

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin
Bazı Patojenlere Karşı İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi**

Rayyan Nawfal Mahmood ALNUAIMI

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Ekim , 2023

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin
Bazı Patojenlere Karşı İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi

Rayyan Nawfal Mahmood ALNUAIMI

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi 26/09/2023 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Dr. Öğr. Üyesi Fatmagün AYDIN (Danışman)
: Prof. Dr. Şehriban ÇEK YALNIZ
: Prof. Dr. B. Devrim ÖZCAN

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2022-14794

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VI
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Bakterilerin Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri	13
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	19
3.1.3. Çalışmada Kullanılan İndikatör Mikroorganizmalar.....	19
3.2. Metot.....	20
3.2.1. Farklı Kaynaklardan Örneklerinin Alınması	20
3.2.2. İzolasyon Yöntemi	20
3.2.3. Gram Boyama.....	22
3.2.4. Katalaz Testi.....	22
3.2.5. İzolatlardan Stok Kültür Hazırlanması	22
3.2.6. Çalışmada kullanılan Bakterilerin Aktivasyonu.....	22
3.2.7. İzolatların Moleküler Yöntemle Tanılanması.....	23
3.2.8. İzolatların bazı patojenlere karşı inhibisyon etkisi	26
3.2.9. İzolatların Biyofilm Oluşturma Potansiyellerinin Belirlenmesi	28
3.2.9. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	29
3.2.10. Hücre dışı enzim üretme kapasitesinin değerlendirilmesi	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	33
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Kültürü ve Saflaştırılması	33
4.2. İzolatların Moleküler Yöntemlerle Tanılanması.....	36
4.3. İzolatların bazı patojenlere karşı inhibisyon etkisi	44
4.3.1. Agar Spot Testi.....	44
4.3.2. Kuyu Difüzyon Testi	47
4.3.3. Sıvı Besiyerinde İnhibisyon Etkinin Belirlenmesi	48
4.3.4. Çapraz Çizgi Yöntemi Testi	49
4.4. İzolatların Biyofilm Oluşturma Potansiyellerinin Belirlenmesi	52
4.4.1. Kongo Kırmızısı Bağlama Testi.....	52

4.4.2. Biyofilm Oluşturma Potansiyeli (Mikroplak Yöntemi).....	55
4.5. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	58
4.6. Hücre dışı enzim üretme kapasitesinin değeriendirilmesi	63
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	79



Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Patojenlere Karşı İnhibisyon Etkisinin Belirlenmesi

Rayyan Nawfal Mahmood ALNUAIMI

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Dr. Fatmagün AYDIN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Bu tezde, farklı kaynaklardan (anne sütü, anne sütüyle beslenen bebeklerin dışkısı ve ev yapımı turşu) izole edilen laktik asit bakterileri türlerinin tanımlanması yapılarak, izolatların bazı patojenlere karşı inhibisyon etkisinin belirlenmesi, biyofilm oluşturma potansiyelleri, antibiyotik duyarlılığı ve hücre dışı enzim üretiminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Seçilen 10 izolatın moleküler tanımlanması, 16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntemle göre, BST01, BST02-05, BST02-07, BST02-10, BD01-05, BD02-02 izolatları *Limosilactobacillus fermentum*, TU01-01 izolatı *Lactiplantibacillus plantarum*, BD03-01, BD04-05 izolatı *Lacticaseibacillus rhamnosus*, BD04-03 izolatı ise *Enterococcus faecalis* türleri tanımlanmıştır. Tanımlanması yapılan izolatlar, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'ne (NCBI) kaydedilmiştir.

Agar spot testinde, *Lactococcus garvieae* LG1suşu hariç izolatların tamamına yakını referans izolatlara karşı inhibisyon etkisi göstermiştir. Kuyu difüzyon testinde, BST02-07 izolatı hariç, tüm izolatlar *Pseudomonas aeruginosa* izolatını inhibe etmiştir. Çapraz çizgi testinde, TU01-01, BD02-02 izolatlarının *Escherichia coli*'e karşı en fazla inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen izolatların tümünün proteaz enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. BST01, BST02-05, BST02-07, BD01-05 izolatlarının orta derecede biyofilm oluşturma yeteneğinde olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anne sütü, bebek dışkısı, turşu, 16S rRNA, enzim aktivitesi

Inhibition Effects Lactic Acid Bacteria Isolated From Various Sources Against Some Pathogens

Rayyan Nawfal Mahmood ALNUAIMI

Advisor: Asst.Prof. Dr. Fatmagün AYDIN

Department of Biotechnology

ABSTRACT

In this thesis, by identifying the lactic acid bacteria species isolated from different sources (breast milk, feces of breast-fed babies and homemade pickles), determining the inhibition effect of the isolates against some pathogens, biofilm formation potential, antibiotic susceptibility and extracellular enzyme production capacity is intended to be determined.

46 lactic acid bacteria (LAB) were isolated 17 from breast milk, 21 from baby feces, and 8 from pickles. Of these, 10 isolates were selected to examine their characteristics, taking into account gram staining, catalase, and cell morphologies. Molecular identification of 10 selected isolates was performed by 16S rRNA gene region sequence analysis method. According to this method, we found the BST01, BST02-05, BST02-07, BST02-10, BD01-05, BD02-02 isolates are *Limosilactobacillus fermentum*, TU01-01 isolate is *Lactiplantibacillus plantarum*, BD03-01, BD04-05 isolate is *Lacticaseibacillus rhamnosus*, BD04-03. The BD04-03 isolate was identified as *Enterococcus faecalis* species. Identified isolates were registered with the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

In the agar spot test, almost all of the isolates except *Lactococcus garvieae* LG1 strain showed inhibitory effects against indicator microorganisms. In the well diffusion test, all isolates inhibited *Pseudomonas aeruginosa* isolate, except isolate BST02-07. In the cross-line test, TU01-01, BD02-02 isolates showed the highest inhibition effect against *Escherichia coli*. All of the isolates obtained in the study were determined to have protease enzyme activity. BST01, BST02-05, BST02-07, BD01-05 isolates were found to have moderate biofilm-forming ability.

Keywords: Breast milk, baby feaces, pickles, 16S rRNA, enzyme activity

TEŞEKKÜR

Öncelikle bana ve aileme vermiş nimetler ve lütuf için, bilgimi geliştirerek insanlığa hizmet etme fırsatı vermiş olduğu için Allah’a şükrediyorum.

Değerli hocam Dr.Öğr.Üyesi Fatmagün Aydın’a yüksek lisans eğitimim boyunca manevi ve bilimsel destek sağlayarak ve kendi çalışmaları ile bana ilham vererek bilgi ve tecrübelerini esirgemediği için minnettarlığımı derinden ifade ederek teşekkürlerimi sunarım.

Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Beritan Batur’a teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca psikolojik desteklerini ve sabırlarını esirgemeyen aileme, anneme, eşime, çocuklarıma, ablama sonsuz teşekkürler, minnettarım.

Ayrıca bana destek olan Mersin'deki Carolina İlaç Şirketine de teşekkürlerimi ve takdirlerimi sunarım.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan referans izolatlar.....	19
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primerler.....	24
Çizelge 3.3. Antibiyotik direncinin belirlenmesinde kullanılan antibiyotik diskleri	30
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan izolat kaynağı, izolat sayısı ve alındığı yer	33
Çizelge 4.2. Seçilen izolatların katalaz, gram boyama ve hücre morfolojileri	33
Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan izolatların kaynağı ve kodlanması.....	36
Çizelge 4.4. Genomik DNA'nın konsantrasyon ve saflık değerleri	37
Çizelge 4.5. Moleküler yöntem ile izolatların tanılanması sonuçları.....	38
Çizelge 4.6. Çalışmada kullanılan izolatların NCBI 'de yer alan kayıt bilgileri	39
Çizelge 4.7. Filogenetik ağaçta yer alan çalışma izolatları ve diğer bakteri türleri	41
Çizelge 4.8. İzolatların agar spot test sonuçları	45
Çizelge 4.9. İzolatların kuyu difüzyon yöntemi sonuçları	47
Çizelge 4.10. Çapraz çizgi yöntemi testi sonuçları.....	50
Çizelge 4.11. İzolatların kongo kırmızısı bağlama testi sonuçları	52
Çizelge 4.12 . Referans izolatların kongo kırmızısı bağlama testi sonuçları	54
Çizelge 4.13. İzolatlarda belirlenen biyofilm oluşumu.....	55
Çizelge 4.14. Referans izolatlarda belirlenen biyofilm oluşumu.....	55
Çizelge 4.15. İzolat ve referans mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneğinin belirlenmesi sonuçları.....	57
Çizelge 4.16. LAB suşlarının antibiyotik duyarlılık testinin sonuçları.....	60
Çizelge 4.17. Referans izolatlarda antibiyotik duyarlılık testinin sonuçları.	61
Çizelge 4.18. LAB izolatlarının proteaz, amilaz lipaz ve selüloz aktivitesi değerleri.	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	İzolatların seyreltme yapılması aşamaları (orijinal).....	21
Şekil 3.2.	Örneklerin izolasyonu ve saflaştırma aşamaları (orijinal).	21
Şekil 3.3.	İzolatların seyreltilmesinin şematize edilmesi (orijinal).	21
Şekil 3.4.	Çapraz çizgi yöntemi testinin şematize edilmesi	28
Şekil 4.1.	MRS besiyeri üzerinde A-BST02-02, B-BST01, C-BST01, D-BD02-02, E-BD01-05, F-BST02-05ve G-BD04-05 izolatlarına ait saflaştırılan kolonilerin görünümü.	34
Şekil 4.2.	İzolatlara ait gram boyama görünümü, A-BST01, B-BST02-05, C-BST02-07, D-BST02-10, E-TU01-01, F-BD01-05, G-BD02-02, H-BD03-01 I- BD04-03 J-BD04-05 1000x (orijinal).....	35
Şekil 4.3.	PZR ürünlerinin %1 agaroz jel görüntüsü.....	37
Şekil 4.4.	Çalışmada tanılanan izolatların gösterildiği filogenetik ağaç	42
Şekil 4.5.	Çalışmada tanılanan izolatlar ile diğer bakteri türleri karşılaştırmasını gösteren filogenetik ağaç	43
Şekil 4.6.	LAB izolatlarının referans izolatlarda inhibe edici etkisinin agar spot testiyle ölçülmesi sonucunda oluşan zon çaplarının besiyerinde görünümü	46
Şekil 4.7.	LAB izolatlarının referans izolatlarda inhibe edici etkisinin kuyu difüzyon testi ile testiyle ölçülmesi sonucunda oluşan zon çaplarının besiyerinde görünümü	47
Şekil 4.8.	Şekil 4. 1. TSA agar ortamında (TU01-01(<i>L. plantarum</i>) bakteri ile (<i>E. coli</i> ATCC 25922) izolatların görünümü.....	49
Şekil 4.9.	LAB izolatlarının referans izolatlar üzerindeki inhibisyon etkisi	51
Şekil 4.10.	İzolatların MRS-CR agar besiyerinde görünümü	53
Şekil 4.11.	Referans izolatların MRC-KK agar besiyerinde görünümü.....	54
Şekil 4.12.	İzolatlar ve referans izolatların biyofilm üretme düzeylerine ait absorbans değerleri	56
Şekil 4.13.	İzolatların antibiyotiklere duyarlılığının besiyerinde görünümü	59
Şekil 4.14.	Referans izolatların antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının besiyerinde görünümü	62
Şekil 4.15.	LAB izolatlarının proteaz, lipaz, amilaz ve selülaz aktivitelerinin besiyerinde görünümü).....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
A+T	: Adenin + Timin
ATP	: Adenozin Trifosfat
CFS	: Hücresiz Süpernatant
CMC	: Karboksi Metil Selüloz
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTPs	: Deoksiribonükleotit Trifosfatlar
Eps	: Ekstraselüler Polimerik Ürünler
G+C	: Guanin + Sitosin
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
kDa	: Kilo Dalton
kob	: Koloni Oluşturan Birim
L	: Litre
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
McF	: Mcfarland
Mg	: Miligram
MRS	: Deman, Rogosa ve Sharpe.
NAD ⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
OD	: Optik Dansite
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
pH	: Hidrojenin Gücü
PZR	: Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
Ss	: Standart Sapma
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
Mg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre

1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB) doğada özellikle anne sütü, süt ürünleri, peynir, et, turşu, ekmekte bol miktarda bulunmakla birlikte insanların ağız boşluğunda, sindirim sisteminde ve kadın genital organlarında bulunmaktadır (Joghataei ve ark., 2019). Laktik asit bakterileri çubuk veya küresel, gram-pozitif, hareketsiz ve katalaz testi negatif olup, gelişme ortamındaki karbonu metabolize etmeleri sonucu ara ürün olarak laktik asit üretmektedirler (Ismail, Yulvizar ve ark., 2018; Abd Mutalib ve ark., 2023).

LAB, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* dahil olmak üzere çok sayıda cinse ait Gram pozitif bakterilerdir. Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı, glikopolimerlerin ve proteinlerin karmaşık bir birleşimidir. Sitoplazmik membranı çevreleyen ve teikoik asitler veya polisakkaritler gibi diğer glikopolimerlerle bulunan bir peptidoglikan (PG) kesesinden oluşur. Kısa peptidlerle çapraz bağlanan glikan iplikçiklerinden oluşan kese, sitoplazmik zarı çevreleyen kapalı, torba şeklinde bir yapı oluşturur. Büyüme ve bölünme sırasında hücre şeklini ve bütünlüğünü koruduğu için bakteri fizyolojisinde önemli bir rol oynar; ayrıca bakteri ile çevresi arasında arayüz görevi görür. Peptidoglikan belirli bir kimyasal bileşime sahiptir ve PG'nin yapısal analizi, b-1,4 bağları yoluyla bağlanan alternatif N-asetilglukosamin (glcnac) ve N-asetilmuramik asitten (murnac) yapılan glikan zincirlerinden oluşmaktadır. Peptidik zincirler, N-terminalleri aracılığıyla murnacın laktik grubuna kovalent olarak bağlanmıştır. Bu peptidik zincirler, türler arasında bileşim bakımından farklılık göstermiştir ve bakteri bütünlüğünü sağlayan hücre etrafında üç boyutlu bir yapı oluşturan bir veya daha fazla amino asidin kısa zincirleri aracılığıyla doğrudan veya dolaylı olarak çapraz bağlanabilmektedir. LAB'de kök peptidin amino asit dizisi L-Ala-g-D-Glu-X-D-Ala iken, üçüncü amino asit (X) bir di-amino asit oluşmaktadır. Çoğu zaman L-Lys'dir (örn., *L. lactis* ve çoğu *lactobacilli*'de) ama aynı zamanda mezodiaminopimelik asit (mdap) (örn. *L. plantarum*'da) veya Lornithine (örn. *L. fermentum*'da) olabilir. LAB arasında, D-Ala yeni sentezlenen PG'de beşinci konumda baskındır; bununla birlikte, D-Lac kalıntıları *L. casei* ve *L. plantarum* gibi doğal olarak vankomisine dirençli laktobasillerde bulunmaktadır. Komşu kök peptitleri arasındaki çapraz bağlanma, bir peptit zincirinin dördüncü pozisyonundaki D-Ala ile başka bir zincirin üçüncü pozisyonundaki di-amino asit (4-3 çapraz bağ) arasında gerçekleşmektedir (Chapot-Chartier ve Kulakauskas, 2014).

LAB bakterileri, laktik asit, organik asitler, diasetil, hidrojen peroksit, bakteriyosinler veya bakterisidal gibi maddeler salgılayarak insan ve hayvan vücudundaki mantar, bakteri ve viral hastalıklarla mücadele edebilmektedir. Karbonhidratları fermente ederek mikroorganizmaları etkileyen ve ayrıca yağ dokusunda tahribat oluşturarak mikroorganizmalarla mücadele eden, anti-enflamatuar sitokin üreten bir yüzey aktif madde özelliği taşımaktadır (Thakur ve ark., 2023; Wang ve ark., 2023; Yusuf ve Hamid 2013). LAB ürettiği maddeler biyokoruyucu olarak sayılmakta ve fermente gıdaların muhafazasında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Okoye ve ark., 2023).

LAB içeren fermente maddelerin bağırsaktaki mikroorganizmalara, gastrointestinal sistemin sağlığına ve sindirim sürecine olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir (Katina ve ark., 2023).

Eski çağlardan bu yana gıdaları, hayvansal ürünleri, meyve ve sebzeleri uzun süre muhafaza etmek ve tüketilene kadar saklamak için yöre halkı ilkel, basit ve ev yapımı olan fermentasyon işlemine yönelmiştir. Sütün lor ve peynire, etin pastırmaya dönüştürülmesi, meyve ve sebzelerin muhafaza edilebilir turşu haline getirilmesi fermentasyonun yaygın örneklerindendir. Tayland gibi bazı ülkelerde peynir, et, turşu gibi yüzden fazla geleneksel fermente gıda çeşidi bulunur ve fermentasyon deneyimi nesilden nesile günümüze kadar aktarılmaya devam etmektedir. Günümüzde insanlar koruyucu madde içermeyen sağlıklı, doğal gıda kaynağı olan ve sindirim sorunları için iyileştirici ürünler olarak bilinen geleneksel fermente gıdalara yönelmektedir (Petchkongkaew ve ark., 2023).

Fermente gıdalarda bulunan bakteriler sağlık sorunlarını gideren, sindirim sisteminde sindirilmeyen maddeleri tüketerek enfeksiyon ve enfeksiyonlara neden olan bakterilerle mücadele etmektedirler (Mohan Keerthivasan ve ark., 2023). Bazı bilim insanları gastrointestinal sistemin desteklenmesi sürecinde laktik asit bakterilerinin etkisini görmek ve daha etkili hale getirmek amacıyla insan vücudundaki biyolojik olarak parçalanmış polimerlere yükleme işlemi gerçekleştirmiştir. Aynı zamanda bağırsak florasında kalıcı olarak bulunmaları için probiyotikleri aşamalı olarak serbest bırakmanın toksik etki göstermediği de belirtmişlerdir (Liu ve ark., 2023). Probiyotikler, konakçıda belirli miktar ve konsantrasyonlarda bulunarak ürettiği metabolitlerle vücut sisteminin sağlıklı çalışmasını sağlayan mikroorganizmalardır. Probiyotikler adezyon ve beslenme için patojenlerle rekabet eden farklı etki mekanizması ile karakterize edilmiştir. Ayrıca sindirim sisteminde özellikle sindirim kanalında anti-patojen metabolitler üretebilmektedirler (Aydın, 2023; Vasudha ve ark., 2023).

Anne sütündeki yararlı bakteriler ile probiyotikler ilgili çalışmalar yapılmadan önce sütün steril bir sıvı olduğu ve izole edilen mikroorganizmaların kontaminasyonlardan kaynaklandığı düşünülmekteydi (Hernández ve ark., 2023). Anne sütünün mikrobiyolojik bileşiminin, coğrafi yerleşim, annenin kilosu, beslenme şekli ve günlük besinleri yeme alışkanlıkları gibi bazı faktörlere bağlı olarak kadından kadına farklılık gösterebilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, anne sütü ile beslenen çocukların hazır süt kullanan çocuklara göre hastalıklara karşı daha dirençli olduğu tespit edilmiştir (Hou ve ark., 2023).

Anne sütünde bulunan koruyucu etkinin antimikrobiyal etkiye dayandığı belirlenmiştir. LAB bakterilerinin şekerleri fermente ederek organik asit üretmesi, bu da çevresel pH'ı düşürerek asidik koşulları tolere edemeyen bazı patojenik bakterilerin yaşamasını engellemesi bu antimikrobiyal etkinin nedenlerindendir (Gabriele ve ark., 2017). Ayrıca LAB bakterileri tarafından üretilen organik asidin hücre zarına nüfuz ederek gram-negatif bakterileri inhibe edebildiği, böylece işlevlerini etkileyerek, sitoplazmayı asitleştirerek ve aside duyarlı enzimleri inhibe edebildiği belirlenmiştir. LAB bakterileri, *E. coli* ve *S. aureus* gibi bazı gıda kaynaklı patojenlerin ve zararlı bakterilerin

büyümesini engelleyen bir polipeptit olan bakteriyosin de üretebilmektedir (Wang ve ark., 2021). Tibet sığırlarının dışkılarından izole edilen *Lactobacillus* suşlarının Ent P2 geni (enterosin P benzeri bakteriyosin) içerdiği ve geniş bir inhibitör spektruma sahip olduğu belirlenmiş olup patojenik bakterilere karşı antagonizma gösterdiği tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2018).

Bakteriler doğada, serbestçe yüzen planktonik bakteriler ya da biyofilm oluşturan mikroorganizmaların hareketsiz kolonileri olarak iki şekilde bulunabilirler (Salas-Jara ve ark., 2016). Biyofilm oluşumu ve bakterilerin yüzeylere bağlanma düzeyi; ortamın pH' sı ve sıcaklığı, bakteri türü ve hücre duvarının yapısı, bakteri sayısı, bağlandığı yüzeyin özellikleri, hücre hareketliliği, ortamdaki besin maddelerin içeriği ve miktarı, iyon konsantrasyonu gibi birçok faktöre bağlı olarak değişebilmektedir (Simões ve ark., 2010). Biyofilm yapıları ile bakteriler; nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerden ve immün sistem bileşenlerinin fagositosundan kendilerini koruyarak avantaj sağlamış olurlar (Donlan ve Costerton, 2002).

Biyofilmlerdeki mikroorganizmalar, antibiyotiklere ve biyositlere karşı 1000 kat daha dirençlidir (Robert ve ark., 2010). Ayrıca biyofilm matrisi polimerik maddelerden oluşur ve antibiyotik difüzyon yeteneğini bozabilir, böylece mikroorganizma virülans kabiliyetine katkıda bulunur. *Aeromonas*, halk sağlığı için tehlikesi olarak kabul edilen (Elhariry, 2011) ve farklı yüzeylerde biyofilm oluşturan yapışma yeteneğine sahip bir bakteridir (Odeyemi ve Ahmad, 2017). *Lactobacillus* spp. gibi probiyotik bakteriler tarafından biyofilm oluşumu, patojenik bakterilerin kolonizasyonunu önleyebilmektedir. Ayrıca bazı biyofilm oluşturan suşlar tarafından üretilen EPS (ekstraselüler polimerik maddeler)'nin, bazı patojenik bakteriler tarafından biyofilm oluşumunu engelleyebildiği de tespit edilmiştir (Salas-Jara ve ark., 2016). Laktik asit bakterilerinin biyofilmlerinin oluşumu ve sindirim sistemi sağlığına olan faydaları, probiyotik takviyelerin ve fermente gıdaların kullanımıyla desteklenir. Bu ürünler, sağlıklı bir bağırsak mikrobiyotası oluşturarak sindirim sistemi sağlığını korumaya yardımcı olabilmektedir (İlhan ve ark., 2009).

