

**AZERBAIJAN'IN FARKLI SÜT
ÜRÜNLERİNDEN PROBİYOTİK BAKTERİ
İZOLASYONU VE TANIMLANMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Kamala MAMMADOVA

Eskişehir 2019

**AZERBAYCAN’IN FARKLI SÜT ÜRÜNLERİNDEN PROBİYOTİK BAKTERİ
İZOLASYONU VE TANIMLANMASI**

Kamala MAMMADOVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji / Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Temmuz 2019**

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 1803F063 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Kamala MAMMADOVA'nın "Azerbaycan'ın Farklı Süt Ürünlerinden Probiyotik Bakteri İzolasyonu ve Tanımlanması" başlıklı tezi 19/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU	:
Üye	: Doç. Dr. Gökalg İŞCAN	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Volkan KILIÇ	:

Prof. Dr. Murat TANIŞLI

Enstitü Müdürü

ÖZET

AZERBAIJAN'IN FARKLI SÜT ÜRÜNLERİNDEN PROBİYOTİK BAKTERİ İZOLASYONU VE TANIMLANMASI

Kamala MAMMADOVA

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2019

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU

Yaptığımız çalışmada Azerbaycan'ın farklı yörelerine ait geleneksel olarak hazırlanmış 6 adet peynir ve 1 adet kesmik örneğinin mikrobiyolojik özelliklerine bakılmıştır. Örneklerden izole edilen laktik asit bakterileri (LAB) morfolojik ve biyokimyasal testlere tabi tutulmuştur. Çalışmamızda kültür bağımsız yöntemler kapsamında mikrobiyal çeşitliliği belirlemek amacıyla toplam DNA ekstraksiyonu ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) deneyleri yapılmıştır. DNA ekstraksiyonu sonucu oluşan amplifikasyon ürünleri Illumina MiSeq platformu kullanılarak dizilenmiştir. Kültür bağımlı yöntem olarak 16S rRNA PCR ve plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolatların SDS-PAGE yöntemi ile protein profilleri incelenmiştir. Rastgele seçilmiş izolatların antimikrobiyal aktivite yetenekleri agar kuyu difüzyon yöntemiyle belirlenmiş ve en büyük aktivite gösteren 12 izolat seçilerek diğer testlere tabi tutulmuştur. İzolatların probiyotik özelliklerini belirlemek için farklı sıcaklık, farklı pH ve farklı tuz konsantrasyonlarında üreme yeteneği incelenmiştir. İzolatların antibiyotik dirençliliklerini belirlemek amacıyla Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılmış ve sonuç olarak farklı antibiyotiklere karşı farklı dirençlilik gösterdikleri belirlenmiştir. İzolatların biyofilm oluşturma yeteneği Kongo Kırmızılı Agar yöntemi ile belirlenerek, seçilen 12 izolatın tümünde biyofilm oluşturma yeteneği saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: LAB, Mikrobiyal çeşitlilik, FISH, SDS-PAGE, Biyofilm.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF PROBIOTIC BACTERIA FROM DIFFERENT DAİRY PRODUCTS OF AZERBAIJAN

Kamala MAMMADOVA

Department of Biology Programme
Programme in Basic and Industrial Microbiology.

Anadolu University, Graduate School of Sciences, July 2019

Supervisor: Professor Dr. Mehmet Burçin MUTLU

In this study, microbiological properties of 6 traditionally prepared cheese and 1 kesmik sample of different regions of Azerbaijan were examined. The lactic acid bacteria (LAB) isolated from the samples were subjected to morphological and biochemical tests. In our study, total DNA extraction and fluorescence in situ hybridization (FISH) experiments were performed to determine microbial diversity within culture independent methods. The amplification products resulting from DNA extraction were sequenced using the Illumina MiSeq platform. As culture dependent method, 16S rRNA PCR and plasmid DNA were isolated. The protein profiles of the isolates were examined by SDS-PAGE method. Antimicrobial activity capabilities of randomly selected isolates were determined by agar well diffusion method and 12 isolates with the greatest activity were selected and subjected to other tests. To determine the probiotic properties of the isolates, reproductive ability at different temperatures, pH and salt concentrations were investigated. The Kirby-Bauer disk diffusion method was used to determine the antibiotic resistance of the isolates and as a result, they showed different resistance to different antibiotics. Biofilm formation ability of isolates was determined by Congo Red Agar method and biofilm formation ability was determined in all 12 isolates.

Keywords: LAB, Microbial diversity, FISH, SDS-PAGE, Biofilm.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansta yapmış olduğum çalışma sürecinde çalışmalarımı takip edip bana yol gösteren, ilgi ve desteklerini esirgemeyen Sayın Danışmanım Prof. Dr. Mehmet Burçin MUTLU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitim sürecimde bilgi ve yardımlarından dolayı değerli hocalarım Nilgün POYRAZ'a, Erdoğan ÇAKIR'a, Mustafa KARAKAŞ'a, doktora öğrencileri Sevilay YAPICI, Samira EBRAHİMİ'ye ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışmada tüm zorluluğu beraber üstlendiğimiz, her an yanımda olan değerli arkadaşım Nurana MOLLAYEVA'ya teşekkür ederim.

Hayatımın tüm evresinde her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve beni bu yerlere getiren canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimin baştan sona tüm sürecinde hep yanımda olan, her konuda bana destek olan değerli Mustafa Hayri ÜNEŞİ'ye sevgi ve sabrından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kamala MAMMADOVA

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Kamala MAMMADOVA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Süt Ve Süt Ürünleri Hakkında Genel Bilgi.....	2
2.2. Probiyotikler	4
2.2.1. Probiyotiklerin tanımı ve tarihçesi	4
2.2.2. Probiyotiklerde aranan kriterler	5
2.2.3. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	6
2.2.4. Probiyotiklerin sağlık üzerine etkileri ve klinik özellikleri	8
2.2.5. Prebiyotikler	12
2.3. Laktik Asit Bakterileri	13
2.3.1. LAB sınıflandırılması.....	14
2.3.1.1. <i>Lactobacillus</i>	16
2.3.1.2. <i>Lactococcus</i>	17
2.3.1.3. <i>Enterococcus</i>	17
2.3.1.4. <i>Leuconostoc</i>	18

2.3.1.5. <i>Pediococcus</i>	18
2.3.2. Antimikrobiyal maddeler hakkında genel bilgi.....	19
2.3.2.1. <i>Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Antimikrobiyal Maddeler</i>	19
2.3.2.1.1. <i>Organik Asitler (laktik asit ve asetik asit, propiyonik asit)</i>	20
2.3.2.1.2. <i>Hidrojen peroksit</i>	21
2.3.2.1.3. <i>Bakteriyosin</i>	21
2.3.2.1.4. <i>I. Grup bakteriyosinler</i>	22
2.3.2.1.5. <i>II Grup bakteriyosinler</i>	23
2.3.2.1.6. <i>III Grup bakteriyosinler</i>	23
2.3.2.1.7. <i>Grup IV Bakteriyosinler</i>	24
2.3.2.2. <i>Ekstraselüler polisakkarit (EPS)</i>	25
2.3.3. <i>Biyofilmin genel özellikleri</i>	27
2.3.4. <i>Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan yöntemler</i>	29
2.3.4.1. <i>Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)</i>	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1. Materyal	32
3.1.1. Süt ürünleri	32
3.1.2. Besi ortamları.....	32
3.1.2.1. <i>M17 Agar (1.15108 Merck)</i>	32
3.1.2.2. <i>M-17 Broth (1.15029 Merck)</i>	33
3.1.2.3. <i>MRS AGAR (Lactobacillus Agar acc. DE MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS) agar (Oxoid)). (1.10660 Merck)</i>	33
3.1.2.3.1. <i>MRS agar %6,0 tuz ilaveli</i>	34
3.1.2.3.2. <i>MRS agar %7,5 tuz ilaveli</i>	34
3.1.2.3.3. <i>MRS agar %10 tuz ilaveli</i>	34
3.1.2.4. <i>MRS broth (1.10660. Merck)</i>	34
3.1.2.5. <i>Plate Count Agar (PCA) (Merck 1.05463)</i>	35

3.1.2.6. <i>Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck 1.10130)</i>	35
3.1.2.7. <i>Violet Red Bile Agar (VRBA) (Merck 1.01406)</i>	35
3.1.2.8. <i>Kongo kırmızılı agar</i>	36
3.1.2.9. <i>Mueller- hinton broth (Merck 1.10293)</i>	36
3.1.2.10. <i>Mueller-hinton agar (Merck 1.05437)</i>	37
3.1.3. <i>Kullanılan çözeltiler</i>	37
3.1.3.1. <i>Fizyolojik tuzlu su (%0.85 'lik sodyum klorür çözeltisi)</i>	37
3.1.3.2. <i>%20'lik gliserol çözeltisi</i>	37
3.1.3.3. <i>%3' lük H₂O₂ çözeltisi</i>	38
3.1.4. <i>Kullanılan boyalar</i>	38
3.1.4.1. <i>Kristal violet</i>	38
3.1.4.2. <i>Safranin</i>	38
3.1.4.3. <i>Lugol</i>	38
3.1.5. <i>Kullanılan kimyasallar</i>	39
3.1.6. <i>Kullanılan antibiyotikler</i>	40
3.1.7. <i>Kullanılan test bakterileri</i>	40
3.1.8. <i>Toplam nükleik asit ekstraksiyonu için ekstraksiyon tamponu</i> ..	40
3.1.9. <i>SDS -PAGE için gerekli malzemeler</i>	40
3.1.10. <i>FISH tamponları</i>	43
3.2. <i>Yöntem</i>	43
3.2.1. <i>Örneklerin toplanması ve muhafıza edilmesi</i>	43
3.2.2. <i>Homojenize işlemi</i>	45
3.2.3. <i>Dilüsyon hazırlama (seyreltme işlemi)</i>	45
3.2.4. <i>Ekim</i>	46
3.2.5. <i>Bakteri sayımı</i>	47
3.2.5.1. <i>Klasik sayım yöntemi</i>	47
3.2.5.1.1. <i>Toplam Mezofilik Aerobik Bakteri Sayımı</i>	48

3.2.5.1.2. <i>Koliform Grubu Bakteri Sayımı</i>	48
3.2.5.1.3. <i>Maya – Küf Sayımı</i>	48
3.2.5.1.4. <i>LAB Sayımı</i>	48
3.2.5.2. <i>Tempo Sayım Yöntemi</i>	48
3.2.6. <i>İzolasyon</i>	50
3.2.7. <i>İzolatların tanımlanması (Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi)</i>	51
3.2.7.1. <i>Gram boyama</i>	51
3.2.7.2. <i>Katalaz testi</i>	52
3.2.7.3. <i>Antimikrobiyal etkinin belirlenmesi</i>	52
3.2.7.4. <i>Farklı sıcaklıklarda gelişim</i>	53
3.2.7.5. <i>Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim</i>	53
3.2.7.6. <i>pH; 3,9 gelişim</i>	53
3.2.7.7. <i>pH; 9,6'da gelişim</i>	54
3.2.8. <i>Biyofilm oluşumu</i>	54
3.2.9. <i>PCR</i>	54
3.2.9.1. <i>Agaroz jel elektroforez</i>	55
3.2.10. <i>Toplam nükleik asit ekstraksiyonu</i>	56
3.2.10.1. <i>Agaroz jel elektroforezi</i>	57
3.2.10.2. <i>Illumina MiSeq platformu ile 16S rDNA gen-hedefli DNA dizileme ve komünite analizi</i>	57
3.2.11. <i>SDS-PAGE yöntemi</i>	58
3.2.12. <i>Seçilen İzolatlardan plazmit izolasyonu</i>	59
3.2.13. <i>Antibiyotik direnci</i>	60
3.2.14. <i>FISH yöntemi</i>	61
4. BULGULAR	63
4.1. <i>Süt ve Süt Ürünlerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Sayım Sonuçları</i>	63

4.2. Süt ve Süt Ürünlerinden İzole edilen Laktik Asit Bakterilerinin Morfolojik, ve Biyokimyasal özellikleri.....	67
4.3. Antimikrobiyal Etki Sonuçları.....	71
4.4. Süt ve Süt Ürünlerinden İzole edilen Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özellikleri (Fizyolojik özellikleri)	73
4.5. Biyofilm Sonucu.....	77
4.6. PCR Sonuçları	78
4.7. Örneklerden Yapılan Toplam Nükleik Asit Ekstraksiyonu Sonucu ..	78
4.7.1. Illumina platformu ile 16S rDNA gen-hedefli MiSeq dizileme	78
4.8. İzolatların Toplam Protein Profillerinin SDS-PAGE Yöntemiyle Belirlenmesi.....	82
4.9. İzolatlardan Plazmid DNA İzolasyonu	83
4.10. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları	84
4.11. FISH Yöntemi ve DAPI Boyama Sonuçları	86
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	90
KAYNAKÇA.....	100
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Bazı geleneksel fermente ürünlerinde bulunan laktik asit bakterileri.....	4
Tablo 2.2. Probiyotik bakteri kriterleri	6
Tablo 2.3. Probiyotik mikroorganizmalar	7
Tablo 2.4. Probiyotiklerin etki mekanizmaları	10
Tablo 2.5. Bazı Probiyotik suşlarının klinik etkileri	11
Tablo 2.6. Prebiyotiklerin konukçu için yararlı etkinlikleri.....	13
Tablo 2.7. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması	24
Tablo 2.8. EPS üreten LAB.....	26
Tablo 3.1. Örneklerin özellikleri	32
Tablo 3.2. M17 Agar içeriği.....	32
Tablo 3.3. M-17 Broth içeriği	33
Tablo 3.4. MRS Agar içeriği.....	33
Tablo 3.5. MRS broth içeriği	34
Tablo 3.6. Plate Count Agar içeriği	35
Tablo 3.7. Potato Dextrose Agar içeriği.....	35
Tablo 3.8. Violet Red Bile Agar içeriği	36
Tablo 3.9. Kongo kırmızılı agar içeriği.....	36
Tablo 3.10. MH Broth içeriği.....	36
Tablo 3.11. MH Agar içeriği.....	37
Tablo 3.12. Fizyolojik tuzlu su içeriği	37
Tablo 3.13. %20'lik gliserol çözeltisi	37
Tablo 3.14. Kristal violet içeriği	38
Tablo 3.15. Safranin.....	38
Tablo 3.16. Lugol içeriği.....	39
Tablo 3.17. Kullanılan kimyasallar ve markaları	39
Tablo 3.18. Kullanılan antibiyotikler ve markaları	40
Tablo 3.19. Toplam Nükleik Asit Ekstraksiyonu İçin Ekstraksiyon Tampon içeriği	40
Tablo 3.20. Kullanılan jeller ve içerikleri	40
Tablo 3.21. Yükleme jeli.....	41
Tablo 3.22. Jel Tamponları	41

Tablo 3.23. %10 SDS (sodyum dodesil sülfat) Solüsyonu	41
Tablo 3.24. %10 Amonyum persülfat Solusyonu (APS)	42
Tablo 3.25. Boyama solüsyonu (%0.025 coomassie blue R-250, %40 metanol)	42
Tablo 3.26. 10x SDS Running Buffer (Yürütme tamponu)	42
Tablo 3.27. 4x Loading sample buffer (10 ml)	42
Tablo 3.28. FISH Hibridizasyon Tamponu.....	43
Tablo 3.29. FISH yıkama Tamponu.....	43
Tablo 3.30. Klasik sayım yöntemi	47
Tablo 3.31. Tempo Sayım Yöntemi.....	50
Tablo 4.1. İzolatların Klasik (geleneksel) sayım sonuçları.....	63
Tablo 4.2. Tempo (BioMeriux) sayım sonuçları.....	65
Tablo 4.3. Qarabağ P. Örneğinden elde edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları.....	67
Tablo 4.4. Gedebeş a/b Örneklerinden elde edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları.	67
Tablo 4.5. Naxçıvan P. Örneğinden elde edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları	68
Tablo 4.6. Ordubad P. Örneğinden elde edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları	69
Tablo 4.7. İvanovka P. Örneğinden elde edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları	70
Tablo 4.8. İvanovka K. Örneğinden elde edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları	70
Tablo 4.9. Antimikrobiyal etki sonuçları	72
Tablo 4.10. Seçilen izolatların farklı sıcaklıklarda gelişim sonuçları.....	73
Tablo 4.11. İllumina platformu ile elde edilen veriler ve değerler.	79
Tablo 4.12. Seçilen izolatların antibiyotik duyarlılık testi.....	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. Azerbaycan Haritası ve Örneklerin alındığı lokasyonlar	44
Şekil 3.2. Süt ürünleri (peynir ve kaymak).....	44
Şekil 3.3. Stomacher cihazı	45
Şekil 3.4. Örneklerden hazırlanan 10^{-1} dilüsyonu	46
Şekil 3.5. Ekim hazırlıkları ve ekim işlemi	46
Şekil 3.6. Çizgi Ekim.....	47
Şekil 3.7. Tempo kartuşları.....	49
Şekil 3.8. Besiyerlerinin kartuşlara doldurulma işlemi	49
Şekil 3.9. İzolat stokları	51
Şekil 3.10. Saf kültürler	51
Şekil 3.11. Boyama için hazır preparatlar	52
Şekil 3.12. Gram boyama yöntemi ile boyanmış preparatlar	52
Şekil 3.13. Applied Biosystem Thermal Cycler cihazı	55
Şekil 3.14. Agaroz jel elektroforezi.....	56
Şekil 3.15. SDS- PAGE.....	59
Şekil 3.16. Ticari olarak elde edilen antibiyotik diskleri.....	61
Şekil 4.1. Örneklerden elde edilen izolatlar	67
Şekil 4.2. Mikroskopta görüntülenen hücre morfolojileri	68
Şekil 4.3. Antimikrobiyal etki sonucu	72
Şekil 4.4. 5 °C, 15 °C, 30 °C ve 45 °C sıcaklıklarda üreme sonuçları.....	74
Şekil 4.5. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme	74
Şekil 4.6. %6 NaCl içeren besiyerinde üreme sonucu.....	75
Şekil 4.7. %7,5 NaCl içeren besiyerinde üreme sonucu.....	75
Şekil 4.8. %10 NaCl içeren besiyerinde üreme sonucu.....	76
Şekil 4.9. pH 3.9 ve pH 9.6'da üreme sonucu	76
Şekil 4.10. Kongo kırmızısı içeren MRSA'da biyofilm sonucu.....	77
Şekil 4.11. Kongo kırmızısı içeren MRSA'da biyofilm sonucu.....	77
Şekil 4.12. Toplam nükleik asit ekstraksiyon jel görüntüsü	78
Şekil 4.13. Örneklerden elde edilen okuma sayıları	79
Şekil 4.14. Rarefaction (seyrelme) grafiği.....	80

Şekil 4.15. Genus düzeyinde taksonomik kompozisyon	81
Şekil 4.16. Familya düzeyinde taksonomik kompozisyon	81
Şekil 4.17. Laktik asit bakterilerine özgü okumalar ve cins düzeyinde dağılım	82
Şekil 4.18. SDS PAGE jel görüntüleri	82
Şekil 4.19. Plazmid DNA	83
Şekil 4.20. Plazmid DNA jel görüntüsü	84
Şekil 4.21. Antibiyotik direnç sonuçları	85
Şekil 4.22. Antibiyotik direnç sonucu	86
Şekil 4.23. Antibiyotik direnç sonucu	86
Şekil 4.24. Gedebe _a Peynirine ait DAPI boyama.....	87
Şekil 4.25. Kesmik örneğine ait DAPI boyama.....	87
Şekil 4.26. Motal Peynirine ait DAPI boyama	88
Şekil 4.27. Naxçıvan peynirine ait DAPI boyama.....	88
Şekil 4.28. İvanovka Peynirine ait DAPI boyama.....	89

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

LAB	: Laktik asit bakterisi
16S rRNA	: 16S ribosomal Ribo Nükleik Asit
PCR	: Polymerase chain reaction
AC	: Aerobic Count
APS	: Amonyum Persülfat
CC	: Coliform Count
cfu/ml	: colony forming unit/milliliter
CO ₂	: Karbondioksit
CTAB	: Cetil Trimetil Ammonyum Bromid
DAPI	: 4', 6'-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorur
EB	: Enterobacteriaceae
EC	: Escherichia coli
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
FISH	: Floresan In Situ Hibridizasyon
g	: Gram
g/L	: gram/litre
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
Kb	: kilo base pairs (1.000bp)
kDa	: Kilodalton
LAB	: Lactic Acid Bacteria
Mb (Mbp)	: mega base pairs (1.000.000 bp)
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MRSA	: Lactobacillus Agar acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE
NaAc	: Sodyum Asetat
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PCA	: Plate Count Agar
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDA	: Potato Dextrose Agar

SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Gel Elektroforezi
STA	: Staphylococcus aureus
TAE	: Tris-Asetik asit-EDTA
TC	: Total Coliforms
TMAB	: Toplam Mezofilik Aerob Mikroorganizma
VRBA	: Violet Red Bile Agar
YM	: Yeast and Moulds
µL	: Mikrolitre
FDA	: Food and Drug Administration
GRAS:	: Generally Recognized as Safe

1. GİRİŞ

Yüzyıllardır insana yararlı etkilerinin olduğuna inanılan Laktik Asit bakterileri, fermente gıdalarda kullanılmasından dolayı gıda endüstrisinde, tedavi edici özellikleriyle probiyotik olarak tercih edilmesinden dolayı sağlık sektöründe sıkça kullanılmaktadır. Fermente süt ürünleri, insanlık tarafından kullanılan en eski biyoteknoloji uygulama biçimlerinden birini temsil etmektedir.

Laktik asit bakterileri (LAB), karbonhidrat fermentasyonunun, son ürünü olarak ya da majör son ürün olarak laktik asit üreten, gram-pozitif, spor oluşturmayan, solunum yapmayan kok veya çubuk şekilli, morfolojik, metabolik ve fizyolojik benzerlik gösteren, ayrıca filogenetik olarak da yakından ilişkili olan bir grup bakteriden oluşmaktadır (Toy, 2018). Bu bakteriler, özellikle peynir ve yoğurt olmak üzere birçok fermente gıdaların üretimine dahil edilmektedir (Ackermann, 2012) Laktik asit bakterileri (LAB) organik asit, asetoin, diasetil, hidrojen peroksit, reuterin, antifungal peptitler ve bakteriyosinler gibi çok çeşitli antimikrobiyal bileşikleri üretebilme yeteneğine sahip olduğu için özellikle son 15 yıldır gıda koruyucusu olarak kullanım açısından ilgileri üzerine çekmiştir (Dinçer ve ark., 2009) Gıda ürünlerinde yoğun olarak kullanılan LAB, FDA (Food and Drug Administration) tarafından GRAS (Generally Recognized as Safe, genellikle güvenli olarak tanımlanan) statüsünde yer almaktadır (Turhan ve Enginkaya, 2016).

Probiyotikler genellikle fermente süt ürünleri veya gıda takviyeleri gibi gıda maddelerinin bileşenleri olup, yeterli miktarda alındıklarında, konakçının sağlığı üzerine olumlu etkileri bulunan, patojen olmayan canlı mikroorganizmalardır (Altuntaş ve ark., 2017). Probiyotik mikroorganizmaların en önemli grubunu laktik asit bakterileri oluşturmaktadır.

Günümüzde probiyotik içeren gıdaların üretimi ve tüketimi git gide artmaktadır. Bu sebepten dolayı özellikle son yıllarda probiyotik çalışmalara olan ilgi dikkatleri üzerine çekmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada Azerbaycan'ın yöresel süt ürünlerinden Laktik Asit Bakterilerinin izolasyonu, tanımlanması ve probiyotik özelliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Süt Ve Süt Ürünleri Hakkında Genel Bilgi

Hayvansal gıdalar içerisinde insan sağlığını önemli yönde etkileyen besinler arasında süt ve süt ürünleri de yer almaktadır (Kurtoğlu, 2018).

Süt: Bir veya daha fazla inek, keçi, koyun veya mandanın sağılmasıyla elde edilen, kolostrum dışındaki meme bezi salgısıdır (Tebliğ No: 2000/ 6). Fizikokimyasal açıdan süt, bir lipit globülleri emülsiyonu ve özellikle laktoz içeren bir karbonhidrat çözeltisi içindeki kolloidal bir protein ve mineral agrega süspansiyonudur (Altomonte ve ark., 2018). Süt ve süt ürünleri, bir b-galaktosid bağı ile bağlı galaktoz ve glukozdan yapılan disakarit laktoz içerir (Zingone ve ark., 2017). Süt zengin bir besin kaynağıdır ve vücuttaki fizyolojik süreçleri artıran birçok biyoaktif bileşen içerir (Khan ve ark., 2019). Sütün enerji içeriğini yağlar, karbonhidratlar ve proteinler oluşturmaktadır. 100 ml sütte 65 kal, 3,8 g yağ, 4,7 g karbonhidrat ve 3,3 g protein bulunmaktadır (Şahinöz ve Özdemir, 2017).

Süt, özellikle mikrobiyal bozulmaya karşı hassas, çok kolay bozulabilir bir maddedir. 19. yüzyılın sonunda sütün korunmasını ve güvenliğini arttırmayı amaçlayan ısıtma işlemlerin geliştirilmesinden önce, süt fermentasyonu gibi geleneksel işlemler sütün bozulmasını önlemek için kullanılmıştır. Günümüzde süt, çeşitli modern işleme teknolojilerini kullanarak çok çeşitli süt ürünlerine dönüştürülmektedir. Fermente sütler, özellikle yoğurt, peynir gibi süt ürünleri ilgili beslenme ve sağlık yararları nedeniyle, büyük ölçüde artan tüketim seviyesine sahiptir (Brisson ve Singh, 2013).

Yalnız süttten üretilen ve içeriğinde izin verilen katkı ve aroma maddeleri ile üretimde gerekli diğer bileşenleri içeren ürünler süt ürünleri olarak adlandırılmaktadır (Tebliğ No: 2000/ 6). Yoğurt, peynir, tereyağı, kefir ve süt tozu gibi süttten yapılan besinler süt ve süt ürünleri grubunda yer almaktadır. Bu besinler, kalsiyum, fosfor, protein, B2 vitamini ve B12 vitamini olmak üzere birçok besin öğesinin önemli kaynağıdır (Kart ve Demircan, 2014).

Yoğurt, fermentasyon sırasında *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* (*S. thermophilus*) ve *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*'un (*L. bulgaricus*) özel olarak simbiyotik kültürlerinin aşılmasıyla üretilen fermente bir süt ürünü olarak bilinmektedir (Bostan ve ark., 2017). Hem aroması hem de kendine özgü lezzeti için dünyanın birçok ülkesinde yaygın olarak tüketilmektedir.

Peynir; sütün, peynir mayası (rennin enzimi) veya organik asitlerle pıhtılaştırılarak, peyniraltı suyunun ayrılmasından sonra pıhtının kesilmesi ve tuzlanması ile elde edilen fermente süt ürünüdür (Kanak ve ark.,2018).

Peynir bileşiminde vücudumuz tarafından sentezlenemeyen ve dışarıdan alınması gereken esansiyel aminoasitler yer almaktadır. Peynir, kalsiyum ve fosfor içeriği yönünden de önemli bir gıdadır, aynı zamanda %10-30 oranında protein içermektedir. Ayrıca, yağ oranına bağlı olarak değişen miktarlarda yağda çözünen vitaminler (A, D, E, K) ve suda çözünen vitaminler (B2, B6, B12) için kaynak sayılabilecek bir süt ürünüdür (Kaynar, 2011).

Çeşitli fermente gıda ürünleri arasında, süt ürünleri uygun, stabil ve besleyici sağlık gıdaları olarak popülerdir. Laktik Asit Bakterileri, süt fermantasyonlarında kullanılan en yaygın başlangıç kültürleridir. Bununla birlikte, birkaç süt bazlı üründe, ikincil veya yardımcı kültürler olarak adlandırılan ek bakteriler, ürün lezzetini ve dokusunu etkilemek için sıklıkla kullanılır.

Peynir üretiminde kullanılan en yaygın başlangıç kültürleri *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, *Lc. lactis subsp. Cremoris*, *S. thermophilus*, *L. helveticus* ve *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*'tur (Amalaradjou ve ark., 2017).

Peynir teknolojisi açısından laktik asit bakterilerinin teknolojik öneme sahip mikroorganizmalar olarak tanımlanmasında; bu mikroorganizmaların aroma geliştirme yeteneğinin olması, bakteriyosin ve ekzopolisakkarit oluşturabilmeleri, bakteriyofajlara olan dirençlilikleri, laktoz ve sitrat metabolizmaları, antibiyotik ve ağır metallere dirençleri dikkate alınmaktadır (Ertürkmen ve Öner, 2015).

Tablo 2.1'de bazı fermente süt ürünlerinde bulunan laktik asit bakterileri gösterilmiştir:

Tablo 2.1. Bazı geleneksel fermente ürünlerinde bulunan laktik asit bakterileri (Evren ve ark., 2011).

Bazı geleneksel fermente ürünlerinde bulunan laktik asit bakterileri	
Ürün	Laktik Asit Bakteri Adları
Peynir	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>S.cremoris</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> ve <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pe. pentosaceus</i> , <i>Leuconostoc dextranicum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Yoğurt	<i>Streptococcus thermophilus</i> ve <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>Lactis</i>
Tereyağ	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Streptococcus</i> sp., <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i>), <i>Leuconostoc gelidum</i> (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>), <i>Weissella paramesenteroides</i> (<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>)
Kefir	<i>L. bulgaricus</i> , <i>Streptococcus lactis</i> , <i>S. durans</i> , <i>L. cellobiosis</i> , <i>S. avium</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus kefirianofaciens</i> , <i>Lactobacillus kefirgranum</i> , <i>Lactobacillus parakefir</i> , <i>L.brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L.rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. hilgardi</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. viridescens</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Leuconostoc mesenteroides</i>

2.2. Probiyotikler

2.2.1. Probiyotiklerin tanımı ve tarihçesi

Probiyotikler; insanların veya hayvanların doğal mikroflorasına ait özellikleri geliştiren, tüketilmeleri sonucunda ağızda, gastrointestinal sistemde, üst solunum yollarında ya da ürogenital kanallarda yararlı etkileri ile konakçının sağlığını iyi yönde etkileyen tek veya karışık canlı mikroorganizma kültürleri olarak bilinmektedir (Kıvanç, 2018).

Probiyotik terimi, son yıllarda gıdalarda kullanımı ve tüketimi ile sık-sık karşımıza çıkan bir kavramdır. Geçen yüzyılın başında mikroorganizmaların sağlık üzerindeki etkilerini gösteren çalışmaların, “Probiyotik” kavramının geliştirilmesinin temeli olduğuna inanılmaktadır. Bağırsak mikrobiyotası ve geleneksel olarak fermente edilmiş gıdalarda veya doğal kaynaklarda bulunan mikroorganizmalar da dahil olmak üzere, bu canlıların sağlık yararları üzerine birçok araştırma yapılmıştır (Xiao ve ark.,2014).

İnsan sindirim sistemi, kanal içindeki yere göre değişiklik gösteren birçok mikrobiyal çeşitliliğe sahip zengin bir ekosistem barındırır (Giraffa, 2014). Dört yüzden fazla bakteri türü, insanın bağırsak kanalında bulunur ve bu da onu çok çeşitli bir ekosistem yapar (Hussein, 2017). İnsan bağırsağında çok sayıda mikroorganizma

bulunmasına rağmen, sadece birkaç mikroorganizma türü probiyotik özelliklere sahiptir (Fernando ve Flint, 2012).

Probiyotik terimini ilk kez Alman bakteriyolog ve besin bilimcisi olan Werner Georg Kollath kullanmıştır. Sağlıklı yaşam için mutlaka gerekli olan maddeler için önerdiği “Probiotika” terimi, Yunanca " yaşam için " anlamına gelen iki kelimeden türemiştir (Yurdakök, 2013). 1965 yılında Lilley ve Stillwell probiyotiki " başka bir mikroorganizmanın büyümesini uyaran mikrobiyel bir madde " olarak tanımladı (Xiao ve ark.,2014). Robert B. Parker 1974’de probiyotikler için “bağırsak mikrobiyal dengesini sağlayan maddeler” şeklinde bir tanımlama getirdi (Yurdakök, 2013). 1989’da Fuller, probiyotikleri “Bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek sağlığı olumlu yönde etkileyen canlı bir mikrobiyel besin takviyesi” olarak yeniden tanımladı ve bu uzun zaman en yaygın kullanılan probiyotik tanımı olmuştur (Xiao ve ark.,2014). 1992’de Robert Havenaar ve Jos H. Huis in’t Velt probiyotikleri “bağırsak mikroflorasının özelliklerini düzelten tekli veya çoklu canlı mikroorganizmalar” olarak tanımladı (Yurdakök, 2013).

Gıda ve Tarım Örgütü ve WHO, probiyotikleri “yeterli miktarda uygulandığında, konağa sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlamaktadır (Tomaro-Duchesneau, 2014).

Probiyotikler günümüzde; temel beslenmenin yanında yeterli miktarda alındığı zaman, insan sağlığını olumlu yönde etkileyen yaşayan mikroorganizmalar olarak kabul edilmektedir (Alp, 2017).

2.2.2. Probiyotiklerde aranan kriterler

Probiyotik mikroorganizmalarda aranan önemli kriterlerden biri insan kaynaklı olmasıdır, yani suşlar ya bağırsak duvarından ya da bağırsak içeriklerinden izole edilmelidir. Zira insan gastrointestinal sistemi genellikle nötr ve anaerobik bir ortam olduğu için, kommensal bakteri izolatları, bitki materyali kaynaklarından veya hayvan gastrointestinal yolundan alınanlara kıyasla düşük pH’ya sahiptir ve oksijene nispeten daha duyarlı olma eğilimindedir. Bu özellikler, aynı zamanda fermente sütte hayatta kalma oranının yüksek tutulması gibi endüstriyel uygulama için bazı teknik özellikleri kapsayabilir (Xiao ve ark.,2014).

Taksonomik olarak tanımlanmış bir mikroorganizma veya mikroorganizmaların kombinasyonu olmalıdır. Çünkü probiyotik etkilerin suşa özgü olduğu bilinmektedir.

Gıda ile alınan probiyotiklerin bağırsak sistemine canlı olarak ulaşması önemli özelliklerden biridir, yani gastrointestinal kanalda canlılığını koruyabilmelidir. Ayrıca

gıda maddesi en az 10^6 koloni/g ve daha fazla sayıda canlı probiyotik bakteri içermeli ve içinde bulundukları gıdanın üretimi ve raf ömrü süresince canlı kalabilmelidir (Sezen, 2013). Probiyotik olarak kabul olunan mikroorganizma kullanım amacı için güvenli olmalı ve hedef konağın üzerinde sağlık yararları geçmişine sahip olmalıdır. Probiyotik ürün üretiminde kullanılan suşun teknolojik özelliklerinin uygun olması gerekmektedir (Alp, 2018).

İnsan sağlığı göz önünde bulundurulduğunda probiyotik mikroorganizmanın toksik olmaması ve transfer edilebilir antibiyotik direnç genleri içermemesi oldukça önemli kriterlerdendir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2016).

Probiyotikler bağırsağın epitel dokusuna uyumlu, konakçının bağırsak epiteline yapışmak yeteneğine sahip olmalıdır (Fernando ve Flint, 2012).

Yukarıda saydığımız özellikler dışında Probiyotik suşda aranan temel gereksinimler arasında “aside ve safraya toleranslı olmak, patojen olmamak ve patojenik bakterilere karşı antagonistik bir aktivite göstermek” gibi kriterler de yer almaktadır (Musikasang ve ark.,2009).

Tablo 2.2. Probiyotik bakteri kriterleri

Probiyotik bakterilerde aranan kriterler	
1	İnsan kaynaklı olmalı
2	Asidik koşullara ve safra tuzlarına karşı dayanıklı olmalı
3	İnsan sindirim sistemi epitelyum yüzeyine yapışma özelliği iyi olmalı
4	Sindirim sisteminde kolonize olabilmeli
5	Patojen olmamalı
6	Patojen bakterilere karşı antagonist etki göstermeli
7	Antimikrobiyal maddeler üretebilmeli
8	Bağışıklık sistemini iyileştirmeli
9	Hızlı metabolize olmalı ve hızlı gelişebilmeli
10	İşleme ve depolama sırasında canlılıklarını koruyabilmek
11	Gıdalarda güvenli kullanılabilmeli

2.2.3. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Sağlık üzerine yararlı etkileri bilinen çeşitli probiyotik suş içeren ticari probiyotik ürünler mevcuttur. Probiyotik mikroorganizmalar arasında daha yaygın olanı

bakterilerdir, aynı zamanda mayalar ve filamentli mantarlardır (Tomaro-Duchesneau, 2014).

Günümüzde çoğunlukla kullanılan probiyotik bakteri *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türüne ait olup bunların dışında *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli* ve *Saccharomyces* türleri gibi mikroorganizmalar probiyotiklerin bazı özelliklerine sahiptir. Tablo 2.3 'de farklı türlere ait olan probiyotik suşlar gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Probiyotik mikroorganizmalar (Kavas, 2007).

Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar	
<i>Lactobacillus Spp.</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus cellebiosus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus reuterin</i> <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus johsonli</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Bifidobacterium Spp.</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium thermophilum</i>
<i>Bacillus Spp.</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus lentus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Bacillus cereus</i>
<i>Pediococcus Spp.</i>	<i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Streptococcus Spp.</i>	<i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Streptococcus intermedius</i> , <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>Bacteriodes Spp.</i>	<i>Bacteriodes capillus</i> , <i>Bacteriodes suis</i> <i>Bacteriodes ruminicola</i> , <i>Bacteriodes amylophilus</i>
<i>Propionibacterium Spp.</i>	<i>Propionibacterium shermanii</i> <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Leuconostoc Spp.</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

Tablo 2.3. (Devamı) *Probiyotik mikroorganizmalar* (Kavas, 2007).

Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar	
Küfler	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>
Mayalar	<i>Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces boulardii, Candida torulopsis</i>

2.2.4. Probiyotiklerin sağlık üzerine etkileri ve klinik özellikleri

Günümüzde, sağlığın korunmasında ve geliştirilmesinde probiyotiklerin kullanımı çok dikkat çekmektedir. Probiyotiklerin insan sağlığı üzerindeki etkileri, in vitro, in vivo veya klinik çalışmalardan elde edilebilir (Xiao ve ark.,2014). Probiyotikler, sağlıklı gastrointestinal fonksiyon ve konakçı beslenmesinde yararlı etki için esastır. Bağırsak florasının etkisi, patojenlere karşı korunma ve bağışıklık sisteminin geliştirilmesi de dahil, hayati faydalar sağlar. Probiyotikler ayrıca çevre dostu bir tedavi yöntemi olarak kabul edilir (Muthukumar ve Kandeepan, 2015).

Probiyotikler, alerji, kardiyovasküler hastalıklar, enflamatuvar barsak hastalığı, irritabl barsak sendromu, metabolik sendrom ve periodontit gibi oral hastalıklar bir dizi sağlık bozukluğunda araştırılmıştır. Probiyotik bakterilerin bağırsak mikrobiyotasını değiştirebileceği çeşitli mekanizmalar mevcuttur. Bu mekanizma, hidrojen peroksit, organik asitler ve bakteriyosinler gibi patojen inhibe edici maddelerin üretilmesini içerir. Probiyotik bakterilerin aynı zamanda bağırsak epitel hücrelerinde patojen yapışma bölgelerini bloke ettiği gösterilmiştir. Ayrıca probiyotik bakterilerin, özellikle Gram pozitif / Gram negatif oranının artmasıyla bağırsak mikrobiyotasını değiştirdiği de kanıtlanmıştır. Araştırmalar, bu orandaki bir azalmanın, sistemik enflamasyona katkıda bulunan yağlanma, hepatik trigliserit birikimi, karaciğer yağlanması, diyabet ve artan lipopolisakkarit seviyelerine (Gram-negatif bakterilerden kaynaklanan) bağlı olduğunu göstermiştir (Tomaro-Duchesneau, 2014).

Probiyotik bakterilerin diş çürüğü üzerinde de etkisi olduğu görülmüştür. Probiyotiklerin diş çürüğü üzerinde faydalı bir etkiye sahip olabilmesi için, diş yüzeylerine yapışabilmeli ve biyofilm oluşturan bakteriyel topluluklara entegre olabilmelidir. Aynı zamanda karyojenik bakterilere antagonistik etki göstererek çoğalmasını önlemelidir (Kıvanç, 2018).

Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığına katkıda bulunduğu diğer önemli etkiler arasında laktoz intoleransı ve kabızlık semptomlarının hafifletilmesi, çeşitli tip

diyarelerin önlenmesi ve tedavisi, immün sistemin uyarılması gibi etkiler yer almaktadır (Sezen, 2013). Probiyotik bakterilerin fizyolojik etkileri üzerinde yapılan birkaç araştırmalar diyare, laktoz intoleransı ve kolon kanserini önleyici etki için gerekli dozun 10^9 - 10^{10} ($9 - 10 \log_{10}$) kob/gün olduğunu göstermiştir (Kuş, 2010).

Kolon mikroflorası içindeki probiyotik mikroorganizmalar, kanserojen maddeleri kansere dönüştürebilen bağırsak bakteriyel enzimlerini inhibe ederek anti-kanserojen etkiye aracılık edebilir. Probiyotikler bu aktiviteyi aşağıda yazılan üç mekanizmadan biri ile etkilenebileceği öne sürülmüştür:

- Prokarsinojenleri yok ederek,
- Prokarsinojenik bir enzimin aktivitesini modüle ederek,
- Tümör baskılanması ile

Deneyssel ve epidemiyolojik çalışmalar, sütün mayalanmasında rutin olarak kullanılan bakteri kültürlerinin, bazı tümörlerin ve tümör hücrelerinin büyümesini önleyerek bazı kanser türlerinin riskini azaltabileceğine dair bazı kanıtlar sağlar (Okuklu, 2014).

Yukarıda belirtildiği gibi probiyotiklerin diyare vakalarında, başarılı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, *Laktobasil*'lerin ürettiği β -galaktosidaz enziminin, bu enzimin edinim eksikliği olan kişilerde diyarenin önlenmesinde yararlı olabileceği de öne sürülmüştür (Samanje, 2018).

Probiyotiklerin uygulanması, sağlıklı ve hastalıklı bireylerde spesifik ve spesifik olmayan bir dizi konakçı immün yanıtın oluşmasına yol açmaktadır. Buna örnek olarak periferik kan lökositleri ve natural killer hücre aktivitesi ve fagositik etkinliğinin artmasını gösterebiliriz. Aynı zamanda non-spesifik salgısal IgA ve spesifik antikor tepkilerinin özellikle mukozal IgA'nın uyarıldığı gözlemlenmiştir (Alp, 2017).

Probiyotiklerin özellikle *Lactobacillus salivarius*'un, kronik gastrit, peptik ülser ve mide kanserine yol açan *Helicobacter pylori*'nin aktivitesini ve kolonizasyonunu engelleme yetenekleri araştırılmıştır. İnsan ve hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalar sonucu probiyotiklerin veya probiyotik son ürünlerinin *H. pylori* enfeksiyonlarını durdurabileceğini göstermiştir (Oral, 2015).

Birçok araştırmacı, probiyotiklerin kolesterol düşürücü etkilere sahip olduğunu öne sürmüştür. Bu etkinin mekanizması kesin olarak açıklanamamıştır. Mekanizmayı açıklamaya çalışan iki hipotez vardır. Bunlardan biri, bakterilerin doğrudan kolesterolü hücre zarına bağlayabilmesi veya içerebilmesidir. Diğeri, safra tuzu hidroliz enzimleri,

kolesterolün parçalanmasıyla sonuçlanan safra tuzlarının dekonjütasyonunu sağlar (Yavuzdurmaz, 2007).

Probiyotiklerin bağışıklık sisteminin dengesini ve Sitokin sentezini düzenlenleyerek iltihabi veya alerjik reaksiyonların azaltılmasında da önemli rol oynadıkları bilinmektedir (Tok ve Aslım, 2007).

Probiyotiklerin etki mekanizmalarının üç şekilde olduğu düşünülmektedir:

- Antimikrobiyel bileşikler üreterek, besin elementleri ve kolonizasyon bölgeleri için rekabet ederek patojen ve zararlı bakterilerin sayılarını azaltmak,
- Sindirim sistemini teşvik eden enzimlerin üretimi, amonyak, aminveya toksik enzimlerin üretiminin azaltılması ve bağırsak duvarının fonksiyonlarının iyileştirilmesi ile mikrobiyel metabolizmayı (enzimatik aktiviteyi) değiştirmek,
- Antikor düzeyinin ve makrofaj aktivitesinin artırılması ile bağışıklık sistemini iyileştirmek (Gülgör ve Özçelik, 2014).

Tablo 2.4. Probiyotiklerin etki mekanizmaları (Kesepara, 2018).

Probiyotiklerin etki mekanizması	
Kanser Önleyici Etki	Mutajenlerin bağlanması/inhibisyonu Prokarsinojenlerin aktif karsinojenlere dönüşümünün inhibisyonu Prokarsinojeni bakterilerin gelişiminin baskılanması Karsinojenlerin emiliminin azaltılması İmmün fonksiyonların artırılması Safra tuzu konsantrasyonu üzerine etki
İmmün Sistemin Düzenlenmesi	Beyaz kan hücrelerinin fagositik aktivitelerinin artırılması Enfeksiyon ve tümör oluşumuna karşı spesifik olmayan savunma mekanizmasının güçlenmesi Antijene spesifik immün yanıtı yardım Ig A üretiminin artırılması
Laktoz Sindirime Katkı	Bakteriyel β -galaktosidaz ile laktozun sindirimi
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>H. pylori</i> inhibitörlerinin üretimi (laktik asit, bakteriyosinler gibi)
Enfeksiyonun Tedavisi/Korunması	<i>H. pylori</i> üreaz aktivitesinin azaltılması
Kalp hastalıklarının önlenmesi ve kan kolestrol seviyesine etki	Bakteriyel hücreler aracılığıyla kolesterolün asimilasyonu Bakteriyel asit hidrolazları ile safra tuzlarının dekonjugasyonu Bakteri duvarına kolestrol bağlanması Hepatik kolesterol sentezinin azaltılması ve/veya kolesterolün bakteriyel kısa zincirli yağ asitleri üretimi ile plazmadan karaciğere taşınması

Tablo 2.4. (Devamı) Probiyotiklerin etki mekanizmaları (Kesepera, 2018).

Probiyotiklerin etki mekanizması	
Alerji	Antijenik maddelerin dolaşım sistemine geçişinin önlenmesi
Enterik patojenlere karşı direnç	Bağırsak flora popülasyonları üzerine etki
	Bağırsak mukozasında agregasyon ile diğer patojenlerin bağlanmasının önlenmesi
	Bağırsak ortamının patojenlere uygun olmayan koşullara değişimi (bakteriyosin, pH, kısa zincirli yağ asitleri)
	Bağırsak münasip üretimine etki ile patojenlerin tutunmasının engellenmesi

Sağlık üzerindeki yararlı etkileri klinik deneylerle kanıtlanmış ve ticari preparatlarda yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalardır arasında *L. acidophilus*, *L. casei* Shirota, *Lactobacillus GG*, *L. johnsonii* Lj1, *L. reuteri* ve *B. lactis* Bb12 türleri yer almaktadır (Gül, 2015).

Tablo 2.5. Bazı Probiyotik suşlarının klinik etkileri (Ünver, 2014).

Probiyotik mikroorganizmaların klinik özellikleri.	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Çocuklarda rotavirüs diyarenin önlenmesi
	Çeşitli diyarelerin yetişkenlerde ve çocuklarda önlenmesi ve tedavisi
	Çocuklarda solunum yolu enfeksiyonlarının azaltılması
	Alerji olma riski yüksek çocuklarda atopik dermatit hastalığının engellenmesi, ürogenital sistemin korunması, bağırsak geçirgenliğinin azaltılması, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi
<i>Lactobacillus johnsonii</i> (<i>acidophilus</i>) LA-1	Bağırsak florasının düzeltilmesi ve dengelenmesi, Bağırsaklık sisteminin geliştirilmesi,
	<i>Helicobacter pylori</i> tedavisinde kullanım,
	Diyarenin önlenmesi, intestinal floranın düzenlenmesi
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	İmmün sistemin geliştirilmesi, kabızlığı önleyici etki, kanda kolesterol seviyesini düşürme
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Bağırsaklık sisteminin geliştirilmesi, HIV pozitif bileşenleri tolere edebilme, çocuklarda diyarenin önlemesine yardımcı olma
<i>Lactobacillus casei</i>	İntestinal floranın geliştirilmesi, mesane kanserine karşı yardımcı olma
<i>Lactobacillus plantarum</i>	İntestinal floranın korunması, fekal kısa zincirli yağ asidi miktarının uygun seviyeye göre düşürülmesi
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Antibiyotiklerin neden olduğu diyarenin önlemesine yardımcı olma, Cl. Difficile kaynaklı kolit tedavisinde kullanım

2.2.5. Prebiyotikler

Gibson ve Roberfroid 1995 yılında prebiyotiği “kolondaki bir veya sınırlı sayıdaki bakterinin aktivitesini ve büyümesini uyararak konağı faydalı olarak etkileyen ve sonuç olarak konağın sağlığını geliştiren sindirilemeyen gıda katkısı” olarak tanımlamıştır (Özyurt ve Ötleş, 2014). Prebiyotik tanımı farklı yıllar içerisinde çok kez değişime uğramıştır ve en son 2017 yılında, Uluslararası Probiyotik ve Prebiyotik Bilimsel Derneği (ISAPP- International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) tarafından, konağın bağırsak mikrobiyotasındaki mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan ve sağlık üzerine yararlı etkileri olan substratlar olarak tanımlanmıştır (Nabizadehasl, 2018).

Günümüzde "prebiyotikler" kalın bağırsaklarda fermente olabilen ve non-patojen bakterilerin besin kaynağı olan besinsel-lifler olarak bilinmektedir (İlgül, 2005).

Bir besin bileşeninin prebiyotik özellik taşıyabilmesi için;

- Konakçının sağlığı üzerinde olumlu etkileri olmalı,
- Bir veya kısıtlı sayıda olmak üzere daha çok bakterinin çoğalmasını uyarmalı,
- Kolon mikroflora bakterileri tarafından hidrolize edilebilmeli (Taşdemir, 2017)
- Gastro-intestinal sistemin üst bölgelerinde hidrolize ve absorbe edilmemeli,
- Mide asidine ve ince bağırsaktan emilime direnç gösterebilmeli
- Bağırsak mikrobiyotasında Bifidobacterium ve Lactobacillus türleri tarafından selektif olarak fermente edilebilmelidir (Kıyak, 2018).

Prebiyotikler temel olarak gastrointestinal kanalda faydalı bakteriyel büyümeyi teşvik eden oligosakaritlerden oluşur. Prebiyotik oligosakaritler, laktik, asetik ve diğer kısa zincirli organik asitlerin üretiminden sorumlu olan seçici bakteri türlerine gerekli enerjiyi sağlayabilmektedir. Bu oligosakaritler, esas olarak mannan oligosakaritler (MOS), FOS (kısa zincirli fruktooligosakaritler, scFOS dahil) ve trans-galaktooligosakaritler (galaktooligosakaritler, GOS dahil olmak üzere TOS) şeklindedir (Lauzon ve ark., 2014).

Yaygın olarak bilinen prebiyotikler:

- Oligofruktoz
- İnülin
- Galacto-oligosakaritler
- Lactulose

- Anne sütü oligosakaritleri'dir. (Guarner ve ark., 2011).

Prebiyotikler inülin tipli fruktanlar yani doğal inülin, enzimatik hidrolize edilmiş inülin veya oligofruktozlar ve sentetik fruktooligosakkaritler olarak sınıflandırılır (Elaltunkara, 2018).

Tablo 2.6. Prebiyotiklerin konukçu için yararlı etkinlikleri (Uthan, 2018); (Tuncay, 2016)

Prebiyotiklerin konukçu için yararlı etkinlikleri	Kaynak
Yararlı bakterilerin gelişimini destekleyip patojenik bakterilerin gelişimini engelleme	(Uthan 2018)
Glukoz absorpsiyonunu yavaşlatma ve insulini düşürerek kan şekeri direncini geliştirme	
Kısa zincirli yağ asitlerinin (short chain fatty acids (SCFA)) artırma	
Yağ profilini geliştirme, koroner kalp hastalığı riskini düşüren HDL kolesterolü artırma, LDL kolesterol ve trigliseridi düşürme	
İntestinal duvarda iltihaplanmayı ve sızıntılı bağırsak sendromunu önleme	
Enfeksiyonlardan koruyarak bağışıklık sistemini düzene sokma ve alerji, egzama, astım ve ciddi otoimmün hastalıklardan korunmaya yardımcı olma	
Gastrointestinal bölgenin mukozal alanına yararlı olan ve besin sağlayan propiyonat ve bütirat gibi kısa zincirli yağ asitlerindeki çözünebilir liflerin intestinal fermentasyonunu uyarma	
Kalsiyum ve diğer minerallerin emilimini artırma,	
Kolon pH'sını düşürme	
Kolorektal kanser riskinin azaltma	
İltihaplı bağırsak düzensizliği ve intestinal düzensizlikte olumlu etkilere sahip olma	
Kısa barsakta ve çekumda (kalın barsağın ilk kısmı) Ig A seviyesini yükseltme	(Tuncay 2016)
Sodyum ve su emilimini artırma	
Vitamin sentezini geliştirme gibi özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir	

Probiyotik ve prebiyotik kombinasyonu ise “sinbiyotik” olarak adlandırılmaktadır. Sinbiyotiğin göstereceği etki, probiyotik ve prebiyotiğin tek başına göstereceği etkiden daha fazladır. Bu nedenle fonksiyonel gıda üretim formülasyonlarında probiyotik ya da prebiyotiğin tek başına kullanılmaları yerine sinbiyotiğin yer verilmesi önerilmektedir (Şener ve ark., 2008).

2.3. Laktik Asit Bakterileri

İlk kez 19. Yüzyıl sonlarında sütte koagülasyona ve fermentasyona yol açan bakteriler laktik asit bakterileri olarak adlandırılmıştır (Soran, 2018). Laktik Asit Bakterileri (LAB), karbonhidrat fermentasyonunun ana metabolik son ürünü olarak laktik asit üreten bakterilerden oluşan fonksiyonel bir mikroorganizma grubudur (Salvetti ve ark., 2012). LAB genel olarak güvenli (GRAS) statüsünde olup, filogenetik olarak

oldukça yüksek heterojeniteye sahip bakteriyel bir grup olarak tanımlanmaktadır (Göze, 2018). Bu bakteriler çoğunlukla hareketsiz ve spor oluşturmeyen (*Sporolactocillus inulinus* hariç), Gram-pozitif, katalaz-negatif, fakültatif olarak anaerobik (*aerotolerant anaerob*), solunmayan basiller veya koklardır (Gündüz, 2018). LAB gelişme sıcaklıkları bakımından termofil ve mezofil özellik göstermekte olup aynı zamanda 10-45 °C arası sıcaklıklarda, yüksek tuz kon santrasyonlarında gelişme ve asit veya alkali tolere etme yeteneklerine sahiptirler (Evren ve ark., 2011).

LAB türleri süt ve süt ürünlerinde, hayvan barsak mukozalarında, bitkilerde-bitki artıklarında ve insanlarda gastrointestinal sistem gibi çok çeşitli ortamlarda bulunabilirler (Öztürk, 2019). LAB insan ve hayvan sağlığı üzerindeki yararlı etkileri nedeniyle probiyotik türler olarak, endüstriyel açıdan fermente ürünlerin oluşumunda rol almaları nedeniyle starter kültür olarak, fonksiyon icra etmektedirler (Demirbaş, 2016). Laktik asit bakterileri, fermente et, süt, meyve, sebze ve tahıl ürünlerinin üretim ve olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaları nedeni ile gıda teknolojisinde çok büyük önem taşımaktadır (Çon ve Gökalp, 2000).

2.3.1. LAB sınıflandırılması

İlk saf LAB kültürü J. Lister tarafından 1873'te elde edilen, *Bacterium lactis* olmuştur (Al-Bayati, 2014). LAB'ın ilk sınıflandırmasını fizyolojik özelliklere (morfolojisi, ekolojisi ve özellikle optimal üreme sıcakları) dayanarak 1919 yılında Orla-Jensen oluşturmuştur. LAB *Thermobacterium*, *Streptobacterium* ve *Betabacterium* olmak üzere üç taksonomiye ayrılmıştır (Yörük ve Güner, 2011).

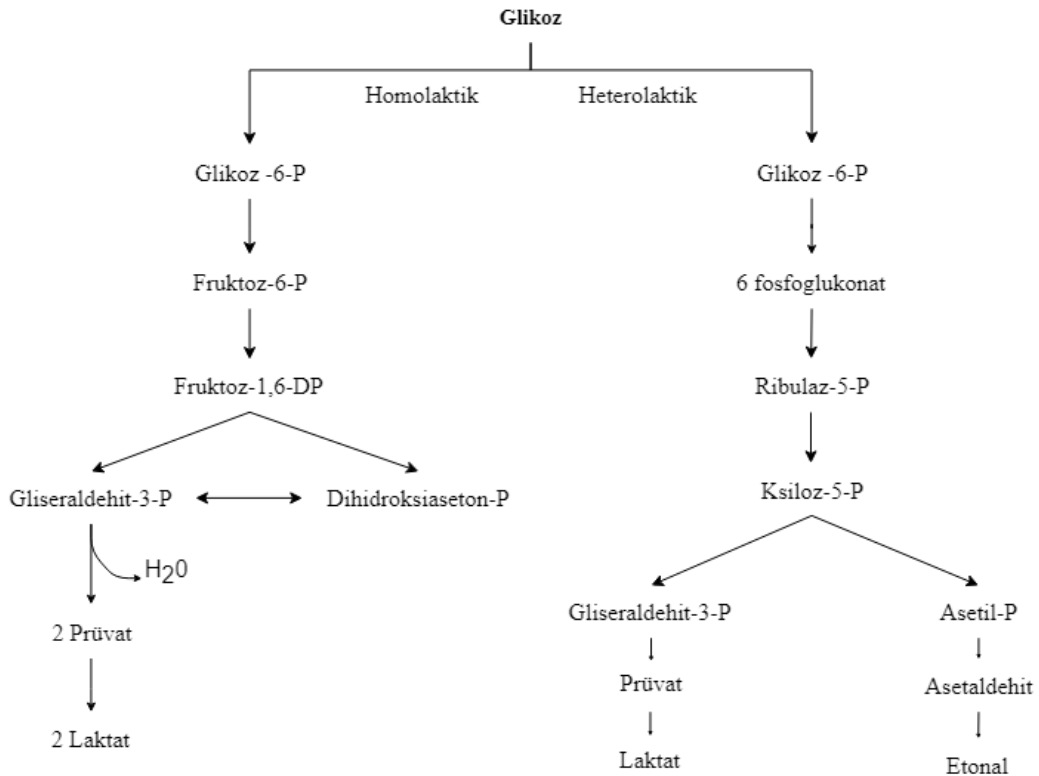
LAB, taksonomik olarak, morfolojik yapılarına, laktik asit konfigürasyonlarına, şeker fermentasyonlarına, tuz, yağ asitleri bileşimine, gelişme sıcaklıklarına ve DNA baz dizisi gibi genetik kriterlere bağlı olarak sınıflandırılmaktadırlar (Şihca, 2012).

LAB arasında en çok incelenen ve kullanılan bakteriler, *Firmicutes* ve *Actinobacteria* olmak üzere iki farklı filumda bulunur. *Firmicutes* filumunda, LAB' nin en önemli cinsleri *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Weissella* yer almaktadır ve bu bakterilerin hepsi *Lactobacillales* ailesine ait olan düşük GC içerikli organizmalardır (%31-49). *Actinobacteria* filumunda ise LAB yüksek GC içeriğine (%58-61) sahip olan *Bifidobacterium* cinsine aittir (Kazancıgil, 2018).

LAB' leri karbonhidratları farklı metabolik yollar kullanarak parçalamaları ve farklı son ürünler oluşturmalarına göre homofermentatif ve heterofermentatif LAB olarak iki

farklı sınıfa ayrılır (Dalca, 2015). Homofermentatif grubun ürettiği tek fermantasyon ürünü laktik asittir. Heterofermentatif grubun üyeleri ise laktik asit, etanol ve CO₂ üretirler (Demir, 2014). Homofermentatifler, aldolaz enzimine sahiptir ve bu sebepten glikozu, doğrudan laktik aside fermente edebilirler. Heterofermentatifler ise alternatif pentoz monofosfat yolunu kullanarak, heksozu fosfoketolaz enzimi tarafından pentoza dönüştürür. Heterofermentatifler, lezzet artırıcı maddeler üretmesi nedeniyle süt endüstrisinde sıklıkla kullanılır (Üstok, 2007).

Homofermentatif laktik asit bakterileri *Streptococcus* ve *Pediococcus* cinslerini içerir. Heterofermentatif laktik asit bakterileri ise *Leuconostoc* cinsi ile *Lactobacillus* cinsinin bir alt grubu olan *Betabacteria*'dan oluşur (Dursun, 2010).



Şekil 2.1. LAB'De Glikoliz (Dündar, 2017).

Fermantasyon sonucu ana ürün olarak organik asit üreten bu bakteriler sitokrom içermezler, elektron taşıma sistemi bulundurmazlar ve enerji ihtiyaçlarını substrat düzeyinde fosforilasyon ile karşılarlar (Uyar, 2018).

LAB günümüzde yaygın fizyolojik sınıflandırmaya göre 20 cinsten oluşmakta olup gıda teknolojisi açısından *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Sterptococcus*, *Tetragenococcus*,

Vagococcus ve *Weissella* cinslerine ait türlerden oluşmaktadır (Zehir, 2017). (Özkalp, 2018).

2.3.1.1. *Lactobacillus*

LAB grupları arasında en çok çeşitlilik gösteren grup *Lactobacillus* cinsine ait türler olduğu bilinmektedir. Homo- ve hetero-fermentatif türler içeren bu geniş grup, aynı zamanda farklı ve çeşitli morfolojik yapılarla sahiptir (Arık, 2018). *Lactobacilli* cinsi, fermantasyon özelliklerine göre geleneksel olarak üç gruba ayrılan, 17 alttürden oluşan 175 tanınmış türü içerir:

- Zorunlu homo-fermantatif,
- Fakültatif hetero-fermantatif
- Zorunlu hetero-fermantatif.

(Lalanne ve ark., 2012).

Zorunlu homofermentatif gruba “*Lb. Delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. helveticus* ve *L. Acidophilus*”, Fakultatif heterofermentatiflere “*L. casei* subsp. *Casei*”, Zorunlu heterofermentatiflere ise “*L. Kefir*” örnek gösterebiliriz (Hassan ve Frank, 2001).

Bu gruba dahil olan bakteriler gram pozitif, katalaz negatif, anaerobik, spor oluşturmeyen bakterilerdir ve genelde hareketsiz olsalar da bazı türleri flagellalara sahiptirler. Çoğu *Lactobacillus* cinsi bakteriler çoğunlukla basil (kısa, dolgun çubuklar, uzun, ince çubuklar) şeklindedir ancak bazı türleri farklı uzunlukta olup kokobasil şeklindedirler (Güney, 2015). Genellikle gelişme sıcaklıkları 5 ile 53°C arasında, pH aralıkları ise 5,5 ile 5,8 arasında değişmektedir (Arslan, 2017).

Bu bakteriler geniş yaşam spektruna sahip olup fermente et, süt, meyve, sebze ve tahıl ürünlerinde, insan gastrointestinal sistem ve vajinada yerleşirler. Bazı durumlarda ara sıra fırsatçı patojenler olabilirler (Goldstein ve ark., 2015). *Lactobacillus* cinsi, fenotipik özellikleri baz alınarak yapılan değerlendirmede *Thermobacterium*, *Steroptobacterium*, *Betabacterium* şeklinde üç alt gruba ayrılmaktadır (Öztürk, 2019). Fenotipik tanımlamanın genellikle güvenilir olması nedeniyle *Lactobacillus* türlerinin tanımlanması, moleküler yollarla (16S rRNA genleri) yapılır.

Birçok *Lactobacilli*, temel olarak asitlenme nedeniyle korunmaya katkıda bulundukları için, aynı zamanda eşsiz lezzet ve doku özelliklerine katkıda bulunma kapasiteleri nedeniyle gıda ve yem ürünleri ile ilişkilidir (Lalanne ve ark., 2012).

2.3.1.2. *Lactococcus*

Lactococcus cinsi nispeten yeni bir taksonomik gruptur. Mevcut taksonomik gruplamalar organizmaların fenotipik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerine dayanır. *Lactococcus*'lar, çeşitli fermente gıdalarda yararlı mikroorganizmalar olarak bilinmektedir (Büyükyörük, 2007). Bu mikroorganizmalar morfolojik olarak küresel hücrelerdir. Hücreler genellikle kısa zincirlerde, çiftler halinde ortaya çıkar. Aynı zamanda tek hücreler de bulunabilir. *Lactococcus*'lar Gram pozitif, mikroaerofilik, katalaz içermeyen hücreler olup koruyucu özelliğe sahiptirler (Vedamuthu, 2013). Laktokok suşları en çok süt endüstrisinde starter bakteriler olarak kullanılmaktadır (Tükel ve Akçelik, 2000). *Lactococcus*'lar cinsinin beş türü bilinmesine rağmen şu anda sadece *Lc. lactis* süt teknolojisinde kullanılır. *Lc. Lactis*' in üç alttürü ayırt edilmiştir: *Lc. lactis subsp. lactis*, *Lc. lactis subsp. cremoris* ve *Lc. lactis subsp. hordniae* (Kazancıgil, 2018). Süt imalatında sadece *Lc. lactis subsp. lactis* ve *Lc. lactis subsp. cremoris* önemlidir. *Lactococcus* türlerinden *L. lactis ssp. lactis*, *L. lactis ssp. cremoris* ve *L. lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* peynir, yayıkaltı, ekşi krema ve yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır (Başaran ve ark., 2004).

2.3.1.3. *Enterococcus*

Önceleri “fekal orijinli streptokoklar” olarak adlandırılan enterokok grubu bakterileri ilk kez 1937 yılında Sherman tarafından tanımlanmıştır (Ateş, 2017). Bu mikroorganizmalar insan ve hayvanlarda normal barsak florasının önemli sakinleri olarak bilinir (Yıldırım, 2007). Enterokoklar tek tek veya çift olarak kısa zincirler halinde bulunan Gram pozitif, katalaz negatif, fakültatif anaerob koklardır. Bu bakteriler 10-45° C arasında üreyebilir, % 6.5'lik NaCl'lü ortamda üremeyi sürdürebilir, 60° C'de 30 dakika canlı kalabilir ve eskulini hidrolize edebilirler (Tok, 2006). Enterokoklar, 4,6-9,9 pH aralığında yaşayabilir ve %40 oranına kadar safra tuzlarını tolere etmek yeteneğine sahiptirler (Güneş, 2018). Enterokoklar çevre, gıda ve klinik mikrobiyoloji açısından önemli laktik asit bakterileri olarak bilinmektedir (Diken, 2016). LAB grubunda yer alan *Enterococcus* cinsi, bazı peynirlerinin olgunlaşması ve aroma gelişimine katkıda bulunan yardımcı kültür olarak kullanılmaktadır. *Enterococcus* suşlarından bazıları *E.faecalis* ve *E. faecium* suşları çoğu ülkelerde probiyotik olarak kullanılır (İşevi, 2011).

Enterokokların aynı zamanda üriner sistem enfeksiyonları, bakteriyemi, bakteriyel endokardit, divertikülit ve menenjit gibi önemli klinik enfeksiyonlara neden olduğu da bilinmektedir (Güneş, 2018).

2.3.1.4. *Leuconostoc*

Leuconostoc türleri, gram-pozitif, katalaz, oksidaz ve PYR (L-pyrrolidonyl-b-naphthylamide) negatif, alfa hemolitik veya hemolitik olmayan koklar olup, çoğunlukla bitki ve sebzelerde, çevrede, daha az oranda da şarap ve süt ürünlerinde bulunduğu belirtilmektedir (Hatipoğlu ve ark., 2008). *Leuconostoc*'lar laktik asit, etanol, asetat ve CO₂ üretmek için laktoz ve sitrat kullanan heterofermentatif laktik asit bakterileri olup diasetil, asetoin ve 2, 3-bütandiol üretme kapasiteleri nedeniyle, tereyağı ve krem fermentasyonunda başlangıç kültür olarak kullanılır. Bu bakteriler proteolitik ve lipolitik enzimlere sahip oldukları için doku, lezzet, kimyasal bileşim, aroma ve fermente ürünlerin diğer bazı kalite kriterlerinde dikkate değer bir rol oynamaktadır (Ekinci ve ark., 2018). Bu nedenle *Leuconostoc*'lar geleneksel peynirlerde tipik lezzetlerine katkıda bulunmak nedeniyle yardımcı maddeler olarak da eklenebilirler (Cicotello ve ark., 2018).

2.3.1.5. *Pediococcus*

Pediococcus türleri karbonhidratlardan D- ve L-laktat üreten homofermentatif Gram-pozitif, kok şekilli bakterilerdir (Ekinci ve ark., 2018). *Pediococcus* cinsine ait türler tuza dayanıklı türler olup %5.5 tuz konsantrasyonunda rahatlıkla gelişebilmektedir. Bu cinse ait türler asit üretimlerinin yüksek olması, tuza toleranslı olmaları ve oldukça geniş bir sıcaklık aralığında (7-45°C) gelişebilmeleri nedeniyle önemlidirler (Akepaer, 2015).

Pediococcus'lar doğal olarak mandıra ürünlerine, taze sebze, bira ve şarap gibi fermente ürünlerde, etlerde bulunmaktadır. *Pediococcus*'lar sebze ve etlerin fermentasyonlarının kontrolüyle ilişkili olup peynirin oluşmasında ikinci flora gibi rol almaktadırlar. Bu mikroorganizmalar sadece aromaya katkıda bulunmayıp, şekil ve renk gelişimini de sağlamaktadır (Biler, 2009). *Pediococcus* türleri dünyanın çeşitli coğrafi bölgelerinde geleneksel olarak üretilen çedar, koyun süt peynirleri ve geleneksel olarak üretilen diğer bazı çiğ süt peynirlerinden izole edilebilir (Ekinci ve ark., 2018).

Günümüzde *Pediococcus* cinsinde tanınan 11 tür bulunmaktadır. Bunlar: *P. asidilaktik*, *P. argentinus*, *P. Cellicola*, *P. clausenii*, *P. damnosus*, *P. etanolidüranlar*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* (alt tür *pentosaceus* ve *intermedius*), *P. siamensis* ve *P. stilesii* türleridir (Wade ve ark., 2018).

2.3.2. Antimikrobiyal maddeler hakkında genel bilgi

Antimikrobiyal gıda katkı maddeleri, gıdalardaki bozulmaların geciktirilmesi ve gıdalarda üreyebilecek mikroorganizmaların gelişimini engellemek amacı ile gıdalara ilave edilmektedir. Gıda endüstrisinde en yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal gıda katkı maddeleri arasında nitrit ve nitrat bileşikleri, kükürtdioksit ve çeşitli sülfidler, nisin, benzoik asit ve tuzları, sorbik asit ve tuzları, propiyonik asit ve tuzları, asetik asit ve asetatlar gibi antimikrobiyaller yer almaktadır (Öztürkcan ve Acar, 2017). Son yüzyılın ortalarından itibaren besinleri koruma ve raf ömrünü uzatmak amacıyla gıda üretiminde ticari sentetik maddelerin kullanılmasına izin verilmiştir. Lakin son yıllarda insanlar, sentetik katkı maddelerinin tüketimiyle ilişkili hastalıkların ortaya çıkması ve sağlığı olumsuz yönde etkilemeleri nedeniyle bu maddelerin kullanımı konusunda ciddi endişelerini dile getirmişler ve bu da doğal maddelerin gıda koruyucu olarak kullanılması konusuna ilgiyi bir hayli arttırmıştır. Mikroorganizmaların mevcut koruyucu maddelere karşı geliştirdikleri direnç doğal kaynaklı besin koruyucular olarak kullanılmasına izin vermektedir (Haşimi ve ark., 2015).

Gıda endüstrisinde kullanılan doğal antimikrobiyal maddelere esansiyel yağları örnek gösterebiliriz. Bu yağlar eterik veya uçucu yağlar olarak da isimlendirilir. Esansiyel yağlar bitkilerin kök, kabuk, yaprak, meyvelerinden farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanarak elde edilen ve oda sıcaklığında sıvı halde olan maddelerdir (Korkmaz, 2018).

Günümüzde mikroorganizmalar tarafından üretilen antimikrobiyal maddeler dikkatleri üzerine çekmektedir ve gıda endüstrisinde sıkça tercih edilmektedir. Bu mikroorganizmalar arasında en çok ilgi odağına dönüşen ve tercih edilen Laktik asit bakterileri ve onlar tarafından üretilen metabolitlerdir.

2.3.2.1. *Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Antimikrobiyal Maddeler*

Gıdaların güvenliğinin sağlanmasında mümkün olduğunca proses uygulamalarından kaçınılması ve doğal katkı maddelerinin kullanımı gerekmektedir. Çeşitli gıdalarda doğal olarak bulunan veya başlangıç kültür olarak kullanılan birçok laktik asit bakterisi tarafından üretilen antimikrobiyal maddeler, gıdanın bozulmasına neden olan mikroorganizmalara veya gıda kaynaklı patojenleri ihtiva eden bir grup mikroorganizmaya karşı antagonistik aktivite gösterdiği bilinmektedir. Bu bakterilerin ürettiği antimikrobiyal maddelerin gıda koruması için kullanılması çok eski çağlardan beri uygulanan bir yöntemdir.

Laktik asit bakterilerinin diğerk mikroorganizmalara karşı gösterdiği bu antagonistik aktivite aşğıdaki mekanizmalar ile gerçekleştiğı bilinmektedir:

- Laktik asit bakterilerinin karbonhidrat kaynaklarını fermente etmeleri sonucu; laktik ve asetik gibi organik asitler üretilmektedir ve gıdalarda bulunan birçok mikroorganizma bu üretilen organik asitlere karşı hassastır ve sonuçta düşen pH'yı da tolere edememektedir.
- Laktik asit bakterileri tarafından üretilen H₂O₂ birçok mikroorganizma üzerine inhibitör etki gösterebilmektedir.
- Bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen ve “bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri metabolitler” olarak isimlendirilen antimikrobiyal karakterli proteinler, özellikle yakın ilişkili bakteriler üzerinde inhibitör etki göstermektedir.
- Bazı laktik asit bakterileri tarafından üretilen, diasetil, alkol ve CO₂ gibi metabolitler bazı mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki gösterebilmektedir (Çon ve Gökarp, 2000).

Süt ürünlerinin güvenliğini ve kalitesini artırmak ve gıda kaynaklı hastalıkların meydana gelme olasılığını azaltmak için antimikrobiyal maddeler üreten LAB, fermente veya fermente edilmemiş süt ürünlerinin üretiminde de kullanılmaktadır (Yüce, 2017).

LAB gıda ortamında bulunan karbonhidratları fermantasyon yoluyla moleküler kütleleri küçük organik bileşiklere dönüştürür. Bu bileşikler organik asitler (laktik asit ve asetik asit, propiyonik asit), diasetil, hidrojen peroksit, reuterin ve bakteriyosinler olarak gruplandırılan, gıda güvenliğini etkileyen ve raf ömrünü kısaltan, bozulma etkeni mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Üner, 2012).

2.3.2.1.1. Organik Asitler (laktik asit ve asetik asit, propiyonik asit)

Organik asitlerin, hücre zarı potansiyelinin korunmasına müdahale ederek, aktif taşımayı inhibe ederek, hücre içi pH'ı azaltarak ve çeşitli metabolik fonksiyonları inhibe ederek antimikrobiyal olarak işlev gördüğü düşünülmektedir (Bryan ve ark., 2015).Organik asitlerler anyon ve protonlarına ayrışmamış formda iken bakteri hücrelerinin lipit membranlarından kolayca geçebilmekte ve hücre sitoplazmasının nötral pH'ında anyon ve protonlarına ayrışabilmekte ve RNA, DNA protein ve hücre duvarı sentezini azaltabildiğı bilinmektedir (Torlak, 2009).

Laktik asit bakterilerinin ana metaboliti olan laktik asit, ortam pH'sını düşürerek birçok mikroorganizmanın gelişimini inhibe etmektedir. Asidin dissosiye olmamış hidrofobik formu hücrenin membranından geçerek hücre içinde dissosiye olmakta,

sitoplazmayı asitlendirmektedir ve dissosiye olmamış asit elektrokimyasal proton değişimini bozarak, bakteriostasise, hassas bakterilerin ölümüne neden olmaktadır (Şihca, 2012).

2.3.2.1.2. Hidrojen peroksit

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen metabolitlerden biri de oksitleyici bir bileşik olan hidrojen peroksittir. Hidrojen peroksit, avoprotein oksidazlar veya NADH peroksidaz etkisinin bir sonucu olarak oksijen varlığında üretilir. H_2O_2 'nin antimikrobiyal etkisi, enzimlerin denatüre olmasına ve membran lipidlerinin peroksidasyonuna neden olan sülfhidril gruplarının oksidasyonu ve dolayısıyla rakip organizmalar için öldürücü olabilen membran geçirgenliğini artırabilir, ayrıca mikrobiyal DNA'ya zarar verebilen süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi bakteri yok edici radikallerin üretimi için bir öncü olabilir (Bryan ve ark., 2015). Bu madde birçok patojen mikroorganizmanın vejetatif hücreleri ile sporları üzerinde öldürücü etkiye sahiptir. Özellikle fermente et ürünlerinde hidrojen peroksit oluşumu, antimikrobiyal etkisi ve ürünlere renk ve lezzet konusunda sağladığı katkılarıyla büyük bir önem taşıdığı bilinmektedir (Genç, 2016).

2.3.2.1.3. Bakteriyosin

Bakteriyosinler, mikroorganizmalar tarafından, ribozomal olarak sentezlenen (prepeptitler olarak ribozomlarda sentezlenen), evrimsel olarak yakın (çoğunlukla) veya yakın olmayan türler üzerine etki gösteren, antibakteriyel aktiviteye sahip proteinlerdir (Avcı, 2015). İlk bakteriyosin izolasyon çalışması Gram negatif bakteri olan *Escherichia coli* üzerinde gerçekleştirilmiştir ve izole edilen molekül 1925 yılında colisin olarak adlandırılmıştır (Işık, 2018). 'Bakteriyosin' terimi ilk olarak 1953 yılında Jacob ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Birçok gıda kaynaklı laktik asit bakterisi türü; *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium* ve *Propionibacterium*, bakteriyosin adı verilen küçük antimikrobiyal proteinler ürettikleri bilinmektedir (Nalvuran, 2013).

Bakteriyosinler genellikle gastrointestinal sistemde proteazların etkisiyle inaktif hale gelen, çoğu küçük katyonik moleküller olup, 30 ila 60 arası amino asit içerirler (Demirci, 2013).

Bakteriyosinlerin çoğunlukla Gram-pozitif bakteriler tarafından üretildiği bilinmektedir. Lakin son araştırmalar bakteriyosinlerin bazı Arke üyeleri tarafından da

üretildiğini göstermiştir (Zengin, 2012). Aynı zamanda Gram negatif bakteriler tarafından (*Escherichia coli*, *Shigella sp.*, *Serratia sp.*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.*) üretilen bakteriyosinler de mevcuttur ki bunlar da mikrosinler olarak isimlendirilmektedir. Mikrosinler protein büyüklükleri, mikrobiyel hedefleri, etki mekanizmaları ve direnç sistemleri açısından farklılık göstermektedir (Alkış, 2016).

Bakteriyosinler literatürde sıklıkla antibiyotikler ve antimikrobiyal aktiviteye sahip farklı tiplerdeki peptitlerle karıştırılmaktadırlar. Lakin bunlar arasında keskin farklar mevcuttur (Işık, 2018).

- Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenen ürünlerdir, antibiyotikler ise enzimatik işlenme aracılığıyla aktif formlarını kazanırlar.
- Bakteriyosinlerin genellikle gelişme fazında üretilen birincil metabolitlerdir, antibiyotikler ise durma fazında üretilen ikincil metabolitlerdir.
- Her bakteriyosinin kendi dirençlilik proteini vardır. Dirençlilik proteinini kodlayan genler bakteriyosinin yapısal genleri ile bağlantılıdır, lakin antibiyotik dirençliliği yöneten genler ise yapısal antibiyotik genlerle bağlantısızdır (Demirci, 2013).
- Bakteriyosinlerin etki spektrumları dardır, antibiyotikler ise geniş etki spektrumuna sahiptir (Üstündağ ve Yalçın, 2017).

