



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANNE SÜTÜNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU,
KARAKTERİZASYONU, BAZI PROBİYOTİK VE STARTER
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pınar ÖNGÜN

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM

AKSARAY, 2015

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün numaralı Tezli Yüksek Lisans öğrencisi, “Pınar ÖNGÜN”, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “ANNE SÜTÜNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU KARAKTERİZASYONU VE BAZI PROBİYOTİK VE STARTER ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Yrd.Doç. Dr. Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM**
 Aksaray Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç.Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK**

Jüri Üyeleri : **Doç.Dr. İlkan Ali OLGUNOĞLU**

Teslim Tarihi :

Savunma Tarihi :

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanışımında alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Pınar ÖNGÜN

ÖNSÖZ

Anne sütü yeni doğmuş bebekler için önemli bir gıda kaynağıdır. Birçok çalışma bu sıvının yeni doğan bebeklerin sağlığı üzerinde birçok olumlu etki oluşturduğunu göstermektedir. Bu olumlu etkilere neden olan faktörlerden birisi de anne sütünün içeriğinde bulunan sağlığa faydalı laktik asit bakterileridir.

Probiyotik ve starter olarak da kullanılan laktik asit bakterileri sindirim sisteminin doğal üyeleri olmakla birlikte bu bakteriler bağırsak yüzeyine tutunarak enterik enfeksiyon riskini azaltırlar ve metabolizmaya yardımcı olurlar. Bazı toksik gıda bileşenlerini parçalayarak ve istenmeyen mikroorganizmaların zararlı metabolitler oluşturmalarını önleyerek sağlıklı bir yaşamın devamını mümkün kılmaktadırlar. Ayrıca bu bakterilerin laktoz hidrolizi, serum kolesterol düzeyinin azaltılması, kolon kanserinin önlenmesi, bağışıklık sisteminin uyarılması gibi pek çok faydası da vardır. Probiyotik LAB'nin, gıda ve sağlık alanındaki önemi, bu bakterilerin süt ve süt ürünlerinde, doğal koşullarda yaygın olarak bulunması gibi sebepler göz önüne alınarak bu çalışmada anne sütlerinden LAB'i izole edilerek, karakterizasyonu yapılmış ve bu izolatların bazı probiyotik ve starter olma özellikleri araştırılmıştır. Bu çalışma ASÜ BAP 2013/70 numaralı Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında büyük desteğini gördüğüm, bilgi ve önerileri ile bana yol gösteren, yardım ve desteğini her zaman hissettiğim çok kıymetli Danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM'a en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü desteklerinden dolayı Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi (ASÜBTAM) ne ve izolatların tanımlanmasında yardım ve desteklerinden dolayı Tansu TANIR'a (BIOMERIEUX) teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında büyük fedakârlık göstererek yardım ve desteklerini esirgemeyen çok sevgili arkadaşlarım Ayşe GÜNYAKTI ve Ayşe YAVUZ'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın yapılmasını ASÜ BAP 2013/70 numaralı projeyle destekleyen Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemi sağlayan ve desteklerini esirgemeyen anneme ve babama sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER DİZİNİ	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1.Laktik Asit Bakterileri	2
2.2.Laktik Asit Bakterilerinin Bulunduğu Yerler	2
2.3.Laktik Asit Bakterilerinin İşlevleri.....	3
2.4. Anne Sütünde Bulunan Mikroorganizmalar.....	4
2.5.Probiyotikler	5
2.6.Starter Mikroorganizmalar	6
2.7.Lactococcus Cinsi Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri.....	7
2.8.Streptococcus Cinsi Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri	8
3. MALZEME VE YÖNTEM	9
3.1. Süt Örneklerinin Toplanması	9
3.2. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	9
3.3. Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Fenotipik Yöntemlerle Karakterizasyonu.....	10
3.3.1. İzolatların Mikroskopik Morfolojileri ve Gram Boyama	10
3.3.2. Katalaz Testi	10
3.3.3. Hareketlilik Testi	10
3.3.4. Glukozdan Gaz Oluşturma.....	11
3.3.5. Hidrojen Sülfür Testi	11
3.4.İzolatların Tanımlanması.....	11

3.4.1. API 20 Strep Testi.....	11
3.4.2. API 20 Strep Testi ile Tanımlamanın Yapılması.....	12
3.5. İzolatların Bazı Starter Özelliklerinin Belirlenmesi	16
3.5.1. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme Testi	16
3.5.2. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Testi	16
3.5.3. İzolatların Asit Üretme Yeteneklerinin Belirlenmesi	16
3.5.4. Ekzopolisakkarit (EPS) Üretiminin Belirlenmesi.....	16
3.5.5. İzolatların Nisin Dirençliliği.....	17
3.6. İzolatların Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	18
3.6.1. Düşük pH’da Gelişme Testi.....	18
3.6.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi	18
3.6.3. Elde Edilen İzolatların Patojen Mikroorganizmalara Antimikrobiyal Aktivitesi.....	19
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	20
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	20
4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Fenotipik Yöntemlerle Karakterizasyonu.....	21
4.2.1. İzolatların Mikroskopik Morfolojileri ve Gram Boyama	21
4.2.2. Katalaz Testi	21
4.2.3. Hareketlilik Testi	22
4.2.4. Glukozdan Gaz Oluşturma.....	22
4.2.5. Hidrojen Sülfür Testi	23
4.3. İzolatların Tanımlanması.....	30
4.3.1. API 20 Strep Testi.....	30
4.4. İzolatların Bazı Starter Özelliklerinin Belirlenmesi	32
4.4.1. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme Testi	32
4.4.2. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Testi	33
4.4.3. İzolatların Asit Üretme Yetenekleri.....	34
4.4.4. Ekzopolisakkarit (EPS) Üretiminin Belirlenmesi.....	34
4.4.5. İzolatların Nisin Dirençliliği.....	36
4.5. İzolatların Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	36

4.5.1. Düşük Ph' da Gelişme Testi	36
4.5.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	37
4.5.3. Elde Edilen İzolatların Patojen Mikroorganizmalara Antimikrobiyal Etkisi	40
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ.....	56

ÖZET
ANNE SÜTÜNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU,
KARAKTERİZASYONU VE BAZI PROBİYOTİK VE STARTER
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkiler gösteren canlı mikroorganizmalar probiyotik olarak adlandırılırlar. Anne sütü yeni doğmuş bebekler için önemli bir gıda kaynağı olmakla birlikte içeriğinde probiyotik özellik gösteren laktik asit bakterilerini de barındırmaktadır.

Çalışmada anne sütlerinden laktik asit bakterileri izole edildikten sonra elde edilen izolatların bazı fenotipik yöntemlerle karakterizasyonları yapılmıştır. Daha sonra izole edilen bakterilerin API 20 Strep kiti ile tür tayinleri yapılmıştır. Yapılan tür tayini sonunda 2 adet *Streptococcus salivarius*, 1 adet *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* suşları ile çalışmaya devam edilmiştir. Belirlenen bu 3 suşun bazı starter olma özellikleri incelenmiştir. Tanımlanan bu izolatlar %4 ve %5 lik tuz konsantrasyonlarında gelişme gösterirken, en son 48. saatteki pH ölçümleri incelendiğinde her 3 suşunda asit üretimi pH 5,40 ve pH 6,93 arasında bulunmuştur, *S. salivarius* (M14-365) suşunun ekzopolisakkarit üretim miktarı en fazla olan suş olarak gözlenirken (8,71 g/L) *L. lactis* subsp. *cremoris* (M4-157) ve *S. salivarius* (M4-11) suşlarının ise EPS üretim miktarları sırasıyla 4,94 g/L ve 5,49 g/L olarak tespit edilmiştir. Tüm suşların nisine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Suşların bazı probiyotik olma özellikleri de araştırılmıştır. Üç suşun kanamisin antibiyotiği hariç test edilen diğer antibiyotiklere (ampicillin, gentamicin, kanamycin, erythromycin ve penisilin G) hassas olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu suşların çeşitli insan ve balık patojenleri üzerine antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Sadece insan kaynaklı patojenlerden olan *P. aeruginosa* üzerinde *S. salivarius* suşlarının (M4-11 ve M14-365) antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anne sütü, izolasyon, karakterizasyon, laktik asit bakterileri, probiyotik, starter

ABSTRACT

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF SOME PROBIOTIC AND STARTER FEATURES OF LACTIC ACID BACTERIA FROM HUMAN BREAST MILK

Live microorganisms showing positive effects on host health are called probiotics. Besides milk is an important food source for newborn babies contains lactic acid bacteria showing probiotics characteristics.

In this study, Lactic acid bacteria isolated from breast milk. After isolation it has made the characterization of isolates by some phenotypic method. Then the identification of isolated bacteria were done with API 20 Strep system. End of this identification two *Streptococcus salivarius* and one *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain are obtained and continued with these strains in this work. Determined these three strains are examined for starter feature. As these isolates have shown growth in salt concentration between 4% and 5%. At last 48 hours, pH concentrations are measured and acid production rate are monitored between pH 5.40 and pH 6.93 for these three strains. Also exopolysaccharide production of these strains was determined and *S. salivarius* (M14-365) was observed the highest rate (8.71 g/L). EPS production of *L. lactis* subsp *cremoris* (M4-157) and *S. salivarius* (M4-11) strains were determined as 4.94 g/L and 5.49 g/L respectively. It was determined that all strains were resistance against nisin. Some probiotic features of these strains were investigated. And they were tested with antibiotics (ampicillin, gentamicin, kanamycin, erythromycin and penicillin G) was found to be sensitive to this antibiotics except three strain kanamycin antibiotic. Besides antimicrobial activity on various human and fish pathogens of these strains was investigated. Only *S. salivarius* strains (M4-11 and M14-365) showed antimicrobial activity against *P. aeruginosa* pathogen of human.

Key Words: Breast milk, isolation, characterization, lactic acid bacteria, probiotic, starter

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. API 20 Strep inkübasyon sonu pozitif (+) reaksiyonlar.....	13
Şekil 3.2. API 20 Strep inkübasyon sonu negatif (-) reaksiyonlar.....	13
Şekil 3.3. İdentifikasyonu gösteren uygulama akış seması.....	15
Şekil 4.1. Süt ile inoküle edilmiş besiyerlerinin anaerobik jarlarda inkübasyonu.....	20
Şekil 4.2. Gram boyama sonucu mor renkli gram pozitif koloniler.....	21
Şekil 4.3. Katalaz (+) ve katalaz (-) suşlar.....	21
Şekil 4.4. Hareketlilik testi.....	22
Şekil 4.5. Glukozdan gaz oluşturan ve oluşturmayan suşlar.....	22
Şekil 4.6. Hidrojen sülfür testi.....	23
Şekil 4.7. 24 saatlik süre sonunda M14-365 suşunun API 20 Strep ile tanımlanması.....	31
Şekil 4.8. 24 saatlik süre sonunda M4-11 suşunun API 20 Strep ile tanımlanması.....	31
Şekil 4.9. 24 saatlik süre sonunda M4-157 suşunun API 20 Strep ile tanımlanması.....	31
Şekil 4.10. İzolatların EPS üretim miktarları.....	35
Şekil 4.11. M4-11 numaralı suşun ampicilline karşı antibiyotik duyarlılık testi.....	39
Şekil 4.12. M14-365 numaralı suşun ampicilline karşı antibiyotik duyarlılık testi.....	39
Şekil 4.13. M4-157 numaralı suşun ampicilline karşı antibiyotik duyarlılık testi.....	39
Şekil 4.14. M4-11 numaralı suşun erythromycine karşı antibiyotik duyarlılık testi.....	39
Şekil 4.15. M14-365 numaralı suşun erythromycine karşı antibiyotik duyarlılık testi.....	39
Şekil 4.16. M4-157 numaralı suşun erythromycine karşı antibiyotik duyarlılık testi.....	39
Şekil 4.17. M4-11 numaralı suşun gentamisine karşı antibiyotik duyarlılık testi.....	40
Şekil 4.18. M14-365 numaralı suşun gentamisine karşı antibiyotik duyarlılık testi.....	40
Şekil 4.19. M4-157 numaralı suşun gentamisine karşı antibiyotik duyarlılık testi.....	40
Şekil 4.20. M4-11 numaralı suşun penicillin G'ye karşı antibiyotik duyarlılık testi.....	40
Şekil 4.21. M14-365 numaralı suşun penicillin G'ye karşı antibiyotik duyarlılık testi.....	40
Şekil 4.22. M4-157 numaralı suşun penicillin G'ye karşı antibiyotik duyarlılık testi.....	40
Şekil 4.23. M14-365 ve M4-157 suşlarının <i>P.aeruginosa</i> patojenine antimikrobiyal etkisi.....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1. Seçilen kolonilerin fenotipik test sonuçları.....	24
Çizelge 4.2. M4-11, M14-365, M4-157 numaralı suşların API 20 Strep sistemi ile identifikasyonu.....	30
Çizelge 4.3. İzolatların farklı sıcaklıklarda gelişime durumu.....	32
Çizelge 4.4. İzolatların farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme durumu.....	33
Çizelge 4.5. İzolatların asit üretme yetenekleri.....	34
Çizelge 4.6. İzolatların EPS üretim miktarları.....	35
Çizelge 4.7. İzolatların nisin dirençliliği.....	36
Çizelge 4.8. İzolatların pH=3,9'da gelişimleri.....	37
Çizelge 4.9. İzolatların antibiyotik duyarlılık testi zon çapları	38
Çizelge 4.10. İzolatların insan patojen mikroorganizmalara antimikrobiyal etkisi...	41
Çizelge 4.11. İzolatların balık patojenleri üzerine antimikrobiyal etkisi.....	41

SİMGELER DİZİNİ

mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
cm	Santimetre
°C	Santigrat Derece
dk	Dakika
g	Gram

KISALTMALAR DİZİNİ

LAB	Laktik Asit Bakterileri
GRAS	Generally Recognised as Safe/ Genelde Güvenilir olarak Bilinen
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Lb.	<i>Lactobacillus</i>
L.	<i>Lactococcus</i>
S.	<i>Streptococcus</i>
EPS	Ekzopolisakkarit

1. GİRİŞ

Bebeklerde doğal yolla bağışıklık sistemlerini güçlendiren anne sütü, yılda milyonlarca çocuğun ölümünü önleyen, besleyici, ekonomik, yan etkisi olmayan ve bebeğe verilirken özel bir işlem gerektirmeyen steril bir gıdadır. Yeni doğmuş bebeklerin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan tüm sıvı, enerji ve besin öğelerini içeren, biyoyararlılığı yüksek, sindirimi kolay doğal bir besindir. Anne sütünün içeriğinde bulunan yağ, karbonhidrat, protein, mineral ve vitaminler gibi çeşitli büyüme faktörlerinin yanı sıra probiyotik özellik taşıyan laktik asit bakterileri (LAB) içermektedir. Probiyotik özellik taşıyan laktik asit bakterileri sindirim sisteminin doğal üyeleridir ve faydalı olarak nitelendirilen bu bakterilerin, gıdaların sindirimine, vitamin üretimine ve zararlı mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların önlenmesine yardımcı olduğu bilinmektedir. Süt sanayinde starter kültür yapımında kullanılan laktik asit bakterileri gıda sanayinde kullanılan en önemli gruplarından da birini oluşturmaktadır.

Probiyotik bakterilerinin gıda ve sağlık alanındaki önemi, bu bakterilerin süt ve süt ürünlerinde, doğal koşullarda yaygın olarak bulunması, bakteriyosin üretme potansiyelinin olması ve antimikrobiyal özellik göstermesi gibi sebepler göz önüne alınarak bu çalışmada anne sütünden laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmış ayrıca bu bakterilerden belirlenen suşların bazı probiyotik ve starter olma potansiyeli araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Laktik Asit Bakterileri

Gram pozitif basil ve koklardan oluşan laktik asit bakterileri Firmicutes şubesine ait çeşitli bakteri cinslerinden oluşmaktadır. Spor oluşturmayan ve katalaz negatif olan bu grubun önemli cinsleri arasında *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella* yer almaktadır. Bütün laktik asit bakterileri anaerobik koşullar altında gelişim gösterebilseler de pek çok anaerobik bakterinin tersine oksijene karşı duyarlı değildirler, yani oksijen varlığında da gelişim gösterebilmektedirler. Bu nedenle de aerotolerant anaerob organizmalar olarak adlandırılmaktadırlar. Fermantasyon sonucu ana ürün olarak laktik asit üreten bu bakteriler sitokrom içermemekte ve elektron taşıma sistemi taşımamaktadırlar. Bu nedenle laktik asit bakterilerinde enerji eldesi yalnızca substrat düzeyinde fosforilasyon ile gerçekleştirilmektedir. Karbonhidrat metabolizmaları göz önüne alındığında homofermentatif ve heterofermentatif olarak iki alt gruba ayrılan LAB taksonomisi uzun yıllardan beri bakterilerin fenotipik özellikleri baz alınarak gerçekleştirilmekte ve bu değerlendirmeye göre LAB; (i) *Thermobacterium*, (ii) *Streptobacterium* ve (iii) *Betabacterium* şeklinde üç alt gruba ayrılmaktadır (Beasley, 2004; Gürsoy ve Kınık, 2005; Madikan ve Matrinko, 2006).