Son on yılda DNA dizileme teknikleri, reaksiyon başına maliyet ve kullanıcı kolaylığı açısından önemli ilerlemeler kaydetmiştir. Bununla birlikte, fenotipik araçlar, daha önce tanımlanmamış laktik asit bakterisi (LAB) türlerinin ilk sınıflandırılmasında önemlidir. Fenotipik araçlar, bir organizmanın gözlemlenebilir özelliklerini temel alır. Bu özellikler arasında morfoloji (şekil, büyüklük), fizyoloji (metabolik aktivite), biyokimya (enzim aktivitesi), büyüme özellikleri (optimal sıcaklık, pH aralığı) gibi faktörler yer alır. Bu araçlar, belirli bir LAB türünün kimliğini belirlemek ve sınıflandırmak için kullanılmıştır. Özellikle daha önce tanımlanmamış LAB türlerinin ilk sınıflandırılmasında, fenotipik araçlar önemlidir. Bu araçlar, DNA dizileme gibi moleküler tekniklerin maliyetli veya karmaşık olduğu durumlarda kullanılabilir. Fenotipik araçlar, laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan basit ve hızlı testler veya kültür bazlı yöntemlerdir. DNA dizileme teknikleri, daha sonra daha ayrıntılı bir analiz için kullanılabilir ve LAB türlerinin daha kesin bir tanımı ve sınıflandırılması için önemli bir araçtır. Ancak, fenotipik araçlar, başlangıçta tanımlanmamış LAB türlerini sınıflandırmak için hala önemlidir ve moleküler tekniklerle birlikte

kullanıldığında daha kapsamlı bir sonuç elde etmek için birlikte kullanılabilir (Sharma ve ark., 2020). Laktik asit bakterileri, düşük guanin artı sitozin DNA içeriğine sahip Gram-pozitif bakterilere aittir. *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinsleri, morfolojik ve fizyolojik özelliklere dayanarak geleneksel olarak ayrılabilmelerine rağmen filogenetik olarak karışık durumdadırlar. *Streptococcus* cinsi, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* ve *Vagococcus* olmak üzere dört cins olarak ayrılmıştır. Laktik asit bakterilerinin geleneksel fenotipik tanımlaması oldukça zahmetli ve her zaman güvenilir değildir. Nükleik asit probu teknolojisi, daha hızlı ve daha güvenilir bir ayırım için bir alternatif olabilir. 16S veya 23S rRNA hedefli oligonükleotidler, LAB'nin spesifik tanımlanması için kullanılmıştır. Bu oligonükleotidler, LAB'yi diğer bakteri türlerinden ayırt etmek için kullanılan belirli genetik bölgelere bağlanır. Bu teknik, hızlı ve güvenilir bir tanı sağlayabilir ve LAB'nin tür düzeyinde ayırımını yapabilmektedir (Schleifer ve ark., 1995)

Bu çalışmada laktik asit bakterilerinin ev yapımı turşulardan, anne sütünden ve bebek dışkılarından izole edilerek saflaştırılması ve daha sonra 16S rRNA dizileri kullanılarak moleküler tekniklerle identifikasyonun yapılması, elde edilen izolatların bazı patojenlere karşı inhibisyon etkisinin, biyofilm oluşturma potansiyellerinin, antibiyotik direncinin belirlenmesi ile hücre dışı enzim üretim aktivite tespitinin yapılması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Salminen (2004) laktik asit bakterilerini gram pozitif, spor oluşturmeyen, katalaz negatif, genellikle hareketsiz ve mikroskop altında basil ve kok şeklinde tanımlanmıştır. Sitokromları ve porfirinleri (solunum zincirlerinin bileşenleri) sentezleme yeteneklerinden yoksundurlar ve bu nedenle bir proton gradyanı oluşturarak ATP oluşturmadıkları bildirmiştir.

Smith ve ark., (2005) yaptıkları çalışmada izole ettikleri laktik asit bakterilerinin (LAB) patojen bakterilerin büyümesini engelleme özelliğine sahip maddeler üretme yeteneğine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Dört LAB 58C'de kıymada streptomisine dirençli *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* kokteyl karışımını inhibe edip etmediğini araştırmışlardır. LAB izolatlarını 10^7 kob/ml'de 10^5 kob/ml patojen konsantrasyonu içeren triptik soya brotha ilave etmişlerdir. Örnekler 58 °C' de saklanmış ve patojen popülasyonlarını 0, 4, 8 ve 12. günlerde belirlenmiştir. 4 günlük depolamadan sonra, LAB izolatları NP 35 ve NP 3'e maruz kalan her iki patojenin sayısında önemli farklılıklar olduğunu belirlemişlerdir. 8 ve 12 günlük depolamadan sonra, tüm LAB her iki patojenin popülasyonunu ortalama 3 ila 5 log döngü azaldığını saptamışlardır. Laktik asit bakterilerinin etkisini incelemek için vakumla paketlenmiş taze kıymada yaptıkları çalışmada her bir LAB izolatı, 12 günlük depolama sonrasında *E. coli* O157: H7'de ortalama 1,5 log döngüsü farklılığa yol açmış ve *Salmonella* popülasyonları ortalama 3 log döngüsü azalttığını tespit etmişlerdir. 4 adet LAB'den karışık konsantre bir kültür hazırlayarak 10^8 kob/g patojen ile inoküle edilen kıymada 3 günlük depolamadan sonra, karışık kültür *E. coli* O157: H7'de kontrole kıyasla 2.0 log azalma sağlarken, 5 günlük depolamadan sonra 3 log azalma olduğunu belirlemişlerdir. *Salmonella* 5. günden sonra tespit edilemeyecek seviyelere düştüğünü kaydetmişlerdir. LAB'nin kıymanın duyu kalitesi üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi olmadığını belirtmişlerdir.

Al-Allaf ve ark., (2009) tarafından yapılan çalışmada kıymadan LAB'nin izolasyonu ve tanılmasını yapmışlardır. İzolatların, gram pozitif ve gram negatif patojenik bakterilerine (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus*) karşı antimikrobiyal aktivite etkisini agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak belirlemişlerdir. LAB'nin oluşturduğu zon çapı 0,6 ila 4 mm arasında saptanmış olup patojen bakterilere karşı inhibisyon etkisi gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Albesharat ve ark., (2011) yaptıkları çalışmada 70 farklı örnekten (15 bebek ve 15 yetişkin, 15 anne sütü ve 25 fermente gıda) bakteri izole etmişlerdir. Sağlıklı kadınların anne sütünde, anne ve bebek dışkısında ve fermente gıda örneklerinde LAB'nin varlığını genotipik düzeyde araştırmışlardır. Otuz altı farklı tür (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* ve *Pediococcus*) tespit edilmiştir. Bazı türler tek bir kaynağa özgü iken *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Lactobacillus brevis* türleri tüm kaynaklarda bulunmuştur. Annelerin dışkısında, sütünde ve bebeklerinin dışkısında *L. plantarum*, *L. fermentum*,

L. brevis, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* ve *P. pentosaceus*'un aynı RAPD genotipleri bulunmuştur.

Daoudou ve ark., (2011) tarafından yapılan çalışmada, on beş suş izole edilerek karakterizasyonu yapılmıştır. Tüm LAB izolatların *E. faecalis*, *E. coli*, *Salmonella arizonae*, *Enterococcus avium* ve *Enterococcus casseliflavus*'a karşı antimikrobiyal aktivite sağladığını belirlenmiştir. İzolatların trimetoprim, sefiksime ve eritromisine dirençli, kloramfenikol, amoksisilin/klavulanik asit ve tetrasiklin'e duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada enteropatojenik bakterilere karşı sağlıklı tavuk bağırsağından antibakteriyel bileşikler üretebilen LAB izole edilmiştir.

Martín ve ark., (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, anne sütünün bebeğin bağırsağında potansiyel bir bakteri kaynağı olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, anne sütü ve bebek dışkı örneklerinde aynı spesifik *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ve *Staphylococcus* bakteri suşlarının varlığını tespit etmişlerdir. Anne sütü ve bebek dışkısından 20 anne-bebek çiftinden izole edilen bakterilerin kimliği suş düzeyinde belirlenmiştir. *Staphylococcus*, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* DNA'sı analiz edilen örneklerin neredeyse tamamı qrti-PCR ile tespit edilmiştir. Bu örnekler farklı agar besiyerlerinde kültüre alınmıştır. Her morfolojiyi temsil eden bir koloni seçilmiş ve klasik testler ile moleküler teknikler birleştirilerek tür düzeyinde tanımlanmıştır.

Ambalam ve ark., 2012 tarafından yapılan çalışmada, *Lactobacillus*'tan 17 suşa Kongo kırmızısı bağlama testi yapılmıştır. Kongo kırmızısı bağlanması testinde besiyeri olarak KK-MRS agar (%0,01 Kongo kırmızısı içeren MRS) kullanılmışlardır. İzolatları KK-MRS agar üzerine ekerek 37 °C'de 72 saat inkübe etmişlerdir. KK'ye bağlanan hücreler KK-MRS agarda yoğun kırmızı koloniler oluşturduğunu KKB olmayan hücrelerin renksiz koloniler oluşturduğunu belirtmişlerdir. İki otoagresyon oluşturan izolatın, *L. Crispatus* 12005 ve *L. paracasei* F8, safra veya müsinde bağımsız olarak biyofilm geliştirdiğini tespit etmişlerdir. Erken (24 saatlik kültürler) biyofilm oluşumunun hidrofobik hücre yüzeyi proteinlerinde artış ve yüksek kongo kırmızı bağlama özelliği ile ilgili olduğunu, geç olgunlaşan (72 saatlik kültür) biyofilmin ise daha fazla karbonhidrat içeriğinden olduğunu belirtmişlerdir.

Moraes ve ark., (2013) tarafından yapılan çalışmada, yirmi dokuz laktik asit bakterisi Biolog, API50CHL, 16S rDNA dizilimi ve türe özgü PZR (Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu) kullanılarak tanımlanmıştır. Tanılama sonuçları karşılaştırıldığında, uygun LAB tanılaması için polifazik bir yaklaşımın gerekli olduğu ve moleküler analizlerin en güvenilir olduğunu belirlenmiştir.

Chapot-Chartier ve Kulakauskas, (2014) Gram pozitif bakteriler arasında genel yapılar ve biyosentez yolları korunmasına rağmen, çalışmalar LAB hücre duvarlarının benzersiz özellikler gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Hücre duvarı biyosentezinde, modifikasyonunda ve bozunma yollarında yer alan genler tanımlanmış olup, bu genlerin bakteriyel fizyolojideki rolünü araştırmak için kullanılabilecek mutantların yapımına olanak sağlamıştır. PGH (peptidoglikan hidrolaz aktivitesini) ve bakteriyel otolizi kontrol eden moleküler mekanizmaların şifresinin çözülmesi, hücre

duvarı proteinlerinin bakteri yüzeyine bağlanması, bakteriyofajların hedef bakteri yüzeyine adsorpsiyonu ve probiyotik bakteriler ile probiyotik bakteriler arasındaki çapraz iletişim konusunda ilerleme kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar, LAB hücre duvarı yapısı ve fonksiyonunu daha fazla araştırılmıştır. PG (peptidoglikan)'ın yeni yapısal modifikasyonları, ilgili genlerle birlikte tespit edilmiştir. Ayrıca PGH'lerin O-glikosilasyonu LAB'de rapor edilmiştir ve *L. plantarum*'un olarak majör otolizini Acm2'nin PG-hidrolize edici aktivitesini modüle ettiği bulunmuştur. Buna ek atomik kuvvet mikroskobu (AFM) görüntülemesinin nano ölçekte bakteriyel yüzey mimarisini keşfetmeye yönelik güçlü bir teknik olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, probiyotik bakterilerde bulunan aktif bileşiklerin tanımlanması, örneğin inflamatuvar bağırsak hastalıklarında olduğu gibi hastalık tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yol açmıştır.

Daba ve ark., (2015) tarafından yapılan çalışmada, çiğ süttten on iki bakteriyosin üreten laktik asit bakterisi örneğini izole etmişlerdir. Süt izolatlarından beşinin *Staphylococcus*, *Bacillus* ve test edilen tüm *Listeria monocytogenes* suşlarına karşı etkili inhibitör aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca iki bakteriyosinjenik izolatın *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* dahil olmak üzere Gram-negatif bakterilere karşı etkili olduğunu belirlemişlerdir. Sıvı ortamda yapılan testlerde, 4°C'de 14 günlük bir depolama süresi boyunca bakteriyosin varlığında *Listeria* üremesinde 3 log'luk bir azalmaya neden olduğunu saptamışlardır.

Jalilsood ve ark., (2015) tarafından yapılan çalışmada, *Pandanus amaryllifolius*'dan *Lactobacillus plantarum* PA21 türünü izole etmişlerdir. Bu izolatın çeşitli bozulmalara ve patojenik bakterilere karşı önleyici etki sağlayacak güçlü biyofilm oluşturma yeteneğinde olduğunu tespit etmişlerdir.

Sáez ve ark., (2018) Arjantin şehrinde pazarlanan 31 adet fermente süt ve sebze gıdasını turşu üretimi için LAB kaynağı olarak seçmişlerdir. *Lactobacillus* suşu olarak tanımlanan altmış dört izolat, fermente gıdaların üretimi için ilgili teknolojik özellikler açısından taranmıştır. *L. plantarum* CRL2162 ve *L. rhamnosus* CRL2164'ün *E. coli* ve *Listeria innocua*'ya karşı yüksek büyüme ve inhibitör aktivite ile en iyi performansı gösterdiğini tespit etmişlerdir. Seçilen suşlar arasında karışık kültürlerde kullanımlarını engelleyecek belirgin bir antagonizma görülmediğini, bu suşların yüksek kalitede standardize edilmiş fermente sebze ürünleri elde etmek için starter kültür olarak potansiyel olabileceğini belirlemişlerdir.

Muruzović ve ark., (2018) tarafından yapılan diğer çalışmada farklı sıcaklık, pH, farklı tuz, glikoz ve laktoz konsantrasyonlarının *Enterococcus hirae* KGPMF9, *Streptococcus uberis* KGPMF2, *Lactococcus lactis subsp. lactis* KGPMF23 and *Lactobacillus fermentum* KGPMF29 planktonik büyüme, biyofilm oluşumu ve oluşan biyofilmi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. *L. fermentum* KGPMF29'un planktonik büyümenin ve biyofilm oluşturma yeteneğinin, asidik ortamda ve farklı glikoz ve laktoz konsantrasyonlarının varlığında uyarıldığını, *E. hirae* KGPMF9'un planktonik büyümesinin asidik ortamda uyarıldığını ve biyofilm oluşumunun test edilen tüm pH ortamlarında sınırlandırıldığını tespit etmişlerdir. Glikoz ve laktoz, *E. hirae* KGPMF9'un planktonik

büyümesi ve biyofilm oluşumu üzerinde herhangi bir etki göstermediğini veya zayıf bir etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu sonuçların, çevresel faktörlerin peynirdeki laktik asit bakterilerinin büyümesi ve gelişimi üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağını belirtmişlerdir.

Haney ve ark., (2018) tarafından yapılan çalışmada, peptitlerin, gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerden oluşan biyofilmleri engelleme ve yok etme yeteneği üzerine etkisini araştırmışlardır. Biyofilmlerin metabolik aktivitesini değerlendirmek için tetrazolyum klorür boyasının yanı sıra yapışan biyofilm biyokütlesini ölçmek için kristal viyole boyama yöntemi kullanmışlardır. Bu boyalar kullanılarak oluşturulan ortam bileşiminin biyofilm tespit yöntemlerinin okumaları üzerindeki etkisini, iki *P. aeruginosa* suşuna (PAO1 ve PA14) ve ayrıca metisiline dirençli bir *S. aureus* suşuna karşı değerlendirmişlerdir. Ortam bileşiminin, bu boya bazlı yöntemlerle elde edilen boyama modellerini önemli ölçüde değiştirdiğini tespit etmişlerdir.

Alang ve ark., (2019) tarafından yapılan çalışmada, LAB'nin sütteki antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. LAB izolatlarının antibakteriyel aktivitesini değerlendirmesinde kuyu difüzyon yöntemi kullanılmışlardır. Sonuç olarak, 14 LAB izolatı arasında hücresiz süpernatantın EPEC'e karşı en güçlü antibakteriyel aktivitesinin K1B, *S. aureus* K4A2 ve *Salmonella typhi*'nin K5B2 olduğunu belirlemişlerdir. 16S rDNA dizisine göre K1B, K4A2 ve K5B2 izolatlarını sırasıyla %99,758, %100 ve %99,759 benzerlikle *Enterococcus faecalis* ATCC19433T olarak tanılamışlardır. K1B, K4A2 ve K5B2 izolatının patojen büyümesini inhibe ettiğini saptamışlardır.

Toe ve ark., (2019) tarafından yapılan çalışmada, Malezya'da gıdalardan izole edilen sekiz LAB'nin hücre dışı proteolitik aktiviteleri ve amino asit üretme yetenekleri açısından incelemişlerdir. Çalışılan tüm LAB asidik ve alkali pH koşulları altında çok yönlü hücre dışı proteolitik aktiviteler sergilemiştir. İzolatlardan *Pediococcus pentosaceus* UP-2, aspartat, lizin, metiyonin, treonin, izolösin, glutamat, prolin, alanin, valin, lösin dahil olmak üzere 15 AA'yı hücre dışı olarak üretmek için en yüksek aminoasit üretme yeteneği gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Husain ve ark., (2020) tarafından yapılan çalışmada, evcil tavuklardan elde edilen LAB'ın antimikrobiyal potansiyelini araştırmışlardır. Araştırmacılar, elde edilen izotların, *E. coli* ve *S. aureus* gibi patojenik bakterilere karşı inhibitör aktivitelerini kuyu difüzyon yöntemi kullanarak araştırmışlardır. *B. subtilis* PATA-5 suşunun doğal antibiyotik siklik lipopeptitler, yani sürfaktin üretebildiğini tespit etmişlerdir.

Morifuji ve ark., (2020) tarafından yapılan çalışmada, LAB tarafından fermente edilen sütün insanlarda ve sıçanlarda diyetdeki karotenoid biyoyararlanımını nasıl etkilediğini değerlendirmeyi ve *Lactobacilli* tarafından fermente edilen sütteki aktif bileşenlerin diyetdeki karotenoid emilimini arttırdığı mekanizmaları araştırmayı amaçlanmıştır. Erkek sıçanlara (n = 8/grup) β -karoten veya β -karoten + fermente süt uygulandı. Sıçanlar (n = 6/grup) aynı zamanda β -karoten taşıma mekanizmalarını araştırmak için bir kolesterol emilim inhibitörü olan ezetimib ile ön işleme tabi tutulmuştur. İnsanlarda randomize çapraz geçiş yöntemi kullanılarak 3 çalışma gerçekleştirilmiştir. Denekler (n = 16/çalışma) sebze (havuç, domates veya ıspanak) içeceklerini tek başına veya fermente

sütlü içeceklerle birlikte tükettiler. Tüketildikten sonra çeşitli zaman noktalarında kan örnekleri toplanmıştır. Sıçanlarda, konsantrasyon-zaman eğrisi (AUC) altındaki serum β -karoten alanının, β -karoten + fermente süt için, yalnızca β -karoten için olduğundan önemli ölçüde daha yüksek olduğunu gösterdi. Fermente sütün ekzopolisakkarit (EPS) içeriği ile serum β -karoten AUC'si arasında anlamlı bir korelasyon ($r = 0.83$, $p < 0.001$) gözlenmiştir. İnsanlarda, plazma triasilgliserolden zengin lipoprotein (TRL) fraksiyonundaki β -karoten için konsantrasyon-zaman eğrisi altındaki artımlı alan (iAUC), havuç + fermente süt olduğunda önemli ölçüde (1,8 kat, aralık: 0,6-3,9) daha yüksek olarak kaydedilmiştir. tek başına havuç içeceğine kıyasla tüketilmiştir. Yalnızca domates içeceği tüketen deneklerle karşılaştırıldığında, domates + fermente süt tüketen deneklerde plazma TRL fraksiyonunda likopen için önemli ölçüde (6,5 kat, aralık: 0,04-7,7) daha yüksek iAUC gözlenmiştir. Ispanak + fermente süt tüketiminden sonra tüm fraksiyonlarda plazma luteinde önemli bir artış gözlenmiştir, ancak tek başına ıspanak içeceği ile bu durum gözlemlenmemiştir. β -karoten ve fermente sütün birlikte tüketilmesinin insanlarda ve sıçanlarda diyetdeki β -karoten biyoyararlanımını önemli ölçüde arttırdığını belirtmişlerdir.

As ve ark., (2020) yalnızca anne sütüyle beslenen bebek dışkısından laktik asit bakterisinin özelliklerini izole etmişlerdir. Elde edilen izolatın, gram-pozitif fakültatif anaerobik katalaz negatif, oksidaz negatif hareketli ekzopolisakkarit üreten kokobasil olduğunu, 37 °C ve pH 8'de optimum ürediğini tespit etmişlerdir. 16SrRNA kısmi dizilimi ile genotipik tanılama, türü *Weissella confusa* olarak tanımlanmışlardır. Antibiyogram çalışmasında izolatın Amoxycillin, Ampicillin, Bacitracin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Co-Trimoxazole ve Vancomycin'e dirençli olduğunu ve çoklu antibiyotik direnç indeksinin 0.7 olduğunu tespit etmişlerdir.

Abdullah ve ark., (2022) Batı Sumatra'ya özgü geleneksel fermente bir yemek olan dadiahta bulunan ve probiyotik potansiyeli olan LAB'ni hem geleneksel olarak hem de moleküler yöntemlerle tanımlanmışlardır. LAB'nin tanımlanmasında 16S rRNA geni kullanılarak yapılan PZR sonucu izolatın 1419 bp'lik baz uzunluğunda olduğunu, filogenetik analizden Limapuluh Kota Regency dadiah'ından izolae edilen LAB'nin *Lactobacillus plantarum*'a akraba olduğu tespit etmişlerdir.

Speranza ve ark., (2020) tarafından yapılan çalışmada farklı yüzeylere (örn. ambalaj malzemeleri, seramik, plastik, kâğıt, polimerler vb.) yapışabilen probiyotik bakterilerin, endüstriyel uygulamalar için yeni biyoteknolojik çözümler olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırmışlardır. Patojenik ve bozulmaya neden olan bakterilerin büyümesini biyolojik olarak kontrol ederek belirlemişlerdir. Sonuçlar, biyofilm varlığında ($6,5-7 \log \text{ kob/cm}^2$) patojenik hücre yüklerinin, yokluğunda gözlemlenenlere kıyasla her zaman daha düşük olduğunu ve *E. coli* O157:H7 için önemli bir azalma ($>1-2$ logaritmik döngü) gösterdiğini tespit etmişlerdir. *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* ve *Salmonella enterica* için hücre yükündeki azalmalar 0,5 ile 1,5 logaritmik döngü arasında değiştiğini saptamışlardır. Aktif ambalaj olarak test edildiğinde biyofilm polipropilen, polivinil klorür, yağlı kâğıt, polietilen ve seramik üzerinde başarıyla oluştuğunu belirlemişlerdir. Yumuşak peynirlerde mikroorganizmaların büyümesi kontrol edildiğinde,

biyofilmin, *L. monocytogenes*'in 15 °C'deki mikrobiyolojik stabilitesini 3 ve 4 günden fazla uzatarak büyümesini yavaşlatmadaki etkinliğinin olduğunu tespit etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre geliştirilen probiyotik LAB biyofilminin patojenik ve gıda bozucu bakterilere karşı biyokontrol ajanı olarak kullanılma potansiyelinin iyi olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Akoğlu (2020), tarafından yapılan çalışmada, Türkiye'deki yerel bir peynirden olan (6) laktik asit bakteri suşu (*Enterococcus durans* EC4, *Enterococcus lactis* EC61, *E. faecalis* EC41, *Enterococcus faecium* EC63, *L. garvieae* LC61, *L. lactis* LC62) izole edilerek izole edilen laktik asit bakterilerinin (LAB) planktonik büyümesi ve biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkili çevresel koşullar (farklı sıcaklık, pH, tuz, glikoz konsantrasyonu ve laktoz konsantrasyonları) araştırılmıştır. Ede edilen sonuçlara göre araştırmacılar *Enterococcus lactis* EC61 ve *E. faecalis* EC41'in değişen çevresel koşullara en dirençli bakteriler olduğu ve 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0 ph değerlerinde; %4 ve %6.5 tuz konsantrasyonlarında; %0,5 glukoz konsantrasyonunda; %0.5, %1.5 ve %2.5 laktoz konsantrasyonlarında planktonik üremelerini sürdürebildiklerini tespit etmişlerdir. Tüm suşların biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu ve özellikle *Enterococcus lactis* EC61 ve *E. faecalis* EC41 suşlarının biyofilm oluşumunun, asidik pH'da ve artan glukoz ve laktoz konsantrasyonlarında önemli ölçüde arttığını, artan tuz konsantrasyonunda ise önemli ölçüde azaldığını belerlemişlerdir.