Gıda korunmasında kullanım potansiyellerinden dolayı en iyi çalışılmış bakteriyosin grubu, laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen bakteriyosinlerdir. 1993 yılında Klaenhammer LAB tarafından üretilen bu bakteriyosinleri; enzimatik duyarlılıkları, moleküler ağırlıkları, ısı duyarlılıkları, translasyon sonrası modifiye edilen amino asitlerinin olup olmayışı ve etki mekanizmalarını esas alarak 4 grup altında sınıflandırmıştır (Delibaş, 2016).

- Sınıf I, Lantionin içeren bakteriyosinler veya Lantibiyotikler;
- Sınıf II, Küçük, ısıya dayanıklı, Lantionin içermeyen membran aktif peptitler;
- Sınıf III, Büyük ısıya dayanıklı proteinler;
- Sınıf IV, aktivite için gerekli protein ve bir veya daha fazla kimyasal kısımdan (lipid, karbonhidrat) oluşan kompleks bakteriyosinler (Santos ve ark., 2015).

2.3.2.1.4. I. Grup bakteriyosinler

Bu gruptaki bakteriyosinler, lantionin köprüleri içeren ve molekül büyüklükleri 5 kDa'dan düşük olan, yapılarında lantionin (Lan) ve β -metillantionin (MeLan) olarak

adlandırılan türev amino asitler bulunan lantibiyotiklerdir. Ayrıca bu grup üyelerinde, biyokimyasal özelliklerini etkileyen dehidroalanin ve dehidrobütirin gibi, dehidro amino asitler de bulunmaktadır (Üstündağ, 2016). Lantibiyotikler, kimyasal yapılarına ve antimikrobiyal aktivitelerine göre kendi aralarında Tip A ve Tip B olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. Tip A lantibiyotikler, pozitif yüklü olup hidrofobik polipeptit yapısında lineer ve düzgün olmayan şekillidirler. Ortalama 21-38 aminoasitten oluşurlar. Tip A lantibiyotikler, bakteri membranında porlar oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Biyokimyasal ve genetik düzeyde en iyi tanımlanmış olan “nisin” bir tip A bakteriyosindir (Abanoz, 2014).

Tip B lantibiyotikler yüksüz veya negatif yüklü olup, globüler peptit yapısındadırlar. Spesifik enzimleri inhibe ederek antimikrobiyal aktivite gösterebilmektedir (Kurt ve Zorba, 2005).

2.3.2.1.5. II Grup bakteriyosinler

Düşük sıcaklıklı stabil peptitler olup molekül büyüklükleri 10 kDa’dan küçüktür ve 30-100 amino asit içerir. Bu gruba dahil olan bakteriyosinler lanthionine içermezler ve bazıları 121°C’ye kadar olan sıcaklıklara karşı yapısını koruyabilir (Dinçer ve ark., 2009). Bu sınıf 4 alt gruba ayrılır. Bu sınıfın en önemli alt grubu IIa alt grubu bakteriyosinlerdir. *Listeria ssp.* üzerindeki inhibitör etkilerinden dolayı “Pediocin benzeri güçlü antilisteriyal etkili bakteriyosinler” olarak adlandırılmıştır (Sezer, 2007). Etki mekanizmaları Tip A lantibiyotiklerde olduğu gibidir. Bu gruba dahil olan bakteriyosinlere pediosin AcH, sakasin A ve lökosin A örnek gösterebiliriz (Akkoç ve ark., 2009).

2.3.2.1.6. III Grup bakteriyosinler

Büyük molekül yapısında (> 30 kDa), ısıl yapışabilen ve litik moleküllerdir. Bu gruba dahil olan bakteriyosinler, hedef mikroorganizmaların hücre duvarının hidrolizine yol açan proteinlerin hücre duvarını parçalama aktivitesine sahiptir (Arena ve ark., 2017). *Lactobacillus helveticus* tarafından üretilen helvetisin J, *Streptococcus zooepidermicus* tarafından üretilen zoosin A, *Enterococcus faecalis* tarafından üretilen enterolisin A, *Streptococcus milleri* tarafından üretilen millerisin B, *Brevibacterium linens* tarafından üretilen linosin M18 bu gruba dahil edilmektedir (Kaya, 2013).

2.3.2.1.7. Grup IV bakteriyosinler

Dördüncü grup bakteriyosinler, polipeptit yapısında, lipoprotein veya glikoprotein gibi ilave bazı yapılar içermeleri ile karakterize edilmektedir. Plantarasin-S, laktosin 27 ve leukonosin S bu gruba dahildir (Karaoğlu, 2013).

Tablo 2.7. Bakteriyosinlerin sınıflandırılması (İpçak ve ark., 2017).

Grup	Yapısı	Karakteristiği	Örnek	Kaynak
Sınıf I (Lantibiyotikler)	• <5kDa moleküler ağırlıkta,	• Post translasyonel modifikasyona uğrarlar	Nisin, Mersacidin	Egan et al., 2016; López Cuellar et al., 2016
Sınıf Ia ve Sınıf Ib	• Globüler peptid, • Sınıf Ib yüksüz veya (-) yüke sahip	• Katyonik, hidrofobik, bu yüzden hedef hücrede gözenek oluştururlar.		
Sınıf II	• Sınıf IIa 3-10 kDa;	• Bu gruba ait	Pediocin PA-1,	Nes et al.,
Sınıf IIa, Sınıf IIb,	Sınıf IIb 25-65 kDa	bakteriyosinlerin	Sakacin P,	1996;
Sınıf Iic	moleküler ağırlıkta, • N-terminal dizimi TyrGly-Asn-Gly-Val, • N-terminalinin sonunda S-S bağları ile formüle edilmiş iki sistein vardır, • Isıya dayanıklı	aktivitesi için iki farklı peptid tamamlayıcı rol oynar. Peptidler bireysel olarak herhangi bir aktivite göstermez.	Leucocin A,	Martinis et al., 2002
Sınıf III	• >30 kDa moleküler ağırlıkta, • Isıya dayanıklı		Helvecitin J, Helvecitin V-1829, Lactacin A ve B, Acidophilucin A	Riley and Wertz, 2002; Martinis et al., 2002
Sınıf IV	• Bu gruba giren bakteriyosinler hakkında bilgi çok sınırlıdır	• Aktivite için proteinle beraber bir veya daha fazla bileşiğe (lipid, karbonhidrat vb.) ihtiyaç duyarlar	Leuconocin S, Lactocin 27	Riley and Wertz, 2002

Bakteriyosinlerin gıdalarda inhibisyon etkileri, bakteriyel etki mekanizmaları, uygun koşullara (pH, NaCl, ısı uygulamaları) göreceli tolerans ve toksisite eksikliği gıdalarda biyokoruyucu olarak rol oynanmasında destek olmaktadır. Bununla birlikte

bakteriyosinlerin kullanımını sınırlayan faktörler bulunmaktadır. Bu faktörlere; dar aktivite spektrumu, kendiliğinden bakteriyojenikliğin kaybı, proteolitik enzimler boyunca inaktivasyon, gıda ortamlarına kültürün zayıf adaptasyonu, düşük üretim seviyesi ve bakteriyosine dayanıklı bakterilerin ortaya çıkmasını gösterebiliriz (Seçkin ve Baladura, 2010). Buna rağmen günümüzde bakteriyosine dayalı biyokoruyucu teknolojiler üzerinde ayrıntılı çalışmalar mevcuttur.

Gıdalara koruyucu olarak bakteriyosin ilavesi ile;

- Gıdaların raf ömrü uzatılabilmekte,
- Saklama koşulları altındaki sıcaklıklarda ekstra koruma sağlanmakta,
- Gıda kökenli patojenlerin besin zinciri ile dağılım riski azaltılabilmekte,
- Gıdalarda bozulmalara yol açan mikroorganizmalar nedeni ile yaşanan ekonomik kayıplar en aza indirgenmekte,
- Kimyasal koruyucuların kullanımları azaltılabilmekte,
- Koruma için daha az prosesin uygulanması sebebi ile ürünün organoleptik özellikleri ve besinsel değeri de daha iyi korunabilmektedir (Uludağ, 2015).

Gıdalarda bakteriyosinlerin kullanımı için 3 uygulama şekli mevcuttur:

- Direk olarak bakteriyosinlerin gıdalara ilavesi,
- Ambalajlama materyaline (yenilebilir filmlere) bakteriyosin ilavesi (Türemiş, 2012)
- Bakteriyosin üreten mikroorganizmaların gıdaların üretiminde startır kültür olarak kullanılması (Uylaşer ve ark., 2008).

2.3.2.2. Ekstraselüler polisakkarit (EPS)

Ekzopolisakkaritler (EPS) genel olarak hücre yapışmasında ve korumasında görev alan, bakteriyel hücre yüzeyinde kapsül şeklinde bulunan veya hücre dışına salgılanan hücre dışı polisakkaritler olarak bilinmektedir. EPS'ler çoğu zaman şekerlerin monosakkarik kalıntılarından veya şeker türevlerinden oluşmakta olup, bitkiler, algler, fungi ve bakteriler tarafından üretilmektedir (Kırma, 2016). Hücreler tarafından salgılanan EPS mikrobiyal hücrelerin fagositoza, faj saldırılarına, antibiyotiklere, toksik bileşiklere, ozmotik strese ve bakteriyosinlere karşı korunmasında etkilidir (Gürsoy ve ark., 2010).

Laktik asit bakterileri genelde “GRAS” statüsünde yer aldığı için ürettikleri EPS’ler de ticari potansiyele sahiptir. Ekzopolisakkarit üretebilen laktik asit bakterilerinden bazıları Tablo 2.8’de gösterilmiştir:

Tablo 2.8. EPS üreten LAB (Kırma, 2016).

Laktik Asit Bakterileri			
Lactobacillus Cinsi	Streptococcus Cinsi	Lactococcus Cinsi	Leuconostoc Cinsi
<i>Lb. hilgardii</i> <i>Lb. casei</i>	<i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus subrinus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>spp. Lactis</i>	<i>Lactococcus mesenteroides</i> spp. <i>ceremois</i>
<i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> <i>spp. Thermophilus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>spp. Ceremois</i>	<i>Lactococcus mesenteroides</i> spp. <i>Mesenteroides</i>
<i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>Bulgaricus</i>			

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS’ler homopolisakkarit ve heteropolisakkarit olmakla iki gruba ayrılır. Homopolisakkaritler tek bir monosakkaritten oluşup, fruktan ve gluklan yapılarını içerir, yüksek molekül ağırlığına sahiptir. LAB tarafından üretilen polimerlerin çoğu heteropolisakkaritler olup, D-glikoz, D-galaktoz, L-ramnoz veya nadir olarak N-asetilglikozamin, N-asetilgalaktozamin ve glukoranik asit yapılarından oluşur (Milci ve Yaygın, 2005).

EPS üretimi için özel gen kümeleri, mezofilik LAB cinsleri için (*Lactococcus*) plazmid üzerinde, termofilik cinsler için (*Streptococcus* ve *Lactobacillus*) ise kromozom tarafından kodlanmaktadır (Zehir, 2017).

LAB’de EPS ya bir dış katman gibi hücre yüzeyine sıkıca bağlanmış kapsüller şeklinde ya da çevreye direk olarak salgılanan hücre dışı EPS şeklinde olur. Bunlardan hücre dışı EPS ticari ürünler (dekstranlar) olarak önem taşımakta olup kimyada jel filtrasyon ve kromatografi işlemlerinde (Sephadex columns); tıpta ise kan plazması ikamesi (Dekstran 70) olarak geniş bir alanda kullanılmaktadır (İspirli, 2016).

EPS’lerin aynı zamanda tıp, tekstil, madencilikte metal ayırma, petrol arıtma, endüstriyel atık arıtma, kozmetik, ilaç üretme ve gıda sanayisi gibi geniş kullanım alanları vardır. EPS’ler özellikle gıda sanayinde kıvam artırıcı, jelleştirici ve emülsifiye edici özellikleri sebebiyle kullanılmaktadır (Soyuçok ve ark., 2016).

2.3.3. Biyofilmin genel özellikleri

Bakterilerin canlı veya cansız herhangi bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri hücre dışı polimerik yapıdaki bir matrikse (ekzopolisakkarit) gömülü (Aydemir, 2018), uyumlu ve yapısal bütünlük içerisinde yaşadığı kompleks bir organizasyon biyofilm olarak adlandırılmaktadır (Arar, 2015). Biyofilm yapısını gözlemleyen ilk kişi 1684 yılında Leeuwenhoek olmuştur. Bu tarihten iki yüzyıl sonra Amerikalı mikrobiyolog Arthur Henrici biyofilm matriksinin varlığını belirlemiştir. Biyofilm terimini ilk kez 1981 yılında Costerton kullanmıştır (Çelik, 2018).

Biyofilm oluşturan bakteriler birbirleriyle haberleşerek varlıklarını devam ettirmek için gerekli olan yaşamsal işlevlerini yerine getirirler (Arar, 2015). Bu mikroorganizmalar iletişim sinyali olarak çeşitli kimyasal mekanizmalar kullanırlar. Mikroorganizmaların hücre yoğunluğu belli bir seviye üzerine çıkınca bakteriler “autoinducer” adı verilen sinyal molekülleri salgılar, böylece çevredeki bakterilerde gen ekspresyonu aktif duruma geçer ve bakteriler çevrelerinde üretilen sinyal moleküllerini algılayarak etraflarında bulunan diğer mikroorganizmaların yoğunluğunu hissederler. Bu iletişim “Quorum sensing” olarak adlandırılır ve hücre yoğunluğuna bağlıdır (Hepdeniz ve Seçkin, 2017).

Biyofilm oluşumu, bakteri türü, bakteri sayısı, hücre hareketliliği dışında ortam sıcaklığı ve pH’ı, bağlandığı yüzeyin özelliği, ortamdaki besin miktarı ve içeriği gibi birçok çevresel faktörler ile de yakından ilişkilidir (Aydemir, 2018). Biyofilm içerisindeki bakteriler antibiyotiklere, antimikrobiyallere ve bağışıklık sistemine direnç gösterir (Kırmusaoğlu, 2017). Biyofilimde direnç oluşmasının sebebi ise bakteriler arası konjugasyon, plazmid, EPS varlığı ve çeşitli bakterilerin katılımı ile oluşan bir popülasyonda bazı mikroorganizmaların kalkan görevi yerine getirmesidir (Ünal, 2005).

Biyofilmi oluşturan topluluklar tek bir mikroorganizma türünden oluşabilir veya farklı türde mikroorganizmaları içerebilir. Biyofilm yapısı polisakkaritler, protein, ekstraselüler DNA, su ve iyonlar gibi farklı bileşenleri içeren kompleks dinamik bir yapıdır (Temel ve Eraç, 2018).

Biyofilm kütlelerinin %97 gibi büyük bir kısmı su, %1-2 EPS, %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipit, fosfolipitlerden oluşmakta olup, bu oranlar mevcut organizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine, genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir (Gün ve Ekinci, 2009).

Biyofilmin tek hücreye nazaran daha fazla üstünlüklere sahip olması Dorlon tarafından (2002) dört ana madde altında toplanmıştır:

- Biyofilmi oluşturan bakterilerin salgıladığı EPS mukoza yapısı ortamındaki C-N-PO₄ gibi besin maddelerini konsantre bir hale getirerek kullanımını arttırmaktadır.
- Biyofilm içerisindeki bakteriler antimikrobiyel maddeler, sıcaklık, yüzey gerilimini değiştiren ajanlar, konakçıya ait fagositler, konakçı radikalleri ve proteazlar gibi çeşitli faktör ve koşullara karşı direnç geliştirirler.
- Yüzeyde bulunan bakteriler tabakalı bir dizilim oluştururlar, bu da çeşitli kimyasallara karşı kalkan yaratmasına olanak sağlar. Aynı zamanda yüzeydeki tabakada katalaz, peroksidaz, proteaz ve lipaz inhibitörleri salgılanarak antimikrobiyellere karşı iç yüzeyde olan bakterileri korur.
- Biyofilm parçaları zamanla olgun biyofilmden koparak daha geniş yüzeye yayılır ki, bu da tek hücreye nazaran daha kolay bir tutunma gerçekleştirir (Ölmez, 2009). Biyofilmler hem sağlık üzerine hem de endüstriye olan etkileri nedeniyle gıda sanayinde oldukça önem taşımaktadır.

Süt üretim tesislerinde, biyofilmler iki kategoriye ayrılabilir:

- İşletme tesislerine özgü olan ve ürünle doğrudan temas halindeki yüzeylerde oluşan işlem veya proses biyofilmleri;
- Temizlik ve sanitasyonun zayıf olduğu ve kanalizasyon çevresindeki nişlerde olduğu gibi, işletme ortamında oluşan çevresel biyofilmler.

Proses biyofilmleri çevresel biyofilmlerden iki ana yolla farklılık gösterir: İlk olarak, bir işlem biyofilminde, kullanılan işlem birimi belirli bakteri grupları için ortam oluşturduğundan bir veya birkaç tür dominant olabilir. İkincisi, işlem biyofilmleri sıklıkla hızlı büyüme oranları ile karakterize edilir. Buna karşılık, çevresel biyofilmlerin gelişmesi birkaç gün veya hafta sürebilir (Bremer ve ark., 2015).

Bakteriyel biyofilm oluşumunun birkaç adımı vardır: ilk yapışma (yüzeye geri dönüşümlü bağlanma), ikinci yapışma (yüzeye geri dönüşümsüz bağlanma) (Vatan ve Saltoğlu, 2017), mikro-koloni oluşumu (hücre-hücre yapışması), olgun biyofilm oluşumu, biyofilmin kopması ve yayılmasıdır (McLandsborough, 2015). Doğal ortamda mikroorganizmaların doğrudan bir yüzeye bağlı olmadıkları ve uygun yüzeyin üzerinde oluşan ince film tabakasına bağlandıkları bilinmektedir. Biyofilm oluşumunun ikinci aşamasında bakteri hücreleri yüzeyle tam olarak temas kurmamaktadır. Tutunmanın

(yapışma) ilk aşaması olan geri dönüşümlü tutunmada bakteri hücresi ile yüzey arasında zayıf etkileşimler olarak bilinen elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve Van Der Waals güçleri meydana gelmektedir. Yüzeyle ilk temasın gerçekleşmesinde hidrofobik etkileşimler rol oynar. Bu fazda olan bakteriler yüzeyin yakınındadır, ancak henüz yüzeyle temas etmiş değildir. Mikroorganizmalar geri dönüşümlü tutunma aşamasında, yüzeyde yaşamak için yeterli besin maddesinin olup olmadığını araştırdıktan sonra geri dönüşümsüz tutunma aşamasına geçilir (Dıan ve ark., 2016). Mikro-koloni oluşumu, bakteriler herhangi bir fiziksel yüzeye veya biyolojik dokulara yapıştıktan sonra gerçekleşir. Kimyasal sinyaller aracılığıyla bakterilerin çoğalması başlar ve ortamdaki kimyasal sinyallerin yoğunluğunun belirli bir eşik değeri geçmesi ile ekzopolisakkarit üretimi gerçekleşir. Böylece, ekzopolisakkarit matrisinde kimyasal bir sinyal kullanarak bakteri hücre bölünmeleri gerçekleşir ve sonuçta mikro-koloni oluşumu meydana gelir (Taşkan, 2019). En son aşamada ise, mikrokoloniler büyüyerek kompleks yapılara veya kümeler dönüşürler. Bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılırlar. Ayrılma evresi, dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşumun bir parçası olarak da tek bir hücrenin veya birçok hücrenin toplu şekilde kopmasıyla meydana gelebilmektedir (Köküner, 2013).

Bir biyofilm oluşumu üç mekanizmadan biriyle oluşabilir:

- a) Ekli hücrelerin yüzey hareketliliği ile yeniden dağıtılması,
- b) Ekli hücrelerin ikili bölünmesi,
- c) Hücrelerin dökme sıvıdan gelişmekte olan biyofilmlere alınması.

Biyofilm oluşturan bakteriler, bu mekanizmaların tümünü bir kerede veya başka şekilde kullanabilir. Biyofilmlerin yapısal olgunluğa ulaşması 10 gün sürebilir (Agle, 2015).

Biyofilm yapısı ilkel dolaşım sistemine benzer, üç boyutlu olarak EPS ile çevrelenmiş su kanalları ve çok katlı bakteri tabakalarından oluşmaktadır. Mikrokoloniler arasına yayılmış bu su kanalları oksijen ve besin gibi yaşamsal substansları taşımakla beraber, metabolik atıkların uzaklaştırılma işleminde de rol alır (Yıldırım, 2006).

Günümüzde Biyofilmin doğa için herhangi bir faydasının olmadığı fikri ileri sürülmektedir (Bülbül ve Filik, 2019).

2.3.4. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan yöntemler

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve karakterizasyonu endüstriyel, bilimsel ve ticari açıdan yıllardır önemini koruyan, gittikçe daha fazla önem kazanan bir konu haline

gelmiştir. LAB'ların identifikasyonunda kullanılan yöntemler genel olarak fenotipik yöntemler ve moleküler (genotipik) yöntemler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Geleneksel fenotipik yöntemler arasında morfolojik, fizyolojik, metabolik, biyokimyasal özellikler ve kemotaksonomik markörler (hücre yağ asitleri, mikolik asit, polar lipidler, quininer, poliaminler, hücre duvarı bileşikler, ekzopolisakkaritler) ile beraber faj tiplendirmeleri, hücre yüzeyindeki antijenler, antimikrobiyel duyarlılık profilleri ve toplam hücre ya da hücre duvarı proteinlerinin elektroforetik patternleri (1D ya da 2D) yer almaktadır (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011).

Laktik asit bakterilerinin fenotipik olarak tanımlanmasında Gram boyama, katalaz testi, arjininden amonyak üretimi, glikozdan gaz oluşturma, eskülin hidrolizi, karbonhidrat fermentasyon testleri, değişik sıcaklık ve pH değerlerinde üreme, farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme gibi testler uygulanmaktadır (Şengün, 2011).

Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan çeşitli fenotipik yöntemler bir cins içindeki alt türleri ve suşları etkin bir şekilde ayırt etmede çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle LAB'ın tanımlanmasında genotipik özelliklere dayanan moleküler metotlar kullanılır (Adıgüzel, 2008).

Genotipik yöntemler tür seviyesinden, ayrı ayrı suş seviyesine kadar, farklı ayırt etme düzeyine sahiptir. Bunların birçoğu genellikle kontrollü reaksiyon koşulları altında, tasarlanmış primerlerin kullanımı ile hedeflenen DNA kısımlarının büyütülmesine olanak tanıyan polimeraz zincir reaksiyona dayanmaktadır. Moleküler tanımlama testlerine (genotipik yöntemler) plazmid profil analizleri, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR), kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizi, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA-PCR; RAPD-PCR), Vurgulu Alan Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis; PFGE), (Samanır 2014), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemlerini örnek gösterebiliriz. Bu yöntemlerin her biri bakteri izolatlarını cins, tür, alttür ve suş düzeyinde sınıflandırmaya, tanımlamaya ve karakterize etmeye çalışmaktadır. Her yöntemin uygulama, ekipman gereksinimi, tekrar edilebilirlik ve çözüme ulaşmadaki kesinlik düzeyleri açısından avantajları ve dezavantajları vardır. Ancak genellikle, son yıllarda kullanılan DNA'ya dayalı moleküler yöntemler son derece güvenilir, basit ve pahalı olmayan tanımlama ve sınıflandırma yöntemleri olarak değerlendirilmektedir (Yılmaz ve Temiz, 2003).

rRNA' ya spesifik sekanslar için moleküler yöntemler içerisinde geniş çapta kullanılan, sadece kültürlenmiş mikroorganizmaların değil, aynı zamanda henüz kültürlenmemiş mikroorganizmaların da tespit edilmesini sağlayan yöntemlerden biri de Fluorescence in situ hybridization (FISH) yöntemidir. FISH bireysel mikrobiyal hücrelerin eşzamanlı görselleştirilmesi, tanımlanması ve lokalizasyonuna izin veren bir teknik olarak, mikrobiyolojinin her alanında birçok uygulama için yararlıdır (Moter ve Göbel, 2000). rRNA-hedefli nükleik asit problemleri ile yerinde hibridizasyon floresan birkaç saat içinde karmaşık numunelerdeki mikroorganizmaları doğrudan tanımlamak için kullanılabilir, bu nedenle çevresel ve tıbbi mikrobiyolojide yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Wagner ve ark., 2003). Tipik bir FISH protokolü:” numunenin fiksasyonu ve geçirgenliği; hibridizasyon; bağlanmamış probu çıkarmak için yıkama adımları; ve etiketli hücrelerin mikroskopi ile saptanması” adımlarını içerir (Amann ve ark., 2001).

2.3.4.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), bir DNA zinciri üzerinde tespit edilen ilgili hedef nükleik asit dizisinin in vitro şartlarda çoğaltılması amacı ile kullanılan hassas, spesifik ve tekrarlanabilir sonuçların alınmasına imkan sağlayan DNA'ya dayalı moleküler bir tekniktir (Aslan, 2016). PZR kavramı ilk olarak 1974 yılında Panet ve Khorana tarafından tanımlanmıştır.

PZR reaksiyonu sırasıyla; hedef DNA çift zincirinin açılması (denaturation; 94 °C' de 30-90 saniye), primerin bağlanması (annealing; 55-60 °C' de 0.5-2 dakika) ve primerin uzaması (extension; 72 °C' de 1 dakika) olarak üç aşamada gerçekleşmektedir (Çakır ve Çakmakçı, 2005). İşlem sonucu elde edilen PZR ürünlerinin tanımlanmasında genellikle agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmaktadır. Agaroz jel elektroforezle ampikonlar ayrıştırılarak çoğaltılan DNA parçasının büyüklüğü görünür hale getirilir (Gündoğdu, 2016).

PZR moleküler genetik çalışmalarda yer alan, DNA klonlanmasına nazaran daha az zahmetli ve kısa sürmesi sebebiyle geliştirilen, farmasotik, klinik, antropoloji, arkeoloji, ziraat gibi birçok uygulama alanlarında kullanılan bir yöntem olarak bilinmektedir (Okutucu ve Pehlivan, 2003). Polimeraz zincir reaksiyonu aynı zamanda basitlik, verimlilik, maliyet, hız ve uygunluk bakımından gıda mikrobiyolojisinde de sık sık tercih edilen bir yöntemdir. Günümüzde otomasyon sayesinde PZR reaksiyonları, birkaç dakikadan birkaç saate kadar olan sürede, yüksek miktarda belirli ve güvenilir bir DNA sekansı veren termosikler içinde kurulmaktadır (Fairchild ve ark., 2006).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Süt ürünleri

Tablo 3.1. *Örneklerin özellikleri*

Örnek adı	Çeşidi	Tuzluluk derecesi	Yağlılık derecesi
Gedebey ₁ peyniri	Beyaz peynir	Az Tuzlu	Orta Yağlı
Gedebey ₂ peyniri	Beyaz peynir	Orta Tuzlu	Orta Yağlı
Naxçıvan peyniri	Beyaz peynir	Az Tuzlu	Az Yağlı
Ordubad peyniri	Beyaz peynir	Az Tuzlu	Az Yağlı
İvanovka peyniri	Beyaz peynir	Orta Tuzlu	Yağlı
Garabağ Motal peyniri	Tulum peyniri	Tuzlu	Yağlı
İvanovka kesmik	Ekşimik tarzı	Tuzsuz	Yağlı

3.1.2. Besi ortamları

3.1.2.1. M17 Agar (1.15108 Merck)

Besiyeri içeriği 1000 ml distile suda çözüldükten sonra, pH $7,2 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilliği sağlanmıştır (http-1).

Tablo 3.2. *M17 Agar içeriği*

Malzeme	g/L
Soya peptonu	5,0 g/L
Et peptonu	2,5 g/L
Kasein peptonu	2,5 g/L
Maya ekstraktı	2,5 g/L
Et ekstraktı	5,0 g/L
D (+) laktoz	5,0 g/L
Askorbik asit	0,5 g/L
Sodium β -glycerophosphate	19,0 g/L
Magnesium sulfate	0,25 g/L
Agar-agar	12,75 g/L

3.1.2.2. *M-17 Broth (1.15029 Merck)*

Besiyeri içeriği 1000 ml distile suda çözüldükten sonra, pH $7,2 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (http-2).

Tablo 3.3. *M-17 Broth içeriği*

Malzeme	g/L
Kasein peptonu	2.5 g/L
Et peptonu (peptic)	2.5 g/L
Soya peptonu (pepainic)	5 g/L
Maya ekstraktı	2.5 g/L
Et ekstraktı	5 g/L
Sodium β -glycerophosphate	19 g/L
Magnesium sulfat	0.25 g/L
Askorbik asit	0.5 g/L
Lactose mono-hydrate	5,0 g/L

3.1.2.3. *MRS AGAR (Lactobacillus Agar acc. DE MAN, ROGOSA and SHARPE (MRS) agar (Oxoid)). (1.10660 Merck)*

Ticari olarak (1.10660. Merck) satılan besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $5,4 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (http-3).

Tablo 3.4. *MRS Agar içeriği*

Malzeme	g/L
Kasein peptonu	10,0 g/L
Et ekstraktı	10,0 g/L
Maya ekstraktı	4,0 g/L
D (+) Glucose	20,0 g/L
K ₂ HPO ₄	2,0 g/L
Tween 80	1,0 g/L
Di-Ammonium hidrojen sitrat	2,0 g/L
Sodyum asetat	5,0 g/L
MgSO ₄	0,2 g/L

Tablo 3.4 (Devamı)*MRS Agar içeriği*

Malzeme	g/L
Agar-agar	14,0 g/L
MnSO ₄	0,04 g/L

3.1.2.3.1. MRS agar %6,0 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilen MRS agar besiyeri içerisine 60gr/1000 ml olacak şekilde sodyum klorür eklenmiş ve distile suda çözüldükten sonra 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (Uyar, 2018).

3.1.2.3.2. MRS agar %7,5 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilen MRS agar besiyeri içerisine 75gr/1000 ml olacak şekilde sodyum klorür eklenerek distile suda çözüldükten sonra 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilliği sağlanmıştır (Er, 2016).

3.1.2.3.3. MRS agar %10 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilen MRS agar besiyeri içerisine 100gr/1000 ml olacak şekilde sodyum klorür eklenerek, pH 5,4’e ayarlanmış ve içerik distile suda çözüldükten sonra 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilliği sağlanmıştır (Pektaş, 2014).

3.1.2.4. MRS broth (1.10660. Merck)

Ticari olarak (1.10660. Merck) satılan besiyeri içeriği 1000ml distile suda 52,2 g çözüldükten sonra, pH 6,2± 0,2’ye ayarlanmış ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir (http-4)

Tablo 3.5. *MRS broth içeriği*

Malzeme	g/L
Kazein pefptonu	10,0 g/L
Et ekstraktı	8,0 g/L
Maya ekstraktı	4,0 g/L
D(+) Glikoz	20,0 g/L
K ₂ HPO ₄	2,0 g/L
Tween 80	1,0 g/L
Di-Ammonium hidrojen sitrat	2,0 g/L
Sodyum asetat	5,0 g/L
MgSO ₄	0,2 g/L

Tablo 3.5. (Devamı)*MRS broth içeriği*

Malzeme	g/L
MnSO ₄	0,04 g/L

3.1.2.5. Plate count agar (PCA) (Merck 1.05463)

Ticari olarak (Merck 1.05463) satılan besiyeri içeriği 22,5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilmiş, pH'sı 7,0±0,2' e ayarlanarak 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir (Halkman ve Sağdaş, 2014).

Tablo 3.6. *Plate Count Agar içeriği*

Malzeme	g/L
Kazein peptonu	5,0 g/L
Maya ekstraktı	2,5 g/L
D(+) Glikoz	1,0 g/L
Agar-agar	14,0 g/L

3.1.2.6. Potato dextrose agar (PDA) (Merck 1.10130)

Ticari olarak (Merck 1.10130) satılan dehidre besiyeri, 39,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilmiş, pH'sı 5,6±0,2 ayarlanarak 121°C'de otoklavda 15 dakika sterilize edilmiştir (http-5).

Tablo 3.7. *Potato Dextrose Agar içeriği*

Malzeme	g/L
Patates infizyonu	4,0 g/L;
D(+) Glikoz	20,0 g/L;
Agar-agar	15,0 g/L

3.1.2.7. Violet red bile agar (VRBA) (Merck 1.01406)

Ticari olarak (Merck 1.01406) satılan dehidre besiyeri, 39,5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde karıştırılarak pH'sı 7,4±0,2'e ayarlanmış ve kaynamaya bırakılmıştır. Kaynama başladıktan sonra en çok 2 dakika daha kaynama sıcaklığında tutulup, sterilliği sağlanmıştır (http-6).

Tablo 3.8. Violet Red Bile Agar içeriği

Malzeme	g/L
Et peptonu	7,0 g/L;
Maya ekstraktı	3,0 g/L;
Laktoz	10,0 g/L;
NaCl	5 g/L;
Ox Bile (Bile Salt Mixture)	1,5 g/L;
Neutral Red	0,03 g/L;
Kristal Violet	0,002 g/L;
Agar-agar	13,0 g/L

3.1.2.8. Kongo kırmızılı agar

Tüm maddeler 1 litre distile su içerisinde eritilip otoklavda 121°C'de otoklavda 15 dakika steril edilmiştir (Kaiser ve ark., 2013), (Aydınlı ve ark., 1996).

Tablo 3.9. Kongo kırmızılı agar içeriği

Malzeme	g/L	Marka
Agar	10 g	Merck
Sükroz	50 g	(Fisher Chemical)
MRS broth	52,2 g	(1.10660. Merck)
Kongo kırmızısı	8 g	Sigma

3.1.2.9. Mueller- hinton broth (Merck 1.10293)

Dehidre besiyeri 21,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilerek otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanmış besiyerinin 25 °C'de pH'sı 7,4±0,2'dir (http-7).

Tablo 3.10. MH Broth içeriği

Malzeme	g/L
Meat infusion	2,0 g
Casein hydrolysate	17,5 g
Starch	1,5 g

3.1.2.10. Mueller-hinton agar (Merck 1.05437)

Dehidre besiyeri, 34,0 g/L konsantrasyonda damıtık su içinde ısıtılarak eritilmiş ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Hazırlanmış besiyerinin 25 °C'de pH'sı 7,4±0,2'dir (http-8).

Tablo 3.11. *MH Agar içeriği*

Malzeme	g/L
Meat infusion	2,0 g
Casein hydrolysate	17,5 g
Starch	1,5 g
Agar-agar	13,0 g

3.1.3. Kullanılan çözeltiler

3.1.3.1. Fizyolojik tuzlu su (%0.85 'lik sodyum klorür çözeltisi)

Fizyolojik tuzlu su çözeltisi sodyum klorür distile su içerisinde çözülerek kullanılmıştır (http-9).

Tablo 3.12. *Fizyolojik tuzlu su içeriği*

Malzeme	g/L
Sodyum klorür (NaCl)	85 g
Distile su	1000 ml

3.1.3.2. %20'lik gliserol çözeltisi

Gliserol ve distile su karıştırılıp 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra kullanılmıştır (Uyar, 2018).

Tablo 3.13. *%20'lik gliserol çözeltisi*

Malzeme	g/L
Gliserol	20 ml
Distile su	80 ml

3.1.3.3. %3' lük H₂O₂ çözeltisi

0,1 mL saf (%35) hidrojen peroksit alınıp distile su ilavesi ile 30 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 1 mL başka bir erlene alınmış ve tekrar distile su ile 30 mL'ye tamamlanmıştır (Er, 2016).

3.1.4. Kullanılan boyalar

3.1.4.1. Kristal violet

Kristal violet 10 ml etil alkol içerisinde çözölmüştür. Daha sonra üzerine ayrı bir şişede 20 ml distile su içerisinde çözölmüş olan amonyum oksalat eklenmiştir. Karışım filtreden geçirilerek kullanılmıştır (Pektaş, 2014).

Tablo 3.14. *Kristal violet içeriği*

Malzeme	g/L
Kristal violet	2,0 g
Amonyum Oksalat	0,2 g
Distile su	20 ml
Etil Alkol (%95)	20 ml

3.1.4.2. Safranin

Safranin alkol içerisinde çözödüldükten sonra üzerine distile su ilave edilmiş ve 24 saat sonunda çözelti filtre kâğıdından geçirilerek süzülmüştür (Pektaş, 2014).

Tablo 3.15. *Safranin*

Malzeme	g/L
Safranin	0,25 g
Etil alkol (%95)	10 ml
Distile su	100 ml

3.1.4.3. Lugol

Potasyum iyodür 30 ml distile suda çözölmüş ve üzerine iyot eklenmiştir. Çözelti distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır (Funda, 2009).

Tablo 3.16. *Lugol içeriği*

Malzeme	g/L
İyot	5 g
Potasyum iyodür (KI)	10 g
Distile su	100 ml

3.1.5. Kullanılan kimyasallar

Tablo 3.17. *Kullanılan kimyasallar ve markaları*

Kimyasal	Marka
MQ su	Gibco
Agarose	Sigma
10X TAE çözeltisi	Fisher
PCR Mix	Biolabs
PCR DNA Marker	İnvitrogen
Tris-HCl	Sigma
EDTA	Gibco
SDS	Amresco
Lizozim	Sigma
Proteinaz K	Sigma
Fenol-Kloroform-İzoamil alkol	Amresco
Etanol	Riedel de Haen
İzopropanol	Sigma
CTAB	Amresco
Tris base	Sigma
EDTA (0.5 M pH 8)	Amresco
SDS-Page için Marker	Sigma
Acrylamide/ bis-acrylamide (%30)	Sigma
Temed	Fluka
NaCl	Sigma
5M NaCl	Promega
PBS 10x	Multicell
Formamide	Promega
UltraPure Distilled Water (DNase, RNase, Free)	İnvitrogen
DAPI	Sigma

3.1.6. Kullanılan antibiyotikler

Tablo 3.18. *Kullanılan antibiyotikler ve markaları*

Antibiyotik	Firması
Siprofloksasin	Himedia
Penisilin-G	Himedia
Gentamisin	Himedia
Nalidixic Acid	Bioanalyse
Vancomycin	Himedia
Clindamycin	Oxoid
Azitromisin	Himedia
Rifampisin	Himedia

3.1.7. Kullanılan test bakterileri

Çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları ‘‘*Bacillus cereus*, *Esheria coli* (ATCC 35218), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29123), *Salmonella typhi*’’ Anadolu Univ. Eczacılık Fakültesinden elde edilmiştir.

3.1.8. Toplam nükleik asit ekstraksiyonu için ekstraksiyon tamponu

Ekstraksiyon tamponu kullanılmadan önce pH’sı 8.0’a ayarlanmalıdır (Poyraz, 2018).

Tablo 3.19. *Toplam Nükleik Asit Ekstraksiyonu İçin Ekstraksiyon Tampon içeriği*

Madde	Miktar
100 mM EDTA	1.5760 gr
100 mM Tris-HCl	0.7880 gr
MQ su	100 ml

3.1.9. SDS -PAGE için gerekli malzemeler

Tablo 3.20. *Kullanılan jeller ve içerikleri*

Madde	%12 Ayırma jeli 10 ml
H ₂ O	3.3 ml
%30 akrilamid karışımı	4 ml

Tablo 3.20. (Devamı)Kullanılan jeller ve içerikleri

Madde	%12 Ayırma jeli 10 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml
%10 SDS	0.1 ml
%10 Amonyum persülfat	0.1 ml
TEMED	0.004 ml

Tablo 3.21. *Yükleme jeli*

Madde	Yükleme jeli 3 ml
H ₂ O	2.1ml
%30 akrilamid karışımı	0.5 ml
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.38 ml
%10 SDS	0.03 ml
%10 Amonyum persülfat	0.03 ml
TEMED	0.003 ml

Tablo 3.22. *Jel Tamponları*

Madde	Ayırma jeli için kullanılan buffer (1.5 M Tris pH:8.8)	Yükleme jeli için kullanılan buffer (1M Tris pH: 6.8)
Tris -base (sigma)	18,16 g	12,11 g
Ultra saf su (deiyonize su)	100 ml	100 ml

Buffer'ların pH'ı 3N HCl' la ayarlanmıştır (Erbulucu, 2012).

Tablo 3.23. %10 SDS (sodyum dodesil sülfat) Solüsyonu (Bölükbaş, 2007)

Madde	Miktar
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	10 g
Distile su	100 ml

Tablo 3.24. %10 Amonyum persülfat Solusyonu (APS) (Bölükbaş, 2007)

Madde	Miktar
Amonyumpersülfat	10 g
Distile su	100 ml

Tablo 3.25. Boyama solüsyonu (%0.025 coomassie blue R-250, %40 methanol) (Ateş, 2017)

Madde	Miktar
Coomassie blue R-250	0.5 g
Methanol	800 ml
Acetic acid	140 ml
Distile su	2000 ml

Tablo 3.26. 10x SDS Running Buffer (Yürütme tamponu)

pH 8.3 olarak ayarlanmıştır (Üzümcü, 2009).

