lactis cremoris* Magnezyum Klorür Optimizasyonu**

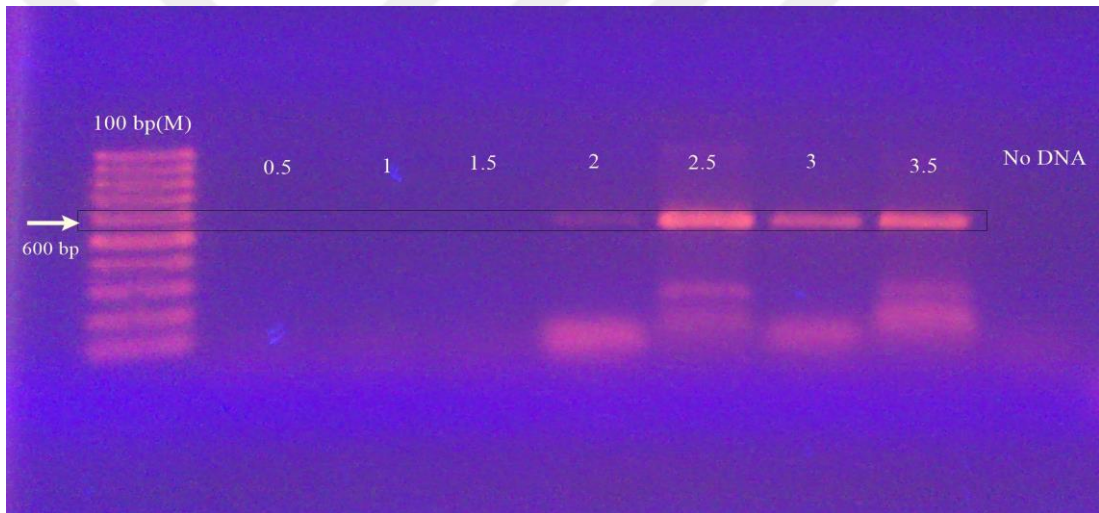
PZR koşullarını optimal seviyeye getirmek için magnezyum klorür (0.5-3  $\mu$ L) aralığında farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Bu optimizasyon şartları her iki alttür için tekrar edilmiştir. *Lactococcus lactis* 'in iki alttürü için de  $MgCl_2$  miktarı olarak 3  $\mu$ L karar verilmiştir.

| MASTER MIX        |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Saf su            | 18,8 | 18,3 | 17,8 | 17,3 | 16,8 | 16,3 | 15,8 |
| $MgCl_2$          | 0,5  | 1    | 1,5  | 2    | 2,5  | 3    | 3,5  |
| 10XTaq Buffer     | 2,5  | 2,5  | 2,5  | 2,5  | 2,5  | 2,5  | 2,5  |
| dNTPmix           | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  |
| Taq DNA Polimeraz | 0,2  | 0,2  | 0,2  | 0,2  | 0,2  | 0,2  | 0,2  |
| Primer F          | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    |
| Primer R          | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    |
| DNA               | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  |

**Tablo 4.9:** Magnezyum klorür optimizasyonu için kullanılan farklı konsantrasyonlar



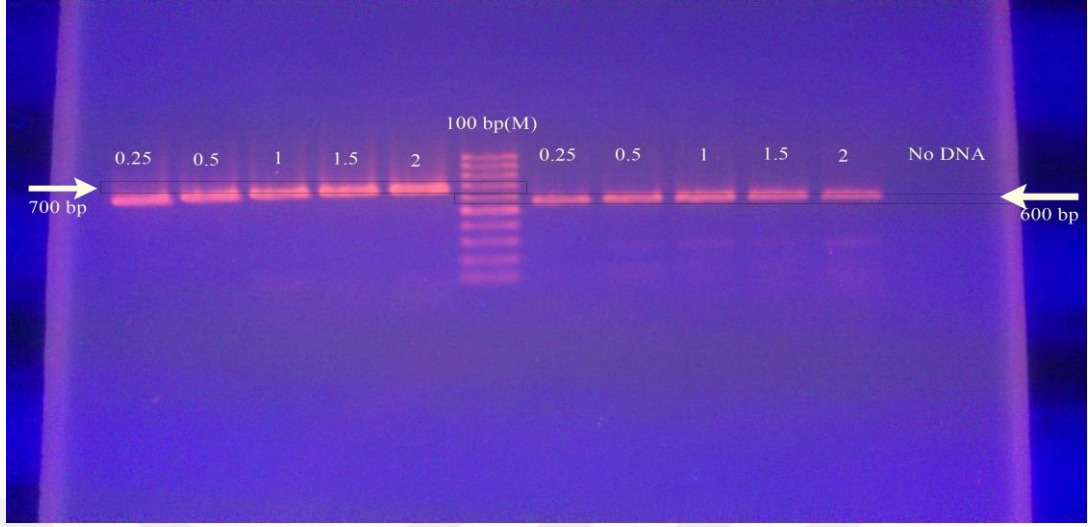
**Resim 4.8:** *Lactococcus lactis ssp. lactis* için magnezyum klorür optimizasyon sonuçları



**Resim 4.9:** *Lactococcus lactis ssp. cremoris* için magnezyum klorür optimizasyon sonuçları

### ***Lactococcus lactis ssp. lactis* ve *Lactococcus lactis ssp. cremoris* Primer Optimizasyonu**

Bu aşamada primer optimizasyon deneme çalışmaları yapılmış ve her iki alttür için de bu optimizasyon tekrar edilmiştir. PZR karışım oranı Tablo 4.10' da verilmiştir. Her iki alttür için de 0.25 µL primer oranına karar verilmiştir.



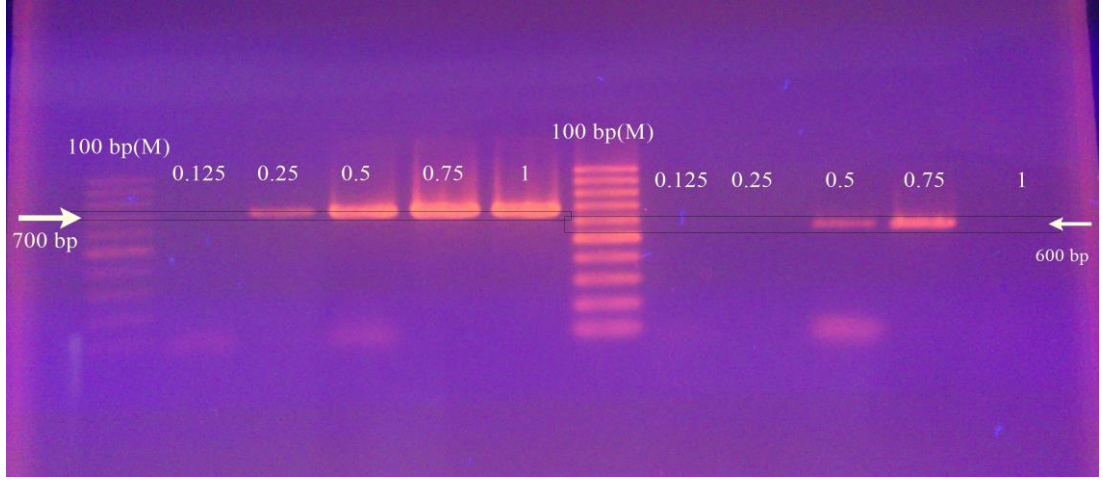
**Resim 4.10:** *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* primer optimizasyonu bant profili