2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Bulunduğu Yerler

LAB, insanlarla mutualist yaşayan çok sayıdaki bakteri grubunu içerir. Bu bakteriler çok önemli probiyotik mikroorganizmalar olup doğal ortamlar olarak mukozal yüzeylerde, özellikle de gastrointestinal sistemde, ağız ve burun boşluklarında, deride kısacası insan vücudunun dış ortamın etkisinde kalan ve bakterilerin hayatta kalması için uygun koşullara sahip tüm bölgelerinde bulunabilmektedir (Sanders, 2000; Tok ve Aslım, 2007). Anne sütüyle beslenen bir bebeğin bağırsak mikrobiyotasının en baskın üyeleri laktik asit bakterileridir. Ayrıca gıda olarak tüketilen bitkiler (meyveler, sebzeler ve tahıl taneleri), şarap, süt ve ette de LAB bulunmaktadır (Wood ve Holzapfel, 1995; Wood ve Warner, 2003; Makarova ve Koonin, 2007).

2.3. Laktik Asit Bakterilerinin İşlevleri

Geleneksel fermente gıdalarda bulunan laktik asit bakterileri genel olarak ürünlere kendine özgü koku, tat ve yapı kazandırmaktadır (Sağdıç, 2002). Ürettikleri metabolitler ile koruyucu özelliğe sahiptirler, fermente olabilen şekerleri tüketip diğer mikrobiyotayı oluşturan bakterilerin çoğalmasını kontrol ederler, ortamın oksidasyon-reduksiyon potansiyelini düşürürler. Laktik asit bakterilerinin pek çok üyesinin bakteriyosin ürettiği bilinmektedir. Antibakteriyal etki *Lactobacillus acidophilus* tarafından üretilen acidophilin ve lactocidin, *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen lactolin ya da *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin gibi antibiyotik ve antibiyotik benzeri maddeler üzerinden tanımlanmıştır. Üretilen bakteriyosinler aracılığıyla bakteriyosinin türüne bağlı olarak özellikle *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* gibi gıda kökenli patojen bakterileri inhibe edebilmektedirler. LAB tarafından üretilen bakteriyosinler arasında *L. lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin en iyi karakterize edilmiş olandır. Nisin geniş spektrumda antimikrobiyal aktiviteye sahip olması, gıda koruyucusu olarak uzun yıllar güvenle kullanılmış olması gibi olumlu özellikleri nedeni ile ticari ve ekonomik anlamda ayrıca önem arz etmektedir (Dinçer vd., 2009).

Ürettikleri laktik asitle ürünün korunmasına yardımcı olurlar. Yoğurtta bulunan laktik asit bakterilerinin kolesterol düşürücü, üretilen laktik asit ve yoğurdun sahip olduğu diğer antibakteriyel maddeler, kalın bağırsakta skatol ve indol gibi fenolik bileşikler üreterek canlı dokuya zarar veren ve hatta kanser başlangıcına neden olan bakterilere karşı engelleyici, bağışıklık sistemini güçlendirici, vücudu koruyucu ve enfeksiyonları engelleyici, kadınlarda hamilelik süresince ve sonrasında kan basıncını düzenleyici etkisi olduğu belirtilmektedir (Canan vd., 2004).

Sucukta laktik asit bakterileri karbonhidratları indirgeyerek aroma oluşumuna katkı sağlar. pH düşürücü etkisiyle ürün daha çabuk kurur, nitritin parçalanmasını ve renk oluşumunu hızlandırır (Alperden, 1993).

Anne sütü alan bebeklerde asidik bir luminal ortam yaratan laktik asit bakterileri, oligosakkaritlerin varlığı mukoza yüzeyindeki reseptörler için bakterilerle yarışmaya girerek patolojik bakteri kolonizasyonunu önlemektedir.

2.4. Anne Sütünde Bulunan Mikroorganizmalar

Anne sütünde Streptokok, Stafilokoklar, Enterokoklar, Bifidobakteriumlar ve Laktokoklar bulunmaktadır (Fernandeza vd., 2014). *Lactococcus* ve *Lactobacillus* cinsine ait türler büyük bir çoğunlukla GRAS (Generally recognized as safe-genel olarak güvenli bilinen) statüsünde bulunurken, *Streptococcus* ve *Enterococcus* cinslerine ait türler ve birkaç LAB cinsi üyesi fırsatçı patojenleri içermektedir.

Anne sütünde bulunan ve son yıllarda probiyotik olma özelliğinden dolayı yaygın olarak yararlanılan bakterilerden bir diğeri ise *Bifidobacterium*'lardır. Bu bakteriler insan sindirim sisteminde en fazla bulunan bakterilerden birisidir (Grigor vd., 2001). Son yıllarda hazırlanan probiyotik preparatları içerisinde *Bifidobacterium* türlerine geniş ölçüde yer verilmektedir. Özellikle bağışıklık sistemi problemi olan kişilerde pek çok olumlu etkilerinin olduğu belirtilmiştir. Ayrıca yeni doğanda sindirim sistemine ilk olarak yerleşen ve patojenlerin gelişimini sınırlayan bakteri olduğu düşünülmektedir.

Yine anne sütünden elde edilen diğeri bir bakteri türü ise *Enterococcus* türleridir (Martin vd., 2007). Yapılan bir çalışmada tanımlama testleri sonucunda izole edilen bakterilerin pek çoğunun *Enterococcus faecium* olduğu belirlenmiştir. *Enterococcus* cinsi bakteriler üzerinde yapılan çalışmalar diğeri laktik asit bakterileri üzerinde yapılan çalışmalar kadar yaygın değildir. Bu cinse ait türler fırsatçı patojen olarak tanınmış ve olumlu özelliklerinin incelenmesi hususunda yeterli çalışma yapılmamıştır. Ancak son yıllarda gerek anne sütünde gerekse sindirim sisteminde yoğun bir şekilde bulundukları ve pek çok fonksiyonel özelliğe sahip suşlarının varlığı kanıtlanmıştır (Zeyner ve Boldt, 2006). Günümüzde bu özelliklerinin belirlenmiş olmasından dolayı *Enterococcus* türleri üzerindeki araştırmalar yoğunlaşmış ve bu bakterinin sanılandan daha fazla yararlı bazı etkileri olabileceği konusu önem kazanmıştır.

Anne sütü ile yapılan bazı çalışmalarda süt örneklerinin incelenmesi ile izole edilen suşlar sırasıyla; *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* ve *Lb. fermentum* olarak teşhis edilmiştir. *Lactobacillus brevis*' in ise dominant tür olduğu görülmüştür (Başyigit, 2004).

2.5. Probiyotikler

Probiyotik latince kökenli bir kelime olup dilimizdeki karşılığı yaşam içindir. Probiyotikler hayvan ve insanların sindirim sistemindeki mikrobiyal dengeyi sağlayarak konakçıya fayda sağlayan tek bir tür veya birden fazla türdeki “canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmıştır. Probiyotikler ve sağlığa olumlu etkileri üzerine ilk çalışma ise 19. yüzyılın sonlarında Rus bilim adamı Metchnikoff tarafından yapılmıştır. Metchnikoff mikrofloranın oluşması üzerine sistematik olarak çalışmış ve fermente süt ürünlerinin vücutta bulunan toksik bir maddeden zehirlenmeyi engellediğini öne sürmüştür (Fuller, 1989; Fuller, 1999; Gismondo ve Drago, 1999). Fuller ise probiyotikleri konakçının intestinal mikroflorasının gelişimini teşvik eden yararlı etkileri olan canlı mikrobiyal besin elementleri olarak tanımlamıştır. Bu tanımlama Huisin’t Veld tarafından, insanların veya hayvanların doğal mikroflorasına ait özellikleri geliştiren, tüketilmeleri sonucunda ağızda gastrointestinal sistemde, üst solunum yollarında ya da ürogenital kanallarda yararlı etkileri ile konakçının sağlığında iyileşmeye sebep olan tek veya karışık canlı mikroorganizma kültürleri şeklinde genişletilmiştir (Klaenhammer ve Kullen, 1999).

İyi bir probiyotik; patojen olmamalı ve kullanıldığı insan ve hayvanda yan etki oluşturmamalı, mide ve duodenumdan geçişi sırasında buradaki yüksek asitliğe toleranslı olmalı, ince bağırsağın üst kısmından geçişi sırasında safra tuzlarına karşı dirençli olmalı, bağırsak epitel hücrelerinde kısa sürede kolonize olup çoğalmalı, antimikrobiyal maddeler üreterek patojen mikroorganizmaların sindirim sisteminde barınmalarını önlemeli, insan ve hayvan sağlığında çeşitli nedenlerden dolayı kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli olmalı, patojen bakterilere karşı antagonistik etkileri olmalı, bakteriyosin, hidrojen peroksit, laktik asit gibi organik asitler sentezleyebilmeli ve bağırsağın pH’sını düşürmeli, mide ve bağırsak kanalından geçişleri sırasında canlı kalabilmeli, epitel yüzeylere tutunmayı sağlayan maddeler (ekzopolisakkarit, lektin vb.) üretebilmeli, bakterinin yüzeyi hidrofobik yapıda olmalı, agregasyon ve koagregasyon yeteneğine sahip olmalı, depolanma süresince canlılığını ve stabilitesini korumalı, konakçıya spesifik olmalı, antikor üretimini teşvik ederek bağışıklık sistemini güçlendirmelidir (Nousiainen ve Setälä, 1993; Tuncer, 2000). Genel olarak probiyotikler, insan ve hayvanlarda bağırsak sisteminin mikrobiyal dengesini iyileştirerek yararlı etkiler göstermektedir.

Probiyotik olarak kullanılan en yaygın LAB sınıflandırmada 6 gruba ayrılırlar (Tannock, 1997). Bunlar; *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Bifidobacterium*'dur. İnsan beslenmesinde ve hayvan yem katkısı olarak kullanılan bazı probiyotik mikroorganizmalar arasında *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. reuteri*, *S. thermophilus* gibi LAB yer almaktadır (Başyigit, 2004).

İnsanlarda probiyotiklerin tüketimi sonucu belirtilen faydaları; laktoz toleransını arttırması, sindirim sistemi enfeksiyonlarını engellemesi, kanser riskini azaltması, kolesterolü düşürmesi ve kalp-damar hastalıklarını engellemesi, sindirim zorluklarını gidermesi, çeşitli vitaminler sentezleyerek besleyiciliği artırması ve bağışıklık sistemini kuvvetlendirmesi olarak özetlenmektedir (Salminen vd., 1998; Fooks vd., 1999; O'sullivan, 2006).

2.6. Starter Mikroorganizmalar

Starter kültürlerin ilk kullanımının üzerinden yaklaşık 100 yıl geçmiştir. Storch, Kopenhag'da; Weigmann, Kiel'de birbirlerinden bağımsız olarak ekşi krema ve peynir altı suyundan peynir üretiminde laktik asit ve diasetil üretiminden sorumlu olan mezofilik laktik asit bakterilerini izole etmeyi başarmışlardır. Günümüzde tüm dünya ülkelerinde fermente sütler, krema olgunlaştırma ve değişik peynir çeşitlerinin üretiminde dominant olarak *Lactococcus* türleri kullanılmakta, bazı peynir çeşitleri ile süt içeceklerinin yapımında mezofilik lactobasillerden de yararlanılmaktadır. Bunlar asitlik oluşturdıkları gibi proteolitik aktif bakterilerdir. Hatta bazıları probiyotik özelliğe de sahiptir (Kılıç, 2001).

Yapılan çalışmalarda *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium* bakterilerinin çeşitli suşlarının destek kültür olarak cheddar peynirinde kullanımında olumlu sonuçlar verdiği görülmüştür (Gürsoy ve Kınık, 2006).

Yoğurt, tereyağı, peynir gibi süt ürünlerinin kendine özgü yapıları ile beğenilen tat ve aromalarının oluşmalarını sağlamak amacıyla kullanılan, istenen özelliklere sahip saf mikroorganizma kültürlerine saf kültür veya starter kültür denilmektedir (Kılıç, 2001). Starter kültür olarak ürüne bağlı olmak kaydı ile genellikle mezofilik laktik asit bakterilerinden *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* ya da termofillerden *S. thermophilus*, *Lb. helveticus* ve *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* kullanılmaktadır

Yoğurt ve benzeri ürünler ile sert ve pıhtısı pişirilen peynirlerin yapımında yararlanılan termofilik laktik kültürler ise *Lb. delbruecki spp. bulgaricus* ve *Lb. delbruecki spp. lactis*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus* ile *S. salivarius spp. thermophilus*'tan oluşmaktadır (Kılıç, 2001; Oumer, 2001) *L. lactis subsp. cremoris*, *L. lactis subsp. lactis*, *L. lactis subsp. lactis var diacetylactis* ve *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* içeren ticari starter kullanılarak inek ve koyun sütü karışımından yarı sert bir İspanyol peyniri olan Hispanico peyniri üretmiştir.

Lb. paracasei spp. paracasei, birçok peynir türünün doğal laktik florasında başlıca laktik asit bakterisi olarak bulunabilmektedir. *Lb. paracasei spp. paracasei* suşları esas olarak probiyotik mikroorganizmalardır (Gürsoy ve Kınık, 2006). Starter kültürlerin önemli özellikleri hızlı asidifikasyon, sütün mikrobiyal olarak muhafazası, ürüne özel aroma oluşturmaları, yapı oluşturma kapasiteleri ve sağlık etkileridir. Bakteri gelişimi sırasında laktozun fermentasyonu sütün asitliğinin artmasına sebep olur ve bu şekilde süt, sütün bozulmasına sebep olan bakterilere ve patojen bakterilerin gelişmesine karşı korunmuş olur (Ruas-Madiedo vd., 2002).

2.7. *Lactococcus* Cinsi Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Fermente gıda endüstrisinde önemli bir yere sahip olan LAB' lar içerisinde yer alan laktokoklar (*Lactococcus spp.*); Gram-pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmayan, hareketsiz, fakültatif anaerob bakteriler olarak tanımlanmaktadır. DNA hibridizasyonu, immunolojik analizler, lipotaykoik asit yapısı, yağ asidi profillerinin karşılaştırılması gibi tanı testlerinden elde edilen verilere dayanılarak *Lactococcus* cinsi oluşturulmuştur (Schleifer vd., 1985).

Lactococcus cinsi bakteriler kok morfolojisinde olup, gelişme ortamlarında tek (0,5–1,5 µm), kok çiftleri ya da kısa zincirler halinde bulunabilmektedir. Optimum gelişme sıcaklıkları 30 °C olan laktokoklar, 10 °C ve 45 °C arasında gelişme gösterebilmektedir. Türleri arasında 40 °C üzerinde ve yüksek tuz konsantrasyonlarında (>% 4 sodyum klorür) gelişebilme ve farklı şekerlerden (laktoz, mannitol ve rafinoz) asit oluşturma özellikleri bakımından farklılıklar görülmektedir (Schleifer 1985; Schlegel 1997; Furet vd., 2002). % 6,5 NaCl varlığında ve ortam pH'sının 9,6 olması durumunda gelişme göstermezler (Büyükyörük vd., 2010). Laktozu fermente etme yeteneği, özellikle süt endüstrisinde starter olarak kullanılan

laktokoklar için kritik bir önem taşımaktadır. Şekerleri homofermentatif yolla laktik aside dönüştürmek sureti ile enerji elde etmektedirler. Laktokoklar bu özellikleri ile streptokoklardan ve enterokoklardan ayrılırlar.