Tatsaporn ve Kornkanok, (2020) yaptıkları çalışmada, fermente tavuk ve balıktan izole edilen LAB'nin patojenik mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilm oluşumunu önlemek önlemede etkisini incelemişlerdir. İzole laktik asit bakterilerin, fizyolojik özelliklerini, gıda kaynaklı patojenlerin planktonik ve biyofilmine karşı %0,5-1,3 w/v nisin içeren ham süpernatantın antimikrobiyal aktivitesini, test edilen tüm patojenlerle otoaggregasyon, koaggregasyon ile biyofilm oluşturma yeteneğini, asit ile safra tuzu koşullarında bakteriyel hayatta kalmasını, hemolitik aktivite ve antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonunu araştırmışlardır. Tüm LAB'nin koaggregasyon prosesi yoluyla test edilen tüm patojenlerin biyofilm oluşumunu önlemek için biyofilm geliştirebildiklerini belirlemişlerdir. Ayrıca izolatların, safra tuzuna % 6-8 oranında tolerans gösterdiklerini düşük pH'a kısmen dirençli olduklarını, hemolizin negatif ve Avrupa standartlarının izin verdiği düzeyde antibiyotik duyarlılığına sahip olduklarını tespit etmişlerdir.

Hajwal (2023), tarafından yapılan bir çalışmada, altı aylıktan küçük on iki bebek, 1 Nisan 2021 ile 1 Ekim 2022 tarihleri arasında Irak'ın Ramadi kentindeki Kadın ve Çocuk Hastanesi'nden örneklenmiştir. Bebekler anne sütü ve biberon sütü ile beslenenler olarak iki ana gruba ayrılmıştır. Dışkı örnekleri toplanarak *Lactobacillus* türleri izole edilmiştir. *Staphylococcus*, *Klebsiella* ve *Pseudomonas* bakterilerine karşı izolatlardan hazırlanan ekstraktların ve Amoxicillin, Amikacin ve Cefixime antibiyotiklerinin inhibisyon etkisini araştırmışlardır. Analiz sonuçlarına göre, Cefixime ile *Lactobacillus* türü ekstraktının diğer tüm tedavi türlerine kıyasla önemli ölçüde en yüksek ortalama inhibisyon çapına sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, anne sütüyle beslenen bebeklerin, biberonla beslenen gruba kıyasla tedaviye önemli ölçüde daha iyi yanıt verdiğini saptamışlardır.

Duche ve ark., (2023) tarafından yapılan çalışmada, potansiyel probiyotik LAB suşları fenotipik ve genotipik antibiyotik direnç profilleri açısından incelenmiştir. Yöntemler farklı antibiyotiklere karşı duyarlılık Kirby Bauer standart disk difüzyon protokolü ile test edilmiştir. Menřei ne olursa olsun, LAB suşları sefalosporinlere, aminoglikozitlere, kinolonlara, glikopeptitlere ve birkaç istisna dışında beta-laktamlar arasında metisiline karşı belirgin fenotipik direnç gösterirken, beta-laktamların bir alt grubu olan makrolidlere, sülfonamidlere ve karbapenemlere karşı bazı varyasyonlarla birlikte yüksek duyarlılık gösterdiğini tespit etmişlerdir.





3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan *Lactobacillus* suşları farklı kaynaklardan (anne sütü, bebek feçesi ve ev yapımı turşu) izole edilmiştir.

3.1.1. Bakterilerin Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri

MRS Agar

Bileşimi	Miktar (g/l)
Bakteriyolojik agar	10
Bakteriyolojik pepton	10
Dekstroz	20
Dipotasyum fosfat	2
Magnezyum sülfat	0,2
Manganaz sülfat	0,05
Et ekstraktı	8
Sodyum asetat	5
Tween 80	1
Maya özü	4
Amonyum sitrat	2

MRS katı besiyerlerine L-sistein (% 0,05 w/v) ve kalsiyum karbonat (% 0,05 w/v) eklenip çözülmüştür. Otoklavda 121 °C’de, 1,2 atm’de 15 dk steril edilmiştir. Kullanılncaya kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

MRS Broth

Bileşimi	Miktar (g/l)
Kazeinden elde edilen pepton	10,0
Et ekstresi	8,0
Maya ekstresi	4,0
D(+)-glikoz	20,0
Dipotasyum hidrojen fosfat	2,0
Tween® 80	1,0
Di-amonyum hidrojen sitrat	2,0
Sodyum asetat	5,0
Magnezyum sülfat	0,2
Manganez sülfat	0,04

MRS sıvı besiyelerine L-sistein (%0,05 w/v) eklenip çözülmüştür. Otoklavda 121 °C’de, 1,2 atm’de 15 dk sterilize edilmiştir. Kullanılncaya kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

MRS-KK Agar

Bileşimi	Miktar (g/l)
MRS agar	62
Kongo kırmızısı	40
Coomassie brillant blue	20

Besiyeri hazırlanarak (25°C – pH 5,7 ± 0,2) otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Kullanılncaya kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

Tryptic Soy Agar (TSA)

Bileşimi	Miktar (g/l)
Pankreas kazein sindirimi *	15
Soya fasulyesi küspesinin papaik sindirimi **	5
Sodyum klorit	5
Agar	15
Dekstroz (Glikoz)	2,5
Dipotasyum hidrojen fosfat	2,5
pH 25 °C'de	7,3 ± 0,2

* Kazeinin enzimatik sindirimi, triptikaz peptonuna eşdeğerdir

** Soya fasulyesinin papaik sindirimi, fiton peptonuna eşdeğerdir.

Besiyeri hazırlanarak otoklavda 121 °C'de, 1,2 atm'de 15 dk sterilize edilmiştir. Kullanılincaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Tryptic Soy Broth (TSB)

Bileşimi	Miktar (g/l)
Pankreas kazein sindirimi	17
Soya fasulyesi küspesinin papaik sindirimi	3
Dipotasyum hidrojen fosfat	2,5
Dekstroz (Glikoz)	2,5
Sodyum klorit	5
pH 25 °C'de	7,3 ± 0,2

Besiyeri hazırlanarak otoklavda 121 °C'de, 1,2 atm'de 15 dk sterilize edilmiştir. Kullanılincaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

MRS ve Nişasta (% 1,5)

Bileşimi	Miktar (g)
MRS Agar	18,06
Nişasta	4,5
L-sistein	0,15
Saf su	300 ml

Besiyerinin içerisinde L-sistein ve nişasta eklenip çözülmüştür. Otoklavda 121 °C'de, 1,2 atm'de 15 dk steril edilmiştir. Kullanılincaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

İyodin Solüsyonu (% 1 w/v)

Bileşimi	Miktar (g)
İyot	1
Saf su	100 ml

İyot 100 ml saf su içerisinde karıştırıcı kullanılarak çözündürülmüştür.

MRS Agar ve Tween 80 (%1)

Bileşimi	Miktar (g)
MRS Agar	18,06
Tween 80	3
L-sistein	0,15
Saf su	300 ml

MRS agar içerisine L-sistein eklendikten sonra (pH 25 °C- 6,0 ± 0,2) besiyeri otoklavda 121 °C’ de 15 dakika sterilize edilerek 45-50 °C'ye soğutulmuştur. Besiyeri içerisine 0,22 mikron millipore filtre ile steril koşullarda kademeli olarak tween 80 (%1) ilave edip (laminer akış altında) çözölmüştür. Daha sonra besiyeri petri tabaklarına dökölmüştür. Kullanılincaya kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

MRS Agar ve Yağsız Süt (%1,2)

Bileşimi	Miktar (g)
MRS Agar	18,06
Yağsız süt	3,6
L- sistein	0,15
Glucose	0,9
Saf su	300 ml

MRS Agar hazırlandıktan sonra besiyeri otoklavda 121 °C’de 5 dakika sterilize edilmiştir. MRS ortamının otoklav ile sterilizasyonunu tamamladıktan sonra, 0,22 mikron millipore filtre kullanarak steril koşullarda (laminer akış altında) kademeli olarak 50 ml yağsız süt ilave edip çözölmüştür. Kullanılincaya kadar 4 °C’de buzdolabında saklanmıştır.

MRS Agar ve Tributirin (%1)

Bileşimi	Miktar (g)
MRS Agar	18,06
Tributirin	3
L-sistein	0,15
Saf su	300 ml

Besiyeri hazırlanarak otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edildikten sonra 45-50 °C’ye soğutulmuştur. MRS ortamının otoklav ile sterilizasyonu tamamladıktan sonra, 0,22 mikron millipore filtre ile steril koşullarda kademeli olarak tributirin (%1) ilave edip (laminer akış altında) çözülmüştür. Besiyeri petri tabaklarına dökülmüştür. Kullanılncaya kadar 4 °C’de buzdolabında saklanmıştır.

MRS Agar ve %1 Karboksimetil Selüloz (CMC)

Bileşimi	Miktar (g)
MRS Agar	18,06
Karboksimetil selüloz (CMC)	3
L-sistein	0,15
Saf su	300 ml

Besiyerine karboksimetil selüloz (CMC) (%1) eklenip çözdürülmüştür. Besiyeri hazırlanarak (pH (25°C – 5,7 ± 0,2) otoklavda 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Daha sonra çözelti 45-50 °C’ye kadar soğuyunca besiyeri petri tabaklarına dökülmüştür. Kullanılncaya kadar 4 °C’de buzdolabında saklanmıştır.

MRS Agar (%1,2 Yumuşak Agar ve Glukoz %0,2)

Bileşimi	Miktar (g)
MRS Agar	18.06
Agar	3,6
L- sistein	0,15
Glikoz	0,6
Saf su	300 ml

Besiyeri hazırlanarak otoklavda 121 °C’de, 1,2 atm’de 15 dk sterilize edilmiştir. Kullanılncaya kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

TSB Broth (%0,7 Yumuşak agar ve %0,25 glikoz)

Bileşimi	Miktar (g)
TSB	6
Agar	1,4
L-sistein	0,1
Glikoz	0,5
Saf su	200 ml

Besiyeri hazırlanarak otoklavda 121 °C'de, 1,2 atm'de 15 dk sterilize edilmiştir. Kullanılncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

MRS Broth (%0,2 sakkaroz)

Bileşimi	Miktar (g)
MRS broth	15,68
Sakkaroz	0,6
Saf su	300 ml

Besiyerine sakkaroz (%0,2) eklenmiştir ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir, Besiyeri, 10 ml'lik steril kapaklı cam tüpler içerisine alınmıştır. Kullanılncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

TSB Broth (%0,25 glikoz)

Bileşimi	Miktar (g)
TSB broth	9
Glikoz	0,75
Saf su	300 ml

Besiyeri hazırlanarak otoklavda 121 °C'de, 1,2 atm'de 15 dk sterilize edilmiştir. Kullanılncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Kristal Viyole Solüsyonu (%0,1)

Bileşimi	Miktar (g)
Kristal viyole	1
Etanol	50 ml
Ultra saf su	1 L

1 g kristal viyole 50 ml etanol içinde eritilerek ve toplam hacim distile su/ultra saf su ile 1 l'ye tamamlanmıştır.

Asetik Asit, Glasiyal (%33)

Bileşimi	Miktar (g)
Asetik asit glasiyal % 99,5	33
Ultra saf su	100 ml

Asetik asit 1000 ml'e tamamlanmıştır. Daha sonra sıvı kullanıncaya kadar 100 ml'lik bir cam şişeye konulmuştur.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar, terazi (ADAM), manyetik hot plate (heidolph), pH metre – (Orion 3 star), otoklav, laminar kabin (Bio MAT) - besiyerlerini hazırlamak için kullanılmıştır. Laminar kabin (Hera), bakteri ekimi için kullanılmıştır. Buzdolabı (BEKO), inkübatör (memmert), sıcak su banyosu (GFL 1086), ABI 3500 genetik analiz cihazı, elektroforez cihazı, mikrodalga fırın, ultraviyole light, spektrofotometre (Shimadzu UV -1800), soğutmalı santrifüj (Beckman coulter avanti j-30i), santrifüj, mikroparka okuyucu ez read 400 – (biyokrom), mikroskop - floresans mikroskobu (Olympus Cx43), dijital koloni sayacı, Mcfarland standard spektrofotometre, çalkalayıcı inkübatör (innova), dijital sürmeli kumpas elektronik, ölçme aracı - dijital kumpas elektronik cihaz, vorteks, -20°C buzdolabı, -80°C buzdolabı çalışmada kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan İndikatör Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan referans izolatlar Çizelge 3. 1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan referans izolatlar

Sıra	LAB. Suşları
1.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356
2.	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014
3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 22644
4.	<i>Candida albicans</i> DSMZ 30028
5.	<i>Staphylococcus aureus</i> DSMZ 4910
6.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
7.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
8.	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC BAA-1605
9.	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
10.	<i>Aeromonas hydrophila</i> AH 1 (Onuk ve ark. 2013).
11.	<i>Lactococcus garvieae</i> LG1 (Didinen ve ark. 2014)
12.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35948

3.2. Metot

3.2.1. Farklı Kaynaklardan Örneklerinin Alınması

Örnekler, 4 farklı annenin sütünden, 4 farklı anne sütü ile beslenen bebeklerin (18 aya kadar olan) dışkısından ve 2 çeşit koruyucu içermeyen ev yapımı sebze turşusundan (salatalık ve pancar) alınmıştır.

Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, 2022/38 sayılı kararı ile alınan izin sonrasında, anne sütü örnekleri ve bebeklerden dışkı örnekleme yapılmıştır.

3.2.2. İzolasyon Yöntemi

Anne Sütü ve Bebek Dışkısı Örneklerinin Alınması

Gönüllülerden numuneler toplanmadan 2 hafta önce antibiyotik kullanımı bırakılmıştır. Süt örnekleri steril koşullarda ve hızlı bir şekilde toplanmıştır. Toplanan örnekler soğuk zincir altında laboratuvara taşınmıştır. Kadınlardan numune toplamadan önce cilt bakterilerinin varlığını en aza indirmek amacıyla steril eldiven giyerek meme ucu ve çevresini alkollü (etil alkol %70) bir bezle temizlenmiştir. Süt sağılarak ilk birkaç damla süt atıldıktan sonra 3 ml'ye kadar süt örnekleri alınmıştır (Mohammad ve ark., 2021). Örnekler 5 saat içinde laboratuvarında işleme alınmıştır (Demirok ve ark., 2021).

Turşu Örneklerinin Alınması

Numuneler, steril plastik şırınga ile turşu suyundan alınmıştır. Örnekler soğuk zincir altında laboratuvara taşınmıştır (Chen ve ark., 2013; Roy ve Rai, 2017).

Anne Sütü, Bebek Dışkısı ve Turşu Örneklerinden Bakterilerin İzolasyonu

Ayrı olarak 1 ml anne sütü, 1g bebek dışkısı ve 1 ml turşu numunesinden alınarak 99 mL MRS broth'a aşılanarak inkübe edilmiştir. Anaerobik koşullar altında, 48 saat boyunca 30-37 °C'de inkübe edilmiştir (Diba ve ark., 2013).

İnkübasyondan sonra anne sütü, bebek dışkısı ve turşu örneklerinden üretilen bakteriler ayrı olarak 1:10 oranında steril fizyolojik tuzlu su (% 0.85) ile seyreltilmiştir. Daha sonra seri dilüsyonlar (10^{-1} ile 10^{-6}) hazırlanarak seyreltme yapılmıştır. Her petriden 100 µl alınıp yayma çubuğu ile %0,5 (w/v) CaCO₃ ve %0,05 (w/v) L-sistein-hidroklorür içeren MRS agara yayılmıştır. Her dilüsyondan üç petriye ekim yapılmıştır. Petriler, anaerobik koşullar altında 30-37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir.

Tek bakteri kolonisi, bir MRS agar 10^{-3} , 10^{-5} dilüsyonundan alınmıştır ve yeni bir MRS agar üzerinde ekimi (dört alan yöntemi) yapılarak anaerobik olarak 30-37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Bu uygulamayı yaptıktan sonra farklı bir koloni tespit edildiğinde yukarıdaki aşamalar aynı şekilde sırasıyla tekrar edilmiştir. Tek koloni bakterileri, ön tarama için 4°C'de steril MRS broth içinde saklanmıştır (Yousef ve Carlstrom, 2003; Roy and Rai, 2017; Bellali ve ark., 2019).

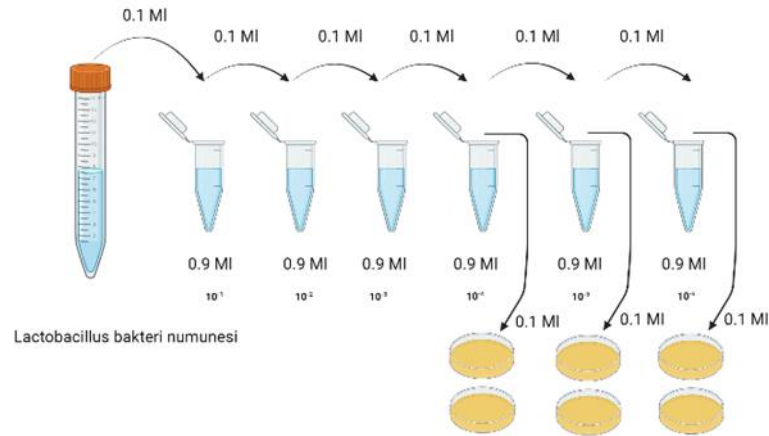
İzolatların seyreltme yapılması aşamaları Şekil 3.1.'de, örneklerin izolasyonu ve saflaştırma aşamaları Şekil 3.2.'de, izolatların seyreltilmesinin şematize edilmesi Şekil 3.3.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. İzolatların seyreltme yapılması aşamaları (orijinal).



Şekil 3.2. Örneklerin izolasyonu ve saflaştırma aşamaları (orijinal).



Şekil 3.3. İzolatların seyreltilmesinin şematize edilmesi (orijinal).

3.2.3. Gram Boyama

İzolatlar için gram boyama aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

- 1- Kristal viyole boya ile bir dakika boyanmıştır ve ardından distile suyla yıkanmıştır.
- 2- Boyayı stabilize etmek için sürüntüler bir dakika süreyle iyoda maruz bırakılmıştır, ardından distile su ile yıkanmıştır.
- 3- %96 konsantrasyondaki etil alkol ile 10 saniye süreyle renk giderilmiştir ve hemen distile su ile yıkanmıştır.
- 4- 30 saniye safranin ile boyanmıştır ve ardından distile suyla yıkanmıştır. Kurutulduktan sonra, bakteri tipini belirlemek için immersiye yağ ile slaytlar bir lens (100X) mikroskop altında incelenmiştir.

3.2.4. Katalaz Testi

Çalışmada elde edilen 18-24 saatlik her bir izolata ait koloni öze ile toplanarak lam üzerine alınarak üzerine bir damla %3 'lük H₂O₂ damlatılmıştır. Karanlık bir zemin üzerinde kabarcık oluşumunu gözlemlenmiştir. Köpüklenme yani kabarcık oluşumu) pozitif olarak kabul edilmiştir. Zayıf pozitif reaksiyonu gözlemlmek için bir büyüteç veya mikroskop kullanılmıştır.

3.2.5. İzolatlardan Stok Kültür Hazırlanması

Gliserol stokları (%60 gliserol) hazırlanırken aynı hacimde distile su içinde %100 gliserol ile seyreltilmiştir ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilerek hazırlanmıştır. Gliserol stokları 25 °C'ye kadar soğutulmuştur ve daha sonra kullanmak üzere aseptik olarak saklanmıştır. Steril bir plastik halka (tek kullanımlık) kullanarak gece boyunca inkübe edilmiş bir petri kabından tek bir bakteri kolonisi alınmıştır ve MRS suyu içeren bir tüpe aşılanmıştır ve tüpleri anaerobik koşullar altında 18 saat inkübe edilmiştir (Bellali ve ark., 2019).

Gece inkübasyona bırakılan kültürlerinden 500 µl'yi 2 ml 'lik bir santrifüj tüpünde %60 gliserole pipetaj yaptıktan sonra bunlar vorteksle hafifçe karıştırılmıştır. Laktik asit bakterilerini içeren gliserol stoğu -80°C gibi çok düşük bir sıcaklıkta ihtiyaç duyulana kadar dondurulmuş ve saklanmıştır (Ayivi ve ark., 2022).

3.2.6. Çalışmada kullanılan Bakterilerin Aktivasyonu

Çalışma izolatları ve referans izolatlar için gerekli analizlerin yapılmasına başlamadan önce izolatların tüm analizlerde kullanılabilmesi amacıyla aşağıda belirtilen şekilde aktive edilmesi işlemi yapılmıştır.

İzolatların Aktivasyonu

-80 °C' de muhafaza edilen her bir izolat ayrı olarak 10 ml steril MRS broth besiyeri içeren tüplere alınmıştır. MRS broth besiyerleri 37 °C'de 48 saat anaerobik olarak inkübe edilmiştir, ardından MRS agar plakalarında üretilmiştir ve yeniden 37°C'de 48 saat anaerobik olarak inkübe edilmiştir, bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. Son olarak, her bir izolat ayrı olarak 30 ml MRS broth içinde kültüre alınarak anaerobik olarak gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.

İndikatör Mikroorganizmaların Aktivasyonu

Referans izolatlar 10 ml steril TSB broth içeren tüplere aşılanmıştır ve 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra TSA agar plakalarına ekilmiştir. 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. Daha sonra, referans izolatlar 10 ml TSB broth + %0,25 glikoz içeren besiyerine ekilerek gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.

3.2.7. İzolatların Moleküler Yöntemle Tanılanması

16S rRNA gen bölgesi dizi analizi yöntemi ile izolatların moleküler tanılanması yapılmıştır. İzolatların moleküler tanılanmasında, bakterilerin MRS Agar besiyerinde geliştirilmesi, genomik DNA izolasyonu, PZR'da çoğaltma, baz dizi sırasının belirlenmesi, veri tabanı ile karşılaştırma ve izolatların 16S rRNA ile tanımlanması ile isimlendirme aşamaları yer almıştır.

İzolatlardan Genomik DNA İzolasyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), geleneksel moleküler klonlama deneylerinde önemli rol oynayan ve aynı zamanda yeterli miktarda nükleik asit elde etme sorununu çözen moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılan güçlü tekniklerden biridir (Wang ve ark., 2023).

Seçilen izolatların genomik DNA'sının izolasyonunda SentroPure Bac-X Bakteriyel DNA İzolasyon Kiti (SPU1MID-M01) kullanılmıştır. Kite yer alan protokole göre genomik DNA izolasyonu yapılmıştır.

Aşağıda açıklanan protokole göre olan on farklı izolatın genomik DNA izolasyonu yapılmıştır.

Tek koloni MRS broth 37 °C'de bir gece kültüre alınmıştır. Bir öze dolusu koloni, 180 µl lizozim sindirim tamponu içinde süspanse edilmiştir ve vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra bir saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İki ayrı su banyosu (veya ısıtıcı bloklar) 37°C ve 55°C'ye ayarlanmıştır. Tüplere 2 µl Triton-X eklenmiştir, pipetaj yapılmıştır ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. 20 µl RNase eklenmiştir ve vorteks ile düşük şiddetle karıştırılmıştır. 20 µl Proteinaz K eklendikten sonra tüpler tekrar vorteksle iyice karıştırılmıştır. 200 µl PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer eklenmiştir ve tekrar vorteksle iyice karıştırılmıştır. Tüpler 55 °C'de 30 dakika tutulmuştur.