Madde	Miktar
25mM Trisma-Base	3 g
192 mM Glycine	14,4 g
%10' luk SDS	1 g
Distile su	1000 ml

Tablo 3.27. 4x Loading sample buffer (10 ml)

4x Loading sample buffer 1x'e dönüştürülerek kullanılmıştır (Üzümcü, 2009).

Madde	Miktar
1 M Tris- HCl (pH 6.8)	2 ml
SDS	0.8 g
100% Glycerol	4 ml
14.7 M β - mercaptoethanol	0.4 ml
Bromophonol blue	8 mg
0.5 M EDTA	1 ml

3.1.10. FISH tamponları

Tablo 3.28. *FISH Hibridizasyon Tamponu (Amann ve ark.,1990)*

Madde	Miktar
1M-Tris-HCl (pH 8)	40 µl
5M-NaCl	360 µl

Tablo 3.28. *(Devamı)FISH Hibridizasyon Tamponu (Amann ve ark.,1990)*

Madde	Miktar
Formamide	700 µl
%10 SDS	2 µl
MQ su	900 µl

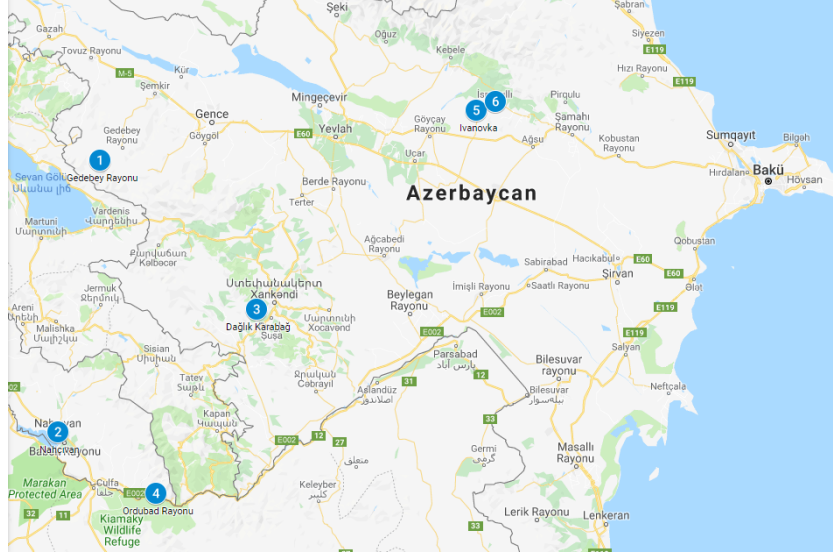
Tablo 3.29. *FISH yıkama Tamponu (Amann ve ark.,1990)*

Madde	Miktar
1 M Tris-HCl (ph8)	1 ml
5M-NaCl	700 µl
0,5 M EDTA	500µl
MQ su	50 ml

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin toplanması ve muhafaza edilmesi

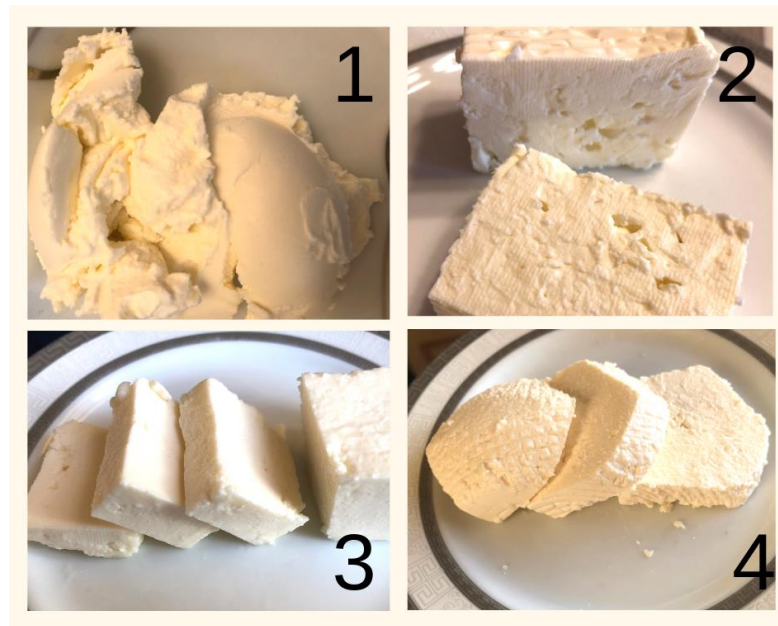
Bu çalışmada Azerbaycan'ın farklı yörelerine ait süt ürünleri (peynir ve kesmik) gerekli koşullar altında laboratuvara getirildikten sonra (+) 4° C'de muhafaza edilmiştir. Şekil 3.1'de olan numaralandırılmış noktalar örneklerin aldığı lokasyonları göstermektedir.



Şekil 3.1. Azerbaycan Haritası ve Örneklerin alındığı lokasyonlar

Örnekler:

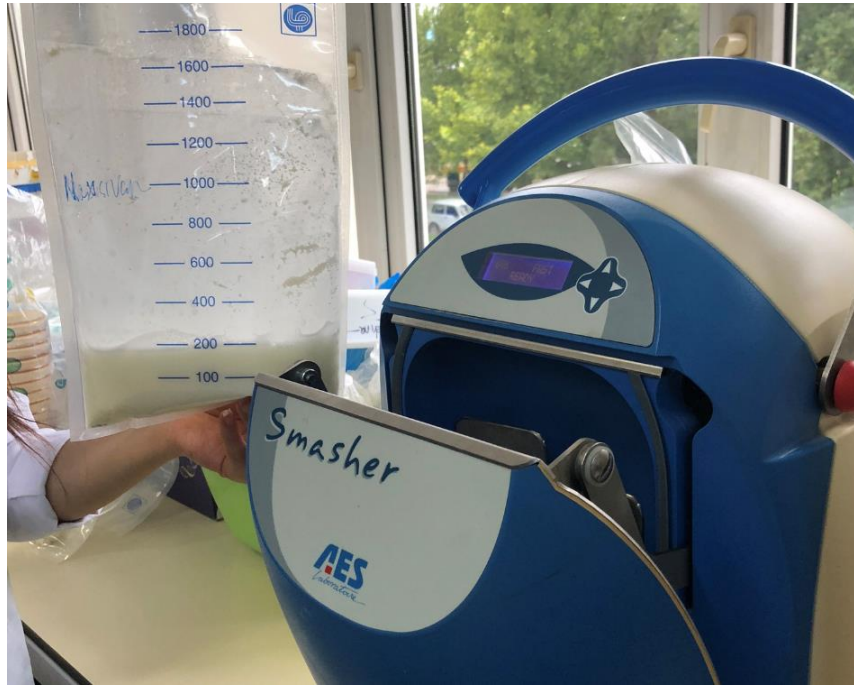
1. Gedebe₁ peyniri (GDP₁)
2. Gedebe₂ peyniri (GDP₂)
3. Naxçıvan peyniri (NP)
4. Garabağ Motal peyniri (MP)
5. Ordubad peyniri (OP)
6. İvanovka peyniri (PİV)
7. İvanovka kesmik (KİV)



Şekil 3.2. Süt ürünleri (peynir ve kaymak)

3.2.2. Homojenize işlemi

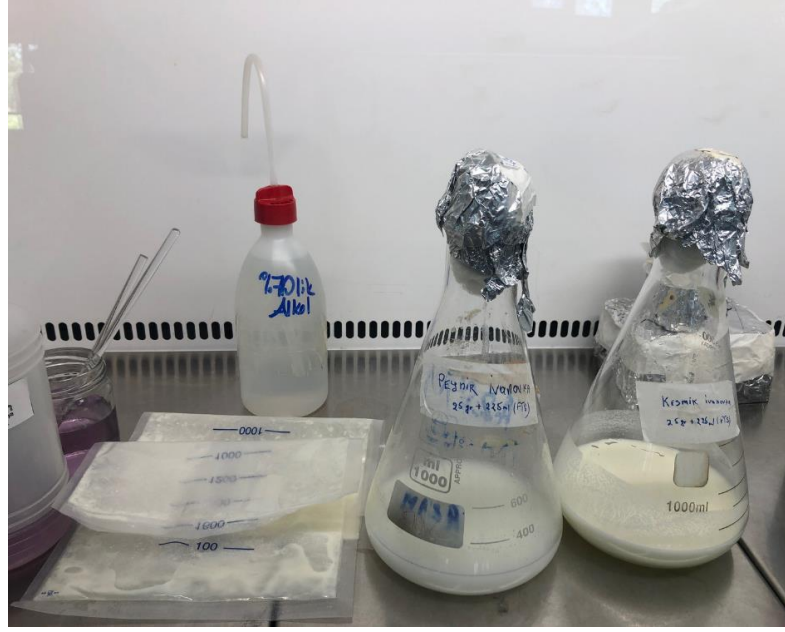
Laktik asit bakterisi izolasyonu amacıyla toplanan örneklerden ilk aşama olarak homojenize işlemi yapılmıştır. Bu işlem için örneklerden steril koşullar altında her biri 25 gram olmakla hassas terazide tartım yapılmıştır. Tartım sonrasında steril kabinde örnekler önceden hazırlanmış 225ml %0,85 NaCl içeren Fizyoloji Tuzlu Su (FTS) ile karıştırılarak filtreli membran torbaya dökülmüş (stomacher torbası) ve stomacher cihazında en az 60 saniye olmak koşulu ile homojenize hale getirilmiştir (Pichart, 2004).



Şekil 3.3. Stomacher cihazı

3.2.3. Dilüsyon hazırlama (seyreltme işlemi)

Yaptığımız çalışmada örneklerin 10^{-1} - 10^{-7} e kadar seyreltme işlemi yapılmıştır. Önceden steril edilmiş tüplere her biri 9 ml olmakla FTS aktarılmıştır. Homojenize edilmiş örnekler 10^{-1} dilüsyonu olarak kabul edilmiş ve bunu takiben 10^{-1} dilüsyonundan 1 ml alınarak içerisinde 9 ml FTS olan tüpe ekleyip 10^{-2} dilüsyonu elde edilmiştir. Aynı şekilde devam ederek diğer dilüsyonlar (10^{-7} e kadar) hazırlanmıştır (Halkman, 2005).



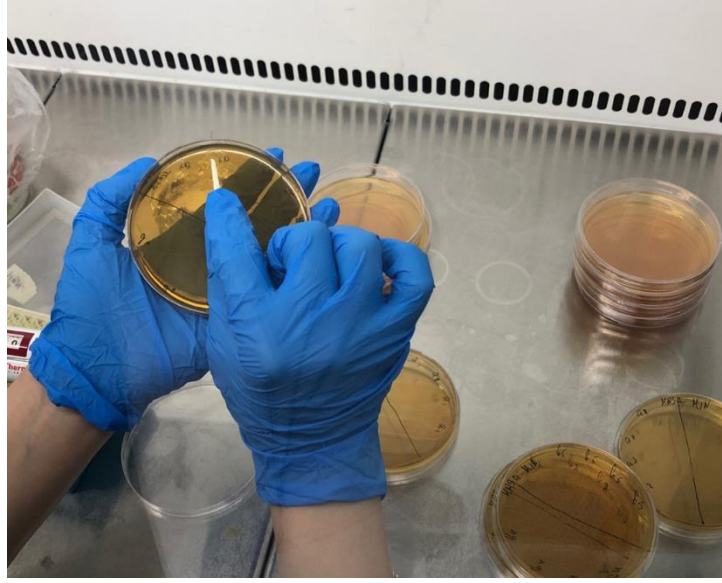
Şekil 3.4. Örneklerden hazırlanan 10^{-1} dilüsyonu

3.2.4. Ekim

Hazırladığımız dilüsyonlardan (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} dilüsyonları) MRSA (De Man Rogosa Sharpe, Merck Agar), M17A, PDA (Potato Dextrose Agar), VRBA, PCA katı besiyerlerine 100 μ l ekleyerek drigalski spatülü yardımı ile çift paralel şekilde yayma plak yöntemi ile ekim yapılmış, aerobik ve anaerobik koşullarda uygun dereceli etüvlerde inkübasyona kaldırılmıştır (Tunalı, 2014).



Şekil 3.5. Ekim hazırlıkları ve ekim işlemi



Şekil 3.6. Çizgi Ekim

3.2.5. Bakteri Sayımı

Yapmış olduğumuz bu çalışmada bakteri sayımı için 2 yöntem kullanılmıştır. Bunlardan biri klasik geleneksel yöntem, diğeri Tempo sayım yöntemidir.

3.2.5.1. Klasik sayım yöntemi

Klasik sayım yöntemi uzun yıllardan beri kullanılan bir yöntem olup, ekim sonrası inkübasyon sonucu katı besiyerinde canlı hücrelerin koloni oluşturması ve bu kolonilerin sayılarak örnekteki canlı hücre sayısının hesaplanması esasına dayanır. Koloni sayısı 30-300 arası olan petrilerin işleme alınması gerekir. Sayım sonucu katı besiyerinde olan toplam koloni sayısı seyreltme faktörü ile çarpılarak hesaplanma yapılır (Güven ve Zorba, 2016).

Tablo 3.30. Klasik sayım yöntemi

Klasik sayım yöntemi			
Bakteri çeşidi	Kullanılan Besiyeri	İnkübasyon derecesi	İnkübasyon süresi
TMAB	PCA	30 °C	48 saat
TC	VRBA	37 °C	24 saat
YM	PDA	27 °C	3-5 gün
LAB	MRSA & M17A	30± 1 °C	48-72 saat

3.2.5.1.1. Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı

Örneklerin TMAB sayımı için, Plate Count agar (PCA) besiyeri kullanılmıştır (Sezen, 2007). Uygun dilüsyonlardan çift paralel şekilde yayma plak yöntemi ile ekim yapılmış, 30 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir (Halkman, 2005). Inkübasyondan sonra koloni içeren petriler sayılarak seyreltim faktörüyle çarpılmış ve sayılar kaydedilmiştir.

3.2.5.1.2. Koliform grubu bakteri sayımı

Örneklerin koliform grubu bakteri sayımı için Violet Red Bile agar (VRBA) kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan çift paralel şekilde yayma plak yöntemi ile VRBA besiyerine ekim yapılmış ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Tekinşen ve ark., 1993). Inkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılmış ve dilüsyonu faktörü ile çarpılmıştır.

3.2.5.1.3. Maya – küf sayımı

Maya ve küf sayımı için Potato Dextrose agara (PDA) yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır (Kaya ve Zorba, 2018). Ekim yapılan plaklar 25 °C’de 5-7 gün inkübasyona bırakılmış ve inkübasyondan sonra koloniler sayılarak maya ve küf sayısı bulunmuştur (Halkman, 2005).

3.2.5.1.4. LAB sayımı

LAB sayımı için Man Ragosa Sharpe agar (MRS agar) ve M17 agar kullanılmıştır (Durak ve ark., 2015). Yayma plak yöntemiyle ekim yapılmış, 30 ± 1 °C’de 48-72 saat inkübe edilmiş ve koloni içeren petriler sayılmıştır.

3.2.5.2. Tempo sayım yöntemi

Otomatik sayım yöntemi Tempo BioMeriux cihazı yardımıyla mevcut Tempo kitleri ile gerçekleştirilmiştir. Kitler kartuş ve besiyerinden oluşur. Toplam 8 Tempo kiti vardır: CC, EB, TC, EC, STA, AC, LAB ve YM.



Şekil 3.7. Tempo kartuşları



Şekil 3.8. Besiyerlerinin kartuşlara doldurulma işlemi

Öncelikle hazırlık aşaması yapılmıştır. Bu aşamada uygun koşullarda laboratuvara getirilen örneklerden (peynir ve kesmik örn.) hassas terazide 25 gr tartım yapılmış ve 225 ml FTS ile karıştırılarak stomacher cihazında 60 saniye sürecinde homojenize hale getirilmiştir. Hazırlanan karışım (1:10) 10^{-1} dilüsyonu olarak kabul edilmiş ve işlemlere bu dilüsyon üzerinden devam edilmiştir.

Sonraki aşama Tempo Hazırlık istasyonu (Tempo PRep) bilgisayarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada ise bilgisayarda sırasıyla besiyeri, kartuş okutma işlemi yapılır ve buna esasen dilüsyon aralığı (1/40; 1/400) seçilir. Dilüsyon birimi cfu/ml şeklinde ayarlanır. Belirlenen dilüsyon aralığı 1/40 ise 3ml distile su +1ml örnek, eğer 1/400 ise 3.9ml distile su + 0.1ml örnek besiyerlerine aktarılır. Aktarma işlemi bittikten

sonra besiyeri şişeleri yaklaşık 3-5 saniye vortex cihazı yardımıyla karıştırılarak homojenize hale getirilir. Sonrasında kartuşlar besiyeri içerisine yerleştirilerek Rak yardımı ile Tempo Doldurucusu cihazına koyulur. Bu cihaz yardımı ile besiyeri + örnek karışımı kartuşlara doldurulur. Son aşama olarak kartuşlar uygun dereceli etüvlere kaldırılarak inkübasyona bırakılır. Tablo 3.31’de Tempo kitleri ve uygun dereceli inkübasyon süreçleri gösterilmiştir:

Tablo 3.31. Tempo Sayım Yöntemi

Tempo Kiti	İnkübasyon süresi	İnkübasyon derecesi
<i>Coliform Count (CC)</i>	24-27 saat	37 °C
<i>Enterobacteriaceae (EB)</i>	24-27 saat	37 °C
<i>Total Coliform (TC)</i>	24-27 saat	37 °C
<i>E.Coli (EC)</i>	24-27 saat	37 °C
<i>Staphylococcus aureus (STA)</i>	24-27 saat	37 °C
<i>Aerobic Count (AC)</i>	48 saat	30 °C
<i>Lactic Acid Bacteria (LAB)</i>	48 saat	30 °C
<i>Yeast/Mold (YM)</i>	72-76 saat	27 °C

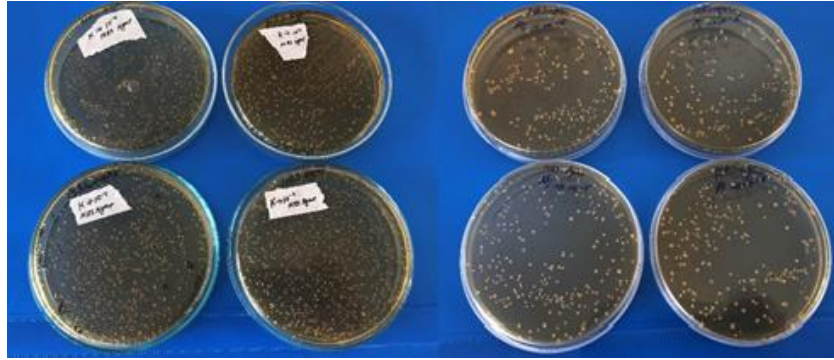
İnkübasyon süreci bittikten sonra Tempo Okuma cihazında (Tempo Reader) okutma işlemi yapılmış, sayım belirlenmiş (http-10), Azerbaycan ve Türk Gıda Kodeksi Tebliğine göre değerlendirme yapılmıştır.

3.2.6. İzolasyon

MRS ve M17 agarlarda üreyen kolonilerden sayım yapıldıktan sonra her bir besiyerinden LAB’ ne benzer koloniler rastgele seçilmiştir. Seçilen koloniler, MRS Agardan alınanlar MRS brotha; M17 Agardan alınanlar M17 brotha ekilmiştir (Kara ve Akkaya, 2015). Daha sonra tekrar brotlardan agarlara çizim ekimi yapılarak koloniler saflaştırılmıştır (Pichart, 2004). Bu aşamadan sonra elde ettiğimiz saf kültürleri diğer testlerde kullanabilmek için %20’lik gliserol çözeltisinde -80° C’de muhafaza edilmiştir (Yiğit, 2009).



Şekil 3.9. İzolat stokları



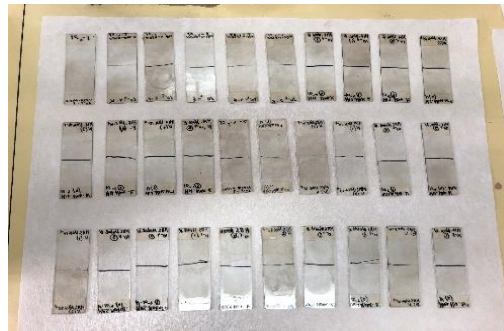
Şekil 3.10. Saf kültürler

3.2.7. İzolatların tanımlanması (morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi)

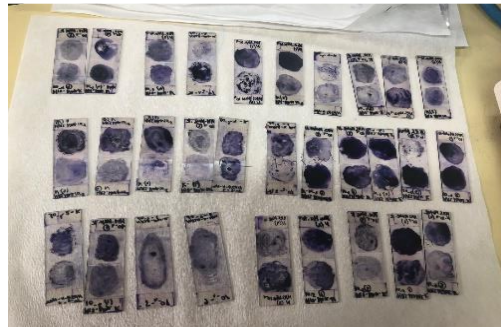
3.2.7.1. Gram Boyama

İzolatların, Gram özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, Christian Gram tarafından geliştirilmiş (1884) olan Gram boyama tekniği kullanılmıştır (Karahana ve ark., 2002). Bunun için, canlanan kültürlerden (48 saat) öze yardımıyla 1 tutam alıp, distile su ile karıştırarak lam üzerine iyice yayarak, preparat hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar, havada kurutularak, bek alevinde fikse edilmiştir (Bostancı, 2019). Fikse edilen

preparatlara 1 dakika kristal viyole boyası, 1 dakika lügol-iyot çözeltisi, 15 saniye %96-
lık alkol, 30 saniye safranin boyası ile müdahale edilmiştir. Her boyama aşamasından
sonra preparat distile su ile yıkanmıştır. Boyama işlemi bittikten sonra preparat havada
kurutulmuş, 1 damla immersiyon yağ damlatılıp ışık mikroskopunun 100' lük objektifi
ile incelenmiştir. Mikroskopta incelenen sonuçlara göre mor renkli bakteriler Gram (+),
pembe renkli olanlar ise Gram (-) olarak kabul edilir (Karahana ve ark., 2002).



Şekil 3.11. *Boyama için hazır preparatlar*



Şekil 3.12. Gram boyama yöntemi ile boyanmış preparatlar

3.2.7.2. Katalaz Testi

İzolatların biyokimyasal özelliklerini incelemek amacıyla katalaz testi yapılmıştır. 48 saatlik canlanan kültürlerin katalaz enzimine sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla izolatlar temiz bir lam üzerine alınıp %3'lük H₂O₂ çözeltisi damlatılmıştır. Gaz kabarcıklarının oluşumu katalaz testi açısından pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Bell ve ark., 2005). Laktik Asit Bakterileri Katalaz negatif oldukları için katalaz pozitif olan izolatlar elenmiştir (Özteber, 2013).

3.2.7.3. Antimikrobiyal etkinin belirlenmesi

Rastgele seçilen izolatların antimikrobiyal etkisini belirlemek amacıyla agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. 10ml MRS Broth'da canlandırılmış 24-48 saatlik

kültürler 10000 rpm’ de 10 dakika 4 °C’ de santrifüj edilmiş ve süpernatant elde edilmiştir. Daha sonra süpernatantları 0,45 µl por çaplı membran filtreden süzölmüştür (Demir, 2014).

Kullanılan test bakterileri – *E.coli*, *S. Aureus*, *S.typhi*, *B.cereus* uygun derecelerde 24 saat MH Broth’ da canlandırılmış ve 0,1 ml MH agar üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Daha sonra agar üzerinde mantar delici yardımıyla delikler açılmış ve her kuyucuğa 100 µl farklı bakteri süpernatantı eklenmiştir. 2 saat süpernatantın emilmesi beklendikten sonra petriler 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Al-Bayati, 2014; Sezer, 2007).

3.2.7.4. Farklı sıcaklıklarda gelişim

Gram pozitif, Katalaz negatif olarak seçilen, en büyük antimikrobiyal etki gösteren izolatların farklı sıcaklıklarda toleransının belirlenmesi için 48 saatlik aktif kültürlerden MRS agar petrilere inokülasyon yapılarak, 48 saat süreyle 4°C, 15°C, 30°C ve 45°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Belirlenen sürenin sonunda kültür gelişimi kontrol edilerek farklı sıcaklıklarda gelişim değerlendirilmiştir (Funda, 2009).

3.2.7.5. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim

Gram pozitif, Katalaz negatif olarak seçilen, en büyük antimikrobiyal etki gösteren izolatların tuza karşı olan toleranslarının belirlenmesi için; sırası ile %6, %7,5 ve %10 oranında tuz içeren MRS agar ortamı hazırlanmış ve 48 saatlik aktif kültürlerden her üç ortama inokülasyon yapılarak izolatlar 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu izolatların farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişimi derecelendirilerek sonuçlar değerlendirilmiştir (Holt ve ark., 2000).

3.2.7.6. pH; 3,9 gelişim

Seçilen izolatların yüksek asitliğe sahip ortamda gelişip gelişmediğini belirlemek amacıyla; MRS broth besiyerinin pH’sı 1M HCl ve 1M NaOH yardımı ile 3,9’a ayarlanarak 121 °C 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Mevcut izolatların 48 saatlik aktif kültürlerinden pH sı 3,9’a ayarlanmış MRS broth besiyerine inoküle edilmiş ve izolatlar 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreci sonunda bulanıklık görülen tüpler pozitif, bulanıklık görülmeyen tüpler ise negatif olarak değerlendirilmiştir (G-Allegria ve ark., 2004).

3.2.7.7. *pH; 9,6'da gelişim*

Seçilen izolatların pH 9,6'da gelişip gelişmediğini belirlemek için MRS broth besi ortamının pH'sı 1M HCl ve 1M NaOH ile 9,6'ya ayarlanmış, 121 °C 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Mevcut izolatların 48 saatlik aktif kültürlerinden hazırlanan MRS broth besi ortamına inokülasyon yapılarak izolatlar 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Belirtilen süre sonunda bulanıklık görülen tüpler pozitif, bulanıklık görülmeyen tüpler ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Ertekin ve Çon, 2014).

3.2.8. **Biyofilm oluşumu**

48 saatlik canlanan kültürler %10 sükröz ve Kongo kırmızısı içeren MRS ortamına inoküle edilmiş ve 37 °C'de 24 saat aerobik olarak inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda gelişen kültürlerin morfolojik görünüşleri incelenmiştir. İzolatlardan siyah renkli koloniler pozitif (Tsvetoslava ve ark., 2017), renk değiştirmemiş olan sarı renkli koloniler negatif değerlendirilmiştir (Kıvanç ve Erikçi, 2018).

Biyofilm içindeki bakteriler antibiyotiklere, antimikrobiyalere ve bağışıklık sistemine direnç gösterir (Kırmusaoğlu, 2017).

3.2.9. **PCR**

İzolatların genotipik tanımlanması için kullandığımız PCR işleminde ilk aşama olarak kalıp DNA hazırlanmıştır. Bunun için 24-48 saatlik taze kültür kullanılmıştır. Saf kültürden kürdan yardımıyla bir parça alınarak içerisinde 200µl MQ (Nucleaz Free) su olan PCR tüplerine eklenmiş ve çözündürülmüştür. Sonrasında hücrelerin lize edilmesini sağlamak için 10 dakika 96 °C'de PCR cihazına yerleştirilmiştir. Bir sonraki adım olarak her bir PCR tüpüne 12.5 µl 1x Master Mix, 9.5 µl su (MQ su), 1µl 27F Forward primer, 1µl 1492 R Reverse primer, 1 µl kalıp DNA eklenmiş ve toplam 25 µl ' ye tamamlanmıştır. En son PCR tüpleri PCR cihazına yerleştirilerek "Bacter 50" programında yürütülmüştür. Bu programa esasen:

- Denaturasyon- 94 °C'de- 3 dakika
- (30x)- Denaturasyon- 94 °C'de- 30 san; Bağlanma- 50 °C'de-1 dakika; Uzama – 72 °C' de- 2 dakika,
- (1x)- Final uzama- 72 °C'de 10 dakika' dır (Ramadan, 2014 protokolü modifiye edilmiştir).

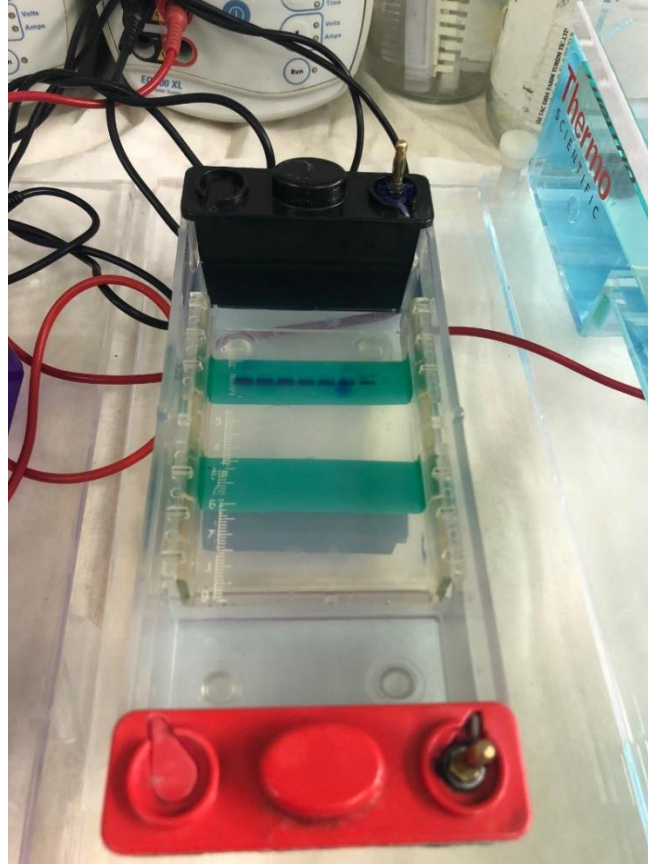


Şekil 3.13. Applied Biosystem Thermal Cycler cihazı

3.2.9.1. Agaroz jel elektroforez

PCR işlemi sonucu elde edilen PCR ürünlerinin gerekli bant oluşumunu tespit etmek amacıyla Agaroz jelde yürütülmüştür. Örnek sayısına esasen tabla ölçüsü belirlenmiş ve %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır.

Jel hazırlarken 1gr agaroz hassas terazide tartılmış, üzerine 100 ml 1x TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) eklenmiş ve homojen bir karışım elde edilene kadar ısıtılmıştır. Sonra hazırlanan jelin çok sıcak olmaması koşulu ile içerisine GelRed Nucleic Acid Stain boya eklenip tablaya aktarılmış, üzerine tarak takılarak yaklaşık 20 dakika donması beklenmiştir. 5 µl örnek 1 µl yükleme boyası ile karıştırılıp kuyucuklara eklenmiştir. Aynı zamanda 1 µl 1 kb DNA Ladder marker 5 µl yükleme boyasıyla (Fermentas 6X Loading Dye Solution) karıştırılarak agaroz jele yüklenmiştir. Oluşan bantları incelemek amaçlı (+) ve (-) kontrollerin de jele yüklenmesi yapılmıştır. (+) kontrol için daha önce PCR sonucu çıkan örnek, (-) kontrol için ise kalıp DNA'sı olmayan mix karışımı kullanılmıştır. Son aşama olarak 40 dakika 90 V elektrik akımı ile yürütülmüştür.



Şekil 3.14. Agaroz jel elektroforezi

Sonuç olarak jeller UV ışığı veren transillüminatör Biolab Uvitec cihazı ile incelenmiş ve fotoğraflanmıştır (Sönmez, 2018).

3.2.10. Toplam nükleik asit ekstraksiyonu

Bu işlem gıda örneklerinin 10^{-1} dilüsyonu üzerinden yapılmış ve işleme başlamadan önce ışık mikroskobu yardımıyla bakteri yoğunluğu belirlenmiştir.

Örnekler her biri 2 ml olarak ependorf tüplerine aktarıldıktan sonra 5 saniye vortekslenerek homojenize hale getirilmiş ve 15 dakikada 13000 rpm' de santrifüj yapıldıktan sonra işleme pelet kısmı üzerinden devam edilmiştir. Pelet üzerine 600 μ l ekstraksiyon tamponu eklenmiş ve ters-düz yapılarak karışması sağlanmıştır. Daha sonra 10 μ l lizozim enzimi ekleyip 15 dakika 37 °C' de çalkalayıcı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi bittikten sonra karışımın üzerine 10 μ l proteinaz K enzimi ekleyip 2-3 saniye vortekslenmiştir. Her bir tüpe 0.3 gr zirkonyum boncuklar eklenmiş ve 90 saniye vortekslenmiştir. Karıştırma işlemi bittikten sonra 60 μ l SDS ekleyip, 30 dakika 37 °C' de çalkalayıcı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu 120 μ l NaCl solüsyonu, 90 μ l CTAB eklenmiş ve ters-düz yapılarak karışması

sağlanmış, 55 °C' lik su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. İşlem sonrasında 12000 g'de (rcf' de) 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı üzerinden işleme devam edilmiştir. Süpernatant üzerine 1 hacim fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) eklenip 12000 g'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra üst kısım alınıp temiz tüpe aktarılmış ve üzerine 1/10 kadar NaAc ve 2 hacim 100%'lük soğuk etanol eklenmiştir. Süspansiyon karıştırılmış ve -20 °C'de 1 gece bekletilmiştir. Bekleme sürece ardından süspansiyon 14000 g'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırılmış ve pelet üzerine önceden -20 °C'de bekletilmiş 70%'lik etanol (alkol) eklenerek 11 dakika 12000 g'de santrifüjlenmiştir. En son aşama olarak alkol dökülerek peleti tamamen kuruttuktan sonra üzerine 100 µl mq su eklenmiş ve jel elektroforeze tabi tutulmuştur (Poyraz, 2018; Quigley ve ark., 2012 modifiye hali).

3.2.10.1. Agaroz jel elektroforezi

Temiz bir erlen içerisine 100 ml 1X TAE koyulmuş ve 1g agaroz tartılarak 1X TAE içerisine eklenmiştir. Agarozun erimesi ve homojen bir hale gelmesi için tamamen berraklaşınca kadar ısıtılmıştır. Agaroz jel, 45-50 °C'ye kadar soğutulurken içerisine belirtilen miktarda 5µl GelRed Nucleic Acid Stain boyası ilave edilmiş, hafifçe köpüklenmeyecek şekilde karıştırılmıştır. Taraklar elektroforez küvetine uygun şekilde yerleştirilmiş ve jel küvet içerisine dökülmüştür. Jel oda sıcaklığında yaklaşık 35-40 dakika bekletilerek donması sağlanmıştır. Elektroforez tankının içerisine jel yerleştirilmiştir, jelin yüzeyini kaplayacak biçimde 1X TAE ilave edilmiş ve ardından taraklar çıkarılmıştır. 5µl Ekstraksiyon ürünü, 1µl yükleme boyası (Fermentas 6X Loading Dye Solution) ile karıştırılmış ve kuyucuklara yüklenerek elektroforez başlatılmıştır. Elektroforez işlemi 300 Amper, 90 Volt, 60 dakika süresinde gerçekleştirilmiştir. İşlem bittikten sonra elektroforez sonlandırılmış ve jel dikkatlice küvetten alınmıştır. Sonuçlar Jel görüntüleme sistemi transillüminatör Biolab Uvitec cihazında görüntülenmiş ve oluşan bantlar İnvitrogen markasına ait DNA Ladder markır ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.2.10.2. Illumina MiSeq platformu ile 16S rDNA gen-hedefli DNA dizileme ve komünite analizi

Örneklerden elde edilen Toplam nükleik asit ekstraktlarından Illumina MiSeq platformu (16S rDNA gen-hedefli, çift-uçlu dizileme) kullanılarak 16S rDNA'ya dayalı gen dizileme, BM Labosis Firması'nda (Ankara, Türkiye) gerçekleştirilmiştir.

Amplifikasyon için “Earth Microbiome Project”de (<http://11>) önerilen protokole uygun, genin V3-V4 bölgesini hedef alan 515F (5’-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3’) – 806R (5’-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3’) primer setleri kullanılmıştır (Caporaso ve ark., 2011; Apprill ve ark., 2015; Parada ve ark., 2016).

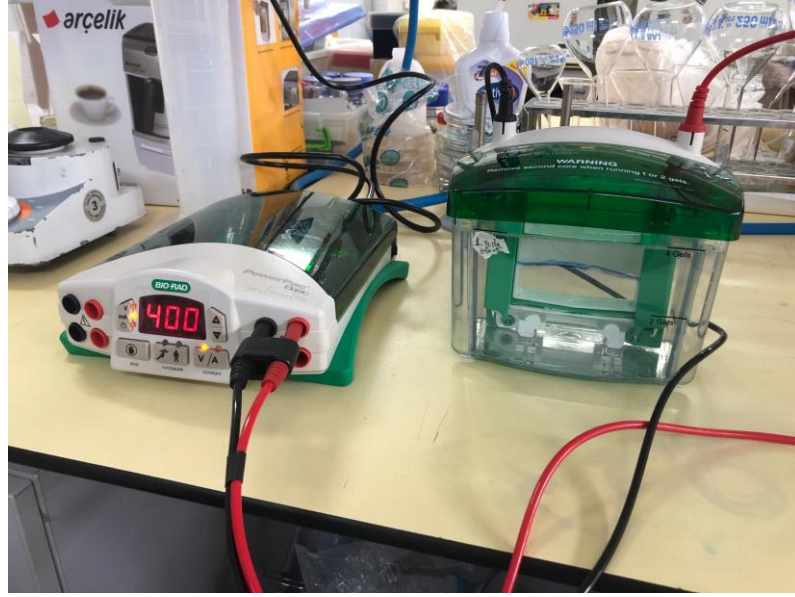
3.2.11. SDS-PAGE yöntemi

SDS-PAGE bir elektroforez yöntemi olup, proteinlerin poliakrilamid jel gibi bir mobil ortamda elektrik akımı yardımıyla molekül ağırlıklarına göre ayrılmalarını sağlamaktadır. Bu yöntem yardımı ile proteinlerin çeşitliliğinin tanımlanması, kalitatif ve kantitatif ölçümler yapılması mümkündür (Güven, 2008).

SDS-PAGE yönteminde kullanılan jel, dikey jel sistemine ait olup “ayırma jeli” (alt kısım) ve “yükleme jeli” (üst kısım) adlandırılan iki kısımdan oluşur. Dikey jel sisteminde kullanılan cam plakalar 10 x 8 cm ve 10 x 7.5 cm ölçülerinde olup, Bio-Rad jel elektroforez tankına yerleştirilmiş ve içerisine 5ml % 12’lik ayırıcı jel dökülmüştür. Ayırıcı jelin polimerizasyonu için 1 saat beklenmiştir. Jel kuruduktan sonra üstte kalan boş kısma hazırlanan yüklem jeli eklenmiş, taraklar takılmış ve 40 dakika sürecinde kurumaya bırakılmıştır. Jel kuruduktan sonra plakalar elektroforez tankına yerleştirilmiş, elektrot tamponu ilave edilmiş ve taraklar çıkarılmıştır.

Daha sonra jele yüklem koşulu ile örnekler hazırlanmıştır. Bunun için 48 saatlik katı besiyerinde canlanan kültürlerden pirinç tanesi kadar alarak 100 µl 50mM TRİS-HCL’da çözündürülerek homojenize hale getirilmiştir. Bu karışım içerisine göz kararı glass Beads (cam boncuk) aktararak 5 dakika vortekslenmiş, üzerine 200 µl SDS loading buffer aktarılmış ve cam beher içerisinde 5 dakika kaynatılmıştır (Mutlu, 2006 modifiye edilmiştir).

Hazırlanan örnekler jel kuyucuklarına her biri 25 µl olacak şekilde aktarılmıştır. Jel sistemine; yüklem jeldeki göç için 90V, ayırıcı jelde göç için ise 120 V akım ayarlanmıştır. Örnekler jelde yaklaşık 2 saat yürütüldükten sonra plakalar tampon içerisinden alınmış ve jeller Commasie Brilliant Blue Çözeltisinde 1 gece bekletilmiştir. Bu işlemin ardından jelleri boyadan arındırmak için saf su ile 1 kaç defa yıkama işlemi yapılmıştır (Uymaz, 2009).



