



**ÇEŞİTLİ GIDALARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN (LAB) TANIMLANMASI VE BİYOFİLM
OLUŞTURMA YETENEKLERİ İLE ANTİBİYOTİK
DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gökşen ARIK



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ GIDALARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN (LAB) TANIMLANMASI VE BİYOFİLM
OLUŞTURMA YETENEKLERİ İLE ANTİBİYOTİK
DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gökşen ARIK

Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

BURSA-2018

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Gökşen ARIK tarafından hazırlanan “Çeşitli Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) Tanımlanması ve Biyofilm Oluşturma Yetenekleri ile Antibiyotik Dirençliliklerinin Araştırılması” adlı tez çalışması Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU

Başkan: Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU
Uludağ Üniversitesi
Ziraat Fakültesi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı



İmza

Üye: Prof. Dr. Sezai TÜRKEK
Uludağ Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



İmza

Üye: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı



İmza

Üye: Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
Çukurova Üniversitesi
Ziraat Fakültesi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı



İmza

Üye: Doç. Dr. Ayşegül KUMRAL
Uludağ Üniversitesi
Ziraat Fakültesi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı



İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım


Prof. Dr. Ali BAYRAM
Enstitü Müdürü

27.3.2018

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
 - kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- beyan ederim.**

06/04/2018

Gökşen ARIK

ÖZET

Doktora Tezi

ÇEŞİTLİ GIDALARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN (LAB) TANIMLANMASI VE BİYOFİLM OLUŞTURMA YETENEKLERİ İLE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gökşen ARIK

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU

Bu çalışmada çeşitli gıda örneklerinden izole edilerek tanılanan laktik asit bakterilerinin (LAB) biyofilm oluşturma özellikleri ve antibiyotik dirençlilikleri belirlenmiştir. Gıda örnekleri Bursa’ daki farklı pazarlardan temin edilerek, uygun koşullarda laboratuvar ortamına getirilmiştir. Potansiyel LAB kültürleri, gıda örneklerinden izole edilerek, saflaştırılmıştır. İzolatlara biyokimyasal testler uygulanarak, potansiyel LAB suşları belirlenmiş ve moleküler yöntemler ile suşların tanılanması yapılmıştır. Olası LAB kültürlerinin cins ve tür bazında belirlenebilmesi için 16S rRNA bölgesi PZR ile evrensel 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') ve 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') primerleri kullanılarak çoğaltılmış ve elde edilen PZR ürünleri sekanslanmıştır. Sekans sonuçlarına göre 40 izolatin tanılanması yapılmıştır. İdentifikasyonu yapılan LAB suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri kalitatif bir yöntem olan “Tüp yöntemi” ve kantitatif sonuçlar veren “Mikro plaka (96 kuyucuklu plaka) yöntemi” ile belirlenmiştir. Biyofilm oluşumu 30 ve 37°C’ de 24 ve 48 saatlik inkübasyonun ardından gözlemlenmiş olup, farklı sıcaklık ve inkübasyon süreleri kullanılarak stres koşulları oluşturulmaya çalışılmıştır. Suşların dört ayrı antibiyotiğe (streptomisin (25 ve 300µg), ampisilin (25µg), tetrasiklin (50µg) ve vankomisin (30µg)) karşı dirençleri disk difüzyon yöntemi ile inkübasyonun ardından disklerin etrafında oluşan zon çapları ölçülerek belirlenmiştir. Tanısı yapılan 40 LAB suşu arasından 21’ inin (%52,5) biyofilm üreticisi olduğu belirlenmiştir. LAB suşlarında en yoğun biyofilm oluşumu 37°C’ de 48 saat inkübasyon koşullarında gözlemlenmiştir. 37°C’ de 48 saatlik inkübasyon koşulunda suşların %20’ sinin (8 adet) “orta düzeyde”, %25’ inin (10 adet) ise “zayıf düzeyde” biyofilm oluşturduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca suşların %72,5’ inin streptomisine (25 µg), %65’ inin vankomisine (30 µg) dirençli olduğu, ancak %77,5’ inin ampisiline (25 µg) ve %95’ inin ise tetrasikline (50 µg) duyarlı oldukları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: laktik asit bakterileri, tanılama, biyofilm, antibiyotik dirençlilik

2018, 118 sayfa.

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA (LAB) ISOLATED FROM DIFFERENT FOODS AND INVESTIGATIONS OF THEIR BIOFILM FORMATION AND ANTIBIOTIC RESISTANCE

Gökşen ARIK

Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU

In this research, the biofilm formation properties and antibiotic resistance of lactic acid bacteria (LAB) isolated from different food samples, were determined. The potential LAB cultures were isolated and purified after the food samples were collected from the bazaars in different regions of Bursa and they were transported to the laboratory under appropriate conditions. The biochemical analyses were performed to the cultures and the possible LAB strains were identified by molecular methods. 16S rRNA was amplified by PCR with using universal bacterial primers 27F (5' AGAGTTT GATCMTGGCTCAG 3'), 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') and the PCR products were sequenced. According to the sequencing results, 40 isolates were identified. The biofilm forming capacity of the identified LAB strains was examined by "Tube adherence method" a qualitative method and "Microtiter plate (96 well-plate) assay" a quantitative method. Biofilm formation was observed after the incubation at 30 and 37 °C for 24 and 48 hours, thus stress conditions were tried to be provided by using different temperatures and incubation periods. Susceptibility of all the strains to four antibiotics (streptomycin (25 and 300 µg), ampicillin (25 µg), tetracycline (50 µg), and vancomycin (30 µg)) was tested with the disk diffusion method by measuring the zone diameter formed around the disks after the incubation. Among the identified 40 isolates, 21 LAB strains (52,5%) were determined as a biofilm producer. The most biofilm formation among the strains was observed under the conditions at 37°C for 48 hours. It was observed that among the strains, 20% (8 strains) produced biofilm at "medium level" and 25% (10 strains) at "weak level" after the incubation at 37°C for 48 hours. Besides, it has been determined that among the strains, 72,5% were resistant to streptomycin (25 µg) and 65% were resistant to vancomycin (30 µg), moreover, 77,5% were susceptible to ampicillin and 95% to tetracycline (50 µg).

Key Words: lactic acid bacteria, identification, biofilm, antibiotic resistance

2018, 118 pages.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi BAP OUAP(Z)-2015/8 nolu “Çeşitli gıdalardan elde edilen laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri ile biyofilm oluşturma koşullarının araştırılması” konulu proje çalışmasının bir bölümüdür.

Çalışmalarımın planlanmasında ve yürütülmesinde emeği geçen ve akademik hayatımda desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU’na (Uludağ Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü), bilgi, tecrübe ve fikirlerini benimle paylaşarak, çalışmalarımnda önemli katkılarda bulunan tez izleme komitesi üyeleri Sayın Doç. Dr. Ayşegül KUMRAL (Uludağ Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü) ve Sayın Prof. Dr. Sezai TÜRKEL (Uludağ Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü) hocalarıma, ışığıyla yolumu aydınlatan Sayın Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü) hocama, bana her zaman manevi destek veren, bu zorlu süreçte yardım ve sevgilerini her daim hissettiğim değerli eşim Burak ARIK’ a ve aileme, bana moral kaynağı olan yardımsever arkadaşlarım Araş. Gör. Seyit UĞUZ’ a (Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Biyosistem Mühendisliği Bölümü), Araş. Gör. Bilge ARSLAN’a (Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Biyosistem Mühendisliği Bölümü) ve Araş. Gör. Ezgi KURTULMUŞ’ a (Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Biyosistem Mühendisliği Bölümü) en içten teşekkürlerimi sunarım.

Gökşen ARIK
Bursa, Nisan 2018

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri.....	4
2.1.1. <i>Lactococcus</i>	6
2.1.2. <i>Leuconostoc</i>	6
2.1.3. <i>Lactobacillus</i>	7
2.1.4. <i>Weissella</i>	8
2.1.5. <i>Enterococcus</i>	9
2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Önemi ve Kullanım Alanları.....	9
2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Tanılanması ve Uygulanan Yöntemler	16
2.3.1. Kültüre bağlı tanılama yöntemleri	17
2.3.2. Kültürden bağımsız tanılama yöntemleri	20
2.4. Biyofilm	21
2.4.1. Biyofilm oluşumunun dezavantajları ve engelleme yolları	25
2.4.2. Biyofilm oluşumunun avantajları ve LAB suşlarında biyofilm oluşumu.....	29
2.5. Laktik Asit Bakterilerinde Antibiyotik Direnci	32
2.6. Laktik Asit Bakterilerinde Biyofilm Oluşumu ile Antibiyotik Direnci Arasındaki İlişki	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM	38
3.1. Materyal	38
3.1.1. Araştırma örnekleri	38
3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler	39
3.2. Yöntem.....	41
3.2.1. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu	41
3.2.2. Laktik asit bakterilerinin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi	41
3.2.3. Laktik asit bakterilerinin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	42
3.2.4. Laktik asit bakterilerinin genotipik yöntem ile tanılanması.....	42
3.2.5. Tanılanan laktik asit bakterilerinin biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi	48
3.2.6. Tanılanan laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi	50
3.2.7. İstatistiksel analiz.....	51
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	53
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	53
4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Tanılanması.....	54
4.2.1. Fenotipik yöntem	54
4.2.2. Genotipik yöntem.....	56
4.3. Tanılanan Laktik Asit Bakterilerinin Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi	67
4.3.1. “Tüp yöntemi” ile biyofilm oluşumunun incelenmesi	67

4.3.2. “96 kuyucuklu plaka yöntemi” ile biyofilm oluşumunun incelenmesi.....	68
4.3.3. Biyofilm oluşumunun belirlenmesinde kullanılan tüp ve 96 kuyucuklu plaka yöntemlerinin karşılaştırılması.....	72
4.4. Tanılanan Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi	82
5. SONUÇ	89
KAYNAKLAR	94
Ek 1- İzolatların “Tüp Yöntemi” ile belirlenen biyofilm oluşturma kapasiteleri	109
Ek 2- İzolatların “96 Kuyucuklu Plaka Yöntemi” ile belirlenen biyofilm oluşturma kapasiteleri	111
Ek 3- Tanısı yapılan laktik asit bakterilerinin bazı antibiyotiklere karşı dirençleri ve zon çapı (mm) ölçüm sonuçları.....	113
ÖZGEÇMİŞ	115



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Celcius
%	Yüzde
<	Küçüktür
>	Büyüktür
\leq	Küçük ya da eşit
\geq	Büyük ya da eşit
μ	Mikro
g	Santrifüj kuvveti

Kısaltmalar	Açıklama
AFLP	Amplified fragment length polymorphism (Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi)
bç	Baz çifti
BLAST	The Basic Local Alignment Search Tool
CO_2	Karbondioksit
d	Dakika
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis (Denatüre gradyan jel elektroforezi)
DNA	Deoksiribonükleik asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EMBL	European molecular biology laboratory
EPS	Ekzopolisakkarit
EtBr	Etidyum bromür
FAME	Fatty acid methyl esters (Yağ asiti metil ester)
FISH	Floresan in situ hibridizasyonu
FKI	Fenol:kloroform:isoamil alkol
GI-sistem	Gastro-intestinal sistem
GRAS	Generally recognised as safe
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HePS	Heteropolisakkarit
HoPS	Homopolisakkarit
KCl	Potasyum klorür
L	Litre
LAB	Laktik asit bakterileri
MgCl_2	Magnezyum klorür
MIK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
mL	Mililitre
mm	Milimetre

Kısaltmalar	Açıklama
mM	Milimolar
MRS	De man-rogosa-sharpe
NaCl	Sodyum klorür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
O ₂	Oksijen
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis (Darbeli alan jel elektroforezi)
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
QS	Quorum sensing (Çoğunluk algılanması)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele arttırılmış polimorfik DNA)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi)
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
s	Saniye
SDS-PAGE	Sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
spp	Subspecies (Alt türler)
TBE	Tris Borat EDTA
UV	Ultra viyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. LAB üyelerinin filogenetik olarak gruplandırılması	5
Şekil 2.2. Biyofilm oluşum evreleri	24
Şekil 2.3. Biyofilm oluşum aşamalarının makroskopik şemaları ve elektron mikroskobu görüntüleri	24
Şekil 2.4. Gıda işletmelerinde kullanılan boru sistemlerinin içinde biyofilm tabakası oluşumu	27
Şekil 4.1. İzolatların elde edildikleri kaynaklar	53
Şekil 4.2. [<i>Lactobacillus</i> spp. FE26 (a)], [<i>Leuconostoc lactis</i> FE5, <i>Leuconostoc garlicum</i> FE5 (b)], [<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> FE14, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> FE14 (c)] ve [<i>Lactobacillus curvatus</i> FE41 (d)] suşlarından izole edilen DNA'ların absorbands grafikleri ve konsantrasyonları	56
Şekil 4.3. FE1-FE23 arası kod numaralı izolatların agaroz jel elektroforezi sonucunda oluşturduğu bantlar.....	57
Şekil 4.4. FE24-FE43 arası kod numaralı izolatların agaroz jel elektroforezi sonucunda oluşturduğu bantlar.....	58
Şekil 4.5. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> FE1 suşunun ileri primer ile sekans okuma grafiği.....	59
Şekil 4.6. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> FE1 suşunun geri primer ile sekans okuma grafiği.....	59
Şekil 4.7. <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> FE10 suşunun ileri primer ile sekans okuma grafiği	60
Şekil 4.8. <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> FE10 suşunun geri primer ile sekans okuma grafiği	60
Şekil 4.9. İzole edilen mikroorganizmaların tür bazında dağılımı (%).....	63
Şekil 4.10. <i>L. plantarum</i> FE29 suşunun 30°C ve 37°C' de 24 saat inkübasyonu sonunda biyofilm oluşturma kapasitesi; "a", "c": Tüp yöntemi; "b", "d": 96 kuyucuklu plaka yöntemi.....	76
Şekil 4.11. <i>L. lactis</i> FE40 suşunun 30°C ve 37°C' de 48 saat inkübasyonu sonunda biyofilm oluşturma kapasitesi; "a", "c": Tüp yöntemi; "b", "d": 96 kuyucuklu plaka yöntemi.....	78
Şekil 4.12. Laktik asit bakterilerinin 30 ve 37°C' de 48 saat inkübasyonu sonucunda belirlenen biyofilm oluşturma kapasiteleri.....	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Bazı gıda örneklerinden izole edilen LAB suşları	13
Çizelge 3.1. Örneklere ilişkin bilgiler	38
Çizelge 3.2. PZR için hazırlanan stok çözeltide bulunan reaktifler ve konsantrasyonları	46
Çizelge 3.3. Laktik asit bakterileri için uygulanan PZR koşulları	47
Çizelge 4.1. Bakteri izolatlarının fenotipik özellikleri.....	54
Çizelge 4.2. Saflaştırılan izolatların özellikleri.....	61
Çizelge 4.3. İzolatların cins ve tür bazında tanılama sonuçlarına ait bilgiler	64
Çizelge 4.4. Tanılanan LAB suşlarının antibiyotik direçlilikleri.....	83
Çizelge 4.5. LAB suşlarının MAR indeksi değerleri	84



1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB) geliştikleri ortamlarda fermentasyon sonucunda laktik asit üretmekte ve son ürüne kendine has tat, koku ve aroma kazandırmaktadır. LAB, Gram pozitif, fakültatif anaerob, katalaz negatif, çoğunluğu spor oluşturmeyen, hareketsiz bakteriler olarak bilinmektedir. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Tetragonococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactosphaera*, *Melissococcus*, *Aerococcus* ve *Oenococcus* cinsleri, LAB üyeleri arasında yer almaktadır (Dinçer ve ark. 2009, Evren ve ark. 2011, Özteber 2013, Mahony ve ark. 2014). İlk kez 19. yüzyılda sütü pıhtılaştırıcı mikroorganizmalar olarak tanınmaya başlamış ve sonrasında laktik asit bakterileri olarak gruplandırılarak, özellikle fermente gıdaların üretimindeki önemleri ortaya çıkmıştır (Yerlikaya 2014).

Laktik asit bakterilerinin süt ve et ürünleri, bazı alkollü içkiler ve bazı bitkilerin yanı sıra meyve-sebzelerden izole edildiği bilinmektedir. Ayrıca, insan ve hayvanların gastro-intestinal sistemlerinden (GI-sistem) ve nadir olarak da topraktan izole edilebilmektedir. LAB, çok eski çağlardan beri fermente gıda ve yem üretiminde önemli rol oynamakta olup, günümüzde de fermente ürünlerde starter olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Wassie ve Wassie 2016).

LAB türleri yaygın olarak izole edilen, karbonhidratları fermente ederek laktik asit üreten ve heterojen bir aile olan mikroorganizma grubunun üyeleri olarak bilinmektedir. Laktik asit fermentasyonu ile mikroorganizma için gerekli olan enerji elde edilmektedir (Kocková ve ark. 2011, Stoyanova ve ark. 2012, Saranraj ve ark. 2013, Sun ve ark. 2014).

Laktik asit bakterilerinin büyük çoğunluğu gıdalarda kullanımı açısından güvenilir (generally recognised as safe (GRAS)) kabul edilmektedir. Bu nedenle laktik asit bakterilerine ait birçok tür starter olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, fermentasyon sonucunda meydana gelen metabolitleri de doğal gıda koruyucuları olarak sıklıkla

kullanılmaktadır (Baruah ve ark. 2016). Bu metabolitler başta laktik asit olmak üzere bakteriyosin, hidrojen peroksit, ekzopolisakkarit (EPS) vb. bileşenler olup, gıda ürünlerinde kıvam artırıcı ve tat-aroma geliştirici olarak da kullanılabilir (Hassan 2008, Mostefaoui ve ark. 2014, Baruah ve ark. 2016).

LAB türleri, gıda endüstrisinde probiyotik olarak da kullanılmaktadır. Probiyotik LAB suşları intestinal sistemde tutunarak, hızla çoğalabilmektedir. Probiyotikler, “konakçının intestinal sisteminde yeterli miktarlarda bulunduğu sağlıklı olumlu yönde etkileyen yaşayan mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (Arroyo-Lopez ve ark. 2012, Reis ve ark. 2016). Özellikle anne sütü ile beslenen yeni doğan bebeklerde sütte bulunan oligosakkaritler, prebiyotik özellik göstererek LAB’ nin bağırsak mukozasında gelişmeleri için uygun bir ortam oluşturmaktadır. Prebiyotikler, faydalı mikroorganizmaların bağırsak sisteminde gelişimini destekleyen ve sindirilemeyen gıda katkıları olarak bilinmektedir (Özyurt ve Ötleş 2014, Reis ve ark. 2016). LAB türleri tarafından üretilen EPS’ nin enerji kaynağı olarak metabolize edilemediği, ancak sindirim sisteminde prebiyotik özellik gösterdiği ve LAB türleri için bariyer görevi görerek, olumsuz koşullara karşı direnci artırdığı bildirilmektedir (Ahi 2011, Ergene 2015).

LAB üyeleri fermente gıda ürünlerinde istenilen özelliklerin kazanılmasını sağlamaktadır. Ancak bazı gıdalarda bozucu mikroorganizmalar olarak bilinmekte olup, ortamda bulunması istenmemektedir. Özellikle bazı et ürünlerinde, mayonez ve salata soslarında, fermente soya fasülyesinde ve şaraplarda LAB bulunması istenmemektedir (Kubota ve ark. 2008). Gıdaların bozulmasına neden olan mikroorganizmalar arasında laktik asit bakterilerinin gıdada meydana getirdiği değişimin, Gram negatif bakterilere göre daha yavaş olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bozulma daha geç meydana gelmektedir (Johansson ve ark. 2011).

LAB suşları farklı koşullar altında biyofilm tabakası oluşturabilmektedirler. Biyofilm tabakası, ekstraselüler matriks içinde gömülü halde bulunan ve canlı/ canlı olmayan yüzeylere tutunma özelliği gösteren mikroorganizmaların oluşturduğu koloniler olarak bilinmektedir. Yüzeye tutunan mikroorganizma sayısı zamanla artmakta ve hücreler

daha güçlü şekilde bağlanmaktadır. Hücre sayısının artması ile oluşturdukları biyofilm tabakası da kalınlaşmaktadır. Kalınlaşan biyofilm tabakası yüzeylere daha sıkı bağlandığından, olgun bir tabakanın ortamdan uzaklaştırılması da zorlaşmaktadır. Biyofilm tabakasında mikroorganizmalar, metabolitleri ve mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS matrisi bulunmaktadır. LAB-EPS ilişkisinin biyofilm oluşumu ve yüzeylere tutunmada kilit noktası olduğu bilinmektedir. EPS üretimi ve biyofilm oluşumu sayesinde farklı yüzeylerde mikrobiyel kolonizasyon gerçekleşebilmektedir (Johansson ve ark. 2011).

Biyofilm oluşumu genellikle patojenite ile ilişkilendirilmekte olup, patojen mikroorganizmaların özellikle antibiyotik dirençlerinin biyofilm oluşumu ile doğrudan alakalı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle özellikle klinik öneme sahip patojen mikroorganizmaların kontrolünde, biyofilm oluşumunun engellenmesi amaçlanmaktadır. Ancak biyofilm oluşumu gıda endüstrisi açısından öneme sahip farklı mikroorganizma gruplarında da gözlenmekte olup, özellikle starter olarak kullanılan LAB kültürlerinden biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olanların, olumsuz çevre koşullarına daha dirençli olabilecekleri düşünülmektedir. Bu durum göz önüne alınarak, tez kapsamında farklı gıda örnekleri toplanarak, uygun koşullarda laboratuvar ortamına getirilmiş ve olası laktik asit bakterileri izole edilerek saflaştırılmıştır. Saf kültürler biyokimyasal ve moleküler yöntemler ile tanılanmıştır. İzole edilerek tanılanan LAB suşlarının biyofilm oluşturabilme özellikleri ve antibiyotik dirençlilikleri incelenmiş olup, biyofilm oluşumunun antibiyotik direnci üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

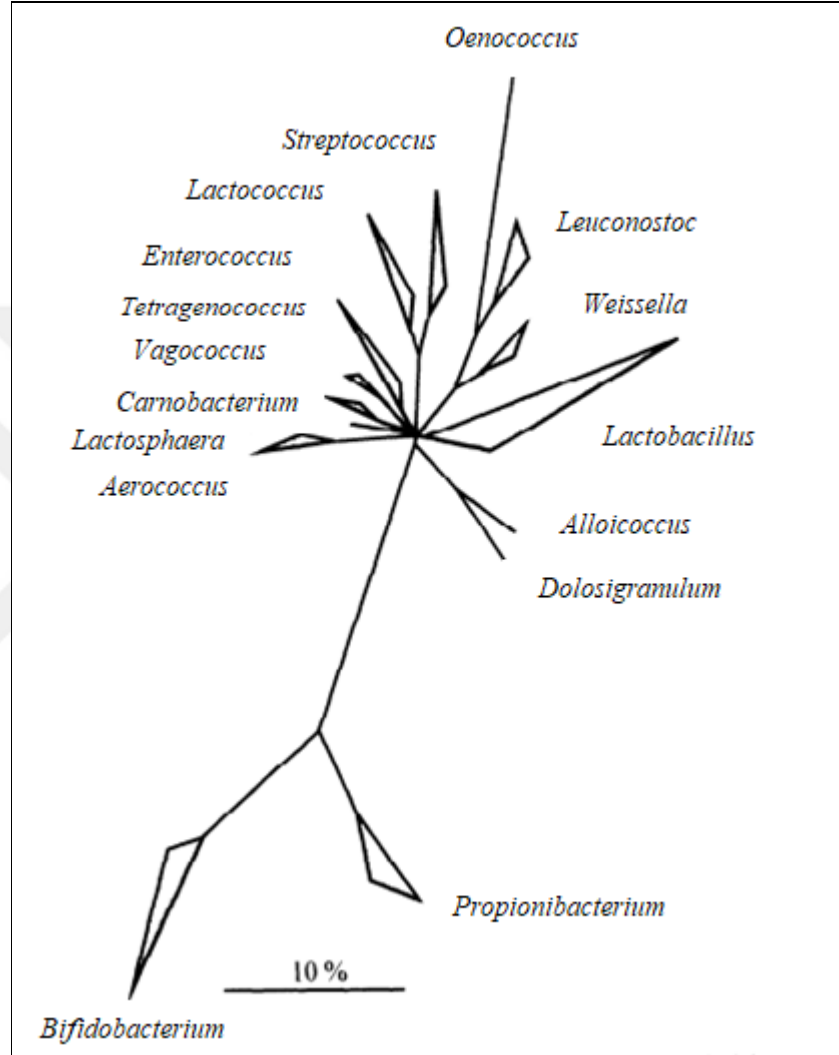
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri heksozları fermente ederek laktat oluşturmaktadır. LAB üyelerinin tamamı Gram pozitif, katalaz negatif, çubuk ya da kok şekilli, genellikle spor oluşturmeyen ve büyük çoğunluğu hareketsiz olan bakteriler olarak bilinmektedir (Tunail 2009, Yerlikaya 2014). *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella* cinslerine ait türler LAB üyeleri arasında yer almaktadır. Ayrıca, filogenetik olarak LAB grubuna bağlı olmasa da *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* ve *Brevibacterium* türleri de gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Çünkü genellikle LAB suşlarına benzer özellikler göstermekte ve benzer metabolitler üretmektedirler. Gıdalarda kullanılmaları da güvenilir olarak kabul edilmekte ve özellikle probiyotik özellik gösteren türleri fonksiyonel gıdalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Temmerman ve ark. 2004, Tunail 2009, Yerlikaya 2014). Laktik asit bakterilerinin filogenetik grupları Şekil 2.1’ de verilmiştir.

Laktik asit bakterileri, karbonhidratları metabolize etme şekillerine göre homo- ve hetero-fermentatif olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. *Pediococcus* spp., *Lactococcus* spp. gibi homo-fermentatif LAB, karbonhidrat kaynaklarını fermentasyon sonucunda %90 oranında laktik aside dönüştürebilmektedir. *Weissella* ve *Leuconostoc* gibi hetero-fermentatif LAB ise karbon kaynaklarının en fazla %50’ sini laktik aside dönüştürülebilmektedir. Hetero-fermentatif LAB tarafından gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda laktik asit dışında CO₂, formik ve asetik asit gibi bazı organik asitler, ayrıca etanol üretimi söz konusu olmaktadır (Tunail 2009, Evren ve ark. 2011, Kocková ve ark. 2011, Stoyanova ve ark. 2012, Saranraj ve ark. 2013, Tokatlı 2013, Sun ve ark. 2014).

LAB türlerinin genellikle anaerobik koşullarda fermentasyon yolu ile enerjilerini sağladıkları bilinmekte olup, genetik yapıları farklı olan bazı türlerin ise aerobik koşullarda daha iyi gelişebildiği belirtilmektedir (Valenzuela ve ark. 2015).



Şekil 2.1. LAB üyelerinin filogenetik olarak gruplandırılması (Stiles ve Holzapfel 1997)

Özellikle O₂'li ortamda gelişebilen LAB suşlarının fermente gıdalarda aroma gelişimi ve K₂ vitamini üretiminde daha etkili ve verimli oldukları bildirilmektedir (Valenzuela ve ark. 2015). K₂ vitamini eksikliği, yeni doğanlarda hemorajik hastalıklara ve kemiklerde kırılabilirliği artıran osteoporoz gibi bazı rahatsızlıklara neden olmaktadır. Bu

nedenle K₂ vitamini üreten LAB suşlarının gıdalarda kullanılması insan sağlığını olumlu yönde etkilemektedir (Patel ve ark. 2013).

2.1.1. *Lactococcus*

Laktokoklar; homofermentatif, mikroaerofilik, Gram pozitif bakteriler olarak bilinmekte olup, 10°C' de gelişebilirlerken, 45°C' de gelişim gösterememektedirler. Çift ya da zincir şeklinde kok hücre morfolojisine sahip oldukları için, hücre yapıları bakımından *Streptococcus* ve *Enterococcus* cinsine ait türlere de benzerlik göstermektedirler. *Lactococcus* cinsine ait türler, gelişme sıcaklıklarının farklılığından yararlanılarak, *Streptococcus* ve *Enterococcus* cinslerinden ayrılabilir (Samaržija ve ark. 2001, Tokatlı 2013).

Lactococcus cinsine ait en önemli türlerden biri olan *L. lactis*, gıda sanayiinde sıklıkla kullanılan, çiğ süt ve süt ürünlerinde rastlanılan LAB türlerinden biri olarak bilinmekte olup, bitkisel gıdalardan da izole edilebildiği bildirilmektedir (Demir 2014, Kim ve Lee 2016, Khemariya ve ark. 2017). Gıda endüstrisinde ticari öneme sahip starterlerden biri olup, fermente süt ürünlerinde kullanım alanı bulmakta ve bazı patojenlere karşı inhibisyon etkisi bulunmaktadır (Kim ve Lee 2016, Khemariya ve ark. 2017).

2.1.2. *Leuconostoc*

Gram pozitif, heterofermentatif ve EPS (dekstran, levan) üretme yeteneği ile ön plana çıkan *Leuconostoc* cinsine ait türler genellikle şeker üretim hatlarında oluşturdukları şlam yapısı ile bağdaştırılmaktadır (Dimic 2006). *Leuconostoc* spp. hücrelerinin kok şeklinde ve hareketsiz bir morfolojiye sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca genellikle çift halinde ya da zincir halinde oldukları bildirilmektedir (Tokatlı 2013). *Leuconostoc* spp. daha çok bitkisel ürünler, sebze-meyve yüzeylerinden izole edilebilmekte ve ayrıca süt ürünlerinde de reolojik ve aromatik özelliklerin kazandırılmasında starter olarak kullanım alanı bulmaktadır. Karbonhidratları fermente ederek, laktik asit yanında CO₂, etanol, laktat, asetaldehit gibi ürünler de oluşturmaktadır. Ayrıca süt ürünlerinde aroma

maddesi olarak kullanılan diasetil üretme yeteneği ile de gıda sanayiinde geniş kullanım alanı bulmaktadır. Özel olarak üretilen peynirlerde büyük gözenekli yapının oluşmasında *Leuconostoc* türlerinin kullanıldığı bilinmektedir. EPS üretimi ile gıdalarda koruyucu özellik göstermekte olup, ayrıca oligosakkarit, mannitol, bakteriyosin ve bazı vitaminleri de sentezleyebildiği belirtilmektedir (Cardamone ve ark. 2011, Shin ve Han 2015). *Leuconostoc* cinsine ait türlerin streptomisine direnç gösterebildiği, ancak penisilin, ampicilin gibi β -laktam grubu antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları bildirilmektedir (Flórez ve ark. 2016).

2.1.3. *Lactobacillus*

Lactobacillus cinsine ait türler LAB grupları arasında en çok çeşitlilik gösteren grup olarak yer almakta ve sekizden fazla tür içermektedir. Homo- ve hetero-fermentatif türlerin bulunduğu bu geniş grupta, morfolojik yapılar da farklılık ve çeşitlilik göstermektedir. Hücre morfolojisi uzun ya da kısa çubuk şeklinde tanımlanmakta olup, bazı türleri kokoid-kokobasil hücre yapısına sahip olabilmekte ve bazı türlerinin ise oldukça ince bir hücre yapısına sahip olduğu gözlemlenmektedir. *Lactobacillus* grubunda bulunan türlerin spor oluşturmadıkları, Gram pozitif oldukları, katalaz enzimlerinin bulunmadığı bilinmektedir. *Lactobacillus* cinsine ait türler proteolitik ve lipolitik özellik gösteremediklerinden, gelişmeleri için buldukları ortamda özellikle peptit, aminoasit, bazı vitaminler ve yağ asitlerine ihtiyaç duymaktadırlar (Ahi 2011, Tokatlı 2013).

Lactobacillus spp. meyve-sebze ve bitkisel ürünlerden, süt ve ürünlerinden, fermente gıdalardan yaygın olarak izole edilmektedir. Bazı türlerinin güçlü düzeyde biyofilm oluşturabildiği, EPS üretim yeteneğinin olduğu ve streptomisin, vankomisin gibi bazı antibiyotiklere direnç gösterebildikleri belirtilmektedir (Jalilsood ve ark. 2015, Jose ve ark. 2015, Salas-Jara ve ark. 2016).

2.1.4. *Weissella*

İlk olarak 1993 yılında ayrı bir grup olması önerilen *Weissella* cinsine ait türlerin Gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, hareketsiz (*W. beninensis* hariç), sitokrom oksidaz enzimine sahip olmayan türler olduğu bilinmektedir (Fessard ve Remize 2017). Kısa çubuk ya da kokoid şeklinde hücre yapıları olan ikili ya da kısa zincirler şeklinde gözlemlenen *Weissella* spp.'nin günümüze kadar 19 türü tanımlanmış hepsinin heterofermentatif oldukları, laktik asit, etanol, CO₂ ve asetat üretebildikleri rapor edilmiştir (Srionnual ve ark. 2007, Goh ve Philip 2015, Li ve ark. 2017, Deatraksa ve ark. 2018). Fakültatif anaerob olan *Weissella* cinsine ait türler genel olarak 15-37°C' de gelişmekte olup, *W. cibaria* ve *W. confusa* türlerine ait bazı suşların 45°C' de de gelişebildiği bildirilmektedir. Morfolojik inceleme yapıldığında *Leuconostoc* spp. ile karıştırılabilmektedir. Ayrıca biyokimyasal testler uygulandığında da diğer LAB üyelerinden ayrımı konusunda hatalı sonuçlar elde edilebilmekte olup, *Weissella* cinsinin tanısında mutlaka moleküler yöntemlerin kullanılması gerektiği bildirilmektedir (Fessard ve Remize 2017).

Genellikle prebiyotik olarak ya da başka amaçlar için kullanılmak üzere EPS üretiminde *Weissella* türlerinden sıklıkla yararlanılmaktadır. Bazı türlerinin de probiyotik olduğu belirtilmektedir. Bakteriyosin benzeri bileşenler ve folat ürettiği belirlenen bazı *Weissella* türlerinin de olduğu önceki çalışmalarda belirtilmektedir (Srionnual ve ark. 2007, Goh ve Philip 2015, Li ve ark. 2017, Deatraksa ve ark. 2018).

Weissella spp. fermente gıdalardan, işlenmemiş sebze-meyvelerden, süt ve çeşitli peynirlerden izole edilebilmektedir. *W. cibaria*'nın bazı *Lactobacillus* spp. türlerinden çok daha fazla EPS (glukan ve dekstran) üretebildiği rapor edilmiştir. Ayrıca *W. cibaria* suşlarının vankomisin, streptomisin, penisilin, gentamisin gibi birçok antibiyotiğe karşı dirençli oldukları ancak, ampisilin, tetrasiklin, eritromisine karşı duyarlı oldukları bildirilmektedir (Fessard ve Remize 2017).

2.1.5. *Enterococcus*

Enterococcus cinsi, ikili ya da kısa zincir halinde bulunan fakültatif anaerob, kok ya da kokoid morfolojiye sahip bakteriler olarak bilinmektedir. LAB üyeleri arasında yer alan enterokokların gıdaların tat, aroma ve sertlik-yumuşaklık gibi reolojik özelliklerinin oluşmasında etkili oldukları belirtilmektedir (Ahi 2011). *Enterococcus* cinsinin optimum gelişme sıcaklığı 37°C olarak belirtilmektedir. Bazı türleri vankomisine direnç gösterirken, bazılarının ise duyarlı oldukları belirtilmektedir. Çiğ süt ve süt ürünlerinden izole edilen bazı *Enterococcus* türlerinin ise eritromisin ve tetrasikline karşı dirençli oldukları belirlenmiştir (Lukasova ve Sustackova 2003). Morfolojik incelemelerde *Streptococcus* ile ayırt edilmesi mümkün olamamakta ve tür bazında tanılanmaları için 16S rRNA dizi analizine ihtiyaç duyulmaktadır (Demir 2014). *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin biyofilm oluşturabildikleri bildirilmekte olup (Mohamed ve Huang 2007), sütte izole edilen ve biyofilm oluşturan *Enterococcus* spp. türlerinin çiğ sütte yoğun olarak gözlemlendiği, ancak sütün işlenmesi ile elde edilen peynir çeşitlerinde daha az rastlandığı bildirilmektedir (Necidova ve ark. 2009).

2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Önemi ve Kullanım Alanları

Gıdaların saklanmasında kullanılan önemli yöntemlerden biri fermentasyon olup, çiğ gıdada doğal olarak bulunan mikrobiyotanın aktivitesi ile gerçekleşmekte ve bu sayede ürünün kendine özgü duyuşal özellikleri ön plana çıkmaktadır. Ayrıca doğal olarak gerçekleşen fermentasyon ile gıda güvenliği de sağlanmaktadır. Eski çağlardan beri gıdaların korunması amacı ile kullanılan bir yöntem olan fermentasyon sayesinde düşük pH ve su aktivitesi gibi olumsuz koşullara dayanıklılık gösteren LAB suşlarının ortamda rekabetleri sonucunda, patojen ve/veya bozucu mikroorganizmalar ile gıdanın bulaşması engellenmekte ve son ürünün raf ömrü uzamaktadır. *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus* ve *L. plantarum* türleri süt ve ürünlerinden sıklıkla izole edilebilmektedir. Fermentasyon sonucunda meydana gelen CO₂, hidrojen peroksit (H₂O₂), bakteriyosin gibi metabolitlerin de son ürünün güvenliğinde ve bozulmadan depolanabilmesinde etkili olduğu belirtilmektedir (Quijada ve ark. 2018). Farklı ürünlerden izole edilen *L. sakei*

ve *L. curvatus* türlerinin fermentasyon süresince sakasin ve kurvasin A gibi bakteriyosinler üreterek, patojen mikroorganizmaları inhibe edebildiği rapor edilmiştir (Cebirbay 2014, Palamutoğlu ve Kasnak 2014). Çiğ sütün LAB suşları ile doğal fermentasyonu sonucunda elde edilen İran' a özgü geleneksel bir peynir çeşidi olan Lighvan peynirinin tüketiminden sonra gıda kaynaklı bir enfeksiyona rastlanmamaktadır. LAB suşlarının çiğ süt içinde gelişerek hâkim mikrobiyota haline geldiği ve ortamdaki patojen mikroorganizmaları tamamen inhibe edebildiği düşünülmektedir (Attar ve ark. 2018).

Süt ürünleri probiyotik LAB suşları için uygun bir ortam oluşturmaktadır. Probiyotik süt ürünlerinin yanında ülkemizde ve dünyada sebze bazlı fermente ürünlerin de sıklıkla tüketildiği bilinmektedir. Bazı durumlarda süt proteinlerine karşı alerji ya da kolesterol problemi olanlar için fermente süt ürünleri sınırlayıcı etken olabilmektedir. Hem süt ürünlerinde hem de bitkisel fermente gıdalarda ve ham meyve-sebzelerde LAB üyelerinin doğal olarak bulunduğu bilinmektedir. Turşu üretiminde ve farklı sebzelerden fermente içecek üretiminde de LAB suşlarından faydalanılmaktadır. Ayrıca Türkiye' deki hıyar turşularından farklı olarak, Hindistan ve Nepal' de olgun hıyarların açık havada kurutulduktan sonra 3-5 gün süre ile *L. plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* türleri ile fermentasyona bırakılmasının ardından "khalpi" olarak adlandırılan geleneksel yiyeceğin tüketime sunulduğu bildirilmektedir (Panghal ve ark. 2018). Fermente süt ürünlerinde sıklıkla karşılaşılan LAB suşlarının yanında çiğ sütlerin doğal biyotasında da *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. paracasei* gibi LAB suşlarının varlığı bilinmektedir (Güneş Altuntaş ve ark. 2010).

LAB' nin GRAS olarak gıdalarda kullanılabilme nedenlerinin başında hücre yapıları ve özellikleri gelmektedir. LAB suşlarında hücre duvarı yapısında bulunan polisakkaritlerin özellikle biyofilm tabakasının oluşumunda, antimikrobiyel peptidlere karşı direncin gelişiminde, hücre morfolojisinin ve bakteriyofajların tanınmasında rol aldığı bilinmektedir. Hücre duvarı yapısında yer alan proteinlerin ise hem fonksiyonel, hem de yapısal özelliklerin kazanılmasında farklı rolleri olduğu bilinmektedir (Chapot-Chartier ve Kulakauskas 2014).

Laktik asit fermentasyonu birçok gıdada ekşime ve bozulmaya neden olabilmektedir. Ancak fermentasyonun yoğurt, peynir, turşu, sucuk ve salam çeşitleri gibi birçok gıdanın üretiminde olması gerektiği bilinmektedir (Ertekin 2007, Tunail 2009, Evren ve ark. 2011). Ayrıca sofralık zeytin üretiminde ortama starter eklenmeden, ham zeytinin üzerinde bulunan doğal flora ile fermentasyon gerçekleştirilmektedir. Sofralık zeytinin fermentasyonunda, özellikle LAB türleri ile mayalar rol oynamaktadır. LAB suşları salamura pH' ı düşüren en önemli faktör olup, bu sayede bozucu mikroorganizmaların inhibisyonu sağlanmaktadır (Hurtado ve ark. 2012, Bonatsou ve ark. 2017). Bazı gıdalarda arzu edilen, bazılarında ise istenmeyen sonuçlara neden olan LAB üyelerinden özellikle *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* gibi sakkarozdan yoğun şekilde dekstran üretebilen türlerin şekerleme fabrikalarında sorun oluşturduğu bilinmektedir (Ertekin 2007, Tunail 2009, Evren ve ark. 2011).