Lizatlara 200 µl %96-100 etanol eklendikten sonra homojen bir çözelti elde etmek için 5 Saniye vorteksenerek iyice karıştırılmıştır. PureLink genomik parçalama/bağlama tamponu ve etanol ile hazırlanan lizatlar (yaklaşık 640 µl), PureLink döndürme kolonuna aktarılmıştır.

Kolon, oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 10000 x g'de santrifüjlenmiştir. Tüpte oluşan supernatant kısmı atılmıştır ve pellet temiz bir PureLink toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Daha önce etanol ile hazırladığımız 500 µl yıkama tamponu 1 kolona eklenmiştir. Pelet, oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 10000 x g'de santrifüjlenmiştir. Tüpte oluşan süpernatant kısmı atılmıştır ve pellet temiz bir Pure Link toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Daha önce etanol ile hazırladığımız 500 µl yıkama tamponu 2 kolona eklenmiştir. Kolon oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dakika santrifüj edilmiştir ve tüpteki supernatant kısmı atılmıştır. Tüpte kalan pellet temiz bir 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. 25-200 µl PureLink genomik ayırma tamponu (Genomic Elution Buffer) kolona eklenmiştir. Kolon oda sıcaklığında 1,5 dakika maksimum hızda santrifüj edilerek saf DNA elde edilmiştir. Nanodropda konsantrasyon ve saflığı belirlenmiştir. Saflaştırılan DNA, -20 °C'de saklanmıştır.

İzolatların 16S rRNA geninin PZR amplifikasyonu ve dizi analizi

On farklı izolatın taranması, iki çift primerle (Çizelge 3.2.), saf kültürlerden 16S rRNA genlerini amplifiye etmek için kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primerler

Primerler	Sekans 5' → 3'
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3
1492R	5'-T ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Aşağıdaki PZR koşulları altında dizileme için ABI 3500 Genetic Analyzer cihazını kullanılmıştır.

Ön denatürasyon 95 °C'de 10 dakika, 95 °C 'de denatürasyon için 45 döngü (30 saniye), 55°C'de primer yapışması (30 saniye) 72°C'de (30 saniye) ön uzatma ve 72 °C'de uzatma (10 saniye) olarak PZR işleminin gerçekleştiği aşağıdaki tabloda verilmiştir. PZR karışımını hazırlamak için GoTaq Hot Start Master Mix (Promega, ABD) kullanıldı. 50 µl solüsyon için, 25 µl Hot Start Master Mix, 1 µl 1492R primer (10 µM), 1 µl primer 27F (10 µM) , 1 µl DNA şablonu (~100 ng) ve 22 µl hazırlama aşamasında nükleaz içermeyen su kullanılmıştır (İspirli ve Dertli, 2023).

Agaroz Jel Elektroforezi

Jel elektroforezi, doğrusal DNA ve RNA fragmentlerini ayırmak ve DNA'nın boyutlarını belirlemek için kullanılan birkaç fiziksel yöntemlerden biri de jel elektroforez yöntemidir (Armstrong ve Schulz, 2015). Bu yöntemde DNA, bir elektrik akımına yanıt olarak yüksek oranda

çapraz bağlı bir agaroz matris boyunca hareket etmektedir. Çözeltide, DNA üzerindeki fosfat negatif yüklüdür ve bu nedenle molekül pozitif elektrod yönünde hareket etmektedir.

Bu yöntemde dört temel adım takip edilmiştir.

- 1- Agaroz jelin hazırlanması ve dökülmesi; 800 mg agaroz 100 ml 1X Tris Borat EDTA tamponunda (TBE) çözülerek mikrodalga fırında tüm partiküller eriyene kadar kaynatılmıştır ve oda sıcaklığında soğumaya bırakıldıktan (yaklaşık 20 dk) sonra jel standına dökülmüştür ve taraklar yerleştirildi. Jeller katılaştıktan sonra taraklar yavaşça çıkarılmıştır, agaroz jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir ve tampon jeli kaplayana kadar 1X Tris Borat EDTA tamponu (TBE) ilave edilmiştir.
- 2- Numune hazırlama ve yükleme: Elektroforez sırasında DNA hareketinin görsel olarak izlenmesi için 1 µl yükleme boyası (bromofenol mavisi ve ksilen siyanol FF) ile 5 µl DNA örneği mikropipetle alınmıştır çalışma için kuyuya aktarılmıştır (Dos Santos ve ark., 2019).
- 3- Agaroz jelin çalıştırılması: 120 V voltaj, 5 MA elektrik akımı kullanılmıştır ve jel 1-1.30 saat çalıştırılmıştır. DNA ve RNA'yı görselleştirmek için bir interkolasyon ajan olan etidyum bromür kullanılarak jel boyanmıştır.
- 4- Elektroforez tamamlandığında, jel dikkatlice elektroforez tankından çıkarılmıştır ve etidyum bromür içine 15-20 dakika daldırılmıştır. UV ışığına maruz kaldığında etidyum bromür floresan bir DNA ayırıcı maddedir (312 nm dalga boyu) (Armstrong ve Schulz, 2015).

16S rRNA Gen Dizisi ve Filogenetik Analiz

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri dizileme öncesi kullanılmayan dNTP'leri ve primerleri PZR karışımından uzaklaştırmak için saflaştırılmıştır (ZMR ve ark., 2016) Dizileme reaksiyonu, üreticinin talimatlarına göre ABI 3500 Genetic Analyzer cihazı, Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ABI 3500 Genetik Analiz Cihazı ve polimer, ayırma makinesi ve matrisler olarak kullanılmıştır. Türetilmiş nükleotit dizileri, BioEdit Dizi Hizalama Düzenleyicisi ile analiz edilmiştir ve hizalanmıştır. Elde edilen konsensüs dizileri, GenBank'ta daha önce yayınlanmış verilerle karşılaştırılmıştır (Aplevicz ve ark., 2014). İzolatların kimliği, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nden (NCBI) (Aplevicz ve ark., 2014) Blast aracı (Basic Local Alignment Search Tools Nucleotide) kullanılarak analiz edilmiştir.

Genetik ağaç, program (MEGA11) kullanılarak çizilecek ve önyükleme testinde ilgili takson gruplarının bir arada görüldüğü kopya ağaçların yüzdesi, dalların yanında görünecektir (Felsenstein J ve diğerleri, 1985). Evrimsel mesafeler daha sonra, bölge başına baz ikamesi sayısı birimi cinsinden olan Kimura 2 parametrelili yöntemi (Kimura M ve diğerleri, 1980) kullanılarak hesaplanacaktır.

3.2.8. İzolatların bazı patojenlere karşı inhibisyon etkisi

Agar Spot Testi

İzolatlar, bir MRS Broth ve MRS agarda üç kez kültürlenerek aktive edilmiştir. Bir antimikrobiyal bileşik üretimi için test edilecek suşların bir gecelik kültürleri, agar plakalarının yüzeyine nokta ekim yapılarak (MRS-0,2, %1,2 yumuşak agar ile) kolonilerin gelişmesine izin vermek için 25 °C’de (20-24 saat) inkübe edilmiştir. Referans izolatlar ((*P. aeruginosa* ATCC 22644), (*S. aureus* ATCC 25923), (*E. coli* ATCC 25922), (*L.garvieae* LG1) , (*S. epidermidis* ATCC 35948)) yaklaşık (5×10^7 kob/ml, 7 ml yumuşak MRS-0,2 agar (%0,7 yumuşak agar) içine inoküle edilmiştir ve nokta ekim yapılan plakaların üzerine dökülmüştür. 25°C’de 24 saat anaerobik inkübasyondan sonra, plakalar üzerinde oluşan inhibisyon bölgeleri kontrol edilmiştir. Koloni etrafındaki şeffaf zon genişliği inhibisyon pozitif olarak değerlendirilmiştir (Schillinger ve Lücke, 1989).

Kuyu Difüzyon Testi

Kuyu difüzyon testi aşağıdaki aşamalara ve yöntemine göre yapılmıştır (Al-Malkey ve ark., 2017).

İzolatların aktive edilmesi

10 izolatın, 10 ml’lik steril MRS besiyeri içeren tüplere ekimi yapılarak 37 °C’de 48 saat anaerobik olarak inkübe edilmiştir.

Hücre içermeyen süpernatanın hazırlanması

Hücre içermeyen süpernatant (HİS), 4 °C’de 15 dakika boyunca 10.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant steril bir filtreden (0,22 um filtre; Millipore, ABD) filtre edilmiştir. Kullanılana kadar -80°C’de saklanmıştır (Singh ve ark., 2018).

İndikatör mikroorganizmaların aktivasyonu

Referans izolatlar (*P. aeruginosa* ATCC 22644, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *L.garvieae* LG1, *A. hydrophila* AH1, *S. epidermidis* ATCC 35948) 10 ml steril TSB broth içeren tüplere aşılanmıştır ve 37°C’de 48 saat inkübe edilmiştir.

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi

İzolatların antimikrobiyal aktivitesi, kuyu difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Steril pamuk çubuklar (0,5 McFarland) referans izolata daldırılmıştır, süspansiyonun bulanıklığı 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ kob/ml) olarak ayarlanmıştır. Yaklaşık 100 µl referans izolatlar ayrı ayrı TSA agar plakalarının tüm yüzeyi üzerine sürülerek yayma ekimi yapılmıştır

Petri plaklarının üzerindeki besiyeri her biri 6 mm çapındaki eşit mesafeli oyukların açılması steril bir kuyu delici ile yapılmış olup kuyuların tabanı yumuşak agar ile bloke edilmiştir. Önceden işaretlenmiş oyuklara 100 µl CFS eklenmiştir. Negatif kontrol olarak, steril MRS sıvı besiyeri ve pozitif kontrol olarak ise asetik asit (%33) kullanılmıştır. Tüm deneyler üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Plaklar 24 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra oluşan inhibisyon bölgeleri (mm) ölçülerek kaydedilmiştir.

Sıvı Besiyerinde İnhibisyon Etkinin Belirlenmesi

Sıvı besiyerinde inhibisyon etkinin belirlenmesinde aşağıdaki aşamalar uygulanmıştır.

Hücresiz Süpernatantın (HS) Hazırlanması

Gece boyunca inkübe edilen bakteriler 4 °C’de 15 dakika boyunca 10,000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant steril bir filtreden (0,22 µm filtre; Millipore, ABD) filtre edilerek elde edilmiştir. Hücresiz süpernatant (HS), kullanılabildiği kadar -80 °C’de saklanmıştır (Singh ve ark., 2018).

İndikatör Bakteri Hazırlanması

E. coli (ATCC 25922) 10 ml steril TSB suyu içeren tüplere aşılanmıştır ve 37°C’de 48 saat inkübe edilmiştir.

Sıvı besiyerinde inhibisyon etkinin belirlenmesinde, yoğunluğu 10⁷ hücre/ml olan referans indikatör 10ml TSB brotha ekilmiştir. 1ml izolatın süpernatantı ilave edilmiştir. Daha sonra 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Steril fizyolojik tuzlu su ile uygun dilüsyon yapılarak TSA agara yayma ekim yöntemiyle ekilmiştir. 37 °C’de 24 saatlik inkübasyondan sonra her bir petri kabında üreyen koloniler sayılmıştır (Nieto-Lozano ve ark., 2002; Kalkan ve ark., 2017).

Çapraz Çizgi Yöntemi Testi

Seçilen izolatların antimikrobiyal aktivitesi, çapraz çizgi yöntemi testi kullanılarak referans izolatlarla karşı test edilmiştir (Coman ve ark., 2014).

Çapraz çizgi yöntemi testinin uygulanmasında aşağıdaki aşamalar takip edilmiştir.

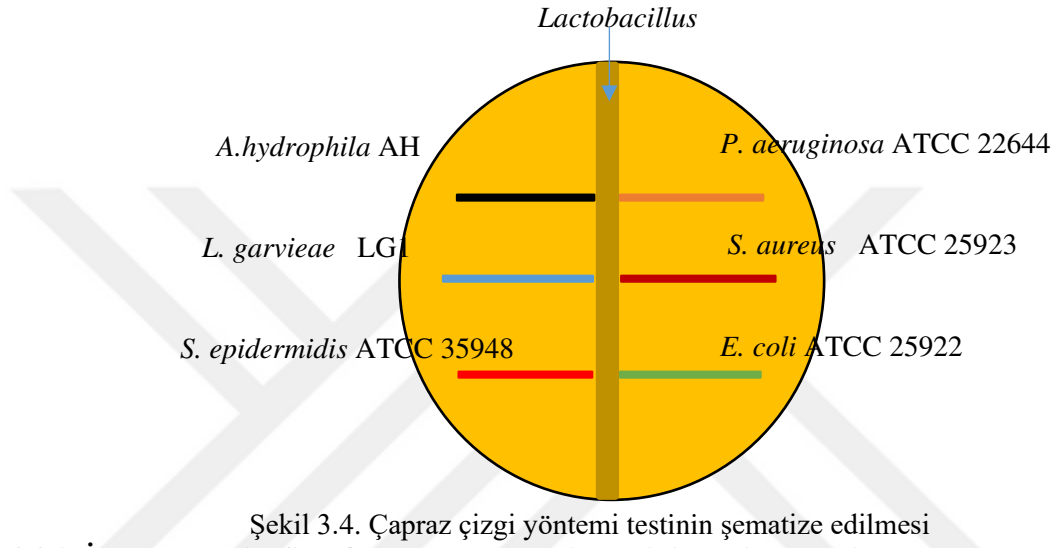
İndikatör Bakterilerin Hazırlanması

İzolatları ile referans izolatlar (*P. aeruginosa* (ATCC 22644), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), *A. hydrophila* (AH 1), *L. garvieae* (LG1), *S. epidermidis* (ATCC 35948)) ile 10 ml steril TSB suyu içeren tüplere aşılanmıştır ve 37°C’de 48 saat inkübe edilmiştir.

Bu kültürler, -20 °C’de donmuş stok kültürler olarak saklandı ve inhibisyon deneylerinde kullanılmadan önce iki kez aktifleştirilmiştir.

İzolatlar aktive edildikten sonra MRS agar besiyerinde 1 cm genişliğinde steril bir svab kullanılarak ekimi yapılmıştır ve plaklar 15 dakika kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra, referans izolatlar, Şekil 3.9’da çapraz çizgi yönteminin şematize edildiği şablona göre yatay olarak ekimi yapılmıştır ve plakalar, anaerobik koşullar altında 37 °C sıcaklıkta 48 saat inkübe edilmiştir. Her bir patojenik bakteri türü grubu için inhibisyon bölgeleri verilmiştir ve sonuçları doğruluğunu sağlamak için her bir plaka iki tekrar halinde yapılmıştır.

Çapraz çizgi yöntemi testinin şematize edilmesi Şekil 3. 4.’de verilmiştir.



Şekil 3.4. Çapraz çizgi yöntemi testinin şematize edilmesi

Kongo Kırmızısı Bağlama Testi

MRS agar hazırlanarak sterilize edildikten sonra %0,03 (w/v) oranında kongo kırmızısı besiyerine eklenmiştir. Aday probiyotik izolatların besiyerine ekimleri yapılarak 37° C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası oluşan kırmızı renkli koloniler pozitif (hidrofobik), beyaz veya renksiz koloniler ise negatif (non-hidrofobik) olarak değerlendirmiştir (Sharma ve ark, 2016; Didinen ve ark, 2014).

Biyofilm Oluşturma Potansiyeli (Mikroplak Yöntemi)

İzolatların biyofilm oluşturma kapasitesi, aşağıda belirtilen aşamalar uygulanarak test edilmiştir (O'Toole ve Kolter 1998; Lebeer ve ark. 2007; Ramírez ve ark., 2015).

Biyofilm oluşturma kapasitesi belirlenmesi testinde kullanılacak olan izolatların ve referans izolatların aktivasyonu 3.2.6. metod bölümünde anlatılan yönteme göre yapılmıştır.

Mikroplak Yöntemi

İndikatör bakteriler %0,25 glikoz içeren 180 µL TSB brotha alınmıştır. Daha sonra, her bir kuyucuğa önceden hazırlanmış 20 µL'lik bir bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Negatif kontrol kuyuları yalnızca TSB broth içermektedir.

Buharlaşmayı önlemek için parafilm ile kapatılmıştır. Mikroplakalar stabil koşullarda 72 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kuyucukların içeriği bir kaba boşaltılmıştır. Her kuyu, uygun bir mikropipet kullanılarak 200 µL steril fosfat tamponlu salin (PBS; pH 7,2) ile üç kez yıkanmıştır. Her yıkama adımından sonra, plakalar hafifçe vurularak kuyular boşaltılmıştır. Biyofilmin sabitlenmesinden önce, plakalar ters çevrilmiştir.

Biyofilm Fiksasyonu

Yıkamadan sonra, kalan yapışık bakteriler, 60 dakika boyunca 60 °C’de sıcak havaya maruz bırakılarak ısı ile stabilize edilmiştir. 200 µL %0,1 kristal viyole (Merck Company, Almanya) ile 15 dakika boyanmıştır. Fazla boya kuyu başına 200 µl distile su ile durulanmıştır. Yıkamalara boyadan kurtuluncaya kadar yıkamaya devam edilmiştir.

Mikroplaka oda sıcaklığında havayla kurutulduktan sonra, hücrelere bağlı boya yeniden çözülerek, bağlı hücrelerden kuyu başına 150 µL %95 etanol ile ayrıştırılma almıştır. Etanol yavaşça ilave edilmiştir ve ardından kapağı kapatılan mikrotitre plakası (buharlaşmayı en aza indirmek için) çalkalanmadan en az 30 dakika oda sıcaklığında bırakılmıştır (Shokri ve ark., 2018).

Sonuçların Değerlendirilmesi

Kristal viyole ile boyanmış her bir kuyunun optik yoğunluğu (OD), bir mikrotitre plaka okuyucusu kullanılarak (Thermo Multiskan GO Plate Reader) 570 nm’de ölçülmüştür (Terraf ve ark., 2012).

Tüm testler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi aşağıdaki eşitliğe göre tespit edilmiştir (Ruchi ve ark., 2022).

1. $OD \leq OD_c$ ise biyofilm = üretici değil
2. $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ ise biyofilm = zayıf
3. $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ ise biyofilm = orta
4. $4 \times OD_c < OD$ ise biyofilm = güçlü

OD_c =Cutoff OD değeri ve OD = Test edilen tüm suşlar ve negatif kontroller için değerleri hesaplanmıştır

3.2.9. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İzolatların, antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Manzoor ve ark., 2016).

Antibiyotik direncinin belirlenmesinde kullanılan antibiyotik diskleri Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Antibiyotik direncinin belirlenmesinde kullanılan antibiyotik diskleri

No	Antibiyotik diskleri
1.	BLANK
2.	Gentamicin (CN10)
3.	Erythromycin (E15)
4.	Trimethoprim/Sulfamethoxazole (1.25/23.75ug), (SXT 25)
5.	Nitrofurantoin (F300)
6.	Vancomycin (VA 30 µg)
7.	Tetracycline (TE30 µg)
8.	Oxolinic acid (OA2 2 µg)
9.	Nalidixic acid (NA30, 30 µg)
10.	Novobiocin (NV30 µg)
11.	Sulfamethoxazole (SMZ 100 µg)
12.	Ampicillin (AM10 µg)

Antibiyotik direncinin belirlenmesinde uygulanan yöntem aşağıda verilmiştir.

1- İnokulumun hazırlanması

İzolatlar 2 ml steril tuz (%0,85) içinde süspansiyon edilmiştir. Yoğunluk 0,5 McFarland standardına göre ayarlanmıştır.

2- MRS agar besiyerine izolatların ekimi

Steril tuz (%0,85) içinde hazırlanan izolatlar MRS agar içeren petri kabının yüzeyine yayılmıştır. Petri kabının kapağı hafifçe açık bırakılarak, yüzeyinin kurumasını sağlanmıştır.

3- Antibiyotik disklerinin yerleştirilmesi

Steril pens ile antibiyotik diskleri MRS agar yüzeyine yerleştirilmiştir. Daha sonra antibiyotik diskli agar plakları anaerobik koşullarda 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnhibisyon bölgelerinin çapları elektronik bir dijital kumpas kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar hassas (S), çok hassas (I) ve dirençli (R) olarak değerlendirilmiştir.

3.2.10. Hücre dışı enzim üretme kapasitesinin değerlendirilmesi

On izolatın hücre dışı enzim üretimi (lipaz, proteaz ve selüloz), ayrı olarak %1 Tween 80, %1 karboksimetil selüloz (CMC) ve %1 yağsız süt içeren MRS agar plakalarında test edilmiştir (Zheng ve Wang, 2017).

Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Amilaz enzim aktivitesini değerlendirmek için, MRS nişasta besiyeri, (%1,5 (w/v) hazırlanmıştır ve daha sonra (MRS agar + %1,5 nişasta) besiyerinde öze ile izolatlar aşılacaktır. 37 °C’de 48 saat anaerobik olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra plaklara batırmak için %1 (w/v) iyot solüsyonu damlatılmıştır. Koloni etrafında renksiz bir hale oluşması amilaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Lipaz enzim aktivitesini değerlendirmek için, MRS Tween 80 besiyeri hazırlanmıştır ve daha sonra (MRS agar + %1 Tween 80) besiyerinde öze ile izolatlar aşılacaktır. 37 °C’de 48 saat anaerobik olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra koloni etrafında renksiz hale oluşması lipaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Zheng ve Wang, 2017).

Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Proteaz enzim aktivitesini değerlendirmek için, MRS yağsız süt besiyeri besiyeri hazırlanmıştır ve daha sonra besiyerine öze ile izolatlar aşılacaktır (Rastogi ve ark., 2020). 37 °C’de 48 saat anaerobik olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra koloni etrafında renksiz hale oluşması proteaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Filimon ve ark., 2022) .

Selüloz Aktivitesinin Belirlenmesi

Selüloz enzim aktivitesini değerlendirmek için, MRS karboksimetil selüloz besiyeri hazırlanmıştır ve daha sonra besiyerine öze ile izolatlar aşılacaktır. 30 °C’de 48 saat anaerobik olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra plakları %1 (w/v) iyot solüsyonu damlatılmıştır. Koloni etrafında renksiz bir hale oluşması selüloz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Chen ve ark., 2017) .