Şekil 3.15. SDS- PAGE

3.2.12. Seçilen İzolatlardan plazmit izolasyonu

Plazmidler sitoplazmada yerleşen, kromozomal DNA'dan bağımsız ve kromozomal DNA'ya oranla çok daha küçük boyutlarda, farklı sayılarda olan halkasal şekilli, kendilerini eşleyebilmek yeteneğine sahip DNA molekülleridir (Sağlam ve Karahan, 2017).

Plazmit izolasyonu için PrepEase TM Quick MiniSpin Plasmid Kiti kullanılmış ve 12 adet bakteri üzerinden işleme devam edilmiştir. İşlem için 48 saatlik canlanan kültürler kullanılmıştır. İzolasyon aşağıdaki adımları takiben devam etmiştir:

1. Taze kültürden 2 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış, 11000 x g'de 30 saniye santrifüjlenmiş, yeterli miktarda pelet elde edene kadar tekrarlanmış ve işleme pelet üzerinden devam edilmiştir.
2. Bir sonraki aşamada bakterileri lize etmek ve nötr hale getirmek için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.
 - a. Pelet üzerine ilk önce 250 µl RNase A-A1 buffer eklenmiştir.
 - b. Son olarak 300 µl A3 buffer eklenmiş ve 6-8 defa ters-düz edilerek karıştırılmıştır.
 - c. Daha sonra 250 µl A2 buffer eklenmiş 6-8 defa ters-düz edilerek peletin çözünmesi sağlanmıştır ve 2-3 dakika oda sıcaklığına inkübe edilmiştir.
3. Elde ettiğimiz lizati berraklaştırmak için 11000 x g' de oda sıcaklığında veya 4 °C' de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

4. Bir sonraki aşamada DNA' yı kolona tutturmak için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.
 - a. PrepEase TM MiniSpin kolonu 2 ml' lik toplama tüpüne yerleştirilmiş,
 - b. Elde edilen lizat kolon içerisine aktarılmış,
 - c. 11000xg' de 1 dakika santrifüjlenmiş ve süzüntü atılmıştır.
5. Kolonun yıkanması ve kurutulması için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.
 - a. 450 µl etanol içeren AQ buffer kolona eklenmiş,
 - b. 11000 x g' de santrifüj edilmiş ve süzüntü uzaklaştırılmıştır.
6. DNA' nın uzaklaştırılması için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.
 - a. PrepEase TM MiniSpin kolonu 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüp içerisine yerleştirilmiş,
 - b. Üzerine 50 µl AE Buffer eklenmiş,
 - c. 1 dakika inkübe edilmiş,
 - d. 11000x g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
 - e. Son olarak elde ettiğimiz süzüntü plazmid DNA içermiştir (Şekil 4.13).

Elde edilen plazmid DNA jel elektroforeze tabi tutulmuştur.

3.2.13. Antibiyotik direnci

Peynir ve kesmik örneklerinden izole edilen LAB' lerinin antibiyotik direncini saptamak için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. İlk aşamada kültürler MRS Broth sıvı besiyerinde 48 saat süre ile aktive edilmiş, daha sonra hücre yoğunluğu 0,5 McFarland (1-2x10⁸ kob/mL) standardına göre ayarlanmıştır (Ağanı, 2019). Suşların antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amacıyla, literatür göz önünde bulundurularak ticari olarak satılan 8 farklı antibiyotiğe ait antimikrobiyal ilaçların: "Vankomisin, Nalidixic Acid, Siprofloksasin, Gentamisin, Penisilin-G, Rifampisin, Clindamycin, Azitromisin" kağıt diskleri kullanılmıştır. Antibiyotik direnç testi uygulanacak LAB suşları, MRS broth'da aktif hale getirildikten sonra MRS agara yayma plak yöntemi ile ekimleri yapılmış ve steril koşullar altında besiyeri yüzeyine dispenser aracılığı ile antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. 24 saatlik 37 °C' de inkübasyonu takiben antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları dikkate alınarak, NCCLS doküman M2-A9 (Wikler ve ark., 2006) kriterlerine göre bakteri suşları; dirençli ve duyarlı olarak değerlendirilmiştir (Kanak ve ark., 2018).



Şekil 3.16. Ticari olarak elde edilen antibiyotik diskleri

3.2.14. FISH yöntemi

Örneklerde mikrobiyal çeşitliliği belirlemek amacıyla FISH yöntemi kullanılmıştır. Uygun protokole esasen ilk aşamada örneklerden her biri 2 ml olmak koşuluyla ependorf tüplere aktarılmış ve 8000 x g' de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısım uzaklaştırılmış ve işleme pelet üzerinden devam edilerek 2 ml 1x'lik PBS eklenmiş ve 8000 x g'de 10 dakika yeniden santrifüjlenmiştir. Bu aşamada süpernatant atıldıktan sonra her bir tüpe 1 ml PBS eklenmiştir. Hazırlanan karışımdan 0,5 ml alınıp yeni tüpe aktarılmış ve üzerine %4 Formaldehid içeren PBS karışımından 1,5 ml eklenmiştir. Bu karışım 1 gece fiksasyon için -20 ° C'de muhafaza edilmiştir.

Fiksasyon işlemi bittikten sonra hazırlanan örnekler yaklaşık 10 ml 1x' lik PBS ile karıştırılmış ve 0.2 µm por çaplı membran filtreden geçirilmiştir. Daha sonra membran filtre kurumaya bırakılmıştır. Her örneğin filtresinden kesim yapılmış ve işaretlenmiştir. Bu yöntemde bakteri probu olarak EUB 338 kullanılmıştır. 2 µl prob 18 µl hibridizasyon tamponu ile karıştırılmış ve karışım filtrenin üzerini tam ıslatacak şekilde damlatılmıştır. Hazırlanan filtreler karanlık ve nemli ortamda 46 ° C' ye ayarlanmış fırında 2 saat hibridizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Hibridizasyon süreci dolduktan sonra filtreler 48° C su banyosunda yıkama tamponu içerisinde en az 15dakika bekletilmiştir. Daha sonra filtre parçacıkları kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra filtrelerin üzerine 25 µl DAPI eklenip 5 dakika bekletilmiştir. Sonrasında sırasıyla saf etanol ve MQ su ile

yıkılarak kurumaya bırakılmıştır. Montajlamak amacıyla filtrelele lam üzerinde gliserol damlatılmış ve üzerine lamel kapatılmıştır. Floresan mikroskopunda görüntölemek amacıyla hazırlanan filtreler -20⁰ C’de karanlıkta bekletilmiştir (Amann ve ark., 1990; Amann ve ark., 1995).

4. BULGULAR

4.1. Süt ve Süt Ürünlerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Sayım Sonuçları

Azerbaycan'ın farklı illerine ait 6 peynir, 1 kesmik, 1 kaymak örneğinin farklı dilüsyonlarından MRSA, M17A, PCA, PDA VRBA besiortamlarına ekim yapılmış ve besiyerlerinde üreme sonucu klasik sayım yöntemi ile koloni sayımı gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda Azerbaycan (2010) (http-12) ve Türk (2011) (http-13) Gıda Kodeksi Tebliğine esasen örneklerin uygun dilüsyonlarından Tempo cihazında mikroorganizma sayısına bakılmıştır.

Tablo 4.1. İzolatların Klasik (geleneksel) sayım sonuçları.

Gıda Örneği	Farklı Besi Ortamlarında Koloni Sayısı (CFU/mL)				
	M17A	MRSA	PCA	PDA	VRBA
Qarabağ Motal Peyniri	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x22	10 ⁴ x 40	10 ⁴ x17	-
	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x23	10 ⁴ x21	10 ⁴ x18	-
	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x1	10 ⁵ x2	10 ⁵ x2	-
	10 ⁵ x300<	-	10 ⁵ x4	10 ⁵ x2	-
	10 ⁶ x300<	10 ⁶ x5	-	-	-
	10 ⁶ x300<	-	-	-	-
	-	10 ⁷ x6	-	-	-
	-	-	-	-	-
Gedebey A Peyniri	10 ⁴ x160	10 ⁴ x 280	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	-
	10 ⁴ x150	10 ⁴ x240	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x270	-
	10 ⁵ x45	10 ⁵ x99	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x167	-
	10 ⁵ x71	10 ⁵ x200	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x95	-
	10 ⁶ x3	10 ⁶ x25	10 ⁶ x100	10 ⁶ x20	-
	10 ⁶ x8	10 ⁶ x19	10 ⁶ x80	10 ⁶ x17	-
	10 ⁷ x2	10 ⁷ x9	10 ⁷ x9	-	-
	10 ⁷ x10	10 ⁷ x3	10 ⁷ x4	10 ⁷ x5	-
Gedebey B Peyniri	10 ⁴ x 220	10 ⁴ x 112	10 ⁴ x 300<	10 ⁴ x 300<	-
	10 ⁴ x 300<	10 ⁴ x 130	10 ⁴ x 300<	10 ⁴ x 300<	-
	10 ⁵ x145	10 ⁵ x77	10 ⁵ x120	10 ⁵ x170	-
	10 ⁵ x71	10 ⁵ x85	10 ⁵ x170	10 ⁵ x110	-
	-	10 ⁶ x13	10 ⁶ x22	10 ⁶ x54	-
	10 ⁶ x6	10 ⁶ x15	10 ⁶ x13	10 ⁶ x62	-
	10 ⁷ x1	10 ⁷ x5	-	10 ⁷ x5	-
	-	10 ⁷ x1	10 ⁷ x4	-	-

Tablo 4.1. (Devamı)*İzolatlardan Klasik (geleneksel) sayım sonuçları.*

Gıda Örneği	Farklı Besi Ortamlarında Koloni Sayısı (CFU/mL)				
	M17A	MRSA	PCA	PDA	VRBA
Naxçıvan peyniri	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x2
	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x1
	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x240	-
	10 ⁵ x280	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x150	-
	10 ⁶ x23	10 ⁶ x20	10 ⁶ x70	10 ⁶ x85	-
	10 ⁶ x15	10 ⁶ x7	10 ⁶ x84	10 ⁶ x97	-
	-	10 ⁷ x3	-	10 ⁷ x8	-
	-	10 ⁷ x2	-	-	-
Ordubad peyniri	10 ⁴ x120	10 ⁴ x240	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x1
	10 ⁴ x64	10 ⁴ x240	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x3
	10 ⁵ x34	10 ⁵ x95	10 ⁴ x300<	10 ⁵ x250	-
	10 ⁵ x44	10 ⁵ x76	10 ⁴ x300<	10 ⁵ x180	-
	10 ⁶ x10	10 ⁶ x3	10 ⁶ x56	10 ⁶ x32	-
	10 ⁶ x5	10 ⁶ x7	10 ⁶ x54	10 ⁶ x60	-
	-	10 ⁷ x1	10 ⁷ x6	10 ⁷ x5	-
	-	10 ⁷ x2	-	10 ⁷ x7	-
İvanovka Peyniri	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x 300 <	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x9
	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x 300 <	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x6
	10 ⁵ x 300<	10 ⁵ x 300<	10 ⁵ x 240	10 ⁵ x 100	10 ⁵ x 1
	10 ⁵ x 300<	10 ⁵ x 300<	10 ⁵ x 300<	10 ⁵ x 209	-
	10 ⁶ x92	10 ⁶ x 74	10 ⁶ x28	10 ⁶ x10	-
	10 ⁶ x79	10 ⁶ x 65	10 ⁶ x41	10 ⁶ x39	-
	10 ⁷ x 8	10 ⁷ x 5	10 ⁷ x 3	10 ⁷ x0	-
	10 ⁷ x 9	10 ⁷ x 10	10 ⁷ x 1	10 ⁷ x 1	-
İvanovka Kesmiği	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x38	-
	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x39	-
	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x103	10 ⁵ x7	-
	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x104	10 ⁵ x3	-
	10 ⁶ x61	10 ⁶ x21	10 ⁶ x7	10 ⁶ x1	-
	10 ⁶ x45	10 ⁶ x14	10 ⁶ x9	10 ⁶ x2	-
	10 ⁷ x4	10 ⁷ x1	10 ⁷ x5	-	-
	10 ⁷ x4	10 ⁷ x1	10 ⁷ x2	10 ⁷ x1	-
İsmayılı kaymağı	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x8
	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x300<	10 ⁴ x2
	10 ⁵ x200<	10 ⁵ x212	10 ⁵ x160	10 ⁵ x300<	-
	10 ⁵ x280<	10 ⁵ x280	10 ⁵ x300<	10 ⁵ x300<	-
	10 ⁶ x80	10 ⁶ x52	10 ⁶ x40	10 ⁶ x40	-
	10 ⁶ x40	10 ⁶ x35	10 ⁶ x25	10 ⁶ x68	-
	10 ⁷ x3	10 ⁷ x11	10 ⁷ x15	10 ⁷ x3	-
	10 ⁷ x5	10 ⁷ x6	10 ⁷ x18	10 ⁷ x3	-

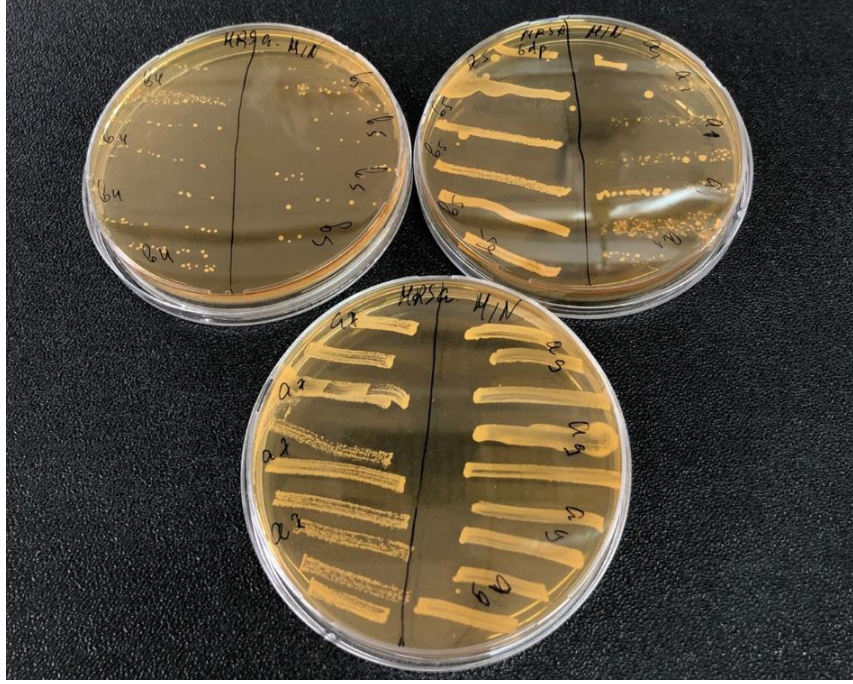
Tablo 4.2. *Tempo (BioMeriux) sayım sonuçları*

Nümune	Test	Mod	Sonuç
Qarabağ Motal Peyniri	TC	24-27 s	=2,8 E2 CFU/mL
	STA	24-27 s	=1,3 E2 CFU/mL
	EC	22-27 s	=1,4 E2 CFU/mL
	EB	22-27 s	=44 CFU/mL
	CC	22-27 s	<10 CFU/mL
	AC	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
	LAB	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
	YM	72-76 s	=4,9 E4 CFU/mL
Gedebey A Peyniri	TC	24-27 s	=3,0 E2 CFU/mL
	STA	24-27 s	=45 CFU/mL
	EC	22-27 s	=2,1 E2 CFU/mL
	EB	22-27 s	=3,0 E2 CFU/mL
	CC	22-27 s	=21 CFU/mL
	AC	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
	LAB	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
	YM	72-76 s	> 4,9 E4 CFU/mL
Gedebey B Peyniri	TC	24-27 s	=8,3 E2 CFU/mL
	STA	24-27 s	=67 CFU/mL
	EC	22-27 s	-
	EB	22-27 s	= 100 CFU/mL
	CC	22-27 s	=1,9 E2 CFU/mL
	LAB	40-48 s	= 3,0 E5 CFU/mL
	AC	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
	YM	72-76 s	> 4,9 E4 CFU/mL
Naxçıvan Peyniri	TC	24-27 s	<10 CFU/mL
	STA	24-27 s	< 10 CFU/mL
	EC	22-27 s	<10 CFU/mL
	EB	22-27 s	>4,9 E4 CFU/mL
	CC	22-27 s	< 10 CFU/mL
	AC	40-48 s	= 2,0 E2 CFU/mL
	LAB	40-48 s	= 3,0 E5 CFU/mL
	YM	72-76 s	= 10 CFU/mL
Ordubad Peyniri	TC	24-27 s	=2,5 E4 CFU/mL
	STA	24-27 s	< 10 CFU/mL
	EC	22-27 s	=3,0 E2 CFU/mL
	EB	22-27 s	=9,9 E2 CFU/mL
	CC	22-27 s	=3,5 E2 CFU/mL
	AC	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
	LAB	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
	YM	72-76 s	> 4,9 E4 CFU/mL

Tablo 4.2. (Devamı) *Tempo (BioMeriux)* sayım sonuçları

Nümune	Test	Mod	Sonuç
İvanovka Peyniri	TC	24-27 s	> 4,9 E4 CFU/mL
	STA	24-27 s	=1,2 E2 CFU/mL
	EC	22-27 s	
	EB	22-27 s	> 4,9 E4 CFU/mL
	CC	22-27 s	> 4,9 E4 CFU/mL
	AC	40- 48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
	LAB	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
	YM	72-76 s	> 4,9 E4 CFU/mL
İvanovka Kesmiği	TC	24-27 s	=86 CFU/mL
	STA	24-27 s	=10 CFU/mL
	EC	22-27 s	=86 CFU/mL
	EB	22-27 s	=21 CFU/mL
	CC	22-27 s	=32 CFU/mL
	AC	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
	LAB	40-48 s	> 4,9 E5 CFU/mL
	YM	72-76 s	> 4,9 E4 CFU/mL
İsmayılı Kaymağı	TC	24-27s	> 4,9 E4 CFU/mL
	STA	24-27s	<10 CFU/mL
	EC	22-27s	-
	EB	22-27s	> 4,9 E4 CFU/mL
	CC	22-27s	> 4,9 E4 CFU/mL
	AC	40-48s	> 4,9 E5 CFU/mL
	LAB	40-48s	> 4,9 E5 CFU/mL
	YM	72-76s	> 4,9 E4 CFU/mL

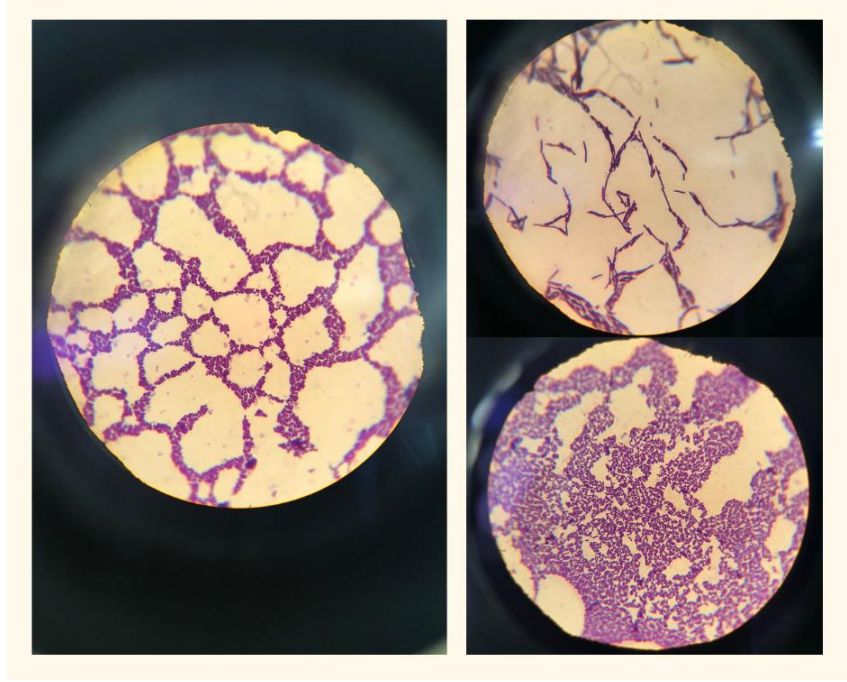
İnkübasyon sonucu MRS agar ve M17 agar üzerinde üremiş küçük, mat, krem rengi ya da beyaz renkteki laktik asit bakterisi ihtimali olan koloniler rasgele seçilerek saflaştırma yapılmıştır. Gram boyama ve katalaz aktivitesi sonucuna bakılarak hücre şekilleri belirlenmiş, Gram pozitif, Katalaz negatif izolatlar seçilerek ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere endorff tüp içerisinde %20'lik gliserol çözeltisinde -85 °C'de stoklanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda toplamda 95 adet laktik asit bakterisi izole edilmiştir. Elde edilen izolatlardan “25’ i Naxçıvan peynirine, 7’ i Garabağ Motal peynirine, 13’ü İvanovka peynirine, 18’i Ordubad peynirine, 11’i Gedebe (a) peynirine, 13’ü Gedebe (b) peynirine, 8’i İvanovka kesmiği” örneğine aittir. (Kaymak örneği bozulma nedeniyle sayım dışında hiçbir teste tabi tutulmamıştır)



Şekil 4.1. Örneklerden elde edilen izolatlara

4.2. Süt ve Süt Ürünlerinden İzole edilen Laktik Asit Bakterilerinin Morfolojik, ve Biyokimyasal özellikleri

Naxçıvan peynirine ait 25 izolattan 14'ü basil, 2'i kokobasil, 9'u kok, Garabağ Motal peynirine ait 7 izolattan tümü basil, İvanovka peynirine ait 13 izolattan 12'i kok, 1'i kokobasil, Ordubad peynirine ait 18 izolattan 8'i basil, 10'u kok, Gedebe (a) peynirine ait 11 izolattan 5'i basil, 4'ü kok, 2'i kokobasil, Gedebe (b) peynirine ait 13 izolattan 8'i kok, 4'ü kokobasil, 1'i basil, İvanovka kesmiğine ait 8 izolattan 6'ı kok, 1'i kokobasil, 1'i basil hücre şekline sahip olduğu görülmüştür. Sonuçlara esasen izolatlardan “Naxçıvan, Motal peynirlerinde basil, İvanovka, Gedebe (b) peynirlerinde, İvanovka kesmiğinde kok, Ordubad ve Gedebe (a) peynirlerinde hem kok hem basil”, hücre şeklinin üstünlük teşkil ettiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2. Mikroskopta görüntülenen hücre morfolojileri

Tablo 4.3. Qarabağ P. Örneğinden elde edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları.

Kaynak	İzolat Adı	Agar	Dilasyon Aralığı	Gram Boyama	Katalaz	Morfolojisi
Qarabağ Motal Peyniri	M ₁	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Basil
	M ₂	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Basil
	M ₃	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil
	M ₄	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil
	M ₅	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil
	M ₆	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil

Tablo 4.4. Gedebeş a/b Örneklerinden elde edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları.

Kaynak		Agar	Dilasyon Aralığı	Gram Boyama	Katalaz	Morfolojisi
Gedebeş Peyniri A & B	GA ₁	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Basil
	GA ₂	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok
	GA ₃	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Kok

Tablo 4.4. (Devamı) Gedebeş a/b Örneklerinden elde edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları.

Kaynak		Agar	Dilasyon Aralığı	Gram Boyama	Katalaz	Morfolojisi
Gedebeş Peyniri A & B	GA ₄	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil
	GA ₅	M17A	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil
	GA ₆	M17A	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Kok
	GA ₇	M17A	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Kok
	GA ₈	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil
	GA ₉	M17A	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Kokobasil
	GA ₁₀	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil
	GB ₁	M17A	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok
	GB ₂	M17A	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kokobasil
	GB ₃	M17A	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok
	GB ₄	M17A	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kokobasil
	GB ₅	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok
	GB ₆	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil
	GB ₇	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Kok
	GB ₈	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok
	GB ₉	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok
	GB ₁₀	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kokobasil
	GB ₁₁	M17A	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok
	GB ₁₂	M17A	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok

Tablo 4.5. Naxçıvan P. Örneğinden elde edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları

Kaynak	İzolat Adı	Agar	Dilasyon Aralığı	Gram Boyama	Katalaz	Morfolojisi
Naxçıvan Peyniri	N ₁	MRSA	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Basil
	N ₂	M17A	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Basil
	N ₃	M17A	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Kok
	N ₄	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Kokobasil
	N ₅	MRSA	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Basil
	N ₆	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Basil
	N ₇	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Basil
	N ₈	M17A	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok
	N ₉	MRSA	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Kok

Tablo 4.5. (Devamı) Naxçıvan P. Örneğinden elde edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları

Kaynak	İzolat Adı	Agar	Dilasyon Aralığı	Gram Boyama	Katalaz	Morfolojisi
Naxçıvan Peyniri	N ₁₀	MRSA	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Basil
	N ₁₁	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil
	N ₁₂	M17A	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil
	N ₁₃	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil
	N ₁₄	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Basil
	N ₁₅	M17A	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Kok
	N ₁₆	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil
	N ₁₇	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Basil
	N ₁₈	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Kokobasil
	N ₁₉	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil
	N ₂₀	M17A	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok

Tablo 4.6. Ordubad P. Örneğinden elde edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları

Kaynak	İzolat Adı	Agar	Dilasyon Aralığı	Gram Boyama	Katalaz	Morfolojisi
Ordubad Peyniri	O ₁	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Basil
	O ₂	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Basil
	O ₃	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Basil
	O ₄	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil
	O ₅	MRSA	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Basil
	O ₆	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil
	O ₇	MRSA	10 ⁻⁷	G(+)	K(-)	Kok
	O ₈	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok
	O ₉	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Kok
	O ₁₀	M17A	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Basil
	O ₁₁	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Basil
	O ₁₂	M17A	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Kok
	O ₁₃	M17A	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Kok
	O ₁₄	M17A	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok
	O ₁₅	M17A	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Kok
	O ₁₆	M17A	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Kok
	O ₁₇	M17A	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Kok
	O ₁₈	M17A	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Kok

Tablo 4.7. *İvanovka P. Örneğinden elde edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları*

Kaynak	İzolat Adı	Agar	Dilasyon Aralığı	Gram Boyama	Katalaz	Morfolojisi
İvanovka Peyniri	PİV ₁	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Kok
	PİV ₂	MRSA	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Kok
	PİV ₃	MRSA	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Kok
	PİV ₄	MRSA	10 ⁻⁷	G(+)	K(-)	Kok
	PİV ₅	MRSA	10 ⁻⁷	G(+)	K(-)	Kok
	PİV ₆	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Kok
	PİV ₇	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok
	PİV ₈	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok
	PİV ₉	M17A	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok
	PİV ₁₀	M17A	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Kokobasil
	PİV ₁₁	M17A	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Kok
	PİV ₁₂	M17A	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Kok
	PİV ₁₃	M17A	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Kok

Tablo 4.8. *İvanovka K. Örneğinden elde edilen izolatların morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları*

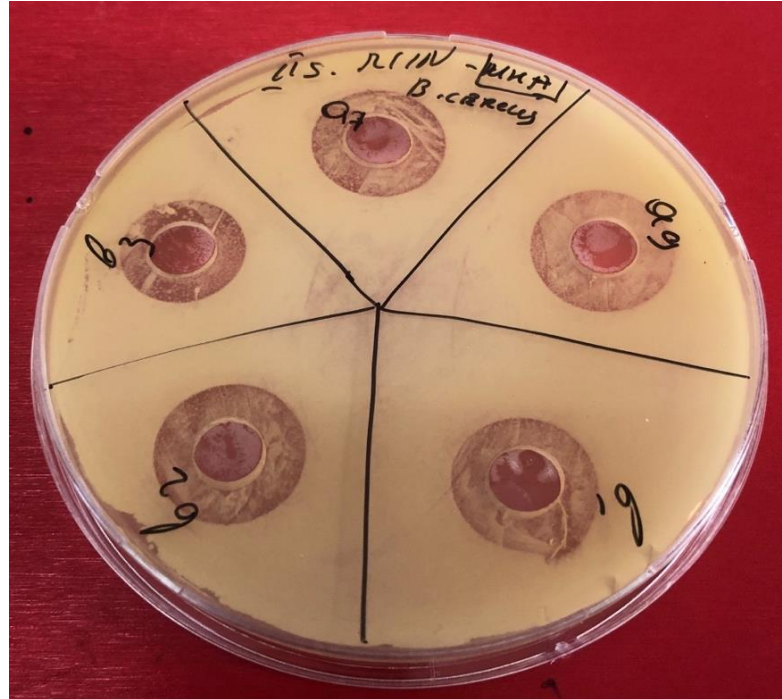
Kaynak	İzolat Adı	Agar	Dilasyon Aralığı	Gram Boyama	Katalaz	Morfolojisi
İvanovka Kesmiği	KİV ₁	MRSA	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Kok
	KİV ₂	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Kokobasil
	KİV ₃	MRSA	10 ⁻⁶	G(+)	K(-)	Kok
	KİV ₄	MRSA	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok
	KİV ₅	MRSA	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Basil
	KİV ₆	M17A	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Kok
	KİV ₇	M17A	10 ⁻⁵	G(+)	K(-)	Kok
	KİV ₈	M17A	10 ⁻⁴	G(+)	K(-)	Kok

4.3. Antimikrobiyal Etki Sonuçları

Rastgele seçilen izolatların antimikrobiyal etkileri belirlenerek en büyük aktivite gösteren kültürler diğer aşamalarda işleme alınmıştır. Antimikrobiyal etki sonuçları Tablo 4.9’da mm cinsinden verilmiştir.

Tablo 4.9. Antimikrobiyal etki sonuçları

İzolatlar	Patojenler			
	<i>S. typhi</i> ,	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. Coli</i>
N ₇	12	10	7	14
N ₂₀	13	10	10	12
N ₂₁	7	8	7	12
N ₂₂	10	10	10	10
N ₂₃	11	10	12	11
N ₂₄	12	10	9	10
N ₂₅	12	9	9	12
M ₂	10	9	12	12
M ₇	8	10	10	12
KIV ₈	12	7	10	9
Ga ₁₁	10	2	17	2
Gb ₂	10	10	17	11



Şekil 4.3. Antimikrobiyal etki sonucu

4.4. Süt ve Süt Ürünlerinden İzole edilen Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özellikleri (Fizyolojik özellikleri)

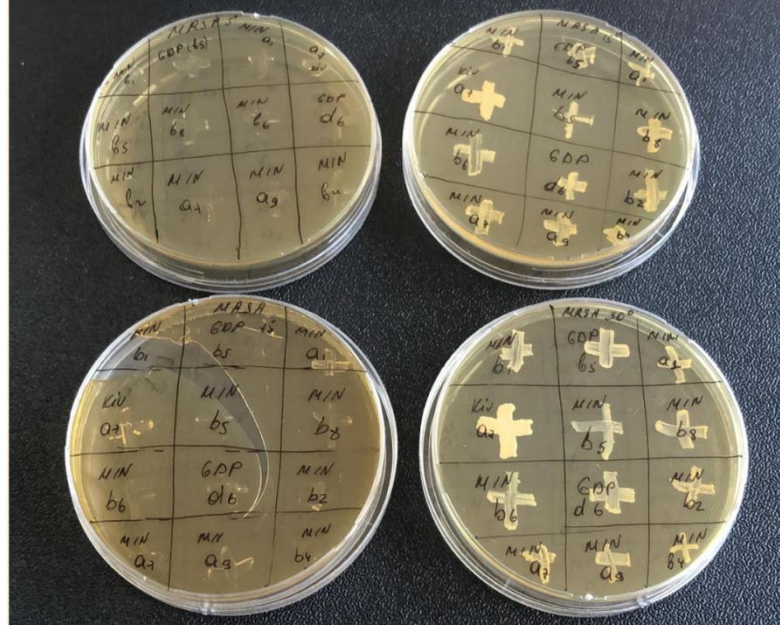
İzolatların fizyolojik özelliklerini belirlemek amacıyla farklı sıcaklık, farklı tuz konsantrasyonları ve farklı pH'larda gelişimleri incelenmiştir.

İzolatlardan N₇, N₂₀, N₂₁, N₂₂, N₂₃, N₂₄, N₂₅, M₂, M₇, KİV₈, Ga₁₁, Gb₂ izolatları seçilerek 5 °C, 15 °C, 30 °C ve 45 °C sıcaklıklarda 48 saat süreyle gelişmeleri gözlemlenmiştir.

İzolatların tümü 30 °C ve 15 °C çok iyi üreme performansı gösterirken, 45 °C'de N₇, N₂₂, N₂₄, N₂₅ izolatları hiç üreme göstermemiş diğerleri ise az üreme göstermiştir. 5 °C sadece KİV₈ çok az üreme göstermiş, geriye kalan izolatlarda üreme gözlemlenmemiştir.

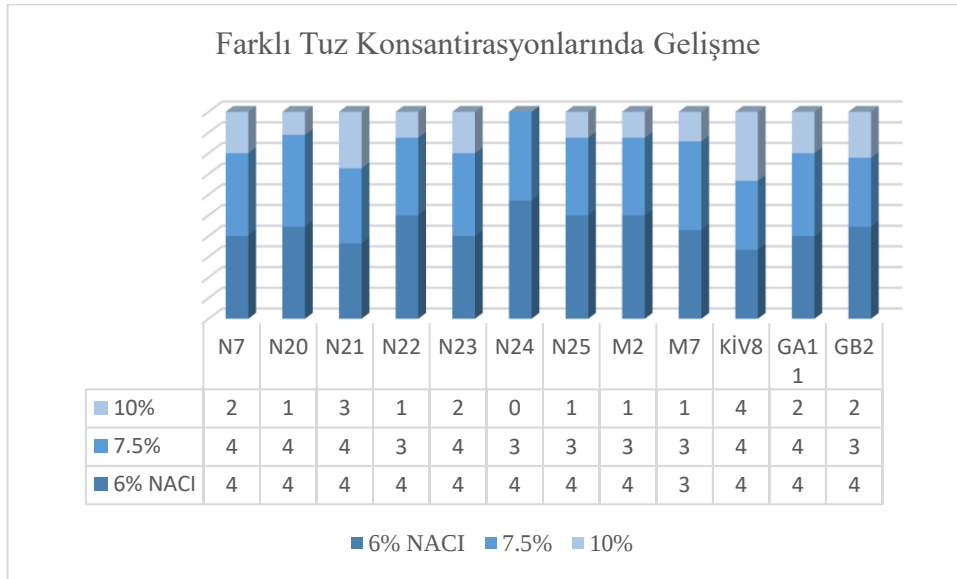
Tablo 4.10. Seçilen izolatların farklı sıcaklıklarda gelişim sonuçları

İzolatlar	5 °C	15 °C	30 °C	45 °C
N ₇	-	+	+	-
N ₂₀	-	+	+	+
N ₂₁	-	+	+	+
N ₂₂	-	+	+	-
N ₂₃	-	+	+	+
N ₂₄	-	+	+	-
N ₂₅	-	+	+	-
M ₂	-	+	+	+
M ₇	-	+	+	+
KİV ₈	+	+	+	+
Ga ₁₁	-	+	+	+
Gb ₂	-	+	+	+



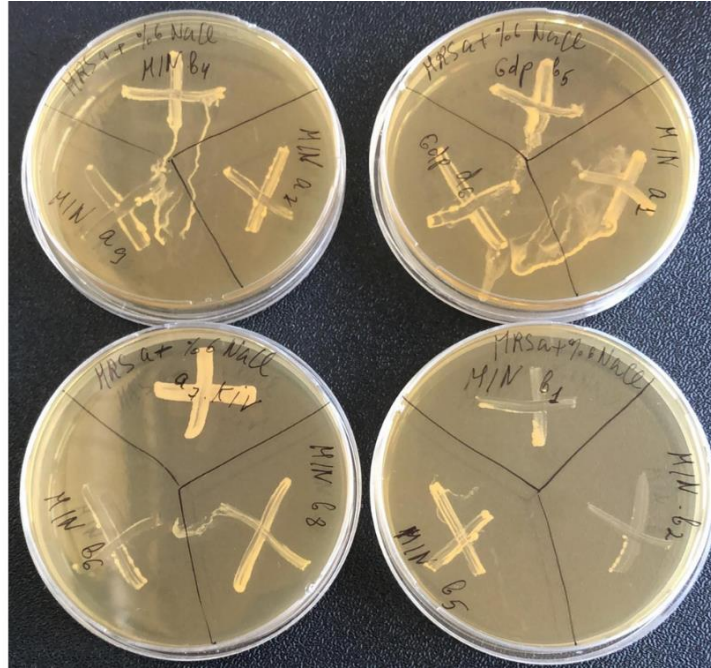
Şekil 4.4. 5 °C, 15 °C, 30 °C ve 45 °C sıcaklıklarda üreme sonuçları

Daha sonra N₇, N₂₀, N₂₁, N₂₂, N₂₃, N₂₄, N₂₅, M₂, M₇, KİV₈, Ga₁₁, Gb₂ izolatlarının farklı tuz konsantrasyonlarında gelişimini gözlemlemek için %6, %7,5 ve %10 oranında NaCl içeren besiortamına inoküle edilerek inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonrası izolatların farklı tuz konsantrasyonlarında olan toleransları grafik x’de gösterilmiştir. İzolatların hepsi %6 ve %7,5 NaCl içeren besiyerinde iyi üreme göstermiş, %10 NaCl içeren besiyerinde ise izolatlardan 3’ü çok iyi gelişme gösterirken, 8’i çok az üreme göstermiş, 1’i hiç gelişme göstermemiştir.

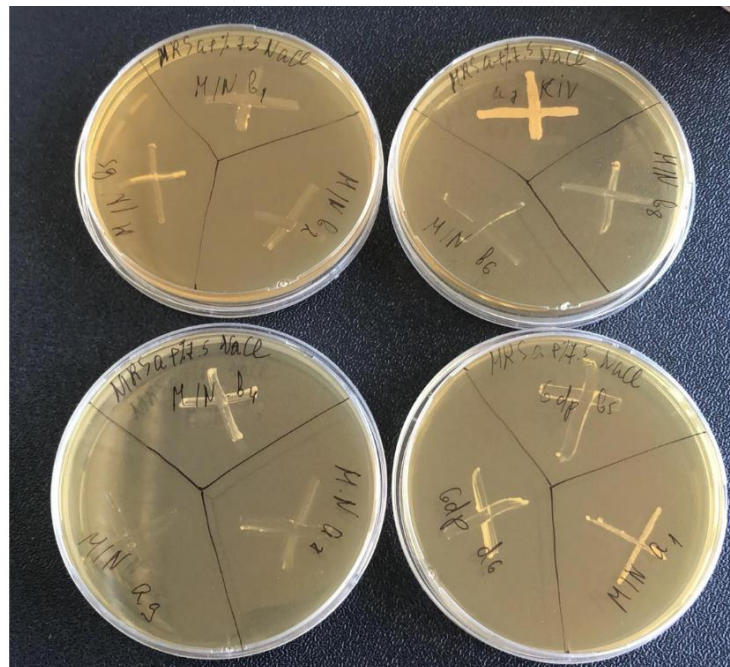


Şekil 4.5. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme

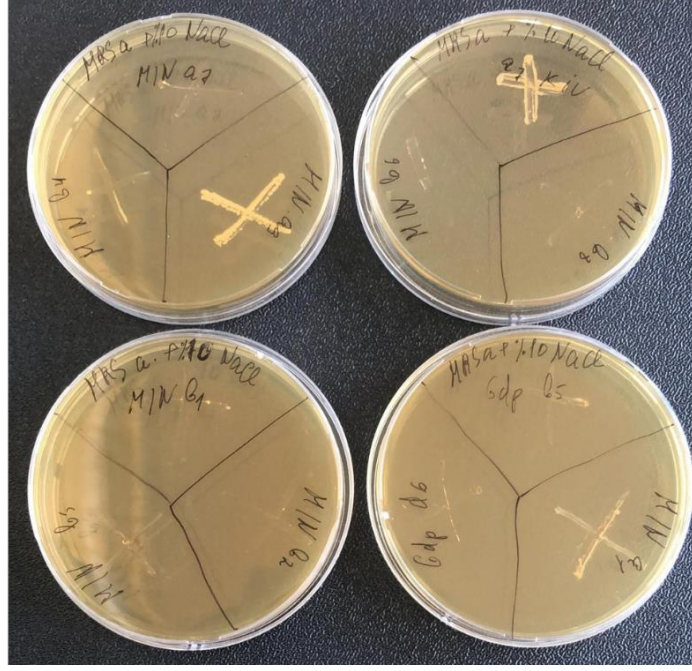
Üremeler (0: Yok, 1: Çok Az, 2: Az, 3: İyi, 4 Çok İyi) değerleri ile ifade edilmiştir.