LAB, özellikle zengin besin içeriğine sahip olan gıdalarda şlam oluşturabilmektedir, bu nedenle bozulma olan gıdalarda yapışkan şlam yapısı da gözlemlenebilmektedir. Ayrıca, LAB üyeleri, gıdaların doğal renk, aroma ve görünüşünü de değiştirebilmektedir (Johansson ve ark. 2011). Bazı *Lactobacillus acetotolerans* ve *L. fructivorans* suşlarının yüksek konsantrasyondaki asetik asite karşı dayanıklı oldukları bilinmektedir. Özellikle sirke prosesinde *Lactobacillus* spp.' nin ortamda canlı kalabilme ihtimalleri, son üründe bozulma riskini de beraberinde getirmektedir (Kubota ve ark. 2008). Ayrıca laktik asit bakterilerinden *L. plantarum* da biyofilm oluşturabilen türlerden biri olup, asit ve etanole karşı direnç göstermektedir. Bu nedenle özellikle lahana turşusu gibi asitli gıdalarda gözlenen tipik bozulma nedeni olarak ön plana çıkmaktadır. *L. plantarum* suşu kırmızı şaraplardan da izole edilmiş ve düşük pH değerlerinde (3,2-3,6) bile canlılığını koruyabildiği ve gelişebildiği belirlenmiştir (Kubota ve ark. 2009).

Gıdalarda kullanılan LAB suşlarının ortam asitliğini hızla artırabilme, proteolitik etki, tuz toleransı, fajlara karşı direnç gibi gıda endüstrisinde istenilen özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Ho ve ark. 2018). Ayrıca LAB kültürlerinin fermentasyonu ile

meydana gelen metabolitlerin, fırıncılık ürünlerinin de raf ömrünü uzattığı belirtilmektedir (Minervini ve ark. 2018).

Fermente bir ürün olan Kimchi, Kore' ye özgü geleneksel sebze yemeği olarak bilinmektedir. Jeong ve Lee' nin (2015) yaptıkları bir çalışmada Kimchi' den izole ederek, tanıladıkları *Weissella* ve *Leuconostoc* cinslerine ait farklı türlerin antibiyotik dirençliliklerini araştırmış ve tüm suşların ampisilin, kloramfenikol, eritromisin ve tetrasikline duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Suşların penisiline karşı da duyarlı olduklarını, ancak *Weissella* türlerinin *Leuconostoc* türlerinden iki kat daha fazla penisilin konsantrasyonunda inhibe olabildiklerini gözlemlemişlerdir. *Weissella* suşlarında gözlemlenen antibiyotik direncinin ise sonradan kazanılmış bir direnç olmadığını belirtmektedirler. Ayrıca Kim ve Kim (2014), Jimenez ve ark. 2018 ve Maksimovic ve ark. (2018) ise yaptıkları çalışmalarda, "kimchi" ve Peru' ya özgü "tocosh" isimli geleneksel fermente patatesten izole ettikleri LAB suşlarının folat, riboflavin ve tiramin gibi insan sağlığı için gerekli ve önemli olan, enzimatik aktivitelerde kofaktör görevini üstlenen vitaminleri de üretebildiğini belirlemişlerdir. LAB suşlarının insan sağlığını olumlu yönde etkileyen metabolitler (EPS, biyofilm, vitaminler, antimikrobiyel bileşenler vb.) üretmesi, onları ilaç ve gıda sektöründe de önemli hale getirmektedir. Ayrıca endüstriyel proseslerde LAB üyelerinin ortamda biriken metabolitleri sayesinde gıda güvenliği de sağlanmaktadır. Fonksiyonel fermente gıda üretiminde de LAB suşlarının metabolitleri yeni ürünlerin geliştirilmesinde önemli bileşenler olarak bilinmektedir (Yüksekdağ ve Zeydanlı 2013, Deatraksa ve ark. 2018).

Fermente gıdaların üretilmesinde LAB suşları arasından özellikleri bilinen, doğal antibiyotik direnci olanların seçilmesi ve starter olarak kullanılması gerektiği bilinmektedir. Antibiyotik direnci olan bakterilerin, duyarlı türlere göre insan sindirim sisteminde daha kolay kolonize olabildikleri, yetersiz koşullar altında daha uzun süre canlılıklarını koruyabildikleri ve daha dirençli oldukları bilinmektedir. Ayrıca antibiyotik direncin patojen mikroorganizmalara aktarılamaması da istenilen özelliklerden biridir. Bu özelliklere sahip olan suşlarda bakteriyosin üretiminin de olması, direnç mekanizmasını güçlendirmektedir. Jeong ve Lee (2015) yaptıkları

çalışmada fermente gıdalardan izole ettikleri *Leuconostoc* ve *Weissella* türlerinde bakteriyosin üretiminin olduğunu rapor etmişlerdir. Bazı gıdalarda bulunan LAB suşları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bazı gıda örneklerinden izole edilen LAB suşları

Gıda örneği	LAB türü	Referans
İşlenmemiş zeytin	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Leuconostoc garlicum</i> , <i>Weissella</i> spp., <i>Leuconostoc citreum</i>	Korukluoğlu ve ark. 2002, Tokatlı ve ark. 2012
Peynir	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Weissella cibaris</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus graminis</i> , <i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i>	Karakuş 1994, Durlu- Özkaya ve ark. 2001, Coeuret ve ark. 2003, İşleroğlu ve ark. 2008, Evren ve ark. 2011, Şimşek ve ark. 2014, Ertürkmen ve Öner 2015, Singh ve ark. 2015, Akoğlu ve ark. 2017
Çiğ süt	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pediococcus</i> spp. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i>	Delavenne ve ark. 2012, Singh ve ark. 2015, Doğan ve Özpınar 2017
Kefir	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>kefiranofaciens</i> , <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>L.</i> <i>delbrueckii</i> , <i>L.rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i>	Evren ve ark. 2011, Leite ve ark. 2015, Doğan ve Özpınar 2017, Jeong ve ark. 2017
Yoğurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Streptococcus</i> <i>salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus durans</i>	Azadnia ve Khan- Nazer 2009, Evren ve ark. 2011, Alexandraki ve ark. 2017
Turşu	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. parabrevis</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>namurensis</i> , <i>Lactobacillus diolivorans</i> , <i>Pediococcus</i> <i>parvulus</i> , <i>Pediococcus ethanolidurans</i> , <i>Pediococcus</i> <i>cerevisiae</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ,	İç ve Özçelik 1995, Evren ve ark. 2011, Bağder-Elmacı ve ark. 2015, Tokatlı ve ark. 2015, Tokatlı ve ark. 2017

Vakevainen ve ark. (2018)' ları yaptıkları çalışmada Meksika' ya özgü fermente bir mısır ürünü olan “atole agrio”dan izole ettikleri LAB suşlarının özelliklerini incelemişler ve suşların EPS üretebildiklerini belirlemişlerdir. Suşların EPS üretimi, %2 glikoz, laktoz, maltoz, rafinoz ya da sakkaroz içeren MRS Agar üzerinde her bir kültürün geliştirilmesi ile belirlenmiştir. Gelişme sonucunda rop oluşturan koloniler EPS üretebilen kültürler olarak işaretlenmiştir. *L. plantarum* Q8212 suşu da pozitif kontrol olarak denemede kullanılmıştır. Bahsi geçen çalışmada *L. plantarum* ve *P. pentosaceus* suşları, en çok EPS üretebilen suşlar olarak belirlenmiştir.

Probiyotik LAB suşları üzerine yapılan bir başka çalışmada yeşil lahanadan izole edilerek tanılanan *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. brevis* ve *P. pentosaceus*' un teknolojik özellikleri araştırılmıştır. Fermente yeşil lahanadan izole edilen suşlarının tamamının nalidiksik asite karşı dirençli oldukları, çoğunluğunun da streptomisin ve kanamisine direnç gösterdikleri belirtilmektedir. Mikroorganizma kaynaklı hastalıkların tedavisinde antibiyotik kullanımı sonrasında bağırsak mukozasına tutunmuş halde bulunan probiyotik suşların ortamda hâkim mikrobiyota halinde kalabilmesi için antibiyotiklere karşı dirençli olmaları gerekmektedir. Bu nedenle antibiyotik dirençlilik, probiyotik mikroorganizmalarda aranan önemli özelliklerden biri olarak belirtilmektedir (Gotcheva ve ark. 2002). Bahsi geçen çalışmada tanılanan suşlarda gözlemlenen antibiyotik dirençliliğinin sonradan kazanılmış bir özellik olmadığı bildirilmektedir. Ayrıca suşların çoğunluğunun düşük pH değerlerinde gelişebildiği de belirlenmiştir. Çalışmada bazı özellikleri belirlenen LAB suşlarının potansiyel probiyotik bakteriler olabileceğine değinilmektedir (Michalak ve ark. 2018).

Listeria monocytogenes, bazı gıdalarda rastlanan patojen bir bakteridir. Laktik asit bakterilerinden özellikle *L. plantarum* tarafından üretilen plantarisinin *L. monocytogenes*' i inhibe ettiği bilinmektedir. Bu nedenle plantarisin gıdalarda doğal koruyucu ajan olarak kullanılmaktadır. Antimikrobiyel bileşenler, bakteriyosin vb. metabolitler üreterek ya da biyofilm oluşturarak gıdaların raf ömrünü uzatan LAB suşlarının, metabolit üretim yeteneklerinin ortam koşullarına göre şekillendiği bilinmektedir. Engelhardt ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada *L. curvatus*

'un bakteriyosin üretme hızının NaCl konsantrasyonu, pH ve sıcaklıktan etkilendiği gözlemlenmiştir. NaCl konsantrasyonu arttıkça ve sıcaklık düştükçe, *L. plantarum* suşunun bakteriyosin üretme yeteneğinin de azaldığı sonucuna varılmıştır. LAB suşlarının doğal koruyucu olarak kullanılabilme potansiyellerinin araştırılmasında, metabolitlerinin hangi koşullarda daha yoğun üretildiği belirlenerek, o koşullarda üretimi uygun olan gıdalarda kullanılmalarının etkili sonuç vereceği düşünülmektedir.

Son yıllarda starter olarak kullanılan LAB suşlarının enkapsülasyonu ile ilgili çalışmalar da hız kazanmıştır. Çok eski çağlardan beri doğal fermentasyon yolu ile elde edilen gıdaların endüstriyel olarak üretilmeye başlanmasından sonra starter kavramı ön plana çıkmış ve suşların seçiminde de bazı kriterler önemli hale gelmiştir. LAB kültürlerinde ürünün hızla fermente olabilmesi için, fermentasyon gücü yüksek, farklı ortam koşullarına dayanıklı, hızlı gelişme özelliği bulunan suşlar, starter olarak seçilmektedir. LAB suşlarının fermentasyon sonucunda oluşan metabolitlere genellikle dayanıklı olduğu bilinmektedir, ancak metabolit konsantrasyonu arttıkça, canlı hücre sayısında da azalma olması kaçınılmaz hale gelmektedir. Enkapsülasyon işlemi ile starterlerin dış ortamdan etkilenme ihtimali düşük seviyeye inmektedir (Kavitake ve ark. 2018, Prasanna ve Charalampopoulos 2018). Özellikle antibiyotik direnci olan, EPS ve biyofilm üretebilen LAB suşlarının da dayanıklılıklarının artırılmasında enkapsülasyon uygulamalarının yararlı olabileceği düşünülmektedir. Kullanılan enkapsülasyon materyalinin özellikleri sayesinde starterin korunabileceği ve duyuşal özelliklerin de daha uzun süre saklanabileceği düşünülmektedir (Kavaz-Yüksel ve ark. 2015, Pulaj ve ark. 2016, Schoina ve ark. 2018).

İnkübasyon koşulları, ortama salgılanan metabolitlerin çeşit ve miktarını değiştirmekte olup, özellikle bazı fermentasyon koşullarında LAB suşları tarafından üretilen biyojenaminlerin birikebildiği ve insan sağlığını tehdit edebildiği belirlenmiştir. (Peñas ve ark. 2010, Xiong ve ark. 2014). İnsan sağlığına zarar verebilecek metabolitler yanında, takip edilmeyen fermentasyon koşullarında arzu edilen miktardan daha fazla yapışkan madde (EPS vb.) üretimi sonucunda ürünün duyuşal özelliklerinde de bozulmalar meydana gelebilmektedir. Süt ürünlerinde yapışkan (ropy) kültür olarak

bilinen EPS üreten LAB suşlarının tercih edildiği bilinmektedir. Bu ürünlerde istenilen kıvamlı yapının elde edilmesi, EPS üretme yeteneği olan LAB suşlarının kullanımı ile mümkün hale getirilebilmekte ve bu sayede kıvam artırıcı katkı maddelerinin kullanımı azaltılabilmektedir. Ayrıca EPS tabakasının doğal koruyuculuğu nedeni ile starterin uzun süre fermentasyonda kullanılabilmesi de mümkün olabilmektedir (Suyuçok ve ark. 2016). Ancak bazı fermente gıdalarda (fermente et ürünleri vb.) yapışkan EPS tabakasının yoğun olması ürünün duyuşal özelliklerini de bozabilmektedir. Bu nedenle gıda üretiminde kullanılan LAB suşlarının metabolit üretme koşullarının belirlenmesi ve fermentasyonun takibi önemli birer üretim basamağı olarak bilinmektedir (Makela ve ark. 1992, Kröckel 2013).

2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Tanılanması ve Uygulanan Yöntemler

Gıdalardan izole edilen LAB üyeleri incelendiğinde genel olarak, *Lactobacillus* türleri süt, et, sebze ve tahıl ürünlerinden, *Lactococcus* türleri süt ve ürünlerinden, *Leuconostoc* türleri süt ve sebzelerden, *Pediococcus* türleri, et ve sebzelerden, *Oenococcus* türleri şaraplardan ve *Enterococcus* ve *Streptococcus* türleri ise süt ve ürünlerinden izole edilerek tanılanmıştır. LAB suşlarının tanılanmasında fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler kültüre bağı ve kültürden bağımsız teknikler olarak iki grup altında incelenmektedir (Temmerman ve ark. 2004, Paveljšek ve ark. 2014 Yerlikaya 2014). Günümüzde rutin mikrobiyolojik analizlerde uygulanabilen hızlı fenotipik tanılama yöntemleri bulunmasına rağmen, bu yöntemler genotipik yöntemler kadar hassas ve güvenilir sonuçlar vermemektedir (Donelli ve ark. 2013, Paveljšek ve ark. 2014).

Moleküler yöntemler; gıdalar gibi karmaşık ekosistemlerde bulunan mikroorganizmaların saptanması, tanılanması ve özelliklerinin belirlenmesi için kullanılan teknikleri kapsamaktadır. Özellikle gıda mikrobiyolojisi alanında son yıllarda kültüre bağı olmayan tanılama yöntemleri dikkat çekmektedir. Kültüre bağı ya da kültürden bağımsız yöntemler mikrobiyel DNA' nın doğrudan örnekten ya da kültür ortamında geliştirilen mikroorganizma kolonisinden alınıp alınmama durumuna göre

gruplandırılmaktadır. Geleneksel yöntemler ile mikroorganizmaları kültüre alma teknikleri göz önüne alındığında, karmaşık bir mikrobiyotanın tamamının tanınması mümkün olamamakta ve bu nedenle kültürden bağımsız tanılama teknikleri üzerine çalışmalar hızla devam etmektedir (Yerlikaya 2014).

2.3.1. Kültüre bağlı tanılama yöntemleri

Mikroorganizmaların incelenmesinde eski tarihlerden beri uygulanan yöntemlere göre numunelerden izole edilen mikroorganizmaların laboratuvar ortamında gelişmesine olanak sağlanmış ve mikrobiyel gelişme *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiştir (Gürsoy ve Otlu 2017).

Gıda endüstrisinde kullanılan LAB suşlarının özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle de suşların tanınmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Tanılamada kullanılan fenotipik yöntemler daha ekonomik olduğu için, genotipik yöntemlerden daha fazla tercih edilmektedir. Bu nedenle fenotipik tanılama işlemlerinde spesifik tanılama kitleri kullanılmaktadır. Kültürlerin genel olarak özellikleri fenotipik yöntemler ile belirlenebilse bile benzer fenotipe sahip olan suşların DNA dizileri arasında farklılık olması durumunda birbirinden farklı davranış sergileyebileceği de bilinmektedir. Farklı genotipe sahip olmalarına rağmen fenotipik yöntemler ile aynı tür olarak tespit edilen suşların tanılama sonuçlarında hataların olabileceği genellikle gözden kaçmaktadır (Temmerman ve ark. 2004, Yerlikaya 2014, Fguiiri ve ark. 2015).

Fenotipik tanılama yöntemleri

Özellikle, endüstride ve gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında mikroorganizmaların tanınmasında fenotipik testler rutin olarak kullanılmaya devam etmektedir. Bu yöntemler; mikroorganizmaların morfolojik ve fizyolojik karakteristiklerinin, farklı sıcaklıklarda gelişme düzeylerinin, karbonhidrat metabolizması ve protein profillerinin belirlenmesi olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, fenotipik tanılama yöntemlerinin taksonomik ayırım gücünün sınırlı olduğu ve tekrarlanabilirliğinin düşük olduğu gibi

önemli sonuçları ortaya çıkarmaktadır. Fenotipik yöntemlerin popüler olmasının nedeni ise spesifik bir cihaz ya da ekipman gerektirmemesine bağlanmaktadır (Temmerman ve ark. 2004, Yerlikaya 2014).

Fenotipik yöntemler, kültüre bağlı teknikler olarak bilinmekte olup, hedef mikroorganizmanın kültüre alınabilir olması gerekliliği ön plandadır. Mikroorganizmaların kültüre alınması her zaman mümkün olamamakta ve bu nedenle sonuçlar bazen yanlış yorumlanabilmektedir (Gürsoy ve Otlu 2017).

Mikroorganizmaların fenotipik tanılanmasında spesifik test kitleri (API 50 CHL vb.), sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi (Temmerman ve ark. 2004, Donelli ve ark. 2013, Bağder-Elmacı ve ark. 2015), organik asitlerin ince tabaka kromatografisi ve yağ asiti metil ester (FAME) analizi (Temmerman ve ark. 2004, Donelli ve ark. 2013) ve bu analizlere ek olarak, gerekli görüldüğü durumlarda rastgele arttırılmış polimorfik DNA-PZR (RAPD-PZR) tekniklerinin (Temmerman ve ark. 2004, Donelli ve ark. 2013, Bağder-Elmacı ve ark. 2015) kullanıldığı bilinmektedir. Fenotipik yöntemlerde alt türlerin birbirinden ayırımında bazı hatalı sonuçlar elde edilebilmekte olup, bu yöntemlerin özellikle laktobasiller ve bifidobakterilerin tanılanmasında yetersiz kaldığı belirtilmektedir (Donelli ve ark. 2013). Fenotipik yöntemlerde en doğru sonuca ulaşabilmek için, birden fazla yöntemin kombinasyonunun kullanılması ve analizlerin tekrarlanabilirliğinin tespit edilmesi önerilmektedir (Temmerman ve ark. 2004, Bağder-Elmacı ve ark. 2015).

Genotipik tanılama yöntemleri

Birçok genotipik tanılama yöntemi, spesifik olarak hedef bir DNA parçasının amplifikasyonuna izin veren polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) prensibine dayanmaktadır. Teorik olarak PZR primerleri kontrollü reaksiyon koşulları altında tüm türlere özgü olacak şekilde tasarlanabilmektedir. İlk primer tasarımı 1997 yılında 16S rRNA parçasının amplifikasyonunu sağlayacak şekilde gerçekleşmiş ve tasarlanan primerin sadece bifidobakterilere özgü olduğu belirtilmiştir. Bu sayede gıda matriksinde

gene özgü tanılama işlemi bifidobakteriler için mümkün hale gelmiştir. *Bifidobacterium adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve* ve *B. longum* insan sindirim sisteminde sıkça rastlanan bakterilerdendir. Son zamanlarda LAB türlerine özgü primerler de tasarlanmakta ve faj bağlantılı primerler bu amaçla sıklıkla kullanılmaktadır (Matsuki ve ark. 2004, Temmerman ve ark. 2004, Ward ve Roy 2005).

Genotipik yöntemlerde, numuneden yapılan ekimler sonucunda mikroorganizmaların *in vitro* koşullarda besi ortamında gelişmesi sağlanmakta ve koloni oluşumu gözlemlenmektedir. Mikroorganizmalar, zenginleştirme besiyerlerinde geliştirilerek koloni oluşumu desteklenebilmektedir. Mikroorganizmanın saf kolonisi elde edildikten sonra DNA izolasyonu ve uygun primerler kullanılarak PZR amplifikasyonu gerçekleştirilmektedir. PZR ürünleri saflaştırılarak sekans analizi yapılmakta ve dizi analizinde elde edilen elektroferogramlar değerlendirilerek, tanılama işlemi tamamlanmaktadır (Demirel 2012).

Mikroorganizmanın cins ve türünün tahmin edilemediği durumda, türler arasında en iyi ayrımı sağlayan 16S ya da 23S rRNA sekanslama yapılması önerilmektedir. Dizi analizi ile elde edilen sekansın, önceden sekansı tanılanan ve veritabanında yer alan diziler ile karşılaştırılması sonucunda yakın akrabalıklar tespit edilmekte ve türler arasındaki benzerlik oranları kontrol edilerek, mikroorganizmanın türü belirlenebilmektedir. Online veritabanları arasında en çok kullanılanlar, EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) ve Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) olarak bilinmektedir. Veritabanlarında bulunan ve test mikroorganizması ile uyumlu olan sekansların belirlenmesi için BLAST ya da FASTA gibi arama algoritmaları kullanılmaktadır. Bu tanılama yöntemi oldukça güvenilir olmasına rağmen, alt türlerin tanılanması, veritabanlarındaki taksonomik tür sayısı ile sınırlı kalmaktadır. Ayrıca operonlar arası baz diziliminden dolayı meydana gelen varyasyonlar da bazı tanılama hatalarına neden olabilmektedir (Temmerman ve ark. 2004).

2.3.2. Kültürden bağımsız tanılama yöntemleri

Kültüre bağlı tanılama yöntemlerindeki yaklaşımlar, kültürün bulunduğu ortama (gıda, toprak vb.) bağlı olarak tasarlanmıştır. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda kültüre bağlı yöntemlerin kullanılması sayesinde mikroorganizmalar hakkında önemli bilgiler elde edilebilmiştir. Ancak, kültürden bağımsız moleküler tanılama yöntemlerinin uygulanması sonucunda, özellikle kültüre alınamayan mikroorganizmaların özelliklerinin de belirlenebilmesi sağlanmıştır. Bu yöntemde DNA, doğrudan örnekten izole edilerek analiz edilmektedir (Gürsoy ve Otlu 2017).

Toplam DNA ya da seçici PZR reaksiyonu sonunda meydana gelen PZR ürünleri (amplikonlar) ile gerçekleştirilen ayırım gücü yüksek, kültürden bağımsız teknikler bulunmaktadır. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) (Temmerman ve ark. 2004, Claisse ve ark. 2007), darbeli alan jel elektroforezi (PFGE) (Çetinkaya ve Ayhan 2012, Munoz-Atienza ve ark. 2016), çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP) (Temmerman ve ark. 2004, Demirel 2012), laktobasillere özgü spesifik primerlerin kullanılması ile ayırım hassasiyeti yüksek olan rastgele arttırılmış polimorfik DNA yöntemi (RAPD) (Kılıç ve ark. 2003, Temmerman ve ark. 2004) ve floresan in situ hibridizasyonu (FISH) (Demirel 2012, Gürsoy ve Otlu 2017), bu yöntemler arasında yer almaktadır. Kültürden bağımsız tanılama yöntemleri ile mikroorganizmaların alt türleri de kolaylıkla belirlenmektedir. Yapılan çalışmalarda kültürden bağımsız teknikler ile *tuf* geninin tespiti ile yakın akraba olan 9 adet *Lactobacillus* alt türünün belirlenebildiği belirtilmektedir (Temmerman ve ark. 2004, Demirel 2012, Park ve ark. 2012). Ayrıca kültürden bağımsız denatüre gradyan jel elektroforezi (DGGE) yöntemi de bir örnekteki DNA parçalarının karşılaştırılmasını sağlayan moleküler parmak-izi teknikleri olarak bilinmektedir (Temmerman ve ark. 2004, Claisse ve ark. 2007, Demirel 2012, Gürsoy ve Otlu 2017). LAB suşlarında antimikrobiyel bileşenlere direnç genlerinin de bu yöntemler ile tespit edilebildiği bildirilmektedir (Demiray ve Yılmaz 2005).

Özellikle fenotipik tanılama yöntemlerinin yetersiz olması, araştırmacıları daha güvenilir sonuçlar elde edebilecekleri ve kesin bir taksonomik ayırımın anlaşılmasına

olanak sağlayacak yaklaşımlara yönlendirmiş ve dolayısı ile mikroorganizmaların DNA yapılarının detaylı olarak incelenmesi gerekliliği doğmuştur. Genotipik yöntemler de DNA dizilerinin ve genetik özelliklerin anlaşılmasına yönelik teknikleri içermektedir. Araştırmalar sonucunda, uygulanan modern taksonomik yöntemlerin fenotipik ve genotipik yöntemleri birlikte kullanmaya teşvik ettiği bilinmektedir (Tokatlı 2013).

2.4. Biyofilm

Mikroorganizmaların çoğunluğu yüzeylere tutunma konusunda doğal bir yeteneğe sahiptir. Bir yüzey üzerinde tutunmuş halde bulduklarında ortamdaki besin maddelerinden daha çok faydalanabilmekte ve daha hızlı gelişerek sayılarını çoğaltabilmektedirler (Araújo ve ark. 2011, Kostaki ve ark. 2012, Fonteini 2015). Biyofilm, canlı/ cansız bir yüzeye geri dönüşümlü ya da dönüşümsüz olarak tutunmuş kendi ürettikleri ekstraselüler matriks tarafından çevrelenmiş ve salgıladıkları sinyal maddeleri ile birbiri ile haberleşebilen mikroorganizma toplulukları olarak tanımlanmaktadır (Kam Hepdeniz ve Seçkin 2017, Ünal ve Tayfur 2017). Matriksi oluşturan tabakanın, biyofilm katmanları içinde yer alan mikroorganizmalar tarafından üretilen ağ yapısı şeklinde jele benzer polisakkarit bir yapı olduğu bilinmektedir. Biyofilm tabakasının %97' sini su oluşturmaktadır. Geri kalan kısımlarda ise mikroorganizmalar, EPS, proteinler, nükleik asit, lipit ve fosfolipitler yer almaktadır. Ortam koşullarına, biyofilm tabakasında bulunan mikrobiyel biyotaya ve mikroorganizmaların tutundukları yüzey koşullarına göre, biyofilm matriksi içinde bulunan bileşenlerin yüzde oranları da değişebilmektedir (Gün ve Ekinci 2009, Abebe 2013, Ünal ve Tayfur 2017).

Mikroorganizmalar tarafından biyofilm tabakasının oluşturulma nedenleri aşağıdaki gibidir (Jefferson 2004);

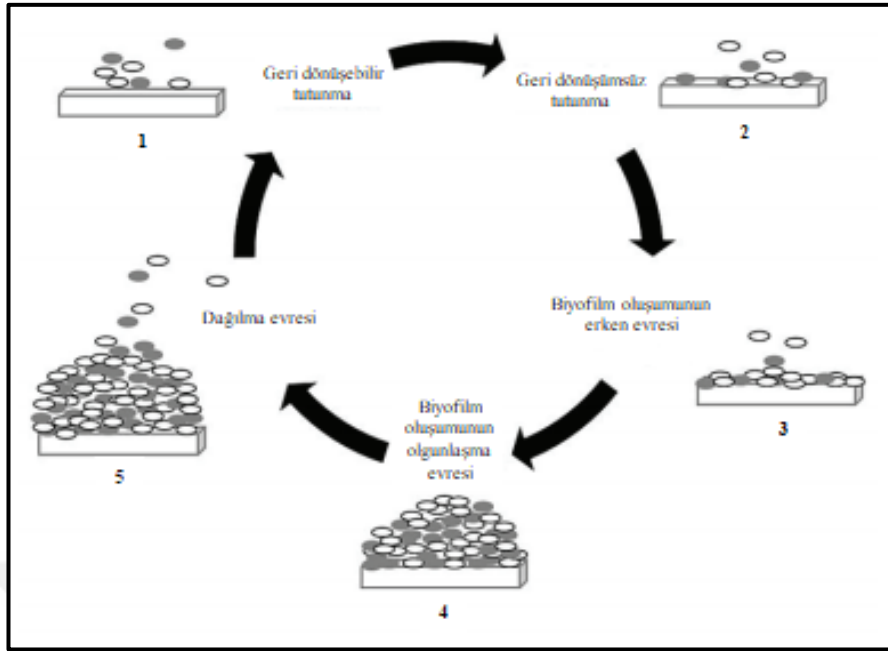
1. Dış faktörlerden korunmak,
2. Besin maddelerine erişebilme imkânını artırmak,
3. Diğer mikroorganizmalar ile iletişim halinde olarak, topluca hareket etmek

4. Diğer mikroorganizma grupları ile sinyal molekülleri ile haberleşerek, ortam koşullarına uygun olacak şekilde yeni ve farklı genetik özellik ve davranış şekilleri sergileyebilmek

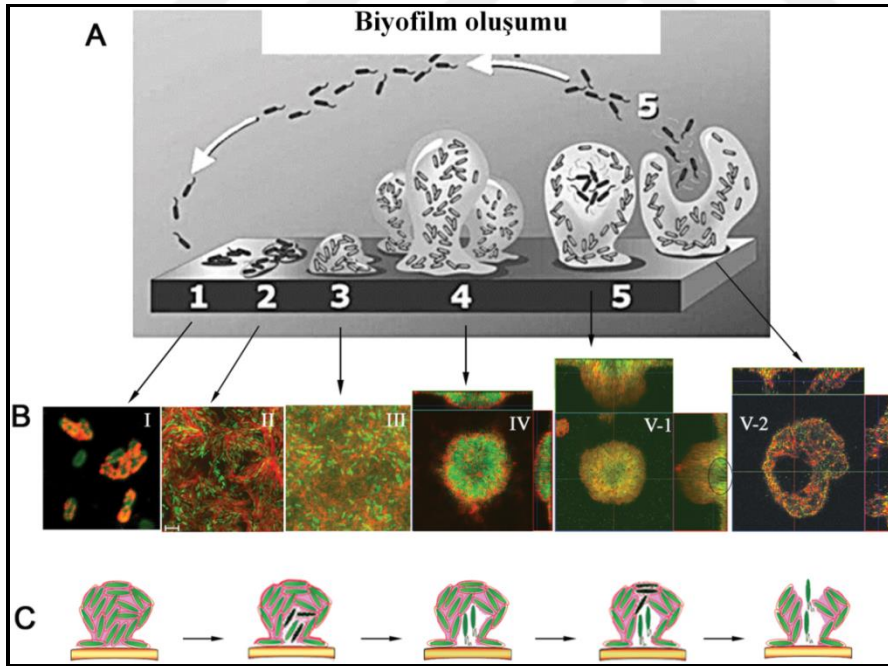
Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar gelişim evrelerine göre planktonik ve yerleşik (sessile) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Planktonik hücrelerin bireysel olarak ve serbest halde yaşadıkları, sessile hücrelerin ise bir yüzeye tutunarak mikrokoloni halinde yaşamlarını devam ettirdikleri bilinmektedir. Mikroorganizmaların yüzeye tutunma aşamaları zamana bağlı olarak değişmekte ve yüzeyde tutunmuş olan mikrokoloni ile salgıladıkları metabolitlerinin oluşturduğu jelle benzer matriks de zamanla kalın bir tabaka haline gelmektedir. Stres koşullarında canlı kalabilme gibi bazı karakteristik özellikler, mikroorganizmalar arasında genetik olarak aktarılabilmektedir. Tutunulan yüzeyin yapısı ve mikroorganizmanın tutunma kabiliyeti, biyofilm oluşumunda önemli olan temel iki faktör olarak bilinmektedir. Ayrıca ortam pH' sı ve sıcaklığının dışında mikroorganizmanın türü, hücre zarı ve duvarının yapısı, yüzeye tutunan hücre sayısı, mikroorganizmanın hareket kabiliyeti, ortamın iyon konsantrasyonu ve ortamdaki besin maddelerinin miktarı/ içeriği gibi birçok yan faktörün de biyofilm oluşumunda rol aldığı belirtilmektedir (Gün ve Ekinci 2009, Akan ve Kınık 2014, Fonteini 2015). Biyofilm oluşumunda birden fazla gelişim aşaması gözlemlenmektedir. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturabilme kabiliyetlerine göre ve biyofilm oluşum aşamasına bağlı olarak yüzeylere tutunmanın tersinir ya da tersinmez şekilde gerçekleştiği bilinmektedir. Bu durum da genetik faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Bu nedenle dayanıklı mikroorganizmaların canlılığını daha uzun süre devam ettirebilmek için EPS üreterek, yüzeylere geri dönüşümsüz olarak tutunmaya çalıştıkları bilinmektedir (Araújo ve ark. 2011, Kostaki ve ark. 2012, Fonteini 2015). EPS üretiminin mikroorganizmaların kendi aralarında haberleşmesini sağlayan sinyal üretimlerini tetiklediği bildirilmektedir. EPS salgısı hücrelerin dehidrasyona uğrama riskini azalttığı için, stres koşullarına daha dayanıklı hale gelmelerini sağlamaktadır (Patel ve ark. 2014). EPS salgısı ile biyofilm tabakasının zamanla olgunlaştığı ve buradaki mikroorganizmaların, salgıladıkları sinyal molekülleri sayesinde etkileşime geçtikleri bilinmektedir. Sinyal molekülleri ile

gerçekleşen hücreler arası iletişim “Quorum sensing (QS)” olarak adlandırılmaktadır. QS mekanizması sayesinde planktonik haldeki mikroorganizma hücrelerinde gözlemlenmeyen bazı özelliklerin biyofilm tabakası içinde gözlemlendiği bildirilmektedir. Mikroorganizmaların yüzeylere tutunması ve zamanla daha güçlü bağlar ile tersinmez olarak bağlanması konusunda da QS mekanizmasının rol aldığı belirtilmektedir (Araújo ve ark. 2011, Patel ve ark. 2014, Fonteini 2015). Biyofilm oluşum aşamaları Şekil 2.2’ de gösterilmektedir.

Biyofilm oluşumu beş aşamada meydana gelmektedir. İlk aşamada mikroorganizma hücreleri yüzeye hidrojen bağları gibi güçlü olmayan bağlar ile tersinir şekilde tutunmaktadır. Yüzeye tutunma zamanla daha güçlü bağlar ile gerçekleşmekte ve mikroorganizma hücrelerinin yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunması ile ikinci aşama tamamlanmaktadır. Üçüncü aşamada ise mikrokoloni oluşumları meydana gelerek, EPS üretimi hızlanmakta ve biyofilm tabakası biraz kalınlaşmaya başlamaktadır. Biyofilm tabakasının olgunlaşması aşamasında (dördüncü aşama) QS mekanizmasının aktif olduğu ve hücre sayısının daha çok arttığı bilinmektedir. Bu sayede biyofilm tabakasında yer alan mikroorganizma hücreleri stres koşullarına karşı dayanıklı hale gelmektedir. Olgunlaşma aşamasını ise dağılma evresi (beşinci aşama) takip etmektedir. Biyofilm tabakasından ayrılan planktonik hücreler başka yüzeylere tutunarak, yeniden biyofilm oluşum aşamalarını devam ettirme eğilimde olmaktadır. Biyofilm gelişim aşamalarında gözlemlenen kopma veya ayrılma evresinde tek bir mikroorganizma hücresi ya da mikroorganizma kümesi biyofilm tabakasından koparak ortama yayılmaktadır. Bu ayrılma ve dağılma işlemi, dış kuvvetlerin etkisi ile olabileceği gibi biyofilm oluşum aşamasının bir parçası olarak, tek ya da çoklu hücrelerin kopması sonucunda da gerçekleşebilmektedir (Gün ve Ekinci 2009). Şekil 2.3’ te biyofilm aşamalarının makroskobik ve mikroskobik görünümleri verilmiştir.



Şekil 2.2. Biyofilm oluşum evreleri (Yeşilçimen-Akbaş 2015)



Şekil 2.3. Biyofilm oluşum aşamalarının makroskobik şemaları (A ve C) ve elektron mikroskobu görüntüleri (B) (Ma ve Wood 2009)

2.4.1. Biyofilm oluşumunun dezavantajları ve engelleme yolları

Biyofilm oluşumu ilk olarak patojen mikroorganizmalarda tespit edilmiştir, bu nedenle biyofilm oluşumu ile insan sağlığının olumsuz etkileneceği önyargısı oluşmuş ve bilimsel araştırmalarda da genellikle biyofilm oluşumunun engellenmesi üzerinde durulmuştur. Biyofilm yapısı ilk olarak 1980'li yıllarda diş plaklarında gözlemlenmiştir (Donlan ve Costerton 2002, Bjarnsholt ve ark. 2013).

Özellikle patojenler gibi insan sağlığını olumsuz etkileyen mikroorganizmaların bir yüzeye tutunup, gelişmesi istenmemektedir. Ortamda hakim mikrobiyota halini aldığı zaman enfeksiyon riskleri ve salgınlar ortaya çıkabilmekte ve mikrokolonilerin biyofilm oluşturması sonucunda da antimikrobiyel ajanlara karşı direnç gelişebilmektedir. Patojen mikroorganizmaların direnç geliştirmesi, onlarla mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Bu nedenle özellikle klinik mikrobiyolojide hastalık etmeni olan mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmin engellenmesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (Annous ve ark. 2009, Gün ve Ekinci 2009).

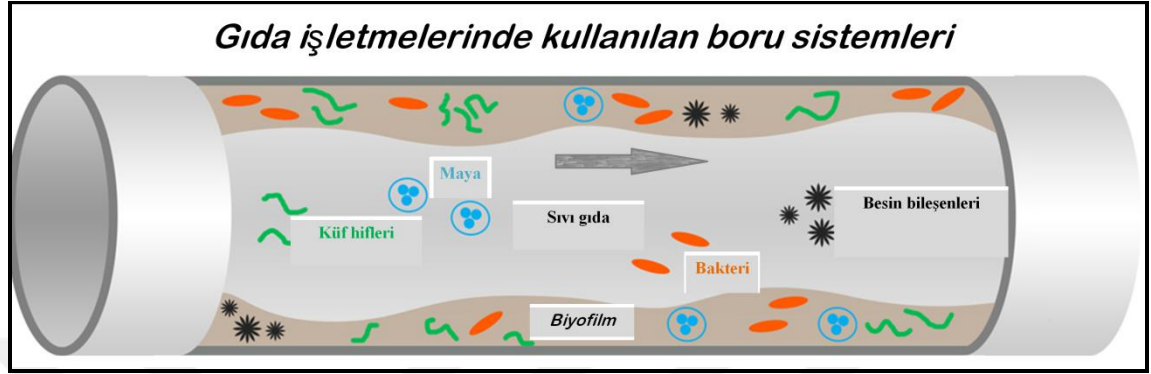
Yapılan bir çalışmada, bazı patojen bakterilerin planktonik formlarının gelişme süreci takip edilmiştir. Planktonik formun durağan fazdaki antibiyotik dirençliliği ile biyofilm formlarının antibiyotik dirençlilikleri aynı bulunmuştur. Mikroorganizmaların özellikle QS mekanizması ile haberleşebilmeleri sonucunda ortam koşullarına göre davranış şekillerini değiştirdikleri belirlenmiştir. Biyofilm formunda olmasalar bile toplu halde bulunan hücrelerin durağan fazda, stres faktörlerine direnç gösterebilme eğilimlerinin de QS mekanizması ile alakalı olduğu düşünülmektedir. Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların ortam koşullarına hızlı adapte olabilme ve daha dirençli hale gelme özellikleri de QS mekanizmasını destekler nitelikte bulunmuştur (Spoering ve Lewis 2001, Vu ve ark. 2009).

Biyofilm tabakası, mikroorganizmalar için koruyucu bir kalkan görevi görmektedir. Özellikle antimikrobiyel ajanlar ve dezenfektanlara karşı, planktonik formlarına oranla 500 kat daha dayanıklı oldukları rapor edilmiştir. Bu konu ile ilgili yapılan bir

çalışmada, mikroorganizmaların biyofilm tabakasından ayrılarak, gelişmeleri için uygun bir sıvı besiyerine aşılınmaları durumunda, antimikrobiyel ajanlara duyarlı olan eski hallerine döndükleri de belirtilmektedir (Akan ve Kınık 2014, Diani ve ark. 2016).