| MASTER MIX        |      |      |      |      |      |
|-------------------|------|------|------|------|------|
| Saf su            | 17,8 | 17,3 | 16,3 | 15,3 | 14,3 |
| MgCl <sub>2</sub> | 3    | 3    | 3    | 3    | 3    |
| 10XTaq Buffer     | 2,5  | 2,5  | 2,5  | 2,5  | 2,5  |
| dNTPmix           | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  |
| Taq DNA Polimeraz | 0,2  | 0,2  | 0,2  | 0,2  | 0,2  |
| Primer F          | 0,25 | 0,5  | 1    | 1,5  | 2    |
| Primer R          | 0,25 | 0,5  | 1    | 1,5  | 2    |
| DNA               | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  |

**Tablo 4.10:** *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* primer optimizasyonu için PZR karışımı

### ***Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* DNA Optimizasyonu**

İki alttür için de DNA optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır. Tablo 4.11’de DNA konsantrasyon aralığı verilmiştir. Sonuç olarak *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* için 0.25µL, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* için ise 0,75 µL olarak belirlenmiştir.



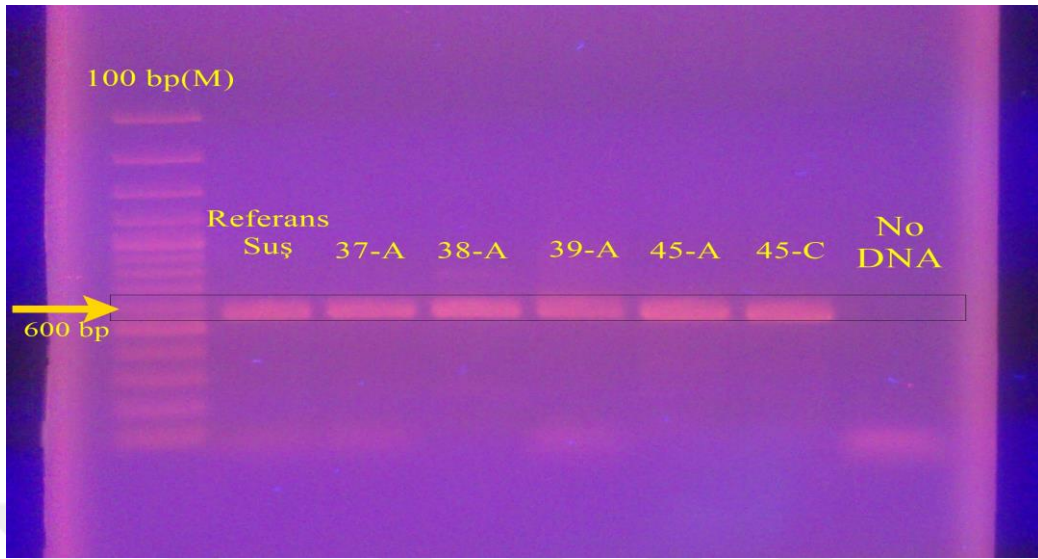
**Resim 4.11:** *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* DNA optimizasyonu

| MASTER MIX        |       |      |      |      |      |
|-------------------|-------|------|------|------|------|
| Saf su            | 17,8  | 17,3 | 16,3 | 15,3 | 14,3 |
| MgCl <sub>2</sub> | 3     | 3    | 3    | 3    | 3    |
| 10XTaq Buffer     | 2,5   | 2,5  | 2,5  | 2,5  | 2,5  |
| dNTPmix           | 0,5   | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5  |
| Taq DNA Polimeraz | 0,2   | 0,2  | 0,2  | 0,2  | 0,2  |
| Primer F          | 0,25  | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| Primer R          | 0,25  | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| DNA               | 0,125 | 0,25 | 0,5  | 0,75 | 1    |

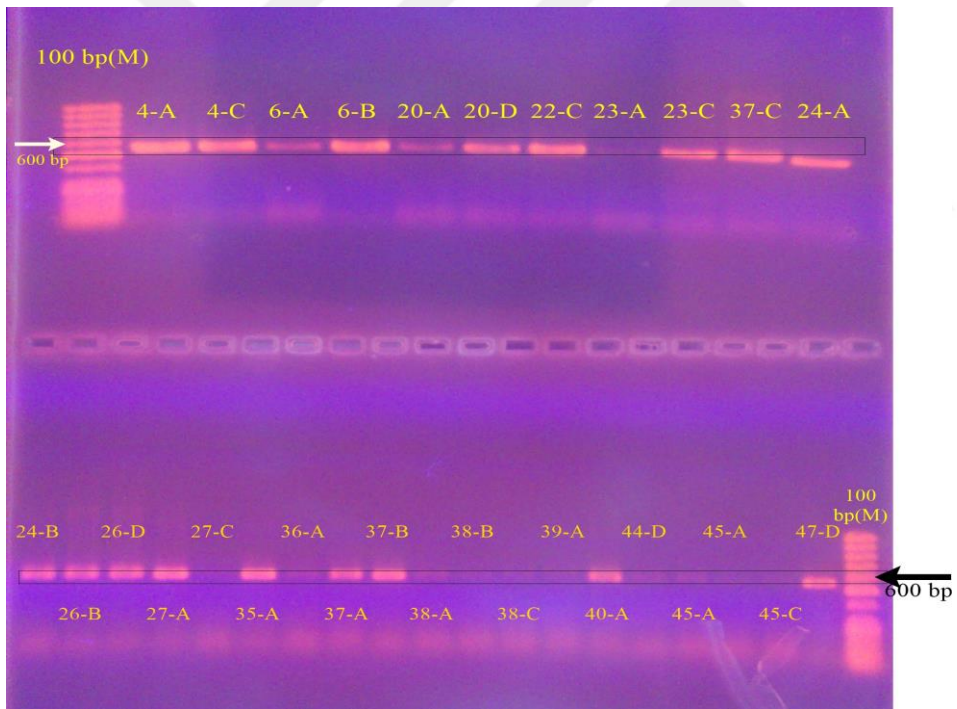
**Tablo 4.11:** *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* DNA optimizasyonu için PZR karışımı konsantrasyonu