Laktokoklar genellikle bitkilerde ve hayvanların derilerinde bulunmaktadır. *L. garvieae* en çok balıklardan, hayvanlardan ve süttten, *L. piscium* somon balığından, *Lb. plantarum* çoğunlukla bitkilerden izole edilmektedir (Williams vd., 1990). *L. raffinolactis* ise nadiren de olsa çiğ sütte ve peynirlerde bulunmaktadır (Perez Elortondo vd., 1999; Lopez-Diaz vd., 2002). *L. lactis* türüne ait *L. lactis subsp. cremoris* ve *L. lactis subsp. lactis* alt türlerine çoğunlukla çiğ süt, yumuşak ve sert peynirler, ekşi kremler ve bu gibi mandıra ürünlerinde rastlanmaktadır (Ward vd., 2002; Casalta and Montel 2008) *Lactococcus* cinsini oluşturan bakteriler içerisinde *L. lactis* türü, çiğ sütte ve fermente süt ürünlerinde genellikle en baskın bulunan laktik asit bakterisidir.

2.8. Streptococcus Cinsi Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

Streptococcus cinsindeki türler küresel ve oval morfolojiye sahip, gram pozitif, katalaz negatif ve genellikle hareketsiz bakterilerdir. Hücreleri ikili veya zincir halinde bulunan homofermentatif laktik asit bakterisidir (Mitchell ve Sandine, 1984). Çapları 0,7-0,9 µm olan hücreler gram pozitif ve katalaz negatif özelliğe sahiptir. Optimum olarak 40- 45 °C’ de gelişen *S. thermophilus*’ un minimum ve maksimum gelişme sıcaklıkları sırasıyla 20 °C ve 52 °C’ dir. Bu mikroorganizma termodurik karakterdedir ve pastörizasyon sıcaklığına dayanabildiğinden (65 °C’ de 30 dk. veya 75 °C’ de 15 dk.) pastörize sütlerde bulunabilir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışma Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi Tarım Ürünleri Geliştirme Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Anne sütünden izole edilen laktik asit bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılarak, bu bakterilerin bazı probiyotik ve starter özelliklerine belirlenmiştir.

3.1. Süt Örneklerinin Toplanması

Bu çalışmada 2013/27 karar sayılı etik kurul izin belgesi ile gönüllü 16 anneden süt örneği alınmıştır. Annelerden örnek alınması amacıyla tek kullanımlık 10 mL hacimli cam steril örnek kapları kullanılmış ve bu kapların içerisine anneden 1-5 mL kadar örnek alınarak steril koşullarda laboratuvara getirilmiştir. Örnek alınmadan önce memenin aerola bölgesi steril su ile temizlenmiştir.

İzole edilen suşların muhafazası için 1,5 mL'lik ağzı kapaklı tüplere yaklaşık 0,4 mL gliserol konularak steril edilmiştir. Bakteriler uygun sıvı besi ortamında iki kez aktifleştirilmiş. Aktifleştirilen kültürlerden 0,6 mL gliserol içeren steril ağzı kapaklı tüplere konularak ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir (Çetin, 1983; Tok, 2007).

3.2. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Farklı annelerden alınan sütlerden LAB'nin izole edilip saf kültürlerinin elde edilmesinde genel olarak *Lactobacillus* türleri için MRS agar ve *Lactococcus* türleri için M17 agar besi ortamlarından yararlanılmıştır (de Man vd., 1960). Temin edilen süt örnekleri agarlı besi yerine inoküle edildikten sonra 2 gün süreyle anaerobik koşullarda *Lactobacillus* türleri için MRS agar da 37 °C'de inkübe edilmiştir (Castele, 2006; Holt vd., 2000; Halkman, 2005). *Sterptococcus* ve *Lactococcus* türleri M17 agarda 30 °C'de 2 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda elde edilen isolatlar saflaştırılıncaya kadar pasajlanmıştır (Holt vd., 2000; Halkman, 2005; Castele, 2006).

Saflaştırılan LAB'nin karakterizasyonuna bazı fenotipik yöntemler kullanılmıştır.

3.3. Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Fenotipik Yöntemlerle Karakterizasyonu

3.3.1. İzolatların Mikroskopik Morfolojileri ve Gram Boyama

Sıvı besiyerindeki kültürden mikropipet ile yaklaşık 30 µL alınarak, lam üzerine konulmuştur. Lam ilk olarak havada kurutulmuş sonra bek alevinden 3 kez geçirilerek fiksasyon yapılmış ve soğutulmuştur. Preparat önce kristal violet ile boyanarak 1 dakika beklenmiş ve fazla boya akıtılmıştır. Sonra iyot-lugol çözeltisi ile boyanarak 1 dakika beklemeye bırakılmıştır. Fazla boya akıtılarak, alkol ile 6 saniye muamele edilmiştir. Distile su ile alkol yıkanarak uzaklaştırılmış ve son olarak preparat safranin ile boyanarak 30 sn bekletilmiştir. Fazla boya distile su ile yıkanarak havada kendi halinde kurumaya bırakılmıştır. Preparata immersiyon yağı damlatıldıktan sonra mikroskopta 100'lük objektifte incelenmiştir (Tamer vd., 1989; Akçelik vd., 1999).

3.3.2. Katalaz Testi

Genellikle fakültatif anaerobik ve aerobik mikroorganizmaların sahip olduğu katalaz enzimi, ortamdaki hidrojen peroksiti oksijen ve suya ayrıştırır. Sıvı veya katı besiyerinde geliştirilen bakteri kültürüne H₂O₂ ilave edildiğinde, serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenebilmesi, hidrojen peroksitin ayrışmasını, dolayısıyla katalaz enziminin varlığını gösterir (Durlu ve Özkaya, 2012). Saflığı sağlanan ve Gram (+) izolatların aktif kültürleri, steril 10 mL optimum gelişim gösterdikleri (MRS veya M17) broth içeren tüplere inoküle edilerek, anaerobik koşullarda 24 saat süre ile aktive edilmiştir. Bu aktif kültürler üzerine % 3 hidrojen peroksit damlatılarak gaz kabarcıklarının çıkıp çıkmadığı gözlenmiştir. Gaz kabarcığı görülen kültürler için test pozitif, gaz kabarcığı görülmeyen kültürler için ise test negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer vd., 1989).

3.3.3. Hareketlilik Testi

Sıvı besiyerinde gelişen bakteriler tüplerde dik olarak hazırlanmış yumuşak agarlı (% 0,8 agar) besiyerine iğne uçlu öze ile batırma kültür şeklinde inoküle edilmiştir. 24 saat uygun sıcaklık koşullarında inkübasyondan sonra inokülasyon hattında inokülasyon boyunca üremenin gözlemlendiği bakteriler hareketsiz, bulanıklık olanlar ve yanlara doğru gelişenler ise hareketli olarak değerlendirilmiştir (Collins vd., 1995; Temiz, 1996).

3.3.4. Glukozdan Gaz Oluşturma

LAB'nin heterofermentatif veya homofermentatif olup olmadıklarını belirlemek amacıyla glukozdan gaz üretim özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla stok kültürdeki bakteri örneklerinden öze yardımıyla alınan örnekler 10 mL'lik besiyerlerine inokülüm yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 5000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek, süpernatant döküldükten sonra tüpte kalan bakteri kültürlerinden 1 mL alınıp içerisinde durham tüpü bulunan glukoz fosfat broth içeren tüplere ilave edilmiştir. Gelişme sıcaklıklarında 24 saat inkübe edilerek durham tüpü içerisindeki gaz oluşumu değerlendirilmiştir (Facklam vd., 2002).

3.3.5. Hidrojen Sülfür Testi

Bu test, mikroorganizmaların sülfür içeren bazı aminoasitleri (sistin, sistein, metionin, glutation) veya bileşikleri (sülfatları) ayrıştırarak hidrojen sülfür (H₂S) oluşturmalarını belirlemek için yapılmaktadır. İzolatların H₂S üretimleri TSI (Triple Sugar Iron Agar) katı besiyerinde gerçekleştirilmiştir (Fowler vd., 1975). İzolatlar uygun sıvı besiyerinde 37 °C'de 24 saatte aktifleştirildikten sonra. Aktif kültürlerden paralel olarak yatık TSI agar besiyerine yüzeysel ekimleri yapılarak, 37 °C'de CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda bakterinin oluşturduğu H₂S, besiyerinin bileşimindeki demir ile reaksiyona girerek siyah renkli demir sülfür oluşmaktadır. Buna göre besiyeri renginin siyaha dönüşmesi H₂S oluştuğunu göstermektedir. H₂S testinde pozitif kontrol olarak *Salmonella spp.* ve negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 35218 bakterileri kullanılmıştır (Anonim, 2005; Beyatlı vd., 2010).

3.4. İzolatların Tanımlanması

3.4.1. API 20 Strep Testi

İzolatlardan *Sterptococcus* ve *Lactococcus* cinsi bakterilerin tanımlanması amacıyla API 20 Strep kiti kullanılmıştır.

API 20 Strep, geniş bir kapasiteye sahip 20 kimyasal testi kombine eden standartlaştırılmış bir metoddur. Birçok Streptokok ve Enterokokun grup veya tür düzeyinde tanımlanmasını sağlar. API 20 Strep stribi, şekerlerin enzimatik aktivitesi ya da fermentasyonunun belirlenmesi için dehidrate substratlar içeren 20 mikrotüpten oluşmaktadır.

Enzimatik testler, enzimatik substratları yeniden hidrate etmek için kullanılan saf bir kültürden yapılmış yoğun bir organizma süspansiyonu ile inoküle edilir. İnkübasyon periyodu sırasında ortaya çıkan metabolik son ürünler spontan olarak ya da reaktiflerin eklenmesiyle ortaya çıkan renk değişiklikleri meydana gelir. Fermentasyon testleri, şeker substratları meydana getiren zenginleştirilmiş bir madde ile inoküle edilir. Karbonhidratların fermentasyonu pH indikatöründe bir kayma ile saptanır. Reaksiyonlar, okuma tablosuna göre okunur ve tanımlama, bilgisayar tanımlama programı kullanılarak elde edilir.

3.4.2. API 20 Strep ile Tanımlamanın Yapılması

Ampuller dikkatlice açılmıştır. 2-8 °C’ de muhafaza edilen besiyerleri ve kuyucuklar, kullanmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir (20±5 °C). Ampul, ampul koruyucusuna yerleştirilmiştir. Dik pozisyonunda tek elle koruyucu ampülü tutulmuştur (beyaz plastik kapak en üstte). Kapak, başparmak kapağın düzleştirilmiş kısmına dayanarak mümkün olduğu kadar aşağıya doğru bastırılmıştır. Ardından kapak başparmağın dışı doğru hareketiyle itirilerek, ampulün tepesinin kırılıp ayrılması sağlanmıştır. Ampul koruyucusundan çıkarılmış ve koruyucu bir sonraki kullanım için saklanmıştır. Kapak dikkatlice uzaklaştırılmıştır.

Bir eküvyon kullanarak, petride gelişmiş olan tüm bakteriler toplanıp API Suspension Medium (2 mL) ampulüne aktarılmıştır. Bu şekilde 4 Mc Farland’dan daha bulanık yoğun bir stok süspansiyon hazırlanması sağlanmıştır. Stok süspansiyon hazırlandıktan hemen sonra kullanılmıştır. Hazırlanan stok süspansiyondan strinin ilk yarısına (VP’ den ADH’ ye kadar olan kuyucuklara) hava kabarcığı olmayacak şekilde dağıtılmıştır. VP’ den LAP’ a kadar testler için her kuyucuğa yaklaşık 100 µL, ADH test kuyucuğuna ise boynuna kadar stok süspansiyondan konulmuştur. API GP Medium ampülü başlangıçta açıklandığı şekilde açılıp stok süspansiyonun geri kalanı bu ampule aktarılmış (yaklaşık 0,5 mL) ve iyice karıştırılmıştır. Strinin ikinci yarısına (RIB’ den GLYG’ ye kadar olan kuyucuklara) bu yeni süspansiyondan dağıtılmıştır. Süspansiyon, bu kuyucuklara da hava kabarcığı kalmayacak şekilde boynuna kadar doldurulmuştur. Altı çizili olarak belirtilen kuyucuklara (ADH’ den GLYG’ ye kadar olan kuyucuklar) hafif konveks bir yapı oluşturacak şekilde mineral yağ doldurulmuştur. Kuyucukların bulunduğu tepsinin üstü kapak ile kapatılmıştır. Bu

şekilde hazırlanan stripler 37 °C ± 2°C’ de inkübasyona tabi tutulmuşlardır. İlk okuma 4 - 4,5 saat sonunda, ikinci okuma da 24 saat (± 2 saat) sonunda yapılmış ve değerlendirmeler takip tablosuna işaretlenmiştir. 4 saat inkübasyondan sonraki kontrolden önce ilgili reaktifler ait oldukları kuyucuklara damlatılmıştır. Buna göre; VP test kuyucuğuna sırasıyla birer damla VP 1 ve VP 2 reaktifleri, HIP test kuyucuğuna 2 damla NIN reaktifi, PYRA, _GAL, _GUR, _GAL, PAL ve LAP test kuyucuklarına sırasıyla birer damla ZYM A ve ZYM B reaktifleri damlatılmıştır. 10 dakika beklenip süre sonunda gerçekleşen reaksiyonlar okuma tablosuna göre değerlendirilmiştir.

Okumada pozitif (+) olarak değerlendirmesi gereken reaksiyonlar Şekil 3,1’de verilmiştir.



Şekil 3.1: API 20 Strep inkübasyon sonu pozitif (+) reaksiyonlar

Okumada negatif (-) olarak değerlendirmesi gereken reaksiyonlar Şekil 3,2’de verilmiştir.



Şekil 3.2: API 20 Strep inkübasyon sonu negatif (-) reaksiyonlar

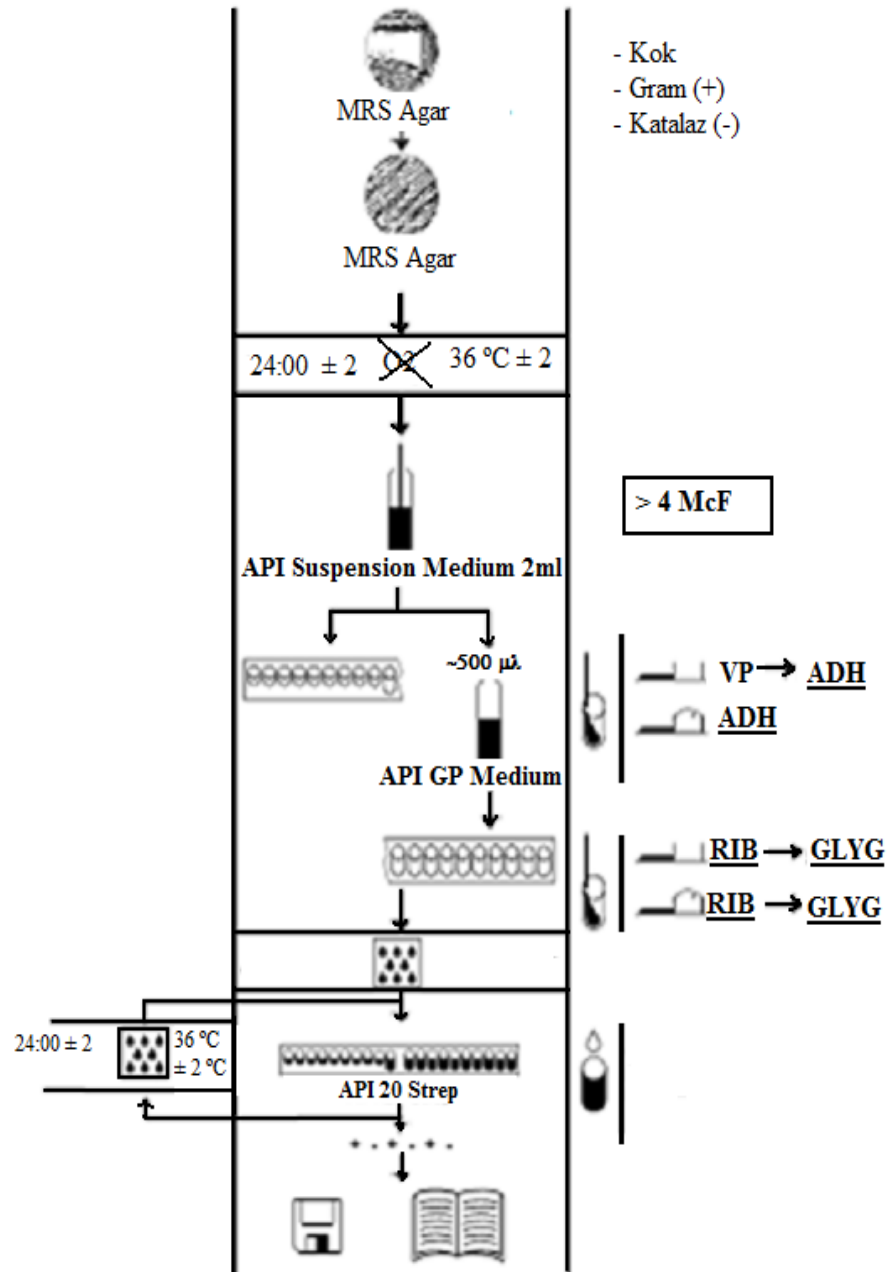
Bu okuma işleminden sonra striplerin inkübasyonuna devam edilmiş ve 24 saat (±2 saat) sonunda ESC kuyucuğunda değişiklik olup olmadığı kontrol edilip, ADH ile RIB’den GLYG’ye kadar olan kuyucuklarda da ikinci kez okuma gerçekleştirilmiştir. Okumada pozitif (+) ve negatif (-) değerlendirmeler yukarıda belirtildiği gibi yapılmış ve takip tablosuna işlenmiştir.