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Kültürü ve Saflaştırılması

Bu çalışmada, anne sütü, bebek dışkısı ve turşu örneklerinden 46 potansiyel laktik asit izolatı elde edilmiştir. İzolatların, gram pozitif ve katalaz negatif olduğu belirlenmiştir. İzolatlardan stok kültür hazırlanmış ve daha sonra kullanılmak üzere -20 °C’de saklanmıştır Çalışmada kullanılan izolat kaynağı, izolat sayısı ve alındığı yer Çizelge 4. 1.’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan izolat kaynağı, izolat sayısı ve alındığı yer

İzolat kaynağı	No	İzolat Sayısı	Toplam izolat sayısı	Alındığı yer
Anne sütü	1	1	17	Mersin
	2	4		
	3	5		
	4	7		
Bebek dışkısı	1	3	21	Mersin
	2	7		
	3	4		
	4	7		
Turşu	1	1	8	Mersin
	2	7		
Toplam		46	46	

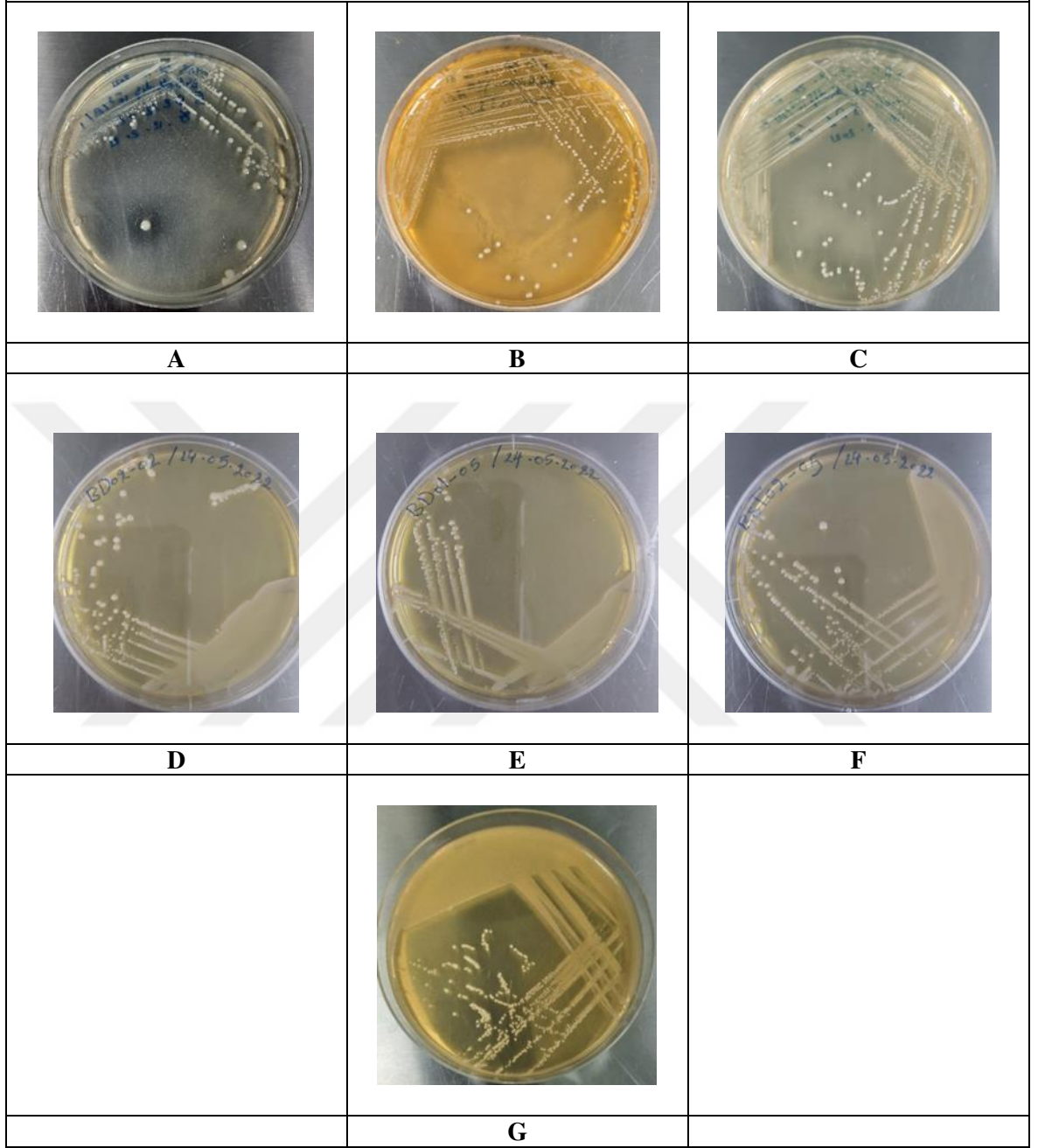
Tüm izolatlarda gram testi ve katalaz testi yapıldıktan sonra farklı görünen koloni ve hücre morfolojilerine sahip olan on izolat seçilmiştir. Çizelge 4. 2. Seçilen izolatların katalaz, gram boyama ve hücre morfolojileri Çizelge 4.2.’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Seçilen izolatların katalaz, gram boyama ve hücre morfolojileri

İzolat Kaynağı	Katalaz	Gram Boyama	Hücre morfolojisi
Anne sütü	_*	+*	Basil
Anne sütü	-	+	Basil
Anne sütü	-	+	Basil
Anne sütü	-	+	Basil
Turşu	-	+	Basil
Bebek dışkı	-	+	Basil
Bebek dışkı	-	+	Basil
Bebek dışkı	-	+	Basil
Bebek dışkı	-	+	Kok
Bebek dışkı	-	+	Basil

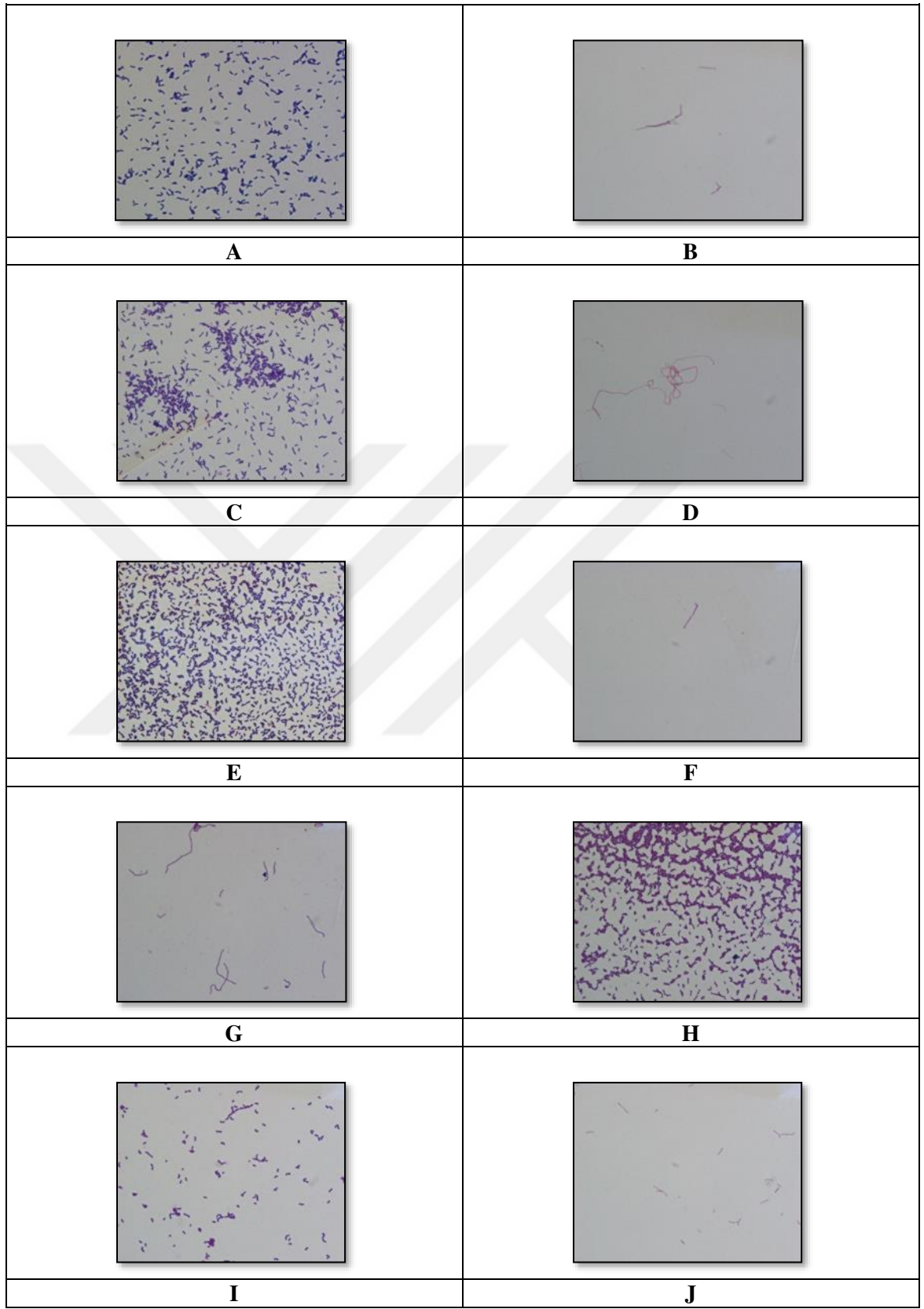
*(+); gram-pozitif suşlar, (-); katalaz negatif suşlar.

MRS besiyeri üzerinde A- B-BST01, C-BST01, D-BD02-02, E-BD01-05, F-BST02-05 ve G-BD04-05 izolatlarına ait saflaştırılan kolonilerin görünümü Şekil 4. 1.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. MRS besiyeri üzerinde A-BST02-02, B-BST01, C-BST01, D-BD02-02, E-BD01-05, F-BST02-05ve G-BD04-05 izolatlarına ait saflaştırılan kolonilerin görünümü.

İzolatlara ait gram boyama görünümü Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.3. İzolatlarla ait gram boyama görünümü, A-BST01, B-BST02-05, C-BST02-07, D- BST02-10, E-TU01-01, F-BD01-05, G-BD02-02, H-BD03-01 I- BD04-03 J- BD04-05 1000x (orijinal).

Bakteri izolatlarının seçimi

Tüm izolatlarda gram testi ve katalaz testi yapıldıktan sonra farklı görünen koloni ve hücre morfolojilerine sahip olan on izolat seçilmiştir.

Çalışmada kullanılan izolatların kaynağı ve kodlanması Çizelge 4. 3.'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan izolatların kaynağı ve kodlanması

No	Kaynak	Kod
1.	Anne sütü	BST01
2.	Anne sütü	BST02-05
3.	Anne sütü	BST02-07
4.	Anne sütü	BST02-10
5.	Şalgam Turşusu	TU01-01
6.	Bebek dışkı	BD01-05
7.	Bebek dışkı	BD02-02
8.	Bebek dışkı	BD03-01
9.	Bebek dışkı	BD04-03
10.	Bebek dışkı	BD04-05

Rebecca ve ark. (2013), yoğurttan izole ettikleri laktik asit bakterisi olan *Lactobacillus delbreukii* izolatının, gram pozitif, çubuk şeklinde ve katalaz negatif olduğunu bildirmişlerdir.

4.2. İzolatların Moleküler Yöntemlerle Tanılanması

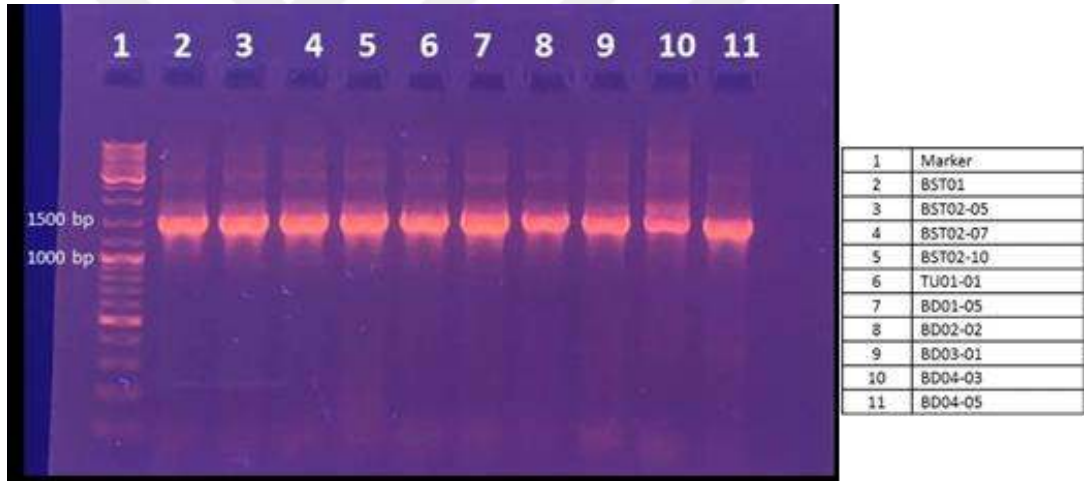
16S rRNA geni bakterilerde evrenseldir ve bu nedenle tüm bakteriler arasındaki ilişkiler ölçülebilir. Genel olarak, 16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırılması, tür ve alt tür düzeyi denilen seviye de dahil olmak üzere suşların birden fazla düzeyde sınıflandırılmasına ek olarak, tüm ana bakteri filumları boyunca cins düzeyindeki organizmalar arasında farklılaşmaya da olanak tanımaktadır (Clarridge, 2004).

İzolatlardan genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra nanodropda belirlenen genomik DNA'nın konsantrasyon ve saflık değerleri Çizelge 4. 4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Genomik DNA'nın konsantrasyon ve saflık değerleri

No.	Kod	Miktar (ng/ul)	Saflık A260/A280
1.	BST01	44,55	2,07
2.	BST02-05	25,57	2,22
3.	BST02-07	17,99	2,25
4.	BST02-10	19,86	2,31
5.	TU01-01	94,12	2,10
6.	BD01-05	42,58	2,31
7.	BD02-02	55,25	1,92
8.	BD03-01	12,51	2,45
9.	BD04-03	18,91	2,24
10.	BD04-05	14,26	2,47

PZR ürünlerinin %1 agaroz jel görüntüsü Şekil 4.3.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. PZR ürünlerinin %1 agaroz jel görüntüsü

Çalışmada anne sütü, yeni doğan bebek dışkısı ve ev yapımı şalgam turşu farklı kaynaklarından 46 bakteri suşu izole edilmiş, saflaştırma işlemleri yapılmış ve suşların ilk özelliklerinin belirlenmesinden sonra, koloni şekli, katalaz testi sonucu, gram boyama ile ilk ayırıcı tanı ve ışık mikroskobu altında inceleme dahil olmak üzere, cins seviyesinde 16S rRNA'ların PZR amplifikasyonu yoluyla moleküler yöntemlerle genetik dizilerini belirlemek için 10 bakteri suşu karşılaştırıp seçilmiştir.

Bu amaçla PZR'de cinse özgü primerler kullanılmış ve Çizelge 3.2 'de (Malzeme ve Yöntemler bölümü) daha önce bahsedilen spesifik primer setleri kullanılarak tüm izolatların 16S rRNA bölgeleri belirlenmiştir. rRNA geninin 16S bölgesini amplifiye etmek için kullanılan moleküler tanılama çalışmalarına göre *Lactobacillus* spp. cinsleri baskın olarak bulunmuştur.

Primer seti, (27F, 1492R), BST01 suşlarında 1501 bp'lik bir fragmanı *L. fermentum* olarak büyütmede başarılı olmuş, BST02-05 suşlarında 1406 bp'lik bir fragmanı *L. fermentum* olarak amplifiye edilmiştir ve BST02-07 suşlarında 1357 bp'lik bir fragmanı *Limosilactobacillus* olarak amplifiye edilmiştir. *L. fermentum*, BST02-10 suşlarında 1373 bp'lik bir parçayı *L. fermentum* olarak yükseltmiştir. TU01-01 suşlarında 1409 bp'lik bir parçayı *L. plantarum* olarak yükseltmiştir. BD01-05 suşlarında 1419 bp'lik bir parçayı *L. fermentum* olarak yükseltmiştir. BD02-02 suşları *L. fermentum* olarak suşlar, BD03-01 suşlarında 1367 bp'lik bir parçayı, BD04-03 suşlarında 1241 bp fragmanını yüksetmiş, BD04-03 suşunu *Enterococcus faecalis* olarak amplifiye edilmiştir.

Moleküler yöntem ile izolatların tanılanması sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Moleküler yöntem ile izolatların tanılanması sonuçları

No.	Kod	İzolatlar
1.	BST01	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
2.	BST02-05	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
3.	BST02-07	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
4.	BST02-10	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
5.	TU01-01	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
6.	BD01-05	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
7.	BD02-02	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
8.	BD03-01	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
9.	BD04-03	<i>Enterococcus faecalis</i>
10.	BD04-05	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>

PZR ürünlerine ait çift yönlü DNA dizileme sonuçları güncel NCBI mikrobiyal veritabanında incelenmiş olup diziler FASTA formatında BLAST analizi sonuçlarına göre tanımlanmıştır (Çizelge 4.6.'de).

Çalışmada kullanılan izolatların, NCBI 'de yer alan kayıt bilgileri Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Çalışmada kullanılan izolatların NCBI 'de yer alan kayıt bilgileri

Kod	İzolatlar	Tanım	Lokus	Organizma	Baz sayısı
BST01	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	<i>L. fermentum</i> strain RNFA-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	OP499883 (1501 bp DNA linear BCT 27-SEP- 2022)	<i>L. fermentum</i> Bacteria; Bacillota; Bacilli; <i>Lactobacillales</i> ; <i>Lactobacillaceae</i> ; <i>Limosilactobacillus</i> .	1501
BST02-05	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	<i>L. fermentum</i> strain RNFA-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	OP499884 (1406 bp DNA linear BCT 27-SEP- 2022)	<i>L. fermentum</i> Bacteria; Bacillota; Bacilli; <i>Lactobacillales</i> ; <i>Lactobacillaceae</i> ; <i>Limosilactobacillus</i> .	1406
BST02-07	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	<i>L. fermentum</i> strain RNFA-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	OP499885 (1357 bp DNA linear BCT 27-SEP- 2022)	<i>L. fermentum</i> Bacteria; Bacillota; Bacilli; <i>Lactobacillales</i> ; <i>Lactobacillaceae</i> ; <i>Limosilactobacillus</i> .	1357
BST02-10	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	<i>L. fermentum</i> strain RNFA-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	OP499886 (1373 bp DNA linear BCT 27-SEP- 2022)	<i>L. fermentum</i> Bacteria; Bacillota; Bacilli; <i>Lactobacillales</i> ; <i>Lactobacillaceae</i> ; <i>Limosilactobacillus</i> .	1373
TU01-01	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> strain RNFA-5 16S ribosomal RNA gene,partial sequence	OP499887 (1409 bp DNA linear BCT 27-SEP- 2022)	<i>L. plantarum</i> Bacteria; Bacillota; Bacilli; <i>Lactobacillales</i> ; <i>Lactobacillaceae</i> ; <i>Lactiplantibacillus</i> .	1409

Çizelge 4.6. Çalışmada kullanılan izolatların NCBI 'de yer alan kayıt bilgileri (devamı)

BD01-05	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	<i>L. fermentum</i> strain RNFA-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	OP499888 (1419 bp DNA linear BCT 27- SEP-2022)	<i>L. fermentum</i> Bacteria; Bacillota; Bacilli; <i>Lactobacillales</i> ; <i>Lactobacillaceae</i> ; <i>Limosilactobacillus</i> .	1419
BD02-02	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	<i>L. fermentum</i> strain RNFA-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	OP499889 (1420 bp DNA linear BCT 27-SEP- 2022)	<i>L. fermentum</i> Bacteria; Bacillota; Bacilli; <i>Lactobacillales</i> ; <i>Lactobacillaceae</i> ; <i>Limosilactobacillus</i> .	1420
BD03-01	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i> strain RNFA-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	OP499890 (1367 bp DNA linear BCT 27-SEP- 2022)	<i>L. rhamnosus</i> Bacteria; Bacillota; Bacilli; <i>Lactobacillales</i> ; <i>Lactobacillaceae</i> ; <i>Lacticaseibacillus</i> .	1367
BD04-03	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> strain RNFA-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	OP499891 (1241 bp DNA linear BCT 27-SEP- 2022)	<i>E. faecalis</i> Bacteria; Bacillota; Bacilli; <i>Lactobacillales</i> ; <i>Enterococcaceae</i> ; <i>Enterococcus</i> .	1241
BD04-05	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i> strain RNFA-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	OP499892 (1407 bp DNA linear BCT 27-SEP- 2022)	<i>L. rhamnosus</i> Bacteria; Bacillota; Bacilli; <i>Lactobacillales</i> ; <i>Lactobacillaceae</i> ; <i>Lacticaseibacillus</i> .	1407

Taksonların evrimsel ilişkileri

16S rRNA genine ait hizalama sonuçları kullanılarak çalışılan izolatların evrimsel analizi yapılmıştır. Bakteri türlerinin evrimsel yakınlıkları, minimum evrim yöntemi kullanılarak çıkarılmıştır (Rzhetsky ve ark.,1992). Optimal ağaç gösterildiğinde, sonuçlarda üç ana grup ortaya çıkmıştır; bunlardan ilki, test edilen, bilimsel adı ve kodu taşıyan ve harflerle (**A, D, E, F, G**) ifade edilmiştir. Genetik özellikleri bakımından incelenen izolatlara yakın olan ikinci grup LAB türleridir. *L. fermentum* izolatı genetik sınıflandırma açısından birbirine çok yakın olduğundan (**B,C**) harfleriyle sınıflandırılmıştır. Üçüncü grup ise, genetik ve genetik sınıflandırma açısından incelenen on laktik asit bakterisi türünden farklılaşan bir grup bakteri türü (*Bacillus subtilis* suşu)'dür. Bu grup ise (**H**) harfleriyle sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.7).

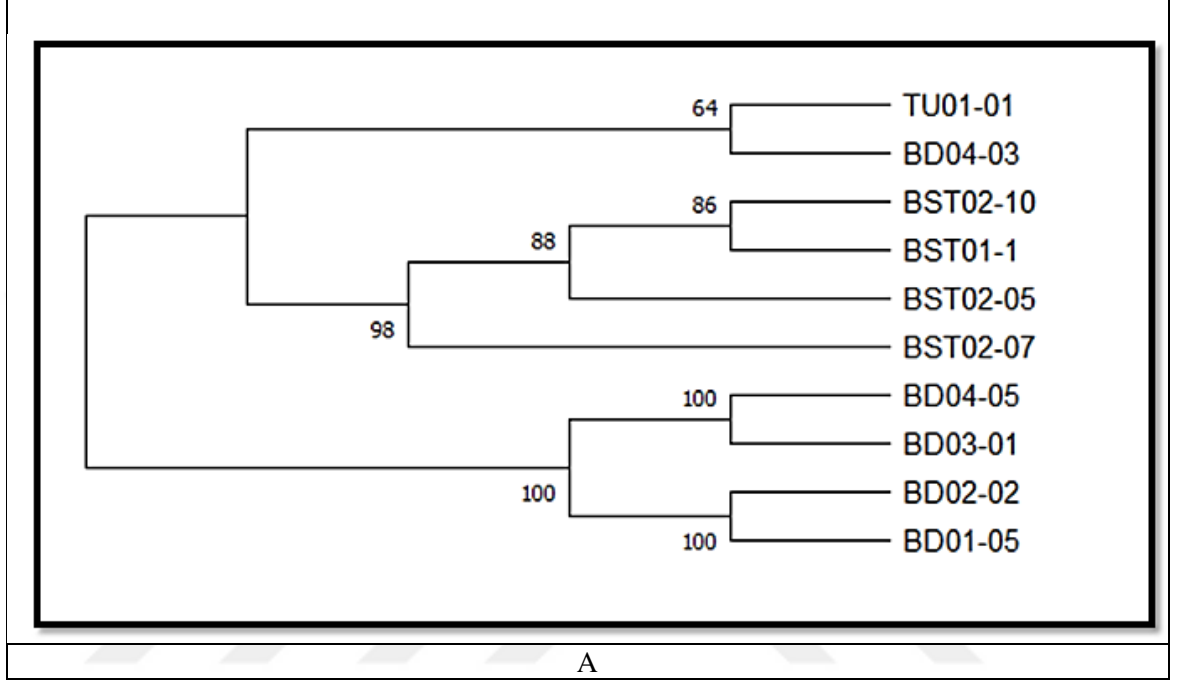
Çizelge 4.7. Filogenetik ağaçta yer alan çalışma izolatları ve diğer bakteri türleri

A	BD02-02- <i>L. fermentum</i> BD01-05- <i>L. fermentum</i>
B	<i>L. fermentum</i> strain 3 16S ribosomal RNA gene partial sequence. <i>L. fermentum</i> strain 8 16S ribosomal RNA gene partial sequence
C	<i>L. fermentum</i> strain 6 16S ribosomal RNA gene partial sequence <i>L. fermentum</i> strain 5 16S ribosomal RNA gene partial sequence
D	BD04-05- <i>L. rhamnosus</i> BD03-01- <i>L. rhamnosus</i>
E	BST01- <i>L. fermentum</i> BST02-10- <i>L. fermentum</i>
F	BST02-07- <i>L. fermentum</i> BST02-05- <i>L. fermentum</i>
G	TU01-01- <i>L. plantarum</i> BD04-03- <i>E. faecalis</i>
H	<i>Bacillus subtilis</i> strain DSAM 02 16S ribosomal RNA gene partial sequence <i>Bacillus subtilis</i> strain PI 16S ribosomal RNA gene partial sequence. <i>Bacillus subtilis</i> strain PANA13 16S ribosomal RNA gene partial sequence.