#### 4.6.2. *Lactococcus lactis* Alt türlerinin İdentifikasyonu

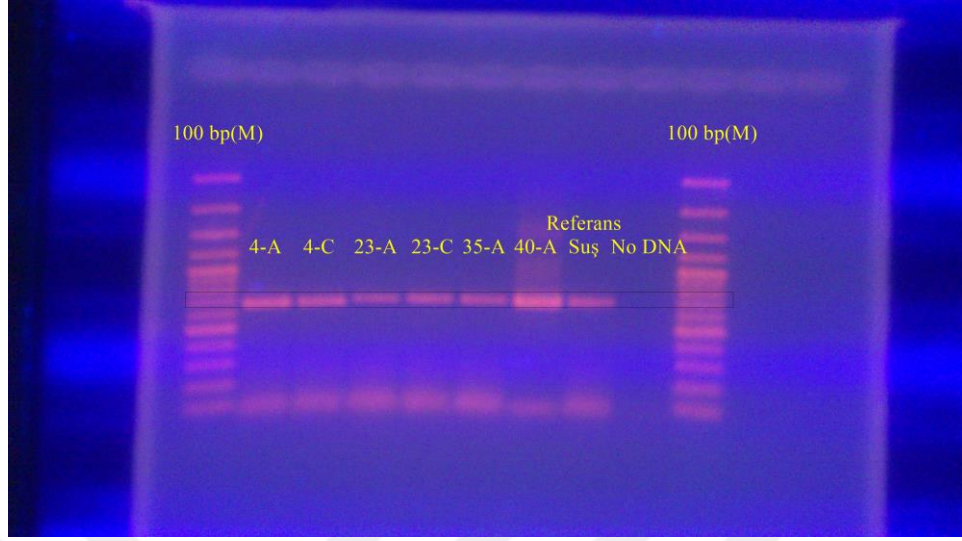
İzolatların 16S rRNA'yı kodlayan gen bölgeleri PZR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Bu hedef bölgeler *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* ve *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* türlerine özgü tasarlanan primerler kullanılarak belirlenmiştir. Bu bölgelerin bant profilleri Resim 4.12, 4.13, 4.14 ve 4.15' de verilmiştir.



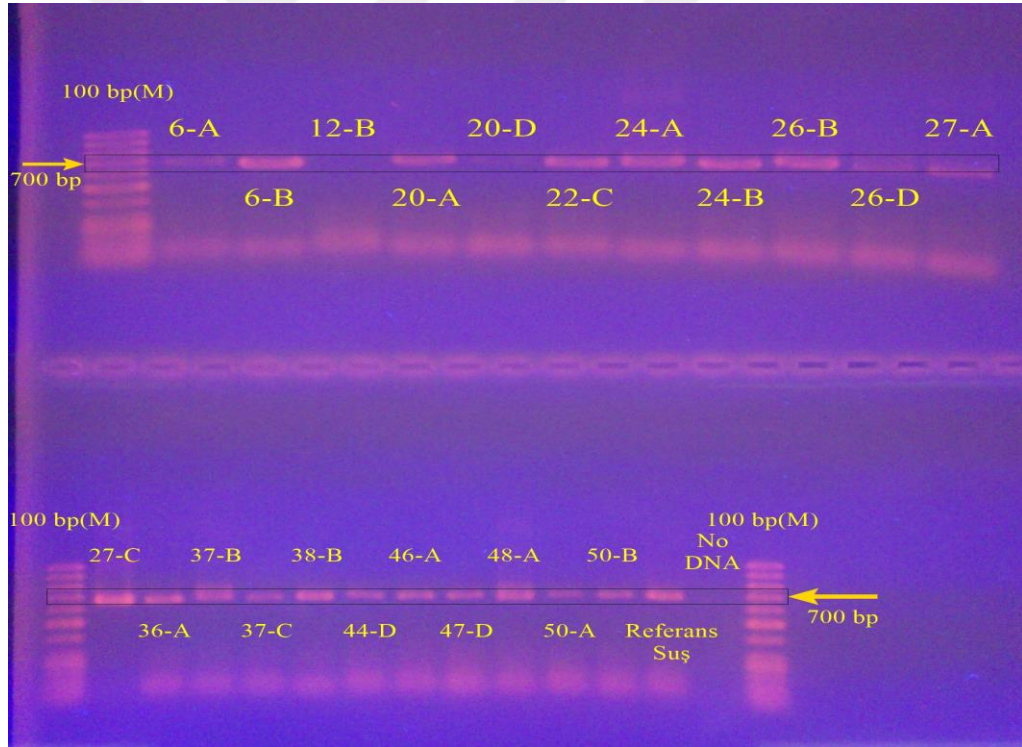
**Resim 4.12:** *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* izolatlarının bant profili (M: marker)



**Resim 4.13:** *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* izolatlarının bant profili (M: marker)



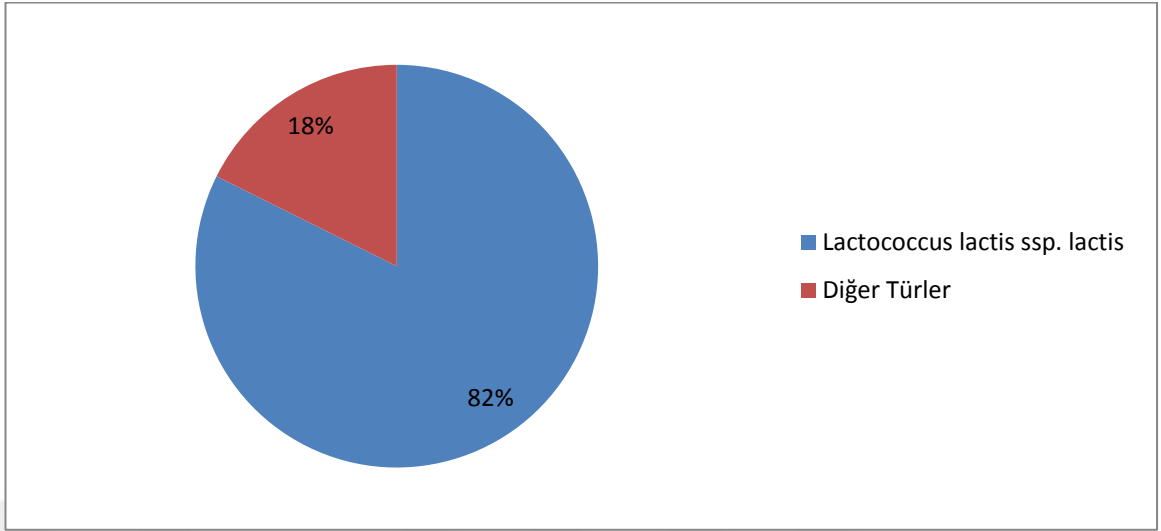
**Resim 4.14:** *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* izolatlarının bant profili (M: marker)