Şekil 4.6. %6 NaCl içeren besiyerinde üreme sonucu

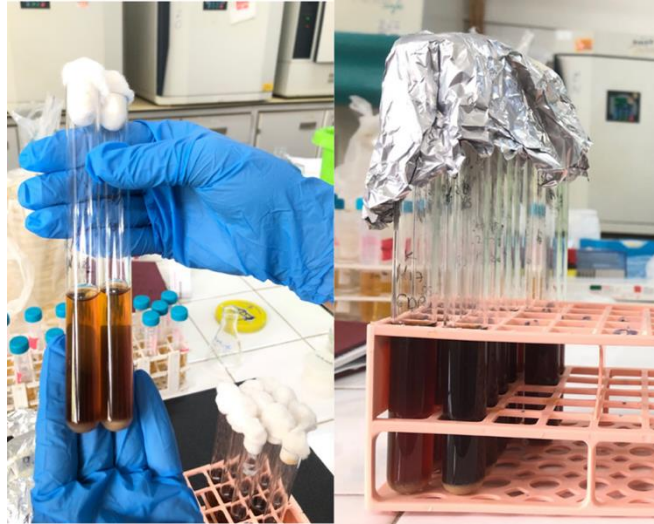


Şekil 4.7. %7,5 NaCl içeren besiyerinde üreme sonucu



Şekil 4.8. %10 NaCl içeren besiyerinde üreme sonucu

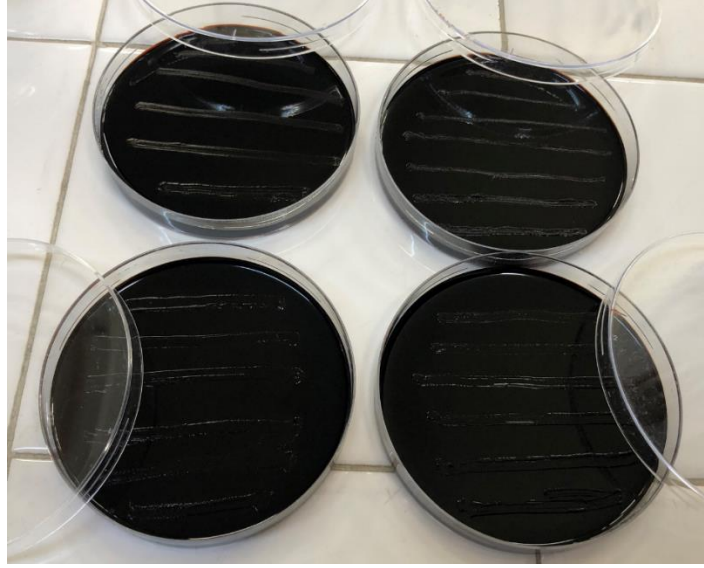
N7, N20, N21, N22, N23, N24, N25, M2, M7, KİV8, Ga11, Gb2 izolatlarının farklı pH'larda gelişimine bakmak için besiyerinin pH'ı sırasıyla 3.9 ve 9.6 'ya ayarlanmış, izolatlar besiyerine inoküle edildikten sonra 48 saat süre ile uygun dereceli etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu olarak izolatların tümünün pH 3.9 ve pH 9.6'da iyi üreme gösterdiği gözlemlenmiştir.



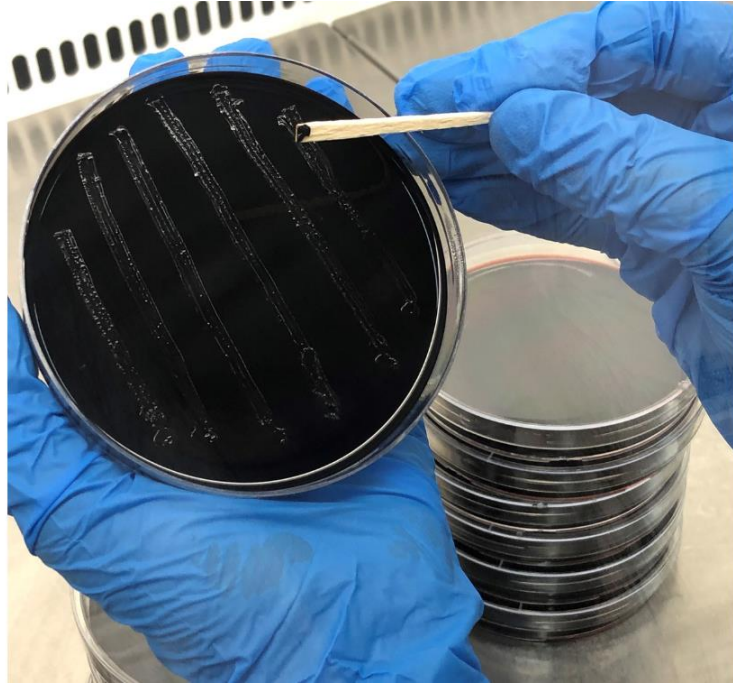
Şekil 4.9. pH 3.9 ve pH 9.6'da üreme sonucu

4.5. Biyofilm Sonucu

48 saatlik canlanan izolatların (N7, N20, N21, N22, N23, N24, N25, M2, M7, KİV8, Ga11, Gb2) Kongo kırmızısı içeren MRSA besiyerine ekimi yapılmış ve 37°C dereceli etüvde 24 saat sonra inkübasyon sonuçları incelenmiştir. Sonuçlara esasen mevcut izolatların hepsinde siyah koloniler gözlemlenmiş ve biyofilm pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.10. Kongo kırmızısı içeren MRSA 'da biyofilm sonucu



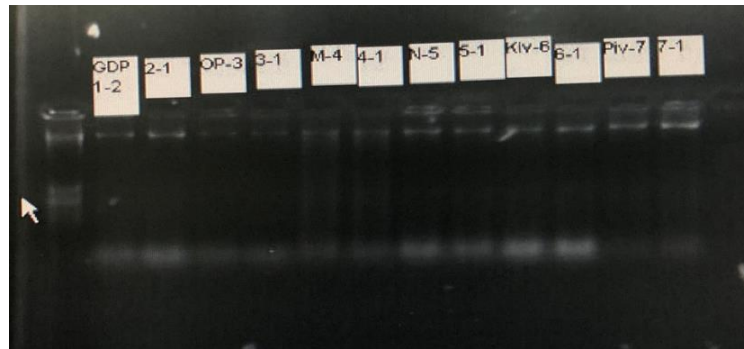
Şekil 4.11. Kongo kırmızısı içeren MRSA 'da biyofilm sonucu

4.6. PCR Sonuçları

PCR ürünleri %1'lik agaroz jellerde yürütülmüş ve sonuçlar Jel görüntüleme sistemi transillüminatör Biolab Uvitec cihazında görüntülenmiştir. Lakin hedeflenen baz çifti (1500 bp) elde edilememiştir. PCR' da gerekli olan baz çiftinin elde edilmemesinin kalıp DNA miktarı, Mg konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonu, primer konsantrasyonu gibi nedenleri olabilir. Yaptığımız çalışmada primer ve kalıp DNA dışındaki diğer ürünler Master Mix şeklinde ticari olarak elde edildiği için konsantrasyonları değiştirilememiştir. Lakin farklı primer setleri kullanılarak reaksiyonlar tekrarlanmıştır, buna rağmen sonuç elde edilememiştir. Sonuçları etkileyen diğer faktörlerden biri de annealing sıcaklığı olduğu düşünülmektedir.

4.7. Örneklerden Yapılan Toplam Nükleik Asit Ekstraksiyonu Sonucu

Yapmış olduğumuz çalışmada örneklerin bakteriyal çeşitliliğini tespit etmek amacıyla toplam nükleik asit ekstraksiyonu yapılmıştır. Işık mikroskobu yardımı ile örneklerin bakteri yoğunluğu tespit edildikten sonra uygun ekstraksiyon protokolü kullanılarak 5 adet farklı peynir örneği ve 1 adet kesmik örneğinden genomik DNA izolasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen genomik DNA'lara ait jel görüntüleri şekil 4.10' da gösterilmiştir. Elde edilmiş ekstraksiyon sonuçları BM Labosis Firması'nda (Ankara, Türkiye) değerlendirilmiştir.



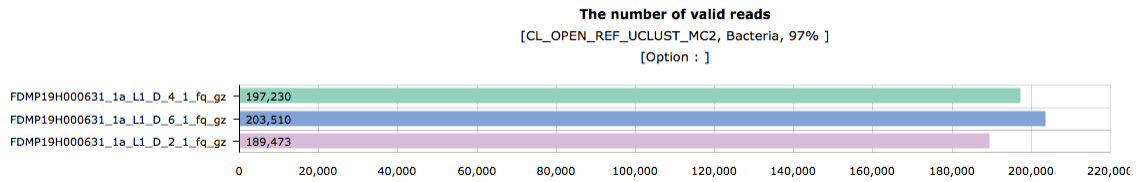
Şekil 4.12. Toplam nükleik asit ekstraksiyon jel görüntüsü

4.7.1. Illumina platformu ile 16S rDNA gen-hedefli MiSeq dizileme

BM Labosis Firması'nda (Ankara, Türkiye) sadece Gedebe Peyniri, Qarabağ Motal Peyniri ve İvanovka Kesmik örneklerinin toplam nükleik asit sonuçlarına esasen Illumina platformu ile 16S rDNA gen-hedefli MiSeq dizileme sonuçları elde edilmiştir.

Illumina platformu ile elde edilen amplicon büyüklüğü ortalama ~420 bazdır. Barkod ve primer diziler uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen okuma uzunluğu ortalama 400bp olarak elde edilmiştir. Verilerin taksonomik profilini ve istatistiksel dağılımını belirlemek için EzBiocloud yazılım paketi kullanılmıştır. Bu platform ile yapılan analizde OTU toplama stratejisi de novo kümeleme algoritması ile yapılmıştır. Dizilerin hizalanmasında PyNAST, taksonomi atama işleminde Uclust ve PKSSU4 veritabanı kullanılmıştır. Elde edilen OTU'lardan tek bir dizi ile temsil edilen dizi verileri uzaklaştırılmıştır ve istatistiksel çeşitlilik tahminleri bu veriler üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.13'de örneklerin okuma sayıları verilmiştir. Görüldüğü gibi D2 kodlu Gedebey 1 örneğinin 189473, D4 kodlu Qarabağ Motal örneğinin 197230, D6 kodlu İvanovka Kesmik örneğinin okuma sayısı 203510 olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.13. Örneklerden elde edilen okuma sayıları

Illumina platformu ile dizileme sonucu elde edilen veriler ve hesaplanan tahmini çeşitlilik ve tür zenginliği değerleri Tablo 4.11'de gösterilmiştir.

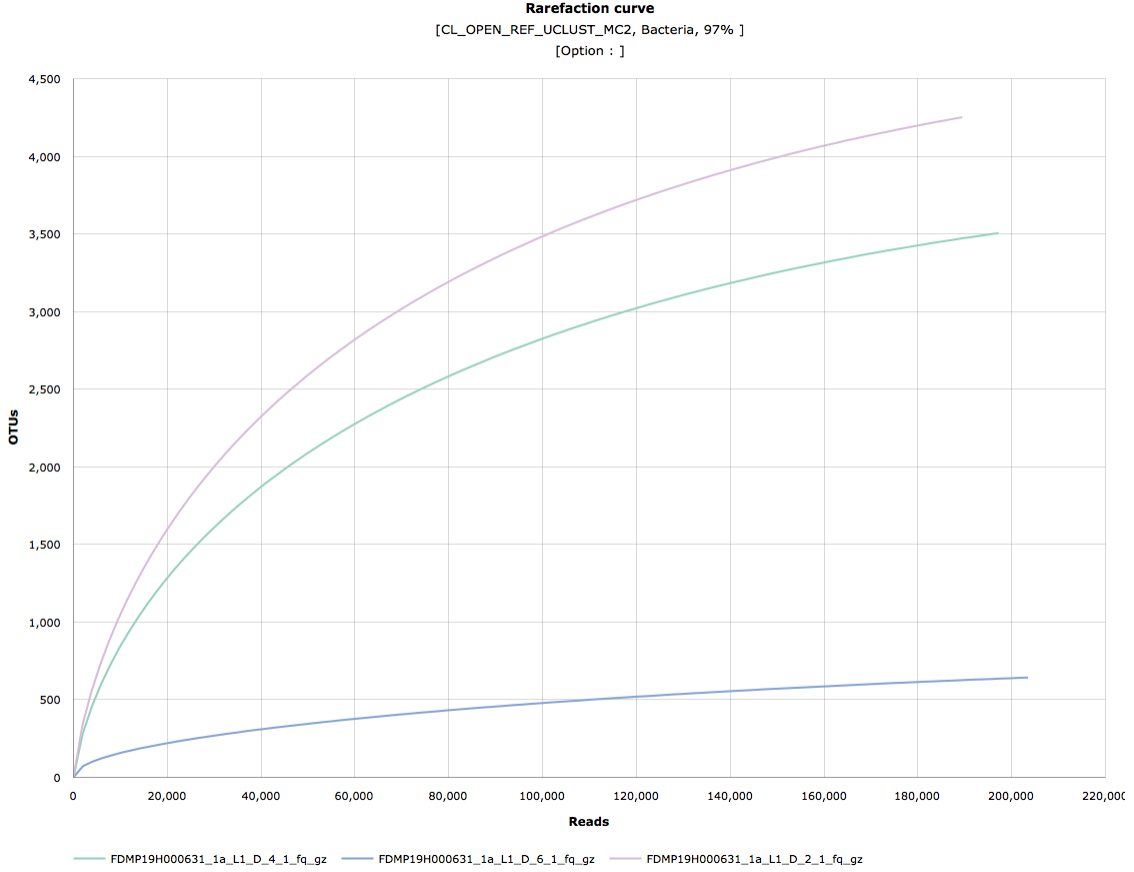
Tablo 4.11. Illumina platformu ile elde edilen veriler ve değerler.

Method	CL OPEN REF UCLUST MC2	Database	chunlab
Cut off	0.97	Normalization	none
Target	Bacteria	Count	1000

Sample name	Target reads	OTUs	ACE	CHAO	Jackknife	NPS Shannon
D_4	197230	3505	4126.02	3918.08	4333.00	03.08
D_6	203510	643	933.40	837.45	882.51	2.15
D_2	189473	4251	5023.91	4798.78	5269.00	3.84

Sample name	Shannon	Simpson	Phylogenetic Diversity	Good's coverage of library(%)
D_4	03.04	0.29	4564	99.58
D_6	2.14	0.22	1144	99.89
D_2	3.79	0.13	5344	99.46

Good's coverage değerleri (0.9989-0.9946) Tablo 4.11'de görüldüğü üzere örnekleme noktasındaki çoğu filotipin başarılı bir şekilde tanımlandığını göstermektedir. Örneklere ait dizi okumalarına göre seyrelme (Rarefaction) grafiği şekil 4.14'de verilmiştir.

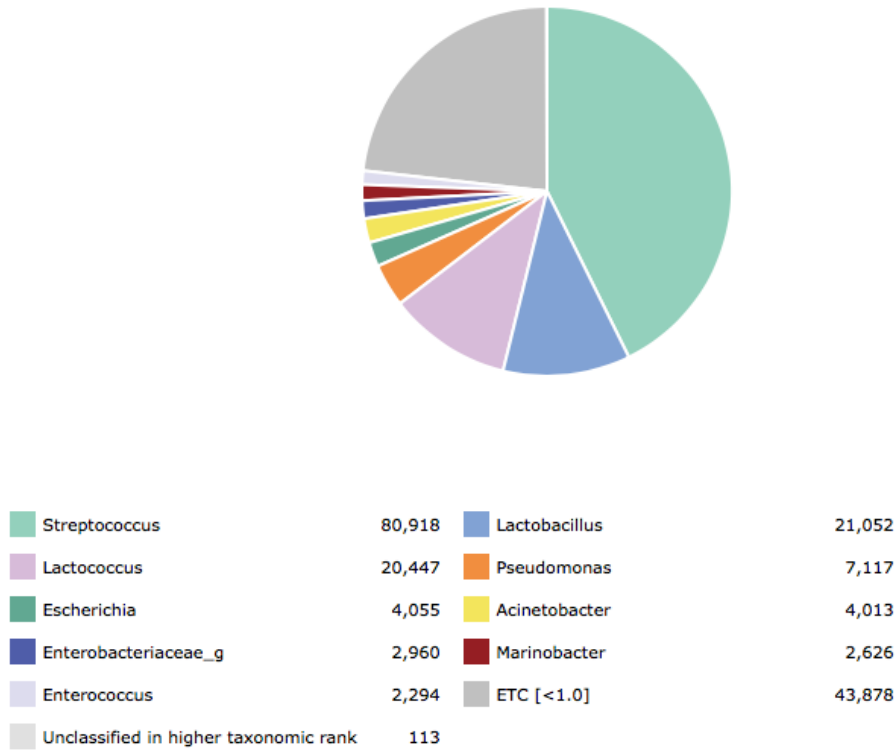


Şekil 4.14. Rarefaction (seyrelme) grafiği

“PD” (phylogenetic diversity) değeri filogenetik çeşitliliğin bir ölçüsü olup, ağaç üzerindeki belirli bir takson kümesini kapsayacak şekilde gerekli olan tüm filogenetik dalların minimum toplam uzunluğu olarak tanımlanmaktadır. Daha büyük PD değerleri, daha fazla tahmini çeşitlilik özelliğini anlamına gelmektedir. Buna göre D2 ve D4 örnekleri çeşitlilik açısından zengin örnekler olarak değerlendirilmektedir. D6 örneği ise bu anlamda daha düşük bir değere sahiptir.

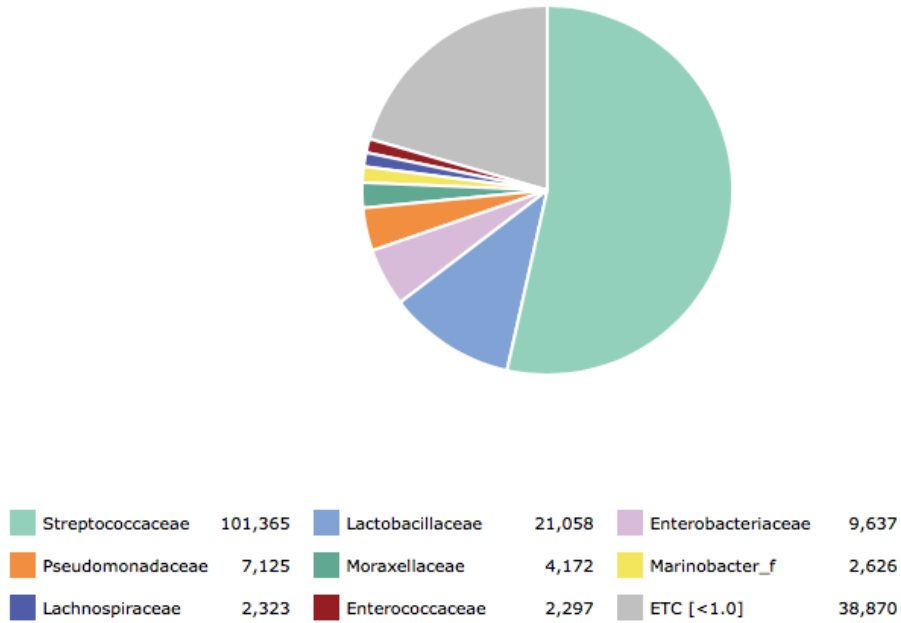
Yapmış olduğumuz çalışmada 3 örnek içerisinde sadece D2 kodlu Gedebey 1 örneği ileri analizlerde değerlendirilmeye alınmıştır.

Örnekler arasında D2 kodlu örneğe ait kaliteli okuma sayısı 189473’tür. EzBiocloud databank üzerinden yapılan taksonomik analiz sonuçları Şekil 4.15’de verilmiştir.



Şekil 4.15. Genus düzeyinde taksonomik kompozisyon

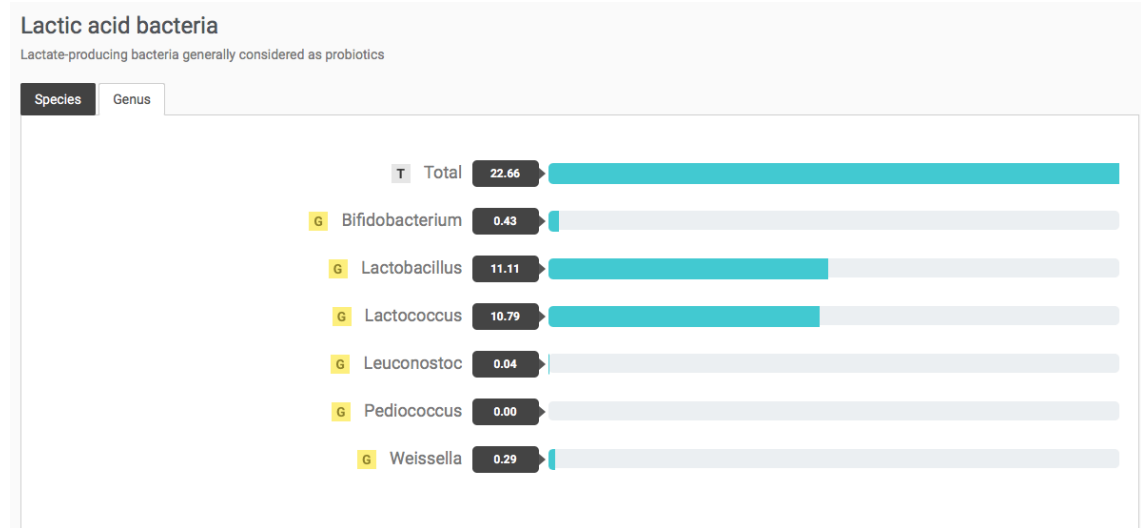
Genus düzeyinde *Streptococcus* cinsinin 80,918 okuma ile en yüksek oranda temsil edildiği görülmektedir. Daha sonra *Lactobacillus* ve *Lactococcus* cinsleri gelmektedir.



Şekil 4.16. Familya düzeyinde taksonomik kompozisyon

Familya düzeyinde *Streptococcaceae* familyasının 101,365 okuma sayısı ile en yüksek oranda temsil edildiği görülmektedir. Daha sonra *Lactobacillaceae* ve *Enterobacteriaceae* familyaları gelmektedir.

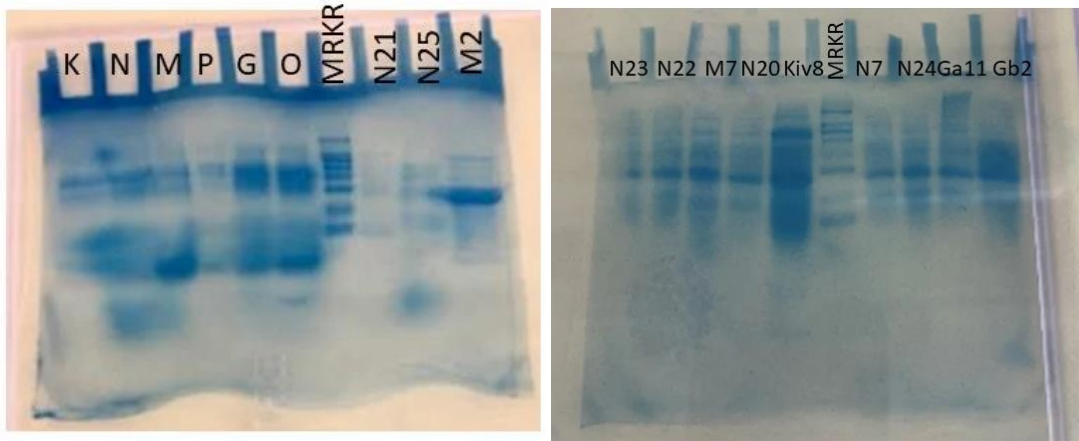
D2 örneğine ait 16S ampikon dizileri okumaları içindeki Laktik asit bakterilerine özgü okumalar ve bunların ait olduğu grupların cins düzeyinde dağılımı Şekil 4.17’de verilmiştir.



Şekil 4.17. Laktik asit bakterilerine özgü okumalar ve cins düzeyinde dağılım

4.8. İzolatların Toplam Protein Profillerinin SDS-PAGE Yöntemiyle Belirlenmesi

Uygun SDS-PAGE protokolü kullanılarak N₇, N₂₀, N₂₁, N₂₂, N₂₃, N₂₄, N₂₅, M₂, M₇, KİV₈, Ga₁₁, Gb₂ izolatları ve 6 adet örnek (kesmik ve peynir örnekleri) işleme alınmıştır ve SDS-PAGE jel görüntüleri (Şekil 4.18) elde edilmiştir.



Şekil 4.18. SDS PAGE jel görüntüleri

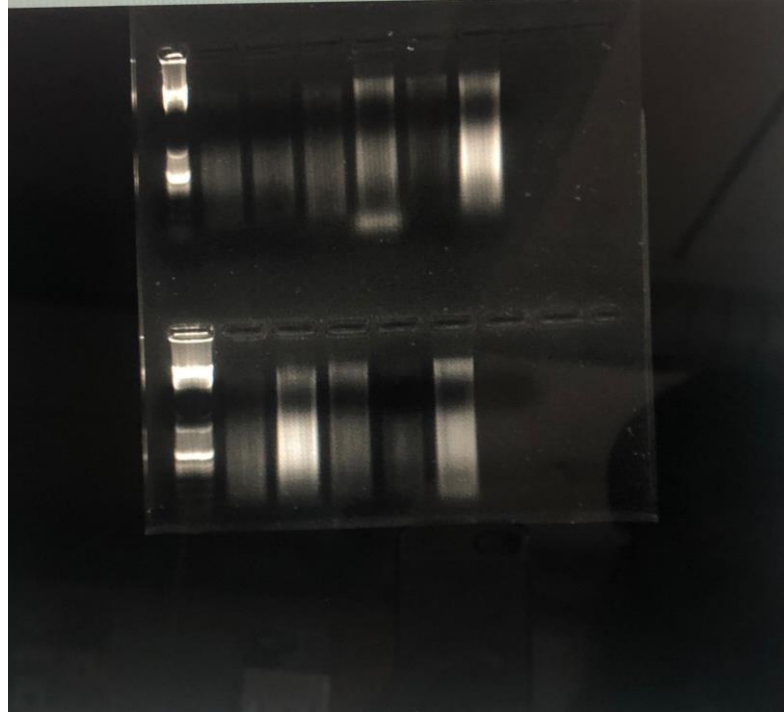
Bu çalışma kapsamında 200.000-6.500 dalton arasında moleküler ağırlığa sahip proteinler içeren standart Sigma protein karışımı kullanılmış ve izolatlar içerisinde aynı moleküler ağırlığa sahip bantlar saptanmıştır. İzolatların protein profillerine bakıldığında 200.000 – 20.000 arasında bantların yoğun olduğu tespit edilmiştir.

4.9. İzolatlardan Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid izolasyonu için PrepEase™ Quick MiniSpin Plasmid Kitleri kullanılmıştır ve 12 adet bakteri işleme alınmıştır. Lakin plazmid DNA izolasyonu başarısız sonuçlanmıştır. Laboratuvar koşullarında plazmitler kültürün muhafaza süresi, antibiyotik kullanımı, besiyerinin bileşimi, plazmid gideren kimyasalların etkisi ile sıcaklığın değiştirilmesi gibi koşullardan etkilenmektedirler, aynı zamanda bazı laktik asit bakterilerinde plazmid bulunmamaktadır. Yaptığımız çalışmada pozitif kontrol kullanılmadığı için kitin çalışıp çalışmadığı belirlenememiştir, bu sebebin sonucu olumsuz etkileyeceği düşünülmektedir.



Şekil 4.19. Plazmid DNA



Şekil 4.20. *Plazmid DNA jel görüntüsü*

4.10. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları

N₇, N₂₀, N₂₁, N₂₂, N₂₃, N₂₄, N₂₅, M₂, M₇, KIV₈, Ga₁₁, Gb₂ izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi sonuçları Tabloda gösterilmiştir.

Çalışma için ticari olarak satılan Siprofloksasin, Penisilin-G, Gentamisin, Nalidixic Acid, Vancomycin, Clindamycin, Azitromisin ve Rifampisin olmak üzere 8 farklı antibiyotik kullanılmıştır. Yaptığımız çalışma sonucunda izolatların duyarlılık ve dirençlilik durumları kültürden kültüre değişerek farklılık göstermiştir. İzolatlardan 8'i Siprofloksasin'e, 2'i Clindamycin'e, 1'i Rifampisin'e, 1'i Azitromisin'e, 11'i Vancomycin'e, 2'i Penisilin-G'e, tümünün Gentamisin ve Nalidixic Acid 'e dirençlilik gösterdiği gözlemlenmiştir.

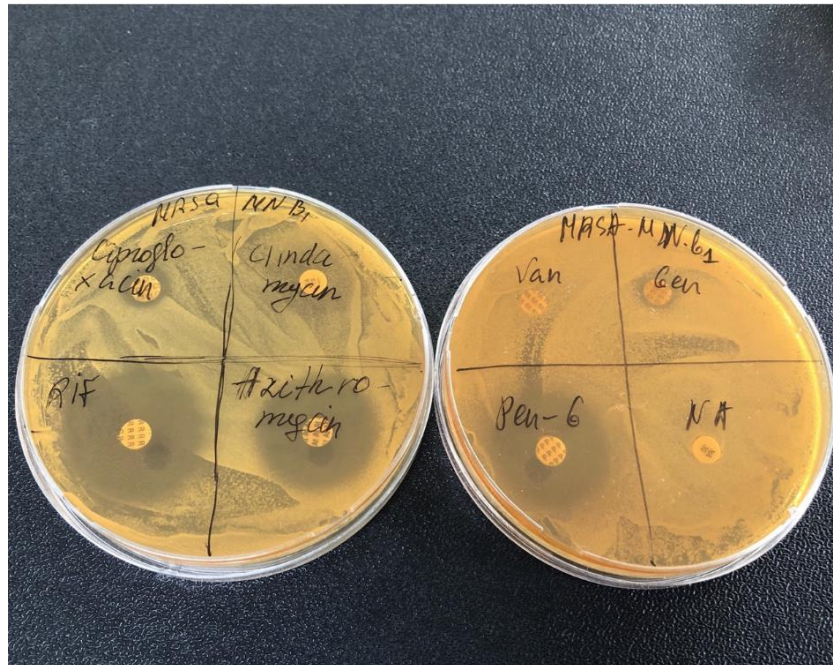
Tablo 4.12. *Seçilen izolatların antibiyotik duyarlılık testi*

İzolat adı	Siprofloksasin	Clindamycin	Rifampisin	Azitromisin	Vancomycin	Gentamisin	Penisilin-G	Nalidixic Acid
N ₇	R	30	20	13	R	R	25	R
N ₂₀	R	15	20	23	R	R	25	R

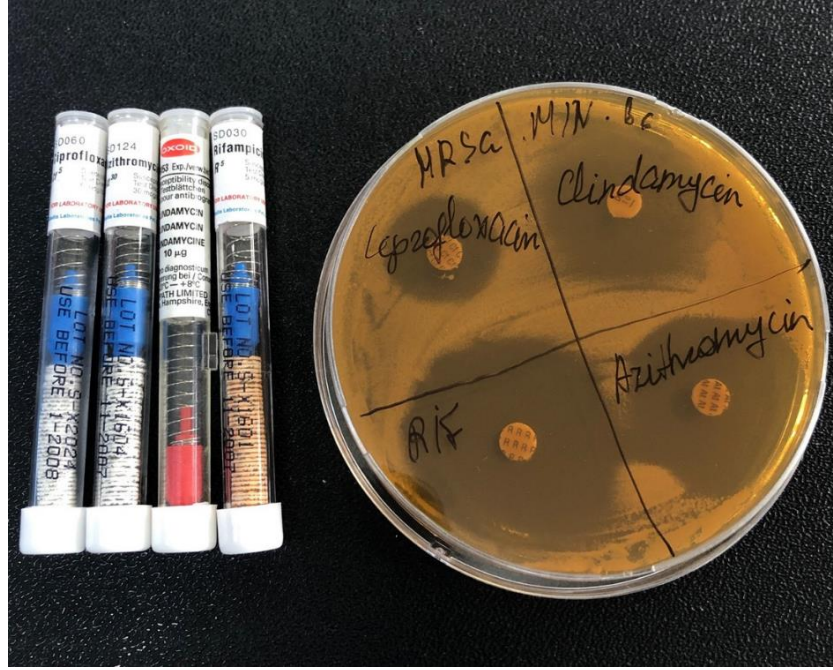
Tablo 4.12. (Devamı)Seçilen izolatların antibiyotik duyarlılık testi

İzolat adı	Siprofloksasin	Clindamycin	Rifampisin	Azitromisin	Vancomycin	Gentamisin	Penisilin-G	Nalidixic Acid
N ₂₁	R	40	25	20	R	R	35	R
N ₂₂	R	40	25	15	10	R	30	R
N ₂₃	3	20	25	15	R	R	25	R
N ₂₄	R	10	20	15	R	R	30	R
N ₂₅	15	25	30	30	R	R	35	R
M ₂	10	R	23	20	R	R	20	R
M ₇	8	23	15	15	R	R	R	R
KİV ₈	R	R	R	R	R	R	R	R
Ga ₁₁	R	40	27	22	R	R	35	R
Gb ₂	R	40	25	21	R	R	30	R

(Sonuçlar mm cinsinde verilmiştir. R: dirençli demektir).



Şekil 4.21. Antibiyotik direnç sonuçları



Şekil 4.22. Antibiyotik direnç sonucu



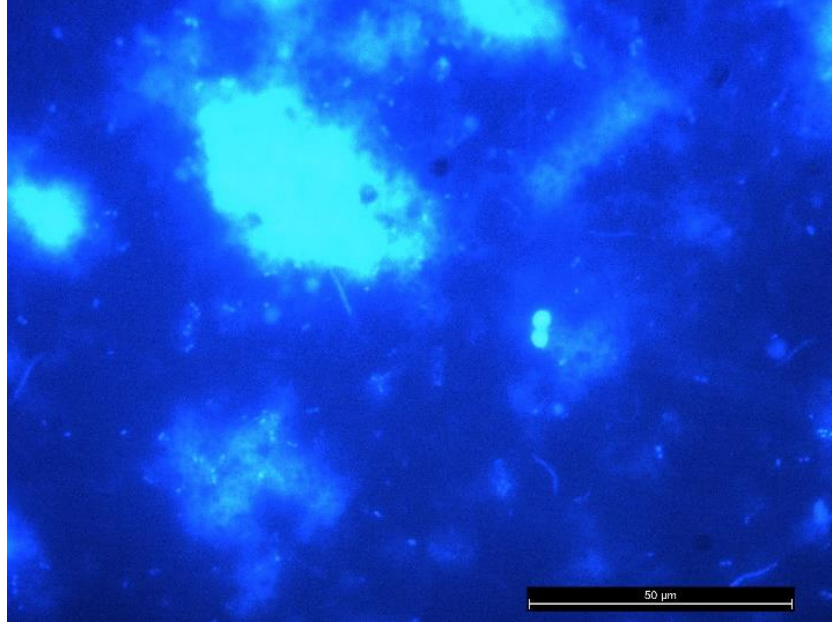
Şekil 4.23. Antibiyotik direnç sonucu

4.11. FISH Yöntemi ve DAPI Boyama Sonuçları

Yapılan çalışmada farklı peynir ve kesmik örneklerindeki mikrobiyal çeşitliliği belirlemek amacıyla bakteria spesifik Eub 338 probu ve DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) boyası kullanılmıştır.

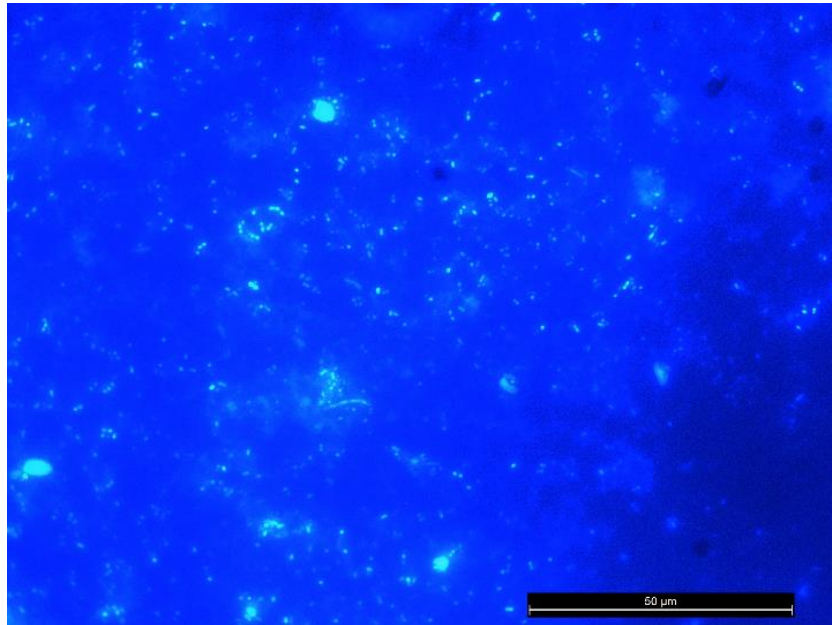
Çalışmada DAPI sinyalleri ile olumlu sonuç elde edilse de prob sinyalleri zayıf olmuştur.

Floresan mikroskobu ile elde edilen DAPI boyama sonuçları aşağıda gösterilmiştir.



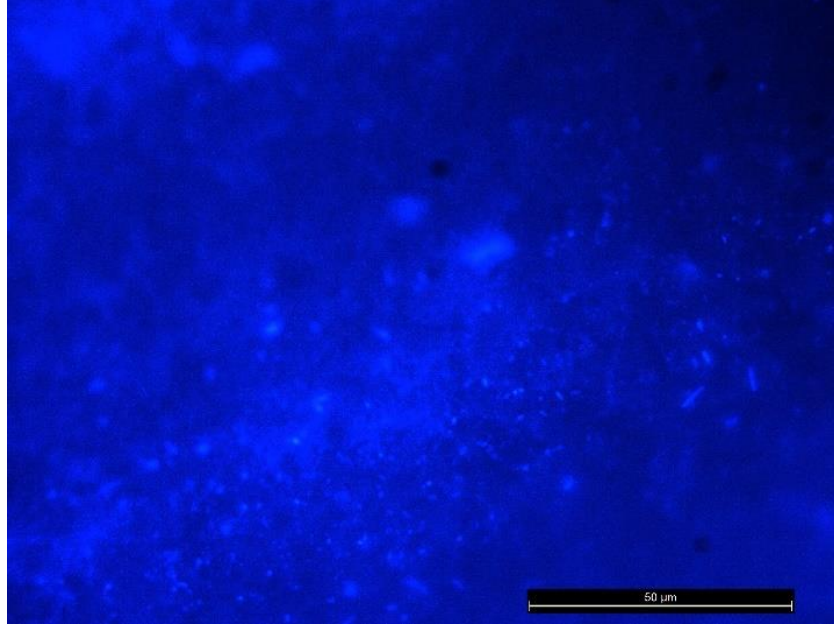
Şekil 4.24. *Gedebeypa* Peynirine ait DAPI boyama

Gedebeypa peynirine ait DAPI boyama sonucuna (Şekil 4.24) esasen örnek içerisinde kok ve basil şekilli bakterilerin olduğu gözlemlenmiştir.



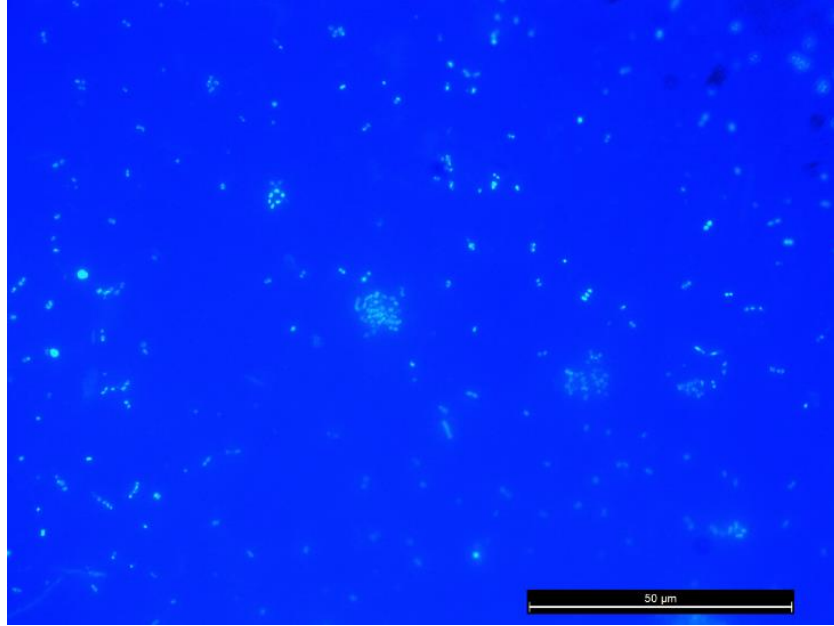
Şekil 4.25. *Kesmik* örneğine ait DAPI boyama

Kesmik örneğinde DAPI boyama sonucuna (Şekil 4.25) göre kok şekilli bakterilerin yoğun olduğu belirlenmiştir.