Bootstrap testinde ilişkili taksonların bir arada kümелendiği kopya ağaçların yüzdesi (50 kopya) dalların yanında gösterilmiştir (Felsenstein ve ark.,1985). Evrimsel mesafeler Kimura 2-parametre yöntemi (Kimura ve ark.,1980) kullanılarak hesaplanmıştır. Saha başına baz ikamesi sayısı birimindedir. Bölgeler arasındaki oran değişimi bir gama dağılımıyla modellenmiştir (Şekil parametresi = 1). ME ağacı, 1 arama düzeyinde Close-Neighbor-Interchange (CNI) algoritması (Nei ve ark.,2000) kullanılarak aranmıştır. Komşu-birleştirme algoritması (Saitou ve ark.,1987) kullanılarak başlangıç ağacı analizi 17 nükleotid dizisini içermektedir. Her dizi çifti için tüm belirsiz

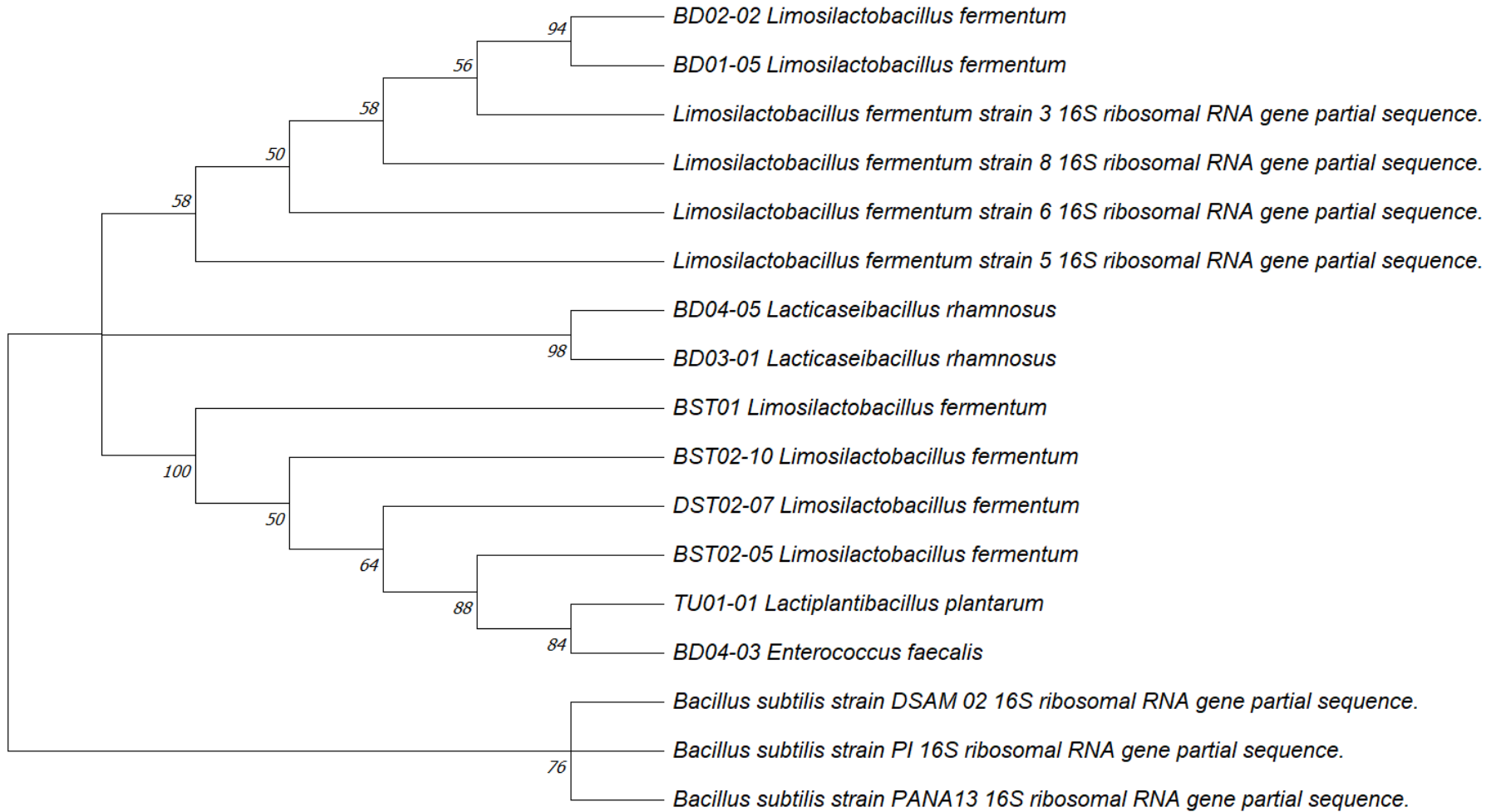
konumlar kaldırılmıştır (çift yönlü silme seçeneği). Nihai veri setinde toplam 1498 pozisyon bulunmaktadır. Evrimsel analizler MEGA11'de yapılmıştır (Tamura K ve ark.,2021).

Evrimsel yakınlıklarını belirlemek için seç-bağla (bootstrap) yöntemi 50 tekrarlı kullanılmıştır. Çalışmada tanılanan izolatların gösterildiği filogenetik ağaç Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.5. Çalışmada tanılanan izolatların gösterildiği filogenetik ağaç

Çalışmada tanılanan izolatlar ile diğer bakteri türleri karşılaştırmasını gösteren filogenetik ağaç Şekil 4. 5.'de verilmiştir.



Şekil 4.6. Çalışmada tanımlanan izolatlar ile diğer bakteri türleri karşılaştırmasını gösteren filogenetik ağaç

DNA izolasyonunun ardından 16S rRNA bölgesi PZR protokolü ile çoğaltılmıştır. İzolatların *Enterococcus* spp ve *Streptococcus* spp olarak tanımlandığı moleküler tanımlamayı sağlayan 16S rRNA genini çoğaltmak için evrensel primerler kullanılmıştır.

De Urreza ve ark., (2000) yaptıkları çalışmada, laktik asit bakterilerinin DNA parmak izlerini, *Streptococcus pneumoniae* genomunda bulunan tekrarlayan elementlere (BOX PCR) dayanan bir primer kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonuyla üretmişlerdir. Yöntemi, çiğ süt, endüstriyel starter ve yoğurttan 37 izolatın tanımlanmasında kullanmışlardır. *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lb. delbrueckii subsp bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* tür, alt tür ve suş seviyesinde farklılaşmanın mümkün olduğunu ve BOX-PCR aynı zamanda bir starter kültürün suş kompozisyonunun incelenmesine ve ticari fermente sütteki suşların doğrudan tespitine de uygulanabileceğini belirtmişlerdir.

16S rRNA bölgesi, prokaryotik mikroorganizmaların ribozomundaki 30S alt ünitesinin bir parçasıdır. Prokaryotik canlıların tanımlanmasını ve filogenetik olarak sınıflandırılmasını sağlayan, yaklaşık 1500 bazlık korunmuş bir bölgedir. 16S rDNA tarafından kodlanır ve prokaryotik mRNA'nın çevirisi sırasında anahtar rolündedir. Diğer bir özelliği ise ribozomun A bölgesinde kodon ve antikodon eşleşmesini dengelemektir (Chatellier ve ark., 2014).

Kafkaskıray, (2020) tarafından yapılan çalışmada, MRS besiyerinde üretilen 40 adet laktik asit bakterisi moleküler tanımlama analizini gerçekleştirmek için izole edilmiştir. 16S rDNA moleküler analizi sonucunda 40 LAB suşunun 38'inin *L. plantarum*, 2'sinin ise *L.brevis* olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda TU01-01 olarak kodlanan laktik asit bakterisinin türü moleküler tanımlama analizi sonucunda *L. plantarum* olarak tespit edilmiştir, Kafkaskıray, (2020)'nin çalışmasıyla benzer özelliktedir. Xu ve ark. (2020), fermente süt mısırından izole ettikleri laktik asit bakterisi olan L15 suşunun 16S rRNA moleküler tanımlama analizi sonucunda *Limosilactobacillus fermentum* olduğunu raporlamışlardır. Çalışmamızda BST01, BST02-05, BST02-07, BST02-10, BD01-05 ve BD02-02 olarak kodlanan izolatların 16S rRNA moleküler tanımlama analizi sonuçları, Xu ve ark. (2022) ile benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda izole edilen BD03-01, BD04-03 ve BD04-05 izolatlarının ise moleküler tanımlama analizi sonuçları, Kafkaskıray, (2020) ve Xu ve ark (2022) tarafından belirtilen sonuçlardan farklılık göstermektedir.

4.3. İzolatların bazı patojenlere karşı inhibisyon etkisi

4.3.1 Agar Spot Testi

Agar spot testi sonucunda *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 22644 referans bakterisine karşı en yüksek zon çapı BD04-05 izolatında ölçülmüş (20,9 mm), en düşük zon çapı ise B03-01 izolatında ölçülmüştür (7,02 mm). *S. aureus* ATCC 25923 Referans bakterisine karşı en yüksek zon çapı BD04-05 izolatında ölçülürken (18,68 mm), en düşük zon çapı TU01-01 izolatında ölçülmüştür (9,97 mm). *E. coli* ATCC 25922 referans üne karşı en yüksek zon çapının TU01-01 izolatında ölçülmesine karşın (33,5 mm), en düşük zon çapı BD03-01'de ölçülmüştür (10,84 mm). *A. hydrophila* AH1 izolatına

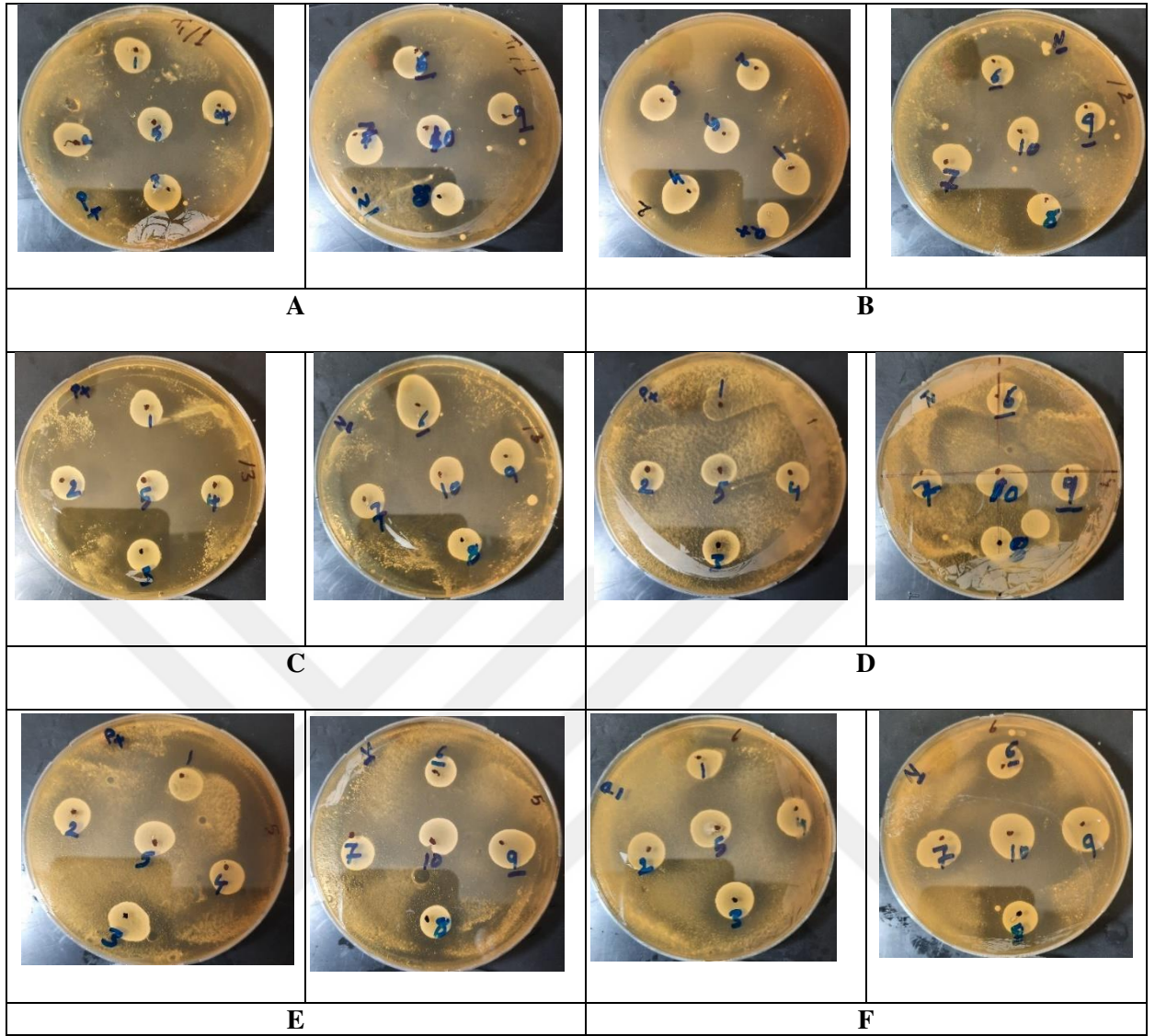
karşı BD01-05 (5,24 mm), BD02-02 (13,31 mm), BD03-01 (8,2 mm) ve BD04-05 (7,73) izolatlarında antimikrobiyal aktivite zon çapı gözlemlenirken, diğer izolatlarda antimikrobiyal aktivite zon çapı gözlemlenmemiştir. *S. epidermidis* ATCC 35948 referans izolatına karşı en yüksek zon çapı BST02-05 izolatında gözlemlenmiş, en düşük zon çapı BD02-02 izolatında ölçülmüştür. *L. garvieae* LG1 referans izolatına karşı ise hiçbir laktik asit bakterisinde antimikrobiyal aktivite zon çapı ölçülmemiştir İzolatların agar spot test sonuçları Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. İzolatların agar spot test sonuçları

No.	<i>Lactobacillus</i> İzolatları	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 22644	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>L.garvieae</i> LG1	1	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35948
1.	BST01	+++*	+++	+++	.*	-	+++
2.	BST02-05	+++	+++	+++	-	-	+++
3.	BST02-07	+++	+++	+++	-	-	++*
4.	BST02-10	++	+++	+++	-	-	++
5.	TU01-01	+++	++	+++	-	-	+++
6.	BD01-05	+++	+++	+++	-	++	++
7.	BD02-02	+++	+++	+++	-	+++	++
8.	BD03-01	++	+++	+++	-	++	++
9.	BD04-03	+++	+++	+++	-	-	+++
10.	BD04-05	+++	+++	+++	-	++	+++

* -, inhibisyon zonu yok; +, inhibisyon zonu < 5 mm; ++, inhibisyon zonu 5–10 mm arasında; +++, inhibisyon zonu > 10 mm.

LAB izolatlarının referans izolatlarda inhibe edici etkisinin agar spot testiyle ölçülmesi sonucunda oluşan zon çaplarının besiyerinde görünümü Şekil 4.6.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. LAB izolatlarının referans izolatlarda inhibe edici etkisinin agar spot testiyle ölçülmesi sonucunda oluşan zon çaplarının besiyerinde görünümü A- *P. aeruginosa* ATCC 22644, B- *S. aureus* ATCC 25923, C- *E. coli* ATCC 25922, D- *L. garvieae* LG1, E- *Aeromonas hydrophila* AH 1, F- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35948.

Karasu ve ark., (2006) tarafından yapılan çalışmada laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitelerinin test edilmesi amacıyla agar spot testi yöntemi kullanılmışlardır. Çalışmanın sonucunda 13 adet *L. plantarum* ve 3 adet *L. pentosus* olmak üzere 16 adet laktik asit bakterisinin *L. sake* Lb790, *L. monocytogenes* Li1, *L. monocytogenes* Li6, *E. coli*, *E. faecium*, *Y. lipolitica*, *P. vulgaris* ve *A. hydrophila* 'ya karşı inhibisyon zon çapı oluşturduğu gözlemlenmiştir. Kıvanç ve Dinçer, (2018) ise pastırmadan izole ettikleri laktik asit bakterilerinde agar spot testi sonucunda hiçbir referans izolata karşı inhibisyon zon çapı gözlemlenmemiştir. Karasu ve ark., (2006) tarafından yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile çalışmamız benzerlik göstermektedir. Kıvanç ve Dinçer, (2018) ise çalışmamızdan farklı sonuçlar elde etmişlerdir.

4.3.2 Kuyu Difüzyon Testi

Laktik asit bakterileri bakteriyosinler, asetik, propiyonik ve laktik asitler gibi birçok madde üretmektedir. Böylece insanları enfekte eden patojenik bakterileri ortadan kaldırmak için kullanılabilecek bakterilerden biri olduğu bilinmektedir (Aytar ve ark., 2019). İzolatların kuyu difüzyon yöntemine göre sonuçları Çizelge 4. 9.'da verilmiştir.

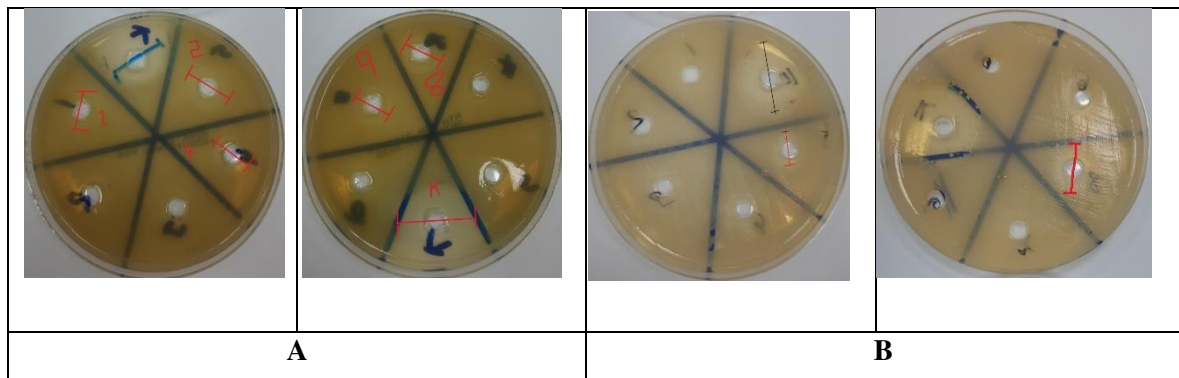
Laktik asit bakteri hücrelerinden elde edilen süpernatant, beş tip referans izolata karşı test edilmiştir. Bu sonuçlara göre izolatlar *P. aeruginosa* ATCC 22644, *L.garvieae* LG1 türlerine karşı inhibisyon etkisi göstermişlerdir. BST01 izolatu ise tüm referans izolatlara karşı inhibisyon etkisi göstermiştir. İzolatların kuyu difüzyon yöntemi sonuçları Çizelge 4.9.'de verilmiştir.

Çizelge 4.9. İzolatların kuyu difüzyon yöntemi sonuçları

		İzolatlar									
		BST 01	BST 02-5	BS 02-07	BST 02-10	TU 01-01	BD 01-05	BD 02-02	BD 03-01	BD 04-03	BD 04-05
Referans izolatlar	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 22644	+++*	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	_*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	+*	+	+	+	+	-	+	-	+	+
	<i>A. hydrophila</i> AH 1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	<i>L.garvieae</i> LG1	+++	+++	-	-	+++	+	++*	+++	-	-
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35948	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* -, inhibisyon zonu yok; +, inhibisyon zonu < 5 mm; ++, inhibisyon zonu 5–10 mm arasında; +++, inhibisyon zonu > 10 mm.

Kuyu difüzyon testi sonuçlarının besiyerinde görünümü ise Şekil 4.7.'da verilmiştir.



Şekil 4.8. LAB izolatlarının referans izolatlarda inhibe edici etkisinin kuyu difüzyon testi ile testile ölçülmesi sonucunda oluşan zon çaplarının besiyerinde görünümü (BST01, BST02-05, BST02-07, BST02-10, TU01-01, BD01-05, BD02-02, BD03-01, BD04-03 ve BD04 -05); (A)- *P. aeruginosa* ATCC 22644, (B)- *S. aureus* ATCC 25923.

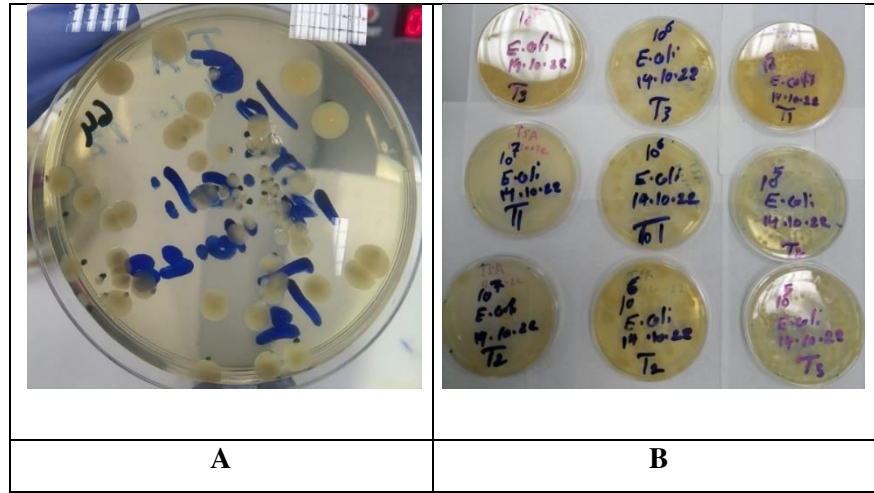
Rebecca ve ark., (2013) yoğurttan izole ettikleri *Lactobacillus* türlerinin *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *K. pneumonia* ve *S. typhi* referans izolatlarına karşı antimikrobiyal aktivitesini test etmek amacıyla kuyu difüzyon yöntemini kullanmışlardır. İzole edilen ve seçilen tüm suşların, *E. coli* referans izolatına karşı inhibisyon zon çapları gözlemlenmiştir. Herreros ve ark., (2005) ise İspanyol keçi sütü peynirinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin (*Lactococcus lactis subsp. lactis*) antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla gerçekleştirdikleri kuyu difüzyon testi sonucunda referans izolatlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Kıvanç ve Dinçer, (2018) ise pastırmadan izole ettikleri laktik asit bakterilerinde kuyu difüzyon testi sonucunda hiçbir referans izolata karşı inhibisyon zon çapı gözlemlenmemiştir. Çalışmalarda elde edilen veriler ile çalışmamız karşılaştırılınca, Rebecca ve ark., (2013) ve Herreros ve ark., (2005)'nin elde ettikleri sonuçların çalışmamızla benzer sonuçlar olmasına karşın, Kıvanç ve Dinçer, (2018)'in çalışmasındaki sonuçlar çalışmamızdan farklıdır.