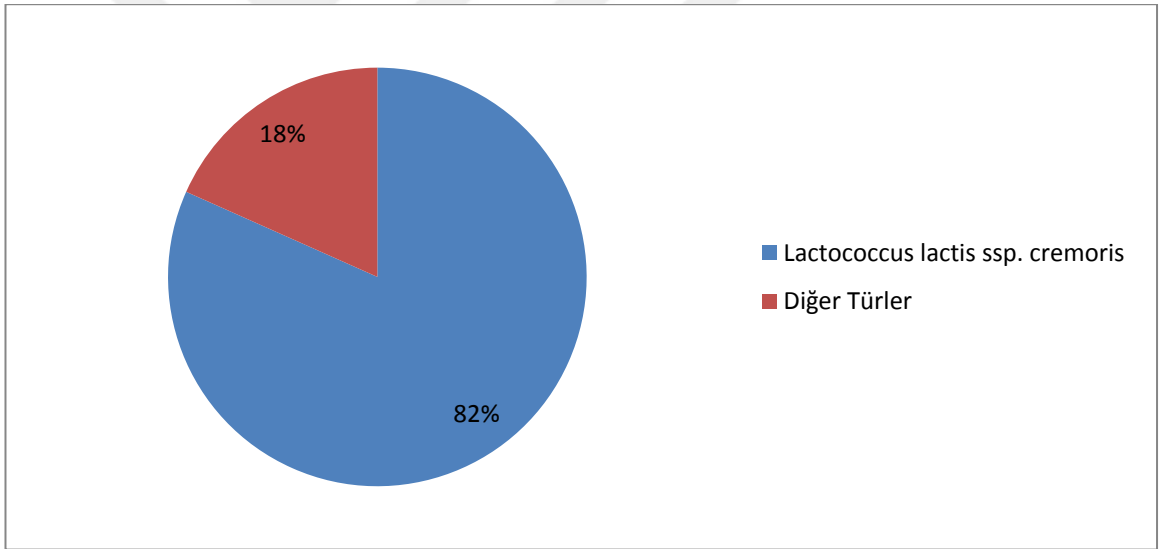
**Resim 4.15:** *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* izolatlarının bant profili (M: marker)

PZR yöntemi uygulaması sonrasında antimikrobiyal aktiviteye sahip 34 izolatın %73'ünün *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, %82'sinin ise *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* olduğu belirlenmiştir.





Şekil 4.12: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* suş dağılım oranı



Şekil 4.13: *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* suş dağılım oranı

## 5.TARTIŞMA

Bu çalışmada; Amasya ilinde mandıralardan sağlanan 77 çiğ süt örneğinden izole edilen 154 laktik asit bakterisinin, bazı gıda patojenleri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilen izolatların identifikasyonu yapılmıştır. Fenotipik identifikasyon için gram boyama, biyokimyasal yöntemler ve API testi, genotiplendirme için PZR yöntemi kullanılmış, tür ve tür altı düzeyde tanımlama yapılmıştır.

Yapılan çalışmalarda farklı örneklerden laktokokların izolasyonu bildirilmiştir. Toprakta *L. lactis* subsp. *lactis* izolasyonu [Chen ve ark., 2005], bitkilerden ve süttten *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* izole edilirken, süttten *L. lactis* subsp. *cremoris* izolasyonu [Nomura ve ark., 2006], çiğ süttten *L. garviae* suşları [Poznanski ve ark., 2004], peynirden *L. garviae* izolasyonu (Fortina ve ark.), kargı tulum peynirinden 96 laktik asit bakterisi izolatu elde edilmiştir [Elçioğlu, 2010].

Hızarcı'nın yapmış olduğu çalışmada; 30 tulum peynirinden 75 izolat elde edilmiştir. Bunların % 39,7'si *Lb. brevis* , % 27,4'ü *Lb. brevis* , % 20,6'sı *Lb. plantarum* , % 5,5'i *Lb. paracasei spp. paracasei* , % 4,1'i *Lb. pentosus*, % 1,4'ü *Lb. brevis* , % 1,4'ü *Lactococcus lactis spp. lactis* olarak tanımlamıştır.

Karagül'ün çalışmasında; 8 tulum peyniri, 3 kefir, 1 pastörize ve 1 çiğ süt örneğinden 125 LAB izole edilmiş ve bu izolatların antimikrobiyal aktivitesi incelemiştir [Karagül, 2010].

Tabakoğlu çalışmasında; peynirden izole ettiği LAB'nin antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. 124 izolatın sadece 4'nün seçilen test mikroorganizmaları üzerinde inhibisyon etkisi oluşturduğunu bildirmiştir. İzolatların 2'sinin *Enterococcus durans* ve 2'sinin de *Enterococcus faecium* olduğu Vitek 2 sistemi ve bazı biyokimyasal testlerle belirlenmiştir [Tabakoğlu, 2010].

Karagül yaptığı çalışmada; süt, peynir ve kefirde elde ettiği izolatların 34'ünün belirlediği mikroorganizmaların en az birine inhibitör etkisi olduğunu bildirmiştir. İzolatların ürettikleri antimikrobiyal maddenin, 121 °C'de 15 dakika uygulandığı ısı işlemi sonrasında antimikrobiyal etkisini genellikle yitirmediği, hatta bazı izolatlarda etkisini arttırdığı görülmüştür. Bunun sebebinin antimikrobiyal maddelerin ısı işlem sonrası rejenerasyon yeteneğinin olmasıyla ilişkilendirmiştir. Antimikrobiyal maddeleri tripsin ve pepsin enzimleriyle muamele ettiklerinde, bu maddelerin inhibitör özelliklerini kaybettiklerini ve protein yapıda olduğunu göstermektedir [Karagül, 2010].

Kışla'nın çalışmasında; 83 adet çiğ süt, peynir ve lahana örneğinden 273 laktik asit bakterisini izole etmiş ve kuyu difüzyon yöntemi ile bakteriyosin özelliğini araştırmış fakat hiçbir izolatın bakteriyosin üretmediğini belirlemiştir. Daha sonra *L.lactis* 497 suşunun ürettiği nisinin serbest hale geçmesi için kuvvetli asitle muamele etmiş ve kaynar su banyosunda bekletmiştir. Nisin üretimini artırmak için glukoz, sakkaroz, fruktoz ve laktozlu karbon kaynaklarından en çok verimi %2'lik sakkarozlu MRS brothda elde ettiğini bildirmiştir [Kışla, 2001].

Demir'in çalışmasında; daha önceden izole edilen laktik asit bakterilerine antimikrobiyal aktivite testi uygulamıştır. 138 izolata pH'nın nötrlendiği agar spot testi ve agar kuyu difüzyon testi uygulamıştır. Agar spot testinde tüm izolatlar antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Agar kuyu difüzyon testinde ise hiçbir izolatta inhibisyon zonu oluşmamıştır. Testlerdeki bu farklılığın sebebinin ise asit üretimi ile ilgili olduğunu belirtmiştir [Demir, 2014].

Banwart'ın yaptığı çalışmada; hücre içerisine giren ve hücre içerisinde disosiyeye olan asitler veya asidik ortamdaki protonların pasif olarak hücre içine girişi vasıtasıyla düşen sitoplazmik pH'nın DNA'da zarara neden olabileceği belirtilmiştir (Banwart, 1989). Laktik asit, asetik asit ve p-aminobenzoat ile pH: 3,5'a getirilmiş, ortamda *E.coli*'nin 4 suşu geliştirilmiş ve DNA'nın tek iplikçisindeki kırılmayı onaramayan

(DNA polimeraz I enzimi içermeyen) pol A1 suşunda her üç asitin de yüksek toksik etkide bulunduğu görülmüştür [Çon ve Gökalp, 2002].