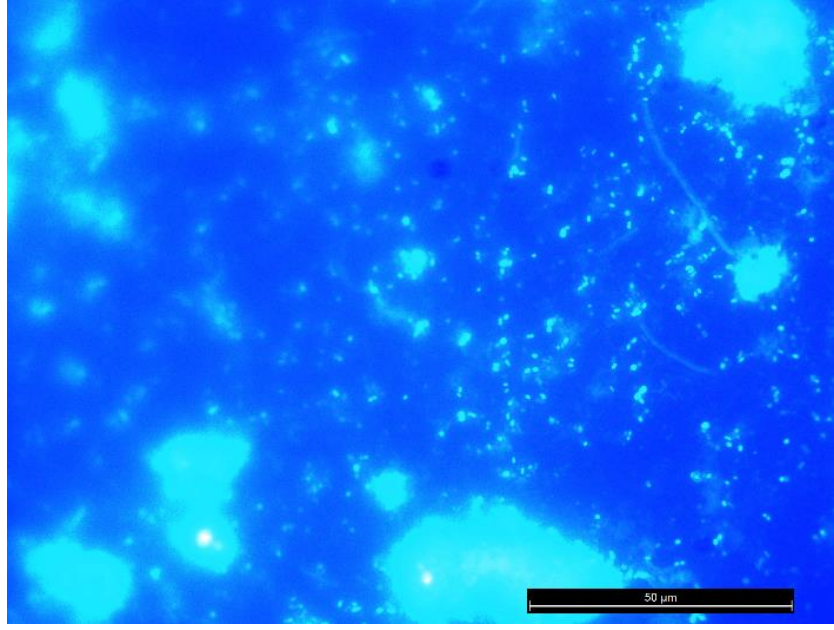
Şekil 4.26. *Motal Peynirine ait DAPI boyama*

Garabağ Motal peynirinde DAPI boyama sonucuna (Şekil 4.26) göre kok ve basil şekilli bakterilerin olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.27. *Naxçıvan peynirine ait DAPI boyama*

Naxçıvan peynirinde DAPI boyama sonucuna esasen (Şekil 4.27) kok, diplokok ve streptokok şekilli bakterilerin olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.28. *İvanovka Peynirine ait DAPI boyama*

İvanovka peynirinde DAPI boyama sonucuna göre (Şekil 4.28) genel olarak kok ve basil şekilli hücrelerin olduğu belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapmış olduğumuz çalışmada Azerbaycan'ın farklı illerine ait 6 peynir ve 1 kesmik, 1 kaymak örneğinden laktik asit bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. MRS agar, M17 agar, PCA, PDA, VRBA besi ortamlarına ekim yapılmış ve inkübasyon sonucu klasik sayım yöntemi ile koloni sayımı gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda Azerbaycan (2010) ([http-12](#)) ve Türk (2011) ([http-13](#)) Gıda Kodeksi Tebliğine esasen örneklerin uygun dilüsyonlarından Tempo cihazında mikroorganizma sayısına bakılmıştır. Otomatik sayım yöntemi (Tempo BioMeriux) ile elde edilen veriler her iki ülkenin Gıda Tebliğine göre karşılaştırılmış ve tebliğlere göre değerlendirme yapıldığında peynir ve kaymak gibi süttten yapılan ürünlerde *S.aureus*, *Salmonella* ve *L.monocytogenes* gibi patojen bakteriler belirli örnek sayısında belirli miktarlar için istenmeyen bakteriler olarak gösterilmiştir. Azerbaycan Gıda Tebliğinde değerlendirilmeler g/sm³, Türk Gıda Tebliğinde ise kob/g-ml birimleri üzerinden yapılmıştır. Çalışmamızda Tempo BioMeriux sayım sonuçları tebliğlerle kıyaslandığında bazı değerlerin beklenen değerlerin üstüne çıktığı görülse de bunun getirme ve saklanma koşullarında oluşa bilecek kontaminasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sayım sonrası petrilerde gelişen küçük, mat, krem rengi ya da beyaz renkteki laktik asit bakterisi olası olan koloniler rasgele seçilerek saflaştırma yapılmıştır. İzole edilen kültürlerin Gram boyama ve Katalaz aktivitesi belirlenmiş, Gram (-), Katalaz (+) olan izolatlar elenmiş, sonuç olarak toplam 95 izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatlardan 8 tanesi kesmik örneğine, 87 tanesi farklı peynir örneklerine aittir. Kaymak örneği bozulma nedeni ile, sayım dışında hiçbir teste tabi tutulmamıştır.

İzolatların hücre morfolojisi ışık mikroskobunda belirlenmiştir. Sonuçlara esasen izolatlardan “Naxçıvan, Garabağ Motal peynirlerinde basil, İvanovka, Gedebe (b) peynirlerinde, İvanovka kesmiğinde kok, Ordubad ve Gedebe (a) peynirlerinde hem kok hem basil”, hücre şeklinin üstünlük teşkil ettiği gözlemlenmiştir.

Rastgele seçilen izolatların antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiş, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29123) ve *Salmonella typhi* üzerinde etkili olan ve en büyük aktivite gösteren 12 bakteri (N₇, N₂₀, N₂₁, N₂₂, N₂₃, N₂₄, N₂₅, M₂, M₇, KIV₈, Ga₁₁, Gb₂) seçilmiştir.

Sanpa ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada geleneksel fermente balık ürününden MRS agar kullanılarak izole edilen laktik asit bakterilerinin hücresiz süpernatantının gıda kaynaklı patojenlere (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*,

Bacillus cereus, *Clostridium perfringens*, *Shigella sp.* ve *Vibrio sp.*) karşı antibakteriyel aktivitesi belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise farklı süt ürünlerinden MRS agar ve M17 agar kullanarak laktik asit bakterileri izole edilmiş, izolatların hücresiz süpernatantı elde edilmiş ve *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29123) ve *Salmonella typhi*’e karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir.

Muhammad ve arkadaşlarının (2019) yaptığı diğer bir çalışmada fermente sert peynirden izole edilen *Lactobacillus plantarum*’un gıda kaynaklı patojenlere (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus*) karşı antimikrobiyal aktivitesi Oxford fincan tekniği ve karışık kültür inhibisyon deneyleri kullanılarak incelenmiştir. Bizim çalışmamızda ise izolatların antimikrobiyal etkisi agar kuyu difüzyon yöntemi ile saptanmıştır.

Agcaoili ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada geleneksel olarak hazırlanan fermente edilmiş ürünlerden elde edilen 30 laktik asit bakteri izolatının (17 *Lactobacillus plantarum*, 13 *Enterococcus spp.*) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Escherichia coli* ATCC 25922’ ye karşı antibakteriyel aktivitesini belirlemek için disk difüzyon metodu kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda ise geleneksel olarak hazırlanan süt ürünlerinden elde edilen laktik asit bakterilerinden 12 izolat seçilerek *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29123) ve *Salmonella typhi*’e karşı antimikrobiyal aktivitesi agar kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Lakin bizim çalışmamızda laktik asit bakterilerinin türleri izolatların belirlenememiştir.

Mohamad ve arkadaşlarının yaptığı diğer çalışmada (2019) mango turşusundan standart yöntemlerle izole edilen LAB’nin (1 *Lactobacillus fermentum*, 2 *L. pentosus* ve 2 *L. paracasei*) antibakteriyel aktivitesi, bizim çalışmamızda olduğu gibi LAB’nin hücresiz süpernatantı kullanılarak agar kuyu difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Beş LAB izolatının tamamında, test edilen patojenlere karşı antibakteriyel aktivitenin olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmamızın ilerleyen aşamalarında antimikrobiyal aktiviteye sahip olan 12 izolatın tanımlanması ve daha geniş spektrumda patojenlere karşı test edilmesi, ayrıca antimikrobiyal maddenin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz N₇, N₂₀, N₂₁, N₂₂, N₂₃, N₂₄, N₂₅, M₂, M₇, KİV₈, Ga₁₁, Gb₂ izolatlarının Kongo Kırmızılı Agar yöntemi ile biyofilm oluşturma yetenekleri araştırılmıştır. Sonuç olarak tüm izolatlarda siyah renkli koloniler gözlemlenmiş ve biyofilm pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bakteriyel biyofilmler, doğal ortamlarında

birçok mikroorganizma türü için tercih edilen bir büyüme şeklidir. Patojenlerin bir biyofilm içerisine entegre olma kabiliyetleri hayatta kalmaları için çok önemlidir. Laktik asit bakterileri (özellikle *Lactobacillus*) topluluklarında biyofilm oluşumu olasılığı çeşitli endüstriyel ve tıbbi ortamlarda önemlidir çünkü bu bakteriler farklı patojenik mikroorganizmaların kolonizasyonunu ortadan kaldırabilir. Alternatif olarak, gıda kaynaklı patojenlere karşı biyo-kontrol ajanları olarak laktik asit bakteri biyofilmlerinin hızla genişleyen potansiyeli ile yeni fırsatlar ortaya çıkmaktadır (Jalilsood ve ark., 2015).

Rewatkar ve Wadher (2013) tarafından yapılan çalışmada 60 klinik izolat için biyofilm oluşumunun tespiti için Tüp yöntemi (TM) ve Kongo Kırmızılı agar (CRA) yöntemi karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak CRA yöntemi ile 60 izolattan, 54'ü yüksek biyofilm üreticisi olarak tespit edilmiş, TM yöntemi ile 50 izolatın biyofilm oluşumunun kötü olduğu, 10 tane izolatın ise biyofilm üreticisi olmadığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla mevcut soruşturmadan, CRA yöntemi hızlı, hassas ve tekrarlanabilir bir yöntem olarak kabul edilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ise diğer testlere esasen seçilen toplam 12 adet laktik asit bakterisinin biyofilm oluşturma yeteneği CRA yöntemiyle belirlenmiş ve tümünde biyofilm sonucu pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Sultan ve Nabel'in (2019) yaptıkları bir çalışmada üropatojenler tarafından biyofilm üretiminin tespiti Doku Kültürü Plak yöntemi (TCPM), tüp yöntemi (TM) ve Kongo Kırmızılı Agar (CRA) yöntemi ile yapılmıştır. Yapılan deney sonucu olarak incelenen üç fenotipik biyofilm saptama yönteminden biyofilm tespiti için en ideal yöntem Doku Kültürü Plak yöntemi olduğu fikrini ileri sürmüşler. Tüp yöntemi biyofilm tespitinde Kongo Kırmızılı Agar yönteminden daha üstün olup daha iyi hassasiyet ve özgül sonuçlar göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise patojenlerin aksine, laktik asit bakterilerinde biyofilm oluşumunun saptanması için Kongo Kırmızılı Agar yöntemi ile olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Peynir ve kesmik örneklerinden elde ettiğimiz Gram (+), Katalaz (-), biyofilm (+), antimikrobiyal etkiye sahip N₇, N₂₀, N₂₁, N₂₂, N₂₃, N₂₄, N₂₅, M₂, M₇, KİV₈, Ga₁₁, Gb₂ kodlu izolatların 8 farklı antibiyotiğe (Siprofloksasin, Penisilin-G, Gentamisin, Nalidixic Acid, Vancomycin, Clindamycin, Azitromisin ve Rifampisin) olan direnç ve duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Deney sonucu olarak izolatlardan 8'i Siprofloksasin'e, 2'i Clindamycin'e, 1'i Rifampisin'e, 1'i Azitromisin'e, 11'i Vancomycin'e, 2'i Penisilin-G'e, tümünün Gentamisin ve Nalidixic Acid 'e dirençlilik gösterdiği gözlemlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.12'de mm cinsinden verilmiştir.

Rewatkar ve Wadher (2016) tarafından yapılan çalışmada Kirby-Bauer disk difüzyon tekniği kullanılarak biyofilm üreten bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri yapılmış ve netice itibarıyla biyofilm üreten bakteriler antibiyotiklere daha fazla duyarlı oldukları belirlenmiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise seçilen tüm isolatlar biyofilm üretme yeteneğine sahip oldukları halde antibiyotiklere hem duyarlı hem de dirençli oldukları saptanmıştır (Tablo 4.12).

Hassan ve arkadaşlarının (2011) yapmış olduğu bir çalışmada biyofilm üreten bakterilerin CLSI kurallarına göre Kirby-Bauer disk difüzyon tekniği kullanılarak antibiyotik duyarlılık testi yapılmıştır. Biyofilm üreten bakterilerde, biyofilm üretmeyenlere göre daha yüksek antibiyotik direncinin olduğu gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise seçilen tüm bakteriler biyofilm üretme yeteneğine sahip olmuştur ve ticari olarak elde edilen farklı antibiyotiklere karşı farklı dirençlilik göstermiştir.

Turhan ve Enginkayanın (2016) yapmış olduğu benzer bir çalışmada bazı ticari probiyotik gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin (*Lactobacillus spp.*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium spp.*) antibiyotik dirençlilikleri Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemi ile belirlemiştir. Yapılan çalışmada analiz tür düzeyinde gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre *Lactobacillus spp.* isolatlarında vankomisin (%20), tetrasiklin (%20), ampisilin (%20), gentamisin (%20) ve siprofloksasine (%80) karşı direnç saptanırken, isolatların eritromisin (%100), kloramfenikol (%100) ve nitrofurantoin'e (%100) ise duyarlı oldukları bulunmuştur. *Lactobacillus acidophilus* isolatlarının ise gentamisin (%25) ve siprofloksasine (%75) karşı dirençli oldukları saptanırken, tüm *L. acidophilus* isolatlarının vankomisin, eritromisin, tetrasiklin, ampisilin, kloramfenikol, ripamfislin ve nitrofurantoin'e duyarlı oldukları bulunmuştur. *Bifidobacterium spp.* izolatinin vankomisin, tetrasiklin, ampisilin ve siprofloksasin'e karşı dirençli olduğu, buna karşın eritromisin, gentamisin, kloramfenikol ve nitrofurantoin'e duyarlı olduğu belirlemişler. Bizim çalışmamızda seçilen isolatlar tür düzeyinde belirlenmemiş, lakin bu çalışma ile kıyasla 12 izolattan gentamisine (%100), siprofloksasine (~%66), vancomycine (~%91), rifampisine (~%8) karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.

Bizim çalışmaya benzer olarak Sharma ve arkadaşlarının (2016) yaptığı diğer bir çalışmada ticari olarak temin edilebilen probiyotik *Lactobacilli*'ler antibiyotik dirençliği değerlendirilmiştir. Çalışmada toplam 30 izolat (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum* ve

Lactobacillus fermentum) 45 antibiyotiğe karşı disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyotik duyarlılık testine tabi tutulmuştur. İzolatlar, nalidiksik asit, vankomisin, kanamisin, teikoplanin, ko-trimoksazol, amikasin, streptomisin, norfloksasin, sefepime ve nitrofurantoine karşı yüksek direnç göstermiştir. Bunun yanı sıra, tobramisin, gentamisin, ampisillin, sefaklor, metisilin, penisilin, tetrasiklin, levofloksasin, azitromisin, kloramfenikol, amoxyclav, sulbaktam, oksasilin, ofloksasin, siprofloksasin, kloksasilin ve novobiosinin doğru düşük direnç göstermiştir. İzolatların hiçbiri klindamisin, eritromisin, linezolid, kuinopristin / dalfopristin ve doksisisiklin direnç göstermemiştir. Tüm izolatlar, cefatrixone, seftazidim, sefadroksil, sefotaksim, sefalotin, sefoperazon ve netillin karşı duyarlı olduğu bulunmuştur. Bu çalışma, antibiyotik direncinin, gıda güvenliği konusunda endişe yaratabilecek farklı probiyotik türlerinde yaygın olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, antibiyotik duyarlılığı, probiyotiklerin değerlendirilmesinde güvenlik değerlendirmesinin önemli bir parçası olarak düşünülmelidir.

Laktik asit bakterilerinin çoğunun antibiyotiklere dirençli olduğu, bu dirençliliğin yapısal olduğu ve transfer edilemediği kabul edilmiştir. Aynı zamanda *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. reuteri* gibi bazı laktik asit bakterilerinin plazmitler tarafından kodlanan antibiyotik dirençlilik genleri taşıdığı, antibiyotik dirençliliğinin patojen ve patojen olmayan bakterilere transferinin sağlık açısından ve probiyotiklerin güvenilirliği açısından büyük önem taşıdığı belirtilmiştir (Yiğit 2009).

Kendi çalışmamızda ilerleyen aşamalarda elde ettiğimiz laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri belirlendikten sonra bu özelliğin göz önünde bulundurulması hedeflenmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışmada örneklerin bakteriyal çeşitliliğini tespit etmek amacıyla toplam nükleik asit ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilmiş ekstraksiyon sonuçları BM Labosis Firması'nda (Ankara, Türkiye) değerlendirilmiştir. BM Labosis Firması'nda (Ankara, Türkiye) sadece Gedebe Peyniri, Qarabağ Motal Peyniri ve İvanovka Kesmik örneklerinin toplam nükleik asit sonuçlarına esasen Illumina platformu ile 16S rDNA gen-hedefli MiSeq dizileme sonuçları elde edilmiştir. Illumina platformu ile elde edilen ampikon büyüklüğü ortalama ~420 baz olup, barkod ve primer diziler uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen okuma uzunluğu ortalama 400bp olarak elde edilmiştir. Elde edilen verilere göre D2 kodlu Gedebe 1 örneğinin 189473, D4 kodlu Qarabağ Motal örneğinin 197230, D6 kodlu İvanovka Kesmik örneğinin okuma sayısı

203510'dur. Good's coverage değerleri D4 kodlu örnek için %99.68, D6 kodlu örnek için %99.89, D2 kodlu örnek için %99.46 olup, örnekleme noktasındaki çoğu filotipin başarılı bir şekilde tanımlandığını göstermektedir. Çalışmamızın diğer aşamalarında 3 örnek içerisinde sadece D2 kodlu Gedebe 1 örneği ileri analizlerde değerlendirilmeye alınmıştır. D2 örneğinin Genus düzeyinde taksonomik kompozisyon değerlerine göre *Streptococcus* cinsinin 80,918 okuma ile en yüksek oranda temsil edildiği görülmektedir. Daha sonra 21,052 oranda *Lactobacillus* cinsi ve 20,447 oranda *Lactococcus* cinsi gelmektedir. D2 örneğinin Familya düzeyinde *Streptococcaceae* familyasının 101,365 okuma sayısı ile en yüksek oranda temsil edildiği görülmektedir. Daha sonra 21,058 okuma sayısı ile *Lactobacillaceae* ve 9,637 okuma sayısı ile *Enterobacteriaceae* familyaları gelmektedir. D2 örneğine ait 16S ampikon dizileri okumaları içindeki Laktik asit bakterilerine özgü okumalar ve bunların ait olduğu grupların cins düzeyinde dağılımı Şekil 4.17'de gösterilmiştir.

Çin'in Guangxi eyaletinde Song ve arkadaşlarının (2017) yaptığı çalışmada mastisitli ineklerden elde ettikleri süt örneklerindeki mikrobiyal çeşitliliği belirlemek için Illumina MiSeq platformunu kullanarak bakteriyel 16S rRNA genlerinin DNA dizilimi yoluyla analizi yapılmıştır. Sonuç olarak on bakteriyel filo (*Akidobakteriler*, *Aktinobakteriler*, *Sınıflandırılmamış Bakteriler*, *Sınıflandırılmış Bakteroidetler*, *Aday-bölünme-TM7*, *Siyanobakteriler*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* ve *Tenericutes*), 2 mantar filo (*Ascomycota* ve *Basidiomycota*) tanımlanmıştır. Bakteriyel filo içerisinde baskın olan filo *Firmicutes*, bunu takiben *Tenericutes* olarak belirlenmiştir. Cins düzeyinde, en çok sayıda bakteri operasyonel taksonomik ünite (OTU) *Enterococcus* ve *Mycoplasma* olduğu belirlenmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ise sağlıklı ineklerden elde edilen sütlerin geleneksel olarak işlenmesinden elde edilen yöresel farklı peynir ve kesmik örneklerindeki mikrobiyal çeşitlilik Illumina platformu ile 16S rDNA gen-hedefli MiSeq dizileme ile belirlenmiştir. Ve sonuç olarak cins düzeyinde en çok *Streptococcus* cinsinin 80,918 okuma ile baskın olduğu görülmektedir.

Diğer bir çalışma ise Sant'Anna ve arkadaşları tarafından (2019) Brezilya'da yöresel Minas zanaat peyniri üzerinde yapılmıştır. Bu peynir, lezzet ve duyuşal yönleri artırabilecek spesifik mikroorganizmaların aşılmasından sorumlu olan "pingo" adı verilen endojen bir başlangıç kültürünün eklenmesiyle çiğ inek sütü kullanılarak yapılır. Bu çalışmada işlenmemiş sütün bakteri topluluğunu ve endojen başlangıç kültürü değerlendirmek, aynı zamanda altmış günde Serra do Salitre bölgesinde (Brezilya)

olgunlaşan peynirin iç ve dış yüzeyindeki bakteri topluluğundaki olası değişimleri ortaya çıkarmak için Illumina MiSeq 16S rRNA gen amplikonu sıralaması kullanılmıştır. Peynirin olgunlaşma süresi boyunca familya düzeyinde *Planococcaceae* ve *Streptococcaceae* yaygın olduğu görülmüştür. Aynı zamanda peynirlerin yüzeyinde *Planococcaceae* familyasının *Leuconostocaceae* familyası ile güçlü etkileşimler geliştirdiği görülmüş ve çevresel faktörlerle ilişkilendirilmiştir. Yapılan bu çalışmaya göre coğrafi konum, nem ve asitlik gibi abiyotik faktörler mikrobiyal değişimin ana nedenleri olarak değerlendirilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ise yöresel olgun peynirler ticari olarak elde edilmiştir. 16S rDNA gen-hedefli MiSeq dizileme ile mikrobiyal çeşitlilik belirlenmiş ve bu çalışmada olduğu gibi *Streptococcaceae* familyasının baskın olduğu belirlenmiştir.

Wang ve arkadaşlarının (2019) yapmış olduğu çalışmada Illumina MiSeq sıralaması ve kültüre bağlı yöntemler kullanarak süt işleme sırasında ekipman yüzeylerinde oluşan biyofilmlerin bakteriyel bileşimini araştırılmıştır. Illumina sekansı altı sınıf, on sıra, on beş aile, on sekiz cins ve on sekiz türden oluşan sekiz adet phyla tanımlamıştır. Buna karşılık, kültür bazlı yöntem kullanılarak aynı örneklerden sadece sekiz tür izole edilmiştir. Tanımlanan bakterilerin biyofilm oluşturma kabiliyetini belirlemek için kristal viyole boyama yoluyla biyofilm oluşum analizi yapılmıştır. Yetiştirilebilen sekiz türden beşi, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter junii*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium callunae* ve *Stenotrophomonas maltophilia*, biyofilm oluşturabildiği belirlenmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada Illumina MiSeq dizileme ile genel mikrobiyal çeşitlilik belirlenmiştir. Aynı zamanda belirli kriterlere göre seçilen kültürlerin biyofilm oluşturma yeteneğine bakılmıştır. Bahsettiğimiz çalışmadan farklı olarak, bizim çalışmamızda kültürlerin biyofilm oluşturma yeteneği Kongo Kırmızılı Agar yöntemiyle saptanmıştır, lakin bu izolatların hangi türe ait olduğu belirlenmemiştir.

Illumina MiSeq platformu ile mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi yalnızca süt ürünleriyle sınırlanmamakta olup, aynı zamanda farklı gıda (Sun ve ark., 2018), çevresel örnekler (Abdallah ve ark., 2018) ve bağırsak mikrobiyotası (Zhu ve ark., 2018) gibi çeşitli analizleri kapsamaktadır.

Sun ve arkadaşlarının (2018) Geleneksel Çin soya fasulyesi ezmeleri üzerinde yaptığı çalışmada Illumina Miseq Sekansı kullanarak mikrobiyal çeşitliliği araştırılmıştır. Toplamda, on dokuz örnekten 687.888 okuma sayılı bakteri dizisi ve yirmi örnekten

1.091.649 okuma sayılı mantar dizisi elde edilmiştir. Bakteriyel sekanslar arasında, baskın filo *Firmicutes* (% 74.77), *Proteobacteria* (% 22.61) ve *Actinobacteria* (% 2.55) olarak değerlendirilmiştir. Genus düzeyinde ise *Staphylococcus* cinsinin çoğunluk oluşturduğu belirlenmiştir.

Zhu ve arkadaşlarının (2018) yaptığı diğer bir çalışmada doğu Himalayalarda yaşayan Sichuan takinin (vahşi ve esir türlerin) dışkıları üzerinden bağırsak mikrobiyotasının mikrobiyal topluluğunu ve çeşitliliğini karakterize etmek için 16S rRNA'nın V4 bölgesini hedef alan Illumina Miseq platformu kullanılmıştır. Sonuçlara göre *Firmicutes* (%57.4), *Bacteroidetes* (%24.2) ve *Proteobacteria* (%12.3) filalarının baskın olduğu belirlenmiştir. Aile / cins düzeyinde ise *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Lachnospiraceae*, *Rikenellaceae*, *Bacillus*, *Comamonas* ve *Spirochaetaceae* 'nin çoğunluk teşkil ettiği gözlemlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada farklı peynir ve kesmik örneklerindeki mikrobiyal çeşitliliği belirlemek için kullanılan diğer yöntemlerden biri de FISH yöntemi olmuştur. FISH yönteminde bakteriye spesifik Eub 338 probu ve DAPI boyası kullanılmış ve sonuçlar floresan mikroskobu ile incelenmiştir. DAPI boyama ile sonuçlara esasen pozitif sinyaller elde edilmiş ve Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28'de sonuçlar gösterilmiştir. Netice itibarıyla morfolojik olarak değerlendirme yapılmış ve çalışmamızda kullanılan süt ürünlerinde genel olarak kok, basil, diplokok, streptokok hücre şekillerinin üstünlük teşkil ettiği gözlemlenmiştir. Floresan mikroskobunda Eub 338 probu ile zayıf sinyaller elde edilmiştir. Hibridizasyon sonrası filtreleri kapatmak için solmayı engelleyen citifluor (antifade solüsyon) yerine gliserol kullanılması aradan geçen süre zarfında zayıf sinyallerin oluşmasına neden olmuştur. Çalışmanın ilerleyen aşamalarında FISH yönteminin tekrarlanması planlanmıştır.

Machado ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada *Lactobacillus* spp'yi tanımlamak için Peptid Nükleik Asit (PNA) FISH probu kullanmışlar. Probu (Lac663), farklı *Lactobacillus* türlerine ait 36 suşta ve diğer bakteri türlerinin 20 suşunda test edilmiştir. Yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %100 ve %95 olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca yöntemin uygulanabilirliği *Lactobacillus* suşları ile probiyotik aralık konsantrasyonlarında ve diğer taksonomik olarak ilişkili bakterilerde ve ayrıca patojenik bakterilerde eklenen süt örneklerinde test edilmiştir. Lac663 probu, yalnızca *Lactobacillus* suşlarına bağlanmıştır ve tarif edilen PNA-FISH metodu, bu potansiyel probiyotik bakterilerin insan sağlığı üzerinde etkili bir yararı olduğu düşünülen

konsantrasyonlarda doğrudan *Lactobacillus spp.* ölçebilmiştir. Bizim çalışmamızda ise genel bakteria spesifik Eub338 probu kullanılmış ve analizi yapılan örneklerdeki kültüre alınmış ve alınmamış mikrobiyal çeşitliliği belirlemek amaçlanmıştır.

Kollöffel ve arkadaşlarının (1999) yaptığı çalışmada farklı olgun Gruyere Sure peynirinin yüzey mikroflorası in situ hibridizasyon tekniğiyle gruba ve türe özgü oligonükleotit problemleri kullanılarak belirlenmiştir. Prob olarak Eub338 kullanılmış ve mikrobiyal topluluğun büyük bir kısmı (%70'i) saptanabilmiştir. rRNA-hedefli oligonükleotit problemleri ile flüoresan in situ hibridizasyon ile tespit edilebilen bakteri sayısı olarak tanımlanan fizyolojik olarak aktif bakteriler, DAPI boyaması ile saptanan toplam sayılar ve canlı sayım tekniği ile karşılaştırılmıştır. Bizim çalışmamızda da benzer olarak Eub338 probu kullanılmış ve DAPI boyaması yapılmıştır. Lakin bu çalışmadan farklı olarak, yaptığımız çalışmada DAPI boyaması ile morfolojik yoğunluk belirlenmiştir.

Gunasekera ve arkadaşları (2003) yaptıkları çalışmada *Pseudomonas spp.* tespiti ve numaralandırılması için spesifik bir flüoresans in situ hibridizasyon (FISH) probunu geliştirmişler. 16S rRNA dizileri, *Pseudomonas* cinsi için spesifik oligonükleotit probu geliştirmek amacıyla analiz edilmiş ve 20 farklı *Pseudomonas spp* ve *Pseudomonas* dışındaki cinslerden (negatif kontroller olarak) 23 bakteri türü test edilmiştir. Bu çalışmada sunulan yöntem sütteki *Pseudomonas spp* eşzamanlı olarak tespit edilmesine, tanımlanmasına ve numaralandırılmasına izin vermektedir. *Pseudomonas*'ın hızlı ve doğru numaralandırılması, süt tesislerinde belirli kirlilik kaynaklarının tanımlanmasını, pastörizasyon işlemlerinin doğru şekilde onaylanmasını ve işlenmiş sütün raf ömrünün tahmin edilmesini kolaylaştırır.

FISH yöntemiyle aynı zamanda geçerli problemler kullanarak süt tesislerinde sütün bozulmasına neden olan *Pseudomonas spp* gibi belirli kirlilik kaynaklarının tanımlanması (Bottari ve ark., 2006), *Salmonella spp.* *Listeria monocytogenes* gibi gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların hızlı bir şekilde tespiti (Oliveira ve ark.,2004), çevresel analizlerde mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi (Llobet-Brossa ve ark., 1998) ve başka analizler mümkündür.

Yaptığımız çalışmada sonuç olarak tüm verileri gözden geçirdiğimiz zaman Azerbaycan'ın farklı süt ürünlerinden elde edilen sayım sonuçlarına göre tüm örneklerde belirli sayıda laktik asit bakterisi olduğu gözlemlenmiştir. Morfolojik değerlendirilmelere göre koloni üzerinde morfolojilerine esasen laktik asit bakteri olası mikroorganizmalar seçilerek saflaştırılmış ve morfolojik, biyokimyasal testlerle belirlenmiştir. Daha sonra

rastgele seçilen izolatların antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiş ve 12 izolatta yüksek aktivite saptanmıştır. Yüksek aktivite gösteren izolatların antibiyotik dirençlilikleri belirlenmiş ve farklı antibiyotiklere karşı farklı direnç sonuçları elde edilmiştir. Aynı zamanda Kongo Kırmızılı Agar yöntemiyle izolatların tümünde biyofilm oluşturma yeteneğinin olduğu saptanmıştır. Seçilen izolatlar farklı sıcaklık, farklı tuz konsantrasyonları ve farklı pH'larda geliştirilmiş ve genel olarak pozitif sonuçlar elde edilmiştir. İzolatlardan plazmit DNA izolasyonu yapıldığında pozitif sonuç elde edilememiştir. Daha sonra örneklerdeki mikrobiyal çeşitlilik DNA ekstraksiyon sonuçlarına esasen Illumina MiSeq platformu ile belirlenmiştir. Örneklerdeki mikrobiyal toplulukların morfolojik yoğunluğu FISH yöntemi ile saptanmıştır. Genel olarak çalışmamızın amacı Azerbaycan'ın farklı süt ürünleri ile ilgili yapılan diğer çalışmalar gibi literatüre katkıda bulunmak olmuştur.

KAYNAKÇA

- Abanoz, H. S. (2014). *Enterococcus faecalis Kt11"İn Probiyotik Potansiyelinin Belirlenmesi ve Bakteriyosin Üretimi Üzerine Çalışmalar*. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir. Osmangazi Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Abdallah, M. B., Karray, F., Kallel, N., Armougom, F., Mhiri, N., Quéméneur, M., ... & Sayadi, S. (2018). Abundance and diversity of prokaryotes in ephemeral hypersaline lake Chott El Jerid using Illumina Miseq sequencing, DGGE and qPCR assays. *Extremophiles*, 22(5), 811-823.
- Ackermann, H.W. (2012). Phages of Lactic Acid Bacteria: Discovery and Classification. Quíberoni A. D. L.; Reinheimer J. A. *Bacteriophages In Dairy Processing*. 1-25.
- Adıgüzel, G. (2008). *Fermente Türk Sucuğundan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Karakterizasyonu*. Doktora Tezi. Erzurum. Atatürk Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Aganı, O., B. (2019). *Batı Afrika Tahıl Bazlı Süt Ürünü Degue'nin Fermantasyonu ve İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Adana. Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Agcaoili, G. J. T., Oyong, G., & Cabrera, E. C. (2019). Screening of Lactic Acid Bacteria Isolated From Philippine Traditional Fermented Products: Potential Probiotic Bacteria with Antimicrobial and Cytotoxic Activities. *The FASEB Journal*, 33(1_supplement), 38-9.
- Agle, M. E. (2015). Biofilms In The Food Industry. Blaschek, H. P., Wang, H. H., Agle, M. E. "Biofilms In The Food Environment". Blackwell. 3-19.
- Akepaer, M. (2015). *Bazı Enterococcus Lactococcus ve Pediococcus Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Akkoç, N., Şanlıbaba, P., Akçelik, M. (2009). Bakteriyosinler: Alternatif Gıda Koruyucuları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 25 (1-2) 59 – 70.
- Al-Bayati, A. A. K. (2014). *Isolation and Molecular Identification of Some Lactic Acid Bacteria From Traditionally Made Fermented Food*. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Alkış, A. (2016). *Geobacillus Toebii Hbb-218 Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Bozulmayı Engellemek Amacıyla Konserve Gıdalara Uygulanması*. Yüksek Lisans. Aydın. Adnan Menderes Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Alp, D. (2018). *Doğal Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması ve İn Vitro Bağırsak Modelinde Patojenlerin Tutunmasını Engelleme Özelliklerinin Belirlenmesi*. Doktora Tezi. Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Alp, S. (2017). *Ortodontik Tedavi Gören Hastalarda Probiyotik Bakteri İçeren Kefirin Sistemik Tüketiminin ve Probiyotikli Diş Macununun Lokal Uygulamasının Tükürükteki Mikrobiyal Kolonizasyon Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması*. Uzmanlık Tezi. Konya. Selçuk Üniversitesi. Diş Hekimliği Fakültesi.
- Altomonte, İ., Salari, F., Martini, M. (2018). Milk Fat Components And Milk Quality. Poltronieri P. *Microbiology İn Dairy Processing Challenges and Opportunities*. 1-11. John Wiley & Sons.
- Altuntaş, S., Korukluoğlu, M., Altuntaş, V. (2017). Probiyotik Escherichia Coli Suşu Nissle 1917. *Pamukkale Univ Muh Bilim Derg*, 23(7), 933-940.
- Amalaradjou, M.A., Upadhyaya, İ., Venkitanarayanan, K. (2017). Microbial Applications İn The Food İndustry. Gupta V.K., Zeilinger S., Filho E.X.F., Bazúa M.C.D.D., Purchase D. *Microbial Applications*. 1-33.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., & Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and environmental microbiology*, 56(6), 1919-1925.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and insitu detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.
- Amann, R., Fuchs, B. M., & Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), 231-236.
- Aprill, A., McNally, S., Parsons, R., & Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2), 129–137.
- Arar, D. (2015). *Bakteriyal Biyofilm Oluşumu*. Yüksek Lisans Tezi. Denizli. Pamukkale Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Arena, M. P., Russo, P., Spano, G. (2017). Industrial Microorganisms: Tolerance to Antibiotics and Application of Antimicrobial Agents. Gupta, V. K., Zeilinger, S., Filho, E. X. F., Durán-Domínguez-De-Bazúa, M., Purchase, D. *Microbial Applications. Recent Advancements And Future Developments*. (213-229). Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- Arık, G. (2018). Çeşitli Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin (Lab) Tanımlanması ve Biyofilm Oluşturma Yetenekleri ile Antibiyotik Dirençliliklerinin Araştırılması. Doktora Tezi. Bursa. Uludağ Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Arslan, S. (2017). *Türkiye'nin Farklı Yörelerinden Toplanan Beyaz Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Erzurum. Atatürk Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Aslan, H. (2016). *Isıl İşlem Görmüş Bazı Gıdalarda Escherichia Coli O157:H7 ve Salmonella Typhimurium'un Kantitatif Tespitinde Kültürel Yöntem, Real-Time Pcr ve Pma-Real Time Pcr Yöntemlerinin Karşılaştırılması*. Doktora Tezi. Kayseri. Erciyes Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ateş, S. (2017). *İdrar ve Gaita Örneklerinden İzole Edilen Enterococcus faecalis ve Enterococcus faecium Suşlarının Isı Şok Proteinlerinin Sds-Page Yöntemi ile Analizi*. Yüksek Lisans Tezi. Van. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Avcı, M. (2015). *Farklı Peynir Çeşitlerinden Bakteriyosin (Enterisin) Üreticisi Enterokok Suşlarının İzolasyonu ve Üretilen Bakteriyosinlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pzr) ile Tanısı*. Yüksek Lisans Tezi. Isparta. Süleyman Demirel Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Aydemir, D. H., (2018). Bakteriyal Biyofilmlerin Biyolojik Önemi ve Etkili Kontrol Stratejileri. *Turk J Life Sci*. 3/1:218-230.
- Aydınlı, A., Durmaz, G., Akgün, Y. (1996). Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Slime Faktör Yapımının Kongo Kırmızılı Agar Yöntemiyle Araştırılması. Eskişehir. Osmangazi Üniversitesi. Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.
- Başaran, P., Başaran, N., Çakır, İ. (2004). *Lactococcus Lactis Subspecies Lactis ve Cremoris Suşlarının Ribotyping ve Site Specific-PCR ile Moleküler Ayırımı*. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 14-15.
- Bell, C., Neaves, P., Williams, A. P. (2005). Food Microbiology And Laboratory Practice. 253-254.