Tıbbi alanda sorun teşkil eden biyofilm oluşturabilen patojen mikroorganizmalar ile mücadele önemli bir araştırma konusudur. Özellikle gıda endüstrisinde de biyofilm oluşumunun gıda güvenliği açısından önemli riskleri olduğu bilinmektedir. Özellikle süt işletmeleri, içme suyu dolmuş ve şişeleme fabrikaları, meyve-sebze işleme ve et işleme fabrikaları gibi gıda sektöründe bulunan işletmeler için en büyük risklerden biri, gıda hammadde ve son ürünün temas ettiği yüzeylere *Bacillus cereus* gibi özellikle sporlu patojen mikroorganizmaların bulaşması ve ortamdan uzaklaştırılması konusunda yetersiz kalınmasıdır. Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar insan sağlığını tehdit etmektedir. Bu nedenle gıda işletmelerinde alet-ekipman temizliği önem taşımaktadır. Özellikle üretimin tamamen kapalı sistemler ile gerçekleştiği işletmelerde hijyen kontrolünün daha önemli olduğu bilinmektedir. Süt ve şekerleme fabrikalarında sıvı hammaddenin geçtiği boru sistemlerinin iç yüzeylerinin temizliği diğer ekipmanlara göre daha zor ve risklidir. Benzer şekilde gıda ile temas eden yüzeylerde hijyen eksikliği durumunda, besinsel yönden zengin olan kalıntı içerisinde çeşitli mikroorganizma grupları gelişme imkanı bulmakta ve gıda hatlarında çapraz kontaminasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca mikroorganizmalar yüzeylerde gelişmeye başladıkları andan itibaren zamanla biyofilm oluşturan türler ortamda hâkim biyota haline gelebilmekte ve dolayısı ile EPS üretimi de hızlanmaktadır. Mikrokolonilerin yüzeylere güçlü kimyasal bağlar ile bağlanması sonucunda biyofilm tabakasının kalınlığı artmaya başlamaktadır. Boru iç yüzeylerinde biyofilm tabakasının kalınlaşması ile korozyon meydana gelmektedir. Ayrıca sürtünme kuvvetinin artması ve boru iç hacminin de daralmasından dolayı sıvı geçiş hızı da düşmektedir. Bu durumda ekonomik kayıp, üretim hızında düşme ve kontaminasyondan dolayı ürün kaybı gibi hasarlar meydana gelebilmektedir (Garrett ve ark. 2008, Kiskó ve Szabó- Szabó 2011, Winkelstroter 2015). Olgunlaşmış biyofilm tabakasının yüzeylerden uzaklaştırılması zorlaştığı için, yeterli dezenfeksiyonun sağlanamama ihtimali doğmaktadır. Biyofilm oluşumuna izin verilmeden etkili ve yeterli bir sanitasyon işlemi gerekliliği tüm gıda

fabrikaları için geçerlidir (Kumari ve Sarkar 2016). Gıda işletmelerinde yer alan sistemlerde boru cidarlarında farklı mikroorganizma gruplarının tutunması ile meydana gelen biyofilm tabakası Şekil 2.4' te şematize edilmiştir.



Şekil 2.4. Gıda işletmelerinde kullanılan boru sistemlerinin içinde biyofilm tabakası oluşumu (<http://watter.nl/en/sustainable-disinfection/removing-biofilm/>)

Yapılan bir çalışmada et fabrikalarında temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerini takiben gıda hatlarında bulunan konveyörlerden *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Listeria* spp., *Serratia* spp. ve *Staphylococcus* spp. türlerinin izole edildiği belirlenmiş ve biyofilm oluşturma koşulları ile dezenfektanlara karşı dirençleri araştırılmıştır. Denemede biyofilm oluşturma kapasitesi en yüksek olan suşların dezenfeksiyon işlemlerinden sonra bile ortamdaki izole edilebilen bakteriler olan *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ve *Listeria* cinslerine ait olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun çapraz kontaminasyona neden olarak, tüketime hazır et ürünlerinde risk oluşturacağı ifade edilmektedir (Fagerlund ve ark. 2017).

Biyofilm oluşumunun risk oluşturduğu alanlardan biri de su arıtma tesisleridir. Tesislerde yapılan mikrobiyel kontrollerde özellikle şlam oluşturan *Pseudomonas* ve bazı küf türlerinin izole edildiği belirtilmektedir. Biyofilm oluşumunu engellemek için etkin dezenfeksiyon sistemlerinin bulunması gerekliliği vurgulanmaktadır (Rao ve ark. 2017).

Bir diğerk gıda kaynaklı patojen bakteri türü olan *Staphylococcus aureus* ile yapılan bir çalışmada ise bakterinin ürettiğı biyofilm gelişimi üzerine bazı bitki esansiyel yağlarının etkileri incelenmiştir. Özellikle *Cinnamomum cassia* ve *Salvia officinalis* esansiyel yağlarının beraber kullanıldığı denemede 24 saatlik inkübasyon sonunda *S. aureus* gelişiminin 3 log birimlik azaldığı ve biyofilm oluşumunun da 90 dakikalık muamelenin ardından %68 oranında azaldığı belirlenmiştir (Campana ve ark. 2017). Tarçın ve limon esansiyel yağları ile yapılan bir başka çalışmada *E. coli* ve *B. cereus* suşları arasında meydana gelen QS mekanizması engellenerek biyofilm oluşumunun azaldığı anlaşılmıştır (Kerekes ve ark. 2013). Biyofilm oluşumunu engelleyici yeni doğal koruyucu ajanların tespit edilmesi gıda endüstrisi açısından çok önemlidir. Nostro ve ark. (2016)'nın yaptığı çalışmada *Punica granatum* L. ve *Rhus coriaria* L. bitki ekstraktlarının gıda kaynaklı patojenlerden olan *Esherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* tarafından oluşturulan biyofilm tabakalarını sırası ile %25-40 ve %20-30 arasında azalttığı belirlenmiştir. Biyofilm oluşumu 96-kuyucuklu plaka yöntemi ile belirlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalar da ultrasonik ses dalgalarının *P. aureginosa* tarafından oluşturulan biyofilm tabakasını parçalayabildiğini göstermektedir (Masak ve ark. 2014).

Gıda kaynaklı hastalıkların ve kontaminasyonun engellenmesi açısından, gıda işletmelerinde ham madde girişinden son ürün çıkışına kadar gıda ile temas eden alet-ekipman ve konveyör sistemlerinin düzenli olarak dezenfekte edilmesi, ayrıca belirli aralıklarla dezenfeksiyon kontrollerinin yapılması çok önemlidir. Düzenli kontroller ile mikroorganizmaların biyofilm oluşturmalarına izin verilmeden, hijyen sağlanabilmektedir. Mikroorganizmalar bir yüzeye tutunduktan sonra biyofilm oluşumu genellikle 10 gün süre içerisinde gerçekleşmektedir. Bu durumun engellenmesi açısından uygun antimikrobiyel ajanlar yardımı ile işletme içi hijyenin sağlanması önerilmektedir (Akan ve Kınık 2014).

Özellikle geçtiğimiz yıllarda Avrupa ve İskandinav ülkelerinde görülen paketlenmiş taze yeşilliklerden kaynaklanan salgınlar sonrasında Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) toplantılar düzenlemiş ve konu ile ilgili çalışmalara başlamıştır. Yapılan

araştırma sonuçlarına göre özellikle salata için hazırlanarak tüketime sunulan paketlenmiş ıspanak ve karışık yeşillik ambalajlarında bitki özularının biriktiği gözlenmiştir. Bu sızıntının özellikle *Salmonella* spp. gelişmesi için uygun bir ortam yarattığı ve bakteri gelişiminin denemedeki kontrol grubuna göre çok daha fazla olduğu belirtilmektedir. *Enterobacter* ve *Salmonella* gibi enterik patojenler, taze yeşillik çeşitlerinin bulunduğu ambalajlarda biriken sıvı ile gelişme olanağı bulmakta ve biyofilm oluşturmaktadır. Bu nedenle tüketime hazır yeşilliklerin depolama ve transfer süreçlerinde mikrobiyel gelişmeye ve biyofilm oluşumuna uygun hale geldikleri bildirilmektedir. Taze olarak tüketilen yeşillikler çok az işlem gördükleri için, patojenler ile kontamine olmaları da kaçınılmaz hale gelmektedir. Tüketime hazır yeşilliklerin dekontaminasyonu amacı ile organik asit, hidrojen peroksit ya da klor uygulamaları yapılmış ancak, sanitasyon uygulamalarının yeşilliklerin tekstürel yapısını bozduğu anlaşılmıştır. Yeşillik yapraklarında LAB suşlarının kolonizasyonu sağlandığında ve bazı bakteriyofajların yapraklara uygulanması sonucunda enterik patojenlerin sayısının düştüğü ve biyofilm oluşumunun azaldığı gözlemlenmiş, ancak tam inhibisyonun sağlanabileceği en uygun yöntem henüz belirlenmemiştir (Koukkidis ve ark. 2017).

2.4.2. Biyofilm oluşumunun avantajları ve LAB suşlarında biyofilm oluşumu

Biyofilm oluşumu özellikle LAB suşları gibi insan sağlığına faydalı mikroorganizmalarda gözlemlendiğinde, hücrelerin olumsuz ortam koşullarına dirençli olmasını sağlamak için istenilen bir özellik haline gelebilmektedir. Birçok LAB suşunun EPS üretebildiği bilinmektedir (Erginkaya ve ark. 2011, Salas-Jara ve ark. 2016). Ayrıca çoğu LAB türü probiyotik olarak gıdalarda kullanılmakta ve biyofilm üretme kabiliyetleri nedeni ile patojen mikroorganizmalarla yarışabilmektedir. LAB suşlarının ürettiği biyofilm tabakasının patojen mikroorganizmalara karşı koruyucu bir kalkan görevi gördüğü bildirilmektedir. Bu sayede özellikle et ve süt endüstrisinde biyofilm üretebilen LAB suşlarının kullanımı ön plana çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar, LAB suşlarının antilisterial etkiye sahip olduklarını göstermektedir. Bu özelliğin de LAB suşlarının biyofilm üretebilme yetenekleri ile doğrudan ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. LAB suşlarının ürettiği biyofilm tabakasının küfler üzerine de inhibe edici

etkilerinin olduğu bildirilmekte olup, doğal gıda koruyucusu olarak LAB biyofilmlerinin kullanım koşulları üzerine çalışmalar devam etmektedir (Erginkaya ve ark. 2011, Furukawa 2015, G3mez ve ark. 2016, Cruciata ve ark. 2018).

Biyofilm oluşumunda QS mekanizmasının 3nemli role sahip olduğu bilinmektedir. Çoğunluk algılanması mekanizmasının patojen mikroorganizmalarda g3r3lmesinin istenmeyen sonuçlar doğurduğu bilinmektedir. Ancak, gıda end3strisinde kullanım alanı bulan insan sağlığına faydalı mikroorganizmalarda aktif QS mekanizmasının pozitif etkileri olabileceği bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada *L. sakei* suşunun A1-2 sinyal molek3l3 ile diğer LAB suşları arasında haberleşme sağlayabildiği ve bu sinyal molek3l3n3n ise *E.coli* O157:H7'nin vir3lens etkisini inhibe edebildiği tespit edilmiştir (Park ve ark. 2014).

Yun ve ark. (2014) tarafından yapılan bir başka çalışmada da LAB t3rleri arasında 3zellikle fermente s3t 3r3nlerinden izole edilen *L. acidophilus* suşunun salgıladığı sinyal molek3l3n3n *Clostridium difficile* gelişimini engellediği ve toksin 3retimini de durdurduğu belirtilmektedir.

Gıda sanayiinde 3zellikle Akdeniz 3lkelerinde 3nemli bir kaynak olan zeytinin hasat edildikten sonra 3n işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir. Hasat sonrasında zeytine acı tat veren oleuropeinin meyveden uzaklaştırılması ve 3r3n3n yenilebilir hale getirilmesi için bazı 3n işlemler yapılmaktadır. Alkali oksidasyonu, salamurada bekletme gibi işlemler sayesinde sofralık zeytinler t3ketime sunulmaktadır. Meyvenin olgunlaşma aşamasına bağlı olarak yağ, karbonhidrat ve oleuropein miktarlarının oranları değişkenlik g3sterebilmektedir. 3n işlemler esnasında, meyvenin doğal florasında bulunan LAB ve bazı maya suşları, zeytin ve salamuranın birleşimi sayesinde uygun bir gelişme ortamı bulmakta ve yeterli besin maddesi de salamuraya geçmektedir. Ortamda hakim duruma geçen LAB suşları ve mayalar sayesinde fermentasyon gerçekleşmekte ve zeytinin kendine 3zg3 tat ve aroma kazanması sağlanmaktadır. 3zellikle LAB suşlarının zeytindeki mezokarp tabakasına tutunarak biyofilm oluşturması sayesinde hasat sırasında ortamda bulunan patojen mikroorganizmalar, LAB suşları ile

yarışamamakta ve fermentasyon esnasında da tamamen inhibe olmaktadır (Berlanga ve Guerrero 2016).

Laktik asit bakterileri özellikle fermente gıdaların üretiminde kullanılan starter kültür olarak gıda endüstrisinde ön planda olup, metabolitlerinin doğal gıda koruyucuları oldukları bilinmektedir. Ayrıca patojenlerin gıda ürünlerinde gelişip, insan sağlığını tehdit etme riskleri bulunması nedeni ile ortamda LAB suşlarının da bulunması patojenlerin zararlı etkilerini azaltabilmekte ya da tamamen durdurabilmektedir. Biyofilm yapısı, mikroorganizmayı özellikle stres koşullarına, olumsuz çevre şartlarına daha dayanıklı hale getirmektedir. Planktonik hücrelerin ise olumsuz koşullardan daha kolay etkilendikleri bilinmektedir. Bu durumda LAB suşlarının daha dirençli hale gelebilmeleri açısından biyofilm oluşturabilmeleri, gıda sanayiinde istenilen bir özellik haline gelmektedir (Jalilsood ve ark. 2015, Salas-Jara ve ark. 2016).

LAB suşlarının ürettiği EPS' ler homo (HoPS) ve heteropolisakkaritler (HePS) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Her iki grubun da gıda endüstrisinde kullanım alanları bulunmaktadır. Bunlardan α -D-glukan, β -D-glukan ve β -D-fruktanlar HoPS' lerden bazıları olup, özellikle gıda endüstrisinde reolojik-tekstürel özelliklerin düzenlenmesi için hidrokolloidlerin yerine kullanılmaktadır. HoPS' ler ayrıca donmuş gıdaların stabilizasyonu amacı ile kullanılmaktadır. Donmuş et ve balık gibi ürünlerin ve ayrıca peynir çeşitlerinin üzerinin HoPS' ler ile film şeklinde kaplanması sonucunda ürünler oksidasyon ve diğer kimyasal reaksiyonlardan korunmaktadır. Ksantan gibi biyopolimerler ise bakteriler tarafından üretilebilen ve kıvam artırıcı olarak gıdalarda kullanım alanı bulan HePS' lerden bazıları olarak bilinmektedir. Bu nedenle LAB suşlarında EPS üretimi ve biyofilm oluşumu, gıdaların endüstriyel olarak stabilizasyonunda da rol oynamaktadır. Aynı zamanda biyofilm üretebilen LAB suşları bağırsak mukozasına tutunma ve kolonize olabilme özelliğine de sahip olabilmekte ve bu suşlardan probiyotik gıda üretiminde de faydalanılabilmektedir (Sanlibaba ve Çakmak 2016, Bassi ve ark. 2017, Zarour ve ark. 2017).

Abdellah ve ark. (2015) yaptıkları çalışma sonuçlarına göre probiyotik olduğu bilinen bazı LAB suşlarının biyofilm oluşturma kabiliyetinin de olduğunu belirtmektedir. Ayrıca yaptıkları çalışmada deve sütünden izole edilen *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *E. feacium* ve *P. acidilactici* suşlarının biyofilm oluşturma kinetiklerinin birbirleri ile aynı olduğunu, ancak ürettikleri EPS miktarlarının birbirlerinden farklılık gösterdiği rapor edilmiştir. Bu nedenle araştırma sonucunda, EPS üretimi ile biyofilm oluşturma kapasitesi arasında bir korelasyonun tespit edilemediği belirtilmektedir.

Gıda endüstrisinde, patojen mikroorganizmalar ile mücadelede ve gıdaların raf ömrünün uzatılabilmesi açısından doğal gıda koruyucuları olarak görev yapan LAB türlerinin biyofilm oluşturabilen suşları seçilerek, özellikle fermente gıdalarda starter olarak kullanımının uygun olabileceği düşünülmektedir. Biyofilm oluşturan türlerin, ortam koşullarına daha hızlı adapte olabileceği ve aktif QS mekanizması sayesinde istenmeyen mikroorganizmaları daha kolay ve hızlı inhibe edebileceği ve bu sayede son ürünü daha uzun süre koruyabileceği düşünülmektedir. Ayrıca biyofilm oluşturma kabiliyetleri nedeni ile yüzeylere kolaylıkla tutunabildikleri bilinmektedir. Bu nedenle sindirim sistemi boyunca da hızlı kolonize olabilecekleri göz önünde bulundurulduğunda, probiyotik özellik gösterme potansiyellerinin de söz konusu olabileceği düşünülmektedir.

2.5. Laktik Asit Bakterilerinde Antibiyotik Direnci

Mikroorganizmaların endüstride güvenli olarak kullanılabilmeleri açısından her bir suşun antibiyotik dirençliliklerinin araştırılması gerekmektedir. Antibiyotik direnç mekanizması; mikroorganizma türleri, antibiyotik cinsi, insan ve çevrenin etkileşimi ile şekillenen karmaşık bir olgudur. Mikroorganizmaların probiyotik özelliklerinin araştırılmasında antibiyotik direnci aranan bir özellik olmasına rağmen, patojen mikroorganizmalara genlerle aktarılabilme riskinin olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle LAB suşlarında doğal (fenotipik) ya da sonradan kazanılmış antibiyotik direncinin göz önüne alınması gerekmektedir. Bağırsak mukozasında kolonizasyonun sağlanması açısından antibiyotik direnci probiyotik suşlarda avantaj sağlayan bir özellik olarak

bilinmektedir. Bunun nedeni ise dirençli LAB suşlarının antibiyotik varlığında bile patojenlerle yarışabilme gücüne sahip olması ve dolayısı ile mikrobiyotada dominant hale gelerek, ortamda hızla çoğalabilmesidir. Enfeksiyon tedavisinde kullanılan antibiyotikler, genellikle bağırsak mukozasında kolonize olmuş LAB suşlarının inhibisyonuna neden olmakta ve bağırsak yüzeyi patojenlerin çoğalmasına uygun hale gelebilmektedir. Bu nedenle antibiyotik direnci LAB suşlarından özellikle probiyotik olanlarda aranan bir özellik haline gelmiştir (Gerritsen ve ark. 2011, Gad ve ark. 2014)

LAB türlerinde doğal (fenotipik) antibiyotik direncin kalıtsal karakterlerinden kaynaklandığı ve horizontal olarak bir başka bakteriye aktarılamadığı bilinmektedir. Antibiyotik ajanın hedef aldığı yapının mikroorganizmada bulunmaması ya da mikrobiyel hücrenin etken maddeden etkilenmemesi gibi nedenler ile doğal direnç oluşumu gözlenmektedir. Bazı dirençli bakterilerde antibiyotiklerin bağlandığı hedef bölge değişime uğratarak, bakterinin zarar görmesi engellenebilmektedir. Antibiyotikler genellikle bakteri yüzeyindeki protein bölgelere bağlanarak inhibisyon gerçekleştirmektedirler. Bazı direnç mekanizmalarında antibiyotiğin hedef metabolik yolunda değişim ve modifikasyon gerçekleşerek, fenotipik direnç oluşumu gözlemlenmekte ve bu sayede antibiyotiğin inhibisyon etkisi de yok edilebilmektedir. Ayrıca, antibiyotiğin bakteri yüzeyindeki geçirgenliği azaltılarak ya da aktif pompa özelliği ile antibiyotik bakteriden uzaklaştırılarak ve antibiyotik konsantrasyonu düşürülerek bakterinin zarar görmesi engellenmektedir. (Meral ve Korukluoğlu 2014, Demirel ve Gürler 2016).

Doğal direnç genlerinin varlığı özellikle LAB suşlarında istenen bir özellik iken, sonradan kazanılmış direnç risk teşkil edebilmektedir. Doğal antibiyotik direnci, hem antibiyotik tedavilerinde LAB suşlarının gastro intestinal sistemde inhibe olmadan gelişmelerine izin vermekte, hem de patojen mikroorganizmalara genetik olarak aktarılamamaktadır. Ancak sonradan kazanılan direnç mekanizmaları, başka mikroorganizmalardan horizontal olarak gen aktarımı ile elde edilen bir özellik olarak bilinmektedir. Bakteri genom mutasyonunda veya direnç oluşumunu kodlayan genlerin oluşması durumunda kazanılmış dirençten söz edilmektedir. Mikroorganizmalarda

horizontal gen aktarımı bakteriyofajlar ile ya da konjugasyon yolu ile meydana gelmektedir. Plazmidler LAB türleri arasından en çok *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* ve *Pediococcus* cinslerine ait suşlarda gözlemlenmektedir. Özellikle sindirim sisteminde LAB suşları ile patojen bakteriler arasında gen aktarımının gerçekleşebildiği bilinmektedir. Bu nedenle, patojen bakteriler zamanla birçok antibiyotiğe dirençli hale gelerek, tedavisi zor olan veya mümkün olmayan salgınlara yol açabilmektedir. Gen aktarımının gerçekleşmesi için uygun olan ortamlardan biri ise gıda ürünleri olarak bilinmektedir. Özellikle vankomisine dirençli *Enterococcus* türlerinin gıda yolu ile insanlara geçerek, bağırsak mukozasından izole edildiği yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Kushiro 2009, Demirel ve Gürler 2016). Ayrıca LAB suşlarında sonradan kazanılmış antibiyotik direnç genlerinin Gram negatif bakterilere de aktarılabilirdiği belirtilmektedir. Ancak özellikle fermente gıdaların üretiminde kullanılan birçok LAB suşunun (*L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* vb.) vankomisin, ampicilin gibi bazı antibiyotiklere karşı doğal dirence sahip olduğu da bilinmektedir (Mathur ve Singh 2005, Tatlı 2009).

Bir başka direnç mekanizması ise “çapraz direnç” olarak adlandırılmakta olup, benzer mekanizma ile bakterilere etki eden farklı antibiyotik türlerine karşı gösterilen direnç olarak tanımlanmaktadır. Bu durumun genel olarak, etki mekanizmaları ve yapıları aynı olan eritromisin, neomisin, kanamisin vb. antibiyotiklerde gözlemlendiği belirtilmektedir (Tatlı 2009).

Birçok *Lactobacillus* türünün vankomisin ve streptomisine karşı doğal dirençli olduğu bilinmektedir. Ayrıca çoğu *Leuconostoc* türünün de vankomisine karşı doğal dirence sahip olduğu belirtilmektedir (Mathur ve Singh 2005).

Gıda endüstrisinde kullanılacak olan LAB suşlarının antibiyotik dirençliliklerinin moleküler düzeyde incelenerek, kazanılmış dirence sahip olan suşların starter olarak kullanılmaması gerektiği düşünülmektedir. Ancak, doğal direncin genetik olarak tespitinin yapılması sonucunda suşların gıda endüstrisinde kullanılmasının, yeni ürün

geliştirilmesinde ve fonksiyonel ürünlerin üretiminde önemli rol oynayacağı ifade edilmektedir.

2.6. Laktik Asit Bakterilerinde Biyofilm Oluşumu ile Antibiyotik Direnci Arasındaki İlişki

Laktik asit bakterilerinde EPS üretimi ile biyofilm oluşumu arasında korelasyon olduğu bazı çalışmalar ile belirlenmiş olsa da, bazı LAB suşlarında EPS üretim miktarı ile biyofilm oluşturma düzeyi benzer nitelikte bulunmamıştır (Patel ve ark. 2012, Abdellah ve ark. 2015). Ancak hem EPS üretiminin, hem de biyofilm tabakasının LAB suşlarını daha dayanıklı hale getirdiği konusunda araştırmacılar benzer sonuçlara ulaşmışlardır. Bunun nedeni ise biyofilm tabakasında yer alan bileşenler arasında EPS' nin de bulunması ve mikroorganizmaları bir arada tutmada önemli rol oynamasıdır. EPS' lerin mikroorganizmalar tarafından katabolize edilemediği ve dolayısıyla enerji kaynağı olarak kullanılmadığı bilinmektedir (Barçın-Öztürk ve ark. 2008). Ancak EPS' lerin, buldukları ortamda koruyuculuk görevi yaptığı ve mikroorganizma kolonizasyonu ile yüzeye tutunma kabiliyetinin de artmasını sağladığı bildirilmektedir. Enfeksiyon durumlarında kullanılan antibiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasını bozduğu ve zararlı mikroorganizmalar tarafından rekabetçi biyotanın yeniden oluşturulduğu bildirilmektedir. Probiyotik LAB suşlarının antibiyotiklere karşı patojen mikroorganizmalara kıyasla daha duyarlı oldukları bilinmektedir. Bu nedenle bağırsak doğal mikrobiyotasının bozulmaması ve epitel yüzey üzerinde LAB suşlarının zarar görmeden hâkimiyetlerine devam edebilmesi için antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç mekanizmalarının önemli olduğu düşünülmektedir. Biyofilm içindeki mikroorganizmaların, besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoz ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerden daha dirençli oldukları bildirilmektedir (Barçın-Öztürk ve ark. 2008, Gerritsen ve ark. 2011, Gad ve ark. 2014).

Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan EPS' lerin savunmada önemli rol oynayan moleküller olduğu bilinmektedir. EPS'lerin bakteriyi diğer çekim alanlarından (elektrik

çekimi) uzaklaştırarak, farklı hücrelerin fagositozundan ve antimikrobiyel etkisinden de koruduğu bildirilmektedir. Ortamda bulunan diğer mikroorganizmaların salgılamış olduğu sinyal moleküllerini alarak, tehlikede olduğunu algılayan bakteri, savunma mekanizmasını ön plana çıkartmakta ve dolayısı ile biyofilm oluşturmaktadır. Biyofilm oluşumu, bakterinin kendini koruma altına alması olarak tanımlanmaktadır (Barçın-Öztürk ve ark. 2008). Olumsuz koşulların ortaya çıkması halinde, QS mekanizmasının aktif hale geçmesi sağlanmaktadır. Savunma haline geçen bakterinin biyofilm üreterek metal iyonlarına ve bakteriyofaja karşı da direnç gösterebildiği belirtilmektedir (Milci ve Yangın 2005, Ciszek-Lenda 2011).

LAB kültürlerinin planktonik halde iken, sahip olmadıkları özelliklerin biyofilm oluşumu ile ortaya çıkması ile antibiyotik benzeri maddeler üretebildikleri ve ayrıca antimikrobiyel ajanlara karşı da direnç kazandıkları rapor edilmiştir (Jones ve Versalovic 2009, Guinta 2010, İçten 2013, Sudağıdan ve Aydın 2013, Zhang ve ark. 2013, Khosravi ve ark. 2014).

Antimikrobiyel ajanlara gösterilen direncin ve bağırsak mukozasına tutunma kabiliyetinin biyofilm oluşumu ile desteklenmesinden dolayı patojen mikroorganizmalarda biyofilm engellenilmeye çalışılırken, sağlığa faydalı mikroorganizmalarda ise desteklenebilmektedir. Yapılan bir çalışmada Kore' ye özgü fermente soya hamurundan izole edilen LAB suşlarının *P. acidilactici* SDL 1402, *P. acidilactici* SDL 1405, *P. acidilactici* SDL 1406, *W. cibaria* SCCB 2306, *S. thermophilus* SCML 337, *S. thermophilus* SCML 300 ve *E. faecium* SC 54 olduğu moleküler yöntemler ile tanılanmış ve probiyotik özellikleri incelenmiştir. Suşların tamamının penisilin, tetrasiklin, kanamisin, gentamisin, eritromisin, klindamisin ve kloramfenikole karşı duyarlı oldukları, ancak streptomisin ve ampisiline karşı dirençli oldukları belirtilmektedir. Ayrıca agregasyon kabiliyetlerinin *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* ATCC 15313 suşlarına göre daha iyi olduğu belirtilmektedir (Oh ve ark. 2018).

Tez kapsamında farklı gıdalardan izole edilerek biyokimyasal ve moleküler tekniklerle tanımlanan LAB suşlarının biyofilm oluşturma yetenekleri ile antibiyotik dirençleri incelenmiş ve biyofilm oluşumunun antibiyotik direnci üzerine etkisi anlaşılmaya çalışılmıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma örnekleri

Laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve özelliklerinin belirlenmesi amacı ile Bursa ilindeki farklı pazarlardan temin edilen toplam 17 örnek [çiğ süt (3 adet), köy peyniri (4 adet), yeşil ve siyah ham zeytin (10 adet)] toplanmış, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na uygun koşullarda getirilerek numaralandırılmış ve etiketlenmiştir (Çizelge 3.1). Örnekler açıkta tüketiciye satıldığı ambalaj ile temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Örneklere ilişkin bilgiler

	Örnek kodu	Örnek alım tarihi	Örnek tipi	Örnek miktarı
Bitkisel ürünler	YZA-1	12.10.2014	İşlenmemiş yeşil zeytin- Aydın	1000 g
	YZA-2	12.10.2014	İşlenmemiş yeşil zeytin- Aydın	1000 g
	YZA-3	12.10.2014	İşlenmemiş yeşil zeytin- Aydın	1000 g
	YSZG-1	23.11.2014	İşlenmemiş yeşil-siyah zeytin- Gemlik	500 g
	YZG-1	13.10.2014	İşlenmemiş yeşil zeytin- Gemlik	500 g
	YZG-2	15.10.2014	İşlenmemiş yeşil zeytin- Gemlik	500 g
	YZG-3	25.10.2015	İşlenmemiş yeşil zeytin- Gemlik	500 g
	YZG-4	25.10.2015	İşlenmemiş yeşil zeytin- Gemlik	500 g
	YSZİ-1	17.11.2015	İşlenmemiş yeşil-siyah zeytin- İznik	1000 g
	YSZİ-2	17.11.2015	İşlenmemiş yeşil-siyah zeytin- İznik	1000 g

Çizelge 3.1. Örneklerle ilişkin bilgiler (devam)

	Örnek kodu	Örnek alım tarihi	Örnek tipi	Örnek miktarı
Süt ve ürünleri	ÇS-1	15.05.2014	Çiğ süt	100 mL
	ÇS-2	22.05.2014	Çiğ süt	100 mL
	ÇS-3	09.08.2015	Çiğ süt	100 mL
	KP-1	07.08.2015	Köy peyniri	700 g
	KP-2	14.09.2015	Köy peyniri	550 g
	KP-3	16.09.2015	Köy peyniri	550 g
	KP-4	16.09.2015	Köy peyniri	700 g

3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

De man-rogosa-sharpe (MRS) broth ve agar (Merck)

MRS broth granül halde bulunan dehidre besiyerinden 52,2 g/L, MRS agar ise granül halde bulunan dehidre besiyerinden 66,2 g/L olacak şekilde tartılarak, damıtık su içinde homojen şekilde eritilmiş ve 121°C’de 15 d otoklavlanarak, kullanıma hazır hale getirilmiştir. MRS broth laktik asit bakterilerinin aktifleştirilmesinde ve diğer analizlerde, MRS agar ise laktik asit bakterilerinin saflaştırılması, mikrobiyel sayım ve antimikrobiyel direnç analizlerinde kullanılmıştır.

%30’ luk H₂O₂ çözeltisi (Sigma-Aldrich)

Konsantrasyonu hazır olan çözelti gıda örneklerinden izole edilen ve saflaştırılan bakterilerin katalaz reaksiyonlarını gözlemlemek amacı ile kullanılmıştır (Kaban ve Kaya 2008, Bağder-Elmacı ve ark. 2015).

10X tris borat EDTA (TBE) tamponu (Merck)

TBE tamponu kullanıma hazır olarak alınmış olup, jel elektroforezi amacı ile kullanılmıştır (Aymerich ve ark. 2003).

%0,7' lik agaroz jel (Bioshop)

0,84 g agaroz (Bioshop) tartılarak 120 mL 1X TBE (Merck) tamponu eklenmiştir. Mikrodalga fırında çözüldürüldükten sonra son derişim 0,5 µg/mL olacak şekilde Etidyum Bromür (EtBr) (Applichem) eklenip hafifçe çalkalanarak karıştırılmış ve elektroforez tankına dökülmüştür (Aymerich ve ark. 2003).

6X jel yükleme boyası (Thermo Fisher Scientific)

Agaroz jel elektroforezinde DNA ve PZR ürünlerinin jele yüklenmesi ve izlenmesi amacı ile kullanılmıştır (Lee ve ark. 2012).

Etidyum bromür (EtBr) (Applichem)

10 mg/mL distile su içinde çözüldürülerek, hazırlanan çözelti agaroz jel içerisinde son derişimi 0,5 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. EtBr, elektroforez sonrası DNA bantlarının UV ışık altında sarı/turuncu renk vermesini sağlamaktadır (Aymerich ve ark. 2003).

DNA merdiveni (SolisBioDyne)

Farklı boylarda hazırlanmış DNA parçalarını içeren bir çözelti olup, jeldeki görüntü ile karşılaştırma yapılarak, analiz edilen DNA örneklerinden elde edilen bantların yaklaşık boy ve miktarlarının belirlenmesinde kullanılmıştır (Aymerich ve ark. 2003).

Liziz solüsyonu

Liziz solüsyonu (20 mM Tris-HCl (Merck), pH:8,3; 50 mM KCl (Merck); 1,5 mM MgCl₂ (Merck) ; % 0,5 Tween 20 (Applichem); % 0,45 Triton X-100 (Sigma), % 0,01 jelatin (Bioshop)) Caro ve ark. (2015)' nin kullandığı yöntemine göre 5 mL'lik stok çözelti halinde hazırlanmış ve DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

Proteinaz-K (Calbiochem)

Proteinaz-K, DNA izolasyonunda, liziz solüsyonu ile birlikte kullanılmıştır (Caro ve ark. 2015).

Fenol:kloroform:isoamil alkol (FKI); pH:8,0 çözeltisi (Bioshop)

Yüksek ağırlıkta genomik DNA elde edilebilmesi için pH'sı 8,0 olan Tris EDTA tamponu ile doyurulmuş FKI çözeltisi kullanılmıştır (Caro ve ark. 2015).

3.2. Yöntem

3.2.1. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu

Bursa ilindeki pazarlardan toplanan ham zeytin meyveleri (İzmit ve Gemlik) ile köy peyniri numuneleri 10 g olacak şekilde tartılarak 90 mL %0,85 NaCl içeren fizyolojik tuzlu su içinde homojenize edilmiştir. Çiğ süt örneğinden ise seri dilüsyon yapılmıştır. Her örnekten MRS agara dökme yöntemi ile ekim yapılmış ve 28°C'de 48 saatlik inkübasyon sonunda farklı morfolojik yapıya sahip koloniler steril öze yardımı ile alınarak MRS agara sürme yöntemi ile ekilmiştir. Gelişen kolonilerin steril öze yardımı ile alınarak MRS agara sürülmesi işlemi 3 defa tekrarlanarak saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir (Bağder-Elmacı ve ark. 2015).

3.2.2. Laktik asit bakterilerinin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

Saflaştırılan kolonilerden basit preparat hazırlanarak mikroskopta incelenmiştir. Mikroskobik incelemede, koloninin saflığı kontrol edilmiş ve morfolojik özellikleri hakkında genel bilgi kayıt altına alınmıştır.

Gram boyama

Saf kültürler MRS broth besiyerine aşılansarak 28-30°C'de 18-24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 18-24 saatlik taze kültürlerin Gram özelliklerinin belirlenmesi için, Kristal viyole (Merck) ile Lugol çözeltisi (Merck) kullanılmıştır. İzolatların Gram boyanma özellikleri belirlenmiş ve Gram pozitif olan izolatlar seçilmiştir (Goh ve Philip 2015).

3.2.3. Laktik asit bakterilerinin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Katalaz testi

Gram pozitif izolatlara ve katalaz testi yapılmıştır. Katalaz testinde %30' luk H₂O₂ kullanılmıştır. Saf kültürler lam üzerine steril koşullarda alınarak, üzerlerine %30' luk H₂O₂ çözeltisi damlatılmış ve gaz kabarcıkları oluşturan izolatlar katalaz pozitif olarak değerlendirilirken, gaz kabarcığı oluşturmayan izolatlar katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Villani ve ark. 1997).

Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenen izolatlardan Gram pozitif ve katalaz negatif olan izolatlar seçilmiş ve tanılama işlemleri için %30 oranında gliserin içeren sıvı besiyeri içinde -80°C' de saklanmıştır (Shukla ve Goyal 2011).

3.2.4. Laktik asit bakterilerinin genotipik yöntem ile tanılanması

İzolatların elde edildikleri köken ve koloni morfolojileri ile mikroskopta gözlemlenen hücre morfolojileri göz önüne alınarak, farklı cins ve türe ait olabilecekleri tahmin edilen izolatlar seçilerek dizi analizleri yapılmıştır (Adesulu-Dahunsi ve ark. 2017).

Laktik asit bakterilerinden DNA izolasyonu

DNA izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) Caro ve ark. (2015) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi öncesinde -80°C'de

depolanan izolatlar MRS broth içeren 2 mL'lik cryo tüplerde aktifleştirilmiştir. 18-24 saatlik aktif kültürlerden 1'er mL alınarak, 2 paralelli olacak şekilde tüplere aktarılmış ve 12,000 g hızında 3 d santrifüj (Spectrafuge™ 24D) edilmiştir. Supernatant uzaklaştırılarak, 100'er µL steril ve nükleaz içermeyen saf su ile pelet yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkanan peletler vorteksle karıştırıldıktan sonra yeniden 12,000 g'de 3 d santrifüj edilmiş ve yıkama suyu pipetlenerek uzaklaştırılmıştır.

Liziz solüsyonu (20 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; %0,5 Tween 20; %0,45 Triton X-100; %0,01 jelatin) stok çözelti olarak hazırlanmıştır. Peletlerin üzerine 100 µL liziz solüsyonu ve 5 µL Proteinaz-K eklenmiştir. Tüpler, blok ısıtıcı (Labnet Accublock, ABD) içinde Proteinaz-K'nın optimum aktivite gösterdiği 55°C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda Proteinaz-K'nın inaktive edilmesi için tüpler 98°C'de 10 d bekletilmiş ve 12,000 g'de 1 d santrifüj edilerek, DNA içeren supernatant (~100µL) başka bir Eppendorf tüpe alınmıştır. Supernatant miktarı kadar FKI pH:8,0 çözeltisi de oda sıcaklığında eklenmiştir. FKI çözeltisinin özellikle solunum yolları üzerine toksik etkilerinden dolayı, supernatant içeren tüplere ilavesi esnasında çeker ocak kullanılmıştır. Beyaz renkli emülsiyon oluşuncaya kadar vorteks ile karıştırılmıştır. DNA'nın kırılmasını engellemek için, tüplerin çok kısa süreli karıştırılmasına özen gösterilmiştir. Yüksek ağırlıkta DNA gerektiğinde vorteks ile karıştırma yerine, tüpler hafifçe çevrilerek, işlem gerçekleştirilebilmektedir. 12,000 g'de 5 d santrifüjlendikten sonra üst fazda DNA'nın bulunduğu su, alt fazda organik çözeltiler, ara fazda ise opak disk şeklinde denatüre proteinler ve hücre parçaları bulunmaktadır. Üst faz, ara faza dokunulmadan pipetle başka tüpe alınmış, organik faz ve ara faz atılmıştır. Yaklaşık olarak 25µL hacminde elde edilen üst fazın üzerine aynı miktarda kloroform eklenmiştir. Yeniden 12,000 g' de 5 d santrifüj edilerek, üst faz alınmıştır. Bu sayede alt fazda bulunan fenol kalıntısı da uzaklaştırılmıştır. En son tüpte bulunan sıvının hacminin 3 katı hacminde, soğuk %100 etanol eklenmiş ve -20°C' de bir gece bekletilmiştir. -20 ya da -80°C' de bir gece bekletme ile DNA miktarının yoğunlaşması sağlanabilmektedir. DNA içeren tüpler -20°C' den alınarak en yüksek devirde 15 d santrifüjlenmiş ve etanol dökülerek, uzaklaştırılmıştır. Tuzların da uzaklaştırılması için 30 µL %70' lik etanol çözeltisi tüplere eklendikten sonra 5 d

boyunca en yüksek devirde santrifüjlenmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Tüpler bir peçete üzerine ters çevrilerek dizilmiş ve tamamen kuruyana kadar beklenmiştir. Tamamen kuruyan DNA' ların üzerine 30 µL steril, nükleaz içermeyen saf su eklenmiştir ve kullanılıncaya kadar +4°C' de saklanmıştır (Caro ve ark. 2015).

DNA miktar ve kalitesinin belirlenmesi

DNA ve diğer nükleik asitler, sıvı çözeltiler içinde ultraviyole ışığını absorbe etmektedirler. Absorbans değerlerinin ölçülmesi ile DNA miktar ve kalitesi hakkında bilgi veren grafikler elde edilebilmektedir. Nükleik asitler 260 nm dalga boyundaki ışığı; karbonhidrat, peptit, fenol ve aromatik bileşen kalıntıları ise 230 nm dalga boyundaki ışığı absorbe etmektedirler. Proteinler ise 280 nm dalga boyundaki ışığı absorbe etmektedirler. Bu nedenle ekstrakte edilen DNA'nın saflığını ve miktarını kontrol edebilmek için 230, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçülmüştür (Adesulu-Dahunsi ve ark. 2017). Bu ölçümler Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı' nda bulunan Nano Spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir. DNA çözeltisinden 1 µL NanoDrop cihazının gözüne damlatılarak 230, 260 ve 280 nm'de absorbans ölçümleri ve oluşturdukları grafikler görüntülenmiştir. Ölçüm sonuçlarına göre DNA konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Olson ve Morrow 2012, Nayak ve ark. 2013, Adesulu-Dahunsi ve ark. 2017);

“DNA konsantrasyonu (µg/mL) = $A_{260} \times 50 \mu\text{g/mL} \times \text{seyreltme faktörü}$ ”

İzole edilen DNA saflığı yeterli ise A_{260}/A_{280} oranı 1,6-2,0 arasında ve A_{260}/A_{230} oranı 2,0-2,2 arasında olmalıdır.