Takip tablosunda soldan sağa doğru tüm kuyucuklar üçlü gruplar halinde sınıflandırılmış ve her bir üçlü gruptaki kuyucuklar sırasıyla 1, 2 ve 4 şeklinde rakamlar ile tanımlanmıştır. Her bir üçlü grup için, pozitif (+) olarak işaretlenen kuyucuk puanları toplanarak sayısal profil belirlenmiştir. Sayısal profil değeri, üçlü

grupların alt kısmında bulunan yuvarlak içine not edilmiştir. Bu şekilde yedi rakamlı sayısal profil elde edilmiştir. Okunan reaksiyonlara ilişkin işaretlemeler ve 7 rakamlı sayısal profil, API 20 Strep Analitik Profil indeksi (Ref. 20 690) ve bilgisayar tanımlama programı yardımıyla üzerinde çalışılan bakterinin identifikasyonunda kullanılmıştır.

API 20 Strep ile identifikasyon aşamalarını gösteren uygulama akış seması Şekil 3.3'te verilmiştir.

UYGULAMA AKIM ŞEMASI



Şekil 3.3: İdentifikasyonu gösteren uygulama akış şeması

3.5. İzolatların Bazı Starter Özelliklerinin Belirlenmesi

3.5.1. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme Testi

Saflığı sağlanan izolatların aktif kültürleri steril 10 mL optimum gelişme gösterdikleri (M17) broth içeren tüplere inoküle edilerek 15 °C ve 45 °C'deki sıcaklıklarda anaerobik koşullarda 7 gün boyunca 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Lewus vd., 1991; Facklam vd., 2002).

3.5.2. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Testi

M17 broth sıvı besiyerine % 2, % 4, % 5 ve % 6,5 oranlarında NaCl ayrı ayrı olmak üzere ilave edilerek, steril edildikten sonra 24 saatlik aktif kültürler optimum gelişim gösterdikleri besi yerlerine inoküle edilmiştir. Ardından anaerobik koşullarda uygun sıcaklık koşullarında (30 °C veya 37 °C'de) 2 gün süreyle inkübasyona bırakılmış gelişimleri takip edilmiştir (Holt vd., 2000; Arıcı vd., 2011).

3.5.3. İzolatların Asit Üretme Yeteneklerinin Belirlenmesi

M17 broth besiyeri cam tüplere 3 tekrarlı olacak şekilde 20'şer mL dağıtılmış ve steril hale getirilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra M4-11, M14-365 ve M4-157 numaralı suşlar besiyerine inoküle edilmiş. Ardından 30 °C ve 37 °C'de anaerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. pH ölçümü için inkübasyona bırakılan besiyerlerinden steril koşullarda cam tüplere alınarak pH metre ile ölçüm yapılmış. 3, 6, 12, 24, 36 ve 48. saatlerde pH ölçümü yapılmıştır (Sağdıç vd., 2002).

3.5.4. Suşların Ekzopolisakkarit (EPS) Üretiminin Belirlenmesi

EPS'ler bakterinin olumsuz çevre şartlarına karşı korunmasını sağlamaktadır. EPS'nin bakteriyi koruma özelliği ayrıca antibiyotiklere karşıda fiziksel bir koruyuculuk şeklinde de ortaya çıkmaktadır. Yüksek EPS üretimine sahip olan bakterilerin probiyotik olarak uygun olacağı vurgulanmaktadır. Bu amaçla Smitinont vd. (1999) tarafından kullanılan EPS ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. EPS üretiminin belirlenmesi için LAB izolatları M17 broth besiyerinde geliştirilerek yine M17 broth besiyerine % 2 oranında inoküle edilmiş ve 30 °C' de 2 gün boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyondan sonra EPS' in ekstraksiyonu için örneklerden yaklaşık 10' ar mL santrifüj tüplerine alınarak 20 °C' de 5000 rpm' de 20 dakika boyunca

santrifüjlenmiştir. Süre sonunda hücreler tortu şeklinde ayrılmıştır. Üstte kalan sıvı kısım ise; EPS' in çöktürülmesi amacıyla % 95' lik etanol ile bire beş (1/ 5) oranında karıştırılmıştır. Etil alkol ile hazırlanmış olan karışım aynı santrifüj ile bu kez 4 °C ve 5000 rpm' de 20 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Bu işlem sonunda EPS dipte tortu olarak ayrılmıştır. Santrifüjleme işlemi sonrasında tüpler tartılarak 60 °C' de kurutulmuş ve işlem sonunda tartılmıştır. Tüplerin daraları da belirlenmiş olup EPS miktarı son kütlenin başlangıçtaki hacme oranından belirlenmiş ve g/L olarak ifade edilmiştir.

3.5.5. İzolatların Nisin Dirençliliği

İzolatların nisine karşı gösterdikleri duyarlılık veya dirençlilikleri agar difüzyon tekniği kullanılarak Tsai ve Sandine (1987)'ye göre belirlenmiştir. Suşlar, 37 °C' de iki kez ard arda sıvı besi ortamında aktive edilerek, aktif kültürlerin optikal yoğunlukları spektrofotometre 600 nm de $0,6 \pm 0,02$ 'ye ayarlanıp, OD değerleri ayarlanan kültürlerden 100 µL alınıp, katı besi ortamına ilave edilmiştir. İlave edilen kültürlerin besi ortamının yüzeyinde dağılımı homojen bir şekilde sağlanmıştır. Besi ortamında 0,3 cm çapındaki steril çubukla kuyular açılarak ve dipleri steril aynı besi ortamı ile kaplanmıştır. 0,02 N HCl' de 10 mg/mL olacak şekilde stok nisin çözeltisi hazırlanmıştır. Suşların nisine karşı gösterdikleri duyarlılık veya dirençliliklerini belirlemek amacıyla, 50-100-150-200-250-300 µg/mL' lik farklı konsantrasyonlarda nisin stokları hazırlanmıştır. Besi ortamında açılan kuyulara 30 µL stoklardan ilave edilmiş. Petriler, 30 °C ve 37 °C' de anaerobik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde farklı konsantrasyonlarda nisin içeren kuyuların etrafındaki inhibisyon zon çapları ölçülüp, suşların nisine karşı göstermiş oldukları duyarlılık veya dirençlilikleri tespit edilmiştir.

3.6. İzolatların Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.6.1. Düşük pH' da Gelişme Testi

Sıvı besi yerlerinin pH' ları 3,9' a ayarlanarak ve sterilize edildikten sonra 24 saatlik aktif kültürler optimum gelişim gösterdikleri besi yerlerine inoküle edilmiştir. Ardından anaerobik koşullarda, uygun sıcaklık koşullarında (30 °C veya 37 °C' de) 7

gün süreyle inkübasyona bırakılmış ve gelişimleri takip edilmiştir (Çetin, 2002; İşleroğlu vd., 2008b; Yiğit, 2009).

3.6.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Çalışmada starter ve probiyotik bakteri kültürlerinin gelişimini olumsuz etkilediği düşünülen ve klinikte kullanımı yaygın olan antibiyotikler kullanılmıştır. İzole edilen suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Warmńska-Radyko, 2002). Çalışmada, ampicillin (10 µg); gentamisin (10 µg), eritromisin (15µg), kanamisin (30 µg) ve penisilin G (10µg) antibiyotikleri kullanılmıştır. Anne sütünden izole edilen M4-11, M4-157 ve M14-365 numaralı suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır.

M17 agar besiyeri hazırlanarak otoklav ile sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Sterilizasyondan sonra besiyeri 45–50 °C’ye soğutularak, 9 cm çapındaki steril plastik (tek kullanımlık) petri kutularına 15-20 mL olacak şekilde steril koşullarda dökülmüştür.

M4-11, M4-157 ve M14-365 numaralı suşlar hazırlanan iki kez art arda aktifleştirildikten sonra fizyolojik tuzlu su ile Mc Farland No: 0,5 (10^8 kob/ml) bulanıklığına ayarlanmıştır. Hazırlanmış olan dilüsyonların her birinden 100 µL alınarak daha önceden hazırlanmış ve petrilere aktarılmış olan M17 agar besiyerine, steril koşullar altında ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler, steril koşullarda, kapakları açık biçimde 5-10 dk. süreyle bekletilerek yüzeylerinin kuruması sağlanmıştır. Ardından ticari olarak satılan ve belirlenmiş olan antibiyotik diskleri (ampicillin, gentamisin, eritromisin, kanamisin ve penisilin-G) petrilere steril koşullarda, her bakteri için üçer tekrar olacak şekilde aralarında en az 1,5 cm boşluk bırakılarak yerleştirilmiştir. Disklerin yerleştirilmesi işleminden sonra petriler 10–15 dk. süreyle bekletilmiş ve sonrasında petri kutuları 30 °C ve 37 °C de anaerobik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda petrilerdeki zon çapları ölçülerek sonuçlar kaydedilmiştir (Rollins ve Joseph, 2000; Halami vd., 2000).

3.6.3. Elde Edilen İzolatların Patojen Mikroorganizmalara Antimikrobiyal Etkisi

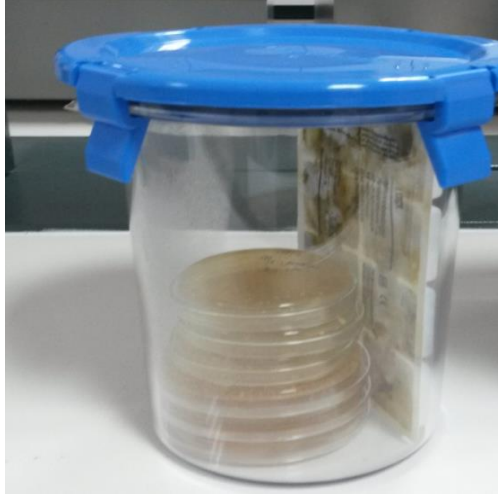
İzolatların insanlarda ve balıklarda gıda veya su kaynaklı patojen olan bazı mikroorganizmalar üzerindeki inhibitör etkisini araştırmak amacıyla M4-11, M4-157 ve M14-365 numaralı suşlar M17 Broth sıvı besiyerinde anaerobik koşullarda 30 °C ve 37 °C’de 24 saat inkübe edilerek aktiveleştirilmiştir. Aktif kültürler 5000 rpm’de 15 dk. santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda oluşan berrak kısım (süpernatant) steril şartlar altında 0,22 µm’lik tek kullanımlık steril filtre ile sterilize edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite için seçilen test mikroorganizmaları (*Staphylococcus aureus* ATCC 29212, *Salmonella enteritidis* RSKK 171, *Candida glabrata* RSKK 04019, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella sonnei* Mu:57, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Aeromonas hydrophila* ATCC 19570, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum* M1, *Vibrio alginolyticus*) sıvı besi ortamında aktiveleştirilerek, uygun sıcaklıklarda geliştirilmiş 24 saatlik aktif kültürler % 0,875’lik serum fizyolojik çözeltisi ile 2 kez yıkanmıştır. 0,5 Mc Farland yoğunluğuna ayarlanan bakteri süspansiyonundan steril petrilerdeki M17 agar besiyerine 100 µL aktarılmıştır. Donan katı besiyeri üzerinde 7 mm çapındaki steril çubukla kuyular açılmıştır. Kuyuların tabanları steril agarla tekrar sıvanmış ve bu kuyulara izolatlarının mikrofiltreye tabi tutulmuş süpernatantından 100 µL ilave edilerek 30 °C ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyu çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile ölçülmüş ve sonuçlar kaydedilmiştir (Reinheimer vd., 1990; Beyatlı vd., 2010; Toksoy, 1996).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Farklı 16 anneden temin edilen süt örnekleri agarlı besiyerine inoküle edildikten sonra 2 gün süreyle anaerobik koşullarda Laktobasiller (MRS agar) 37 °C’de, Streptokoklar (M17 agar) 37 °C’de, Laktokoklar ise (M17 agar) 30 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası petrilere tek düşen, morfolojik olarak birbirinden farklı olan ve laktik asit bakterisi olduğu sanılan koloniler seçilerek fenotipik yöntemlerle karakterizasyonları yapılmıştır.

Fenotipik karakterizasyon sonrasında elde edilen veriler sonucunda 100 adet koloni belirlenmiştir. Seçilen kolonilerin fenotipik test sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Anne sütleri ile inoküle edilmiş besiyerlerinin anaerobik jarlarda inkübasyonu Şekil 4.1. de verilmiştir.

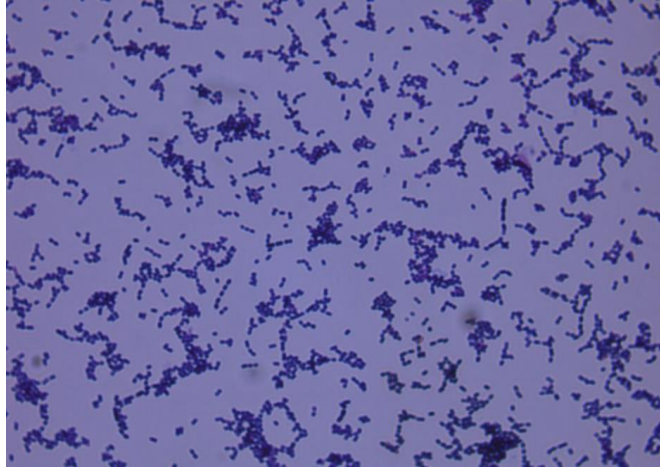


Şekil 4.1: Süt ile inoküle edilmiş besiyerlerinin anaerobik jarlarda inkübasyonu

4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik Yöntemlerle Karakterizasyonu

4.2.1. İzolatların Mikroskopik Morfolojileri ve Gram Boyama

İzolatların mikroskopik morfolojileri ve gram reaksiyonları gram boyama ile incelenmiştir. Pembe renkli olan bakteriler gram (-), mor renkli olan bakteriler ise Gram (+) olarak değerlendirilmiştir (Tamer vd., 1989; Akçelik vd., 1999). Çalışmaya Gram (+) bakterilerle devam edilmiştir. Gram boyama sonucu Gram (+) kolonilerin şekli aşağıda verilmiştir (Şekil 4.2:, Çizelge 4.1:).



Şekil 4.2: Gram boyama sonucu mor renkli gram pozitif koloniler

4.2.2. Katalaz Testi

Saflığı sağlanan izolatlara bölüm 3.3.2’de anlatılan katalaz testi uygulanmıştır. Gaz kabarcığı görülen suşlar için test pozitif, gaz kabarcığı görülmeyen suşlar için ise test negatif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmaya katalaz (-) suşlarla devam edilmiştir.