- Biler, B. (2009). *Pediococcus Acidilactici* Pbf Suşu Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ankara. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bostan, K., Alcay, A.U., Yalçın, S., Vapur, U.E., Nizamlioglu, M. (2017). Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From Traditional Cone Yoghurt. *Food Sci Biotechnol* 26(6):1625–1632.
- Bostancı, B. (2019). *Süt ve Süt Ürünlerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Moleküler İdentifikasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Afyon. Afyon Kocatepe Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M., Neviani, E. (2006). Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73: 485-494.
- Bölükbaş, C. S. (2007). *Echinococcus Granulosus Protoskolekslerinin İn Vitro Ortamda Gelişimi ve Protein Yapılarının Sds-Page Yöntemi ile Belirlenmesi*. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Bremer, P., Flint, S., Brooks, J., and Palmer, J. (2015). Introduction to Biofilms: Definition and Basic Concepts. Teh, K. H., Flint, S., Brooks, J., Knight, G. “*Biofilms in the Dairy Industry*”, WILEY Blackwell. 1-17.
- Brisson, G., Singh, H. (2013). Milk Composition, Physical and Processing Characteristics. Chandan R.C., Kilara A. *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell. 21-44.
- Bryan, C. A. O., Crandall, P. G., Ricke, S. C., Ndahetuye, J. B. (2015). Lactic Acid Bacteria (LAB) As Antimicrobials In Food Products: Types and Mechanisms of Action. Taylor T. M., *Handbook of Natural Antimicrobials For Food Safety and Quality*. Woodhead Publishing Series In Food Science, Technology And Nutrition: Number 269. 117-137.
- Bülbül, Z., Filik, N. (2019). “Derleme”, Gemi Yapımında Kullanılan Ahşap Malzemelerde Oluşan Biyofilm ve Fouling. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi* 7(1), 1 – 6.
- Büyükyörük, S. (2007). *Geleneksel Olarak Hazırlanmış İzmir Tulum Peynirinden Lactococcus Lactis (Lactococcus Lactis Alttür Lactis ve Alttür Cremoris) Suşlarının İzolasyonu, Fenotipik ve Moleküler Teknikler ile İdentifikasyonu*. Doktora Tezi. Bursa. Uludağ Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522.
- Cicotello, J., Wolf, I. V., D'Angelo, L., Guglielmotti, D. M., Quiberoni, A., Suarez, V. B. (2018). Response of *Leuconostoc* Strains Against Technological Stress Factors: Growth Performance And Volatile Profiles. *Food Microbiology* 73:362-370.
- Çakır, İ., Çakmakçı, M. L. (2005). Gıdalarda Patojen Mikroorganizma Aranmasında Kullanılan Moleküler Genetik Yöntemler. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*. Cilt: 03 Sayı: 12. 1-7.
- Çelik, Ç. E. (2018). *Salmonella typhimurium* Biyofilm Yapılarında eDna'nın Rolü ve Biyofilm ile Mücadelede Enzim ve Antibiyotik Uygulaması Yoluyla Biyofilm Yapılarının Zayıflatılması. Yüksek Lisans Tezi. Ankara. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Çon, A. H., Gökalp, H.Y. (2000). Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Metabolitleri ve Etki Şekilleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 30: 180-190.
- Dalca, S. H. (2015). *Denizli İlinden Toplanan Çiğ Süt ve Peynirlerden Otolitik Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Tanımlanması ve Otolitik Özelliklerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Denizli. Pamukkale Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Delibaş, Y. (2016). *Mastitisli Sığır Sütlerinden İzole Edilen Enterococcus faecium Suşlarının Ürettiği Bazı Bakteriyosinlerin Tanısı*. Yüksek Lisans Tezi. Aydın. Adnan Menderes Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Demir, E. (2014). *Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinde Bakteriyosin Üretiminin Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Aydın. Adnan Menderes Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Demirbaş, F.N. (2016). *Ekşi Hamur Kaynaklı Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Teknofonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Bayburt. Bayburt Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Demirci, T. (2013). *Çeşitli Gıdalardan İzole Edilmiş Farklı Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin ve Bakteriyosin Kısmi Karakteristiklerinin Belirlenmesi*. Konya. Selçuk Üniversitesi. Yüksek Lisans Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Dıanı, M., Arıafar, M. N., Akçelik, N. (2016). “Derleme “, İnsan ve Hayvan Sağlığı Açısından Risk Oluşturan Enterokokal Biyofilm Yapısının Doğası. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 73(1): 71 – 80.
- Diken, K. (2016). *Farklı Kaynaklardan Enterococcus faecalis ve Enterococcus faecium İzolasyonu, Moleküler Tanısı ve Genotiplendirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Kütahya. Dumlupınar Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dinçer, E., Kıvanç, M., Karaca, H. (2009). “Derleme” Biyokoruyucu Olarak Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosinler. 1-8.
- Durak, Y., Uysal, A., Aladağ, M. O., Akın, D. (2015). Ticari Yoğurt Örneklerinden Canlı Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Sayımı. *SUFEFD*, 41: 83-88.
- Dursun, D. (2010). *Ankara Çubuk Yöresi Turşularından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması ve Toplam Hücre Protein Profillerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dündar, R. (2017). *Geleneksel Olarak Üretilmiş Ev Tipi Turşularda Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanısı*. Yüksek Lisans Tezi. Erzurum. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ekinci, M. S., Akyol, İ., Ramadan, A. K., Yazdıç, F. C., Özköse, E. (2018). Molecular Identification and Partial Characterization of *Pediococcus* Sp. and *Leuconostoc* Sp. Isolated From Traditionally Made Dairy Products. *Ksü Tarım ve Doğa Derg* 21(1): 44-50.
- Elaltunkara, Z. (2018). *Nar Çekirdeği ve Nar Kabuğu Tozunun Probiyotik Yoğurt Üretiminde Prebiyotik Olarak Kullanım Olanaklarının Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Şanlıurfa. Harran Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Er, S. (2016). *Vajenden Probiyotik Bakterilerin İzolasyonu ve Bunların Antikanserojen Etkisinin Araştırılması*. Doktora Tezi. Eskişehir. Anadolu Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Erbulucu, T. (2012). *Amsonia Orientalis Decne.' nin Farklı Populasyonları Arasındaki Genetik Çeşitliliğin RAPD ve SDS PAGE Yöntemleri ile Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Kocaeli. Kocaeli Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ertekin, Ö., Çon, A. H. (2014). Farklı Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Endüstriyel ve Probiyotik Özellikleri. *Akademik Gıda* 12(4) 6-16.

- Ertürkmen, P., Öner, Z. (2015). Beyaz Peynir Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Başlatıcı (Starter) Kültür Özelliklerinin Biyokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi. DOI: 10.19113/Sdufbed.25545. 9-16.
- Evren, M., Apan, M., Tutkun, E., Evren, S. (2011). Geleneksel Fermente Gıdalarda Bulunan Laktik Asit Bakterileri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* TR. 11-17.
- Fairchild, A., Lee Dvm, M. S. M. D., Maurer, J. J. (2006). PCR Basics. Maurer, J. “*PCR Methods In Foods*”. 1-27. Springer Science & Business Media.
- Fernando, W. M. A. D. B. and Flint, S.H. (2012). Role of Probiotics and Dietary Fibre in Maintaining Healthy Gut Flora. Smith, A. and Jones, C.L. *Probiotics Sources, Types And Health Benefits*. 1-53.
- Funda, E. G. (2009). *Ülkemizde Tüketilen Tarhanaların Mikrobiyolojik ve Bazı Kimyasal Özelliklerinin Analizi*. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir. Anadolu Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- G-Allegria, E., Lopez, I., Ruiz, I.J., Saenz, J., Fernandez, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., Ruiz- Larrea, F., (2004), High Tolerance Of Wild Lactobacillus Plantarum And Oenococcus Oeni Strains To Lyophilisation And Stress Environmental Conditions Of Acid pH And Ethanol. *FEMS Microbiology Letters* 230: 53-61.
- Genç, H. (2016). *Nar Suyunda Ürün Özelliklerinin Geliştirilmesinde Probiyotik Bakterilerin Kullanımı*. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir. Anadolu Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Giraffa, G. (2014). Overview of The Ecology and Biodiversity of The LAB. Holzapfel W.H. and Wood B. S. B. *Lactic acid bacteria biodiversity and taxonomy*. 45-55. John Wiley & Sons.
- Goldstein, E. J. C., Tyrrell, K. L., Citron, D. M. (2015). Lactobacillus Species: Taxonomic Complexity And Controversial Susceptibilities. *Supplement Article* 98-107.
- Göze, D. (2018). *Kaşar Peynirinin Olgunlaşmasının Hızlandırılmasında Otolitik Özellikli Lactococcus Lactis Subsp. Cremoris'in Kullanımı*. Yüksek Lisans Tezi. Burdur. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Guarner, F., Khan, A.G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., Krabshuis, J., Lemair, T. (2011). “Review“, Probiotics and Prebiotics. *WGO Global Guideline* 2-28.

- Gunasekera, T.S., Dorsch, M.R., Slade, M.B., Veal, D.A. (2003). Specific detection of *Pseudomonas* spp. in milk by fluorescence in situ hybridization using ribosomal RNA directed probes. *Journal of Applied Microbiology*, 94;936-945.
- Gül, O. (2015). *Lactobacillus Casei Shirota'nın Çeşitli Yöntemlerle Mikroenkapsülasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Samsun. Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gülgör, G., Özçelik, F. (2014). "Derleme" Bakteriyosin Üreten Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Amaçlı Kullanımı. *Akademik Gıda* 12(1): 63-68.
- Gün, İ., Ekinci, F. Y. (2009). "Derleme ", Biyofilmler: Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam. *Gıda* 34 (3): 165-173.
- Gündoğdu, G. (2016). *Çiğ Süt Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Amasya. Amasya Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gündüz, C.P.B. (2018). *Molecular Characterization of The Predominant Lactic Acid Bacteria and Yeasts in The Sourdough and Chickpea Fermentations and Investigation of Some Lactic Acid Bacteria For Potential Starter Culture Usage*. Doktora Tezi. Adana. Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Güneş, B. (2018). *Enterococcus faecalis Biyofilm Yapısında Edna'nın Rolü ve Biyofilm ile Mücadelede Enzim ve Antibiyotik Uygulaması Yoluyla Biyofilm Yapılarının Zayıflatılması*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara. Ankara Üniversitesi. Biyoteknoloji Enstitüsü.
- Güney, G. (2015). *Laktik Asit Bakterileri ile Ağır Metal (Fe (I), Zn (I)) Giderimi*. Yüksek Lisans Tezi. Isparta. Süleyman Demirel Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gürsoy, A., Durlu-Özkaya, F., Yıldız, F., Aslım, B. (2010). Set Type Yoghurt Production by Exopolysaccharide Producing Turkish Origin Domestic Strains of *Streptococcus Thermophilus* (W22) and *Lactobacillus Delbrueckii Ssp. Bulgaricus* (B3). *Kafkas Univ Vet Fak Derg Research Article* 16 (Suppl-A): S81-S86.
- Güven, S. ve Zorba, N. N. D. (2016). *Genel Mikrobiyoloji ve Laboratuvar Kılavuzu*. Çanakkale, 217-221.
- Güven, T. (2008). *Hastane Kaynaklı Pseudomonas Aeruginosa Suşlarının SDS- PAGE ve PFGE Yöntemleri ile Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- Halkman, A. K., Sağdaş, Ö. E. (2014). Genel Kullanım. *Merck Mikrobiyoloji El Kitabı* III. Baskı. 1-33.
- Halkman, K., (2005). Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. 76-84, 135-233.
- Hassan, A. N., & Frank, J. F. (2001). Starter cultures and their use. Marth, E. H., & Steele, J. *Applied dairy microbiology* (151-207). CRC Press.
- Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., Iqbal, M. (2011). “Evaluation Of Different Detection Methods Of Biofilm Formation İn The Clinical İsolates”. *Braz J Infect Dis*; 15(4):305-311.
- Haşimi, N., Kızıl, S., Tolan, V. (2015). Rezene ve Adaçayı Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Bir Araştırma. Batman Üniversitesi. *Yaşam Bilimleri Dergisi*; Cilt 5 Sayı 2, 227-235.
- Hatipoğlu, Ç. A., Yıldız, E., Köktekir, E., İpekkan, K., Karakoç, E. A., Demiröz, A. P. (2008). Vankomisine Dirençli Bir *Leuconostoc* Menenjitisi Olgusu. *Mikrobiyol Bul*; 42: 695-699.
- Hepdeniz, Ö. K., Seçkin, Ö. (2017). “Derleme“, Dinamik Mikrobiyal Bir Yaşam: Oral Biyofilm. *SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. Cilt 8, Sayı 3. 47-55.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T. ve Williams, S.T. (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 527-567.
- Hussein, A.J. (2017). *Lactic Acid Bacterial Distribution From Different Parts of Digestive Tract of Quails Fed With Various Grain Sources*. Kahramanmaraş, Kahramanmaraş Sütçü İmam University Graduate School Of Natural and Applied Sciences. Department Of Bioengineering and Sciences. Master's Thesis.
- Işık, C. (2018). *Lactobacillus Plantarum S54'ün Bakteriyosini Olan Plantarisin Geninin Ekspresyon Profillerinde Çevre Koşullarına ve Gıda Patojenlerine Bağlı Olarak Meydana Gelen Değişimlerin Araştırılması*. Doktora Tezi. Erzurum. Atatürk Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- İlgül, Ö. (2005). “Derleme” Modern Tıpta Prebiyotikler ve Probiyotikler. *Ulusal Cerrahi Dergisi* 47-50.
- İpçak, H. H., Özüretmen, S., Özelçam, H., Ünlü, H. B. (2017). “Derleme”, Hayvan Beslemede Doğal Koruyucular ve Etki Mekanizmaları. *Hayvansal Üretim* 58(1): 57-65.

- İspirli, H. (2016). Erzincan Tulum Peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin (Lab) İzolasyonu, Moleküler Metotlarla Tanımlanması ve Ekzopolisakkarit (Eps) Üretim Potansiyellerinin Genetik Olarak Belirlenmesi. Bayburt. Bayburt Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi.
- İşevi, T. (2011). *Silaj Kaynaklı Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin İçerikleri Yönünden İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Jalilsood, T., Baradaran, A., Song, A. A. L., Foo, H. L., Mustafa, S., Saad, W. Z., ... & Rahim, R. A. (2015). Inhibition of pathogenic and spoilage bacteria by a novel biofilm-forming Lactobacillus isolate: a potential host for the expression of heterologous proteins. *Microbial cell factories*, 14(1), 96.
- Kaiser, T. D. L., Pereira, E. M., Netto Dos Santos, K. R., Maciel, E. L. N., Schuenck, R.P., Nunes, A. P. F. (2013). Modification of The Congo Red Agar Method to Detect Biofilm Production By Staphylococcus Epidermidis. *Diagnostic Microbiology And Infectious Disease* 75, 235–239.
- Kanak, E. K., Yılmaz, S.Ö., Mumcuoğlu, İ. (2018). Sakarya’da Geleneksel Olarak Üretilen Bazı Yöresel Peynirlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin MALDI-TOF MS Yöntemi ile Tanımlanması ve Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22 (3), 1055-1062.
- Kara, R., Akkaya, L. (2015). Afyon Tulum Peynirinin Mikrobiyolojik ve Fiziko-Kimyasal Özellikleri ile Laktik Asit Bakteri Dağılımlarının Belirlenmesi. *AKÜ FEMÜBİD* 15, 015401 (1-6).
- Karahan, A. G., Arıdoğan, B. C., Çakmakçı, L. (2002), Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu. *Isparta* 2002. 35.
- Karaoğlu, Ş. Ş. (2013). *Rize İli Topraklarından İzole Edilen Bacillus Türlerinin Bakteriyosin İçeriklerinin, Aktarılabilir Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençlerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Rize. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kart, M. Ç. Ö., Demircan, V. (2014). Dünyada ve Türkiye’de Süt ve Süt Ürünleri Üretimi, Tüketimi ve Ticaretindeki Gelişmeler. *Akademik Gıda* 12(1) 78-96.
- Kavas, S.T. (2007). *Probiyotik Mikroorganizmaların Gastrointestinal Sistem Uyumluluğu ve Enterik Patojenlere Etkisi*. Uzmanlık Tezi. Denizli. Pamukkale Üniversitesi. Tıp Fakültesi.

- Kaya, B., Zorba, N. N. D (2018). Farklı Su Aktivitesine Sahip Çeşitli Gıdalarda Küf ve Maya Yükünün Belirlenmesi İçin Kullanılan DRBC Agar ve DG18 Agar Besiyerlerinin Etkinliğinin Karşılaştırılması. *Ordu Üniv. Bil. Tek. Derg.*; 8(2): 206-214.
- Kaya, H.İ. (2013). *Tarhana İzolatı Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosinleri ve Fermantasyonda Patojen Bakteriler Üzerine Etkisi*. Yüksek Lisans Tezi. Denizli. Pamukkale Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kaynar, P. (2011) “Derleme” Ülkemiz Peynirleri Üzerine Mikrobiyolojik Araştırmalar. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 41(1):1-8.
- Kazancıgil, E. (2018). *Çeşitli Tulum Peynirlerinden İzole Edilmiş Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Konya. Selçuk Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kesepara, E.C. (2018). *Viral Gastroenteritlerin Bağırsaktaki Probiyotik Bakteriler Üzerindeki Etkileri*. Yüksek Lisans Tezi. Çorum. Hitit Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Khan, İ.T., Bule, M., Ullah, R., Nadeem, M., Asif, S., Niaz, K. (2019). “Review” The Antioxidant Components of Milk and Their Role in Processing, Ripening, and Storage: Functional Food. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916. 12-33.
- Kıran, F., Osmanağaoğlu, Ö. (2011). Laktik Asit Bakterilerinin (Lab) İdentifikasyonunda/Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 27(1): 62-74.
- Kıran, F., Osmanağaoğlu, Ö. (2016). “Derleme”, Ağız ve Diş Sağlığında Probiyotiklerin Etkisi. *DÜ Sağlık Bil Enst Derg.* 6(1): 56-62.
- Kırma, İ. (2016). *Gıda Kaynaklı Laktik Asit Bakterileri Kullanılarak Ekzopolisakkarit Üretimi*. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. İstanbul Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kırmusaoğlu, S. (2017). The Comparison of Methods Used For The Detection of Biofilm Formation That Cause Antibiotic Resistance of *Staphylococcus Epidermidis* and *Staphylococcus Aureus*. *Ortadoğu Medical Journal* 9 (1): 28-33.
- Kıvanç, A. K. (2018). *Restoratif Materyallerin Yüzeylerinde S. Mutans’ın Biyofilm Oluşturması ve Probiyotik Laktik Asit Bakterisinin Biyofilm Üzerine Etkinliğinin İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi*. Doktora Tezi. İstanbul Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- Kıvanç, M., Erikçi, Ş. Y. (2018). Sofralık Fermente Zeytinlerden (*Olea Europaea L.*) İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin ve Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi C- Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji*. 41-51.
- Kıyak, B. D. (2018). *Yenilebilir Mantarın (Cordyceps Militaris) Potansiyel Prebiyotik Aktivitesinin ve Süt Fermantasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi*. Doktora Tezi. Bursa. Uludağ Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kollöffel B, Meile L, Teuber M (1999) Analysis of brevibacteria on the surface of Gruyère cheese detected by in situ hybridization and by colony hybridization. *Lett Appl Microbiol* 29:317–322
- Korkmaz, A. (2018). *Kuru Trabzon Hurması (Diospyros Kaki L.) Yüzeyindeki Küflerin Çeşitli Antimikrobiyal Maddeler ve UV-C Uygulaması ile İnhibisyonu*. Yüksek Lisans Tezi. İzmir. Ege Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kökümer, T. (2013). *İşlenmemiş Sütlerden İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Doğal Antimikrobiyallerle Engellenmesi ve Oluşan Biyofilmin Ortadan Kaldırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Gebze. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kurt, Ş., Zorba, Ö. (2005). Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları. *Yü Vet Fak Derg*, 16 (1):77-83.
- Kurtoğlu, N. (2018), *Öğrencilerinin Süt ve Süt Ürünleri Tüketim Alışkanlıklarının Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Bayburt, Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kuş, H. (2010). *İnsan Orijinli Probiyotik Bakteriler Kullanılarak Probiyotik Ayran Üretimi*. Yüksek Lisans Tezi. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Lalanne, G. M., Espinoza, Y. R., Sánchez, H. H. (2012). *Lactobacillus Plantarum*: An Overview With Emphasis in Biochemical And Healthy Properties. Campos A. I. P., Mena A.L. *Lactobacillus Classification, Uses And Health Implications*. 1-35.
- Lauzon, H. L., Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Ringo, E. and Davies, S. J. (2014). Probiotics and Prebiotics: Concepts, Definitions and History. Merrifield D., Ringo E. *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*. 169-185. John Wiley & Sons.

- Llobet-Brossa, E., Rosselló-Mora, R., Amann, R. (1998). Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2691-2696.
- Machado, A., Almeida, C., Carvalho, A., Boyen, F., Haesebrouck, F. Rodrigues, L., Cerca, N., Azevedo, N.F. (2013). Fluorescence in situ hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of *Lactobacillus spp.* in milk samples. *International Journal of Food Microbiology* 162, 64–70.
- McLandsborough, L. A. (2015). Current Knowledge and Perspectives on Biofilm Formation and Remediation. Pometto, III A. L., Demirci, A. “*Biofilms in the Food Environment*”, WILEY Blackwell. 1-29.
- Milci, S., Yaygın, H. (2005). Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritler ve Süt Ürünlerindeki Fonksiyonları. *Gıda* 30 (2): 123-129.
- Mohamad, N. I., Manan, M. A., & Sani, N. A. (2019). Isolation and identification of lactic acid bacteria from local pickled mango with antibacterial potential. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2111, No. 1, p. 050011). AIP Publishing.
- Moter, A., Göbel, U.B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of Microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 85–112
- Muhammad, Z., Ramzan, R., Adelazez, A., Amjad, A., Afzaal, M., Zhang, S., & Pan, S. (2019). Assessment of the Antimicrobial Potentiality and Functionality of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from the Conventional Inner Mongolian Fermented Cheese Against Foodborne Pathogens. *Pathogens*, 8(2), 71.
- Musikasang, H., Tani, A., H-Kittikun, A., Maneerat, S. (2009). Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated From Chicken Gastrointestinal Digestive Tract. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1337–1345.
- Muthukumar, P., Kandeepan, C. (2015). Isolation, Identification and Characterization of Probiotic Organisms From Intestine of Fresh Water Fishes. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 4(3): 607-616.
- Mutlu, M. B. (2006). *Tuz Gölü bakterilerinin karakterizasyonu ve mevsimsel dağılımı*. Doktora Tezi. Eskişehir. Anadolu Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Nabizadehasl, L. (2018). *Prebiyotik, Probiyotik ve Sinbiyotiklerin, Kısa ve Uzun Dönemde Tokluk ve Besin Tüketim Üzerine Etkisi*. Doktora Tezi. Ankara. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- Nalvuran, Z. (2013). *Peynirlerden İzole Edilen Farklı Enterococcus Türlerinin Bakteriyosin Üretme Yeteneklerinin ve Bakteriyosinlerinin Karakteristiklerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Konya. Selçuk Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Okuklu, B. (2014). *Isolation, Characterization, and Screening Probiotic Properties of Artisanal Yoghurt Starter Strains From Urla Region*. İzmir a Thesis Submitted to the Graduate School Of Engineering And Sciences Of İzmir Institute Of Technology In Partial Fulfillment Of The Requirements For The Degree Of Doctor Of Philosophy In Food Engineering.
- Okutucu, B., Pehlivan, S. (2003). Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. *Arşiv* 12: 138-148.
- Oliveira, M., Blasco, L., Ferrer, S., Bernardo, F. (2004). Rapid and simultaneous detection of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* in milk by Fluorescent In Situ Hybridisation. *Rev. Port. Cien. Vet.*, 99(552): 215-218.
- Oral, H. (2015). *Farklı Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ölmez, Z. (2009). *Süt Sanayisinde Biyofilm Oluşturan Mikroorganizmalar ve Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Isparta. Süleyman Demirel Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Özkalp, B. (2018). *In Vitro Şartlarda Laktik Asit Bakterilerinin ve Yoğurdun Kurşun ve Kadmiyum Bağlama Özelliğinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara. Hacettepe Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Özteber, M. (2013). *Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Belirlenmesi*. Aydın. Adnan Menderes Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi.
- Öztürk, E. (2019). *Farklı Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Manisa. Manisa Celal Bayar Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Öztürkcan, S. A., Acar, S. (2017). “Derleme” Yaygın Olarak Kullanılan Antimikrobiyal Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Genel Bir Değerlendirme. *İgusabder*, 1: 1-17.

- Özyurt, V.H., Ötleş, S. (2014). “ Derleme“ Prebiyotikler: Metabolizma İçin Önemli Bir Gıda Bileşeni. *Akademik Gıda* 12(1): 115-123.
- Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental microbiology*, 18(5), 1403-1414.
- Pektaş, S. (2014). *Süt ve Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit Üretim Yeteneklerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir. Anadolu Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Pichart, K. (2004). Gıda Mikrobiyolojisi. Gıda Endüstrisi İçin Temel Esaslar ve Uygulamalar. Çevirenler: Sekin, Y., Karagözlü, N. 30-34.
- Poyraz, N. (2018). *Atık Su Arıtma Sistemlerinde Mikrobiyal Kommünite Analizi ve Biyodegradasyon Potansiyellerinin Tespiti*. Doktora Tezi. Eskişehir. Anadolu Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Quigley, L., O’ Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald G.F. Ve Cotter, P.D. (2012). A Comparison of Methods Used to Extract Bacterial DNA From Raw Milk And Raw Milk Cheese. *Journal Of Applied Microbiology*.1364-5072.
- Rewatkar, A.R., Wadher, B. J. (2013). “Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa- Biofilm Formation Methods”. IOSR-JPBS; e-ISSN: 2278-3008, p-ISSN:2319-7676. Vol. 8, Iss. 5, <http://www.iosrjournals.org/> 36-40.
- Sağlam, H., Karahan, A. G. (2017). Laktik Asit Bakterilerinin Plazmidleri ve Bunların Özellikleri. *Kafkas University. Institute Of Natural And Applied Science Journal*.Volume 10, Issue 2, 252-285
- Salveti, E., Torriani, S., Felis, G. E. (2012). The Genus Lactobacillus: A Taxonomic Update. Probiotics & Antimicro. Prot. DOI 10.1007/S12602-012-9117-8.
- Samanje, J. (2018). *Investigation of Probiotic and Biosurfactant Properties of Lactobacillus Isolated From Different Fermented Foods*. Yüksek Lisans Tezi. Trabzon. Karadeniz Teknik Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Samantir N. (2014), *Şalgam Suyundan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin 16s Rrna ile Tanımlanması ve Bazı Gelişme Parametrelerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Ankara. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Sanpa, S., Sanpa, S., & Suttajit, M. (2019). Lactic acid bacteria isolates from Pla-som, their antimicrobial activities and fermentation properties in Pla-som. *Journal of Food Health and Bioenvironmental Science*, 12(1), 57-71.

- Sant Anna, F. M., Wetzels, S. U., Cicco, S. H. S., Figueiredo, R. C., Sales, G. A., Figueiredo, N. C., ... & Souza, M. R. (2019). Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. *Food microbiology*, 82, 349-362.
- Santos, S. C., Oliveira, M., Lemsaddek, T. S. (2015). Bacteriocins. Oliveira, M., Serrano, I. *Frontiers In Antimicrobial Agents*, (Vol.1). *The Challenging Of Antibiotic Resistance In The Development Of New Therapeutics*. 178-208 (185).
- Seçkin, A. K., Baladura, E. (2010). “Derleme“, Gıdaların Muhafazasında Bakteriyosin ve Bakteriyofaj Uygulamaları. *Gıda* 35 (6): 461-467.
- Sezen, A. G. (2007). *Piyasada Satışa Sunulan Taze Kanatlı Eti Preparatlarının Son Kullanma Tarihlerinde Duyusal ve Genel Mikrobiyolojik Kaliteleri*. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Sezen, A.G. (2013). “Derleme”, Prebiyotik, Probiyotik ve Sinbiyotiklerin İnsan ve Hayvan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 8(3): 248-258.
- Sezer, Ç. (2007). *Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bakteriyosin Üretme Yeteneklerinin Araştırılması*. Doktora Tezi. Kars. Kafkas Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Sharma, P, Tomar, SK, Sangwan, V, Goswami, P, Singh, R. (2016). “Antibiotic Resistance Of Lactobacillus Sp. Isolated From Commercial Probiotic Preparations”. *Journal Of Food Safety*, 36(1), 38-51, <https://doi.org/10.1111/jfs.12211>.
- Song, Y., Huang, Y., Hu, G., Guo, X., Cao, H., Zhang, C., ... & Liu, P. (2017). Microbial diversity in milk from Holstein dairy cattle with mastitis in southern China using Illumina MiSeq-based analysis. *Pakistan Veterinary Journal*, 37(2).
- Soran, G. Ş. (2018). *Geleneksel Peynirlerin Üretimine Uygun Doğal Starter Kültürlerin Üretimi ile Bu Kültürlerin Laktik Asit Bakteri Floralarının Tanımlanması ve Karakterizasyonu*. Doktora Tezi Şanlıurfa Harran Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Soyuçok, A., Ekiz, T., Kılıç, G. B. (2016). Ekzopolisakkaritlerin Özellikleri ve Gıda Sanayindeki Önemi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi TARGİD Özel Sayı* 332-344.
- Sönmez, M. (2018), *Anne Sütünde İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin 16S Rrna Dizi Analizi ile Tanımlanması, Antibiyotik Dirençlilik ve Antibakteriyal Aktivitelerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Muş Alparslan Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Sultan, A. M., & Nabel, Y. (2019). Tube method and Congo red agar versus tissue culture plate method for detection of biofilm production by uropathogens isolated from midstream urine: Which one could be better? *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 20(1), 60-66.
- Sun, X., Lyu, G., Luan, Y., Zhao, Z., Yang, H., & Su, D. (2018). Analyses of microbial community of naturally homemade soybean pastes in Liaoning Province of China by Illumina Miseq Sequencing. *Food research international*, 111, 50-57.
- Şahinöz, S., Özdemir, M. (2017). Üniversite Öğrencilerinin Süt ve Süt Ürünleri Tüketim Alışkanlıkları ve Etkileyen Faktörler. *GÜSBD*; 6(4): 106-112.
- Şener, A., Temiz, A., Toğay, S. Ö., Bağcı, U. (2008). Çeşitli Prebiyotiklerin *Bifidobacterium Animalis Subsp. Lactis Bb-12*'nin Gelişimi ve Asitlik Geliştirme Özelliği Üzerine İn Vitro Etkileri. Erzurum. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*; 889-892.
- Şengün, İ. Y. Ş. (2011). Lactic Acid Bacteria Used İn The Production Of Fermented Foods. *Biological Diversity And Conservation*. 4/1, 42-53.
- Şihca, S. (2012). *Hatay- Kırıkhan' da Satışa Sunulan Sürk Peynirinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması ve Gıda Patojenleri Üzerine İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Taşdemir, A. (2017). Probiyotikler, Prebiyotikler ve Sinbiyotikler. *Kastamonu Sağlık Akademisi* 71-88.
- Taşkan, B. (2019). *Membran Biyofilm Reaktöründe Biyofilm Kalınlığının Sinyal İletiminin Önlenmesi Yöntemi ile Kontrolü*. Doktora Tezi. Elazığ. Fırat Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tekinşen, O. C., Patır, B., Alkan, M. (1993). Şavak Peynirinde Koliform Grubu Mikroorganizmalar Üzerine Araştırmalar. *S. Ü. Vet. Fak. Derg.*, 9, 2, 8-12.
- Temel, A., Eraç, B. (2018). “Derleme “, Bakteriyel Biyofilmler: Saptama Yöntemleri ve Antibiyotik Direncindeki Rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*; 48(1):1-13.
- Tok, E., Aslım, B. (2007). Probiyotik Olarak Kullanılan Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Kolesterol Asimilasyonu ve Safra Tuzları Dekonjugasyonundaki Roller. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 37 (1): 62-68.
- Tok, N. Ç. (2006). *Enterokoklarda Vankomisin Direnci*. Uzmanlık Tezi. İstanbul. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği.

- Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S. & Prakash, S. (2014). Modification of The Gut Microbiota to Promote Human Health. H Floch, M., Kim, A. *Probiotics, Prebiotics and Gut Health*. 18-29. Future Medicine Limited (Unitec House, 2 Albert Place, London N3 1QB, UK).
- Torlak, E. (2009). *Doğal Antimikrobiyal Maddeler ile Hazırlanan Yenilebilir ve Kaplanmış Plastik Filmlerin Gıda Kaynaklı Bazı Patojenlere Etkileri*. Doktora Tezi. Konya. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Toy, N. (2018). *Farklı Gıdalardan Tanımlanan Laktik Asit Bakterilerinin Organik Asit Üretimi, Antimikrobiyal Aktivitesi ve Antibiyotik Direnç Özelliklerinin Araştırılması*. Doktora Tezi. Adana. Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tsvetoslava, I. I., Ibrjmov, S., Andreeva, A. I., Ivanov, R (2017). Study of Biofilm Formation from Lactobacillus Fermentum S Cultivated on Different Carbohydrates., *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. ISSN: 0975-8585. 282-289.
- Tunalı, Y. (2014). *Farmosötik mikrobiyoloji uygulamaları*. Dora Yayıncılık. 77- 84.
- Tuncay, P. (2016). *Nöroloji Hastalarında Standart ve Prebiyotik İçerikli Enteral Formulaların Karşılaştırılması*. Doktora Tezi. Ankara. Gazi Üniversitesi. Eğitim Bilimleri Enstitüsü. Aile Ekonomisi ve Beslenme Eğitimi.
- Turhan, E.Ü., Enginkaya, Z. (2016). Probiyotik Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi. *Pamukkale Univ Muh Bilim Derg*, 22(7), 620-624.
- Tükel, Ç., Akçelik, M. (2000). *Lactococcus Lactis Subsp. Lactis* Suşlarında Laktoz Plazmidlerinin Tanımlanması. *Turk J Biol* 24. 405–424.
- Türemiş, G. A. (2012). *Klinik ve Gıda Kaynaklı Enterokoklar Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Bazı Özelliklerinin Karşılaştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Adana. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Türk Gıda Kodeksi. (2000), Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği. *Tebliğ No: 2000/ 6*.
- Türk Gıda Kodeksi. (2000), Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği. *Tebliğ No: 2000/ 6*.
- Uludağ, H. (2015). *Klinik ve Gıda Kaynaklı Enterokoklar Tarafından Üretilen Bakteriyosinlerin Bazı Patojen Bakteriler Üzerine Antimikrobiyel Etkilerinin*

- Karşılaştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Adana. Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Uthan, E. (2018). *Bazı Makrofungus Türlerinden İzole Edilmiş Polisakkaritlerin İn Vitro ve İn Vivo Prebiyotik Aktivitesinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir. Osmangazi Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Uyar, B. (2018). *Ağız Mikroflorasındaki Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özelliğinin Araştırılması*. Doktora Tezi. Eskişehir. Anadolu Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Uylaşer, V., Yönel, S. P., Savaş, E. (2008). Doğal Antimikrobiyal Bir Bileşik: Bakteriyosin. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi* Sayı: 10. 22-30.
- Uymaz, B. (2009). *Probiyotik Özellik Taşıyan Gıda ve İnsan Kaynaklı Laktobasillerin İzolasyonu Tanımlanması ve Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Karakterizasyonu*. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ünal, B. (2005). *Değişik Kaynaklardan İzole Edilen Pseudomonas aeruginosa Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Tespiti ve Biyofilm Oluşumunun Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Aydın. Adnan Menderes Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Üner, A. (2012). *Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Antimikrobiyal Maddelerin Gıda Patojeni Olan Mayalar Üzerine Etkisinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. İstanbul Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ünver, İ.H. (2014). *Saccharomyces Boulardii Kullanarak Probiyotik Yoğurt Üretimi ve Bazı Prebiyotiklerin Yoğurtların Çeşitli Nitelikleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. İstanbul Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Üstok, F. I. (2007). *Production of Beta-Galactosidase Using Lactic Acid Bacteria And Optimisation of Fermentation Parameters*. İzmir. A Thesis Submitted To The Graduate School of Engineering And Science of Izmir Institute of Technology In Partial Fulfilment of Requirements For The Degree of Master Of Science in Biotechnology.
- Üstündağ, A. Ö. (2016). *Bakteriyosin ve Organik Asitin Japon Bildircinlarında Büyüme Performansı, İnce Bağırsak Histomorfolojisi ve Mikrobiyolojisi İle Yemlerdeki Mikroorganizma Sayısı Üzerine Etkileri*. Doktora Tezi. Aydın. Adnan Menderes Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Üstündağ, H. Ç., Yalçın, H. (2017). “Derleme”, Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanımı. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.*, 5(1): 53-65. ISSN: 2148-2837.

- Üzümcü, Z. (2009). *Pseudomonas sp. Suşlarında Cold Shock Protein İzolasyonu ve SDS-PAGE Analizi*. Yüksek Lisans Tezi. Adana. Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Vatan, A., Saltoğlu, N. (2017). “Derleme “, Biyofilm ve Diyabetik Ayak Enfeksiyonları. *Klimik Dergisi*; 30(3): 101-7.
- Vedamuthu, E. R. (2013). Starter Cultures For Yogurt And Fermented Milks. Chandan, R. C., Kilara, A. *Manufacturing Yogurt And Fermented Milks*. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell. 115-149.
- Wade, M. E., Strickland, M. T., Osborne, J. P., Edwards, C.G. (2018). Role of *Pediococcus* in Winemaking. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 25, 7–24.
- Wagner, M., Horn, M., ve Daims, H. (2003). Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current opinion in microbiology*, 6(3), 302-309.
- Wang, B., Tan, X., Du, R., Zhao, F., Zhang, L., Han, Y., & Zhou, Z. (2019). Bacterial composition of biofilms formed on dairy-processing equipment. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49(5), 477-484.
- Wikler, M.A., Cockerill, F. R., Craig, W. A., Dudley, M. N., Eliopoulos, G.M., Hecht, D. W., Hindler, J. F., Low, D. E., Sheehan, D. J., Tenover, F. C., Turnidge, J. D., Weinstein, M. P., Zimmer, B. L., Ferraro, M. G., Swenson, G. M. (2006). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Ninth Edition. *M2-A9 ISBN 1-56238-586-0*. Vol.26
- Xiao, J., Zhang, Y., Yang, Z. (2014). Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Zhang H., Cai Y. *Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice*. Springer Berlin Heidelberg. 303-375.
- Yavuzdurmaz, H. (2007). *Isolation, Characterization, Determination Of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria From Human Milk*. Yüksek Lisans Tezi, İzmir İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yıldırım, M. (2007). *Enterokok’lar ve Enterokok’larla Gelişen Enfeksiyonlar*. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2: 46-52.
- Yıldırım, U. (2006). *Pseudomonas aeruginosa Suşlarında Antibiyotik Varlığında Biyofilm ve Alginat Üretiminin Araştırılması*. Tıpta Uzmanlık Tezi. Denizli. Pamukkale Üniversitesi. Tıp Fakültesi.

- Yılmaz, R., Temiz, A. (2003). *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 'un Klasik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanımlanması ve Karakterizasyonu. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*. Cilt: 01 Sayı: 03. 19-42.
- Yiğit, T. (2009). *Süt ve Süt Ürünlerinden Probiyotik Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması*. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir. Anadolu Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yörük, G. N., Güner, A. (2011). “Derleme” Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması ve Weissella Türlerinin Gıda Mikrobiyolojisinde Önemi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* 6(2): 163-176.
- Yurdakök, M. (2013). Yoğurdun Öyküsü, Probiyotiklerin Tarihi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 56: 43-60.
- Yüce, S. (2017). *Peynir ve Yoğurtlardan İzole Edilmiş Olan Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Teknolojik Özelliklerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Burdur. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Zehir, D. (2017). *Tarhanadan İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterileri Tarafından Üretilen Ekzopolisakkaritlerin Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Denizli. Pamukkale Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Zengin, N. (2012). *Doğal Olarak Üretilen Yoğurtlardan İzole Edilen Streptococcus Thermophilus ve Lactobacillus Delbrueckii Subsp Bulgaricus'un Bakteriyosin Üretme Yeteneklerinin Belirlenmesi ve Ürettikleri Bakteriyosinlerin Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Konya. Selçuk Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Zhu, H., Zeng, D., Wang, N., Niu, L. L., Zhou, Y., Zeng, Y., & Ni, X. Q. (2018). Microbial community and diversity in the feces of Sichuan takin (*Budorcas taxicolor tibetana*) as revealed by Illumina Miseq sequencing and quantitative real-time PCR. *AMB Express*, 8(1), 68.)
- Zingone, F., Bucci, C., Iovino, P., Ciacci, C. (2017). Consumption of Milk and Dairy Products: Facts And Figures. *Nutrition Journal* 33. 322–325.
- http1:
<http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFA AF6AA849816B2EF35D4BDC154831253> (Erişim tarihi: 19.05.2019).

http-2:

<http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAA F6AA849816B2EF49235F373EA5ECF4> – (Erişim tarihi: 19.05.2019).

http-3: <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/920020221.pdf> (Erişim tarihi: 19.05.2019).

http-4: <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/920020222.pdf> (Erişim tarihi: 19.05.2019).

http-5: <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/920020049.pdf> (Erişim tarihi: 19.05.2019).

http-6: <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/920020003.pdf> (Erişim tarihi: 19.05.2019).

http-7: <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/920020307.pdf> (Erişim tarihi: 19.05.2019).

http-8: <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/920020264.pdf> (Erişim tarihi: 19.05.2019).

http-9:

http://megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller/Dil%C3%BCsyon%20Haz%C4%B1rlama.pdf (Erişim tarihi: 01.06.2019). T.C. Milli Eğitim Bakanlığı (2017), Gıda Teknolojisi. Dilüsyon Hazırlama. Ankara.

http-10:

https://www.biomerieuxusa.com/industry/tempo?doc=USA_PRD_LST_G_PRD_USA_20 (Erişim tarihi: 24.05.2019).

http-11: <http://www.earthmicrobiome.org/> (Erişim tarihi: 04.08.2019).

http-12: http://www.sehiyye.gov.az/files/pdf/qida_mehsullari_tehluquesizlik.pdf (Erişim tarihi: 27.05.2019).

http-13: <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-7-1.pdf> (Erişim tarihi: 27.05.2019).