4.3.3. Sıvı Besiyerinde İnhibisyon Etkinin Belirlenmesi

Daha önceki testlerde, TU01-01 (*L. plantarum*) izolatının referans izolatlar üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Sıvı besiyerinde inhibisyon etkinin belirlenmesi testinde, TU01-01 izolatının hücresiz süpernatantı ile *E. coli* bakterisi 37 °C'de 24 saat birlikte inkübe edilmiştir. Dilüsyon yapılarak TSA agara yayma ekim yapılmıştır. İnkübasyondan sonra her bir petri kabında üreyen koloniler sayılmıştır. Sayım sonucunda, $7.9 \times 10^6 \pm 13.6$ kob/ml bulunurken, aynı şartlarda tek başına üretilen *E.coli*'de bakteri yoğunluğu >300 olarak tespit edilmiştir. TU01-01 izolatı ile aynı ortamda *E. coli* bakterisinin birlikte bulunması durumunda bakteri yoğunluğunda azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, bakteriyel antagonizm geliştiğini düşündürmektedir (Hütt ve ark., 2006).

TSA agar ortamında (TU01-01(*L. plantarum*) bakteri ile (*E. coli* ATCC 25922) izolatların görünümü Şekil 4. 8'de verilmiştir.



Şekil 4.9. TSA agar ortamında (TU01-01(*L. plantarum*) bakteri ile (*E. coli* ATCC 25922) izolatların görünümü A-T2 TSA agar ortamında TU01-01 (*L. plantarum*) bakterisi i(10^6), B- TSA agar ortamında TU01-01 (*L. plantarum*) bakterisi ($10^5, 10^6, 10^7$) (orijinal).

Enterik bakterilerin büyümesinin laktik asit üreten bakteriler tarafından in vitro ve in vivo inhibisyonu, laktik asit bakterilerinin inhibitör maddeler üretme yeteneği ile ilişkilendirilmiştir. İnhibitör maddelerin bazıları kısa zincirli uçucu yağ asitleri ve organik asitler olarak tanımlanmıştır. Laktik asit bakterileri, çevrelerinin pH'ını düşüren ve diğer bakterilerin gelişimini azaltan yüksek konsantrasyonlarda laktik asit üretmek için karbonhidratları fermente ederler (Hinton ve ark., 1992). Ren ve ark., (2019)'nın etlik piliçten izole ettikleri laktik asit bakterileri (LAB) sıvı besiyeri inhibisyon testi sonucunda *E. coli*'ye karşı antagonistik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Çalışmada benzer sonuçlar bulunmuştur.

4.3.4. Çapraz Çizgi Yöntemi Testi

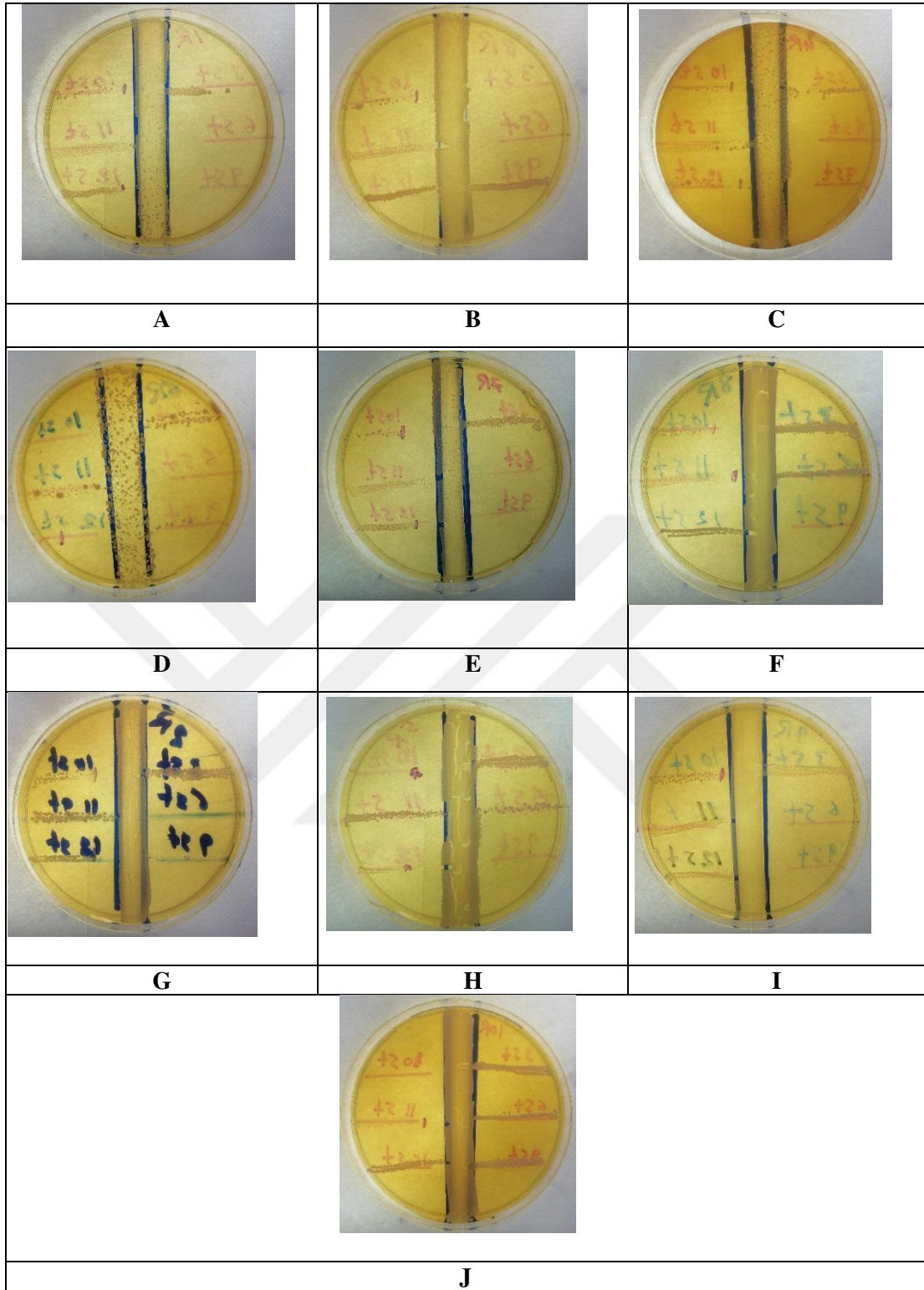
Patojen bakteri türlerini inhibe etmede veya üremelerini sınırlamada kullanılan mikroorganizmaların inhibisyon etkinliğini doğrulamak için kullanılan önemli testlerden biridir. Bu testte, üzerinde çalışılan on laktik asit bakteri suşunun referans izolatlar üzerindeki inhibisyon etkisi belirlendi. Laktik asit bakterilerinin referans izolatlara karşı inhibisyon aktivitesi, üremenin engellendiği bölgenin çapının ölçülmesi ile belirlenmiştir (Khan ve ark., 2023). (Şekil 4.9)

Çapraz çizgi yöntemi testi sonucunda, TU01-01 ve BD02-02 izolatları *E. coli* ATCC 25922 karşı en yüksek inhibisyon aktivitesini gösterdiği tespit edilmiştir. Çapraz Çizgi Yöntemi testi sonuçları Çizelge 4.10.'da verilmiştir. LAB izolatlarının referans izolatlar üzerindeki inhibisyon etkisi Şekil 4. 9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Çapraz Çizgi Yöntemi testi sonuçları

		İzolatlar									
Referans izolatlar		BST01	BST02-05	BST02-07	BST02-10	TU01-01	BD01-05	BD02-02	BD03-01	BD04-03	BD04-05
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 22644	-	0,15±0,2*	3,40±0,2	-*	-	-	-	-	-	-
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	3,90±0,3	3,40±0,5	3,70±0,5	3,60±0,8	0,50±0,7	3,90±0,3	3,50±0,3	-	3,80±0,11	-
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	3,70±0,7	3,70±0,1	-	3,80±0,2	4,00±0,1	-	4,00±0,6	3,10±0,4	3,20±0,16	-
	<i>A. hydrophila</i> AH 1	0,90±0,5	1,50±0,1	0,65±0,07	0,65±0,2	3,90±0,7	2,20±0,1	0,70±0,5	1,45±0,4	0,40±0,1	3,00±0,1
	<i>L. garvieae</i> LG1	-	-	-	-	0,50±0,7	-	-	0,15±0,2	-	0,65±0,9
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35948	0,55±0,0 7	0,55±0,2	0,10±0,1	0,40±0,5	2,00±0,8	2,75±0,2	0,85±0,07	-	0,55±0,7	0,40±0,5

* ort; ortalama, ss; standart sapma, mm (-); suşların dirençli olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.10. LAB izolatlarının referans izolatlar üzerindeki inhibisyon etkisi A-BST01, B-BST02-07, C- BST02-10, D-BD01-05, E- BD02-02, F-BD03-01, G-BST02-05, H-TU01-01, I-BD04-03 ve J-BD04-05

Probiyotikler, zararlı patojenlerin çoğalmasına karşı koyan çeşitli antimikrobiyal maddelerin üretilmesiyle bilinmektedir. Khan ve ark., (2023) *L. rohita*’dan izole edilen COFCAU_PEP4 suşunun çapraz çizgi ve paralel çizgi oluşturma yöntemiyle antagonizma etkisini araştırmışlardır. Antagonizma analizleri (çapraz ve paralel çizgi oluşturma) sonucunda, COFCAU_PEP4 suşunun referans izolatların çoğuna karşı belirgin bir inhibitör kapasitesi olduğu belirlenmiştir. Seçilen izolatın, *Aeromonas spp*’nin çeşitli patojenik suşlarına karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Fang ve ark., (1996) laktik asit bakterilerinin (*LAB*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei* ve *Streptococcus thermophilus*) patojen *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* türleri üzerindeki antagonistik etkisini çapraz çizgi yöntemi testi ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak izolatların *S. aureus* ve *E. coli* referans izolatlarına karşı antagonistik etki gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar ile çalışmamız benzerlik göstermektedir.

4.4. İzolatların Biyofilm Oluşturma Potansiyellerinin Belirlenmesi

4.4.1. Kongo Kırmızısı Bağlama Testi

Testin amacı, test edilen on LAB suşunun, ekstraselüler polimerik maddeler (EPS) polimerik maddeler (EPS) salgılayarak hücre zarı oluşturma yeteneğini belirlemektir (Lahiri ve ark., 2022).

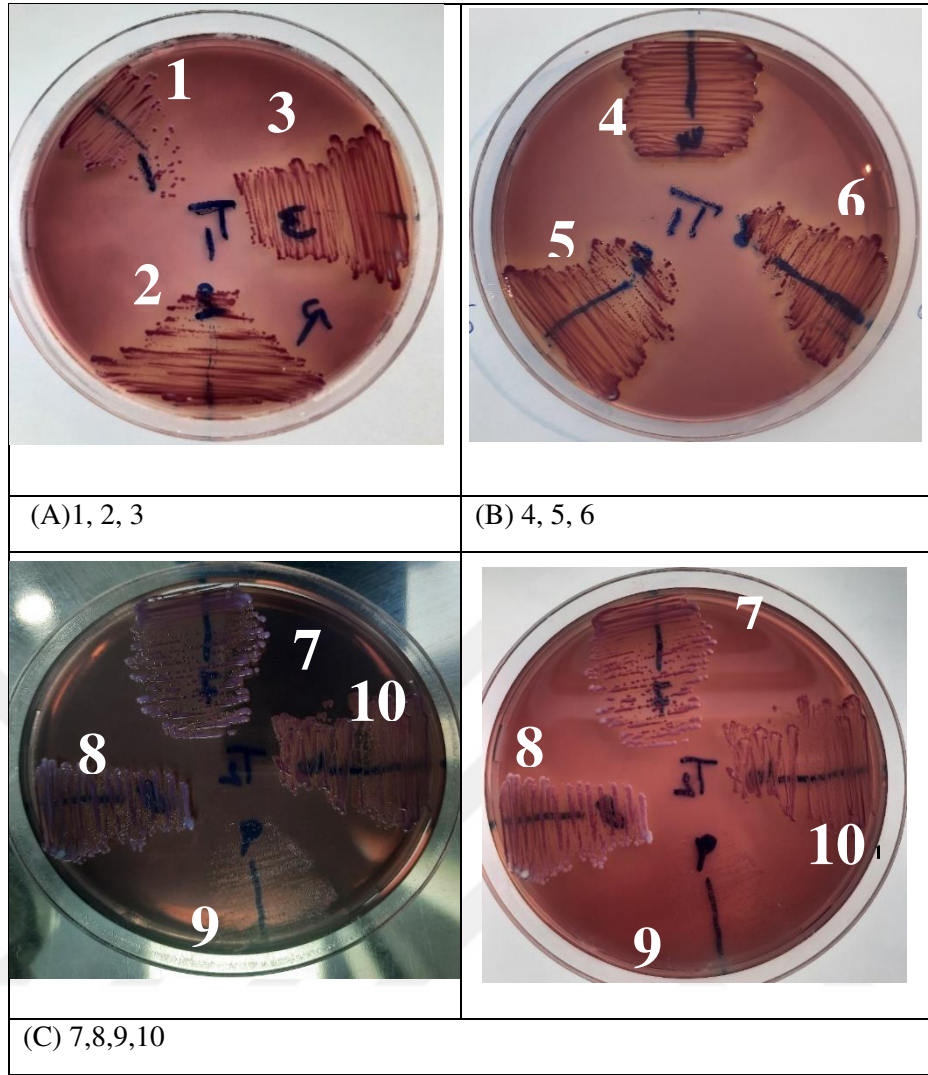
Laktik asit bakteri suşları ((BST01 (*L. fermentum*), BST02-05 (*L. fermentum*), BST02-07 (*L. fermentum*), BST02-10(*L. fermentum*), TU01-01 (*L. plantarum*), BD01-05 (*L. fermentum*), BD04-03 (*E. faecalis*), BD04-05 (*L. rhamnosus*)) MRS-KK agar besiyerinde üretildikten sonra koloniler kırmızı renkte olup sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4. 11; Şekil 4.10).

Laktik asit bakterilerinin suşları (BD02-02 (*L. fermentum*), BD03-01 (*L. rhamnosus*), MRS-KK agar sonra kolonileri beyaz renkte olup, sonuç negatif çıkmıştır. İzolatların kongo kırmızısı bağlama testi sonuçları Çizelge 4. 11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. İzolatların kongo kırmızısı bağlama testi sonuçları

No.	Kod	İzolatlar	Kongo kırmızısı bağlama testi
1.	BST01	<i>L. fermentum</i>	Pozitif
2.	BST02-05	<i>L. fermentum</i>	Pozitif
3.	BST02-07	<i>L. fermentum</i>	Pozitif
4.	BST02-10	<i>L. fermentum</i>	Pozitif
5.	TU01-01	<i>L. plantarum</i>	Pozitif
6.	BD01-05	<i>L. fermentum</i>	Pozitif
7.	BD02-02	<i>L. fermentum</i>	Negatif
8.	BD03-01	<i>L. rhamnosus</i>	Negatif
9.	BD04-03	<i>E. faecalis</i>	Pozitif
10.	BD04-05	<i>L. rhamnosus</i>	Pozitif

İzolatların MRS-KK agar besiyerinde görünümü Şekil 4.10.’da verilmiştir.



Şekil 4. 11. İzolatların MRS-KK agar besiyerinde görünümü (A) (1-BST01, 2-BST02-05, 3-BST02-07), (B) 4-BST02-10, 5-TU01-01, 6-BD01-05 (C) (7- BD02-02,8- BD03-01,9-BD04-03, 10-BD04-05)

Referans izolatlardan, *L. acidophilus* ATCC 4356 *L. pl antarum* ATCC 8014 *P. aeruginosa* ATCC 22644 *S. aureus* DSMZ 4910 *S. aureus* ATCC 25923 *S. epidermidis* *E. coli* ATCC 25922 *A. hydrophila* AH 1 *L. garvieae* LG1 *S. epidermidis* ATCC 35948 TSA-KK agar besiyerinde ürettikten sonra oluşan koloniler kırmızı renkte olup sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4. 12)

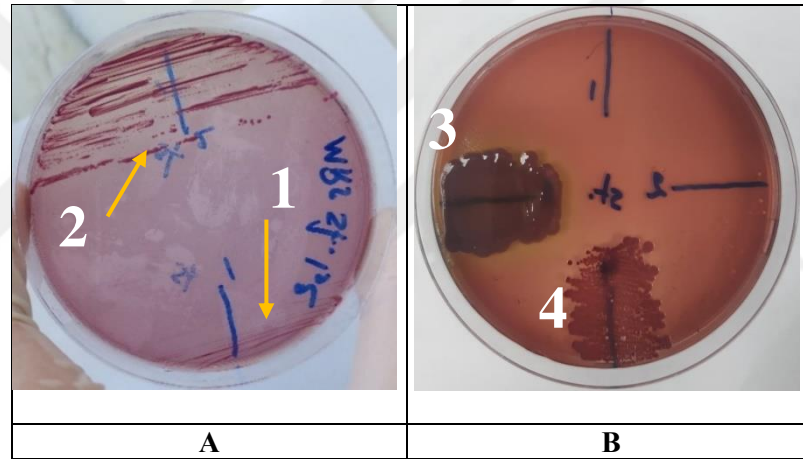
Referans izolatlarından, *C. albicans* DSMZ 30028, *A. baumannii* ATCC BAA-1605, TSA-KK agar besiyerinde ürettikten sonra koloniler beyaz renkte olup sonuç negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4. 12).

Referans izolatların kongo kırmızısı bağlama testi sonuçları Çizelge 4. 12.'de verilmiştir.

Çizelge 4.12 . Referans izolatların kongo kırmızısı bağlama testi sonuçları

No.	İzolatlar	Kongo kırmızısı bağlama testi
1.	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	Pozitif
2.	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	Pozitif
3.	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 22644	Pozitif
4.	<i>C. albicans</i> DSMZ 30028	Negatif
5.	<i>S. aureus</i> DSMZ 4910	Pozitif
6.	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Pozitif
7.	<i>S. epidermidis</i>	Pozitif
8.	<i>A. baumannii</i> ATCC BAA-1605	Negatif
9.	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Pozitif
10.	<i>A. hydrophila</i> AH 1	Pozitif
11.	<i>L.garvieae</i> LG1	Pozitif
12.	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35948	Pozitif

Referans izolatların MRC-KK agar besiyerinde görünümü Şekil 4. 11.'de verilmiştir.



Şekil 4.12. Referans izolatların MRC-KK agar besiyerinde görünümü. A- 1- *L. acidophilus* ATCC 4356, 2- *L. plantarum* ATCC 8014 B- 3- *P. aeruginosa* ATCC 22644, 4- *C. albicans* DSMZ 30028

Mutlu ve ark., (2019) tarafından yapılan bir çalışmada laktik asit bakterilerinin kongo kırmızısı yöntemi kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda tüm izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir, Landeta ve ark., (2013) ise sosislerden izole ettikleri ve *L. sakei* olarak tanımladıkları laktik asit bakterisinin kongo kırmızısı yöntemiyle biyofilm oluşumu testi sonucunu %43 olarak tespit etmişlerdir. Mutlu ve ark., (2019) ve Landeta ve ark., (2013) tarafından yapılan çalışmada elde edilen veriler çalışmamız ile karşılaştırılınca BST01, BST02-05 BST02-07, BST02-10, BD01-05, BD04-03 ve BD04-05 izolatlarının sonuçlarıyla aynıdır. Çalışmamızda BD02-02 ve BD03-01 olarak kodlanan izolatlar ise yapılan çalışmalarda bulunan verilerden farklıdır.

4.4.2. Biyofilm Oluşturma Potansiyeli (Mikroplak Yöntemi)

Biyofilm oluşturma yeteneği, kolonizasyonu teşvik etmesi, LAB'nin konakçının mukozasında daha uzun süre kalıcı olmasını sağlaması ve böylece patojenik bakterilerin kolonizasyonunu önleyebilmesi nedeniyle probiyotik suşlar için önemli bir özellik olarak kabul edilmektedir (Terraf ve ark., 2012).

İzolatlarda belirlenen biyofilm oluşum potansiyeli, BST01, BST02-05, BST02-07 ve BD01-05 izolatlarında diğer izolatlara daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. İzolatlarda belirlenen biyofilm oluşumu Çizelgeler 4.13'te verilmiştir.

Çizelge 4.13. İzolatlarda belirlenen biyofilm oluşumu

No.	İzolat	Biyofilm oluşumu (Å) * (ort±st)*
1.	BST01-01	0,26±0,076
2.	BST02-05	0,27±0,078
3.	BST02-07	0,24±0,069
4.	BST02-10	0,08±0,003
5.	TU01-01	0,08±0,005
6.	BD01-05	0,23±0,076
7.	BD02-02	0,09±0,007
8.	BD03-01	0,08±0,005
9.	BD04-03	0,08±0,005
10.	BD04-05	0,08±0,004
11.	Kontrol (MRS)	0,09±0,007

(Å) * = 570 nm OD *ort=ortalama, st=standart hata

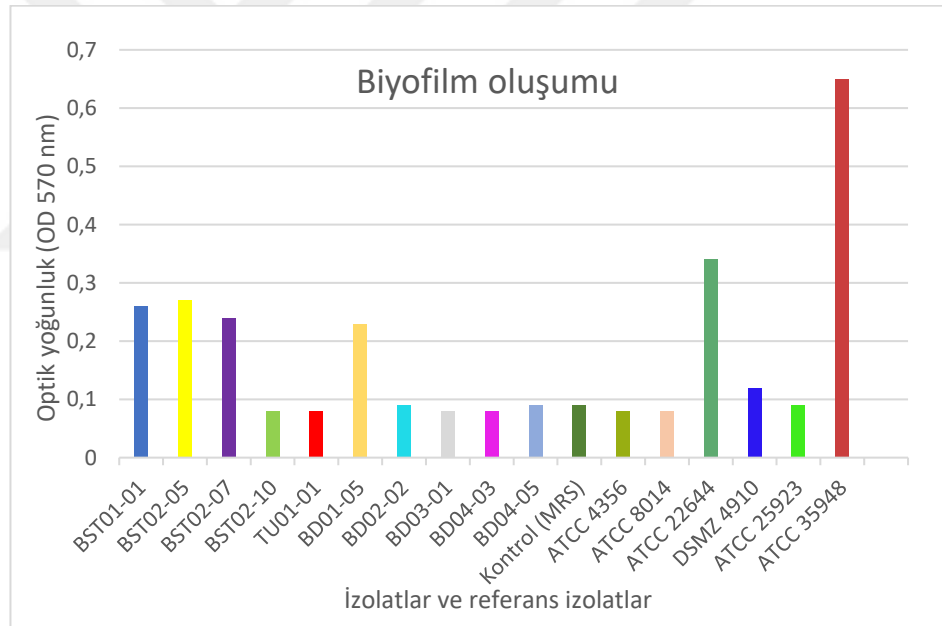
Referans izolatlarda belirlenen biyofilm oluşumu değeri en yüksek ATCC 35948 izolatında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4. 12.) Referans izolatlarda belirlenen biyofilm oluşumu Çizelge 4. 14.'de verilmiştir.

Çizelge 4. 14. Referans izolatlarda belirlenen biyofilm oluşumu

No.	Referans izolat	Biyofilm oluşumu (Å) * (ort±st)*
1.	ATCC 4356	0,08±0,004
2.	ATCC 8014	0,08±0,003
3.	ATCC 22644	0,34±0,033
4.	DSMZ 4910	0,12±0,030
5.	ATCC 25923	0,09±0,006
6.	ATCC 35948	0,65±0,255

(Å) * = 570 nm OD *ort=ortalama, st=standart hata

İzolatlar ve referans izolatların biyofilm üretme düzeylerine ait absorban değerleri Şekil. 4.12.'de verilmiştir.



Şekil 4. 13. İzolatlar ve referans izolatların biyofilm üretme düzeylerine ait absorban değerleri

Mikroplak yönteminde, BST01, BST02-05, BST02-07 ve BD01- 05 izolatlarının orta derecede biyofilm oluşturma yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. İzolat ve referans izolatların biyofilm oluşturma yeteneğinin belirlenmesi sonuçları Çizelge 4.15.'de verilmiştir.