Gonzalez-Fandos ve Dominguez'in yaptıkları çalışmada; çiğ tavuk butlarına 5 dk 0,55 mol/L laktik asit uygulamasının, mezofil bakteri sayısında 0,68-3-13 log'luk azalma yaptığı ortaya konulmuştur. 0,55 mol/L laktik asit uygulanan çiğ tavuk butları, 7 gün boyunca 4 °C'de depolanmış ve depolama sonunda *L. monocytogenes* sayısında 1,74 log azalma kaydedilmiştir. 0,22 mol/L laktik asit sığır etine uygulandığında, *L. monocytogenes* sayısında 0. günde 1,56 log azalmaya neden olduğu ortaya konmuştur. Et yüzeyine laktik asit uygulamasının florada 1-3 log azalmaya neden olduğu belirlenmiştir [Gonzalez-Fandos ve Dominguez, 2006].

Dahiya ve Speck (1968); *L. bulgaris* ve *L. lactis*' in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi yardımıyla *S.aureus* 'un ve bazı *Pseudomonas* türlerinin gelişimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Juffs ve Babel (1975); çok suşlu bir laktik asit starterini çeşitli psikrotrof mikroorganizmaları içeren süte, %0,5 oranında inoküle etmişler, daha sonrada sıcaklık ve zamana bağlı olmak üzere öncelikle starter türüne önemli inhibitör aktivite elde ettiklerini bildirmişlerdir. Aynı denemede, ortama katalaz katılması sonucu antimikrobiyal etkide azalma meydana gelmesi dolayısı ile bu aktivitenin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretiminden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir [Çon ve Gökalp,2002].

Yaptığımız çalışmada Amasya ilinde tüketime sunulan 77 adet çiğ süt örneği kullanılmıştır. Seri dilüsyonlar halinde MRS (De Man Rogasa Sharpe) Agar'a ekilen ve koloni morfolojisi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* olduğu düşünülen gram pozitif, katalaz negatif koloniler M17 Agar'a inoküle edilmiştir. Kullanılan 77 çiğ süt numunesinden 154 adet izolat elde edilmiştir. Belirlenen *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (DSM 4312), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ve *Escherichia coli* (ATCC 35218) patojenlerden türlerinden en az üç patojene antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edildi.

Çalışmamızda elde edilen 154 adet laktik asit bakterisinden %40'ı *Salmonella enteritidis*'e, %33'ü *Staphylococcus aureus*'a, %29'u *Bacillus cereus*'a, %29'u *Bacillus subtilis*'e ve %13'ü *Escherichia coli*'ye karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. İzolatların birden çok patojen üzerindeki etkisine bakılacak olursa %59'u en az bir patojene karşı inhibitör etki gösterirken %38'i iki, %22'si üç, %11'i dört, %5'i ise bütün patojenlere karşı inhibitör etki göstermiştir.

Adnan ve Tan (2007), iki geleneksel Malezya ürününden ve kırmızı biber püresinden izole edilen laktik asit bakterileri arasında, pH 4.5, pH 7.0 ve pH 9.0'da *L. brevis* ve *L. plantarum* türlerinin geliştiğini belirtmişlerdir. Laktik asit bakterilerinin ayırımında gelişme sıcaklıkları önemli olduğundan, sıvı besiyerinde 50 °C'de gelişmesi, *Enterococcus faecium*'u diğer enterokoklardan ayırmada yararlıdır. *Lactococcus lactis ssp. cremoris* ise diğer laktokoklardan 40 °C'de gelişmeme özelliğiyle ayrılmaktadır [Tabakoglu, 2010].

Tangüler tarafından şalgam suyundan izole edilen *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* cinslerinin pH 4.0'da gelişme gösterdiği, fakat pH 9.6'da hiçbir bakterinin gelişme göstermediği belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada kontrol olarak kullanılan *L. buchneri*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* türlerinden *L. buchneri* hariç diğer dört bakterinin pH 4.4'de gelişebildiği, fakat beş bakteriden hiçbirinin pH 9.6'da gelişmediği saptanmıştır [Tangüler, 2010].

Kıran tarafından yapılan bir çalışmada, hazır gıdalardan izole edilen ve çeşitli kültür koleksiyonlarından temin edilen laktik asit bakterilerinin hepsinin, %4 tuzda geliştiği, %6.5 tuzda beş tanesi hariç diğerlerinin geliştiği, %12 tuzda dört tanesinin zayıf gelişme gösterdiği ve diğerlerinin gelişmediği, %18 tuz konsantrasyonunda ise hiçbirinin gelişmediği belirtilmiştir [Kıran, 2006].

Yaptığımız çalışmada izole edilen laktik asit bakterilerinin biyokimyasal test sonuçları değerlendirildiğinde, bütün izolatların %4'lük NaCl'de ürediği, fakat %7.5'lik NaCl'de 4-A ve 36-A numaralı izolatın üremediği gözlenmiştir. %10'luk

NaCl'de 4-A, 4-C, 26-D, 27-A, 37-C, 39-A, 46-A, 50-A ve 50-B numaralı izolatların üremediği tespit edilmiştir.

Asitlik bazlık değişiminin incelenmesinde ise pH 3.9'da 4-A, 4-C, 6-B, 12-B, 20-A, 23-A, 26-B, 27-C, 35-A ve 37-A numaralı izolatlarında üreme görülmemiş, pH:9.6'da tüm izolatların ürediği saptanmıştır.

Çalışmamızda ayrıca ortam ısısının suşların üremesine etkileri de incelenmiştir. +4°C'de 4-A, 4-C, 20-D, 24-A, 24-B, 27-A, 27-C ve 36-A numaralı izolatlarda üreme görülmemiştir. 15°C'de izolatların üremelerinde herhangi bir olumsuz etki gözlenmemiştir. 45°C'de 4-A, 4-C, 6-B, 12-B, 36-A, 37-B, 39-A ve 44-D numaralı izolatlar ürememiştir.

Biyokimyasal testler tür tanımlamada kullanılırken bu testlerin bir aşaması da tür tanımlama kitlerindeki yardımcı test veya doğrulama yüzdesini artırmak için kullanılmaktadır.

Kara ve Akkaya, Afyonkarahisar'da topladıkları tulum peyniri örneklerinden izole ettiği laktik asit bakterilerini API 50 CHL ve API 20 Strep testleriyle tanımlamıştır. %1,2 *Pediococcus* spp. ve %25,3 *Enterococcus* spp. tespit edilmiştir. İzole edilen laktik asit bakterilerinden en yüksek oranlarda %15,66'sı *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei*, %13,25'i *Lactobacillus brevis*, %7,22'i *Lactobacillus plantarum*; %12,04'i *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, %7,22'si *Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides/dextranicum*; %1,20'si *Pediococcus acidilactici* olarak tanımlanmıştır [Kara ve Akkaya, 2014].

Çalışmamızda 34 izolatın API 20 Strep testi sonuçlarına göre; %23'ü *Leuconostoc* spp., %17.6'sı *Enterococcus faecalis*, %17.6 *Lactococcus lactis* ssp.*cremoris*, %14.7'si *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, %8.8'i *Enterococcus faecium*, %8.8'i *Aerococcus viridans*, %5.8'i *Enterococcus durans* ve %2.9'u *Enterococcus avium* olarak belirlenmiştir.