Katalaz testi sonucu, katalaz (+) ve katalaz (-) suş örnekleri Şekil 4.3. te verilmiştir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.3: Katalaz (+) ve katalaz (-) suşlar

4.2.3. Hareketlilik Testi

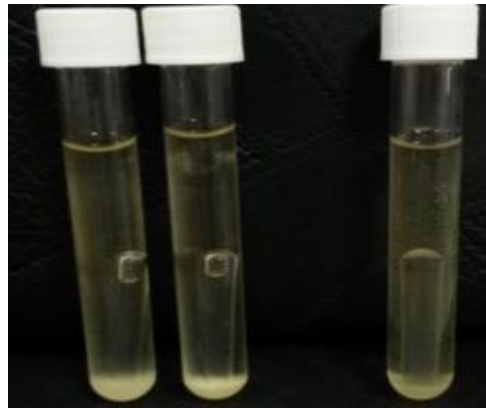
Sıvı besiyerinde gelişen bakteriler için bölüm 3.3.3’de anlatılan hareketlilik testi uygulanmıştır. LAB hareketsiz oldukları için inokülasyon hattı boyunca gelişen bakterilerle çalışmaya devam edilmiştir. Hareketlilik testi sonuç örneği Şekil 4.4’de verilmiştir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.4: Hareketlilik testi

4.2.4. Glukozdan Gaz Oluşturma

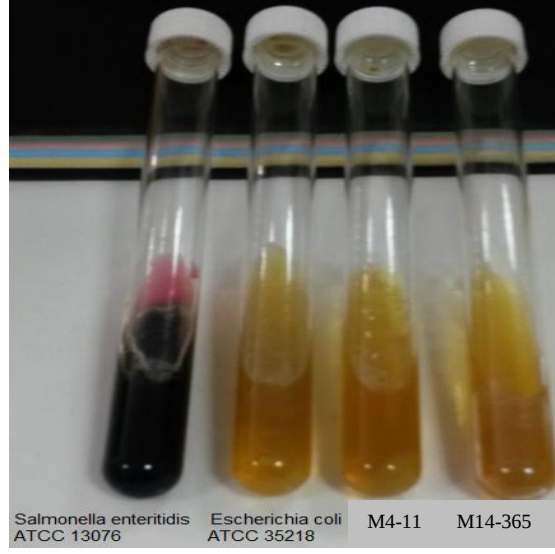
Stok kültürdeki bakteri örneklerine bölüm 3.3.4’de anlatılan glukozdan gaz oluşturma yöntemi uygulanmıştır. İnkübasyon sonrası gaz oluşturan bakteriler heterofermentatif, oluşturmayanlar ise homofermentatif olarak sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.1). Glukozdan gaz oluşturan ve oluşturmayan suşlar Şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5: Glukozdan gaz oluşturan ve oluşturmayan suşlar

4.2.5.Hidrojen Sülfür Testi

İzolatlara bölüm 3.3.5’te anlatılan hidrojen sülfür testi uygulanmıştır. Test sonuçlarına göre besiyeri renginin siyaha dönüşmesi H₂S oluştuğunu göstermektedir. Hidrojen sülfür testi Şekil 4.6.’da verilmiştir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.6: Hidrojen Sülfür Testi

Çizelge 4.1: Seçilen kolonilerin fenotipik test sonuçları

Koloni sayısı	Koloni adı	Kültür koşulları	Morfoloji	Gram boyama	Katalaz	Hareketlilik	Glukozdan gaz oluşturma	Hidrojen sülfür üretimi
1	M2- 3	MRS-37 ⁰ C anaerobik	basil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	M2-4	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	M2-5	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	M2-6	MRS-37 ⁰ C anaerobik	basil	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
5	M2-8	MRS-37 ⁰ C anaerobik	basil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	M2-9	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
7	M2-12	MRS-37 ⁰ C anaerobik	basil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
8	M1-14	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	M2-23	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kokobasil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
10	M2-24	MRS-37 ⁰ C anaerobik	basil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
11	M2-20	M-17-37 ⁰ C aerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
12	M2-29	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
13	M2-30	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
14	M2-40	MRS-37 ⁰ C anaerobik	basil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

15	M2-41	MRS-37 ⁰ C anaerobik	basil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
16	M2-42	MRS-37 ⁰ C anaerobik	basil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
17	M2-43	MRS-37 ⁰ C anaerobik	basil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
18	M2-44	MRS-37 ⁰ C anaerobik	basil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
19	M3-46	MRS-37 ⁰ C anaerobik	basil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
20	M3-47	MRS-37 ⁰ C anaerobik	basil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
21	M3-48	MRS-37 ⁰ C anaerobik	basil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
22	M3-49	MRS-37 ⁰ C anaerobik	basil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
23	M3-50	MRS-37 ⁰ C anaerobik	basil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
24	M1-61	MRS -37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
25	M1-81	M-17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
26	M1-82	M-17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
27	M2-91	M-17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
28	M2-94	M-17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
29	M3-102	M-17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
30	M3-103	M-17-30 ⁰ C anaerobik	kokobasil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
31	M3104	M-17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
32	M3-105	M-17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
33	M2-64	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

34	M2-114	MRS-37 ⁰ C aerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
35	M4-118	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kokobasil	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
36	M4-120	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kokobasil	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
37	M4-121	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kokobasil	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
38	M4-123	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
39	M4-124	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
40	M4-125	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
41	M4-128	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
42	M4-132	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
43	M4-134	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
44	M4-145	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
45	M4-147	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
46	M4-153	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
47	M4-155	M17-30 ⁰ C anaerobik	kokobasil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
48	M4-157	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
49	M4-159	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
50	M4-162	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
51	M4-11	M17-42 ⁰ C aerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
52	M4-33	M17-42 ⁰ C aerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

53	M5-190	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
54	M5-193	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
55	M3-79	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
56	M5-184	MRS-37 ⁰ C anaerobik	bacil	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
57	M4-46	M17-42 ⁰ C aerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
58	M2-17	M17-37 ⁰ C aerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
59	M1-176	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
60	M6-198	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
61	M6-199	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
62	M6-200	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
63	M6-201	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
64	M6-205	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
65	M10-206	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kokobacil	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
66	M10-207	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kokobacil	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
67	M10-208	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kokobacil	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
66	M11-210	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
67	M11-211	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
68	M11-212	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
69	M11-213	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

70	M10-220	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
71	M10-222	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
72	M10-223	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
73	M8-232	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
74	M8-235	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
75	M9-247	MRS-37 ⁰ C anaerobik	bacil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
76	M9-248	MRS-37 ⁰ C anaerobik	bacil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
77	M7-237	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
78	M8-246	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
79	M9-249	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
80	M9-251	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
81	M10-253	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kokobacil	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
82	M10-254	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kokobacil	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
83	M-10-255	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kokobacil	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
84	M-10-258	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kokobacil	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
85	M-8-233	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
86	M-8-243	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
87	M-11-259	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
88	M-11-261	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

89	M-11-262	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
90	M-11-264	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
91	M-7-269	M-17-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
92	M-7-265	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
93	M-7-266	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
94	M-7-268	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
95	M-9-273	MRS-37 ⁰ C anaerobik	bacil	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
96	M12-290	MRS-37 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
97	M13-363	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
98	M14-365	M17-30 ⁰ C anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
99	M15-327	MRS-37 ⁰ C - anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
100	M16-330	MRS-37 ⁰ C - anaerobik	kok	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

Yiğit, (2009) yaptığı peynir, kefir, çiğ süt, pastörize süt ve anne sütünden izole ettiği 209 izolatin gram boyama ve katalaz aktivitesi sonucunda hepsinin gram (+) katalaz (-) olduğu tespit etmiş; peynir örneklerine ait 100 izolattan 3'ünün (% 3) basil, 2'sinin (% 2) kokobasil, 95'inin (% 95) kok, kefirde 24 izolatin tamamının (% 100) kok, çiğ sütte 37 izolattan 2'sinin (% 5) basil, 35'inin (% 95) kok, pastörize süt ve anne sütüne ait izolatların tamamının (% 100) kok olduğunu belirlemiştir.

4.3. İzolatların Tanımlanması

4.3.1. API 20 Strep Testi

API 20 Strep testlerinde ise üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerekli reaktifler damlatıldıktan sonra gelişen renk değişimine göre değerlendirilmiştir. Tanımlanmaya çalışılan izolatlar kuyucuklarda bulunan karbon kaynağını kullandığı zaman mevcut indikatör nedeniyle renk değişimi meydana gelmektedir. Pozitif ve negatif olarak değerlendirilen sonuçlar yönetici firma tarafından optimize edilmiş olan veri tabanına girilerek tür tayinleri gerçekleştirilmiştir. Yüksek tanımlama oranlarına ve kok morfolojisine sahip 3 suş seçilerek bunların bazı starter ve probiyotik olma özelliklerine bakılmıştır.

İzolatların API 20 Strep ile tanımlanmasına ait resimler Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9.'da verilmiştir.

Gerçekleştirilen tür tayinine göre M4-11, M4-157 ve M14-365 numaralı suşlardan M4-11 numaralı suşu ve M14-365 numaralı suşun *Streptococcus salivarius*, M4-157 nolu suşun ise *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* olduğu tespit edilmiş ve identifikasyon sonuçları Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2: M4-11, M14-365 ve M4-157 numaralı suşların API 20 Strep sistemi ile identifikasyonu

Suş No	Cins Adı	Tür Adı	apiweb™ %
M4-11	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>S. salivarius</i>	% 96,1
M14-365	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>S.salivarius</i>	% 81,6
M4-157	<i>Lactococcus spp.</i>	<i>L.lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	% 92,7



Şekil 4.7: 24 saatlik süre sonucunda M14-365 suşunun API 20 Strep ile tanımlanması



Şekil 4.8: 24 saatlik süre sonucunda M4-11 suşunun API 20 Strep ile tanımlanması



Şekil 4.9: 24 saatlik süre sonucunda M4-157 suşunun API 20 Strep ile tanımlanması

Bölükbaşı, (2007) 45 yoğurt örneğinden 24 tane izolat hazırlamıştır. Bu bakteri izolatlarının tanımlamasını API 50 CHL ve API 20 Strep test kitleri ile yapmıştır. API 20 Strep test kiti ile yapılan çalışma sonucunda ise *L. lactis* ssp. *lactis*, *E. durans* ve *E. faecium* bakterilerini tanımlanmıştır.

Şanlıbaba ve Akçelik, (2000) çiğ süt ve peynir altı suyundan izole ettikleri 73 adet bakterinin tanımlanmasını geleneksel yöntemlerle gerçekleştirmiş, çalışma sonucunda laktokok izolatlarının 50 adedinin *L. lactis* subsp. *lactis*, 7 adedinin *L. lactis* subsp. *diacetylactis* ve 16 adedinin de *L. lactis* subsp. *cremoris* suşu olduğunu saptanmıştır. Sağdıç vd., (2002) 20 farklı tereyağı örneğinden 55 adet LAB izole etmişler ve yaptıkları geleneksel tanılama çalışması sonucunda bu türleri *S. salivarius* ssp. *thermophilus* (%21.2), *S. ssp.* (%4.7), *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (%20), *Lb. casei* ssp. *casei* (%15.3), *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* (%2.3), *E. faecium* (%18.8), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*)

(%7.1), *Leuconostoc gelidum* (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*) (%4.7) ve *Weissella paramesenteroides* (*Leuconostoc paramesenteroides*) (%5.9) olarak tanımlamışlardır.

4.4. İzolatların Bazı Starter Özelliklerinin Belirlenmesi

4.4.1. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme Testi

Saflığı sağlanan izolatların aktif kültürleri steril 10 mL optimum gelişme gösterdikleri M17 broth içeren tüplere inoküle edilerek 15 °C ve 45 °C'deki sıcaklıklarda anaerobik koşullarda 7 gün boyunca 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyona bırakılan M4-11, M4-157, M14-365 suşlarının gelişim durumları Çizelge 4.3'deki gibidir.

Çizelge 4.3: İzolatların farklı sıcaklıklarda gelişme durumu

SUŞ NO	15°C	45°C
M4-11	-	+
M4-157	*	-
M14-365	-	+

-: Gelişme yok, +: Gelişme var, *: Çok zayıf gelişim

M4-11 ve M14-365 numaralı suşlar 15 °C sıcaklıkta gelişim göstermemişken, 45 °C’de gelişim göstermişlerdir. M4-157 numaralı suş ise 15 °C’de zayıf gelişim göstermiş, 45 °C’de ise gelişim göstermemiştir.

Yiğit, (2009) peynir örneklerinden izole ettiği 100 izolattan 47’sinin (% 47) 4 °C, 15 °C ve 45 °C’de; 20’sinin (% 20) sadece 15 °C ve 45 °C’de; 7’sinin (% 7) sadece 45 °C’de geliştiğini belirlemiştir. İzolatların geri kalan 26’sı (% 26) ise 4 °C, 15 °C ve 45 °C’lerden bir veya birkaçında zayıf gelişim göstermiştir. 24 kefir izolatının 11’i (% 46) 4 °C, 15 °C ve 45 °C’de; 5’i (% 21) sadece 15 °C ve 45 °C’de; 4’ü (% 17) sadece 45 °C’de gelişmiştir. Geri kalan 4’ü (% 17) ise 4 °C, 15 °C ve 45 °C sıcaklıktaki ortamlardan bir veya birkaçında zayıf gelişim göstermiştir. Çiğ sütte 37 izolatın 19’u (% 51) 4 °C, 15 °C ve 45 °C’de; 2’si (% 5) sadece 15 °C ve 45 °C’de; 2’si (% 5) sadece 45 °C’de gelişmiştir. Geri kalan 14’ü (% 38) 4 °C, 15 °C ve 45 °C’lerden bir veya birkaçında zayıf gelişim göstermiştir. Pastörize sütte 28 izolattan 13’ü (% 46) 4 °C, 15 °C ve 45 °C’de; 1’i (% 3) sadece 15 °C ve 45 °C’de; 1’i (% 3) sadece 45 °C’de

gelişmiştir. Geriye kalan 13'ü (% 46) 4 °C, 15 °C ve 45 °C'lerden bir veya birkaçında zayıf gelişim göstermiştir. Anne sütünde 20 izolatın tamamı (% 100) 4 °C, 15 °C ve 45 °C'de gelişim göstermiştir.

4.4.2. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme Testi

% 2, % 4, % 5 ve % 6,5 oranlarında NaCl içeren M17 Broth sıvı besiyerinde inoküle edilen ve anaerobik koşullarda 30 °C ve 37 °C'de de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılan M4-157, M14-365 ve M4-11 numaralı suşların gelişim durumları Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

Çizelge 4.4: İzolatların farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme durumu

SUŞ NO	% 2 NaCl	% 4 NaCl	% 5 NaCl	% 6,5 NaCl
M4-157	+	+	+	-
M14-365	-	+	+	-
M4-11	-	+	+	-

+: Gelişim göstermiş, -: Gelişim göstermemiş

M4-157 numaralı suş % 2, % 4 ve % 5 NaCl sıvı besiyerinde gelişim gösterirken, M14-365 ve M4-11 numaralı suşlar % 4 ve % 5 NaCl sıvı besiyerinde gelişim göstermiş fakat % 2 NaCl sıvı besiyerinde gelişim gösterememişlerdir. % 6,5 NaCl sıvı besiyerinde ise test edilen tüm koloniler gelişmemiştir.

Kıran, (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, hazır gıdalardan izole edilen ve çeşitli kültür koleksiyonlarından temin edilen laktik asit bakterileri arasında, % 4 tuzda tüm bakterilerin geliştiği, % 6,5 tuzda 5 tanesi hariç diğerlerinin geliştiği, % 12 tuzda 4 tanesinin zayıf gelişme gösterdiği diğerlerinin gelişmediği, % 18 tuz konsantrasyonunda ise hiçbirinin gelişmediği belirtilmiştir.

Arslankoz, (2011) tarafından yapılan çalışmada LAB'ın % 3, % 6,5, % 10 ve % 12 tuz konsantrasyonlarında gelişme yetenekleri incelenmiştir. %3 tuz konsantrasyonunda tüm bakterilerin gelişme gösterdiği, % 6,5 tuz konsantrasyonunda en iyi gelişmeyi *Lb. plantarum* türlerinin gösterdiği, 3 bakterinin gelişmediği; % 10 tuz

konsantrasyonunda *Pediococcus ethanolidurans* ve *Lb. plantarum* türlerinin en iyi gelişim gösterdiği, 12 bakterinin gelişmediğini tespit etmiştir.