$A_{260}/A_{280} < 1,6$ ise protein kirliliği,

$A_{260}/A_{280} > 2,0$ ise kloroform/fenol kirliliği,

$A_{260}/A_{230} < 2,0$ ise karbonhidrat, peptit, fenol ve aromatik bileşik kirliliği şeklinde yorumlanmıştır.

Agaroz jelin hazırlanması

Laboratuvarında kullanılan 120 mL hacmindeki elektroforez tankına dökmek için agaroz jel hazırlanmıştır. Agaroz jel hazırlanırken hem mikroorganizmalardan ekstrakte edilen DNA' ların (nano-drop ölçüm sonuçları uygun olanlar), hem de polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi için % 0,7 (w/v) oranında agaroz 250 mL'lik erlen içine tartılarak eklenmiş ve 1xTBE tamponu ile 120 mL' ye tamamlanmıştır. Çalkalanarak karışım sağlanmış ve sıvının seviyesi erlen üzerinde işaretlenmiştir. Mikrodalga fırın içinde agaroz tamamen homojen olarak dağılıncaya kadar ısıtılmış ve buharlaşma olmuş ise işaretlenen seviyeye kadar distile su ilave edilmiştir. Çözeltinin biraz soğuması beklenmiş ve 60°C civarına gelince 0,5 µg/mL etidyum bromür (EtBr) eklenerek hazırlanan jel elektroforez tankına dökülmüştür. Kullanılacak tarak jel içine yerleştirildikten sonra jelin katılaşması beklenmiş ve tarak jelden çıkarılmıştır. Katılaştıran jelin yüzeyini örtecek şekilde tampon dökülerek, jelin kuruması engellenmiştir (Aymerich ve ark. 2003).

Laktik asit bakterilerinin 16S rRNA yöntemi ile tanınması

Laktik asit bakterilerinden genomik DNA ekstrakte ve izole edildikten sonra 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') ve 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') ileri ve geri primerleri ile bakterilerin evrensel primerler ile uyum sağlayan genetik bölgelerinin çoğaltılarak tanınması amaçlanmıştır. İleri ve geri primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılan bölge yaklaşık olarak 1500 bp olarak belirlenmiştir (Doi ve ark. 2013, Bağder-Elmacı ve ark. 2015).

Stok PZR karışımı hazırlanmış ve tüplere dağıtılmıştır. Reaktiflerin hacimleri ve her bir tüpte 25 µL olacak şekilde hazırlanan stok çözeltinin son konsantrasyonu Çizelge 3.2'de belirtilmektedir.

Çizelge 3.2. PZR için hazırlanan stok çözeltide bulunan reaktifler ve konsantrasyonları (Taq DNA Polymerase, New England, Biolabs Protokol, 2017)

Reaktifler (Konsantrasyon)	Hacim (1 tüp için)	Son konsantrasyon
ThermoPol Reaksiyon Tamponu - PZR Tamponu (10x + MgCl ₂)	2,5 µL	1x
dNTP (5mM)	1 µL	0,2 mM
Primer F (5µM)	1 µL	0,2 µM
Primer R (5µM)	1 µL	0,2 µM
Taq (5U/µL)	0,25 µL	1 U
DNA (20-200 ng/ µL)	1 µL	25-70 ng
Nükleaz içermeyen steril saf su	18,25 µL	-
TOPLAM	25 µL	-

PZR koşulları Caro ve ark. (2015)'nin kullandığı yöntem biraz modifiye edilerek, kullanılan primer özellikleri ve Taq polimeraz enziminde geçerli olan protokole göre oluşturulmuştur. Her bir bakteri örneği için PZR tüpleri 2 paralelli olacak şekilde hazırlanmış ve agaroz jelde aynı anda yürütülecek örnek sayısı ve paralelleri dikkate alınarak master miks miktarı hesaplanmıştır. Master miks tüpü buz içinde hazırlanmış (Taq polimeraz en son eklenmiştir) ve 24' er µL olacak şekilde tüplere dağıtılmıştır. Her bir bakteri örneğine ait DNA' ların nano-drop ölçümleri PZR öncesi tamamlanmıştır, PZR tüplerinde son hacim 25 µL olarak belirlendiği için her bir DNA örneğinden kendi tüpüne aktarılmak üzere 1' er µL alınarak, 2 paralelli olacak şekilde tüplere dağıtılmış ve toplam DNA konsantrasyonları 20-200 ng arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Çalışmada kullanılan PZR koşulları Çizelge 3.3'te belirtildiği gibidir.

Çizelge 3.3. Laktik asit bakterileri için uygulanan PZR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Zaman
Ön denatürasyon	95°C	5 d
35 döngü	95°C	30 s
	50°C	1,5 d
	68°C	1,5 d
	68°C	10 d
Primer uzaması	68°C	10 d
Bekletme	10°C	∞

PZR bittikten sonra tüpler cihazdan çıkarılmış, her birine 5' er μ L yükleme boyası eklenmiş, karıştırılmış ve agaroz jeldeki kuyucuklara yüklenerek 90 voltta, 1 saat yürütülmüştür. Baz büyüklüğü tespiti için 1 kb'lık marker (SolisBioDyne) kullanılmıştır. Jelde yürütme sonucunda oluşan bantlar, UV ışık altında görüntüleme cihazında (Illuminyx-Transilluminators) görüntülenmiş ve gözlemlenen bantlar kesilmiştir. Kesilen bantlar, bant temizleme işlemi için DNaz ve RNaz içermeyen Eppendorf tüpler içine alınmıştır. Bant gözlemlenemeyen örneklerin PZR master miks karışımlarındaki miktarları değiştirilmiştir. DNA örneklerinden 2 ve 5 μ L konularak, master miks içindeki nükleaz içermeyen steril saf su miktarı aynı oranda azaltılmış ve tüplerdeki son miktar yine 25 μ L olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu durumda kullanılan DNA miktarı arttığı için PZR çalışmış ve agaroz jelde yürütme sonucunda, bant oluşumları gözlemlenmiştir. Kesilen bantlar, bant temizleme kiti (NucleoSpin) ile temizlenerek sekans analizi için REFGEN- Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji (Ankara) ve IONTEK (İstanbul) firmalarına gönderilmiştir. Sekans sonuçları gen bankası olan ve <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> adresindeki "Nucleotid BLAST" programı kullanılarak taranmıştır. Biyokimyasal analizler ile tanımlanan olası laktik asit bakterileri 16S rRNA dizilimi baz alınarak, 27F ve 1492R primerleri ile PZR gerçekleştirilmiş ve sekans sonuçları göz önüne alınarak, tür bazında tanımlanması da yapılabilmektedir.

3.2.5. Tanılanan laktik asit bakterilerinin biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi

Tanılanan izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri iki farklı yöntem ile belirlenmiştir. Her iki yönetime göre sonuçlar karşılaştırılmıştır.

“Tüp yöntemi” ile biyofilm oluşumunun incelenmesi

Tüp yöntemi ile biyofilm oluşumunun incelenmesinde Hassan ve ark. (2011)' nın çalışmalarındaki yöntem kullanılmıştır. Laktik asit bakterilerinin gelişmeleri için optimum koşullar ile bazı stres koşulları oluşturulmuş ve farklı gelişme ortamlarında biyofilm oluşturma düzeyleri incelenmiştir. 30 ve 37°C' de 24 ve 48 saatlik inkübasyon koşulları ile 4 ayrı deneme grubu oluşturulmuştur. Test mikroorganizmaları aktive edilmiş ve 10 mL steril MRS broth bulunan falkon tüplerine 18-24 saatlik kültürlerden 100'er µL aşılama yapılmıştır. Tüpler 30 ve 37°C' de 24 ve 48 saat süre ile aerobik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplerdeki besiyeri boşaltılmış, fosfat salin tamponu (pH:7,3) ile yıkanmış ve oda sıcaklığında ters şekilde kurumaya bırakılmıştır. Tüpler tamamen kuruyunca %0,1' lik kristal viyole ile 10 d boyunca boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Biyofilm tabakaya bağlanmayan fazla boya deiyonize su ile yıkanmış ve tüpler ters şekilde oda sıcaklığında yeniden kurumaya bırakılmıştır. Kurutmanın ardından tüplerin iç çeperlerinde ve tabanında görünür boyalı biyofilm tabakası var ise pozitif olarak değerlendirilmiş ve boyalı tabakanın yoğunluğuna göre “biyofilm üretmeyen, zayıf, orta ve güçlü biyofilm üreten bakteri suşları” şeklinde derecelendirme yapılmıştır.

“96 kuyucuklu plaka yöntemi” ile biyofilm oluşumunun incelenmesi

Laktik asit bakterilerinde biyofilm oluşumu Zhang ve ark. (2013)'nin uyguladığı spektroskopik yöntem olan 96 kuyucuklu plakalar ile belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan yöntem, 96-kuyucuklu plakalarda hücre yoğunluklarının ölçülmesi ve sonrasında %0,1' lik kristal viyole ile kuyucukların boyanması sonucunda

spektroskopik ölçümlerinin alınması ve hücre yoğunluğuna göre oluşan biyofilmin absorbans değerlerinin belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Bu yöntemde göre 18-24 saatlik taze kültür, steril MRS sıvı besiyeri ile 1:100 oranında seyreltilmiş ve toplamda 100 µL olacak şekilde mikropalakada bulunan kuyucuklara pipetlenmiştir. Negatif kontrol kuyucuklarına ise steril MRS sıvı besiyeri aktarılmıştır. Deneme grupları iki ayrı inkübasyon süresi ve sıcaklığı baz alınarak düzenlenmiş olup, her bir test organizmasının biyofilm oluşturma yeteneği üç paralelli olacak şekilde, 30 ve 37°C’ de 24 ve 48 saat süre ile aerobik koşullar altında belirlenmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda laktik asit bakterisi kültürleri kuyucuklarda gelişmiş ve toplam hücre yoğunlukları 630 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Ardından kuyucuklardaki besiyeri ve kültür boşaltılmış olup, kuyucuklardaki serbest halde bulunan bakteri hücrelerinin ortamdaki uzaklaştırılması için deiyonize su içerisine mikropalakalar 7-8 defa daldırılarak, yıkanma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminin ardından mikropalakalar 37°C’ lik inkübatörde 45 d boyunca ters şekilde kurumaya bırakılmıştır. Kuyucuklar tamamen kurduktan sonra, her bir kuyucuğa %0,1’ lik kristal viyole pipetlenerek biyofilm tabakasının 20 d boyunca oda sıcaklığında boyanması sağlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda serbest haldeki boya tamamen uzaklaşana kadar mikropalakalar deiyonize su içerisinde yıkanmış ve ardından 37°C’ de 45 d boyunca kurumaya bırakılmıştır. Kuyucuklar tamamen kurduktan sonra her bir kuyucuğa 100 µL %95’ lik etil alkol ilave edilmiş ve 30 d boyunca oda sıcaklığında inkübe edilerek, biyofilm tabakaya bağlanmış boyanın etil alkol içinde çözünmesi sağlanmıştır. Süre sonunda her bir kuyucuktaki “kristal viyole-etil alkol” çözeltisi, başka bir mikropalakaya aynı sıra ile aktararak, spektrofotometrede 492 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır.

Her bir suşun biyofilm oluşturma kapasitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$“B= A_{492} / A_{630}”$$

İzolaların biyofilm oluşturma kapasiteleri B skalasına göre sınıflandırılmıştır (Tahmourespour ve Kermanshahi 2011, Zhang ve ark. 2013).

$B < 0,1$ ise "biyofilm üretmeyen",
 $0,1 \leq B < 0,5$ ise "zayıf",
 $0,5 \leq B < 1,0$ ise "orta düzeyde",
 $B \geq 1,0$ ise "güçlü biyofilm üreten" olarak adlandırılmıştır.

3.2.6. Tanılanan laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi

İzolatların antibiyotik dirençlerinin belirlenmesinde Halkman (2005) ve Landeta ve ark. (2013)'nın kullandığı yöntem kullanılmış olup, tanılanmış laktik asit bakterilerinin 18-24 saatlik taze kültürlerinden MRS katı besiyerine yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır.

İzolatların belirli konsantrasyonlardaki bazı antibiyotiklere [ampisilin (25 μ g), streptomisin (25 μ g ve 300 μ g), vankomisin (30 μ g), tetrasiklin (50 μ g)] karşı dirençlerinin belirlenmesi için disk difüzyon yöntemi (Akoğlu 2006, Karankı 2013) uygulanmıştır. Antibiyotik emdirilmiş disklerin (6 mm) tamamı Oxoid firmasından temin edilmiştir.

Test mikroorganizması inoküle edilmiş agar üzerine steril koşullarda antibiyotik emdirilmiş diskler yerleştirilmiş ve aerobik koşullarda 30°C' de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda antibiyotik aktivitesine bağlı olarak, disk çevresinde oluşan zon çapları ölçülerek, mikroorganizmanın antibiyotik dirençliliği tespit edilmiştir. Deneme üç paralelli olacak şekilde yapılmıştır (Akoğlu 2006, Karankı 2013).

İnkübasyon sonunda antibiyotik disklerin çevresinde zon oluşumu gözlenmeyen suşlar, antibiyotiğe dirençli olarak kabul edilmiştir. Antibiyotik disk etrafında oluşan zon çapı büyüklüğüne göre suşların antibiyotiklere duyarlılıkları birbiri ile kıyaslanabilmiştir.

Çoklu antibiyotik direnci (MAR) indeksi

Suşların antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesinde MAR indeksi kullanılmıştır. Bu indeks, test organizmalarının dirençli olduğu antibiyotik sayısının toplam denenen antibiyotik sayısına oranı bulunarak, hesaplanmaktadır (Yalanca 2009, Alp ve Öner 2014).

“MAR indeksi = a / b”

a: Test organizmasının dirençli olduğu antibiyotik sayısı

b: Test edilen toplam antibiyotik sayısı

Denemede, streptomisin (25 ve 300µg), vankomisin (30µg), tetrasiklin (50µg) ve ampisilin (25µg) olmak üzere dört ayrı antibiyotik kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan iki ayrı dozdaki streptomisinin yüksek dozu (300µg), MAR indeksinin hesaplanmasında tercih edilmiştir. Çünkü yüksek doza dirençli olan suşların, aynı antibiyotiğin daha düşük dozlarına da dirençlilik göstereceği düşünülmektedir. Bu nedenle, direnç indeksinin belirlenmesi amacı ile denemede kullanılan farklı dozlardaki antibiyotiklerin yüksek dozlu olanı seçilerek, indeks çizelgesi oluşturulmuştur.

Çoklu antibiyotik direnci indeksinin 0,20’ den büyük çıkması durumunda, suşun yoğun antibiyotik kullanılan bir kaynaktan izole edildiği anlaşılmaktadır. Yoğun antibiyotik kullanımının olduğu ortamlardan izole edilen mikroorganizmalar, “yüksek riskli” mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Hesaplanan indeks değerinin 0,20’ ye eşit ya da altında bir değer olması ise elde edilen suşun nadiren antibiyotik kullanılan ya da antibiyotik kullanılmayan bir ortamdan izole edildiği anlamını taşıdığı belirtilmektedir (Yalanca 2009, Alp ve Öner 2014).

3.2.7. İstatistiksel analiz

Üç paralelli olarak elde edilen analiz sonuçlarının ortalamaları alınarak, standart hataları ile birlikte verilmiştir. Analizler sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri JMP 7.0 programı ile one-way (ANOVA) analizi kullanılarak

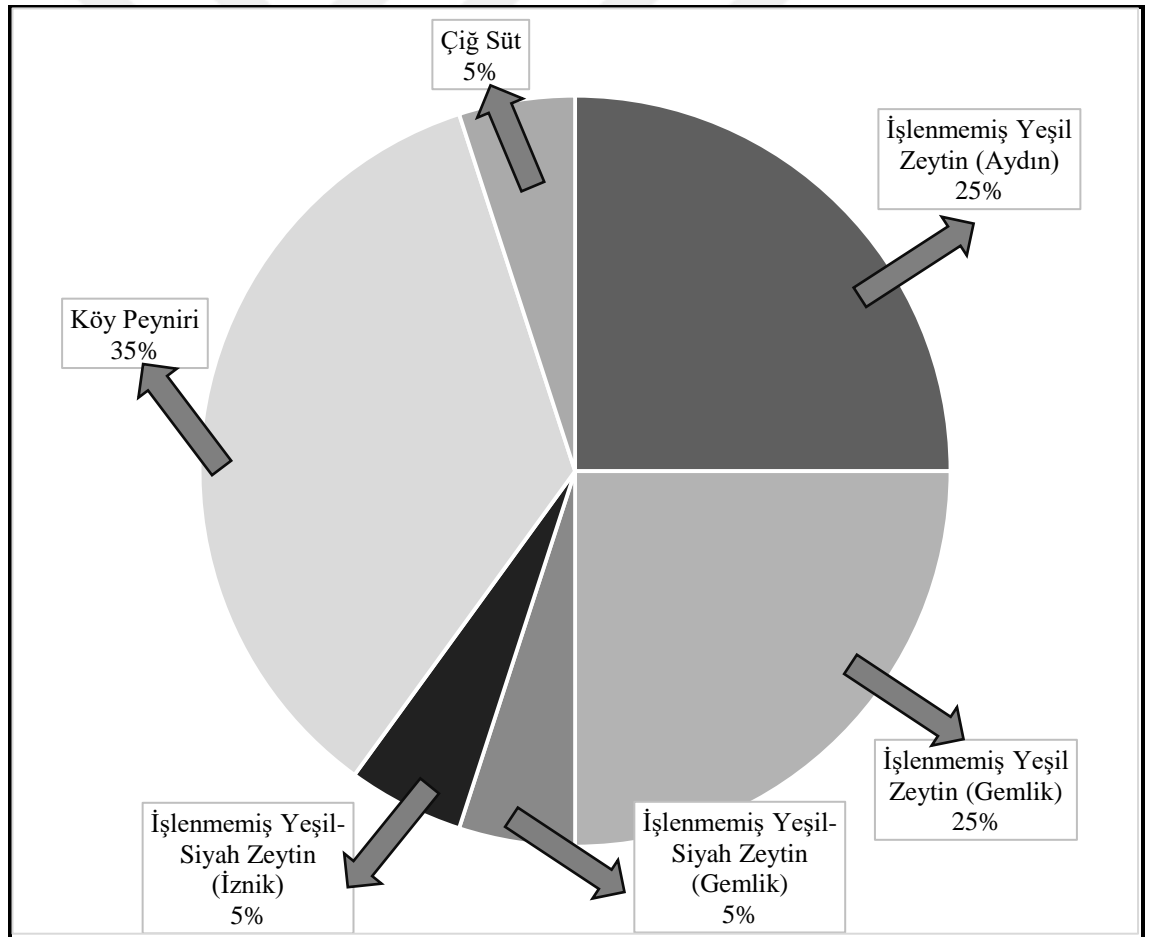
yapılmıştır. Değerlerin birbirinden farklılıkları ve istatistiksel karşılaştırılması Tukey HSD testi ile %5 anlamlılık düzeyinde belirlenmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

İzole edilen bakterilerin saflaştırılması için MRS agara sürme işlemleri birkaç kez tekrarlanarak mikroskopik incelemeler sonucunda bitkisel ve süt kökenli 62 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Ancak, biyokimyasal testler ve tanılama işlemlerinin ardından bazı izolatlar elenmiş ve 43 adet olası laktik asit bakterisi elde edilmiştir. Uygun koşullarda (-80 °C) saklanan izolatlar, süt ve ürünlerine ait 7 ve bitkisel ürünlere ait 10 olmak üzere toplam 17 örnekten elde edilmiştir. 43 adet izolatın elde edildiği kaynaklar Şekil 4.1’ de verilmiştir.



Şekil 4.1. İzolatların elde edildikleri kaynaklar

4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Tanınması

4.2.1. Fenotipik yöntem

Bu aşamada izolatlar gram boyama ve katalaz testleri uygulanmıştır. Süt ve bitkisel kökenli 62 adet bakteri izole edilmiş ve 43 adet bakteri kültürünün Gram pozitif ve katalaz negatif oldukları tespit edilmiştir. Olası laktik asit bakterisi olan 43 izolatın, 17'sinin bitkisel kökenli, 26'sının ise süt kökenli olduğu anlaşılmıştır. Saflaştırılan izolatlar -80 °C'de %30 oranında gliserin içeren MRS broth besiyerinde muhafaza edilmiştir. Çizelge 4.1'de saf izolatlar için fenotipik özellikler belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Bakteri izolatlarının fenotipik özellikleri

	İzolat kodu	Örnek kodu	Morfoloji	Gram özelliği	Katalaz reaksiyonu
Bitkisel kökenli izolatlar	FE5	YZA-1	kokoid	+	-
	FE6	YZA-1	kok/kokoid	+	-
	FE7	YZA-1	kısa çubuk	+	-
	FE46	YZA-1	kok	+	+
	FE8	YZA-2	kok	+	-
	FE9	YZA-2	kok/kokoid	+	-
	FE45	YZA-2	kok	+	+
	FE10	YZA-3	kok	+	-
	FE44	YZA-3	kısa, ince çubuk	-	+
	FE11	YSZG-1	kok	+	-
	FE12	YZG-1	kok	+	-
	FE13	YZG-2	kok	+	-
	FE14	YZG-2	kokoid	+	-
	FE15	YZG-2	kok	+	-
	FE16	YZG-2	kokoid/kısa çubuk	+	-
	FE17	YZG-3	kok	+	-
	FE18	YZG-3	kok	+	-
	FE50	YZG-4	kokoid	+	+
	FE51	YZG-4	kokoid	+	+
	FE20	YSZİ-1	kısa çubuk	+	-
	FE21	YSZİ-1	kokoid	+	-
FE 19	YSZİ-2	kokoid	+	-	

Çizelge 4.1. Bakteri izolatlarının fenotipik özellikleri (devam)

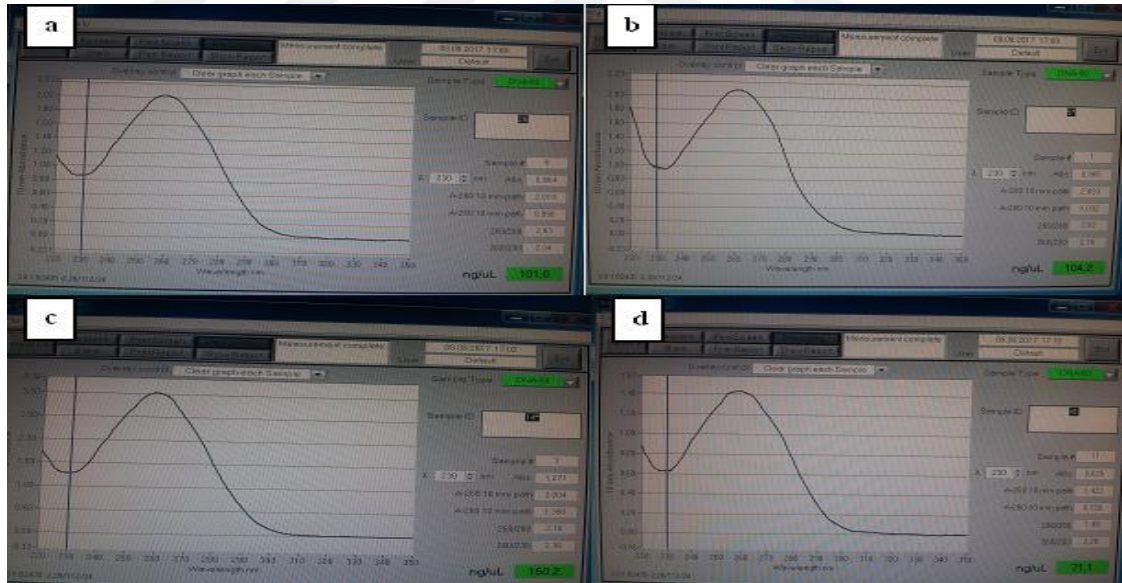
	İzolat kodu	Örnek kodu	Morfoloji	Gram özelliği	Katalaz reaksiyonu
Süt kökenli izolatlar	FE1	ÇS-1	çubuk	+	-
	FE2	ÇS-1	çubuk	+	-
	FE3	ÇS-2	çubuk	+	-
	FE4	ÇS-2	çubuk	+	-
	FE62	ÇS-2	çubuk	+	+
	FE47	ÇS-3	kısa, ince çubuk	-	+
	FE48	ÇS-3	kısa, ince çubuk	-	+
	FE49	ÇS-3	çubuk	+	+
	FE60	ÇS-3	çubuk	+	+
	FE61	ÇS-3	kısa çubuk	-	+
	FE22	KP-1	kok	+	-
	FE23	KP-1	kokoid/kısa çubuk	+	-
	FE24	KP-1	kok	+	-
	FE25	KP-1	çubuk	+	-
	FE26	KP-1	kısa çubuk	+	-
	FE27	KP-1	kısa çubuk	+	-
	FE28	KP-1	kokoid zincir	+	-
	FE53	KP-1	kısa çubuk	+	+
	FE54	KP-1	çubuk	+	+
	FE55	KP-1	çubuk	+	+
	FE59	KP-1	çubuk	+	+
	FE29	KP-2	kısa çubuk	+	-
	FE30	KP-2	kokoid zincir	+	-
	FE31	KP-2	kısa çubuk	+	-
	FE32	KP-2	streptokok	+	-
	FE33	KP-2	kısa çubuk	+	-
	FE34	KP-2	çubuk	+	-
	FE35	KP-2	kısa çubuk	+	-
	FE36	KP-2	kısa çubuk	+	-
	FE37	KP-2	kısa çubuk (zincir)	+	-
	FE38	KP-3	kokoid	+	-
	FE39	KP-3	kok	+	-
	FE40	KP-3	kok	+	-
	FE56	KP-3	kısa, ince çubuk	-	+
	FE58	KP-3	kısa çubuk	-	+
FE41	KP-4	uzun çubuk	+	-	
FE42	KP-4	kısa çubuk	+	-	
FE43	KP-4	kok/streptokok	+	-	
FE52	KP-4	kok	+	+	
FE57	KP-4	kokoid	+	+	

Saflaştırılan bitkisel kökenli 22 adet bakteri izolatının %77' sinin (17 adet), süt kökenli 40 adet bakteri izolatının ise %65' inin (26 adet) Gram pozitif ve katalaz negatif bakteriler olduğu tespit edilmiştir.

4.2.2. Genotipik yöntem

Laktik asit bakterilerinden elde edilen DNA' ların miktar ve kalitesinin belirlenmesi

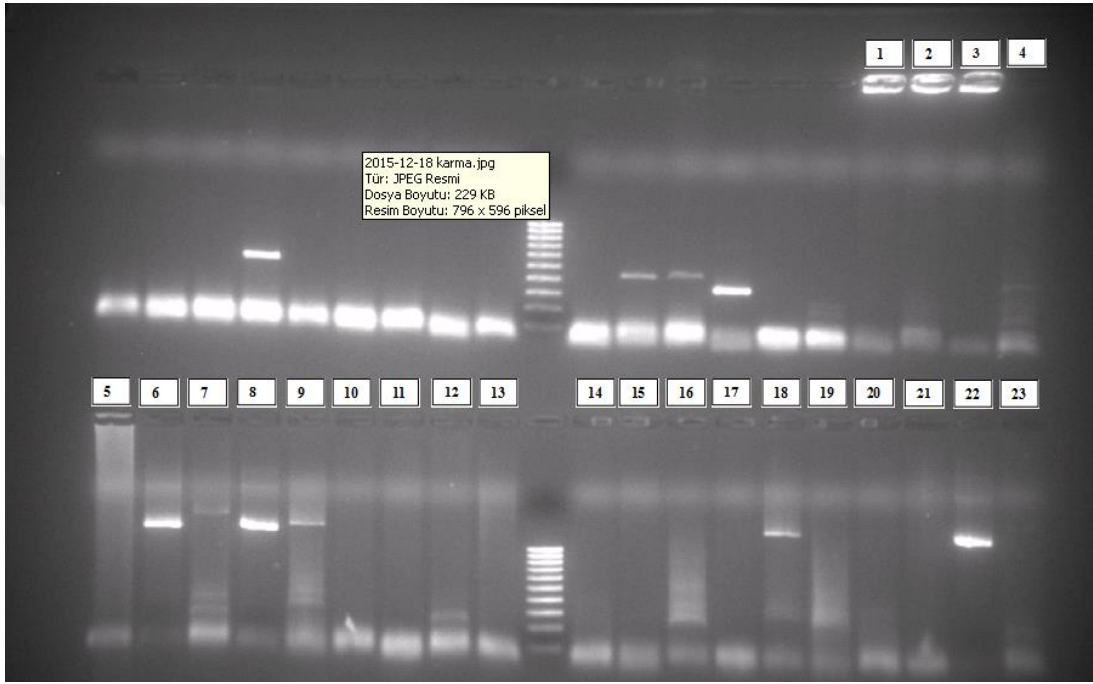
Nano-drop cihazı ile DNA absorbans grafikleri ve konsantrasyonları belirlenmiştir. Absorbans değerlerine göre DNA miktar ve kalitesi belirlenmiş ve izolasyon işlemlerinde kirlilik varsa ya da miktar yetersiz ise DNA izolasyon işlemleri tekrarlanmıştır. Bazı örneklerin nano-drop cihazı ile belirlenen absorbans grafikleri Şekil 4.2' de gösterilmiştir.



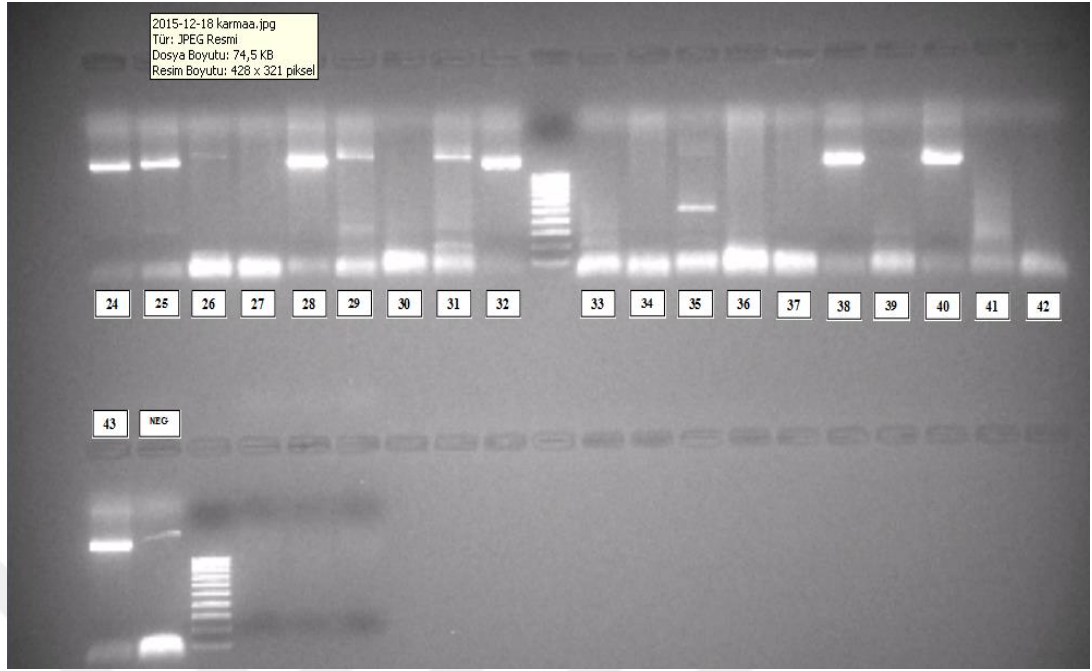
Şekil 4.2. [*Lactobacillus* spp. FE26 (a)], [*Leuconostoc lactis* FE5, *Leuconostoc garlicum* FE5 (b)], [*Leuconostoc pseudomesenteroides* FE14, *Leuconostoc mesenteroides* FE14 (c)] ve [*Lactobacillus curvatus* FE41 (d)] suşlarından izole edilen DNA'ların absorbans grafikleri ve konsantrasyonları

DNA ve PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Nano-drop sonuçları alınan ve absorbans değerleri uygun aralıkta çıkan DNA izolatları agaroz jelde 90 voltta 1 saat yürütülmüş, ancak bant görüntüleri elde edilememiştir. PZR ile çoğaltılan DNA moleküllerine yeniden agaroz jel elektroforezi uygulandığında, 43 örnekte bant görüntüleri elde edilmiştir. İzolatlara ait PZR bant görüntüleri Şekil 4.3 ve Şekil 4.4' te verilmiştir.



Şekil 4.3. FE1-FE23 arası kod numaralı izolatların agaroz jel elektroforezi sonucunda oluşturduğu bantlar



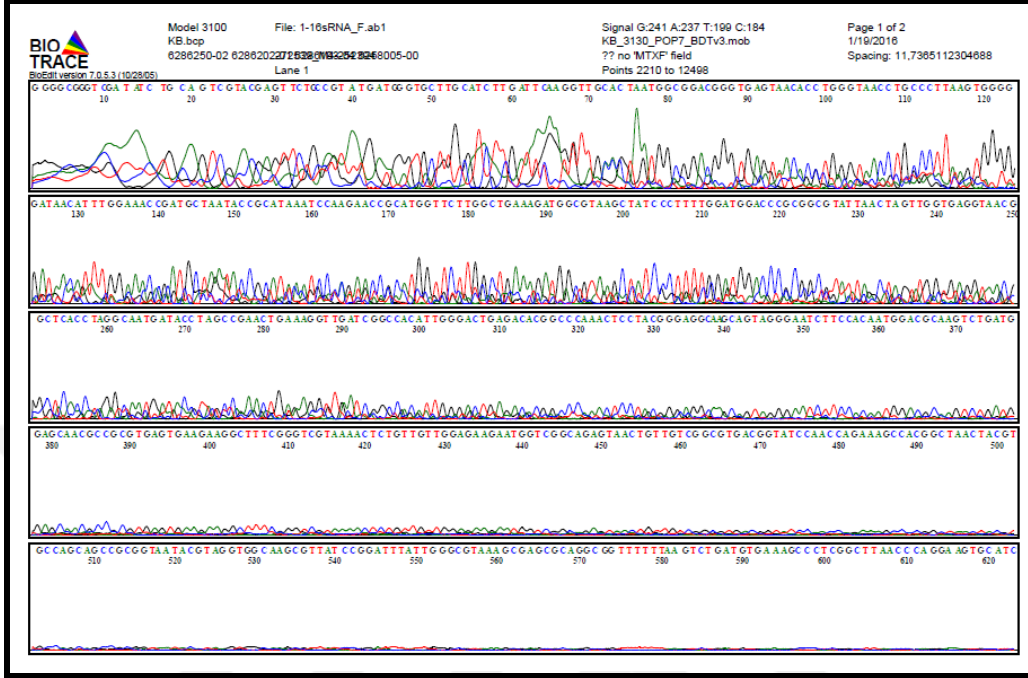
Şekil 4.4. FE24-FE43 arası kod numaralı izolatların agaroz jel elektroforezi sonucunda oluşturduğu bantlar

Şekil 4.3' teki PZR görüntüsünde 1. kulvar 17. kuyudan başlayarak sırasıyla FE1 - FE23 arası örnekler, Şekil 4.4' teki PZR görüntüsünde ise sırasıyla FE24 - FE43 numaralı örnekler mevcut olup, 2. kulvar 2. kuyuda negatif kontrolün bandı görülmektedir.

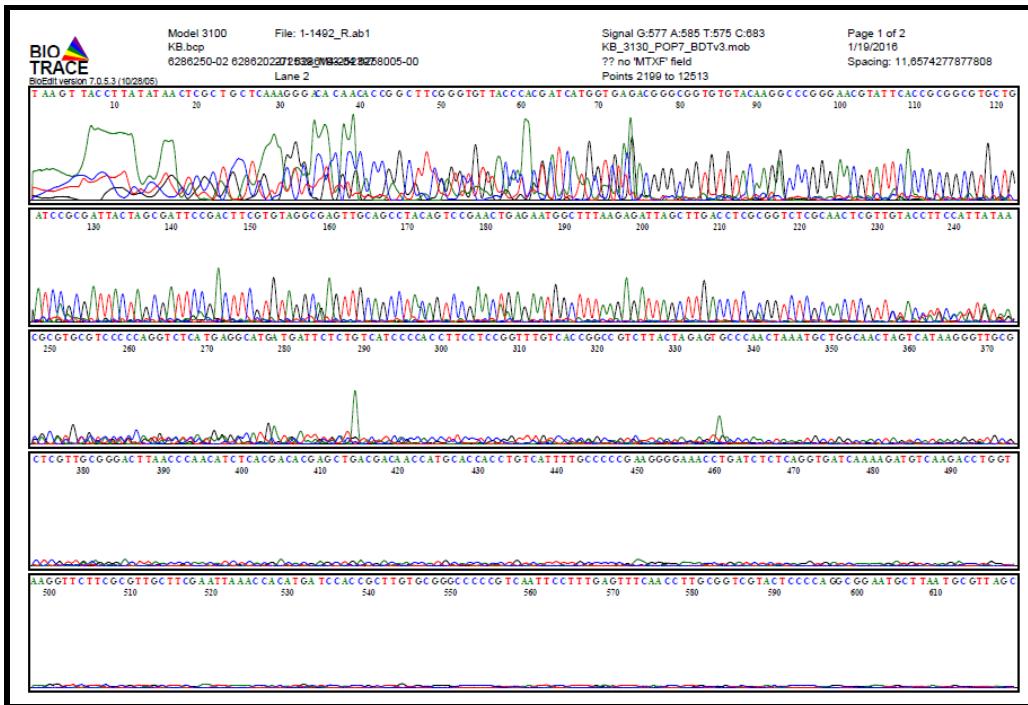
Laktik asit bakterilerinin 16S rRNA yöntemi ile tanınması

Saf kültürlerden izole edilen genomik DNA moleküllerinin 16S rRNA bölgesi çoğaltılarak yapılan PZR sonuçları göz önüne alınarak, izolatlar sekanslama için REFGEN- Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji (Ankara) ve IONTEK (İstanbul) firmalarına gönderilmiştir. 40 adet izolatın sekanslama sonuçları tamamlanmış, 3 adet izolatın tanınması ise başarısız sonuçlanmıştır. Sekans sonuçları BioEdit (Version 5.0.6) programı yardımı ile okunmuş ve diziler “<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>” adresindeki “Nucleotid BLAST” programı kullanılarak taranmıştır. Sekans sonuçları göz önüne alınarak gen bankasından taranan dizileme ile izole edilen laktik asit bakterilerinin cins ve türleri belirlenmiştir.

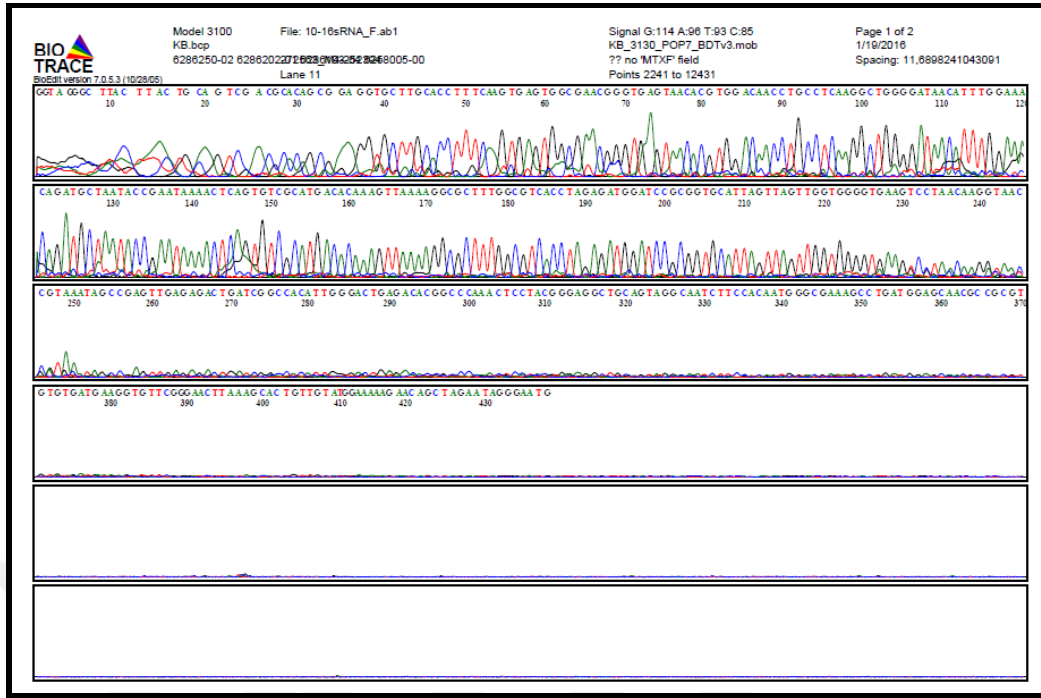
Örneklerden bazılarının ileri ve geri primerlerin bağlanması ile verdikleri sekans sonuçları Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’ de verilmiştir.