Yaptığımız literatür araştırmaları sonucunda moleküler tiplendirme yöntemlerinin kullanıldığı bulgulara rastlanılmıştır. Rodtong ve Tannock, *Lactobacillus*'ların genotiplendirmesiyle ilgili yaptıkları bir çalışmada; izole ettikleri 34 *Lactobacillus* türüne 16S rDNA primerleri ile PZR yöntemi uygulamış ve genetik açıdan farklı dört grubun olduğunu bildirmiştir [Roldtong ve Tannock, 1993].

Kırmacı çalışmasında, şanlıurfa'da koyun çiğ sütlerinden kontrollü koşullarda üretilen Urfa peynirini üç ay olgunlaştırdıktan sonra izole ettiği 143 laktik asit bakterisini fenotipik ve genotipik olarak tür düzeyinde karakterizasyonunu sağlamıştır. En yaygın suşun *Enterococcus* spp. ve ikinci sırada ise *Lactococcus* spp. olduğunu bildirmiştir. Peynirin kalitesi için proteolitik aktivitenin yüksek olması gerektiğini bildiren Kırmacı proteolitik aktivitesi yüksek *Lactococcus* spp.'lerin tür düzeyinde tanımlanması ve gerçek zamanlı PZR denemelerinin tekrarlanmasının gerekliliğine vurgu yapmıştır [Kırmacı, 2010].

Özteber'in çalışmasında ise, 168 izolatta direnç geni bölgelerini MİK ve klasik PZR yöntemiyle ve sekans analiziyle tespit etmiştir. Fenotipik olarak çoklu antibiyotik direncinin *Lactococcus lactis* türlerinin hiçbirinde gözlenmediğini bildirmiştir. İncelenen ürün kaynaklarından en yüksek direnç yüzdelerinin mandıralarda olduğunu ve bunu market ürünleri ve pazar ürünlerinin takip ettiğini bildirmiştir. *Lactococcus lactis* türlerinin güvenilir bir şekilde starter olarak kullanılabileceğini işaret etmektedir [Özteber, 2013].

Büyükyörük alışmasında; İzmir tulum peynirinden laktokok izolasyonu yapmıştır. İzolasyon aşamasında fenotipik yanılma payının yüksek olduğunu bildirerek gram boyama, yüksek tuz konsantrasyonunda ve farklı sıcaklıklarda üreme testi uygulamış ve moleküler identifikasyonla belirlemiştir. Yaptığı çalışmada; peynirlerden *Lactococcus lactis* subsp. *cremois* türünün diğer türlere oranla daha nadir olarak %12 oranında izole edebildiğini bildirmektedir. Ayrıca bu çalışmada fenotipik aşamada cremoris ve lactis türlerinin sadece arjininden amonyak üretim testi ile belirlenebildiğini ve bunun bazen yanlış sonuçlar verdiğini bildirerek PZR yönteminin gerekliliğini vurgulamıştır. alışmasında tulum peynirlerinde %32

oranında *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris*'in bulunması; olgunlaşma işleminin peynirdeki laktokok oranını düşürmesinin bu mikroorganizmaların tulum peynirinde aroma ve lezzet oluşumundaki rolünü belirlediğini bildirmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalara atıfta bulunarak İzmir tulum peynirinde de *L. lactis* subsp. *lactis*'in bulunma oranını (%20), *L. lactis* subsp. *cremoris*'e göre (%12) daha fazla olduğunu bildirmektedir [Büyükyörük, 2007].

Alan'ın tez çalışmasında; turşulardan elde ettiği 40 LAB' ni morfolojik, biyokimyasal ve PZR yöntemi ile tanımlamıştır. İzolatlardan 22 tanesinin *Lactobacillus plantarum* olduğunu bildirmiştir. *Lactobacillus plantarum* türünün baskın olma sebebinin diğer türleri inhibe etmesiyle açıklamıştır. Bu türün plazmit yapısının incelenmesinin turşunun kalitesi açısından olumlu yönde olacağını bildirmiştir [Alan, 2010].

Çalışmamızda ise PZR tabanlı moleküler tiplendirme yöntemi uygulaması sonrasında antimikrobiyal aktiviteye sahip 34 izolattan %73'ünün *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, %82'sinin ise *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda çiğ süttten izole edilen *Lactococcus lactis* türlerinin en çok *Bacillus subtilis* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenirken bunu *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* takip etmektedir. Laktik asit bakterileri, hızlı asit oluşumu ve doğal antimikrobiyal maddeler salgılayarak ürünün raf ömrünün uzatılmasını sağlayan, tüketici sağlığını patojenlere karşı koruyan starter kültürler olarak kullanılmaktadırlar. Bu nedenle bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri metabolitlerin bu patojenleri inaktive ettiği düşünülmektedir. Fenotipik tiplendirme olan API testi morfolojik bir test olduğundan yanlış payı bulunmaktadır. Bu nedenle bu testlerin çoğu zaman alternatif bir testle yani moleküler teknikler veya VITEK gibi uygulamalarla desteklenmesi gerekmektedir. Yaptığımız çalışmada PZR yöntemi kullanılmış ve elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılarak veriler değerlendirilmiştir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada; Amasya'da tüketime sunulan 77 çiğ süt örneğinden izole edilen 154 laktik asit bakterisinin, bazı gıda patojenleri üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edildikten sonra bu izolatların fenotipik olarak gram boyama, biyokimyasal yöntemler ve API testi ile PZR yöntemi kullanılarak identifikasyonu yapılmıştır.

1. MRS (De Man Rogasa Sharpe) Agar'a seri dilüsyonlar halinde ekilen ve koloni morfolojisi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* olduğu düşünülen gram pozitif, katalaz negatif koloniler M17 Agar'a inokule edilmiştir.

2. Elde edilen 154 adet laktik asit bakterisinden %40'ı *Salmonella enteritidis*'e, %33'ü *Staphylococcus aureus*'a, %29'u *Bacillus cereus*'a, %29'u *Bacillus subtilis*'e ve %13'ü *Escherichia coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. İzolatların birden çok patojen üzerindeki etkisine bakılacak olursa %59'u en az bir patojene karşı inhibitör etki gösterirken %38'i iki, %22'si üç, %11'i dört, %5'i ise bütün patojenlere karşı inhibitör etki göstermiştir.

3. İzole edilen laktik asit bakterilerinin biyokimyasal test sonuçları değerlendirildiğinde, bütün izolatların %4'lük NaCl'de ürediği, fakat %7.5'lik NaCl'de 4-A ve 36-A numaralı izolatların üremediği gözlenmiştir. %10'luk NaCl'de 4-A, 4-C, 26-D, 27-A, 37-C, 39-A, 46-A, 50-A ve 50-B numaralı izolatların üremediği tespit edilmiştir.