4.4.3. İzolatların Asit Üretme Yetenekleri

M17 sıvı besiyerinde inoküle edilen M4-157 (30 °C), M4-11 ve M14-365 numaralı suşlar anaerobik koşullarda (37 °C) de inkübasyona bırakıldıktan sonra 3, 6, 12, 24, 36, 48. saatlerde pH ölçümü yapılmış olup çizelge 4.5'deki sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.5: İzolatların asit üretme yetenekleri

SUŞ	3. SAAT	6. SAAT	12. SAAT	24. SAAT	36. SAAT	48. SAAT
NO	pH*	pH*	pH*	pH*	pH*	pH*
M4-11	6,26±0,11	5,50±0,01	5,41±0,01	5,44±0,01	5,40±0,07	5,40±0,03
M4-157	7,15±0,01	6,18±0,00	6,02±0,00	6,02±0,01	6,02±0,01	6,09±0,02
M14-365	6,86±0,00	5,98±0,00	5,69±0,01	5,55±0,000	5,46±0,01	5,45±0,01

*: Ortalama ± Standart Sapma

M17 sıvı besiyerinin pH'sı 7,2±0,2 olarak ölçülmüştür. M4-11, M4-157, M14-365 numaralı suşların inkübe edildiği besiyerlerindeki 3, 6, 12, 24, 36 ve 48. saatlerdeki pH ölçümleri incelendiğinde üç suшта da pH değerlerinin giderek azaldığı görülmektedir. Dolayısıyla her üç suшта da asit üretimi gözlenmiştir. Ancak 48. saatteki pH değerleri karşılaştırıldığında en düşük pH M4-11, en yüksek pH ise M4-157 numaralı suшта görülmüştür.

Cheriguene vd., (2006) keçi sütünden izole ettikleri, *Lb. paracasei* türleri tarafından 24 saat sonunda 0.39-0.76 g/100 mL, *Lb. rhamnosus* türleri tarafından 24 saat sonunda 0.75-0.80 g/100 mL, *Lb. plantarum* türleri tarafından 24 saat sonunda 0.55-0.68 g/100 mL, *E. faecium* türleri tarafından 24 saat sonunda 0.59-0.60 g/100 mL asit üretildiğini bildirmişlerdir.

4.4.4. Ekzopolisakkarit (EPS) Üretiminin Belirlenmesi

M4-11, M4-157 ve M14-365 numaralı izolatların EPS üretimlerinin belirlenmesi için bölüm 3.5.5.'de anlatılan EPS ekstraksiyon yöntemi uygulanmış ve sonuçlar Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6: İzolatların EPS üretim miktarları

SUŞ NO	EPS Üretim Miktarı (g/L)
M4-11	5,49
M4-157	4,94
M14-365	8,71

M14-365 numaralı suş 8,71 g/L ile EPS üretim miktarı olan en fazla olan suş olarak belirlenmiştir. M4-11 numaralı suşun EPS üretim miktarı 5,49 g/L olarak belirlenmiştir. EPS üretim miktarı en düşük olan suş ise 4,94 g/L ile M4-157 numaralı suştur. İzolatların EPS üretim miktarları Şekil 4.10.'da verilmiştir.



Şekil 4.10: İzolatların EPS üretim miktarları

Yüksekdağ ve Aslım, (2005) yoğurt kaynaklı laktobasil suşlarında EPS miktarını 116-255 mg/L olarak bildirmiştir.

Mehrnia vd., (2014) anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkısından izole ettikleri *Lactobacillus* bakterilerin EPS üretim miktarları 142,99 mg/L (*L. casei* LB17), 425,16 mg/L (*L. casei* LB74) arasında değişiklik göstermiştir (*L. casei* LB61 (383,99 mg/L), *L. casei* LB49 (369,19 mg/L) ve *L. brevis* LB63 (348,3 mg/L) olarak tespit etmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda, insan kaynaklı izolatların EPS üretiminin, süt ve süt ürünleri kaynaklı izolatların ürettiği EPS miktarından fazla olduğu dikkat çekicidir. Bu çalışmada da kullanılan bakterilerin EPS üretim miktarlarının diğer çalışmalardan yüksek olduğu görülmektedir. çalışmalarda elde edilen sonuçlarda EPS üretimlerinin türler ve hatta suşlar arasında farklılık gösterdiği görülmektedir. Araştırmacılar bunun nedeninin izolasyon kaynağı, fermentasyon şartları (sıcaklık, inkübasyon süresi ve pH) ve besiyeri kompozisyonunun (karbon ve nitrojen kaynağı) farklı olmasından dolayı olduğunu ifade etmektedirler.

4.4.5. İzolatların Nisin Dirençliliği

İzolatların nisine karşı gösterdikleri duyarlılık ve dirençliliğini belirlemek amacıyla bölüm 3.5.6.'da anlatılan yöntemle hazırlanan besiyerlerindeki kuyulara 50-100-150-200-250-300-400-450-500 µg/ml' lik farklı konsantrasyonlarda nisin çözeltilerinden her kuyuya 30µl olacak şekilde ilave edildikten sonra uygun sıcaklık koşullarında ve anaerobik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılmış ve kuyuların etrafındaki ölçülen zon çapları çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7: İzolatların nisin dirençliliği

	50 µg/ml Zon Çapı (mm)	100 µg/ml Zon Çapı (mm)	150 µg/ml Zon Çapı (mm)	200 µg/ml Zon Çapı (mm)	250 µg/ml Zon Çapı (mm)	300 µg/ml Zon Çapı (mm)	350 µg/ml Zon Çapı (mm)	400 µg/ml Zon Çapı (mm)	450 µg/ml Zon Çapı (mm)	500 µg/ml Zon Çapı (mm)
M14-365	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-157	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Sonuç olarak nisin tüm konsantrasyonlarına (50-500µg/ml) karşı M14-365, M4-157 ve M4-11 suşlarının dirençli olduğu görülmüştür.

4.5. İzolatların Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

4.5.1. Düşük pH'da Gelişme Testi

pH'sı 3,9'ya ayarlanmış besiyerinde inoküle edilen M4-157 (30 °C), M14-365 (37 °C) ve M4-11 (37 °C) numaralı suşlar anaerobik koşullarda inkübasyona bırakıldıktan sonra 24. saatlerdeki sonuçlar Çizelge 4.8'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.8: İzolatların pH=3,9 'da gelişimleri

SUŞ NO	pH=3,9
M4-157	*
M14-365	-
M4-11	-

-: Gelişim yok, *: Zayıf gelişim

Buna göre M4-157 numaralı suş pH 3,9 da zayıf gelişim gösterirken M4-365 ve M4-11 numaralı suşlar gelişim göstermemişlerdir.

Vinderola ve Reinheimer, (2003) mide öz suyuna benzer bir ortam hazırlayarak 24 adet probiyotik bakterinin asit ortamda dayanımını incelemiş, pH 3'de 3 saat sonunda *Lb. casei* ve *Lb. rhamnosus*'un 2,7-5,9 logaritmik birim azaldığını belirlemiştir.

Ehrmann vd., (2002) ördek kökenli 112 adet laktik asit bakterisinden sadece 2 adedinin pH 3 ve 2'de 4 saat sonunda canlı kalabildiğini bildirmiştir. Bu çalışmada ise elde ettiğimiz izolatlar dan 2 tanesi pH 3,9 gelişim gösterememişken birisi de oldukça zayıf gelişim göstermiştir. Bu durumda gösteriyor ki aside dayanım özellikleri suştan suşa farklılık göstermektedir.

Yiğit, (2009) yaptığı bir çalışmada, anne sütünden elde ettiği 20 izolatın tamamı pH 3,9 da gelişim göstermiştir.

Yavuzdurmaz, (2007) anne sütlerinden laktik asit bakterilerini izole etmiş. İzole ettiği bakterilerden üç tanesi probiyotik özellik göstermiştir. Bu izolatlar, mide pH sına (pH 3,0) direnç göstermiştir.

Kıran, (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, hazır gıdalardan izole edilen ve çeşitli kültür koleksiyonlarından temin edilen laktik asit bakterilerinden hiçbirinin pH 2.0 ve pH 3.0'da gelişemediği; pH 4.0, pH 5.0 ve pH 6.0 değerlerinde hepsinin geliştiği; pH 9.6 değerinde *Pedio pentocaceus* türlerinin bir kısmının geliştiği bazılarının zayıf gelişme gösterdiği; *L. plantarum*, *L. brevis* ve *L. fermentum* türlerinin geliştiği, *Leuconostoc* cinslerinin zayıf gelişme gösterdiği belirtilmiştir

4.5.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi

MRS agar besiyerine Mc Farland No: 0,5 (10^8 kob/mL) bulanıklığına ayarlandıktan sonra M14-365, M4-157 ve M4-11 numaralı suşlar inoküle edilip besiyerlerine

antibiyotik diskler yerleştirilmiş, M14-365 ve M4-11 37 °C de, M4-157 30 °C’de, 24 saat sonra diskler etrafındaki zonlar ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 4.9.’da belirtilmiştir.

Çizelge 4.9: İzolatların antibiyotik duyarlılık testi zon çapları (mm)

Suş No	Ampicillin Zon Çapı* (mm)	Gentamicin Zon Çapı* (mm)	Erythromycin Zon Çapı* (mm)	Kanamycin Zon Çapı* (mm)	Penicillin G Zon Çapı* (mm)
M14-365	16,20±1,23	10,38±0,21	26,27±1,32	-	25,05±0,26
M4-157	25,41±1,53	9,61±0,70	13,64±0,68	-	10,94±1,16
M4-11	26,64±2,01	9,89±0,62	21,53±0,13	-	37,06±0,38

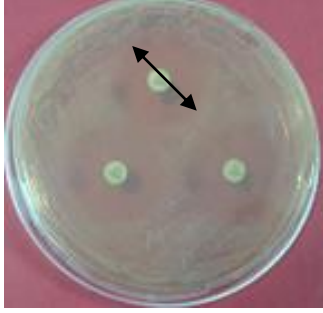
*: Ortalama±Standart Sapma, -: Zon yok

Çizelge 4.8.’e göre test edilen antibiyotiklerin içerisinde M14-365 suşu erythromycin’e karşı en yüksek inhibisyon zon çapı gösterirken sonra sırasıyla penicillin G, ampicillin, gentamicin antibiyotiklerine karşı hassasiyet gözlenmiştir. M4-157 suşu en yüksek inhibisyon zon çapını ampicilline karşı göstermiş sonra sırası ile erythromycin, penicillin G, gentamicin’e karşı hassasiyet gözlenmiştir. M4-11 suşu ise en yüksek inhibisyon zon çapını penicillin G’ ye karşı göstermiş sonra sırası ile ampicillin, erythromycin, gentamicin antibiyotiklerine karşı hassasiyet gözlenmiştir. Her 3 suş da ise kanamycine karşı direnç göstermiştir.

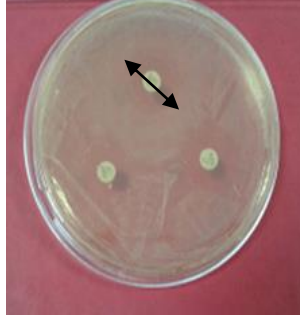
Bayar, (2007) yaptığı çalışmada süt ürünlerinden elde ettiği *Streptococcus* izolatı üzerinde antibiyotiklerin disk difüzyonu ile değerlendirilmesi sonucunda, % 62 duyarlılık oranı ile en az etkili antibiyotik streptomycin olarak bulunmuştur. Kanamycin ve neomycin ise % 0 direnç oranı ile en etkili antibiyotikler olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada da kanamycin *Streptococcus* ve *Lactococcus* izolatları üzerinde de zon oluşturmuyarak izolatlar üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisinin olmadığı anlaşılmıştır.

Aslın ve Beyatlı, (2004) yoğurtlardan izole edilen *S. thermophilus* türlerinde plazmit taşıyıcılığı ve bu türlerin antibiyotik dirençlerini incelemişlerdir. *S. thermophilus*’un suşların büyük bir çoğunluğunun gentamisine (%79) penisilin G’ye (%64) dirençli, kloramfenikole (%94) ve tetrasikline (%88) ise hassas olduklarını bulunmuşlardır.

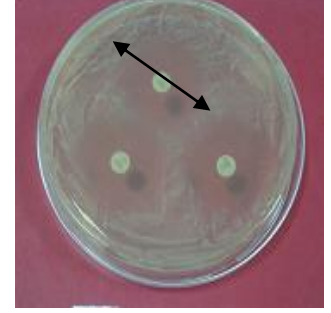
Yokokuro ve Mutai, (1976) yaptıkları çalışmada insan dışkılarından izole edilen 45 adet *L. fermentum* suşunda penisilin direncinin minimum inhibe edici konsantrasyonunun (MIC) sadece 2 izolatta 17 ve 13 U/mL olduğunu, diğer izolatların ise 0,03-0,44 U/mL konsantrasyonda inhibisyon gösterdiklerini tespit etmişlerdir.



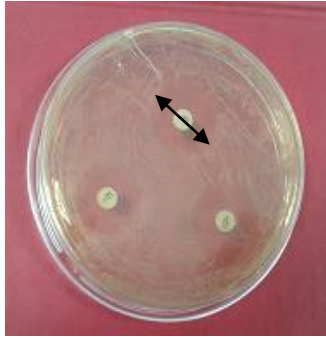
Şekil 4.11: M4-11 numaralı suşun ampicilline karşı antibiyotik duyarlılık testi



Şekil 4.12: M14-365 numaralı suşun ampicilline karşı antibiyotik duyarlılık testi



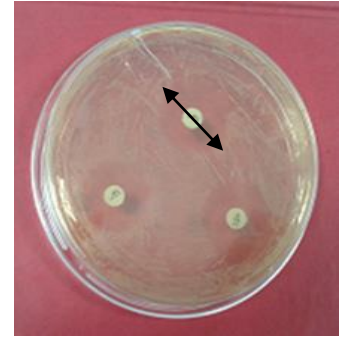
Şekil 4.13: M4-157 numaralı suşun ampicilline karşı antibiyotik duyarlılık testi



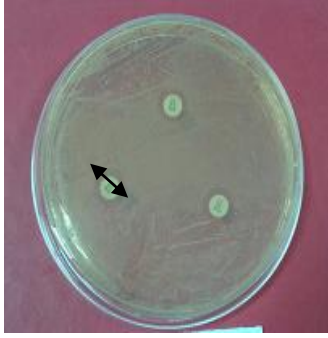
Şekil 4.14: M4-11 numaralı suşun eritromisine karşı antibiyotik duyarlılık testi



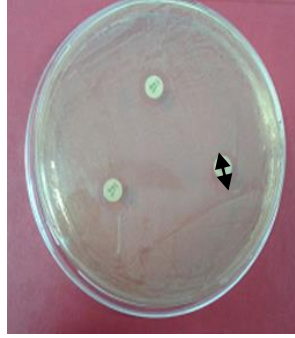
Şekil 4.15: M14-365 numaralı suşun eritromisine karşı antibiyotik duyarlılık testi



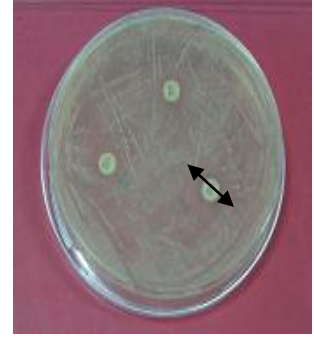
Şekil 4.16: M4-157 numaralı suşun eritromisine karşı antibiyotik duyarlılık testi



Şekil 4.17: M4-11 numaralı suşun gentamisine karşı antibiyotik duyarlılık testi



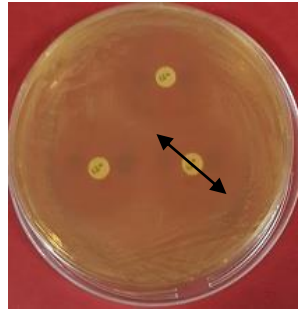
Şekil 4.18: M14-365 numaralı suşun gentamisine karşı antibiyotik duyarlılık testi



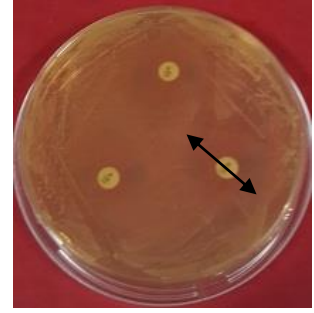
Şekil 4.19: M4-157 numaralı suşun gentamisine karşı antibiyotik duyarlılık testi



Şekil 4.20: M4-11 numaralı suşun penicilin G'ye karşı antibiyotik duyarlılık testi



Şekil 4.21: M14-365 numaralı suşun penicilin G'ye karşı antibiyotik duyarlılık testi



Şekil 4.22: M4-157 numaralı suşun penicilin G'ye karşı antibiyotik duyarlılık testi

4.5.3. Elde Edilen İzolatların Patojen Mikroorganizmalara Antimikrobiyal Etkisi

Çalışmada M14-365, M4-157 ve M4-11 numaralı suşların insan ve balık patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre sadece insan orijinli patojenlerden *P. aeruginosa* türü üzerinde M14-365 ve M4-11 numaralı suşlar antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Zon çapları dikkate alınarak M4-11, *P. aeruginosa* ATCC 27853 üzerinde M14-365'e kıyasla daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir. İzolatların balık patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi tespit edilmemiştir.

Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10. ve 4.11.'de verilmiştir.

Çizelge 4.10: İzolatların insan patojen mikroorganizmalara antimikrobiyal etkisi

Suş No	<i>S. aureus</i> ATCC 2912	<i>S. enteritidis</i> RSKK 171	<i>C. glabrata</i> RSKK 04019	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	<i>S. sonnei</i> Mu:57	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644
M14-365	-	-	-	-	-	7,31±1,27	-	-	-	-
M4-157	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M4-11	-	-	-	-	-	15,26±0,54	-	-	-	-

Çizelge 4.11: İzolatların balık patojenleri üzerine antimikrobiyal etkisi

Suş No	<i>A. hydrophila</i> ATCC 19570	<i>L. garvieae</i>	<i>Y. ruckeri</i>	<i>V. anguillarum</i> M1	<i>V. alginolyticus</i>
M14-365	-	-	-	-	-
M4-157	-	-	-	-	-
M4-11	-	-	-	-	-



Şekil 4.23: M14-365 ve M4-157 suşlarının *P. aeruginosa* patojenine antimikrobiyal etkisi

Yapılan bir çalışmada Burkina Faso Fermente sütlerinden bakteriyosin üreten 8 adet laktik asit bakteri suşu izole edilmiş ve bu suşların *Enterococcus faecalis* 103907 CIP, *Bacillus cereus* 13569 LMG, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Escherichia coli* 105182 CIP test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. *Lb. fermentum*, *Pediococcus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suşları laktik asit bakterileri olarak tanımlanmıştır. İnhibisyon zon çapları 8 mm ve 12 mm arasında ölçülmüştür. *Lb. fermentum* türü 12 mm ile en büyük zon çapını *E. faecalis* üzerinde vermiştir. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* suşu ise *Enterococcus faecalis* üzerinde en küçük zon çapını oluşturmuştur (Savagado vd., 2004).

Yine insan orijinli *Gardnerella vaginalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus milleri*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* gibi patojenlerin indikatör mikroorganizma olarak kullanıldığı başka bir çalışmada suşların hiçbirisi *S. aureus* ve *C. albicans* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermemiştir (Karaoğlu vd., 2002).

Yavuzdurmaz, (2007) izole ettiği probiyotik özellikteki bakterileri *Salmonella typhimurium* CM 5445, *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 129000 ve *Escherichia coli* NRRL B-3008 indikatör mikroorganizmalara karşı da antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir.

Mehrnia vd., (2014) anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkılarından izole ettikleri 15 laktobasil suşunun agar difüzyon tekniği ile patojen bakterilere karşı inhibisyon kapasiteleri değerlendirmiştir. Laktobasil suşlarının %100'ü *S. enteritidis* ATCC

13076, *S. typhimurium* CCM5445 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 test bakterilerine karşı inhibisyon etkisi gösterirken, denenen tüm test bakterileri içerisinde en yüksek inhibisyon zonuna *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı *L. casei* LB61 (21,8 mm) suşunun sahip olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada ise sadece insan orijinli patojenlerden *P. aeruginosa* üzerinde *S. salivarius* (M14-365, M4-157) suşunun aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca diğer çalışmalardan farklı olarak balık patojenleri kullanılmış ve suşlar patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite göstermemiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Son yıllarda, ülkelerde gelişmişlik düzeyi arttıkça yetişkinlerin ve çocukların mikropalara karşı dirençleri de gittikçe azalmıştır. Olumsuz çevre koşulları, sezaryen doğumların artması, çalışan annelerin artışı ile bebeklerin anne sütünden mahrum olmaları, kontrolsüz ve sağlıksız gıdaların kullanımı insanların bakteri florasındaki doğal probiyotik miktarını gittikçe azaltmıştır. Hatta pek çok bebek sezaryen ile doğduğu andan itibaren vücutlarında yararlı bakteri düzeyinin hiç olmadığı ortaya çıkmıştır. Kullanılan birçok ilaç ve antibiyotikler, canlının sindirim sistemindeki mikrofloradaki dengeyi bozmakta, birçok organda uzun sürede onarılamayacak birçok rahatsızlığa sebep olmaktadır. Potansiyel patojenler ortamda baskın duruma gelerek bağırsak, vajina, böbrek gibi önemli organlarda enfeksiyonların oluşumunu hızlandırmaktadır. Antibiyotiklere duyarlı olan laktik asit bakterilerinin sayısı azaldığından bağırsak reaksiyonu değişmekte, ortama patojen mikroorganizmalar hakim olmaktadır. Oysa gerek gelişme faktörü olarak, gerekse hastalıkların iyileştirilmesi amacıyla antibiyotiklerin yerine organizmadaki metabolik faaliyetleri olumlu yönde etkileyen, destekleyen doğal ürünler olan probiyotikler, bir alternatif olarak kullanılabilir. Böylece intestinal mikroflora stabilitesi sağlanarak, uygun şekilde yönlendirilerek, olumsuzluk ve sakıncaları teşvik etmeden antibiyotiklerin zararlı etkileri de engellenmiş olunmaktadır (Kılıç, 2001). Probiyotiklerin yararlı etkilerini içine alan mekanizmalar, antibakteriyel bileşikler üretilen besinler için veya kolonizasyon bölgeleri için yarışarak patojen bakterileri baskı altında tutmaktadırlar (Kılıç, 2001). Probiyotik bakterilerinin gıda ve sağlık alanındaki önemi, bu bakterilerin anne sütünde bulunması, antimikrobiyal özellik göstermesi ve bakteriyosin üretme potansiyellerinin yüksek olması gibi sebepler göz önüne alınarak bu çalışmada anne sütlerinden laktik asit bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmış ve bu bakterilerin bazı probiyotik ve starter özelliklerine bakılmıştır.

Çalışmamızda öncelikle farklı 16 anneden alınan sütlerden LAB'nin izole edilip saf kültürlerinin elde edilmesinde genel olarak *Lactobacillus* türleri için MRS agar ve *Lactococcus* ve *Streptococcus* için M17 agar besi ortamlarından yararlanılmıştır.

İnkübasyon süreci tamamlandıktan sonra agar içeren petrilere; tek düşen, morfolojik olarak birbirinden farklı olan ve laktik asit bakterisi olduğu sanılan 100 adet koloni seçilerek (mat, krem rengi, beyaz, küçük ve özellikle petrinin alt yüzeyinde bulunan koloniler) öze yardımıyla alınarak sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. İzolasyonun ilk aşamasına bazı fenotipik yöntemlerle (morfoloji, gram boyama, katalaz testi, glukozdan gaz oluşturma, hareketlilik testi, hidrojen sülfür testi gibi) karakterizasyonla başlanmıştır. Sonuç olarak elde ettiğimiz 100 suşun morfolojileri kok, basil, kokobasil görünümlü, gram (+), katalaz (-), hareketlilik (-), 9 adet heterofermentatif, 91 adet homofermentatif, hidrojen sülfür testi (-) olduğu tespit edilmiştir. Sonra LAB olarak elde ettiğimiz 100 suştan kok morfolojisine ve yüksek tanımlama oranlarına sahip 3 suş seçilerek API 20 Strep testi ile tür tanımlaması yapılmıştır.

Gerçekleştirilen tür tayinine göre M4-11, M4-157 ve M14-365 numaralı suşlardan M4-11 numaralı suşu ve M14-365 numaralı suşun *Streptococcus salivarius*, M4-157 numaralı suşun ise *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* olduğu tespit edilmiştir.

Sonrasında ise tanımlanan bu 3 suşun bazı starter olma özellikleri tespit edilmiştir. Starter olma özelliklerinden 15 °C ve 45 °C'deki sıcaklıklarda gelişme testi sonuçlarına göre M4-11 ve M14-365 numaralı suşlar 15 °C'deki sıcaklıkta gelişim göstermemişken, 45 °C'de gelişim göstermişlerdir. M4-157 numaralı suş ise 15 °C'de zayıf gelişim göstermiş, 45 °C'de ise gelişim gösterememişlerdir. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme testinde M4-157 numaralı suş % 2, % 4 ve % 5 NaCl sıvı besiyerinde gelişim gösterirken, M14-365 ve M4-11 numaralı suşlar % 4 ve % 5 NaCl sıvı besiyerinde gelişim göstermiş fakat % 2 NaCl sıvı besiyerinde gelişim göstermemişlerdir. % 6,5 NaCl sıvı besiyerinde ise test edilen suşlardan hiçbiri gelişmemiştir. İzolatların asit üretme yeteneklerine bakıldığında ise suşların inkübe edildiği besiyerlerindeki 3, 6, 12, 24, 36 ve 48. saatlerdeki pH ölçümleri incelendiğinde üç suşta da pH değerlerinin giderek azaldığı görülmektedir. Dolayısıyla her üç suşta da asit üretimi gözlenmiştir. EPS üretimlerine bakıldığında ise *S. salivarius* (M14-365) suşu EPS üretim miktarı en fazla olan suş olarak gözlemlenmiş, *L. lactis cremoris* (M4-157) suşunun ise EPS üretim miktarı en düşük olarak gözlemlenmiştir. Starter olma özelliklerinden son olarak nisin dirençliliğine bakılmış sonuç olarak 3 suşunda nisine dirençli olduğu görülmüştür.

Ayrıca suşların probiyotik olma özelliklerinden düşük pH'ya dayanım testi uygulanmış test sonucunda ise M4-157 numaralı suş pH 3,9 da zayıf gelişim gösterirken M4-365 ve M4-11 numaralı suşlar hiçbir gelişim göstermemişlerdir. Sonrasında antibiyotik duyarlılık testi yapılarak izolatların patojen mikroorganizmalara antimikrobiyal etkisine bakılmıştır. Antibiyotik olarak ampicillin, gentamicin, erythromycin, kanamycin ve penicillin G kullanılmıştır. Sonuç olarak test edilen antibiyotiklerin içerisinde M14-365 suşu erythromycin'e karşı en yüksek inhibisyon zon çapı gösterirken sonra sırasıyla penicillin G, ampicillin, gentamicin antibiyotiklerine karşı hassasiyet gözlenmiştir. M4-157 suşu en yüksek inhibisyon zon çapını ampicilline karşı göstermiş sonra sırası ile erythromycin, penicillin G, gentamicin'e karşı hassasiyet göstermiştir. M4-11 suşu ise en yüksek inhibisyon zon çapını penicillin G' ye karşı göstermiş sonra sırası ile ampicillin, erythromycin ve gentamicin antibiyotiklerine karşı hassasiyet göstermiştir. Her 3 suşun da ise kanamycine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir.

İzolatların patojen mikroorganizmalara antimikrobiyal etkisine bakıldığında ise test patojeni olarak kullandığımız insan ve balık patojenleri içerisinde insan orijinli patojenlerden yalnızca *P. aeruginosa* üzerinde M14-365 ve M4-11 numaralı suşlarının aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.

Çalışma sonuçlarına bakıldığında M4-157 numaralı suşun 15 °C'deki sıcaklıkta zayıf gelişim gösterebilmesi, M14-365, M4-11 suşlarının ise 45 °C'deki sıcaklıkta gelişebilmesi, bununla birlikte her 3 suşunda % 4 ve % 5 NaCl sıvı besiyerinde gelişim göstermiş olması ve her 3 suşdada asit üretimi gözlenerek, EPS üretim miktarlarının yüksek olması göz önüne alındığında izolatların starter olarak kullanılabilme potansiyeli taşımadığı ortaya çıkmaktadır.

M4-157 numaralı suşun pH 3,9'da zayıf gelişim göstermesi, tanımlanan izolatlardan M14-365 ve M4-11 (*S. salivarius*) suşlarının antimikrobiyal aktivite göstermesi ve 3 suşunda kanamycin, antibiyotiğine karşı dirençli olmaları probiyotik olma açısından kayda değer özelliklerdir.

Çalışmada elde edilen sonuçlar dikkate alındığında izolatların iyi bir probiyotik ve starter olma potansiyeli taşıdığı gözlenmiştir. Ayrıca yapılacak ilave çalışmalarla bu sonuçlar desteklenebilecektir.

KAYNAKLAR

- Akçelik, M., Ayhan, K., Gürgün, V., Tunail, N., 1999. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara.
- Akkan, H.A., Karaca, M., 2003. Veteriner İç Hastalıklarında Antibiyotiklerin Kullanımı, YYÜ Vet Fak Derg, 14 (2),72-77.
- Alperden, İ., 1993. Et ve su ürünleri mikrobiyolojisi. Gıda Sanayiinde Mikrobiyoloji ve Uygulamaları, Marmara Araştırma Merkezi Gıda ve Soğutma Teknolojileri Bölümü Yayın No:124, s101, Kocaeli.
- Anonim, 1997. Disk Diffusion Susceptibility Testing (Kirby-Bauer Method), <http://www.addl.purdue.edu/newsletters/1997/spring/dds.shtml>.
- Anonim, 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, ed: Halkman A.K., Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, Pp: 243-244, 246, 247, 250, 289, 261, 320.
- Arıcı, M., Coşkun, F., Mirik, M., Gülcü, M., 2011. Hardaliyeden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Tanımlanması, Teknolojik ve Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi, (Proje No:TÜBİTAK 110O018), Tekirdağ Üniversitesi.
- Arslankoz, N., 2011. Ankara Çubuk yöresi turşularından izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı teknolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi.
- Aslım, B., Beyatlı, Y., 1997. Köy ve Kasaba Yoğurtlarından izole Edilen *Lactobacillus bulgaricus* Suşlarının Metabolik ve Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Bir Araştırma, Gıda Dergisi, 22(6), 441-447.
- Aslım, B., Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y., Mercan N., 2005. Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* Strains Under Different Growth Conditions, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21, 673–677.
- Başığit, G., 2004. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Olarak Kullanılma Özellikleri, (Yüksek Lisans Tezi). SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bayar, S., 2007. Süt Örneklerinden *Staphylococcus* ve *Streptococcus* Türlerinin İzolasyonu, Tiplendirilmesi ve Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi, (Yüksek Lisans Tezi). Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Bergamini, C.V., Hynes, E.R., Palma, S.B., Sabbag, N.G., Zalazar, C.A., 2009. Proteolytic Activity of Three Probiotic Strains in Semi-Hard Cheese as Single and Mixed Cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*, International Dairy Journal.
- Beasley, S., 2004. Isolation, Identification And Exploitation Of Lactic Acid Bacteria From Human And Animal Microbiota Department of Applied Chemistry and Microbiology University of Helsinki Finland Academic Dissertation.
- Beyatlı, Y., Aslım, B., Yüksekdağ, Z.N., Önal Darılmaz, D., 2010. Türkiye'nin Geleneksel Peynirlerinde Bulunan Propiyonik Asit Bakteri Türlerinin Belirlenerek, Bazı Probiyotik ve Starter Özelliklerinin Araştırılması, (TÜBİTAK Proje No: 107T486), Ankara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi.
- Bulut, Ç. 2003. Isolation and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria from Cheese. Yüksek Lisans Tezi. İzmir Teknoloji Enstitüsü, 102s., İzmir.
- Büyükyörük, S., Cibik, R., Çetinkay, F., Soyutemiz, G. E., Göksoy, E. Ö., Kirkan, Ş. 2010. Isolation, phenotypic and molecular identification of *Lactococcus lactis* isolates from traditionally produced village cheeses. Journal of Animal and Veterinary Advances, 9 (16); 2154-2158.
- Canan, E., Bige, Neslihan, Ö. Utku Tamer, C.E., Karaman, B., Aydoğan, N., Çopur, Ö.U. 2004. Bazı geleneksel fermente gıdalarımız ve sağlık üzerindeki etkileri. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 23-24 Eylül, Van.
- Castele, S.V., Vanheuverzwijn, T., Ruysen, T., Assche, V.P., Swings, J., Huys, G., 2006. Evaluation of Culture Media for Selective Enumeration of Probiotic Strains of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in Combination with Yoghurt or Cheese Starters, Int. Dairy J., 16, 1470-1476,.
- Casalta, E. ve Montel, M. C., 2008. Safety assesment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. International Journal of Food Microbiology, (126); 271-273.
- Chung, JY., Sung, EJ., Cho, CG., Seo, KW., Lee, JS., Bhang, DH., Lee, HW., Hwang, CY., Lee, WK., Youn, HY., Kim, CJ., 2009. Effect of Recombinant *Lactobacillus* Expressing Canine GM-CSF on Immune Function in Dogs, J Microbiol Biotechnol, Nov.
- Cheriguene, A., Chougrani, F. Ve Bensoltane, A., 2006. Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Algerian Goat's Milk. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9 (7), p.p 1242-1249.
- Collins, C.H., Lyne, P.M. ve Grange, J.M., 1995. Collins and Lyne's Microbiological Methods. Seventh Edition, Butterworth-Heinemann Ltd., Linacre House, Jordan Hill, Oxford, p. 493.