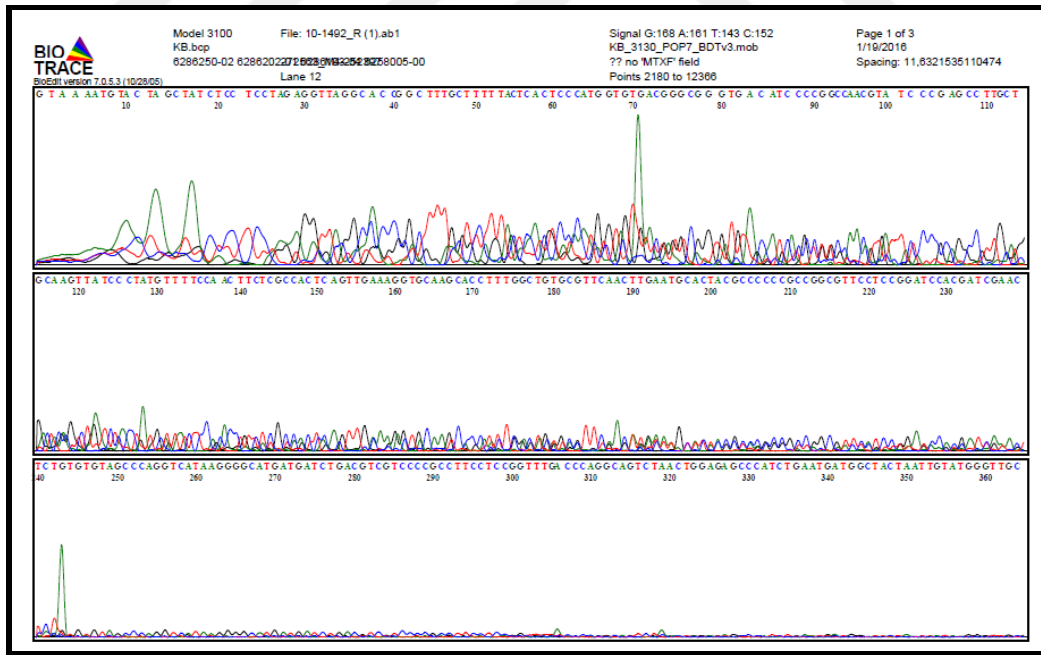
Şekil 4.5. *Lactobacillus rhamnosus* FE1 suşunun ileri primer ile sekans okuma grafiği



Şekil 4.6. *Lactobacillus rhamnosus* FE1 suşunun geri primer ile sekans okuma grafiği



Şekil 4.7. *Leuconostoc pseudomesenteroides* FE10 suşunun ileri primer ile sekans okuma grafiği



Şekil 4.8. *Leuconostoc pseudomesenteroides* FE10 suşunun geri primer ile sekans okuma grafiği

İzolaların kod numaraları, elde edildikleri gıda materyali, morfolojik özellikleri ve tanılama sonuçları Çizelge 4.2' de belirtilmiştir.

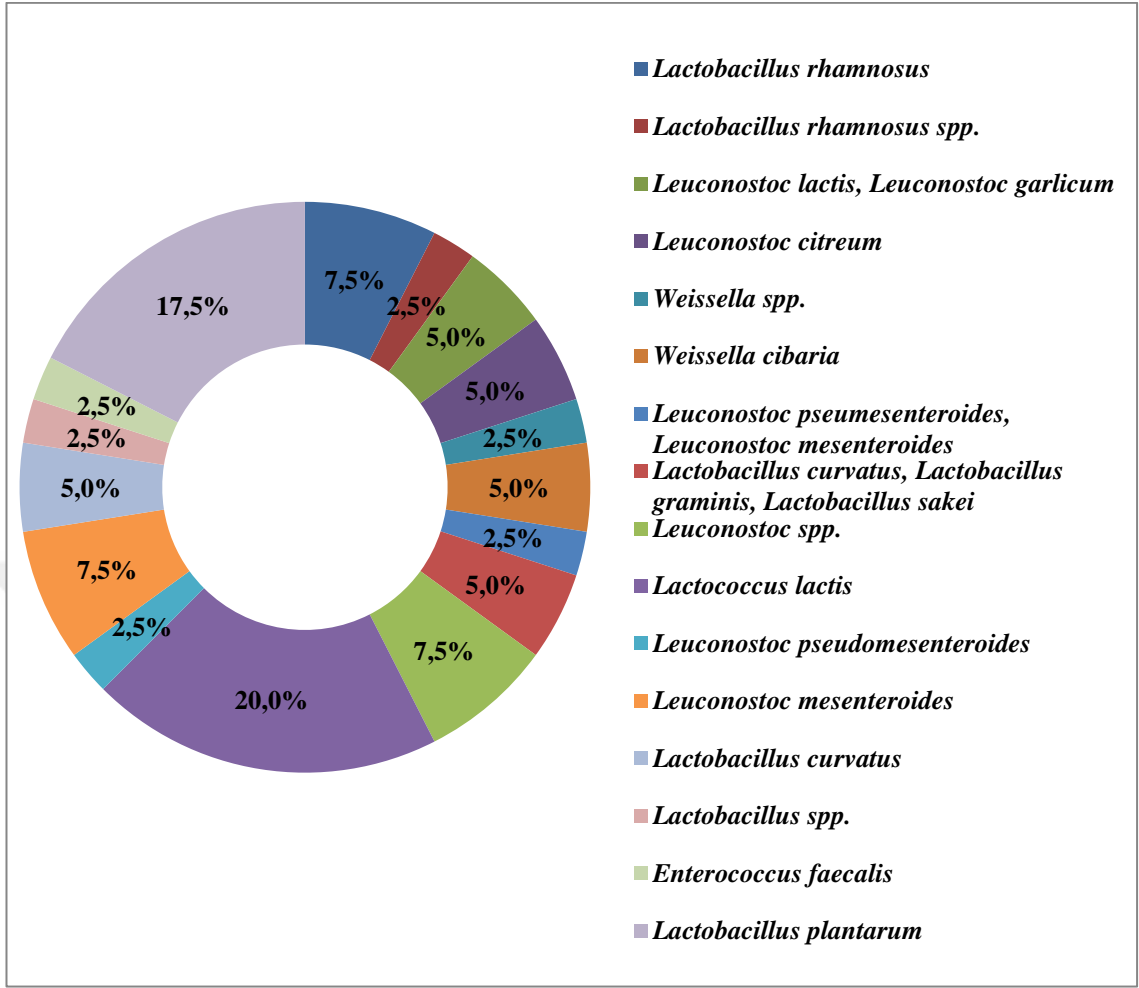
Çizelge 4.2. Saflaştırılan izolatların özellikleri

İzolat numarası (elde edildiği kaynak)	Morfoloji	Tanılanan Tür
FE1 (çiğ süt)	çubuk	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
FE2 (çiğ süt)	çubuk	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
FE3 (çiğ süt)	çubuk	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
FE4 (çiğ süt)	çubuk	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> spp.
FE5 (işlenmemiş yeşil zeytin-Aydın)	kokoid	<i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Leuconostoc garlicum</i>
FE6 (işlenmemiş yeşil zeytin-Aydın)	kok/kokoid	<i>Leuconostoc citreum</i>
FE7 (işlenmemiş yeşil zeytin-Aydın)	kısa çubuk	<i>Weissella</i> spp.
FE8 (işlenmemiş yeşil zeytin-Aydın)	kok	<i>Lactococcus lactis</i>
FE9 (işlenmemiş yeşil zeytin-Aydın)	kok/kokoid	<i>Leuconostoc citreum</i>
FE10 (işlenmemiş yeşil zeytin-Aydın)	kok	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
FE11 (işlenmemiş yeşil-siyah zeytin-Gemlik)	kok	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
FE12 (işlenmemiş yeşil zeytin-Gemlik)	kok	<i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Leuconostoc garlicum</i>
FE13 (işlenmemiş yeşil zeytin-Gemlik)	kok	<i>Leuconostoc</i> spp.
FE14 (işlenmemiş yeşil zeytin-Gemlik)	kokoid	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
FE15 (işlenmemiş yeşil zeytin-Gemlik)	kok	<i>Leuconostoc</i> spp.
FE16 (işlenmemiş yeşil zeytin-Gemlik)	kokoid/kısa çubuk	<i>Weissella cibaria</i>
FE17 (işlenmemiş yeşil zeytin-Gemlik)	kok	<i>Leuconostoc</i> spp.
FE18 (işlenmemiş yeşil zeytin-Gemlik)	kok	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
FE20 (işlenmemiş yeşil-siyah zeytin - İznik)	kısa çubuk	<i>Lactobacillus plantarum</i>
FE22 (köy peyniri-1)	kok	<i>Lactococcus lactis</i>
FE23 (köy peyniri-1)	kokoid/kısa çubuk	<i>Weissella cibaria</i>
FE24 (köy peyniri-1)	kok	<i>Lactococcus lactis</i>
FE25 (köy peyniri-1)	çubuk	<i>Lactobacillus curvatus</i>
FE26 (köy peyniri-1)	kısa çubuk	<i>Lactobacillus</i> spp.
FE27 (köy peyniri-1)	kısa çubuk	<i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus graminis</i> , <i>Lactobacillus sakei</i>
FE28 (köy peyniri-1)	kokoid zincir	<i>Enterococcus faecalis</i>
FE29 (köy peyniri-2)	kısa çubuk	<i>Lactobacillus plantarum</i>
FE30 (köy peyniri-2)	kokoid zincir	<i>Lactococcus lactis</i>
FE31 (köy peyniri-2)	kısa çubuk	<i>Lactobacillus plantarum</i>
FE32 (köy peyniri-2)	streptokok	<i>Lactococcus lactis</i>
FE34 (köy peyniri-2)	çubuk	<i>Lactobacillus plantarum</i>
FE35 (köy peyniri-2)	kısa çubuk	<i>Lactobacillus plantarum</i>
FE36 (köy peyniri-2)	kısa çubuk	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Çizelge 4.2. Saflaştırılan izolatların özellikleri (devam)

İzolat numarası (elde edildiği kaynak)	Morfoloji	Tanımlanan Tür
FE37 (köy peyniri-2)	kısa çubuk (zincir)	<i>Lactobacillus plantarum</i>
FE38 (köy peyniri-3)	kokoid	<i>Lactococcus lactis</i>
FE39 (köy peyniri-3)	kok	<i>Lactococcus lactis</i>
FE40 (köy peyniri-3)	kok	<i>Lactococcus lactis</i>
FE41 (köy peyniri-4)	uzun çubuk	<i>Lactobacillus curvatus</i>
FE42 (köy peyniri-4)	kısa çubuk	<i>Lactobacillus curvatus, Lactobacillus graminis, Lactobacillus sakei</i>
FE43 (köy peyniri-4)	kok/streptokok	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

Sekanslama sonucunda, analizi tamamlanan 40 izolat içinde 5 farklı cinse ait LAB türlerinin izole edildiği anlaşılmıştır. Çiğ süt, zeytin ve köy peynirlerinden izole edilmiş olan laktik asit bakterileri *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus rhamnosus* spp., *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc garlicum*, *Leuconostoc citreum*, *Weissella* spp., *Weissella cibaria*, *Leuconostoc* spp., *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus graminis*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis* ve *Lactobacillus plantarum* olarak belirlenmiştir. 40 adet izolat içindeki mikrobiyel dağılım Şekil 4.9’ da verilmiştir. Tanımlanan LAB suşlarının süt, zeytin ve peynir örneklerinin doğal mikrobiyotasında bulunabilecek türler olduğu tespit edilmiştir. Zeytin örneklerinden daha çok *Leuconostoc* spp., süt örneklerinden *Lactobacillus* ve peynir örneklerinden de genel olarak *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactococcus* spp. izole edilmiştir.



Şekil 4.9. İzole edilen mikroorganizmaların tür bazında dağılımı (%)

İzolatların tür bazında dağılımları incelendiğinde en çok farklı türün izole edildiği gıdalar işlenmemiş yeşil zeytin ve köy peyniri olarak belirlenmiş olup, çiğ süt ve işlenmemiş yeşil-siyah zeytinlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin ise daha az çeşitlilik gösterdiği belirlenmiştir.

İzolatların cins ve tür bazında tanıları, BLAST algoritması kullanılarak belirlenmiş olup, tanılanan türlerin benzerlik yüzdeleri ve erişim kod numaraları Çizelge 4.3' te verilmiştir.

Çizelge 4.3. İzolatların cins ve tür bazında tanımlanma sonuçlarına ait bilgiler

İzolat numarası (elde edildiği kaynak)	Tanımlanan Tür	Benzerlik oranı (%)	Erişim kodu
FE1 (çiğ süt)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	96	KY041760.1
FE2 (çiğ süt)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	97	KY780506.1
FE3 (çiğ süt)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	97	MF369976.1
FE4 (çiğ süt)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> spp.	96	MF348222.1
FE5 (işlenmemiş yeşil zeytin-Aydın)	<i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Leuconostoc garlicum</i>	97	EU794734.1
FE6 (işlenmemiş yeşil zeytin-Aydın)	<i>Leuconostoc citreum</i>	98	KT968364.1
FE7 (işlenmemiş yeşil zeytin-Aydın)	<i>Weissella</i> spp.	92	LC071832.1
FE8 (işlenmemiş yeşil zeytin-Aydın)	<i>Lactococcus lactis</i>	98	KU315069.1
FE9 (işlenmemiş yeşil zeytin-Aydın)	<i>Leuconostoc citreum</i>	95	LC269258.1
FE10 (işlenmemiş yeşil zeytin-Aydın)	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	95	KC417008.1
FE11 (işlenmemiş yeşil-siyah zeytin-Gemlik)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	96	MG754625.1
FE12 (işlenmemiş yeşil zeytin-Gemlik)	<i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Leuconostoc garlicum</i>	95	MG462066.1
FE13 (işlenmemiş yeşil zeytin-Gemlik)	<i>Leuconostoc</i> spp.	94	HQ450732.1
FE14 (işlenmemiş yeşil zeytin-Gemlik)	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	98	KF263165.1
FE15 (işlenmemiş yeşil zeytin-Gemlik)	<i>Leuconostoc</i> spp.	96	LT853601.1
FE16 (işlenmemiş yeşil zeytin-Gemlik)	<i>Weissella cibaria</i>	98	KP889227.1
FE17 (işlenmemiş yeşil zeytin-Gemlik)	<i>Leuconostoc</i> spp.	94	EU177643.1
FE18 (işlenmemiş yeşil zeytin-Gemlik)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	98	HF562948.1
FE20 (işlenmemiş yeşil-siyah zeytin -İzmit)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	95	KR858841.1
FE22 (köy peyniri-1)	<i>Lactococcus lactis</i>	99	KU899030.1
FE23 (köy peyniri-1)	<i>Weissella cibaria</i>	99	CP022606.1
FE24 (köy peyniri-1)	<i>Lactococcus lactis</i>	97	KT124596.1
FE25 (köy peyniri-1)	<i>Lactobacillus curvatus</i>	95	KX156239.1
FE26 (köy peyniri-1)	<i>Lactobacillus</i> spp.	97	MF784248.1
FE27 (köy peyniri-1)	<i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus graminis</i> , <i>Lactobacillus sakei</i>	97	MG430196.1
FE28 (köy peyniri-1)	<i>Enterococcus faecalis</i>	97	MF498498.1
FE29 (köy peyniri-2)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	92	KX129818.1
FE30 (köy peyniri-2)	<i>Lactococcus lactis</i>	98	KC692209.1
FE31 (köy peyniri-2)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	94	MF369878.1
FE32 (köy peyniri-2)	<i>Lactococcus lactis</i>	98	HG798459.1
FE34 (köy peyniri-2)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	JN573608.1
FE35 (köy peyniri-2)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	95	LC164742.1
FE36 (köy peyniri-2)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97	JN573608.1

Çizelge 4.3. İzolatların cins ve tür bazında tanımlanma sonuçlarına ait bilgiler (devam)

İzolat numarası (elde edildiği kaynak)	Tanımlanan Tür	Benzerlik oranı (%)	Erişim kodu
FE37 (köy peyniri-2)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97	FJ751793.1
FE38 (köy peyniri-3)	<i>Lactococcus lactis</i>	98	KU899006.1
FE39 (köy peyniri-3)	<i>Lactococcus lactis</i>	97	KC692209.1
FE40 (köy peyniri-3)	<i>Lactococcus lactis</i>	96	MF185375.1
FE41 (köy peyniri-4)	<i>Lactobacillus curvatus</i>	99	MF540548.1
FE42 (köy peyniri-4)	<i>Lactobacillus curvatus, Lactobacillus graminis, Lactobacillus sakei</i>	97	KT351722.1
FE43 (köy peyniri-4)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97	HM058639.1

İzolatların sekans analizi sonuçlarına göre; en çok *L. lactis* (% 20) ve *L. plantarum* (% 17,5) türlerine, çok düşük oranlarda da *L. rhamnosus* spp. (% 2,5) *Weissella* spp. (% 2,5), *Leu. pseudomesenteroides* (% 2,5) ve *E. faecalis* (% 2,5) cins ve türlerine rastlanmıştır.

Yapılan başka bir çalışma kapsamında 30 farklı çiğ süt örneğinden 74 adet LAB suşu izole edilmiş olup, tanımlanan türler arasında *L. rhamnosus*, *L. mesenteroides*, *L. lactis* gibi türlerin olduğu belirtilmekte ve *L. rhamnosus* türünün dağılımının ise %8 oranında olduğu belirtilmektedir. (Orhan 2013). Bir başka çalışmada ise çiğ ve pastörize sütlerde laktik asit bakterisi dağılımı incelenmiş ve *L. rhamnosus* suşlarının çiğ süt örneklerinde tespit edildiği, pastörize sütlerde ise rastlanmadığı belirtilmiştir (Bluma ve Ciprovica 2015). Ayrıca Baumgartner ve ark. (1998) ile Pogacic ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada, *L. rhamnosus* suşuna çiğ süt örneklerinde oldukça az rastlandığı (% 1,6), ancak çiğ süttten elde edilen sert ve yumuşak peynirlerde daha sık rastlandığı (%25-30) belirtilmektedir. Bu durumda *L. rhamnosus* türünün çiğ süttün doğal biyotasında diğer *Lactobacillus* spp. türlerine göre daha az miktarda bulunduğu ve elde edilen sonuçların başka çalışmalar ile benzer nitelikte olduğu anlaşılmaktadır.

Köy peynirlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin %33' ünü *L. lactis* suşlarının oluşturduğu belirlenmiştir. Yapılan benzer çalışmalarda (Ruggirello ve ark. 2014, Vahabzadeh ve ark. 2017) peynir üretimi sırasında uygulanan ısı işlem ve olgunlaştırma aşamalarının ardından en çok rastlanılan LAB türlerinden birinin *L. lactis*

olduğu belirtilmektedir. Ayrıca starter olarak peynir üretiminde kullanılabildiği ve son ürünün aromasında etkili olduğu belirtilmektedir (Ruggirello ve ark. 2014, Vahabzadeh ve ark. 2017). Hayaloğlu ve ark. (2002) ile Başyigit Kılıç ve ark. (2009)' nın yaptıkları çalışmalarda Türk beyaz peynirlerinin doğal biyotasında yer alan LAB suşlarından dominant türün *L. lactis* olduğu ve bunu *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *Leu. lactis* ve *Leu. mesenteroides* türleri ile diğer türlerin takip ettiği belirtilmektedir. Tez kapsamında *L. lactis*' in dominant flora olarak tespit edilmesi, diğer çalışmalar ile uyum göstermektedir. Ancak, peynirlerden izole edilen bakteri suşları arasından ikinci baskın türün benzer çalışmalardan farklı olarak *L. plantarum* olduğu ve bunu *L. curvatus*, *Leu. mesenteroides*, *W. cibaria*, *E. faecalis* ve *Lactobacillus* spp. türlerinin takip ettiği belirlenmiştir. Peynirin olgunlaşma aşamalarına göre laktik asit bakterilerinin ortamdaki oranları değişkenlik gösterebildiği (Hayaloğlu ve ark. 2002) için çalışmada tanımlanan suşların peynirin doğal mikrobiyotasında bulunan LAB suşları ile uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

Yeşil ve siyah ham zeytinlerin sofralık zeytine işlenmesi aşamalarında izole edilen LAB suşlarından en çok *Lactobacillus* cinsine rastlandığı ve bunu takiben *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Lactococcus* cinslerinin gözlemlendiği Hurtado ve ark. (2012) ile Bonatsou ve ark. (2017) tarafından belirtilmektedir. Bu çalışmada ise ham zeytinden izole edilerek tanımlanan suşlar arasında en çok görülen LAB cinsinin *Leuconostoc* olduğu ve diğer cinslerin genel olarak birbiri ile yakın oranlarda izole edildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca diğer çalışma sonuçlarından farklı olarak, *Weissella cibaria* türü ham zeytin örneklerinden izole edilmiştir. Önceden yapılan çalışmalarda zeytinden izole edilen LAB cinsleri içinde *Weissella* spp.' ye rastlanmadığı, ancak; zeytin ağaçlarının kök kısmındaki rizosfer tabakasından *Weissella* cinsine ait bazı türlerin izole edildiği belirtilmektedir (Fhoula ve ark. 2013). *Weissella* cinsi, toprak örneklerinden de izole edilebilmektedir. Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında, ham zeytinin toplanması aşamasında, meyvelerin toprak ile temasının söz konusu olabileceği ve bu nedenle *W. cibaria* suşuna zeytin mikrobiyotasında rastlanmış olabileceği düşünülmektedir. *W. cibaria* türüne daha çok süt ve ürünlerinde rastlandığı önceki çalışmalarda bildirilmektedir. Keçi ve inek sütlerinden, ayrıca klinik örneklerden

Weissella cinsine ait türlerin izole edildiği, ancak çiğ sütlerden izole edilen *W. cibaria*'nın probiyotik özellik gösterdiği, bakteriyosin ürettiği ve gıdaların doğal fermentasyonunda yer alan önemli LAB suşlarından biri olduğu vurgulanmıştır (Elavarasi ve ark. 2014). Bu özellikleri göz önüne alındığında, zeytin fermentasyonunda da rol oynayabileceği ve son ürünün raf ömrünün uzamasında diğer LAB suşları gibi önemli olabileceği düşünülmektedir.

4.3. Tanılanan Laktik Asit Bakterilerinin Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi

4.3.1. “Tüp yöntemi” ile biyofilm oluşumunun incelenmesi

Laktik asit bakterilerinin biyofilm oluşturma özellikleri Tüp Yöntemine göre belirlenmiş ve sonuçlar EK 1’de verilmiştir.

Tüp yöntemine göre yapılan analiz sonuçları değerlendirildiğinde denemede kullanılan laktik asit bakterilerinin bir kısmında biyofilm oluşumu gözlemlenirken, bazılarının ise biyofilm oluşturamadığı sonucuna varılmıştır.

Deneme planında tüm izolatların biyofilm oluşturma kapasiteleri iki ayrı sıcaklık (30°C ve 37°C) ve inkübasyon süresi (24 ve 48 saat) sonunda test edilmiştir. Laktik asit bakterilerinin normal şartlarda gelişmeleri için inkübasyon koşulları 28-30°C’ de 18-24 saat olup, deneme planına diğer sıcaklık ve sürelerin de dâhil edilmesi ile kültürlerin stres koşullarında ve bunun belirli süre devam etmesi sonucunda göstermiş olduğu tepki ve biyofilm oluşturma dereceleri de gözlemlenebilmiştir. Sıcaklık ve süre koşulları normal gelişim koşullarından farklılaştıkça, bazı izolatlarda biyofilm oluşturma kapasitesinin arttığı, bazı izolatların ise normal gelişim koşullarında daha yoğun biyofilm tabakası oluşturdukları gözlemlenmiştir. Bu durum, izolatların stres koşullarındaki dayanıklılıkları hakkında da bilgi vermektedir.

Biyofilm oluşturma koşulları her bir mikroorganizma için farklılık gösterebilmektedir. Sıcaklık ve inkübasyon süresi değişimi ya da mikroorganizmanın özelliklerine göre farklı stres koşullarının oluşturulması, biyofilm oluşturma kapasitesini etkileyebilmektedir. Çalışmada planlana dört farklı inkübasyon koşulunda gözlemlenen biyofilm oluşum değerleri birbirinden farklılık göstermektedir. Dört ayrı deneme grubu birlikte değerlendirildiğinde, LAB suşlarının yarıdan fazlasının (%55-82,5) farklı inkübasyon koşullarında zayıf biyofilm oluşturduğu, çok az suşun (%2,2-10) orta düzeyde biyofilm oluşturduğu ve yine çok az suşun da (%2,2-10) güçlü biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Literatürde tüp yöntemi patojen mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılmış olup, laktik asit bakterilerinin biyofilm oluşturma kapasiteleri moleküler yöntemler ile, SEM mikroskobu ile ya da mikropkala yöntemi ile belirlenmiştir (Cengiz ve ark. 2006, Hassan ve ark. 2011, Abebe 2013, Demirhan 2013, Tanrıbuyurdu 2014).

4.3.2. “96 kuyucuklu plaka yöntemi” ile biyofilm oluşumunun incelenmesi

Laktik asit bakterilerinin biyofilm oluşturma özellikleri 96 kuyucuklu plaka yöntemine göre belirlenmiş ve sonuçlar EK 2’ de verilmiştir.

96 kuyucuklu plaka yöntemine göre dört ayrı inkübasyon koşulu sonucunda suşların oluşturduğu biyofilm düzeyleri belirlenmiş olup, LAB suşlarının büyük çoğunluğunun biyofilm oluşturamadığı anlaşılmıştır. İzole edilerek tanılanan LAB suşlarının %22,5-27,5’ inin zayıf biyofilm oluşturdukları, daha az sayıda suşun (%10-20) orta düzeyde biyofilm oluşturabildiği, sadece bir LAB suşunun (*Lactococcus lactis* FE30) ise “24 saat-37°C” inkübasyon koşulunda güçlü biyofilm oluşturabildiği anlaşılmıştır. Biyofilm oluşumu gözlenen laktik asit bakterileri arasında ise daha çok “zayıf biyofilm üreten” suşların olduğu sonucuna varılmıştır. Arena ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada laktik asit bakterilerinin genetik olarak özellikle bağırsak yüzeylerine tutunma kabiliyetinin pili varlığı ile karakterize edildiği belirtilmekte olup, *L. lactis* suşlarında da *spaFED* operonunun mukus bağlama ve yüzey lokalizasyonunda görev aldığı belirlenmiştir. Bu durum *L. lactis* suşlarının biyofilm oluşturabileceğini

moleküler olarak açıklamaktadır. *L. lactis*' te pili olmasını sağlayan gen kümesi plazmid üzerine kodlandığı için, biyofilm oluşturabilme özelliğinin *Lactococcus* spp. arasında gen transferi ile birbirine aktarılabilmesi de belirtilmektedir. Mikroplaka ile biyofilm ölçümü yapılan bir başka çalışmada ise *L. lactis* 368 suşunun 30°C' de 48 saatlik inkübasyon sonunda güçlü düzeyde biyofilm oluşturduğu belirtilmektedir (Gómez ve ark. 2016). Suşların izole edildiği ortam ve genetik özellikleri farklı olabileceğinden farklı koşullarda biyofilm oluşturabilecekleri düşünülmektedir.

Stres koşulları oluşturulduğunda, bazı mikroorganizmalar yaşamlarını sürdürebilirken, bazıları canlılığını koruyamamaktadır. Optimum gelişme koşulları dışına çıkıldığında yaşamlarını devam ettirebilen mikroorganizmalardan bazıları ise biyofilm oluşturma yeteneğini kaybedebilirken, bazıları da stres koşullarında daha yoğun biyofilm oluşturabilmektedir. Çalışmada kullanılan LAB suşları göz önüne alındığında, bazılarında optimum gelişme koşulları (30°C de 24 saat) dışına çıkıldığında biyofilm oluşturma kapasitesinin arttığı, bazılarında ise azaldığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle stres koşullarının biyofilm oluşumu üzerine olumlu/olumsuz etkisi ile ilgili kesin kanıya varmak olanaklı olmamıştır.

L. plantarum FE29 suşunun 96 kuyucuklu plaka yöntemi ile analizi sonucunda 24 saatlik inkübasyon koşullarında 37°C' de biyofilm oluşturma kapasitesi "zayıf" olarak belirlenmiştir. Ancak 30°C' de aynı süre sonundaki biyofilm oluşturma düzeyi ile karşılaştırıldığında, 37°C' de B değerinde artış olduğu gözlenmektedir. Bu sonuç, *L. plantarum* FE29 suşunun stres koşullarında biyofilm oluşturma kapasitesinin artabildiğini göstermektedir. Ayrıca inkübasyon süresi uzatıldığında 48 saatlik inkübasyon sonucunda 30°C' de gözlemlenen biyofilm değeri (zayıf), 37°C' lik inkübasyon koşulunda artarak, "orta düzey" biyofilm değerine ulaşmıştır. 37°C' de 48 saatlik inkübasyon sonunda B değeri 0,9 olarak hesaplanmıştır. 1,0 ve üzeri değerler ise "güçlü biyofilm oluşumu" aralığında bulunmaktadır. *L. plantarum* FE29 suşunun güçlü biyofilm oluşturma değeri sınırına da yaklaşmış olması, stres koşulları altında iken biyofilm oluşturma kapasitesinin artabileceği konusunda fikir vermektedir. Jalilsood ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada inkübasyon sıcaklığı 30°C' den 35°C' ye

çıkarıldığında *L. plantarum* suşunun biyofilm oluşturma kapasitesinin de arttığı belirtilmektedir. Stres koşullarının oluşması ile biyofilm oluşumunun da arttığı, bu çalışmada elde edilen bulgular ile uyumluluk göstermektedir. Aoudia ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ise 30°C’ de 24 saat inkübasyon sonunda mikropilaka ile ölçülen biyofilm değerlerinin *L. plantarum* WCFS1 ve *L. plantarum* NA7 suşlarında *L. fermentum* suşlarına göre daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Denemede tek sıcaklık ve süre koşulu kullanılmış olup, tez kapsamında elde edilen veriler ile karşılaştırıldığında *L. plantarum* suşlarının farklı koşullarda farklı düzeylerde biyofilm oluşturabildiği anlaşılmaktadır. Kumar ve ark. (2017) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise biyofilm oluşturan LAB suşlarının metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* S547 suşu üzerine inhibisyon etkisi incelenmiştir. Kefirden izole edilen *L. plantarum* KF suşunun biyofilm oluşturma kapasitesi mikropilaka yöntemi ile 37°C’ de 48 saatlik inkübasyon sonunda belirlenmiş olup, denemede kullanılan koşullarda iyi derecede biyofilm üreticisi olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca biyofilm oluşturan *L. plantarum* KF suşunun *S. aureus* S547 gelişimini 36 saatlik inkübasyon sonunda 2,64 log azalttığı belirtilmektedir. Kumar ve ark. (2017) tarafından belirlenen değerler, bu çalışmada kullanılan inkübasyon sıcaklığı ve süresi ile benzer olup, *L. plantarum* suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri de birbiri ile uyumludur.

Stres koşullarında B değerindeki artış *L. lactis* FE30 ve *L. lactis* FE40 suşlarında da gözlenmiştir. *L. lactis* FE30 suşunun biyofilm oluşturma kapasitesi 37°C ’de artmaktadır. Denemede 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda biyofilm oluşumları incelenmiş ve 30°C’ de 0,1 olan B değeri, 37°C’ de 1,1 olarak kaydedilmiştir.

L. curvatus FE25 suşunun biyofilm oluşturma kapasitesi 37°C’ de 24 saatlik inkübasyon sonunda 0,7 (orta düzey) olarak belirlenmiştir. Ancak 37°C’ de inkübasyon süresi 48 saat olduğunda biyofilm oluşum düzeyinin azaldığı ve B değerinin 0,3 olduğu gözlenmiştir. Bu sonuca göre, *L. curvatus* FE25 suşunun biyofilm tabakasının zamanla azaldığı anlaşılmaktadır. Laktik asit bakterileri karbon kaynaklarını kullanarak başta laktik asit olmak üzere bazı organik asitleri üretmektedirler. Laktik asit fermentasyonu olarak adlandırılan reaksiyon sonucunda ortaya çıkan organik asitler sayesinde

ortamdaki asit düzeyi artmaktadır. Yapılan çalışmalarda, ortamda organik asitlerin, özellikle laktik asit miktarının artması ile biyofilm tabakasının zarar görebildiği ve laktik asit fermentasyonu sonucunda inkübasyon süresi uzadıkça, biyofilm tabakasının azaldığı belirtilmektedir. Biyofilm tabakasının zarar görmesi ve azalması, ortamın pH'sının düşmesi ile doğrudan ilişkilidir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen sitrik, gallik ve laktik asit gibi tüm organik asitler yüzeylerde oluşan biyofilm tabakasının uzaklaştırılmasında rol oynamaktadırlar (Kolari 2003, Yeşilçimen Akbaş ve Çağ 2016). Gómez ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada *L. curvatus* suşunun agregasyon kabiliyeti ve güçlü biyofilm oluşturma yeteneği olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca *L. curvatus* suşu, patojen mikroorganizmalar ile aynı oranda ortama aşılabilir ve ortamdaki biyofilm tabakasının hangi mikroorganizmaya ait olduğu 30°C'de 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon koşulları sonunda belirlenmiştir. LAB suşlarının tutunacak yüzey konusunda da yarışmacı kabiliyete sahip olduğu düşünülerek planlanan çalışmada *L. curvatus* tarafından üretilen güçlü biyofilm tabakası sayesinde ortamdaki *L. monocytogenes* suşunun %69 oranında, *E. coli* O157:H7 suşunun ise %74,6 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen veriler de *L. curvatus* suşunun biyofilm üreticisi olduğunu göstermekte olup, yapılan çalışmalar ile benzer nitelikte sonuçların elde edildiği anlaşılmaktadır.

Çalışmada biyofilm oluşturma özellikleri incelenen laktik asit bakterilerinden bazıları 30°C'de biyofilm oluşturabilirken, 37°C'de biyofilm oluşumu ya daha az gözlenmiş ya da hiç gözlenmemiştir. Bazı laktik asit bakterilerinde ise biyofilm oluşumu 37°C'lik inkübasyon sonunda daha yoğun gözlemlenmiştir. Benzer durum ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda da karşılaşılmıştır. Çalışmada tanımlanan laktik asit bakterilerinin biyofilm oluşturma kapasiteleri göz önüne alındığında, biyofilm oluşumu için gereken koşulların değişkenlik gösterdiği ve her mikroorganizma suşu için farklı olduğu sonucuna varılmıştır (Gün ve Ekinci 2009, Akan ve Kınık 2014, Fonteini 2015).

4.3.3. Biyofilm oluşumunun belirlenmesinde kullanılan tüp ve 96 kuyucuklu plaka yöntemlerinin karşılaştırılması

Biyofilm oluşumunun incelenmesinde, “tüp yöntemi” daha çok gözleme dayalı bir yöntem olup, kalitatif sonuçlar vermektedir. Spektrofotometrik ölçüme dayalı 96 kuyucuklu plaka yönteminde ise biyofilm tabakasının yoğunluğu sayısal değerler ile belirlenebilmiş ve kantitatif sonuçlar elde edilebilmiştir. Böylece yöntemler arasında karşılaştırma ve doğrulama da yapılabilmektedir.

Tüp ve 96 kuyucuklu plaka yöntemlerinde elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında, bazı laktik asit bakterisi suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri her iki yöntemde de benzer bulunmuş ancak bazılarında sonuçların birbiri ile uyumsuz olduğu gözlenmiştir. *L. rhamnosus* FE1 suşunun tüp yöntemine göre 30 ve 37°C’ lik sıcaklıklarda 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda biyofilm oluşturma kapasitesi “zayıf” olarak belirlenmiştir. Ancak, aynı koşullarda 96 kuyucuklu plaka ile belirlenen sonuçlara göre *L. rhamnosus* FE1 suşunda biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. Çalışma sonucunda bulduğumuz sonuçtan farklı olarak Gómez ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada *L. rhamnosus* suşunun güçlü biyofilm üreticisi olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca bir başka çalışmada probiyotik *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) suşunun biyofilm oluşturma değeri “güçlü düzey” olarak tespit edilmiştir (Lebeer ve ark. 2007).

L. lactis FE32 suşunun biyofilm oluşturma kapasitesi incelendiğinde ise tüp ve 96 kuyucuklu plaka yöntemi ile belirlenen sonuçlar birbiri ile tutarlı bulunmuştur. Her iki yöntemde göre de 30 ve 37°C’ lik sıcaklıklarda 24 saatlik inkübasyon ve 30°C’ de 48 saatlik inkübasyon sonucunda *L. lactis* FE32 suşunun zayıf düzeyde, 37°C’ de 48 saatlik inkübasyon sonunda ise orta düzeyde biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir.

Tüp ve 96 kuyucuklu plaka yöntemi sonuçları bazı suşlarda birbirinden önemli derece farklılık göstermiştir. *L. plantarum* FE36 suşunun biyofilm oluşturma derecesi 37°C’ de 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda tüp yöntemine göre “güçlü” olarak belirlenirken, 96 kuyucuklu plaka yönteminde ise biyofilm oluşumu gözlenmemiştir.

Benzer durum *W. cibaria* FE16 suşunda da gözlenmiştir. Tüp yöntemi sonucuna göre 37°C’ de 24 saatlik inkübasyon sonunda orta düzeyde biyofilm oluşumu gözlenirken, 96 kuyucuklu plaka yönteminde zayıf biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada (Jang ve ark. 2016) *W. cibaria* suşları ile ağız sağlığı için önemli olan probiyotik bakterilerinin karakteristik özellikleri karşılaştırılmıştır. *W. cibaria* CMU suşunun yüzeye tutunma yeteneği olduğu belirlenmiş ve biyofilm oluşturma kapasitesinin varlığı anlaşılmıştır. Jang ve ark. (2016) tarafından belirlenen sonuçlar ile tez kapsamında 96 kuyucuklu plaka yöntemi ile elde edilen sonuçlar birbiri ile benzer niteliktedir.

İki yöntem arasında farklılıkların olması, yöntemlerin birbiri ile kıyaslanmasını sağlamıştır. Tüp yönteminde, inkübasyon sonunda oluşan biyofilm tabakasının yoğunluğu ile doğru orantılı olacak şekilde tüplerin iç çeperlerinde ve tabanında boyanmış biyofilm tabakası gözlenmiştir. Yoğun biyofilm tabakasının olduğu örneklerde kristal viyole ile boyanmış tabakanın daha koyu renkli ve kalın olması, beklenen bir sonuçtur. Ancak tüp yöntemine göre yapılan analizde “orta düzey/yoğun biyofilm oluşumu” olarak değerlendirilen bazı sonuçlar, ikinci yöntemde farklı çıkmıştır. Tüp yönteminde, inkübasyon sonunda mikrobiyel sayım işlemi yapılmamaktadır. Bu nedenle görünür şekilde boyanmış biyofilm tabakası, “orta düzeyde” ya da “güçlü biyofilm düzeyi” olarak belirlenebilmektedir. Ancak, yoğun şekilde boyanmış tabakanın varlığı, test mikroorganizmasının güçlü biyofilm üreten bir suş olarak kabul edilebileceği anlamına gelmeyebilir. Çünkü biyofilm oluşturma düzeyi, ortamdaki hücre yoğunluğu ve yüzeye tutunmuş biyofilm tabakası ile doğrudan ilişkilidir. Yüzeye tutunabilme kabiliyeti az olan bir suşun hücre yoğunluğu arttıkça yüzeye tutunan ve biyofilm tabakası oluşturabilen hücre sayısı da artmaktadır. Bu durumda tüp yöntemi ile biyofilm oluşumu incelendiğinde biyofilm oluşturma yeteneği az ya da yetersiz de olsa, hücre yoğunluğunun fazla olması nedeniyle, boyanmış biyofilm tabakası da yoğun ve kalın olmaktadır. Gözlemlenen boyanmış tabaka, suşun güçlü biyofilm üreticisi olduğu şeklinde yorumlanırsa hatalı bir sonuca varılabilir. Biyofilm oluşum düzeyinin daha net anlaşılabilmesi için, mutlaka ortamdaki hücre yoğunluğu ile beraber değerlendirilmesi gerektiği görüşüne varılmıştır. Sonuçta hücre

yoğunluğu ile karşılaştırma yapılmadığında analiz sonuçları hatalı yorumlanabilmektedir.