4. Asitlik bazlık değişiminin incelenmesinde; pH 3.9'da 4-A, 4-C, 6-B, 12-B, 20-A, 23-A, 26-B, 27-C, 35-A ve 37-A numaralı izolatlarında üreme görülmemiş, pH:9.6'da tüm izolatların ürediği saptanmıştır.

5. Ortam ısısının suşların üremesine etkileri incelendiğinde ise; +4<sup>0</sup>C'de 4-A, 4-C, 20-D, 24-A, 24-B, 27-A, 27-C ve 36-A numaralı izolatlarda üreme görülmemiştir.

15<sup>0</sup>C'de izolatların üremelerinde herhangi bir olumsuz etki gözlenmemiştir. 45<sup>0</sup>C'de 4-A, 4-C, 6-B, 12-B, 36-A, 37-B, 39-A ve 44-D numaralı izolatlar ürememiştir.

6. 34 izolatın API 20 Strep testi sonuçlarına göre; %23'ü *Leuconostoc spp.*, %17.6'sı *Enterococcus faecalis*, %17.6 *Lactococcus lactis ssp.cremoris*, %14.7'si *Lactococcus lactis ssp. lactis*, %8.8'i *Enterococcus faecium*, %8.8'i *Aerococcus viridans*, %5.8'i *Enterococcus durans* ve %2.9'u *Enterococcus avium* olarak belirlenmiştir.

7. PZR yöntemiyle 34 izolatın %73'ünün *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, %82'sinin ise *Lactococcus lactis ssp. lactis* olduğu belirlenmiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda, sütte bulunan *Lactococcus lactis* bakterilerinin laktik asit üretim kapasiteleri dikkate alındığında biyokoruyucu starter kültür olarak kullanabilme olasılığı bulunmaktadır. Bu bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle patojenlerin gelişmesini engelleyerek insan sağlığına yararlı olması beklenmektedir.

Çalışmamızın gıdalarda bakteriyosin metabolitlerinin kullanımına bağlı olarak daha ileri çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu ürünlerin saflaştırılması ve yapısının aydınlatılması amacıyla protein analiz yöntemleri geliştirilebilir. Gen bölgeleri belirlenen *Lactococcus lactis* türlerinin DNA dizileme (sekanslama) yöntemiyle doğrulama çalışmaları yapılabilir.

## 7. KAYNAKÇA

Adams, M. R., Nicolaides, L., "Review Of The Sensitivity Of Different Foodborne Pathogens Fermentation", *Food Control*, (1997)

Ahi, S., "Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit (Eps) Üretimi İle Antibiyotik Dirençliliklerinin Araştırılması" *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, (2011)

Akkaya, D., "Laktik Asit Bakterilerine (Lab) Ait Çeşitli Suşların RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik Dna-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) İle Karakterizasyonu Ve Genetik Çeşitliliğin İncelenmesi" *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, (2009)

Aktan, N., Yücel, U., Kalkan, H., "Turşu Teknolojisi" *Ege Üniversitesi Basımevi* (1998)

Ammor, M. S., Florez, A. B., Mayo, B., "Antibiotic Resistance in Non Enterococcal Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria" *Food Microbiology*, (2007)

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I., "Antibacterial Activity Of Lactic Acid Bacteria Against Spoilage And Pathogenic Bacteria Isolated From The Same Meat Small-Scale Facility 1- Screening And Characterization Of The Antimicrobial Compounds" *Food Control* (2006)

Arslankoz, N., "Ankara Çubuk Yöresi Turşularından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Teknolojik ve Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi" *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi* (2011)

Babalola, O.O., "Molecular Techniques: Anoverview Of Methods For The Detection Of Bacteria" *African Journal Of Biotechnology*, (2003)

Basaran P, Basaran N, Cakır I. "Molecular Differentiation Of *Lactococcus Lactis* Subspecies *Lactis* And *Cremoris* Strains By Ribotyping And Site Specific PCR" *Current Microbiology* (2001)

Bayram, M., "Gıda Ürünlerinde Bakteriyosin Üreten Bakterinin İzolasyonu Ve Bakteriyosinin Karakterize Edilmesi" *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi* (2005)

Büyükyörük, S., "Geleneksel Olarak Hazırlanmış İzmir Tulum Peynirinden *Lactococcus lactis* (*Lactococcus lactis* Alttür *lactis* ve Alttür *cremoris*) Suşlarının İzolasyonu, Fenotipik ve Moleküler Teknikler ile İdentifikasyonu" *Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi* (2007)

Carr F.J., Chill D., Mıada N., "The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey" *Critical Reviews In Microbiology*, (2002)

Corroler D., Manguin I., Desmasures N., Gueguen M., "An Ecological Study Of Lactococci Isolated From Raw Milk İn The Camembert Cheese Registered Designation Of Origin Area" *Applied And Environmental Microbiology* (1998)

Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P., "Bacteriocins: Developing Innate İmmunity For Food" *Food Microbiology* (2005)

Çadırcı, B.H., "Bazı *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerin Çeşitli Gram (+) ve Gram (-) Bakteriler Üzerine Antagonistik Etkisi" *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi* (2003)

Çetinkaya, E., Ayhan, K., "Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Teknikler" *Karaelmas Science and Engineering Journal*, (2012)

Çon, A.H., Gökalp, H.Y., "Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal metabolitleri ve etki şekilleri" *Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi* (2002)

De Giori, G.S., De Valdez, G.F., De Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G., "Effect Of Ph And Temperature On The Proteolytic Activity Of Lactic Acid Bacteria" *Journal Dairy Science* (1985)

Demir, E., " Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriyosin Üretiminin Karakterizasyonu" *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü* (2014)

Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J., "New Preservation Technologies: Possibilities And Limitations" *International Dairy Journals* (2004)

Dicks, L.M.T., Van Vuuren, H.J.J. and Dellaglio, F., "Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenos*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base compositions and DNA-DNA hybridizations" . *International Journal of Systematic Bacteriology* (1990)

Dikici, A., "Çevresel Stres Faktörlerine Karşı Bakteriyel Adaptasyonlar ve Mekanizmaları" *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* (2009)

Dykes, G.A., Cloete, T.E. and Holy, A., " Identification of *Leuconostoc* species associated with the spoilage of vacuum-packaged Vienna sausage by DNA-DNA hybridization" *International Journal of Food Microbiology* (1994)

Elçioğlu, Ö., "Kargı Tulum Peynir'inden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Starter ve Probiyotik Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi" *Eskisehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi* (2011)

Esin Çetinkaya, Kamuran Ayhan "Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Teknikler" *Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü* (2012)

Evren, M., Albayram, C., Apan, M., , "Laktik Asit Bakterilerinin Oluşturduğu Antimikrobiyal Maddeler" *Türkiye 9. Gıda Kongresi* (2006)

Giraffa, G., Neviani, E., Torri Tarelli, G., "Antilisterial Activity By Enterococci In A Model Predicting The Temperature Evolution Of Taleggio, An Italian Soft Cheese" *Journal Of Dairy Science* (1994)

Hemme, D., Foucaud-Scheunemann, C., "Leuconostoc, Characteristics, Use In Dairy Technology And Prospects In Functional Foods" *International Dairy Journal* (2004)

Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B., "Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria", *American Society for Microbiology* (1995)

Kara, R., Akkaya, L., "Afyon Tulum peynirinin Mikrobiyolojik ve Fiziko-Kimyasal zellikleri ile Laktik Asit Bakteri Dağılımlarının Belirlenmesi" *Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Araştırma Makalesi* (2014)

Karagül, B., "Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin Benzeri Madde Üretme Yetenekleri" *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi* (2010)

Kılıç, S., "Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri" *Ege Üniversitesi Ziraat Fak. Yayınları No:542, 2. Baskı*, (2008)

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

Kilpper-Bälz, R., Fischer, G., Schleifer, K.H., "Nucleic Acid Hybridization Of Group N And Group D Strptococci" *Current Microbiology* (1982)

Klein, G., "Taxonomy, Ecology And Antibiotic Resistance Of Enterococci From Food And The Gastro İntestinal Tract" *İnternational Journal of Food Microbiology* (2003)

Korucu, D., "Tomas Peynirinden İzole Edilen Laktikasit Bakterilerinin Tanımlanması" *Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi* (2012)

Kuleaşan, H., "Laktobasiller Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Tanımlanması, Sınıflandırılması Ve Bazı Gıda Kaynaklı Patojenler Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi" *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.* (2002)

Kurt, Ş., Zorba, Ö., "Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları" *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi 16* (2005)

Mamsın, A. M. S., "Isolation And Identification Of Potential Nisin-Producing *Lactococcus lactis* spp. *lactis*" *Kahramanmaraş Sütçü İmam University Department Of Bioengineering And Sciences Master Thesis* (2015)

Mathur, S., Singh, R., "Antibiotic Resistance İn Food Lactic Acid Bacteria" Review. *International Journal Of Food Microbiology* (2005)

Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Catzeddu, P., Villan, F., Delena, P., Coppola, S., "Random Amplified Polymorphic DNA And Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphism: Powerful Methods To Differentiate *Streptococcus Thermophilus* Strains" *Journal Of Applied Microbiology* (1998) Bush, U. Nitschko, H., "Methods For Differentiation Of Microorganisms" *Journal Of Chromat. Biology* (1999)

Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Catzeddu, P., Villan, F., Delena, P., Coppola, S., "Nisin Producing Organisms During Tradditional Fior Di Latte Cheese Making Monitored By Multiplex-PCR And PFGE Analysis" *International Journal of Food Microbiology* (2001)

Odamaki, T., Yonezawa, S., Kitahara, M., Sugahara, Y., Xiao, J.-Z., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., Ohkuma, M., "Novel Multiplex Polymerase Chain Reaction Primer Set For Identification Of Lactococcus Species Morinaga" *Milk Industry Co., Ltd, Zama, Kanagawa, Japan Food Science And Technology Institute* (2011)

Özteber, M., "Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Belirlenmesi" *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi* (2013)

PEREZ G, CARDELL E, ZARATE V., "Protein fingerprinting as a complementary analysis to classical phenotyping for the identification of lactic acid bacteria from Tenerife cheese" *Le Lait Dairy Journal* (2000)

Perez G., Cardell E., Zarate V., "Protein Fingerprinting As A Complementary Analysis To Classical Phenotyping For The Identification Of Lactic Acid Bacteria From Tenerife Cheese" *Le Lait Dairy Journal* (2000).

Pu Z.Y., Dobos M., Limsowtin G.K.Y., Powell I.B., "Integrated Polymerase Chain Reaction-Based Procedures For The Detection And Identification Of Species And Subspecies Of The Gram-Positive Bacterial Genus *Lactococcus*" *Journal Of Applied Microbiology*, (2002)

Salama M.S., Musafijajeknic T., Sandine W.E., Giovannoni S.C., "An Ecological Study Of Lactic Acid Bacteria: Isolation Of New Strains Of *Lactococcus* Including *Lactococcus Lactis* Subspecies *Cremoris*" *Journal Of Dairy Science* (1995)

Salminen S., Wright, A., "Lactic Acid Bacteria" (1998)

Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P., "Proteolytic Systems Of Lactic Acid Bacteria" *Applied Microbiology and Biotechnology* (2006)



Stiles, M.E., Holzapfel, W.H., "Lactic Acid Bacteria Of Foods And Their Current Taxonomy" *International Journal Of Food Microbiology*, (1997)

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

Tatlı, D., " Geleneksel Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi", *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, (2009)

Tunail, N., Mikrobiyoloji, 1.Baskı, Ankara (2009)

Tuncer, Y., "Laktokok Suşları Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Tanısı ve Bu Özelliğın Genetik Doğasının Belirlenmesi" *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi* (2005)

**Türkyılmaz, S., Esendal, Ö.**, Polimeraz zincir reaksiyonu ve mikrobiyolojide kullanım alanları. *Kafkas Ün. Vet. Fak. Derg.* (2002)

Ünlütürk, A., Turantaş, F., "Gıdalarda Mikrobiyel Gelişmeyi Etkileyen Faktörler" *Gıda Mikrobiyolojisi. 2.Baskı.* (1999)

Yang, Z., "Antimicrobial Compounds And Extracellular Polysaccharides Produced By Lactic Acid Bacteria: Structures And Properties" *Helsinki Üniversitesi Gıda Teknolojisi* (2000)

Yüksekdağ, Z.N. ve Beyatlı, Y., "Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Fizyolojik, Biyokimyasal, Plazmit DNA ve Protein Profil Özelliklerinin İncelenmesi" *Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi* (2009)

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖZKUL, Hamdi

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 21.06.1988 Malatya

Medeni hali : Bekar

Telefon : 0 (531) 518 46 97

e-mail : ozkulhamdi@gmail.com

| Eğitim Derecesi | Eğitim Birimi                 | Mezuniyet tarihi |
|-----------------|-------------------------------|------------------|
| Yüksek lisans   | Amasya Üniversitesi /Biyoloji | 2016             |
| Lisans          | Fırat Üniversitesi/Biyoloji   | 2013             |
| Lise            | Turgut Özal Lisesi            | 2008             |

### İş Deneyimi

| Yıl | Yer | Görev |
|-----|-----|-------|
|-----|-----|-------|

### Yabancı Dil

İngilizce

**Yayınlar**

1. Özkul, H., Yıldırım, T., Amasya'da Tüketime Sunulan Çiğ Sütlerden *Lactococcus lactis* ve *Leuconostoc spp.* İzolasyonu ile Antimikrobiyal Aktivitenin ve Bakteriyosin Özelliğinin Belirlenmesi. 22. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 10-14 Ağustos 2015, Ankara.

**Kurs ve Sertifikalar**

|         |   |
|---------|---|
| 11.2008 | Bilgisayar İşletmenliği, Halk Eğitim Merkezi, Malatya                   |
| 07.2014 | Pedagojik Formasyon Sertifikası, Yozgat                                 |
| 04.2015 | Uygulamalı Moleküler Biyoloji Yöntemleri Lisansüstü Bahar Okulu, Amasya |

**Hobiler**

Film izlemek, kitap okumak, seyahat etmek, satranç, yüzmek