- Çetin, E.T., 1983. Endüstriyel Mikrobiyoloji, İ. Tıp. Fak. Vakfı Yayınları, İstanbul, 418.
- Darby, B.L., Heusner, G.L., Murry, A.C., Hinton, Jr A., Barton, M.H., Fayrer-Hosken, R.A., 2007. In Vitro Inhibition of Growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridia perfringens* Using Probiotics, ESS Meeting Proceedings, p. 21–23.
- Dinçer, E, Kıvanç, M., Karaca, H., 2009. Biyokoruyucu Olarak Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosinler.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Pebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, Anal. Chem., 28, 350-356,.
- Durlu, Ö.F., 2012. Genel İdentifikasyon Testleri.
- Evren, M., Apan, M, Tutkun, E., Evren, S., 2011. Geleneksel Fermente Gıdalarda Bulunan Laktik Asit Bakterileri
- Facklam, R., Sahm, R.D.S., Teixeira, L.M., 2002. Standart Laboratory Methods for Identifying and Growing Enterococci, Manual of Clinical Microbiology, ASM Press. fooks I.J.
- Fooks, L. J., Fuller, R., Gibson, G. R., 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. Int. Dairy J. 9: 53-61.
- Fowler, G.G., Jarvisan, R., ve Tramer J., 1975. Some methods for microbiological assay, The Soci.for Appl.Bact. Tech.Series.,No:8,91-105.
- Fuller, R., Gibson, G.R., 1999. Prebiotics, Probiotics and Human Gut, Microbiology. Int. Dairy J., 9, 53-61.
- Furet, J. P., Queene, P., ve Talliez, P., 2002. Quantification de bacteries lactiques par PCR quantitative. Science of Aliments, (22); 33-44.
- Göktepe, I., Juneja, V.K., Ahmedna, M., 2006. Probiotics in Food Safety and Human Health, Taylor and Francis Group LLC., CRC Press Inc., Boca Raton, FL. January, 494 pages, ISBN: 1574445146.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biochemical, Technological and Therapeutic Properties Relevant for Use as Probiotics, Trends Food Science and Technology, 10, 139.

- Günay, Ö., 2012. Türkiye Kökenli *Lactococcus lactis* Suşlarının Kromozomal Farklılıklarının Tanımlanması.
- Gürsoy, O., ve Kınık, Ö., 2005. Laktobasiller ve Probiyotik Peynir Üretiminde Kullanım Potansiyelleri, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 3(11), 361-371.
- Grigor, J., Johnson, W.S., Salminen, S., 2001. Food Additives for Special Dietary Purposes, Food Additives-2nd Edition. Ed. Alfred Larry Branen, Marcel Dekker Inc. New York, Pp:339-348.
- Halami, P.M., Chandrashekar, A., Nand, K., 2000. *Lactobacillus farciminis* MD, a New Strain with Potential for Bacteriocin and Antibiotic Assay, Letters in Applied Microbiology, 30, 197-202.
- Halkman, A.K., 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti. Ankara, 73-89, 250.
- Hardie, J.M., Whiley, R.A., 1992. The Genus Streptococcus, In The Genera of Lactic Acid Bacteria, Eds: Wood, B.J.B., and Holzapfel, W.H., Blackie Academic and Professional, London, p.114.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T., Williams, S.T., 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 527-567.
- Jara, S., Sánchez, M., Vera, R., Cofré, J., Castro, E., 2011. The inhibitory activity of *Lactobacillus* spp. isolated from breast milk on gastrointestinal pathogenic bacteria of nosocomial origin. Anaerobe 17 (2011) 474-477.
- Isaacs, CE., 2005. Human milk inactivates pathogens individually, additively and synergistically. Journal of Nutrition;135:1286-8.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Demirpençe, Y., Yıldırım, M., 2008a. Enterekoklar: Biyokimyasal, Fizyolojik ve Fonksiyonel Özellikleri ile Patojenitesi, Akademik Gıda Bilimi ve Teknolojisi Dergisi, 6(3), 16-26.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M., 2008. Yöresel peynirlerden antimikrobiyel aktiviteye sahip laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve tanısı. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 1 (25); 1-6.
- Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., Arul, V., 2013. Probiotics and its functionally valuable products, A Review, Crit Rev Food Sci., 53, 641-658.
- Karahan, A.G., Çakmakçı, M.L., 1996. Probiyotikler, Gıda Dergisi, 21,4, 297-302.

- Kayagil, F., 2006. Geleneksel Starter Kùltürlerin Peynir Kalitesine Etkisi, (Yüksek Lisans Tezi), ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Khaled, D.K., Neilan, B.A., Henriksson, A., Conway, P.L., 1997. Identification and Phylogenetic Analysis of *Lactobacillus* Using Multiplex RAPD-PCR, FEMS Microbiol. Lett., 153, 191-197.
- Kılıç, S., 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri, Ege Üniversitesi Ziraat Fakùltesi Yayınları No:542, 1. Baskı, 451s, İzmir.
- Kıran, F., Osmanağaoğlu, Ö., 2011. Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda/Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 27(1), 62-74.
- Kıran, F., 2006. Hücre Duvarı Protein Profilleri ve Pilazmid İçeriklerine Göre Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Tanısı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniveristesi, 130s., Ankara.
- Klaenhammer, T.R. ve Kullen, M.J., 1999. Selection and design probiotics. International Journal of Food Microbiolog 50(1):45-57.
- Kushiro, A., Chervaux, C., Cool-Portier, S., Perony, A., Legrain-Raspaud, S., Obis, D., Onoune, M., 2009. Moer A., Antimicrobial Susceptibility Testing of Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacteria* by Broth Microdilution Method and Etest, International Journal of Microbiology, 132, 54-58.
- Lewus, C.B., Kaiser, A., Montville, J.T., 1991. Inhibition of Food-Borne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat, Appl. and Environ. Microbiol., 57 (6), 1683-1688.
- Lopez-Diaz, T. M., Alonso, C., Roman, C., Garcia-Lopez, M. L. and Moreno, B., 2002. Lactic acid bacteria isolated from a hand made blue cheese. Food Microbiology, (17); 23-32.
- Madigan, M.T. ve Matrinko, J.M., 2006. "Brock Biology of Microorganisms," Pearson Education, Inc. Eleventh Edition, 375-378.
- Makarova, K. S. ve Koonin, E. V., 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. Journal of Bacteriology, 4 (189); 1199-1208.
- Martin, R., Olivares, M., Pérez, M., Xaus, J., Torre, C., Fernáandel, Z., Rodriguez J.M., (2010).Identification and Evaluation of the Probiotic Potential of *Lactobacilli* isolated from Canine Milk, The Veterinary Journal, 185, 193-198.
- Martin, R., Olivares, M., Marin, M. L., Fernández, L., Xaus, J., Rodriguez, J. M., 2005. Probiotic Potential of 3 *Lactobacilli* Strains Isolated From Breast Milk. J Hum Lact 21(1):8-17.

- Martin, R., Heilig, G.H., Zoetendal, E.G., Jimenez, E., Fernandez, L., Smidt, H., Rodriguez, M., 2007. Cultivation- independent Assessment of the Bacterial Diversity of Breast Milk along Healty Women, *Research in Microbiology*, 158, 31-37.
- Mehrnia, L., Yüksekdağ, ZN., Aslım, B., 2014. Anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkılarından izole edilen *Lactobacillus* türlerinin bazı probiyotik özelliklerinin araştırılması, *Elektronik Mikrobiyoloji*, 12, 1, 67-81.
- Morrow, AL., Rangel, JM., 2004. Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*;15: 221-228.
- Mumcu, Z.N., 1997. Kefirden İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin, Metabolik, Antimikrobiyal ve Plasmid DNA'larının İncelenmesi, (Yüksek Lisans Tezi), Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Newburg, DS., 2005. Innate immunity and human milk. *Journal of Nutrition*;135:1308-12.
- Nousiainen, J., Setälä, J., 1993. Lactic Acid Bacteria As Animal Probiotics, eds: Salminen S. and Von Wright A., *Lactic Acid Bacteria*, Marcel Dekker, New York, US, s.315-356.
- O'sullivan, D.J., 2001. Screening of Intestinal Microflora for Effective Probiotic Bacteria, *Agric. Food Chem.*, 49 (4), 1751-1760.
- Oumer, A., Gaya, P., Fernandez-Garsia, E., Mariaca, R., Gadre, S., Medina, M., ve Nunez M., 2001. "Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture," *J.Dairy Research*, 68, 117-1219.
- Özyurt, Ş., 2005. Doğal (yerel) *Streptococcus Salivarius* subsp., *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Suşlarında Endüstriyel Öneme sahip Özelliklerin Araştırılması.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P., 2003. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from a Grek Dryfermented Sausage in Respect of Their Technological and Probiotic Properties, *Meat Sci.*, 65, 859-867.
- Papich, M.G., 2001. Current Concepts in Antimicrobial Therapy for Horses, *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, 47,94-102.
- Perelmuter, K., Fraga M., Zunino P., 2008. In Vitro Activity of Potential Probiotic *Lactobacillus murinus* Isolated from the Dog, *Journal of Applied Microbiology*, 104 -1718-1725.

- Perez-Elortondo, F. J., Aldamiz, Echobarria P., Alsubi, M. ve Barcina, Y., 1999. Indigenous lactic acid bacteria in Idiazabal ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*, 8, 725-732.
- Pollmann, M., Nordhoff, M., Pospischill, A., Tedin, K., Wieler, L.H., 2005. Effect of Probiotic Strain of *Enterococcus faecium* on the Rate of Natural Chlamydia Infection in Swine, *Infection and Immunity*, 73, 4346-4353.
- Reinheimer, J.A., Demkow, M.R., Condioti, M.C., 1990. Inhibition of Coliform bacteria by lactic cultures, *The Aust J. Dairy Technol.*, May, 5-9.
- Rousis, I.G., 1994. Dairy lactic acid bacteria physiology and growth, *Chimica chronica*, 23, 137-153.
- Rollins, M., Joseph, S.W., 2000. BSCI 424 - Pathogenic Microbiology, Antibiotic Disk Susceptibilities (Kirby-Bauer Disk-Diffusion Method), <http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/LabMaterialsMethods/AntibioticDisk.htm>, 10.03.2015.
- Sabır, F., Beyatlı, Y., Çokmus, C., Önal-Darılmaz, D., 2010. Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. strains isolated from kefir. *J Food Sci.*, 75, M568-M573.
- Sağdıç, O., Arıcı, M., Şimşek, O., 2002. Selection of Starters for Traditional Turkish Yayık Butter Made from Yoghurt, *Food Microbiology*, 19, 303-312.
- Sanders, M. E., 2000. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *American Society for Nutritional Sciences*, (130); 384.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron- Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., 1998. Isolauri E., Moreau M.C., Roberfroid M., Rowland O., Functional Food Science and Gastrointestinal Physiology and Function, *Britain Journal of Nutrition*, 80(1), 147.
- Savagado, A., Cheik, A.T.O., Bassole, H.N.I. and Traore, A.S. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina faso fermented milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3; 1174- 179.
- Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Klipper-Bälz, R. Collins, M. D., ve Fisher, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 6; 183-195.
- Schlegel, H. G., 1997. *General Microbiology*. Cambridge University Press, 673 p, New York, USA.

- Singh, vd., 2014. Probiotic Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated From Human Breast Milk.
- Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Navarini, L., Bosco, M., Cescutti, P., 1999. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization, *Int. J. Food Microbiol.*, 51, 105-111
- Strompfová, V., Lauková, A., Ouwehand, A.C., 2004. Selection of Enterococci for Potential Canine Probiotic Additives, *Veterinary Microbiology*, 100, 107–114.
- Strompfová, V., Lauková, A., 2004. Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria from Canine Faeces, *Bull Vet Inst Pulawy*, 4, 215-21.
- Sullivan, A., Nord, C.E., 2002. The Place of Probiotics in Human Intestinal Infection, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20, 313.
- Şanlıbaba, P. ve Akçelik, M., 2000. Çiğ süt ve peyniraltı sularından izole edilen laktokokların faj duyarlılıkları, *Turkish Journal of Biology*, 24, 425–435.
- Tamer, A.U., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, D., Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R., 1989.3. ve 4. Sınıf Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, Anadolu Üniversitesi, Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, No. 74, Eskişehir, 23-25, 240.
- Tannock, G. W., 1997. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria: Plenty of Scope for Fundamental R&D, *Tıbbiye*, Vol, 15, 270-274.
- Tatlı, D., 2009. Geleneksel Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi.
- Temiz, A., 1996. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, Haliboğlu Basım Yayımları San. Tic. Ltd. Şti., Beşevler, Ankara, 273 s.
- Teuber, M., Meile, L., Schwarz, F., 1999. Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria From Food, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 115-137.
- Tok, E. ve Aslım, B., 2007. Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derneği*, 1, 37, 62-68.
- Toksoy, A., 1996. *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* Suşlarının Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi, (Doktora Tezi), Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tuncer, İ., 2000. Kanatlı Rasyonlarında Probiyotik Kullanımı, *Çiftlik Dergisi*, Mayıs, 195, 39-42.

- Vinderola, C. G., Reinheimer, J. A., 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative 'in vitro' study of probiotic characteristic and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36, 895-904.
- Warminska, RI., Laniewska-Moroz, L., Babuchowski, A., 2002. Possibilities for Stimulation of Bifidobacterium Growth by Propionibacteria, *Le Lait*, 82, 113-121.
- Ward, L. J. H., Davey, G. P., Heap, H. A., ve Kelly, W. J., 2002. *Lactococcus lactis*. *Encyclopedia of Dairy Science*, Elsevier Science Ltd, 1511-1516, London.
- Williams, A. M., Fryer, J. L. ve Collins, M. D. 1990. *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiology Letters*, (68); 109-114.
- Wood, B. J. B., ve Holzapfel, W., 1995. The genera of lactic acid bacteria. (1), Blackie Academic and Professional, Glasgow, United Kingdom.
- Wood, B. J. B., ve Warner, P. J., 2003. Genetics of lactic acid bacteria. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY.
- Yavuzdurmaz, H., 2007. Isolation, Characterization, Determination of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria from Human Milk. A Thesis Submitted to the Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of MASTER OF SCIENCE in Food Engineering.
- Yıldırım, T., 2007. Laktik Asit Bakterilerine (LAB) Ait Bazı Türlerin AFLP (Çoğaltılan Parça Boy Farklılaşması) Yöntemi İle Parmak İzi Analizleri, (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yigit, T., 2009. Süt ve Süt Ürünlerinden Probiyotik Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması, (Yüksek Lisans Tezi), Biyoloji Anabilim Dalı.
- Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y., Aslım, B., 2004. Metabolic activities of *Lactobacillus* spp. strains isolated from kefir. *Nahrung/FOOD*, 48, 218-220.
- Zacarias, M.F., Binetti, A., Laco, M., Reinheimer, J., Vinderola, G., 2011. Preliminary technological and potential probiotic characterisation of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products. *International Dairy Journal*, 21, 548-555.
- Zeyner, A., Boldt, E., 2006. Effect of a Probiotic *Enterococcus faecium* Strain Supplemented from Birth to Weaning on Diarrhoea Patterns and Performance of Piglets, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90, 25-31.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Pınar ÖNGÜN

Doğum Tarihi ve Yeri: 29.10.1985 - AKSARAY

E-posta adresi : pnr.ongun68@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Selçuk Üniversitesi, 2005-2009

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, 2013-

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

- 1)Aksaray Devlet Hastanesi Yaz Stajı
- 2)Aksaray Özel Medisaray Hastanesi Laboratuvarında çalıştı
- 3) ABD’de Houston Community College’de Dil Kursu