Biyofilm oluşturma yeteneği olan bir bakteri kültürü, belirli inkübasyon süresi sonunda biyofilm oluşturma kapasitesi daha düşük düzeyde olan bir bakteri kültürüne göre daha az hücre yoğunluğuna ulaşabilmektedir (EK 2). Bu durumda ortamda meydana gelen biyofilm tabakası da hücre yoğunluğu ile doğru orantılı olarak ince bir katman halinde gözlemlenebilmektedir. Oluşan biyofilm tabakası yoğunluğuna göre değerlendirme yapıldığında, suşun biyofilm oluşturma yeteneğinin zayıf olduğu kanısına varılabilmektedir. Daha fazla hücre yoğunluğuna ulaşan kültürün biyofilm oluşturma düzeyi ise ortamda fazla sayıda yüzeye tutunan hücre bulunduğu için, daha güçlü olarak gözlemlenebilmektedir. Ayrıca, inkübasyon süresi sonunda besiyeri içerisinde hücre yoğunluğu az olan kültürün, biyofilm oluşturma yeteneği olsa bile, tüp çeperi ve tabanına tutunan hücre sayısı da az olacağı için, kristal viyole ile boyanan tabaka açık renkli ve az yoğunlukta olmaktadır. Bu durumda tüp yöntemine göre yapılan analiz sonucunda suşun biyofilm oluşturma düzeyi, “zayıf” olarak belirlenmektedir. Ancak, biyofilm oluşturma kabiliyeti daha zayıf olan ve aynı inkübasyon süresinde daha fazla hücre yoğunluğuna ulaşabilen bir başka kültürün tüp yöntemi ile biyofilm oluşturma yeteneği diğer kültür ile aynı ya da daha yoğun olarak belirlenmektedir. Bu nedenle tüp çeperi ve tabanında gözlenen boyanmış tabakanın yoğun ya da zayıf olması, doğrudan biyofilm oluşturma derecesi ile bağdaştırıldığında, yanlış sonuçlara ulaşılabilir. İnkübasyon sonrasında hücre yoğunluğu belirlenmediği için, tüp yönteminin çok hassas bir yöntem olmadığı (EK 1, EK 2) sonucu ortaya çıkmaktadır (Oliveira ve Cunha 2010, Hassan ve ark. 2011, Devaraj ve Sajjan 2015).

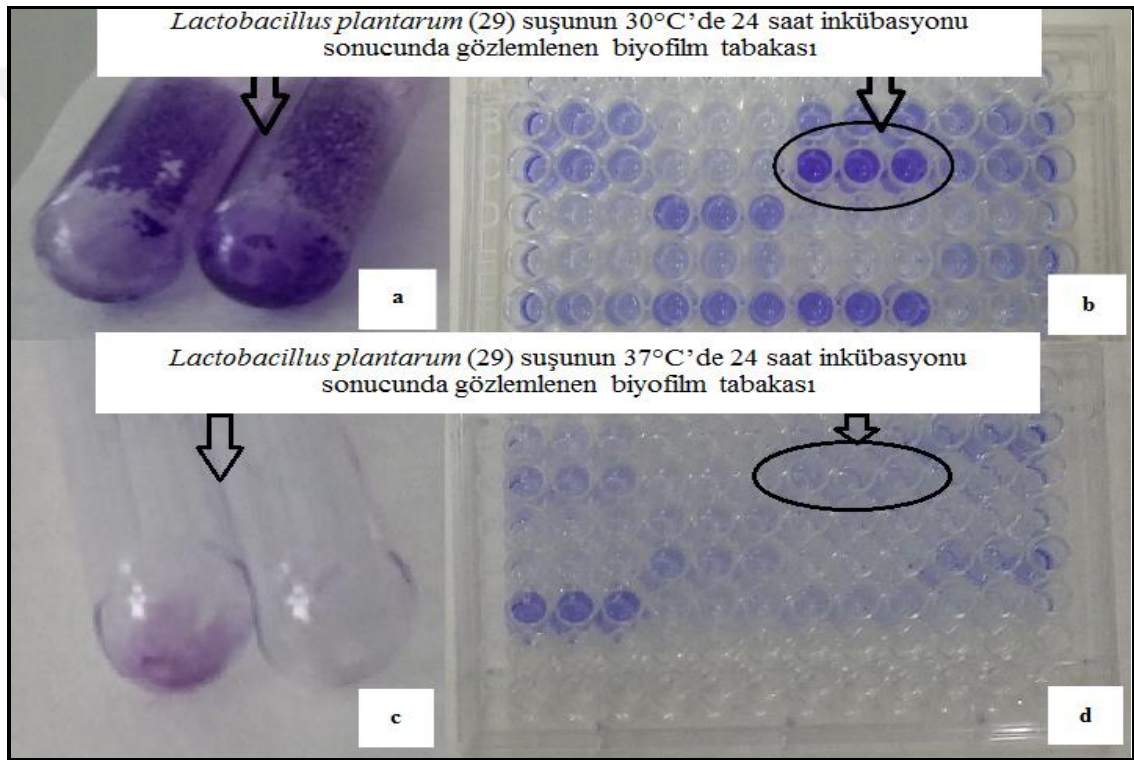
96 kuyucuklu plaka ile gerçekleştirilen denemelerde ise biyofilm tabakası boyanmadan önce, spektrofotometrik yöntemler ile hücre yoğunluğu ölçülmüş, sonrasında ise biyofilm tabakası boyanmıştır. Biyofilm tabakası ne kadar kalın ise tutulan boya da o kadar yoğun olmaktadır. Tutulan boyanın alkol ile serbest hale getirilmesinden sonra boyanın yoğunluğu da spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve biyofilm tabakasına bağlanan boyanın absorbansı, hücre yoğunluğu absorbansına bölünerek biyofilm

oluşturma kapasiteleri değerlendirilmiştir. Bağlı boyanın absorbans değerinin hücre yoğunluğu absorbansına bölünmesi ile suşların hücre yoğunlukları eşitlenmekte ve her bir suşun biyofilm oluşturma dereceleri, hücre yoğunluklarından bağımsız olacak şekilde değerlendirilebilmektedir. Her iki yöntem sonucunda ulaşılan değerler gözlemlenmiş ve 96 kuyucuklu plaka ile yapılan denemelerin daha güvenilir ve hassas sonuçlar verdiği anlaşılmıştır. Hassan ve ark. (2011) yaptıkları çalışmalarda biyofilm oluşumunun belirlenmesinde kullanılan yöntemleri birbiri ile kıyaslamışlardır. Yaptıkları çalışmada tüp yönteminde buldukları bazı sonuçların 96 kuyucuklu plaka yönteminde buldukları sonuçlara benzer olduğunu, ancak genel olarak yalancı pozitif sonuçların tüp yönteminde çok daha sık gözlemlendiğini belirtmektedirler. Mikroplaka ile yapılan spektroskopik yöntemin tüp yöntemine göre çok daha hassas ve doğru sonuçlar verdiği belirtilmektedir (Hassan ve ark. 2011). Bir başka çalışmada da, koagülaz negatif *Staphylococcus* spp.'nin biyofilm oluşturma düzeyi farklı yöntemlere göre belirlenmiştir. Biyofilm oluşumu ile ilgili genler PZR ile tespit edilmiş olup, aynı zamanda da tüp yöntemi ve mikroplaka yöntemi kullanılmıştır. Hem tüp yönteminde, hem de mikroplaka yönteminde alınan sonuçların PZR ile elde edilen sonuçlara yakın olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada tüp yönteminde sadece tüp tabanında meydana gelen boyanmış tabaka varlığı pozitif olarak kabul edilmiş, besiyeri ile havanın birleştiği yerde meydana gelen boyanmış halka şeklindeki tabaka, biyofilm oluşumu ile bağdaştırılmamıştır (Oliveira ve Cunha 2010). Devaraj ve Sajjan (2015) tarafından yapılan çalışmada da biyofilm belirleme yöntemleri birbiri ile karşılaştırılarak, yöntemler arasındaki hassasiyet farkları bulunmaya çalışılmıştır. Sonuçlardaki hassasiyet, mikroplaka yönteminde %98,08 oranında, tüp yönteminde ise %71,88 oranında bulunmuştur. Tez kapsamında, güvenilir ve hassas sonuçların 96 kuyucuklu plaka yöntemi ile elde edildiği, tüp yönteminin hassasiyetinin ise daha düşük olduğu belirlenmiş olup, elde edilen sonuçların benzer çalışmalardaki sonuçlar ile uyumluluk gösterdiği anlaşılmıştır.

Tüp yöntemi kalitatif bir yöntem olduğu için, biyofilm oluşturma derecesinin bu yöntemle göre belirlenmesi yerine, biyofilm oluşumu açısından “var/yok testi” olarak ön denemelerde kullanılmasının daha doğru olacağı sonucuna varılmıştır. Biyofilm

oluşturma kapasitelerinin derecelendirilmesi için ise tüp yöntemi ile yapılan ön denemeler sonucunda biyofilm oluşturabildiği belirlenen suşların 96 kuyucuklu plaka yöntemi ile analiz edilmesi ve sonuçlara göre biyofilm oluşturma seviyelerinin belirlenmesinin daha doğru olduğu düşünülmektedir.

L. plantarum FE29 suşunun 30°C’ de 24 saatlik inkübasyonu sonucunda belirlenen biyofilm oluşturma düzeyi tüp ve 96 kuyucuklu plaka yöntemi ile belirlenmiş ve karşılaştırmalı olarak Şekil 4.10.’da verilmiştir.

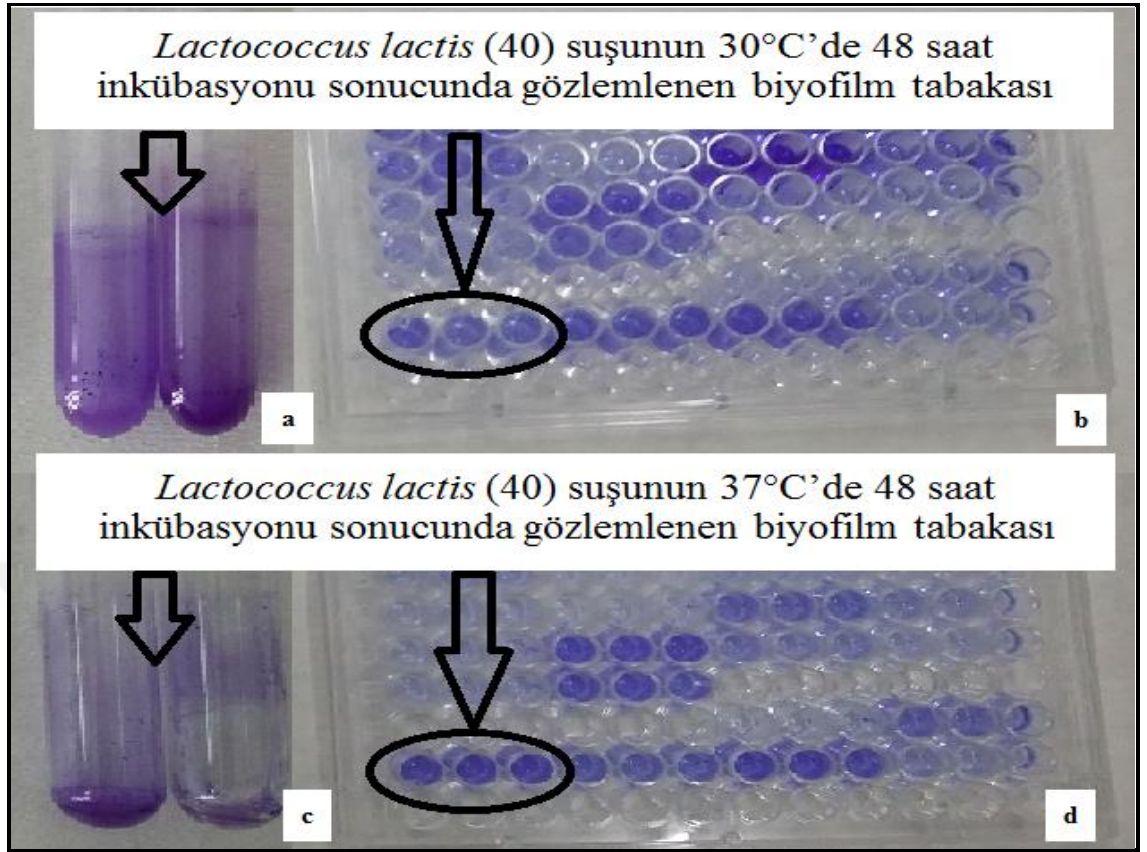


Şekil 4.10. *L. plantarum* FE29 suşunun 30°C ve 37°C’ de 24 saat inkübasyonu sonunda biyofilm oluşturma kapasitesi; “a”, “c”: Tüp yöntemi; “b”, “d”: 96 kuyucuklu plaka yöntemi

Şekil 4.10’ da 30 ve 37°C’ lik inkübasyon koşulları sonucunda oluşan biyofilm düzeyi kristal viyolenin bağlanma miktarına göre görsel olarak incelendiğinde, yoğun ve koyu renkli boyanın varlığı gözlenmektedir. Tüp yönteminde gözden kaçan ve hatalı değerlendirmelere neden olan bu durum, spektrofotometrik ölçüm yapılmadığı takdirde 96 kuyucuklu plaka yönteminde de aynı şekilde ortaya çıkmaktadır. 30°C’ de 24 saat

inkübasyon, laktik asit bakterilerinin bir çoğu için optimum gelişme koşulu olarak bilinmektedir. Bu nedenle aynı süre sonunda 37°C’ de inkübe edilen kültürün, 30°C’ de inkübe edilene göre daha az hücre sayısına ulaşmış olması beklenen bir sonuçtur. Tüp yöntemi sonuçları incelendiğinde, 37°C’ de inkübasyon sonucunda tüp çeperlerinde ve tabanında boyanmış biyofilm tabakasının 30°C’ lik inkübasyonun ardından gözlemlenen biyofilm tabakasına göre daha az olduğu sonucuna varılmış ve bu nedenle oluşum “zayıf düzeyde” olarak nitelendirilmiştir. Ancak 96 kuyucuklu plaka yöntemine göre hücre yoğunluğu absorbansı ile biyofilm tabakasının bağladığı kristal viyole çözeltilisinin absorbansının birbirine oranı, biyofilm oluşturma kapasitesini belirlemektedir. Bu nedenle 30°C’ de daha yoğun ve koyu renkli olarak gözlenen boya ile bağlanmış biyofilm tabakasının nedeninin, ortamdaki hücre yoğunluğunun fazla olması ve dolayısı ile yüzeye tutunan hücre sayısının da fazla olmasından kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Oransal değerlere bakıldığında ise B değerinin 37°C’ de 24 saat inkübe edilen kültürde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak her iki inkübasyon sıcaklığındaki biyofilm oluşturma kapasitesi de “zayıf düzey” aralığındadır (EK 2).

L. lactis FE40 suşunun 30 ve 37°C’ de 48 saat süre ile inkübasyonu sonucunda oluşturduğu biyofilm tabakası da hem tüp, hem de 96 kuyucuklu plaka yöntemi ile belirlenmiş ve Şekil 4.11’ de her iki yönetime göre karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

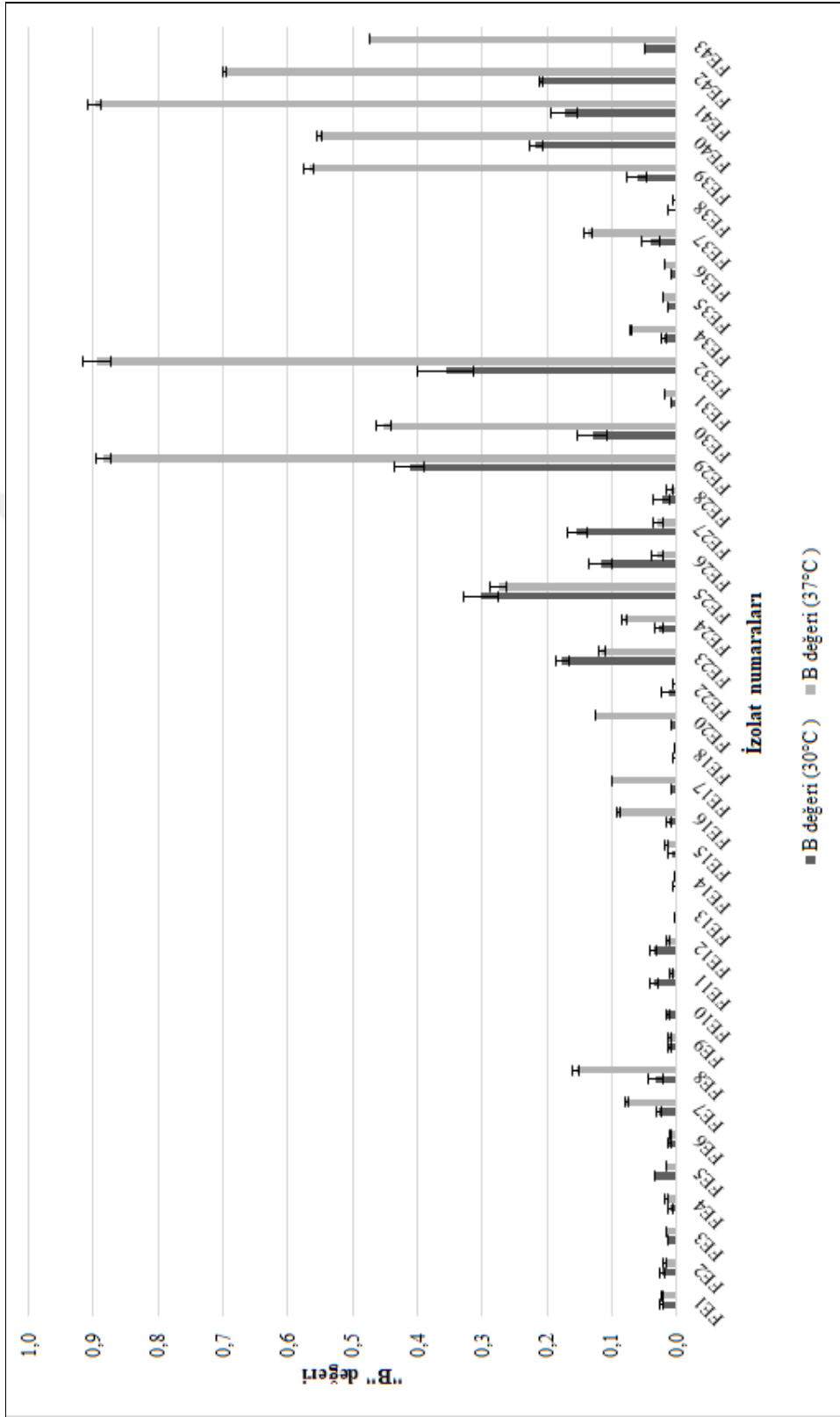


Şekil 4.11. *L. lactis* FE40 suşunun 30°C ve 37°C’ de 48 saat inkübasyonu sonunda biyofilm oluşturma kapasitesi; “a”, “c”: Tüp yöntemi; “b”, “d”: 96 kuyucuklu plaka yöntemi

L. lactis FE40 suşunun 30 ve 37°C’ de 48 saatlik inkübasyonu sonucunda biyofilm oluşturma kapasiteleri belirlenmiştir. Tüp ve 96 kuyucuklu plaka yöntemine ait sonuçlar karşılaştırılmıştır. Şekil 4.11’ de görüldüğü gibi bağlanan boya miktarı tüp çeperlerinde ve plaka kuyucuklarında benzer görünmektedir. Ancak hücre yoğunluklarının birbiririnden farklı olduğu, 96 kuyucuklu plaka yönteminde inkübasyon sonunda ölçülen absorbans değerleri ile anlaşılmıştır. Hücre yoğunlukları ve bağlanan boya miktarları birbirinden farklı olan iki ayrı inkübasyon koşulu sonucu göz önüne alındığında, 37°C’ lik inkübasyon koşulunda daha az hücre gelişimi gözlenmesine rağmen, biyofilm oluşturma kapasitesinin arttığı anlaşılmıştır. 96 kuyucuklu plaka yönteminde alınan sonuçlara göre 30°C’ de 48 saat inkübasyon sonucunda “zayıf düzey” biyofilm oluşumu gözlenirken, 37°C’ de 48 saat inkübasyon sonucunda “orta düzey” biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir (EK 2).

Biyofilm oluşumunun daha çok patojen mikroorganizmalarda gözlenen bir özellik olduğu ve patojenlerin virülens özelliklerinin artması, daha dirençli hale gelmeleri gibi insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen sonuçlara yol açtığı da bilinmektedir. Ancak biyofilm, sağlığı olumsuz yönde etkileyen mikroorganizmalarda engellenilmeye çalışılan bir özellik olmasına rağmen, insan sağlığına faydalı mikroorganizmalarda ise istenilen bir özellik haline gelebilmektedir. Yararlı mikroorganizmaların daha dayanıklı olmaları ve patojen mikroorganizmalar ile savaşmaları açısından biyofilm oluşturan suşların belirlenmesi gerektiği düşünülmektedir (Gün ve Ekinci 2009, Erginkaya ve ark. 2011).

Tez kapsamında analiz edilen laktik asit bakterilerinin biyofilm oluşturma özellikleri belirli gelişme koşulları altında belirlenmiştir. İnsan sağlığına faydalı olan mikroorganizmaların kullanımı söz konusu olduğunda gıdanın tüketimi ile vücuda alınan LAB suşlarının sindirim sisteminde uzun süre canlılığını koruması ve biyofilm oluşturma kapasitesinin devamlılık göstermesi önemlidir. Ayrıca fermente bir gıda üretiminde starter olarak kullanıldığında, doğal koruyucu özellik göstererek, gıdanın tazeliğini uzun süre muhafaza edebilmesi için biyofilm oluşturma kapasitesinin saklama koşullarında azalmaması ya da kaybolmaması gerekmektedir. Yapılan *in vitro* analiz sonuçlarına göre, 24 saatlik inkübasyon sonunda biyofilm oluşturabildiği gözlemlenen bazı laktik asit bakterilerinin 48 saatlik inkübasyon sonunda biyofilm oluşturma derecelerinin azaldığı ya da biyofilm oluşturma özelliklerinin tamamen engellendiği belirlenmiştir. Bu nedenle 48 saatlik inkübasyon sonunda gözlemlenen biyofilm oluşturma kapasiteleri, suşların gıda endüstrisinde kullanımı açısından önemli bir faktör haline gelmektedir. Ayrıca, insan sindirim sisteminde 48 saat sonunda bile biyofilm oluşturabilme ihtimali yüksek olan suşların seçilmesi gerekliliği de dikkat çekmektedir. 48 saatlik inkübasyon sonucunda laktik asit bakterilerinin hem 30, hem de 37°C’ de biyofilm oluşturma kapasiteleri Şekil 4.12’ de verilmiştir.



Şekil 4.12. Laktik asit bakterilerinin 30 ve 37°C’ de 48 saat inkübasyonu sonucunda belirlenen biyofilm oluşturma kapasiteleri

48 saatlik inkübasyon sonunda en yoğun biyofilm oluşumu *L. curvatus* FE41 suşunda 37°C’ de gözlemlenmiştir. Aynı inkübasyon koşullarında biyofilm oluşum yoğunluğu açısından, *L. curvatus* FE41 suşunu, *L. lactis* FE32 ve *L. plantarum* FE29 takip etmektedir. Inkübasyon sıcaklığının 30°C olduğu koşullarda ise 48 saat sonunda *L. plantarum* FE29 suşunun en yoğun biyofilm oluşturan kültür olduğu anlaşılmıştır. Çalışmada elde edilen biyofilm oluşturma değerleri Gómez ve ark. (2016) ve Kumar ve ark. (2017)’ nin yaptıkları çalışma sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

Köy peynirinden izole edilen *E. faecalis* FE28 suşunun biyofilm oluşturma kapasitesi tüp ve mikropkaka yöntemlerinde birbirinden farklı bulunmuştur. Tüp yönteminde farklı inkübasyon koşullarında zayıf ve orta derecede biyofilm üreticisi olarak belirlenen *E. faecalis* FE28 suşunun, mikropkaka ile belirlenen spektroskopik yöntemde dört ayrı inkübasyon koşulunda da biyofilm oluşturmamış sonucuna varılmıştır. 96 kuyucuklu plaka ile alınan sonuçlar daha hassas ve güvenilir oldukları için, *E. faecalis* FE28 suşunun biyofilm üreticisi olmadığı belirlenmiştir. Necidová ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, *E. faecalis* ve *E. faecium* suşları çiğ süt ve süt ürünlerinden izole edilerek biyofilm oluşturma kapasiteleri araştırılmıştır. *E. faecalis* suşlarının %28’ inin biyofilm oluşturabildiği, %72’ sinin ise oluşturamadığı belirlenmiştir. Ayrıca bir başka çalışmada ortamdaki ozmotik basıncın artması ile *E. faecalis* suşlarının biyofilm oluşturma kapasitelerinin azaldığı, ancak bakterilerin gelişme eğrilerinde değişiklik olmadığı belirtilmektedir (Mohamed ve Huang 2007). Önceden yapılan çalışma sonuçları dikkate alındığında, *E. faecalis* suşlarının farklı stres koşullarında farklı düzeyde biyofilm oluşturdıkları ve bazılarının da biyofilm oluşturmamış olduğu anlaşılmaktadır. Tez kapsamında elde edilen sonuçlar da, önceki çalışmalar ile uyum göstermektedir.

Tanımlanan 40 adet laktik asit bakterisi kültürleri arasında 21 tanesi, çalışmada belirlenen koşullarda zayıf, orta ve güçlü düzeyde biyofilm oluşturabilmiş, ancak diğer suşlar biyofilm oluşturmamışlardır. Her suşun kendine özgü biyofilm oluşturma koşullarının olabileceği göz önünde bulundurularak, çalışmada biyofilm oluşturmamış suşların, hiçbir koşulda biyofilm oluşturmamış kanısına varmanın hatalı olacağı

düşünülmektedir. Suşların farklı inkübasyon koşullarında biyofilm oluşturabilecekleri göz önünde bulundurulmalıdır (Jalilsood ve ark. 2015).

Çalışmada izole edilerek tanılanan LAB suşlarının biyofilm oluşturma kapasitelerinin belirlenmesi için seçilen stres koşulları uzun inkübasyon süresi (48 saat) ve iki ayrı inkübasyon sıcaklığı (30 ve 37°C) olacak şekilde planlanmıştır. Antimikrobiyel bir ajanın da ortamda bulunması, mikroorganizma için farklı bir stres ortamı yaratmaktadır. Mikroorganizmaların biyofilm tabakası içinde iken planktonik formlarına göre zor koşullara karşı daha dirençli oldukları bilinmektedir. Bu bağlamda, mikroorganizmalarda antibiyotik dirençliliğin de biyofilm oluşumunun bir sonucu olabileceği düşüncesi ortaya çıkmaktadır. Ancak tetrasiklin gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerin biyofilm tabakasını aşarak mikroorganizmalara ulaşabileceği ve mikrobiyel inhibisyonu sağlayabileceği (Oliveira ve Cunha 2010) de bilinmektedir.

4.4. Tanılanan Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençleri disk difüzyon yöntemine göre belirlenmiş ve zon çapı ölçümlerine ait sonuçlar EK 3' te verilmiştir.

Çalışmada kullanılan laktik asit bakterilerinin antibiyotiklere karşı dirençlerinin belirlenmesi açısından yapılan disk difüzyon metodu ile zon çapı ölçümü sonuçlarına göre; izolatların çoğunun analizlerde kullanılan konsantrasyondaki (30µg) Vankomisin'e karşı dirençli oldukları belirlenmiştir. En büyük zon oluşumları ise Tetrasiklin (50µg) ve Ampisilin (25µg) emdirilmiş disklerin bulunduğu petrilere gözlemlenmiştir. Streptomisin emdirilmiş disklerin bulunduğu petri kutularında ise konsantrasyon arttıkça zon çapının arttığı, dolayısı ile antimikrobiyel etkinin de arttığı gözlemlenmiştir. 25 µg Streptomisin emdirilmiş disklerin ve 30 µg Vankomisin emdirilmiş disklerin etrafında zon oluşumu genel olarak gözlenmemiştir. Zon oluşumu gözlenen petri kutularında ise antibiyotik disk etrafındaki zon çaplarının, denemede kullanılan diğer antibiyotik disklere oranla daha küçük olduğu tespit edilmiştir.

Tanımlanan LAB suşlarının antibiyotik dirençlilik durumları Çizelge 4.4' te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Tanımlanan LAB suşlarının antibiyotik dirençlilikleri

Bakteri	İzolat No	Antibiyotik (µg)			
		ST(300)	AM(25)	TS(50)	VA(30)
<i>Lactobacillus</i> spp.	FE26	R	---	---	R
<i>Lactobacillus curvatus</i>	FE25	---	---	---	R
	FE41	---	---	---	R
<i>Lactobacillus plantarum</i>	FE20	---	---	---	---
	FE29	---	---	---	R
	FE31	R	---	---	R
	FE34	---	---	---	R
	FE35	---	---	---	R
	FE36	---	---	---	R
	FE37	---	---	R	R
	FE1	---	---	---	R
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	FE2	---	---	---	R
	FE3	---	---	---	R
	FE4	---	---	---	R
	FE27	---	---	---	R
<i>Lactobacillus curvatus,</i> <i>Lactobacillus graminis,</i> <i>Lactobacillus sakei</i>	FE42	---	---	---	R
	FE8	R	---	---	R
	FE22	---	---	---	---
<i>Lactococcus lactis</i>	FE24	---	---	---	---
	FE30	---	---	---	---
	FE32	---	---	---	---
	FE38	---	R	---	---
	FE39	---	---	R	---
	FE40	---	R	---	---
	FE13	---	---	---	---
	FE15	---	R	---	R
<i>Leuconostoc</i> spp.	FE17	---	---	---	---
	FE6	R	R	---	R
<i>Leuconostoc citreum</i>	FE9	---	R	---	R
	FE11	---	---	---	---
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	FE18	---	---	---	---
	FE43	---	---	---	R
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	FE10	---	R	---	R
<i>Leuconostoc lactis,</i>	FE5	---	---	---	R
<i>Leuconostoc garlicum</i>	FE12	---	---	---	R
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides,</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	FE14	---	R	---	---
<i>Weissella</i> spp.	FE7	R	R	---	R
<i>Weissella cibaria</i>	FE16	---	R	---	---
	FE23	---	---	---	R
<i>Enterococcus faecalis</i>	FE28	---	---	---	R

ST: streptomisin, AM: ampicilin, TS: tetrasiklin, VA: vankomisin

R: Resistant (dirençli)

---: antibiyotik dirençlilik durumu belirlenemedi

Suşların antibiyotik dirençlerinin belirlenmesinde, NCCLS standartlarında (Yalanca 2009, Alp ve Öner 2014, Ünal Turhan ve Erginkaya 2016) belirtilen koşullarından (besiyeri, antibiyotik konsantrasyonu ve inkübasyon sıcaklık-süresi) farklı bir deneme planı kullanılmıştır. Bu nedenle, NCCLS standardında belirlenen zon çapı büyüklüğüne göre suşlar; dirençli (R), orta dirençli (I) ve duyarlı (S) olarak belirlenememiştir. Ancak, zon çapı oluşumunun gözlenmediği petrilerde, denemede kullanılan konsantrasyondaki antibiyotiğe direnç olduğu sonucuna varılmıştır. Dirençli (R) oldukları belirlenen suşlar dışında, gözlemlenen inhibisyon zonları ise çap boyutuna göre karşılaştırılmış ve suşların duyarlılıkları birbirleri ile kıyaslanabilmiştir. Gözlemlenen zon çapı büyüklükleri, önceki çalışmalar ile de karşılaştırılmıştır. Suşların antibiyotiklere dirençleri MAR indeks değerleri belirlenerek yorumlanmıştır. Tanılanan LAB suşlarının çoklu antibiyotik dirençliliği (MAR) indeksi Çizelge 4.5’ te verilmiştir.

Çizelge 4.5. LAB suşlarının MAR indeksi değerleri

Bakteri	İzolat No	MAR indeksi
<i>Lactobacillus</i> spp.	FE26	0,50
	FE25	0,25
<i>Lactobacillus curvatus</i>	FE41	0,25
	FE20	0,00
	FE29	0,25
<i>Lactobacillus plantarum</i>	FE31	0,50
	FE34	0,25
	FE35	0,25
	FE36	0,25
	FE37	0,50
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	FE1	0,25
	FE2	0,25
	FE3	0,25
	FE4	0,25
<i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus graminis</i> , <i>Lactobacillus sakei</i>	FE27	0,25
	FE42	0,25
<i>Lactococcus lactis</i>	FE8	0,50
	FE22	0,00
	FE24	0,00
	FE30	0,00
	FE32	0,00
	FE38	0,25
	FE39	0,25
	FE40	0,25
<i>Leuconostoc</i> spp.	FE13	0,00
	FE15	0,50
	FE17	0,00

Çizelge 4.5. LAB suşlarının MAR indeksi değerleri (devam)

Bakteri	İzolat No	MAR indeksi
<i>Leuconostoc citreum</i>	FE6	0,75
	FE9	0,50
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	FE11	0,00
	FE18	0,00
	FE43	0,25
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	FE10	0,50
<i>Leuconostoc lactis</i> ,	FE5	0,25
<i>Leuconostoc garlicum</i>	FE12	0,25
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	FE14	0,25
<i>Weissella</i> spp.	FE7	0,75
<i>Weissella cibaria</i>	FE16	0,25
	FE23	0,25
<i>Enterococcus faecalis</i>	FE28	0,25

Suşların çoğunluğunun MAR indeksi değerinin 0,25-0,75 arasında olduğu belirlenmiş olup, yoğun antibiyotik kullanımının olduğu ortamlardan izole edildikleri anlaşılmıştır. Antibiyotik kullanımının çok az olduğu ya da hiç olmadığı ortamlardan izole edilen kültürlerde MAR indeksi değeri 0,20' nin altında çıkmaktadır. Tanılanan LAB suşlarının %22,5 'inin (9 adet) antibiyotik kullanımının olmadığı ortamlardan izole edildiği anlaşılmıştır. Özellikle *L. lactis* ve *Leu. mesenteroides* suşlarının antibiyotik kullanımının olmadığı ortamlardan izole edildiği belirlenmiştir. Özellikle süt ürünlerinden izole edilen suşlarda MAR indeksi değerinin yüksek çıkması, ham madde olarak kullanılan sütte antibiyotik varlığı ihtimalini ortaya çıkarmaktadır. Halk pazarlarında paketli ya da paketsiz olarak satışa sunulan bu ürünlerin sağlığı tehdit edebilecek antibiyotik dirence sahip suşlar içerebildiği anlaşılmıştır. Antibiyotik direnç mekanizmasının belirlenmesi, suşların gıda endüstrisinde güvenli şekilde kullanılabilmesi açısından önem taşımaktadır. Zeytinden izole edilen suşlarda MAR indeksinin yüksek çıkması ise yanlış zirai uygulamaların (pestisit kullanımı vb.) yapılmış olabileceği ihtimalini ortaya çıkarmaktadır.

Streptomisin 25 µg dozunda zon oluşumu gözlemlenen suşlar arasında en duyarlı bakterinin *Leu. mesenteroides* FE43 olduğu saptanmıştır. Flórez ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada süt ve ürünlerinden izole edilen *Leuconostoc* cinsine ait türlerin antibiyotiklere karşı duyarlılıkları araştırılmış olup, *Leuconostoc* spp.' nin

streptomisine duyarlılıklarının 2-128 µg/mL konsantrasyon aralığında olduğu, ancak *Leuconostoc* cinsine ait bir suşun (LbE16) 128 µg/mL konsantrasyonda canlı kalabildiği bildirilmektedir. Streptomisin dozu arttıkça, tez kapsamında kullanılan birçok laktik asit bakterisinin de inhibe olduğu anlaşılmıştır. Elde edilen bulguların Flórez ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışma sonuçları ile uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. Flórez ve ark. (2016) çalışmalarında *Leuconostoc* spp. suşlarını süt ve ürünlerinden izole etmişlerdir. Bu çalışmada ise 300 µg Streptomisin'e dirençli *Leu. citreum* suşu ham zeytin örneğinden izole edilmiştir. Flórez ve ark.'nın (2016) buldukları sonuçlardan farklı olarak, çalışmada izole edilen *Leu. citreum* suşunun streptomisinin yüksek konsantrasyonlarına dahi dirençli olduğu belirlenmiştir. Denemede kullanılan 300µg Streptomisin emdirilmiş disklerin çevresinde zon oluşumu *Leu. citreum* FE6, *Weissella* spp. FE7, *L. lactis* FE8, *Lactobacillus* spp. FE26 ve *L. plantarum* FE31 suşları hariç, diğer laktik asit bakterilerinin tamamında gözlemlenmiştir. Gad ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada süt ürünleri ve probiyotik ilaçlardan izole edilen *Lactobacillus* cinsine ait türlerin çoğunluğunun streptomisin (%17,4) ve vankomisine (%40,6) karşı dirençli oldukları belirtilmektedir. Çalışmada Vankomisin (30µg)'e en duyarlı suşların 11 mm'lik zon çapı ile *L. lactis* FE24 ve *L. lactis* FE30 oldukları belirlenmiştir. Laktik asit bakterilerinde doğal ve kazanılmış antibiyotik direncinin olduğu bilinmekte olup (Mathur ve Singh 2005, Tatlı 2009), özellikle *Lactobacillus* ve *Leuconostoc* cinsine ait türlerde Vankomisin' e karşı doğal direncin olduğu önceki çalışmalarda belirtilmektedir (Özteber 2013). Antibiyotik direnci denemesi sonuçları göz önüne alındığında, çalışmada tanımlanan laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus* spp. ve *Leuconostoc* spp. türlerinin genel olarak Vankomisin' e dirençli oldukları gözlemlenmiştir. Jose ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada yoğurt, peynir örnekleri ile rumenden izole ettikleri LAB suşlarının antibiyotik dirençliliklerini incelemişlerdir. Denemede kullanılan tüm laktik asit bakterilerinin (*L. reuteri*, *L. rhamnosus* ve *L. plantarum* suşları) Streptomisin (10 µg) ve Vankomisin (30 µg) antibiyotiklerine dirençli oldukları belirtilmektedir. *L. rhamnosus* suşlarının Tetrasiklin (30 µg) ve Ampisiline (10 µg) duyarlı oldukları, *L. plantarum* suşlarının Ampisilin' e (10 µg) duyarlı, Tetrasiklin' e (30 µg) ise orta seviyede dirençli oldukları belirtilmektedir. Tez kapsamında *L. plantarum* suşlarının antibiyotik dirençlilikleri ile ilgili elde edilen

sonuçların da benzer nitelikte olduğu anlaşılmaktadır. Zhang ve ark. (2013) ile Ünal Turhan ve Erginkaya (2016) tarafından yapılan çalışmada da benzer sonuçların elde edildiği belirtilmektedir. Ayrıca *L. rhamnosus* ve *L. casei* de dâhil olmak üzere birçok *Lactobacillus* spp. türünün Vankomisin' e karşı doğal dirençli olduğu belirtilmektedir (Ashraf ve Shah 2011).

Çalışmada tanılanan laktik asit bakterilerinin Ampisilin (25µg) ve Tetrasiklin' e (50µg) karşı oldukça duyarlı oldukları anlaşılmıştır. Denemede kullanılan tüm antibiyotikler dikkate alındığında, direnci en yüksek olan suşların, *Leu. citreum* FE6 ve *Weissella* spp. FE7 olduğu tespit edilmiştir. Her iki suş da sadece Tetrasiklin' e (50µg) duyarlılık göstermiştir, ancak disk çevresinde oluşan zon çapları diğer suşlarda gözlemlenenlerden daha küçük bulunmuştur. Flórez ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada ise izole edilen *Leuconostoc* spp. suşlarının Ampisilin gibi β-laktam antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları bildirilmektedir. Tez kapsamında elde edilen verilere göre genel olarak antibiyotik dirençliliği en yüksek suşların *Leu. citreum* FE6 ve *Weissella* spp. FE7 olduğu ve bunları *Leu. pseudomesenteroides* FE10 suşunun takip ettiği gözlemlenmiştir. Denemede kullanılan antibiyotik disklerin etrafında oluşan zon çapları dikkate alındığında, antibiyotik duyarlılığı en yüksek olan suşun *L. lactis* FE30 olduğu belirlenmiştir.

Laktik asit bakterilerinde antibiyotik direnci ile ilgili çalışmalarda bazı tutarsızlıklar söz konusudur. Özellikle besiyeri seçiminde, kullanılan antibiyotik ile etkileşime girmeyecek besiyeri ile çalışılması, sonuçların doğruluğu açısından önem taşımaktadır. Kullanılan besi ortamının test mikroorganizmasının gelişimini desteklediği ve kullanılan antibiyotik ile etkileşiminin olmadığı konusunda emin olunmalıdır (Özteber 2013). Laktik asit bakterilerinde antibiyotiklere karşı duyarlılık testleri önemli olup, kullanılacak en yüksek antibiyotik konsantrasyonunun belirlenebilmesi açısından minimum inhibisyon değerlerinin (MİK) belirlenmesi önem taşımaktadır. Ayrıca, laktik asit bakterilerinin antibiyotiklere duyarlılık göstermelerinin haricinde, antibiyotik direnç genlerini taşıdıkları ve bu genleri aktarabilecekleri de bilinmektedir. Direnç genlerinin aktarılabılır/aktarılamaz olması, bakteriyel suşa göre farklılık göstermektedir. Özellikle

günümüzde gıda endüstrisinde fermente gıdalar sıklıkla tüketilmekte ve sorumlu mikroorganizmalar insan vücuduna girmektedir. Böylece antibiyotik direnç genleri patojen ya da kommensal diğer mikroorganizmalara aktarılabilmektedir. Özellikle *Lactobacillus* spp. türlerinde antibiyotik direnç geni bulunduğu bilinmektedir. Bazı antibiyotiklere karşı direnç genleri bulunmasına rağmen, laktik asit bakterilerinde antibiyotiklere karşı doğal duyarlılık da mevcuttur. Protein sentezini engelleyerek inhibisyon sağlayan tetrasiklin, eritromisin gibi antibiyotiklere karşı birçok laktik asit bakterisi suşunun duyarlı olduğu bilinmektedir (Özteber 2013). Tez kapsamında izole edilerek tanısı yapılan laktik asit bakterileri arasında *L. plantarum* FE37 ve *L. lactis* FE39 suşları hariç, diğer laktik asit bakterilerinin tetrasikline karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir.

Çalışma kapsamında biyofilm oluşumu ile antibiyotik dirençliliği arasında bir korelasyon tespit edilememiştir. Oliveira ve Cunha (2010) yaptıkları çalışmada *Enterococcus* spp. suşlarının antibiyotik dirençliliklerini ve biyofilm oluşturma kapasitelerini incelemişlerdir. Suşların gentamisin ve streptomisin dirençliliği ile biyofilm oluşumu arasında korelasyon olduğu, ancak oksitetrasiklin dirençliliği ile biyofilm oluşumu arasında korelasyon olmadığı belirtilmektedir. Bu çalışma sonuçları göz önüne alındığında Oliveira ve Cunha (2010) ile benzer nitelikte veriler elde edildiği tespit edilmiştir. Başka çalışmalarda ise tez kapsamında belirlenen sonuçlardan farklı olarak antibiyotik dirençliliği olan LAB suşlarının genellikle biyofilm tabakası da oluşturabildiği belirtilmektedir (Zhang ve ark. 2013, Devaraj ve Sajjan 2015, Gómez ve ark. 2016).

5. SONUÇ

Çalışmada elde edilen sonuçlar, maddeler halinde özetlenmiştir;

1. Farklı pazarlardan temin edilen ham zeytin, çiğ süt ve köy peyniri örneklerinden izole edilen bakterilerin biyokimyasal ve moleküler yöntemler ile tanılanması sonucunda 40 izolatın LAB suşu olduğu belirlenmiştir.
2. Tanılama sonuçlarına göre, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Weissella* ve *Enterococcus* cinslerine ait türlerin izole edildiği belirlenmiş olup, genel olarak *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. graminis*, *L. sakei*, *Leu. lactis*, *Leu. garlicum*, *Leu. citreum*, *Leu. pseudomesenteroides*, *Leu. mesenteroides*, *W. cibaria*, *L. lactis* ve *E. faecalis* türlerine rastlanmıştır.
3. İzolatların sekans analizi sonuçlarına göre en çok *L. lactis* (% 20) ve *L. plantarum* (% 17,5) türlerine, çok düşük oranlarda da *L. rhamnosus* spp. (% 2,5) *Weissella* spp. (% 2,5), *Leu. pseudomesenteroides* (% 2,5) ve *E. faecalis* (% 2,5) cins ve türlerine rastlanmıştır. Ham zeytin örneklerinden en çok *Leuconostoc* spp., çiğ süt örneklerinden *Lactobacillus* spp. ve köy peyniri örneklerinden de genel olarak *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactococcus* spp. izole edilmiştir.
4. Çiğ süt örneklerinden sadece *L. rhamnosus* suşları, köy peyniri örneklerinden ise baskın tür olarak *L. lactis* suşları izole edilmiştir.
5. İşlenmemiş yeşil zeytin örneklerinden Aydın çeşidi olanlar arasında en çok *Leu. citreum*, Gemlik çeşidi olanlar arasında ise en çok *Leu. mesenteroides* suşlarına rastlanmıştır. İşlenmemiş yeşil-siyah zeytin numuneleri 2 adet olup, Gemlik çeşidi olandan *Leu. mesenteroides*, İznik çeşidi olandan ise *L. plantarum* suşu izole edilmiştir.

6. Tanılanan suşların biyofilm oluşturma kapasiteleri iki yöntem ile belirlenmiştir.
 - a. Tüp yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre, LAB suşlarının yarıdan fazlasının (%55-82,5) farklı inkübasyon koşullarında zayıf biyofilm oluşturduğu, az sayıda suşun (%2,2-10) orta düzeyde ve yine çok az sayıda suşun da (%2,2-10) güçlü biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir.
 - b. Mikroplaka yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre ise suşların yarısının biyofilm oluşturamadığı belirlenmiştir. Biyofilm oluşturabilen suşların çoğunun “zayıf biyofilm üreticisi” oldukları belirlenmiş olup, sadece bir suşun (*L. lactis* FE30) “24 saat-37°C” inkübasyon koşulunda güçlü biyofilm oluşturabildiği belirlenmiştir.
7. Tüp ve mikroplaka yöntemleri ile belirlenen biyofilm oluşturma kapasiteleri karşılaştırıldığında, spektroskopik ölçüme dayalı yöntem olan 96 kuyucuklu plaka ile elde edilen sonuçların daha güvenilir olduğu belirlenmiştir.
8. Mikroplaka yöntemi sonuçlarına göre, bitkisel kökenli izolatların (15 adet) %40 ‘ının (6 adet), süt kökenli izolatların (25 adet) ise %60’ ının (15 adet) farklı koşullarda biyofilm oluşturabildiği anlaşılmıştır.
9. Çoklu antibiyotik direnci indeksi sonuçlarına göre izolatların %22,5’ inin (9 adet) antibiyotik bulunmayan ortamlardan izole edildiği anlaşılmıştır. Bu suşlardan %55,5’ inin (5 adet) bitkisel, %44,5’ inin (4 adet) ise süt kökenli olduğu belirlenmiştir.
10. MAR indeksi 0,00 olarak hesaplanan süt kökenli *L. lactis* FE 30 ve *L. lactis* FE32 suşlarının “orta” ve “güçlü” düzeyde biyofilm üreticisi oldukları belirlenmiştir.

11. *Lactobacillus* cinsine ait 16 suştan onbeş tanesinin 30µg-vankomisine karşı dirençli olduğu, ancak tamamının 25µg-ampisiline duyarlı olduğu belirlenmiştir.
12. *Leuconostos* cinsine ait 12 suşun tamamının 300µg-streptomisin ve 50µg-tetrasikline duyarlı oldukları, ancak yedi tanesinin 30µg-vankomisine karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir.
13. Tanılanan 3 adet *Weissella* spp. suşlarından bir tanesinin denemede kullanılan tüm antibiyotiklere karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir.
14. *L. lactis* suşlarının denemede kullanılan antibiyotiklere karşı genel olarak duyarlı oldukları, *E. faecalis* suşunun ise 30µg-vankomisine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.
15. 30°C’ de 48 saatlik inkübasyon sonunda biyofilm oluşturabilen 12 adet laktik asit bakterisi suşlarının tamamının “zayıf düzeyde” biyofilm oluşturabildikleri anlaşılmıştır. Bu suşların ise *Lactobacillus* spp., *Weissella* spp., *Lactococcus* spp. ve *Leuconostoc* spp. olduğu belirlenmiştir. Zayıf biyofilm üreticisi oldukları belirlenen suşların çoğunluğunun 30µg-vankomisine dirençli oldukları, bazılarının tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu, genel olarak da 50µg-tetrasiklin ve 25µg-ampisiline duyarlı oldukları belirlenmiştir.
16. İzole edilerek tanılanan LAB suşlarının 30°C’ de 48 saatlik inkübasyon koşulları sonunda belirlenen antibiyotik direçlilikleri ile biyofilm oluşturma kapasiteleri arasında korelasyon tespit edilememiştir.
17. Antibiyotik direnci denemesi sonuçları göz önüne alındığında, çalışmada tanılanan laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus* spp. ve *Leuconostoc* spp. türlerinin genel olarak vankomisine dirençli oldukları gözlemlenmiştir. Bu direnç mekanizması moleküler düzeyde de araştırılarak, tanısı yapılan LAB

suşlarında doğal ya da sonradan kazanılmış direnç mekanizmalarının varlığının tespit edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Biyofilm oluşumu ile mikroorganizmaların daha dirençli hale geldikleri bilinmektedir. Bu nedenle özellikle gıda sanayiinde kullanılan starterin uzun ömürlü olabilmesi açısından biyofilm oluşturabilen suşların seçilmesinin avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca fonksiyonel gıdalar da günümüzde araştırılan alanlar arasında bulunmaktadır. Fermente gıdalarda, laktik asit fermentasyonu özellikle süt ürünlerinde (yoğurt, kefir, peynir vb.) en önemli aşama olarak kabul edilmektedir. Bu ürünlerde kullanılan starter laktik asit bakteri kültürlerinin ayrıca probiyotik özellik taşımaları, o gıda ürünü fonksiyonel bir gıda haline getirmektedir. Birden fazla özelliğin tek bir üründe toplanması ile fonksiyonel gıda ortaya çıkmaktadır. Probiyotik mikroorganizmalar, ürettikleri metabolitleri sayesinde ortamda bulunan patojen mikroorganizmalar ile de yarışabilmekte ve özellikle sindirim sisteminde hâkim mikrobiyota haline gelebilmektedir. Bu mikroorganizmaların biyofilm oluşturabilmelerinin, olumsuz koşullarda ve özellikle patojenler ile savaşmada onlara dayanıklılık sağlayacağı düşünülmektedir.

Özellikle probiyotik suşlarda aranan özelliklerden biri olan sindirim sisteminde tutunabilme ve hızlı kolonize olabilme yeteneğinin de biyofilm oluşumu ile desteklenebileceği düşünülmektedir. Özellikle LAB üyeleri arasında sıklıkla rastlanan probiyotik bakterilerden biyofilm oluşturabilen suşların bağırsak mukozasına kolay bir şekilde tutunabileceği ve zamanla biyofilm oluşturarak dış koşullara karşı daha dirençli hale geleceği düşünülmektedir. İnsan sağlığına faydalı birden fazla özelliğin starterde bulunması ile de sağlıklı fermente gıdaların üretilebileceği sonucuna varılmaktadır. Bu nedenle biyofilm oluşturabilen LAB suşlarının gıda üretiminde yeni starterler olabileceği ve dolayısı ile insan sağlığını da olumlu etkileyebileceği düşünülmektedir.

Bundan sonraki çalışmalarda ise, antibiyotik dirençliliği tespit edilen suşlarda antibiyotik direnç genlerinin tespit edilmesi ile direnç mekanizmalarının belirlenmesi

ve LAB suşlarının ticari ve probiyotik özelliklerinin de belirlenerek, yeni ürün geliştirmede kullanılacak suşların ortaya konulması gerektiği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdellah, M., Ahcène, H., Benalia, Y., Saad, B., Abdelmale, B. 2015.** Evaluation of biofilm formation by exopolysaccharide producer strains of thermophilic lactic acid bacteria isolated from Algerian camel milk. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(6): 513-521.
- Abebe, G.M. 2013.** Çeşitli gıda örneklerinden izole edilen *Enterobacter sakazakii*'nin biyofilm oluşumunun araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Adesulu-Dahunsi, A.T., Sanni, A.I., Jeyaram, K. 2017.** Rapid differentiation among *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Weissella* species from some Nigerian indigenous fermented foods. *LWT - Food Science and Technology*, 77(2017): 39-44.
- Ahi, S. 2011.** Bazı laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit (EPS) üretimi ile antibiyotik dirençliliklerinin araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Akan, E., Kınık, Ö. 2014.** Biyofilm oluşum mekanizması ve biyofilmlerin gıda güvenliğine etkisi. *Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi*, 14: 42-51.
- Akoğlu, A. 2006.** Çiğ sütte *Pseudomonas aeruginosa* Sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar. *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Akoğlu, A., Yaman, H., Coşkun, H., Sarı, K. 2017.** Mengen peynirinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler tanımlanması ve bazı starter kültür özelliklerinin belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21(2): 453-459.
- Alexandraki, V., Kazou, M., Blom, J., Pot, B., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K. 2017.** The complete genome sequence of the yogurt isolate *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 2. *Standards in Genomic Sciences*, 12(18): 1-10.
- Alp, D., Öner, Z. 2014.** Bazı laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlilikleri ve aroma maddeleri oluşturma özelliklerinin belirlenmesi. *GIDA*, 39(6): 331-337.
- Annous, B.A., Fratamico, P.M., Smith, J.L. 2009.** Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. *Journal of Food Science*, 74: 24-37.
- Aoudia, N., Rieu, A., Briandet, B., Deschamps, J., Chluba, J., Jegou, G., Garrido, C., Guzzo, J. 2016.** Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food Microbiology*, 53(2016): 51-59.
- Araújo, P., Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., Simões, M. 2011.** Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, Ed.: Méndez-Vilas, A., Formatex, Badajoz, Spain, pp: 826-834.
- Arena, M.P., Capozzi, V., Spano, G., Fiocco, D. 2017.** The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101: 2641-2657.
- Arroyo-López, F.N., Bautista-Gallego, J., Domínguez-Manzano, J., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., García-García, P., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R. 2012.** Formation of lactic acid bacteria/yeasts communities on the olive

surface during Spanish-style manzanilla fermentations. *Food Microbiology*, 32: 295-301.

Ashraf, R., Shah, N.P. 2011. Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. *International Food Research Journal*, 18(3): 837-853.

Attar, M.A., Yavarmanesh, M., Mortazavi, A., Dovom, M.R.E., Najafi, M.B.H. 2018. Antibacterial effects of *Lactococcus lactis* isolated from lighvan cheese regarding the recognition of nisin, lacticin and lactococcin structural genes. *LWT - Food Science and Technology*, 89(2018): 186–191.

Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M., Hugas, M. 2003. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic *Stapylococci* from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8): 4583-4594.

Azadnia, P., Khan-Nazer, A.H. 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional drinking yoghurt in tribes of fars province. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 10(3): 235-240.

Bağder-Elmacı, S., Tokatlı, M., Dursun, D., Özçelik, F., Şanlıbaba, P. 2015. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles of the Çubuk region in Turkey. *Folia Microbiologica*, 60: 241-251.

Barçın-Öztürk, Ş., Sakarya, S., Öncü, S., Ertuğrul, M.B. 2008. Biyofilmler ve yabancı cisim infeksiyonları. *Klinik Dergisi*, 21(3): 79-86.

Baruah, R., Das, D., Goyal, A. 2016. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria: current trends and applications. *Journal of Probiotics and Health*, 4(2): 1-6.

Bassi, D., Cappa, F., Gazzola, S., Orrù, L., Cocconcelli, P.S. 2017. Biofilm formation on stainless steel by *Streptococcus thermophilus* UC8547 in milk environments is mediated by the proteinase PrtS. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(8): 1-12.

Başığit-Kılıç, G., Kuleaşan, H., Eralp, İ., Karahan, A.G. 2009. Manufacture of Turkish beyaz cheese added with probiotic strains. *LWT - Food Science and Technology*, 42(2009): 1003–1008.

Baumgartner, A., Kueffer, M., Simmen, A., Grand, M. 1998. Relatedness of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from clinical specimens and such from food-stuffs, humans and technology. *LWT - Food Science and Technology*, 31(5): 489-494.

Berlanga, M., Guerrero, R. 2016. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microbial Cell Factories*, 15(165): 1-11.

Bjarnsholt, T., Alhede, M., Alhede, M., Eickhardt-Sørensen, S.R., Moser, C., Kühl, M., Jensen, P. Ø., Høiby, N. 2013. The in vivo biofilm. *Trends in Microbiology*. 21(9): 466-474.

Bluma, A., Ciprovica, I. 2015. Diversity of lactic acid bacteria in raw milk. *Research For Rural Development*, 1: 157-161.

Bonatsou, S., Tassou, C.C., Panagou E.Z., Nychas G.J.E. 2017. Table olive fermentation using starter cultures with multifunctional potential. *Microorganisms*, 5(30): 1-16.

Campana, R., Casettari, L., Fagioli, L., Cespi, M., Bonacucina, G., Baffone, W. 2017. Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 241(2017): 132–140.

Cardamone, L., Quiberoni, A., Mercanti, D.J., Fornasari, M.E., Reinheimer, J.A., Guglielmotti, D.M. 2011. Adventitious dairy *Leuconostoc* strains with interesting

technological and biological properties useful for adjunct starters. *Dairy Science & Technology* 91: 457–470.

Caro, I., Bécares, G., Fuentes, L., Garcia-Armesto, M.R., Rúa, J., Castro, J.M., Quinto, E.J., Mateo, J. 2015. Evaluation of three PCR primers based on the 16S rRNA gene for the identification of lactic acid bacteria from dairy origin. *CyTA – Journal of Food*, 13(2): 181-187.

Cebirbay, M.A. 2014. Fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuklarda bazı *Lactobacillus* ve patojen bakterilerin antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi. *Doktora Tezi*, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Konya.

Cengiz, S.A., Us, E., Cengiz, A.T. 2006. Slime faktörünün klinikteki yeri ve önemi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 13(3): 193-197.

Chapot-Chartier, M.P., Kulakauskas, S. 2014. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. 11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria, 31 Ağustos-4 Eylül 2014, Egmond aan Zee, Netherlands.

Ciszek-Lenda, M. 2011. Biological functions of exopolysaccharides from probiotic bacteria. *Central European Journal of Immunology*, 36(1): 51-55.

Claisse, O., Renouf, V., Lonvaud-Funel, A. 2007. Differentiation of wine lactic acid bacteria species based on RFLP analysis of a partial sequence of *rpoB* gene. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2007): 387–390.

Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*, 83(2003): 269-306.

Cruciata, M., Gaglio, R., Scatassa, M.L., Sala, G., Cardamone, C., Palmeri, M., Moschetti, G., La Mantia, T., Settanni, L. 2018. Formation and characterization of early bacterial biofilms on different wood typologies applied in dairy production. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(4): 1-13.

Çetinkaya, E., Ayhan, K. 2012. Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2(1): 53-62.

Deatraksa, J., Sunthornthummas, S., Rangsiruji, A., Sarawaneeyaruk, S., Suwannasai, N., Pringsulaka, O. 2018. Isolation of folate-producing *Weissella* spp. from Thai fermented fish (plaa som fug). *LWT - Food Science and Technology*, 89(2018): 388-391.

Delavenne, E., Mounier, J., Déniel, F., Barbier, G., Le Blay, G. 2012. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *International Journal of Food Microbiology*, 155(2012): 185-190.

Demir, E. 2014. Fermente süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinde bakteriyosin üretiminin karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

Demiray, E., Yılmaz, Ö. 2005. *Helicobacter pylori*'de antibiyotik direnci ve direncin saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 39: 399-408.

Demirel, S. 2012. Molecular techniques for determining microbial diversity in treatment systems. *Sigma Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 30: 179-192.

Demirel, Y.N., Gürler, Z. 2016. Hayvansal gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç profilleri. *Kocatepe Veterinary Journal*, 9(4): 372-378.

- Demirhan, F. 2013.** Çoklu dirençli *Pseudomonas aeruginosa* klinik suşlarında biyofilm formasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.
- Devaraj, C., Sajjan, A.G. 2015.** Comparison of three different methods for the detection of biofilm in gram positive cocci and gram negative bacilli isolated from clinical specimens. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(11): 952-955.
- Diani, M., Ariafar, M.N., Akçelik, N. 2016.** İnsan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturan enterokokal biyofilm yapısının doğası. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 73(1): 71-80.
- Dimic, G.R., 2006.** Characteristics of the *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strains from fresh vegetables. *Acta periodica technologica*, 37: 3-11.
- Dinçer, E., Kıvanç, M., Karaca, H. 2009.** Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri ve bakteriyosinler. *GIDA / The Journal of Food*, 35(1): 55-62.
- Doğan, M., Özpınar, H. 2017.** Investigation of probiotic features of bacteria isolated from some food products. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(4): 555-562.
- Doi, K., Phuong, O.T.A., Kawatou, F., Nagayoshi, Y., Fujino, Y., Ohshima, T. 2013.** Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented rice bran product. *Advances in Microbiology*, 3: 265-272.
- Donelli, G., Vuotto, C., Mastromarino, P. 2013.** Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 24: (1-8).
- Donlan, R.M., Costerton, J.W. 2002.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2): 167–193.
- Durlu-Özkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., Litopouloutzanetaki, E. 2001.** Technology important properties of lactic acid bacteria isolates from beyaz cheese made from raw ewe's milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 861-870.
- Elavarasi, V., Pugazhendhi, A., Poornima-Priyadharsani, T.K., Valsala, H., Thamaraiselvi, K. 2014.** Screening and characterization of *Weissella cibaria* isolated from food source for probiotic properties. National Conference cum Workshop on Bioinformatics and Computational Biology, Mayıs 2014, NCWBCB.
- Engelhardt, T., Szakmár, K., Kiskó, G., Mohácsi-Farkas, C., Reichart, O. 2018.** Combined effect of NaCl and low temperature on antilisterial bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* ST202Ch. *LWT - Food Science and Technology*, 8 (2018): 104–109.
- Ergene, E. 2015.** Bazı *Bacillus* suşları ile melastan ekzopolisakkarit üretim koşullarının optimizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Sakarya.
- Erginkaya, Z., Ünal, E., Kalkan, S. 2011.** Importance of microbial antagonisms about food attribution: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Ed.: Méndez-Vilas, A., Formatex, Badajoz, Spain, pp: 1342-1348.
- Ertekin, Ö. 2007.** Farklı gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin nümerik taksonomisi. *Yüksek Lisans Tezi*, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Denizli.

- Ertürkmen, P., Öner, Z. 2015.** Beyaz peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin başlatıcı (starter) kültür özelliklerinin biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesi. *Süleyman Demirel üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 19(3): 9-16.
- Evren, M., Apan, M., Tutkun, E., Evren, S. 2011.** Geleneksel fermente gıdalarda bulunan laktik asit bakterileri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 9(1): 11-17.
- Fagerlund, A., Møretro, T., Heir, E., Briandet, R., Langsrud, S. 2017.** Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17): 1-21.
- Fessard, A., Remize, F. 2017.** Why are *Weissella* spp. not used as commercial starter cultures for food fermentation?. *Fermentation*, 3(38): 1-31.
- Fguiri, I., Atigui, M., Ziadi, M., Arroum, S., Khorchani, T. 2015.** Biochemical and molecular identification of lactic acid bacteria isolated from camel milk in Tunisia. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(9): 716-720.
- Fhoula, I., Najjari, A., Turki, Y., Jaballah, S., Boudabous, A., Ouzari, H. 2013.** Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia. *BioMed Research International*, 405708: 1-14.
- Flórez, A.B., Campedelli, I., Delgado, S., Alegría, A., Salvetti, E., Felis, G.E., Mayo, B., Torriani, S. 2016.** Antibiotic susceptibility profiles of dairy *Leuconostoc*, analysis of the genetic basis of atypical resistances and transfer of genes in vitro and in a food matrix. *Plos One*, 11(1): 1-20.
- Foteini, K.M. 2015.** Biofilms in water industry: case study of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* – biofilm formation and control in vitro and in situ. *MSc Thesis*, Agricultural University of Athens, Athens, Greece.
- Gad, G.F.M., Abdel-Hamid, A.M., Farag, Z.S.H. 2014.** Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1): 25-33.
- Garrett, T.R., Bhakoo, M., Zhang, Z. 2008.** Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(2008): 1049–1056.
- Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G.T., de Vos, W.M. 2011.** Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes & Nutrition*, 6: 209–240.
- Goh, H.F., Philip, K. 2015.** Purification and characterization of bacteriocin produced by *Weissella confusa* A3 of dairy origin. *Plos One*, 10(10): 1-17.
- Gómez, N.C., Ramiro, J.M.P., Quecan, B.X.V., de Melo Franco, B.D.G. 2016.** Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms formation. *Frontiers in Microbiology*, 7(863): 1-16.
- Gotcheva, V., Hristozova, E., Hristozova, T., Guo, M., Roshkova, Z., Angelov, A. 2002.** Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains. *Food Biotechnology*, 16(3): 211-225.
- Guinta, A. R. 2010.** New approaches for controlling biofilm formation. *MSc Thesis*, The State University of New Jersey Graduate Program in Microbiology and Molecular Genetics and the Graduate School of Biomedical Sciences, New Jersey.

- Gün, İ., Ekinci, F.Y. 2009.** Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda*, 34(3): 165-173.
- Güneş Altuntaş, E., Ayhan, K., Okcu, G., Erkanlı, K., Balcı, M.H., Sonakın, Ş.S. 2010.** Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel aktiviteleri. *Gıda*, 35(3): 197-203.
- Gürsoy, N.C., Otlu, B. 2017.** Mikrobiyota çalışmalarında moleküler tanı yöntemleri. *Journal of Biotechnol and Strategic Health Research*, 1(Special Issue): 56-67.
- Halkman, A.K. 2005.** Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 s.
- Hassan, A.N. 2008.** ADSA foundation scholar award: possibilities and challenges of exopolysaccharide-producing lactic cultures in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 91(4): 1282-1298.
- Hassan, A., Usman, J., Omair, M., Khalid, A., Iqbal, M. 2011.** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(4): 305-311.
- Hayaloğlu, A.A., Guven, M., Fox, P.F. 2002.** Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish white cheese 'beyaz peynir'. *International Dairy Journal*, 12(2002): 635-648.
- Ho, V.T.T., Lo, R., Bansal, N., Turner, M.S. 2018.** Characterisation of *Lactococcus lactis* isolates from herbs, fruits and vegetables for use as biopreservatives against *Listeria monocytogenes* in cheese. *Food Control*, 85(2018): 472-483.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., Rozès, N. 2012.** Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology*, 31(2012): 1-8.
- İç, E., Özçelik, F. 1995.** Hıyar turşusu fermantasyonunda görülen mikroorganizmalar. *Gıda*, 20(3): 173-178.
- İçten, B.İ. 2013.** Zihinsel engelli bireylerde klinik periodontal durum ve supragingival plakta beta hemolitik streptokok varlığının incelenmesi. *Bitirme Tezi*, Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı, İzmir.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M. 2008.** Yöresel peynirden antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(1): 1-6.
- Jalilsood, T., Baradaran, A., Song, A.A.L., Foo, H.L., Mustafa, S., Saad, W.Z., Yusoff, K., 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(96): 1-14.
- Jang, H.J., Kang, M.S., Yi, S.H., Hong, J.Y., Hong, S.P. 2016.** Comparative study on the characteristics of *Weissella cibaria* CMU and probiotic strains for oral care. *Molecules*, 21(12): 1-11.
- Jeong, D., Kim, D.H., Kang, I.B., Kim, H., Song, K.Y., Kim, H.S., Seo, K.H. 2017.** Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. *Food Control*, 78(2017): 436-442.
- Jeong, D.W., Lee, J.H. 2015.** Antibiotic resistance, hemolysis and biogenic amine production assessments of *Leuconostoc* and *Weissella* isolates for kimchi starter development. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2015): 1078-1084.

- Jimenez, E., Yepez, A., Perez-Cataluna, A., Vasquez, E.R., Davila, D.Z., Vignolo, G., Aznar, R. 2018.** Exploring diversity and biotechnological potential of lactic acid bacteria from tocosh - traditional Peruvian fermented potatoes - by high throughput sequencing (HTS) and culturing. *LWT - Food Science and Technology*, 87(2018): 567-574.
- Johansson, P., Paulin, L., Sade, E., Salovuori, N., Alatalo, E.R., Bjorkroth, K.J., Auvinen, P. 2011.** Genome sequence of a food spoilage lactic acid bacterium, *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 18811^T, in association with specific spoilage reactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(13): 4344-4351.
- Jones, A.E., Versalovic, J. 2009.** Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology*, 9(35): 1-9.
- Jose, N.M., Bunt, C.R., Hussain, M.A. 2015.** Comparison of microbiological and probiotic characteristics of *Lactobacilli* isolates from dairy food products and animal rumen contents. *Microorganisms*, 3: 198-212.
- Kaban, G., Kaya, M. 2008.** Identification of lactic acid bacteria and gram-positive catalase-positive cocci isolated from naturally fermented sausage (sucuk). *Journal of Food Science*, 73(8): 385-388.
- Kam Hepdeniz, Ö., Seçkin, Ö. 2017.** Dinamik mikrobiyal bir yaşam: oral biyofilm. *SdÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(3): 47-55.
- Karakuş, M. 1994.** Beyaz peynirden izole edilen laktik asit bakterilerinin asit oluşturma ve proteolitik aktiviteleri. *Gıda*, 19(4): 237-241.
- Karankı, E. 2013.** Ülkemizde yaygın olarak kullanılan bazı baharatların antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Niğde.
- Kavaz Yüksel, A., Şat, I.G., Yüksel, M. 2015.** The effect of terebinth (*Pistacia terebinthus* L.) coffee addition on the chemical and physical characteristics, colour values, organic acid profiles, mineral compositions and sensory properties of ice creams. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12): 8023-8031.
- Kavitake, D., Kandasamy, S., Devi, P.B., Shetty, P.H. 2018.** Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods – A review. *Food Bioscience*, 21(2018): 34-44.
- Kerekes, E.B., Deak, E., Tako, M., Tserennadmid, R., Petkovits, T., Vagvölgyi, C., Krisch, J. 2013.** Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 115: 933-942.
- Khemariya, P., Singh, S., Nath, G., Gulati, A.K. 2017.** Probiotic *Lactococcus lactis*: A Review. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 5(6): 556-562.
- Khosravi, Y., Ling, L.C., Loke, M.F., Shailendra, S., Prepageran, N., Vadivelu, J. 2014.** Determination of the biofilm formation capacity of bacterial pathogens associated with otorhinolaryngologic diseases in the Malaysian population. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 271: 1227-1233.
- Kılıç, A., Yapar, M., Saraçlı, M.A., Baysallar, M., Doğançlı, L. 2003.** Spinal kord yaralanmalı hastalardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının random amplifiye polimorfik DNA-PCR (RAPD) yöntemi ile genetik analizi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45(2): 143-146.

- Kim, M.J., Kim, K.S. 2014.** Tyramine production among lactic acid bacteria and other species isolated from kimchi. *LWT - Food Science and Technology*, 56(2014): 406-413.
- Kim, Y.J., Lee, S.H. 2016.** Inhibitory effect of *Lactococcus lactis* HY 449 on cariogenic biofilm. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 26(11): 1829-1835.
- Kiskó, G., Szabó-Szabó, O. 2011.** Biofilm removal of *Pseudomonas* strains using hot water sanitation. *Acta Universitatis Sapientiae Alimentaria*, 4: 69-79.
- Kocková, M., Gereková, P., Petruláková, Z., Hybenová, E., Šturdík, E., Valík, L. 2011.** Evaluation of fermentation properties of lactic acid bacteria isolated from sourdough. *Acta Chimica Slovaca*, 4(2): 78-87.
- Kolari, M., 2003.** Attachment mechanisms and properties of bacterial biofilms on non-living surfaces. *Academic Dissertation in Microbiology*, University of Helsinki Department of Applied Chemistry and Microbiology, Helsinki, Finland.
- Korukluoğlu, M., Gürbüz, O., Şahin, İ. 2002.** Taze zeytin mikroflorasında bulunan laktik asit bakterilerinin belirlenmesi. *A.Ü. Zir. Fak. Tarım Bilimleri Dergisi*, 8(2): 109-113.
- Kostaki, M., Chorianopoulos, N., Braxou, E., Nychas, G.J., Giaouris, E. 2012.** Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8): 2586–2595.
- Koukkidis, G., Haigh, R., Allcock, N., Jordan, S., Freestone, P. 2017.** Salad leaf juices enhance *Salmonella* growth, colonization of fresh produce, and virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(1): 1-13.
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., Uchiyama, H. 2008.** Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 106(4): 381-386.
- Kubota, H., Senda, S., Tokuda, H., Uchiyama, H., Nomura, N. 2009.** Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149. *Food Microbiology*, 26(2009): 592-597.
- Kumar, L.M., Saad, W.Z., Mohamad, R., Rahim, R.A. 2017.** Influence of biofilm forming lactic acid bacteria against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA S547). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(12): 1107–1115.
- Kumari, S., Sarkar, P.K. 2016.** *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*, 69(2016): 20-29.
- Kushiro, A., Chervaux, C., Cool-Portier, S., Perony, A., Legrainraspaud, S., Obis, D., Onoune, M., Moer, A. 2009.** Antimicrobial susceptibility testing of lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* by broth microdilution method and etest. *International Journal of Microbiology*, 132(2009):54-58.
- Landeta, G., Curiel, J.A., Carrascosa, A.V., Muñoz, R., de las Rivas, B. 2013.** Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. *Meat Science*, 95(2013): 272–280.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Velez, M.P., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J. 2007.** Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21): 6768-6775.
- Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.Y., Kim, Y.H. 2012.** Agarose gel electrophoresis for the separation of dna fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 62: 1-5.

- Leite, A.M.O., Miguel, M.A.L. Peixoto, R.S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V.M.F., Mayo, B., Delgado, S. 2015.** Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 98: 3622-3632.
- Li, S.W., Chen, Y.S., Lee, Y.S., Yang, C.H., Srionnual, S., Wu, H.C., Chang, C.H. 2017.** Comparative genomic analysis of bacteriocin-producing *Weissella cibaria* 110. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101: 1227–1237.
- Lukasova, J., Sustackova, A. 2003.** Enterococci and antibiotic resistance , *Acta Veterinaria Brno*, 72: 315-323.
- Ma, Q., Wood, T.K. 2009.** OmpA influences *Escherichia coli* biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system. *Environmental Microbiology*, 11(10): 2735-2746.
- Mahony, J., Bottacini, F., van Sinderen, D., Fitzgerald, G.F. 2014.** Progress in lactic acid bacterial phage research. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1): 1-12.
- Mäkelä, P.M., Korkeala, H.J., Laine, J.J. 1992.** Ropy slime-producing lactic acid bacteria contamination at meat processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, 17(1): 27-35.
- Maksimovic, A.Z., Zunabovic-Pichler, M., Kos, I., Mayrhofer, S., Hulak, N., Domig, K.J., Fuka, M.M. 2018.** Microbiological hazards and potential of spontaneously fermented game meat sausages: a focus on lactic acid bacteria diversity. *LWT - Food Science and Technology*, 89(2018): 418–426.
- Masak, J., Cejkova, A., Schreiberova, O., Rezanka, T. 2014.** *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control. *FEMS Microbiology Ecology*, 89(2014): 1–14.
- Mathur, S., Singh, R. 2005.** Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105(2005): 281-295.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Tanaka, R. 2004.** Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1): 167–173.
- Meral, H., Korukluoğlu, M. 2014.** Laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç mekanizmaları. *U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2): 71-82.
- Michalak, M., Gustaw, K., Waśko, A., Polak-Berecka, M. 2018.** Composition of lactic acid bacteria during spontaneous curly kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) fermentation. *Microbiological Research*, 206(2018): 121–130.
- Milci, S., Yaygın, H. 2005.** Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler ve süt ürünlerindeki fonksiyonları. *Gıda*, 30 (2): 123-129.
- Minervini, F., Lattanzi, A., Dinardo, F.R., De Angelis, M., Gobbetti, M. 2018.** Wheat endophytic *Lactobacilli* drive the microbial and biochemical features of sourdoughs. *Food Microbiology*, 70(2018): 162-171.
- Mohamed, J.A., Huang, D.B. 2007.** Biofilm formation by *Enterococci*. *Journal of Medical Microbiology*, 56: 1581–1588.
- Moon, S.H., Kim, C.R., Chang, H.C. 2018.** Heterofermentative lactic acid bacteria as a starter culture to control kimchi fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 88(2018): 181–188.
- Mostefaoui, A., Hakem, A., Yabrir, B., Boutaiba, S., Badis, A. 2014.** Screening for exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria isolated from Algerian raw camel milk. *African Journal of Microbiology Research*, 8(22): 2208-2214.

- Munoz-Atienza, E., Araújo, C., del Campo, R., Hernandez, P.E., Herranz, C., Cintas, L.M. 2016.** Safety assessment and molecular genetic profiling by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and PCR-based techniques of *Enterococcus faecium* strains of food origin. *LWT - Food Science and Technology*, 65(2016): 357-362.
- Nayak, M., Kotigadde, S., Pushpanathan, N., Shetty, H. 2013.** Quality control using Nano Drop 1000 in PCR molecular diagnostic method to measure *Enterococcus faecalis* from secondary endodontic infections. *Endodontology*, 25(1): 100-106.
- Necidová, L., Janštová, B., Karpíšková, S., Cupáková, Š., Dušková, M., Karpíšková, R. 2009.** Importance of *Enterococcus* spp. for forming a biofilm. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(Special Issue): 354-356.
- Nostro, A., Guerrini, A., Marino, A., Tacchini, M., Di Giulio, M., Grandini, A., Akin, M., Cellini, L., Bisignano, G., Saraçoğlu, H.T. 2016.** In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 238(2016): 33–39.
- Oh, A., Daliri, E.B.M., Oh, D.H. 2018.** Screening for potential probiotic bacteria from Korean fermented soybean paste: in vitro and *Caenorhabditis elegans* model testing. *LWT - Food Science and Technology*, 88(2018): 132–138.
- Oliveira, A., Cunha, M.L.R.S. 2010.** Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Research Notes*, 3(260): 1-8.
- Olson, N.D., Morrow, J.B. 2012.** DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes*, 5(668): 1-14.
- Orhan, E. 2013.** Sütten izole edilen laktik bakteriler ve streptokokların enzim aktiviteleri. *Yüksek Lisans Tezi*, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Özteber, M. 2013.** Fermente süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliklerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Aydın.
- Özyurt, V.H., Ötleş, S. 2014.** Prebiyotikler: metabolizma için önemli bir gıda bileşeni. *Akademik Gıda*, 12(1): 115-123.
- Palamutoğlu, R., Kasnak, C. 2014.** Fermente et ürünleri üretiminde probiyotik kullanımı. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2(5): 208-213.
- Panghal, A., Janghu, S., Virkar, K., Gat, Y., Kumar, V., Chhikara, N. 2018.** Potential non-dairy probiotic products – a healthy approach. *Food Bioscience*, 21(2018): 80–89.
- Park, H., Yeo, S., Ji, Y., Lee, J., Yang, J., Park, S., Shin, H., Holzapfel, W. 2014.** Autoinducer-2 associated inhibition by *Lactobacillus sakei* NR28 reduces virulence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control*, 45: 62-69.
- Park, S.H., Jung, J.H., Seo, D.H., Lee, H.L., Kim, G.W., Park, S.Y., Shin, W.C., Hong, S., Park, C.S. 2012.** Differentiation of lactic acid bacteria based on RFLP analysis of the *tuf* gene. *Food Science and Biotechnology*, 21(3): 911-915.
- Patel, A., Shah, N., Prajapati, J.B. 2013.** Biosynthesis of vitamins and enzymes in fermented foods by lactic acid bacteria and related genera - a promising approach. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 5(2): 85-91.

- Patel, I., Patel, V., Thakkar, A., Kothari, V. 2014.** Microbial biofilms: microbes in social mode. *International Journal of Agricultural and Food Research*, 3(2): 34-49.
- Patel, S., Majumder, A., Goyal, A. 2012.** Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, 52(1): 3–12.
- Paveljšek, D., Trmčić, A., Hacin, B., Rogelj, I. 2014.** PCR verification of microplate phenotypic system identification for LAB from traditional Western Balkan raw milk cheeses. *Mljekarstvo*, 64(4): 245-253.
- Peñas, E., Frias, J., Sidro, B., Vidal-Valverde, C. 2010.** Impact of fermentation conditions and refrigerated storage on microbial quality and biogenic amine content of sauerkraut. *Food Chemistry*, 123(2010): 143–150.
- Pogacic, T., Mancini, A., Santarelli, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E., Gatti, M. 2013.** Diversity and dynamic of lactic acid bacteria strains during aging of a long ripened hard cheese produced from raw milk and undefined natural starter. *Food Microbiology*, 36(2013): 207-215.
- Prasanna, P.H.P., Charalampopoulos, D. 2018.** Encapsulation of *Bifidobacterium longum* in alginate-dairy matrices and survival in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, cow milk and goat milk. *Food Bioscience*, 21(2018): 72–79.
- Pulaj, B., Mustafa, B., Nelson, K., Quave, C.L., Hajdari, A. 2016.** Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Pistacia terebinthus* essential oils derived from wild populations in Kosovo. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(147): 1-9.
- Quijada, N.M., De Filippis, F., Sanz, J.J., García-Fernandez, M.D.C., Rodríguez-Lazaro, D., Ercolini, D., Hernandez, M. 2018.** Different *Lactobacillus* populations dominate in “Chorizo de Leon” manufacturing performed in different production plants. *Food Microbiology*, 70(2018): 94-102.
- Rao, T.S., Kumar, R., Balamurugan, P., Vithal, G.K. 2017.** Microbial fouling in a water treatment plant and its control using biocides. *Biocontrol Science*, 22(2): 105-119.
- Reis, N.A., Saraiva, M.A.F., Duarte, E.A.A., de Carvalho, E.A., Vieira, B.B., Evangelista-Barreto, N.S. 2016.** Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human milk, *Journal of Applied Microbiology*, 121: 811-820.
- Ruggirello, M., Dolci, P., Cocolin, L. 2014.** Detection and viability of *Lactococcus lactis* throughout cheese ripening. *Plos One*, 9(12): 1-14.
- Salas-Jara, M.J., Ilabaca, A., Vega, M., García, A. 2016.** Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics. *Microorganisms*, 4(35): 1-14.
- Samaržija, D., Antunac, N., Havranek, J.L. 2001.** Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. *Mljekarstvo*, 51(1): 35-48.
- Sanlibaba, P., Çakmak, G.A. 2016.** Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology: Open Access*, 2(2): 1-5.
- Saranraj, P., Naidu, M.A., Sivasakthivelan, P. 2013.** Lactic acid bacteria and its antimicrobial properties: a review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 4(6): 1124-1133.
- Schoina, V., Terpou, A., Bosnea, L., Kanellaki, M., Nigam, P.S. 2018.** Entrapment of *Lactobacillus casei* ATCC393 in the viscus matrix of *Pistacia terebinthus* resin for functional myzithra cheese manufacture. *LWT - Food Science and Technology*, 89(2018): 441–448.

- Shin, S.Y., Han, N.S. 2015.** *Leuconostoc* spp. as starters and their beneficial roles in fermented foods: Beneficial microorganisms in food and nutraceuticals. microbiology monographs, Ed.: Liang, M.T., Springer, Cham, Switzerland, pp: 111-132.
- Shukla, S., Goyal, A. 2011.** 16S rRNA-based identification of a glucan-hyperproducing *Weissella confusa*. *Enzyme Research*, 2011: 1-10.
- Singh, H., Kongo, J.M., Borges, A., Ponte, D.J.B., Griffiths, M.W. 2015.** Lactic acid bacteria isolated from raw milk cheeses: ribotyping, antimicrobial activity against selected food pathogens and resistance to common antibiotics. *Journal of Food Processing and Technology*, 6(9): 1-5.
- Spoering, A.L., Lewis, K. 2001.** Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of Bacteriology*, 183(23): 6746-6751.
- Srionnual, S., Yanagida, F., Lin, L.H., Hsiao, K.N., Chen, Y.S. 2007.** Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from plaasom, a fermented fish product from Thailand. *Applied And Environmental Microbiology*, 73(7): 2247-2250.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1997): 1-29.
- Stoyanova, L.G., Ustyugova, E.A., Netrusov, A.I. 2012.** Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(3): 229-243.
- Sudağdan, M., Aydın, A. 2013.** Lizozim ve nisinin gıda kaynaklı *Staphylococcus aureus* suşlarında gelişim ve biyofilm oluşumu üzerine etkileri. *The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*, 39(2): 254-263.
- Sun, Z., Yu, J., Dan, T., Zhang, W., Zhang, H. 2014.** Phylogenesis and Evolution of Lactic Acid Bacteria: Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice, Ed.: Zhang, H., Cai, Y., Springer, Netherlands, pp: 1-101.
- Şimşek, Ö., Kördikanhoğlu, B., Yazıcı, G., Kaya, H.İ. 2014.** Beyaz peynirde nisini tolere eden laktik asit bakteri miktarı ve çeşitliliği. *Akademik Gıda*, 12(4): 36-40.
- Tahmourespour, A., Kermanshahi, R.K. 2011.** The effect of a probiotic strain (*Lactobacillus acidophilus*) on the plaque formation of oral *Streptococci*. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 11(1): 37-40.
- Tath, D. 2009.** Geleneksel süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Tanrıbuyurdu, E., 2014.** Sığır mastitislerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında biofilm oluşumu ve antibiyotiklere dirençliliğinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.
- Temmerman, R., Huys, G., Swings, J. 2004.** Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2004): 348-359.
- Tokath, M. 2013.** Ankara Çubuk yöresi turşularından izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanmaları, teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi ve starter olarak kullanılma olanaklarının değerlendirilmesi. *Doktora Tezi*, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.

- Tokath, M., Dursun, D., Arslankoz, N., Şanlıbaba P., Özçelik, F. 2012.** Tursu üretiminde laktik asit bakterilerinin önemi. *Akademik Gıda*, 10(1): 70-76.
- Tokath, M., Gülgör, G., Bağder-Elmacı, S., Arslankoz-İşleyen, N., Özçelik, F. 2015.** In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *BioMed Research International*, 2015: 1-8.
- Tokath, M., Bağder-Elmacı, S., Arslankoz-İşleyen, N., Özçelik, F. 2017.** Technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles. *Gıda*, 42(6): 693-707.
- Tunail, N. 2009.** Mikrobiyoloji. Pelin Ofset, Ankara, 448 s.
- Ünal, D., Tayfur, M. 2017.** Biyofilm. *Güncel Gastroenteroloji*, 21(2): 108-114.
- Ünal-Turhan, E., Erginkaya, Z. 2016.** Probiyotik gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 22(7): 620-624.
- Vakevainen, K., Valderrama, A., Espinosa, J., Centurion, D., Rizo, J., Reyes-Duarte, D., Díaz-Ruiz, G., von Wright, A., Elizaquível, P., Esquivel, K., Simontaival, A.I., Aznar, R., Wachter, C., Plumed-Ferrer, C. 2018.** Characterization of lactic acid bacteria recovered from atole agrio, a traditional Mexican fermented beverage. *LWT - Food Science and Technology*, 88(2018): 109-118.
- Vahabzadeh, S., Özpınar, H., Kalkan, I., Andaç-Öztürk, S. 2017.** Identification and characterization of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* isolated from raw milk and milk products of Turkey and Iran. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*, 5(4): 159-168.
- Valenzuela, J.F., Pinuer, L.A., Cancino, A.G., Yáñez, R.B. 2015.** Metabolic fluxes in lactic acid bacteria-a review. *Food Biotechnology*, 29: 185–217.
- Villani, F., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S. 1997.** Characterization of strains of *Leuconostoc mesenteroides* by analysis of soluble whole-cell protein pattern, DNA fingerprinting and restriction of ribosomal DNA. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 578-588.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J., Ivanova, E.P. 2009.** Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14: 2535-2554.
- Ward, P., Roy, D. 2005.** Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Lait*, 85(2005): 23-32.
- Wassie, M., Wassie, T. 2016.** Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 3(8): 44-49.
- Winkelstroter, L.K. 2015.** Microbial biofilms: the challenge of food industry. *Biochemistry & Molecular Biology Journal*, 1(5): 1-3.
- Xiong, T., Peng, F., Liu, Y., Deng, Y., Wang, X., Xie, M. 2014.** Fermentation of Chinese sauerkraut in pure culture and binary co-culture with *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2014): 713-717.
- Yalanca, İ. 2009.** Geleneksel et ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik direncinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Yerlikaya, O. 2014.** Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan başlıca fenotipik ve moleküler yöntemler. *Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi*, 14: 8-22.

Yeşilçimen-Akbaş, M. 2015. Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry: The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs, Ed.: Méndez-Vilas, A., Formatex, Badajoz, Spain, pp: 383-394.

Yesilcimen Akbas, M., Cag, S. 2016. Use of organic acids for prevention and removal of *Bacillus subtilis* biofilms on food contact surfaces. *Food Science and Technology International*, 22(7):587–597.

Yun, B., Oh, S., Griffiths, M.W. 2014. *Lactobacillus acidophilus* modulates the virulence of *Clostridium difficile*. *Journal of Dairy Science*, 97: 4745–4758.

Yüksekdağ, Z.N., Zeydanlı, M.N. 2013. Folat eksikliği ve probiyotikler. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2(2): 21-36.

Zarour, K., Llamas, M.G., Prieto, A., Ruas-Madiedo, P., Duenas, M.T., de Palencia, P.F., Aznar, R., Kihal, M., Lopez, P. 2017. Rheology and bioactivity of high molecular weight dextrans synthesised by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 174(2017): 646–657.

Zhang, H., Xie, L., Zhang, W., Zhou, W., Su, J., Liu, J. 2013. The association of biofilm formation with antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented foods. *Journal of Food Safety*, 33: 114-120.

EKLER

- EK 1** İzolatların “Tüp Yöntemi” ile biyofilm oluşturma kapasiteleri
- EK 2** İzolatların “96 Kuyucuklu Plaka Yöntemi” ile biyofilm oluşturma kapasiteleri
- EK 3** Tanısı yapılan laktik asit bakterilerinin bazı antibiyotiklere karşı dirençleri ve zon çapı (mm) ölçüm sonuçları



Ek 1- İzolatların “Tüp Yöntemi” ile belirlenen biyofilm oluşturma kapasiteleri

Bakteri türü	İzolat numarası	24 saat inkübasyon					48saat inkübasyon						
		30°C			37°C		30°C			37°C			
		B değeri	SH	BOD	B değeri	SH	BOD	B değeri	SH	BOD	B değeri	SH	BOD
<i>Lactobacillus</i> spp.	FE26	1 ^b	0,00	+	2 ^b	0,00	++	1 ^{bc}	0,00	+	1 ^{bc}	0,00	+
	FE25	1 ^b	0,00	+	1 ^{cd}	0,00	+	1 ^{bc}	0,00	+	1 ^c	0,33	+
	FE41	1 ^b	0,00	+	TE	--	-	3 ^a	0,00	+++	1 ^{bc}	0,00	+
	FE20	1 ^b	0,00	+	TE	--	-	1 ^c	0,33	+	1 ^{bc}	0,00	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	FE29	3 ^a	0,00	+++	1 ^d	0,33	+	3 ^a	0,00	+++	2 ^{bc}	0,33	+++
	FE31	1 ^b	0,00	+	TE	--	-	1 ^c	0,33	+	1 ^{bc}	0,00	+
	FE34	TE	--	-	1 ^d	0,33	+	1 ^c	0,00	+	1 ^{bc}	0,00	+
	FE35	1 ^b	0,33	+	1 ^{cd}	0,00	+	1 ^c	0,33	+	TE	--	-
	FE36	1 ^b	0,00	+	3 ^a	0,00	+++	1 ^c	0,33	+	3 ^a	0,00	+++
	FE37	TE	--	-	TE	--	-	TE	--	-	1 ^c	0,33	+
	FE1	1 ^b	0,33	+	1 ^{cd}	0,00	+	1 ^{bc}	0,00	+	1 ^{bc}	0,00	+
<i>Lactobacillus rhammosus</i>	FE2	1 ^b	0,33	+	1 ^{cd}	0,00	+	1 ^{bc}	0,00	+	1 ^{bc}	0,00	+
	FE3	TE	--	-	1 ^{cd}	0,00	+	1 ^{bc}	0,00	+	1 ^c	0,33	+
	FE4	TE	--	-	1 ^{cd}	0,00	+	TE	--	-	1 ^{bc}	0,00	+
	FE27	1 ^b	0,00	+	2 ^b	0,00	++	2 ^{ab}	0,00	++	1 ^{bc}	0,00	+
<i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus graminis</i> , <i>Lactobacillus sakei</i>	FE42	1 ^b	0,00	+	2 ^b	0,00	++	3 ^a	0,00	+++	1 ^c	0,33	+
	FE8	1 ^b	0,00	+	1 ^{cd}	0,00	+	1 ^c	0,33	+	1 ^c	0,33	+
	FE22	1 ^b	0,00	+	TE	--	-	1 ^c	0,33	+	TE	--	-
	FE24	1 ^b	0,00	+	1 ^{cd}	0,00	+	1 ^c	0,33	+	1 ^c	0,33	+
<i>Lactococcus lactis</i>	FE30	1 ^b	0,00	+	1 ^{cd}	0,00	+	1 ^{bc}	0,00	+	1 ^c	0,33	+
	FE32	1 ^b	0,00	+	1 ^{cd}	0,00	+	1 ^{bc}	0,00	+	2 ^{bc}	0,33	+++
	FE38	TE	--	-	TE	--	-	1 ^c	0,33	+	1 ^{bc}	0,00	+
	FE39	1 ^b	0,00	+	1 ^{cd}	0,00	+	1 ^{bc}	0,00	+	1 ^{bc}	0,00	+
	FE40	1 ^b	0,00	+	1 ^d	0,33	+	3 ^a	0,00	+++	2 ^{ab}	0,00	+++
	FE40	1 ^b	0,00	+	1 ^d	0,33	+	3 ^a	0,00	+++	2 ^{ab}	0,00	+++

^{a-d} Aynı sütunda bulunan farklı harflere sahip değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < 0,05$); **SH**: Standart hata; **TE**: Biyofilm oluşumu tespit edilemedi; **BOD**: Biyofilm oluşum düzeyi
 *Sonaçlar; 1.zayıf, 2.orta, 3: güçlü biyofilm üreticisi şeklinde verilmiştir. Biyofilm oluşum dereceleri; “-” (biyofilm üretmeyen), “+” (zayıf biyofilm üreten), “++” (orta derecede biyofilm üreten), “+++” (güçlü biyofilm üreten) olarak gösterilmiştir.

Ek 1- İzolatların “Tüp Yöntemi” ile belirlenen biyofilim oluşturma kapasiteleri (devam)

Bakteri türü	İzolat numarası	24 saat inkübasyon					48saat inkübasyon						
		30°C		37°C		30°C		37°C		30°C		37°C	
		B değeri	SH	BOD	B değeri	SH	BOD	B değeri	SH	BOD	B değeri	SH	BOD
<i>Leuconostoc</i> spp.	FE13	1 ^b	0,33	+	TE	-	-	-	TE	-	TE	-	-
	FE15	1 ^b	0,33	+	TE	-	-	-	TE	-	TE	-	-
	FE17	1 ^b	0,00	+	TE	-	-	-	TE	-	TE	-	-
<i>Leuconostoc citreum</i>	FE6	TE	--	+	TE	-	-	-	TE	+	TE	-	-
	FE9	1 ^b	0,33	+	1 ^{cd}	0,00	+	TE	--	-	1 ^c	0,33	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	FE11	1 ^b	0,00	+	1 ^{cd}	0,00	+	TE	--	-	TE	-	-
	FE18	1 ^b	0,33	+	1 ^c	0,33	+	1 ^c	0,33	+	TE	-	-
	FE43	1 ^b	0,33	+	TE	-	-	1 ^{bc}	0,00	+	1 ^c	0,33	+
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	FE10	1 ^b	0,33	+	1 ^{cd}	0,00	+	TE	--	-	1 ^{bc}	0,58	+
<i>Leuconostoc lactis</i> ,	FE5	1 ^b	0,33	+	1 ^{cd}	0,00	+	1 ^{bc}	0,00	+	1 ^{bc}	0,00	+
	FE12	1 ^b	0,33	+	1 ^d	0,33	+	TE	--	-	TE	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	FE14	1 ^b	0,33	+	TE	-	-	TE	--	-	TE	-	-
<i>Weissella</i> spp.	FE7	1 ^b	0,33	+	1 ^{cd}	0,00	+	TE	--	-	1 ^c	0,33	+
	FE16	1 ^b	0,00	+	2 ^{bc}	0,33	++	TE	--	-	1	0,00	+
<i>Weissella cibaria</i>	FE23	1 ^b	0,00	+	1 ^d	0,33	+	1 ^c	0,33	+	1 ^{bc}	0,00	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	FE28	1 ^b	0,00	+	TE	-	-	1 ^c	0,33	+	2 ^{ab}	0,00	++

*Aynı sütünde bulunan farklı harflere sahip değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < 0,05$); **SH**: Standart hata; **TE**: Biyofilim oluşumu tespit edilemedi; **BOD**: Biyofilim oluşum düzeyi

*Soniçlar; 1: zayıf, 2: orta, 3: güçlü biyofilim üreticisi şeklinde verilmiştir. Biyofilim oluşum dereceleri; “-” (biyofilim üretmeyen), “+” (zayıf biyofilim üreten), “++” (orta derecede biyofilim üreten), “+++” (güçlü biyofilim üreten) olarak gösterilmiştir.

Ek 2- İzolatların “96 Kuyucuklu Plaka Yöntemi” ile belirlenen biyofilm oluşturma kapasiteleri

Bakteri türü	İzolat numarası	24 saat inkübasyon				37°C				48 saat inkübasyon				37°C			
		B değeri	SH	BOD	BOD	B değeri	SH	BOD	BOD	B değeri	SH	BOD	BOD	B değeri	SH	BOD	BOD
<i>Lactobacillus</i> spp.	FE26	0,1 ^b	0,01	+	0,6 ^{bcd}	0,02	++	++	0,1 ^c	0,02	+	+	+	0,01	0,01	-	-
	FE25	0,1 ^b	0,01	+	0,7 ^{abc}	0,06	++	++	0,3 ^{ab}	0,03	+	+	+	0,3 ^{cd}	0,03	+	+
	FE41	0,1 ^b	0,01	+	TE	0,03	-	-	0,2 ^c	0,02	+	+	+	0,9 ^a	0,10	++	++
<i>Lactobacillus curvatus</i>	FE20	TE	--	-	TE	--	-	-	TE	--	-	-	0,1 ^{da}	0,01	+	+	
	FE29	0,2 ^a	0,02	+	0,4 ^{def}	0,03	+	+	0,4 ^a	0,02	+	+	0,9 ^a	0,06	++	++	
	FE31	TE	--	-	TE	--	-	-	TE	--	-	-	TE	--	-	-	
	FE34	TE	--	-	TE	--	-	-	TE	--	-	-	0,1 ^{da}	0,01	+	+	
	FE35	TE	--	-	TE	--	-	-	TE	--	-	-	TE	--	-	-	
	FE36	TE	0,01	-	TE	0,01	-	-	TE	0,01	-	-	TE	--	-	-	
	FE37	TE	0,01	-	TE	0,01	-	-	TE	0,01	-	-	0,1 ^{da}	0,01	+	+	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	FE1	TE	--	-	TE	--	-	-	TE	--	-	-	TE	--	-	-	
	FE2	TE	--	-	TE	--	-	-	TE	--	-	-	TE	--	-	-	
	FE3	TE	--	-	TE	--	-	-	TE	--	-	-	TE	--	-	-	
	FE4	TE	--	-	TE	--	-	-	TE	--	-	-	TE	--	-	-	
<i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus graminis</i> , <i>Lactobacillus sakei</i>	FE27	0,1 ^b	0,01	+	0,4 ^{def}	0,06	+	+	0,2 ^c	0,01	+	+	TE	--	-	-	
	FE42	0,1 ^b	0,01	+	0,8 ^{ab}	0,11	++	++	0,2 ^{bc}	0,00	+	+	0,7 ^{ab}	0,04	++	++	
	FE8	TE	--	-	0,3 ^{def}	0,12	+	+	TE	0,01	-	-	0,2 ^{da}	0,05	+	+	
	FE22	TE	--	-	TE	0,02	-	-	TE	0,01	-	-	TE	0,01	-	-	
<i>Lactococcus lactis</i>	FE24	TE	--	-	TE	--	-	-	TE	0,01	-	-	0,1 ^{da}	0,04	+	+	
	FE30	0,1 ^b	0,01	+	1,1 ^a	0,07	+++	+++	0,1 ^c	0,02	+	+	0,5 ^{bcd}	0,11	++	++	
	FE32	0,1 ^b	0,01	+	0,4 ^{def}	0,01	+	+	0,4 ^a	0,04	+	+	0,9 ^a	0,09	++	++	
	FE38	TE	--	-	TE	0,01	-	-	TE	0,01	-	-	TE	0,02	-	-	
	FE39	0,1 ^b	0,00	+	0,5 ^{bcd}	0,06	++	++	0,1 ^c	0,02	+	+	0,6 ^{abc}	0,09	++	++	
	FE40	0,1 ^b	0,01	+	0,4 ^{def}	0,01	+	+	0,2 ^{bc}	0,01	+	+	0,6 ^{abc}	0,14	++	++	

^{a-f} Aynı sütunda bulunan farklı harflere sahip değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < 0,05$); **SH**: Standart hata; **TE**: Biyofilm oluşumu tespit edilemedi; **BOD**: Biyofilm oluşum düzeyi
^{*}Sonuçlar “B= A₀₂ / A₆₀” formülüne göre verilmiştir. Biyofilm oluşum dereceleri: “-” (biyofilm üretmeyen), “+” (zayıf biyofilm üreten), “++” (orta derecede biyofilm üreten), “+++” (güçlü biyofilm üreten) olarak gösterilmiştir.

Ek 2- İzolatların “96 Kuyucuklu Plaka Yöntemi” ile belirlenen biyofilm oluşturma kapasiteleri (devam)

Bakteri türü	İzolat numarası	24 saat inkübasyon						48 saat inkübasyon					
		30°C			37°C			30°C			37°C		
		B değeri	SH	BOD	B değeri	SH	BOD	B değeri	SH	BOD	B değeri	SH	BOD
<i>Leuconostoc</i> spp.	FE13	TE	--	-	TE	0,03	-	TE	--	-	TE	0,01	-
	FE15	TE	--	-	TE	0,01	-	TE	0,01	-	TE	--	-
	FE17	TE	--	-	TE	--	-	TE	--	-	TE	0,1 ^{de}	0,10
<i>Leuconostoc citreum</i>	FE6	TE	--	-	TE	0,01	-	TE	--	-	TE	0,01	-
	FE9	TE	--	-	TE	0,02	-	TE	--	-	TE	--	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	FE11	TE	--	-	0,1 ^f	0,02	+	TE	0,01	-	TE	0,01	-
	FE18	TE	--	-	TE	0,01	-	TE	0,01	-	TE	--	-
	FE43	TE	--	-	TE	--	-	0,1 ^c	0,00	+	0,5 ^{bed}	0,09	++
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	FE10	TE	0,01	-	TE	0,02	-	TE	--	-	TE	0,02	-
	FE5	TE	--	-	TE	0,01	-	TE	0,00	-	TE	--	-
<i>Leuconostoc gariticum</i>	FE12	TE	--	-	TE	--	-	TE	0,01	-	TE	0,01	-
	FE14	TE	--	-	TE	0,02	-	TE	0,01	-	TE	0,01	-
<i>Weissella</i> spp.	FE7	TE	--	-	0,2 st	0,13	+	TE	--	-	0,1 ^e	0,04	+
	FE16	TE	--	-	0,1 ^f	0,01	+	TE	--	-	0,1 ^{de}	0,01	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	FE23	0,1 ^b	0,01	+	0,1 ^f	0,01	+	0,2 ^{bc}	0,01	+	0,1 ^{de}	0,02	+
	FE28	TE	--	-	TE	--	-	TE	0,01	-	TE	0,02	-

^{a-f} Aynı sütünde bulunan farklı harflere sahip değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < 0,05$); **SH**: Standart hata, **TE**: Biyofilm oluşumu tespit edilemedi; **BOD**: Biyofilm oluşum düzeyi.

*Sonaçlar "B = A₀₂ / A₆₃₀" formülüne göre verilmiştir. Biyofilm oluşum dereceleri; "--" (biyofilm üretmeyen), "-" (zayıf biyofilm üretken), "+", "++" (orta derecede biyofilm üretken), "+++" (güçlü biyofilm üretken) olarak gösterilmiştir.

Ek 3- Tanısı yapılan laktik asit bakterilerinin bazı antibiyotiklere karşı dirençleri ve zon çapı (mm) ölçüm sonuçları

Bakteri	İzolat numarası	Antibiyotik (µg)									
		ST(25)	SH	ST(300)	SH	AM(25)	SH	TS(50)	SH	VA(30)	SH
<i>Lactobacillus spp.</i>	FE26	TE	--	TE	--	9,0 ^{gük}	0,40	9,3 ^{ampqps}	0,25	TE	--
	FE25	TE	--	3,0 ^{gükl}	0,00	10,3 ^{gük}	0,85	18,5 ^{atg}	0,30	TE	--
	FE41	TE	--	3,3 ^{gük}	0,25	10,3 ^{gük}	0,85	15,3 ^{güj}	0,75	TE	--
<i>Lactobacillus curvatus</i>	FE20	TE	--	6,0 ^{ca}	0,60	11,8 ^{güj}	0,75	7,5 ^{opqs}	0,30	2,0 ^d	0,00
	FE29	TE	--	2,5 ^{üld}	0,30	11,8 ^{güj}	0,75	5,0 ^s	0,60	TE	--
	FE31	TE	--	TE	--	11,0 ^{atgüj}	0,70	6,8 ^{opqs}	0,75	TE	--
	FE34	1,5 ^{cd}	0,30	3,0 ^{gükl}	0,60	11,8 ^{güj}	1,30	12,0 ^{ükanno}	1,15	TE	--
	FE35	TE	--	2,0 ^{ükl}	0,00	10,8 ^{güj}	1,20	5,3 ^{ts}	0,50	TE	--
<i>Lactobacillus plantarum</i>	FE36	TE	--	2,0 ^{ükl}	0,00	12,3 ^{atgüj}	0,85	8,3 ^{opqrs}	1,55	TE	--
	FE37	TE	--	2,0 ^{ükl}	0,00	6,3 ^{ük}	0,25	TE	--	TE	--
	FE1	1,0 ^{cd}	1,00	8,5 ^b	0,30	27,0 ^s	1,20	27,5 ^{bc}	1,20	TE	--
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	FE2	TE	--	7,3 ^{bc}	0,25	19,0 ^{cd}	2,40	21,8 ^{def}	1,10	TE	--
	FE3	0,5 ^d	0,30	8,8 ^b	0,50	23,8 ^{abc}	0,25	28,5 ^{ab}	0,85	TE	--
	FE4	0,5 ^d	0,30	7,0 ^{bcd}	0,40	16,5 ^{de}	1,55	22,0 ^{de}	1,15	TE	--
	FE27	TE	--	3,0 ^{ükl}	0,00	10,5 ^{güj}	0,65	14,8 ^{güj}	1,10	TE	--
<i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus graminis</i> , <i>Lactobacillus sakei</i>	FE42	TE	--	4,8 ^{atgüj}	0,25	21,3 ^{bcd}	1,30	17,0 ^{güj}	0,70	TE	--
	FE8	TE	--	TE	--	5,8 ^{ük}	0,25	16,8 ^{güj}	0,50	TE	--
	FE22	TE	--	2,5 ^{üld}	0,30	13,0 ^{atg}	0,60	24,0 ^{bcd}	0,00	10,5 ^a	0,85
	FE24	TE	--	4,0 ^{atgüj}	0,00	19,0 ^{cd}	0,80	24,8 ^{bcd}	1,10	11,0 ^a	0,60
	FE30	6,0 ^{ab}	0,00	14,8 ^a	0,25	25,0 ^{ab}	1,35	30,5 ^a	0,30	11,0 ^a	0,00
	FE32	4,5 ^b	0,30	6,3 ^{cd}	0,65	10,3 ^{güj}	1,75	14,3 ^{güj}	1,05	5,8 ^c	0,75
	FE38	TE	--	4,5 ^{atgüj}	0,30	TE	--	22,8 ^{cd}	1,10	7,5 ^{bc}	0,65
	FE39	5,3 ^{ab}	0,25	7,3 ^{bc}	0,25	16,0 ^{def}	0,40	TE	--	9,3 ^{ab}	0,25
	FE40	TE	--	5,3 ^{cd}	0,25	TE	--	26,5 ^{bcd}	1,50	7,0 ^c	0,00

^{a-e} Aynı sütunda bulunan farklı harflere sahip değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < 0,05$); **SH**: Standart hata; **TE**: Zon oluşumu tespit edilemedi.

ST: streptomisin, **AM**: ampisilin, **TS**: tetrasin, **VA**: vankomisin

Ek 3- Tanısı yapılan laktik asit bakterilerinin bazı antibiyotiklere karşı dirençleri ve zon çapı (mm) ölçüm sonuçları (devam)

Bakteri	İzolat numarası	Antibiyotik (µg)									
		SI (25)	SH	SI (300)	SH	AM (25)	SH	IS (50)	SH	VA (30)	SH
<i>Leucomostoc</i> spp.	FE13	TE	--	3,8 ^{gñj}	0,25	7,5 ^{gñjk}	0,65	7,8 ^{gñpqs}	0,75	3,0 ^d	0,60
	FE15	TE	--	4,0 ^{gñj}	0,00	TE	--	9,5 ^{gñnops}	0,30	TE	--
	FE17	TE	--	5,0 ^{dqñh}	0,00	5,3 ^k	0,50	11,0 ^{gñnrop}	1,00	3,0 ^d	0,00
<i>Leucomostoc citreum</i>	FE6	TE	--	TE	--	TE	--	6,3 ^{gñrs}	0,25	TE	--
	FE9	TE	--	1,5 ^{kd}	0,85	TE	--	7,3 ^{gñpqs}	0,75	TE	--
<i>Leucomostoc mesenteroides</i>	FE11	2,5 ^c	0,30	7,0 ^{bcd}	0,60	7,8 ^{gñjk}	0,50	10,3 ^{gñnopsq}	0,75	2,0 ^d	0,00
	FE18	2,3 ^{cd}	0,25	7,0 ^{bcd}	0,60	8,0 ^{gñjk}	0,40	12,5 ^{gñjkmn}	0,50	2,0 ^d	0,00
	FE43	6,8 ^a	0,25	15,3 ^a	0,75	23,5 ^{abc}	0,50	21,8 ^{de}	0,75	TE	--
<i>Leucomostoc pseudomesenteroides</i>	FE10	TE	--	1,0 ^l	0,60	TE	--	6,5 ^{gñrs}	0,65	TE	--
<i>Leucomostoc lactis</i> , <i>Leucomostoc garlicum</i>	FE5	TE	--	2,3 ^{kd}	0,25	7,0 ^{gñjk}	0,90	6,0 ^{gñs}	0,40	TE	--
	FE12	TE	--	5,0 ^{dqñh}	0,00	11,0 ^{gñnj}	1,45	10,8 ^{gñnropq}	1,20	TE	--
	<i>Leucomostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Leucomostoc mesenteroides</i>	FE14	TE	--	4,5 ^{gññi}	0,30	TE	--	13,3 ^{gñjkm}	1,30	1,6 ^d
<i>Weissella</i> spp.	FE7	TE	--	TE	--	TE	--	9,5 ^{gñnops}	0,30	TE	--
	FE16	TE	--	3,5 ^{gñjk}	0,30	TE	--	8,0 ^{gñpqs}	1,15	2,0 ^d	0,00
	FE23	2,0 ^{cd}	0,00	4,0 ^{gññj}	0,00	8,5 ^{gñjk}	0,95	10,0 ^{gñnropq}	1,15	TE	--
	FE28	TE	--	6,3 ^{cdq}	0,25	7,5 ^{gñjk}	0,95	12,5 ^{gñjkmn}	0,65	TE	--

^{a-s} Aynı sütunda bulunan farklı harflere sahip değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < 0,05$); **SH**: Standart hata; **TE**: Zon oluşumu tespit edilemedi.

SI: streptomisin, **AM**: ampisilin, **TS**: tetrasiklin, **VA**: vankomisin

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gökşen ARIK
Doğum Yeri ve Tarihi : Kayseri - 02.01.1987
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Sami Yangın Anadolu Lisesi
Lisans : Erciyes Üniversitesi Gıda Mühendisliği
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi Gıda Mühendisliği

Çalıştığı Kurum : Uludağ Üniversitesi (2011-2018)

İletişim : goksengulgor@gmail.com

Yayınları :

Gulgor, G., Korukluoglu, M. 2018. Production of extracellular polymeric substances (EPS) from lactic acid bacteria (LAB): their antimicrobial effect and potential application in food industry: Bioprocessing technology in food and health, Ed.: Kumar Verma, D., Patel, A., Srivastav, P.P., Apple Academic Press, USA.

Gulgor, G., Korukluoğlu, M. 2017. Biofilms and their advantages/disadvantages in food industry: Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs (Microbiology Book Series #6), Ed.: Méndez-Vilas, A., Formatex Research Center, Badajoz, Spain, pp: 308-314.

Korukluoglu, M., Gulgor, G. 2017. Anti-quorum sensing activity of plants: Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs (Microbiology Book Series - Volume #6), Ed.: Méndez-Vilas, A., Formatex Research Center, Badajoz, Spain, pp: 529-535.

Bagder-Elmacı, S., Gulgor, G., Tokath, M., Erten, H., İşçi, A., Ozcelik, F. 2015. Effectiveness of chitosan against wine-related microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, 107 (3):675-686. Doi: 10.1007/s10482-014-0362-6.

Tokatli, M., Gulgor, G., Bagder-Elmacı, S., Arslan k o z -Isleyen, N., Ozcelik, F. 2015. In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *BioMed Research International*, Volume 2015, Article ID 315819, 8 pages, Doi: 10.1155/2015/315819

<http://dx.doi.org/10.1155/2015/315819>.

Arik, G., Korukluoglu, M. 2017. Comparison of methods for the detection of biofilm formation in yeast and lactic acid bacteria species isolated from dairy products.

International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering, 11 (4): 306-310.

(<http://waset.org/publications/10006896/comparison-of-methods-for-the-detection-of-biofilm-formation-in-yeast-and-lactic-acid-bacteria-species-isolated-from-dairy-products>)

Korukluoglu, M., Arik, G., Erdogan, C., Kocakoglu, S. 2017. Screening of antagonistic/synergistic effect between lactic acid bacteria (LAB) and yeast strains isolated from kefir”, *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 11 (4): 282-288.

(<http://waset.org/publications/10006770/screening-of-antagonistic-synergistic-effect-between-lactic-acid-bacteria-lab-and-yeast-strains-isolated-from-kefir>)

Gulgor, G., Korukluoglu, M. 2016. Biogenic amine degradation by lactic acid bacteria during wine processing, *The Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*. 30 (Special Issue): 487-492.

Korukluoglu, M., Gulgor, G. 2016. Resistance of microbial biofilms to disinfectants and its importance in food industry, *The Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*. 30 (Special Issue): 518-524.

Gülgör, G., Korukluoğlu, M. 2015. Şarap kalitesinin geliştirilmesinde *Brettanomyces* türlerinin killer toksinler ile engellenmesi (Properties and importance of killer toxins for wine quality improvement), *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 29(2): 183-192.

Gülgör, G., Korukluoğlu, M. 2014. Mikroorganizmalar arasında çoğunluk algılanması (Quorum sensing), *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2): 83- 92.

Gülgör, G., Özçelik, F. 2014. Bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin probiyotik amaçlı kullanımı, *Akademik Gıda*, 12 (1): 63-68.

Gülgör, G., Korukluoğlu, M. 2014. Mikotoksinlerin sağlık üzerine etkileri ve moleküler tanı yöntemleri, *Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Dergisi Türktarım*, 215: 66-70.

Korukluoglu M., Gulgor G. 2016. The correlation between biofilm formation and antibiotic resistance of some microorganisms isolated from "Kefir". European Biotechnology Congress, 5-7 Mayıs 2016, Riga, Latvia.

Korukluoglu, M., Gulgor, G. 2016. Honey related microorganisms and antimicrobial compounds. International Congress on Food of Animal Origin, 10-13 Kasım 2016. Turkish Republic of North Cyprus.

Gulgor, G., Korukluoglu, M. 2016. Production of biocolours by microorganisms and their importance in food industry. European Biotechnology Congress, 5-7 Mayıs 2016, Riga, Latvia.

Gulgor, G., Korukluoglu, M. 2016. Biogenic amine degradation by lactic acid bacteria during wine processing. 27th International Scientific-Expert Congress of Agriculture and Food Industry, 26-28 Eylül 2016, Bursa, Turkey.

Korukluoglu M., Gulgor G. 2016. Resistance of microbial biofilms to disinfectants and its importance in food industry. 27th International Scientific-Expert Congress of Agriculture and Food Industry, 26-28 Eylül 2016, Bursa, Turkey.

Korukluoglu M., Gulgor G. 2016. Resistance of microbial biofilms to disinfectants and its importance in food industry. 27th International Scientific-Expert Congress of Agriculture and Food Industry, 26-28 Eylül 2016, Bursa, Turkey.

- Bagder-Elmacı, S., Gulgor, G. Tokath, M., Ozcelik, F. 2014.** The inhibitory effect of chitosan against microorganisms involved the different stages of wine production. Proceedings of 2nd International Congress on Food Technology, 5-7 Kasım 2014, Kuşadası, Turkey.
- Korukluoglu, M., Gulgor, G. 2014.** The antifungal activity of organic acids produced by lactic acid bacteria. 2nd International Congress on Food Technology, 5-7 Kasım 2014, Kuşadası, Turkey.
- Gulgor, G., Korukluoglu, M. 2014.** The risk of biofilm formation in the food industry and prevention methods. 2nd International Congress on Food Technology, 5-7 Kasım 2014, Kuşadası, Turkey.
- Bagder-Elmacı, S., Tokath, M., Gulgor, G. Sanlıbaba, P., Ozcelik, F. 2013.** Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional Cubuk pickles. The 2nd International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, 24-26 October 2013, Struga-Ohrid, Macedonia.
- Gulgor, G., Tamer, C. E., 2013.** Application possibilities for propolis as food preservative. The 2nd International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, 24-26 October 2013, Struga-Ohrid/ Macedonia.
- Korukluoglu, M., Gulgor, G. 2013.** The antimicrobial effect of locust bean extract which is a traditional food. The 2nd International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, 24-26 October 2013, Struga-Ohrid/ Macedonia.
- Gulgor, G., Korukluoglu, M. 2013.** Preservation of traditional sweeties by hurdle technology. The 2nd International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, 24-26 October 2013, Struga-Ohrid/ Macedonia.
- Arık, G., Korukluoğlu, M. 2017.** Mikroorganizmalarda enkapsülasyon uygulamaları, avantajları ve karşılaşılan sorunlar. 6. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 05-07 Ekim 2017, Adana, Türkiye.
- Korukluoğlu, M., Arık, G. 2017.** Bazı tıbbi bitkilerin fitokimyasal bileşenleri ve farmakolojik özellikleri. 6. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 05-07 Ekim 2017.
- Gülgör, G. Korukluoğlu, M. 2016.** Şarap fabrikası atıklarının mikrobiyel yolla kompostlanması. Türkiye 12. Gıda Kongresi, 5-7 Ekim 2016. Edirne, Türkiye.
- Korukluoğlu, M., Gülgör, G. 2016.** Zeytinyağı fabrikası atığı olan prinanın biyodönüşümünde küflerin kullanım olanakları. Türkiye 12. Gıda Kongresi, 5-7 Ekim 2016. Edirne, Türkiye.
- Ataş, M., Gülgör, G. 2016.** Ağır metallerin mikroorganizmalar üzerine etkisi. Türkiye 12. Gıda Kongresi, 5-7 Ekim 2016, Edirne, Türkiye.
- Küçükata, Y., Gülgör, G. 2016.** Balda bulunan potansiyel probiyotik bakteriler. Türkiye 12. Gıda Kongresi, 5-7 Ekim 2016, Edirne, Türkiye.
- Korukluoglu, M., Gulgor, G. 2014.** *Lactobacillus helveticus*'un gıdalardaki önemi ve sağlık üzerine etkileri. Bursa 3rd International Food Congress, 26-27 Eylül 2014, Bursa, Turkey.
- Gulgor, G., Korukluoglu, M. 2014.** Mikrobiyel metabolomiklerin önemi ve gıda mikrobiyolojisinde uygulama alanları. Bursa 3rd International Food Congress, 26-27 Eylül 2014, Bursa, Turkey.

- Korukluoğlu, M., Gülgör, G. 2013.** Taze meyvelerin ozon uygulaması ile *E.coli* 0157:H7'den arındırılması. 4. Gıda Güvenliği Kongresi, 14-15 Mayıs 2013, İstanbul, Türkiye.
- Korukluoğlu, M., Gülgör, G. 2013.** Mikotoksinlerin sağlık üzerine etkileri ve moleküler tanı yöntemleri. 8. Gıda Mühendisliği Kongresi, 7-9 Kasım 2013, Ankara, Türkiye.
- Gülgör, G., Korukluoğlu, M. 2013.** Midye dolmanın gıda güvenliği açısından değerlendirmesi. 4. Gıda Güvenliği Kongresi, 14-15 Mayıs 2013, İstanbul, Türkiye.
- Gülgör, G., Korukluoğlu, M. 2013.** Likopenin üretim yolları ve nutrasötik özellikleri. 8. Gıda Mühendisliği Kongresi, 7-9 Kasım 2013, Ankara, Türkiye.
- Gülgör, G., Korukluoğlu, M. 2013.** Gıda bileşenlerinin meme kanserine neden olan genler ile etkileşimi. 8. Gıda Mühendisliği Kongresi, 7-9 Kasım 2013, Ankara, Türkiye.
- Gülgör, G., Korukluoğlu, M. 2013.** Gıda konveyörlerinde mikrobiyel sorunlar ve çözüm önerileri. 8. Gıda Mühendisliği Kongresi, 7-9 Kasım 2013, Ankara, Türkiye.
- Gülgör, G. 2013.** Soğuk zincirin gıda güvenliğindeki yeri ve önemi. 4. Gıda Güvenliği Kongresi, 14-15 Mayıs 2013, İstanbul, Türkiye.
- Gülgör, G., Bektaş, D., Korukluoğlu, M., Kumral, A. 2012.** Bisfenol A içelikli gıda ambalajlarına güncel yaklaşım. 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim 2012, Hatay, Türkiye.
- Korukluoğlu, M., Gülgör, G. 2012.** Meyve sularında bozulma etmeni *A.acidoterrestri*s'in bazı katkı maddeleri ile inhibisyonu. 11. Gıda Kongresi, 10-12 Ekim 2012, Hatay, Türkiye.
- Kumral, A., Bektaş, D., Gülgör, G., Korukluoğlu, M. 2012.** Gemlik çeşidi olarak satışa sunulan sofralık zeytinlerin bazı özellikleri. Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi, 16-18 Mayıs 2012, Aydın, Türkiye.
- Bektaş, D., Gülgör, G., Korukluoğlu, M. 2012.** Akıllı etiketleme teknolojisi ve kullanılabilirliği. 3. Gıda Güvenliği Kongresi, 3-4 Mayıs 2012, İstanbul, Türkiye.
- Gülgör, G., Bektaş, D., Korukluoğlu, M. 2012.** Nutrigenetik, 3. Gıda Güvenliği Kongresi, 3-4 Mayıs 2012, İstanbul, Türkiye.