Çizelge 4.15. İzolat ve referans izolatların biyofilm oluşturma yeteneğinin belirlenmesi sonuçları

No.	Kodu	Referans izolatlar			Biyofilm üretimi
1.	ATCC 4356	<i>L. acidophilus</i>			Ü
2.	ATCC 8014	<i>L. plantarum</i>			Ü
3.	ATCC 22644	<i>P. aeruginosa</i>			O
4.	DSMZ 4910	<i>S. aureus</i>			Z
5.	ATCC 25923	<i>S. aureus</i>			Z
6.	ATCC 35948	<i>S. epidermidis</i>			G
No.	Kodu	İzolatlar			Biyofilm üretimi
1.	BST01-01	<i>L. fermentum</i>			O
2.	BST02-05	<i>L. fermentum</i>			O
3.	BST02-07	<i>L. fermentum</i>			O
4.	BST02-10	<i>L. fermentum</i>			Ü
5.	TU01-01	<i>L. plantarum</i>			Ü
6.	BD01-05	<i>L. fermentum</i>			O
7.	BD02-02	<i>L. fermentum</i>			Ü
8.	BD03-01	<i>L. rhamnosus</i>			Ü
9.	BD04-03	<i>E. faecalis</i>			Ü
10.	BD04-05	<i>L. rhamnosus</i>			Ü
Referans mikroorganizmalar	06	Güçlü	Orta	Zayıf	Üretici değil
		1 (%16,66)	1 (%16,66)	2 (%33,33)	2 (%33,33)
İzolatlar	10	Güçlü	Orta	Zayıf	Üretici değil
		0(% 0)	4 (%40,00)	0(%0)	6 (%60,00)
Total	16	Güçlü	Orta	Zayıf	Üretici değil
		1 (%6,25)	5 (%31,25)	2 (%12,05)	8 (%50,00)
G: Güçlü üretici, O: Orta derecede üretici, Z: Zayıf, Ü:Üretici değil					

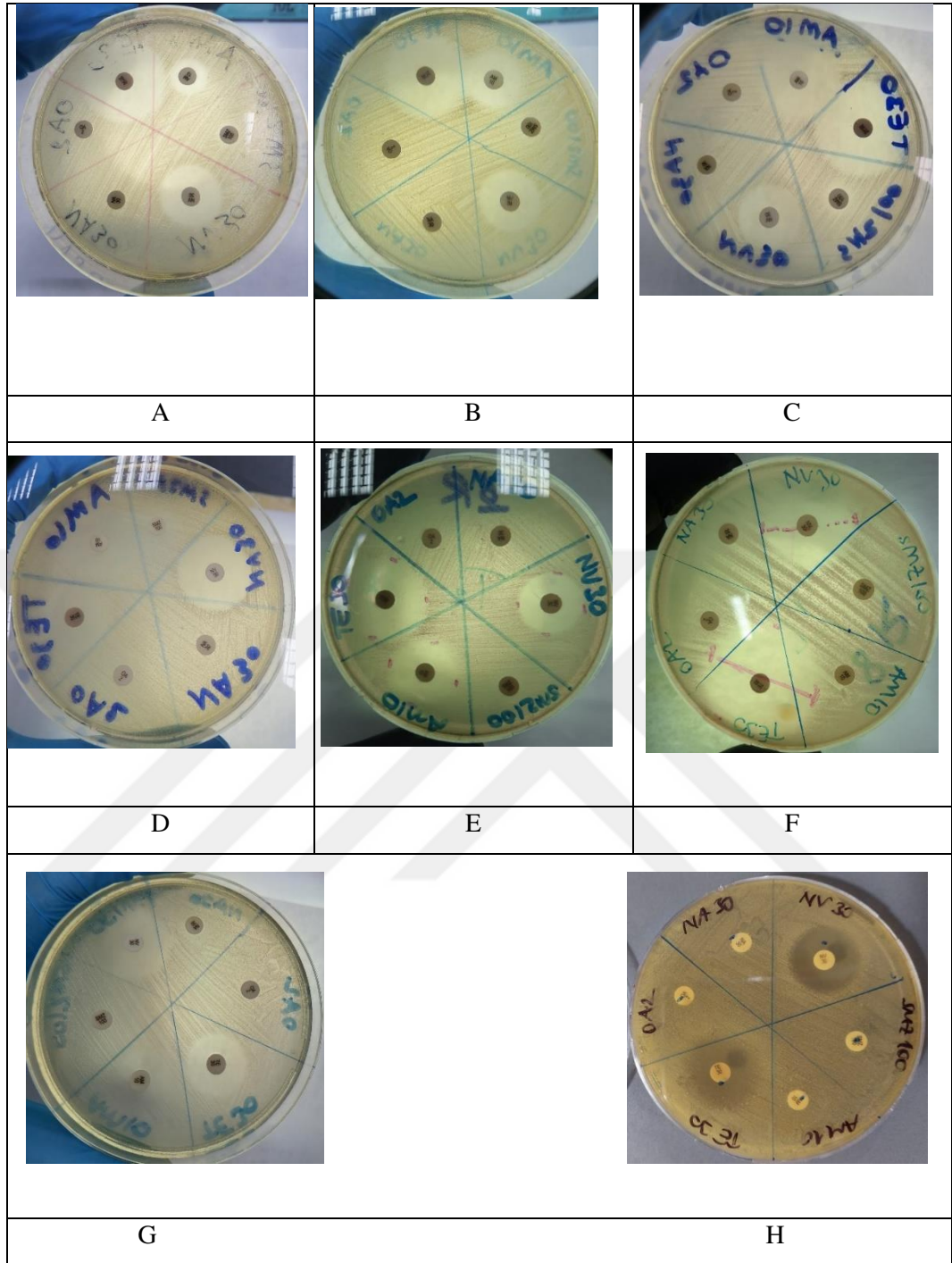
Gomez ve ark. (2016), çeşitli yiyeceklerden izole ettikleri laktik asit bakterileri olan *L. lactis* 368 (1,65), *Lactobacillus helveticus* 352 ve *L. lactis* 94 izolatlarının mikropalak yöntemiyle 595 nm’de biyofilm oluşumu testi sonucunu sırasıyla 1.65, 1.38 ve 1.10 olarak tespit etmişlerdir. İzole edilen laktik asit bakterilerinde biyofilm oluşturma kapasitesinin olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca

Mahgoub ve ark. (2022), izole ettikleri laktik asit bakterisinin 2/3'ünün biyofilm oluşturma özelliğinin olduğunu tespit etmişlerdir. Akoğlu, (2020) ise peynirden izole edilen *Enterococcus lactis* EC61 ve *Enterococcus faecalis* EC41 suşlarının önemli derecede biyofilm oluşumu gösterdiğini belirtmiştir. Gomez ve ark. (2016), Mahgoub ve ark. (2022) ve Akoğlu (2020)'nin bildirdikleri sonuçlardan elde edilen bazı veriler çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

4.5. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Agar disk difüzyon testi, bakterilerin antibiyotiklere duyarlılığını test etmek için yaygın bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların kültürel büyümesinin engellendiği bölgenin çapı ölçülerek, incelenen antibiyotiğe karşı hassas veya dirençli olması durumu değerlendirilmektedir (Dickert ve ark., 1981).

Seçilen 10 adet laktik asit bakterisi olan BST01, BST02-05, BST02-07, BST02-10, TU01-01, BD01-05, BD02-02, BD03-01, BD04-03 ve BD04-05 izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi disk difüzyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Tüm izolatların gentamisin (CN10), nalidiksik asit (NA30), oksolinik asit (OA2) ve sülfametoksazol (SMZ 100) antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu bulunmuştur. Eritromisin (E15) ve novobiyosin (NV 30) antibiyotiklerine karşı BD02-02 izolatu direnç geliştirirken, diğer izolatlar hassasiyet göstermiştir. Trimetoprim-sülfametoksazol (SXT 25) antibiyotiğine karşı BST02-05, BD02-02 BD03-01 ve BD04-05 izolatları direnç geliştirmiş, BST02-07, BST02-10 ve BD01-05 izolatları orta derecede hassasiyet göstermiş, BST01, TU01-01 ve BD04-03 izolatları ise hassasiyet göstermiştir. Nitrofurantoin (F300) antibiyotiğine karşı sadece BD02-02 ve BD04-05 izolatları direnç geliştirmiş, diğer izolatlar hassasiyet göstermiştir. Vankomisin (VA 30) antibiyotiğine karşı sadece BD04-03 izolatu hassasiyet gösterirken, diğer tüm izolatlar direnç geliştirmiştir. Tetrasiklin (TE30) antibiyotiğine karşı BD02-02 izolatu direnç geliştirmiş, BD04-03 ve BD04-05 orta derecede hassasiyet göstermiş, diğer izolatlar ise hassasiyet göstermiştir. Ampisilin (AM10) antibiyotiğine karşı BST01, BD02-02, BD03-01 ve BD04-05 izolatları direnç geliştirmiş, BST02-05 izolatu orta derecede hassasiyet göstermiş ve diğer izolatlar hassasiyet göstermiştir. İzolatların antibiyotiklere duyarlılığının besiyerinde görünümü Şekil 4.13'te verilmiştir.



Şekil 4.14. İzolatların antibiyotiklere duyarlılığı besiyerinde görünümü A- BST01, B- BST02-05, C- BST02-10, D- TU01-01, E- BD01-05, F- BD03-01, G- BD04-03, H- BD04-05

LAB suşlarının antibiyotik duyarlılık testinin sonuçları Çizelge 4. 16.'da verilmiştir.

Çizelge 4. 16. LAB suşlarının antibiyotik duyarlılık testinin sonuçları

No.	A. K.*	BST 01	BST0 2-05	BST0 2-07	BST0 2-10	TU0 1-01	BD0 1-05	BD0 2-02	BD0 3-01	BD0 4-03	BD0 4-05
1.	CN10	R*	R	R	R	R	R	R	R	R	R
2.	E15	S*	S	S	S	S	S	R	S	S	S
3.	SXT25	S	R	MS*	MS	S	MS	R	R	S	R
4.	F300	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
5.	VA30	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
6.	TE30	S	S	S	S	S	S	R	S	MS	MS
7.	OA2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
8.	NA30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
9.	NV30	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
10.	SMZ100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
11.	AM10	R	MS	S	S	S	S	R	R	S	R

*R; dirençli, MS; orta derecede duyarlı, S; hassas, A. K.; antibiyotiklerin kodu.

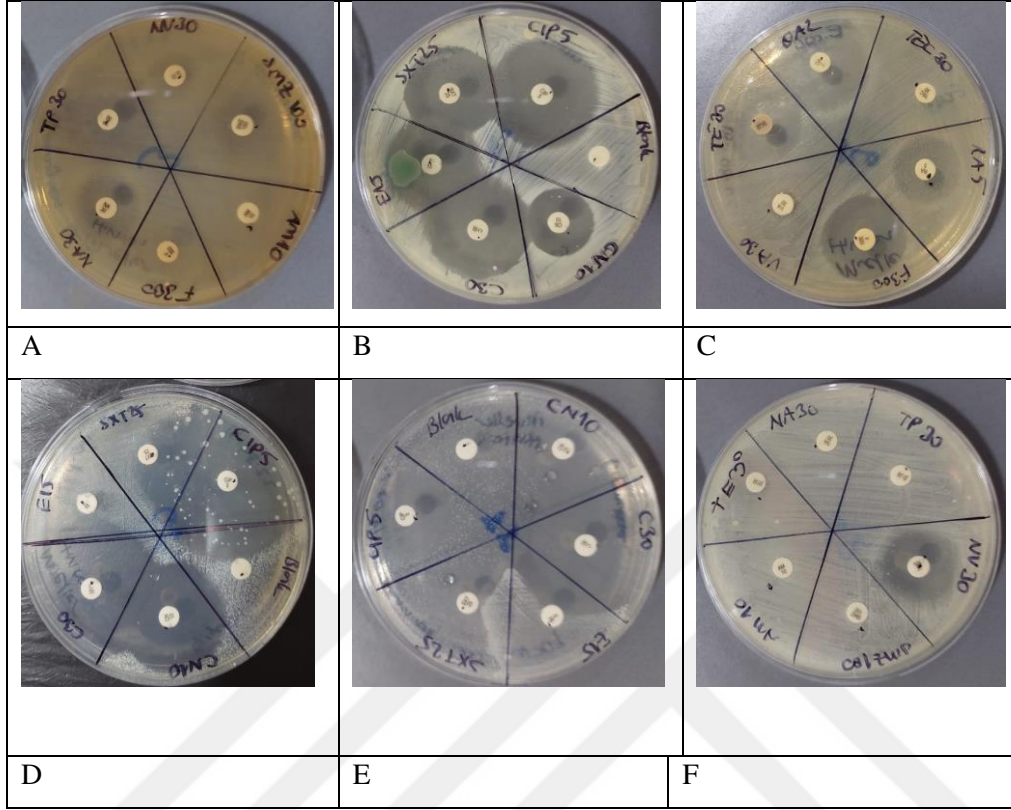
Referans izolatlarda antibiyotik duyarlılık testinin sonuçları Çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4. 17. Referans izolatlarda antibiyotik duyarlılık testinin sonuçları

		Referans İzolatlar					
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 22644	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. hydrophila</i> AH 1	<i>L. garvieae</i> LG1	<i>S.epidermidis</i> ATCC 35948
Antibiyotik Diskleri kodları	CN10	S*	S	S	S	S	R
	E15	R*	S	R	R	R	MS
	SXT25	R	S	S	R	S	R
	F300	R	S	S	S	S	R
	VA30	MS*	S	R	S	S	R
	TE30	R	S	S	R	S	R
	OA2	S	S	S	MS	R	R
	NA30	S	MS	S	S	R	R
	NV30	R	S	R	S	S	S
	SMZ100	S	S	MS	R	R	R
	AM10	R	R	R	R	R	R

*R= Dirençli, MS= Orta derecede duyarlı, S= Duyarlı

Referans izolatların antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının besiyerinde görünümü Şekil 4.14.'de verilmiştir.



Şekil 4.15. Referans izolatların antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının besiyerinde görünümü A- *P. aeruginosa* ATCC 22644, B- *S. aureus* ATCC 25923, C- *E. coli* ATCC 25922 D- *A. hydrophila* AH 1, E- *L. garvieae* LG1, F- *S. epidermidis* ATCC 35948

Küçükönder ve ark., (2022) tarafından yapılan antibiyotik duyarlılık testinde izole edilen LAB'nin, klinik tedavilerde kullanılan bazı antibiyotiklere karşı dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. 15 *Lactobacillus* spp. izolatının tamamı (% 100) kanamisin, streptomisin ve ampiciline, 13'ü (% 86,6) eritromisin, 12'si (% 80) gentamisin ve vankomisine, 11'i (% 73,3) rifampisine ve tetrasikline, 9'u (% 60) kloramfenikole, 8'i (% 53,3) penisiline dirençli olduğu bulunmuştur. Akçay ve Gündoğan, (2019) yaptıkları çalışmada peynir ver çiğ süt örneklerinden izole ettikleri *Lactobacillus* türlerinin antibiyotik dirençliliklerini incelemişler ve izolatların ampiciline (%73,5) karşı oldukça dirençli, ancak tetrasiklin (% 14,7), penisilin (%8,8), kloramfenikol (%5,8) ve eritromisine (%2,9) duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte çalışmada *Lb. paracasei* suşlarının tümü kanamisin'e karşı dirençli, kloramfenikol ve penisiline karşı ise %100 duyarlı bulunmuştur. Aynı zamanda *Lb. paracasei* suşlarının vankomisin ve ampiciline %100 oranında, eritromisine %83,3 oranında, gentamisine %50 oranında, rifampisine ve tetrasikline %33,3 oranında dirençli olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca *Lb. plantarum* suşlarının eritromisin, penisilin (%88,88) ve vankomisine (%66,6) dirençli olduğu da belirlenmiştir. Ancak *Lb. plantarum* olarak tanımlaması yapılan GM5, GM7, GM10 izolatlarının ise vankomisine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda bulunan veriler ile çalışmamızda bazı sonuçların benzer olduğu görülmektedir.

4.6. Hücre dışı enzim üretme kapasitesinin değerlendirilmesi

Hücre dışı enzimlerin (amilaz, lipaz, ve selüloz) üretim aktiviteleri, %1,5 nişasta, %1 Tween 80 ve %1 karboksimetil selüloz (CMC) içeren MRS agar plakaları üzerinde on izolat için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Hücre dışında enzimlerin (amilaz, lipaz ve selüloz) üretimine yönelik yapılan test sonuçları değerlendirildiğinde, bakteri kolonilerinin çevresinde şeffaf bir alan oluşmadığı ve tüm izolatların negatif sonuç verdiği belirlenmiştir (Şekil 4.15).

Yağsız süt agar plakalarında üreyen izolatların etrafında şeffaf bölgeler olduğu ve izole edilen tüm suşların proteaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Laktik asit bakteri suşlarının (BST01, BST02-05, BST02-07, TU01-01, BD01-05, BD03-01) yüksek oranlarda hücre dışı proteaz enzimi salgıladığı saptanmıştır (Çizelge 4. 18.; Şekil 4.15.).

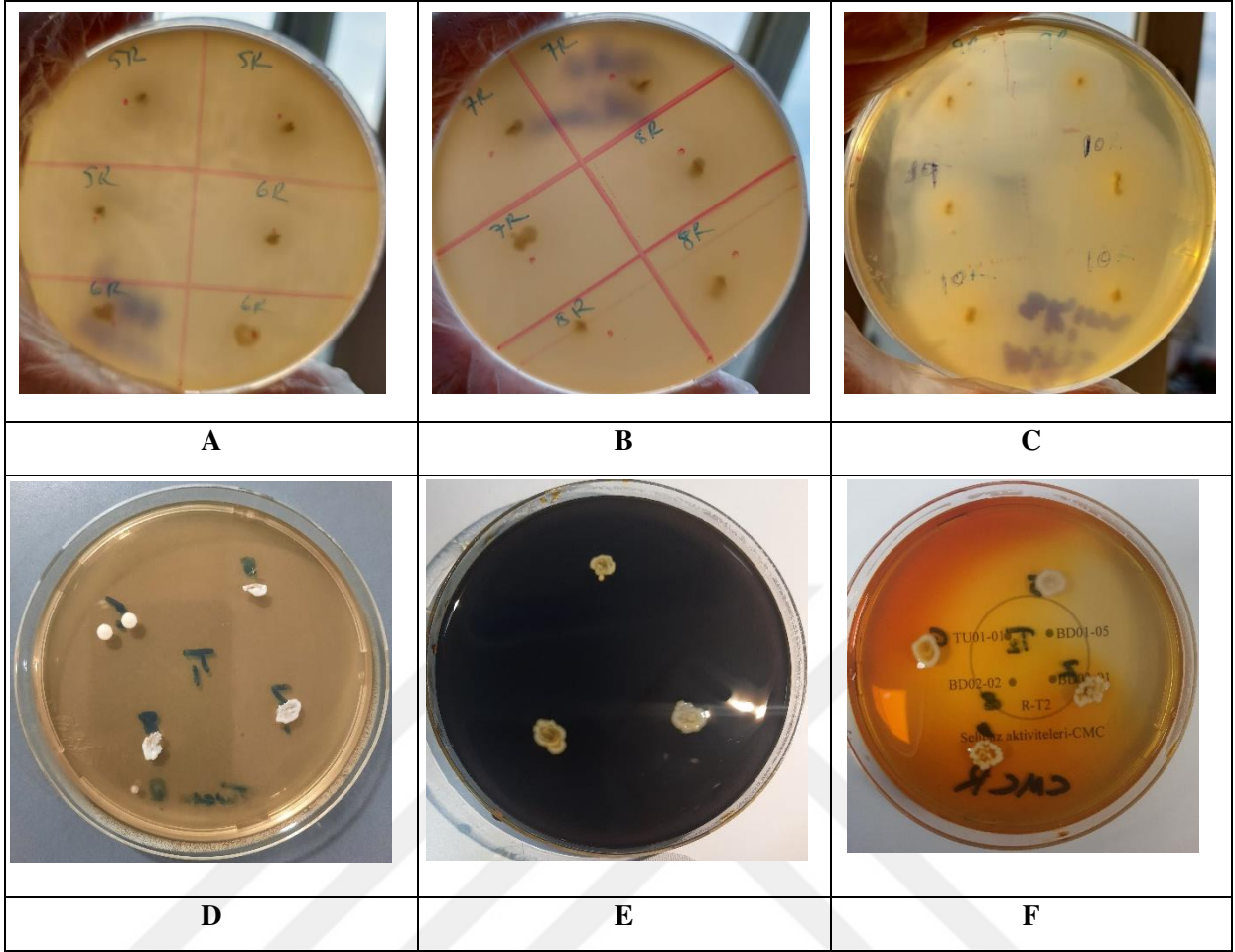
LAB izolatlarının proteaz, amilaz lipaz ve selüloz aktivitesi değerleri Çizelge 4.18.'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. LAB izolatlarının proteaz, amilaz lipaz ve selüloz aktivitesi değerleri

No.	Kod	Proteaz aktivitesi (ort ± s.s)*	Amilaz aktivitesi (ort ± s.s)	Lipaz aktivitesi (ort ± s.s)	selüloz aktivitesi (ort ± s.s)
1.	BST01	20,33 ± 0,5*	-	-	-
2.	BST02-05	18,00 ± 2,0	-	-	-
3.	BST02-07	20,00 ± 1,0	-	-	-
4.	BST02-10	15,66 ± 0,5	-	-	-
5.	TU01-01	20,00 ± 1,0	-	-	-
6.	BD01-05	20,33 ± 2,5	-	-	-
7.	BD02-02	14,33 ± 0,5	-	-	-
8.	BD03-01	17,33 ± 1,15	-	-	-
9.	BD04-03	11,36 ± 1,5	-	-	-
10.	BD04-05	13,00 ± 0,0	-	-	-

*ort; ortalama, ss; standart sapma (mm)

LAB izolatlarının proteaz, lipaz amilaz ve selüloz aktivitelerinin besiyerinde görünümü Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.16. LAB izolatlarının proteaz, lipaz, amilaz ve selüloz aktivitelerinin besiyerinde görünümü A- TU01-01 ve BD01-05'te hücre dışı proteaz enzim aktivitesi B- BD02-02 ve BD03-01, C- BD04-03 ve BD04-05'in hücre dışı proteaz enzim aktivitesi D- BD01-05, BD02-02, BD03-01 ve BD04-03'ün hücre dışı lipaz enzim aktivitesi E- BST01, BST02-05 ve BST02-07 hücre dışı amilaz enzim aktivitesi F- BD01-05, B- BD02-02, BD03-01 ve BD04-03 hücre dışı selüloz enzim aktivitesi (orijinal).

Aguiar ve ark. (2000), laktik asit bakterisi olan *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T izolatında hücre dışı amilaz enzim aktivitesinin var olduğunu bildirmişlerdir. Nurliana ve ark. (2022), laktik asit bakterisi olan *Enterococcus hirae* P31H62, *Enterococcus mundtii* P33S52 ve *E. hirae* P33S6272 izolatlarında hücre dışı selüloz enzim aktivitesini tespit etmişlerdir. Kıvanç ve Dinçer, (2018) pastırmadan izole ettikleri 50 adet laktik asit bakterisinde lipaz aktivitesi olduğunu bildirmişlerdir. Coimbra-Gomes ve ark. (2023), zeytinden izole ettikleri *Lactiplantibacillus pentosus* ve *L. paraplantarum* türlerinin proteaz enzim aktivite zon çapı gösterdiklerini bildirmişlerdir. Zareie ve ark., (2023) ise peynirden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin proteaz enzim aktivitesini değerlendirmiş, seçilen ve proteaz enzim aktivite zon çapı değerlendirilen laktik asit bakterilerinin proteaz enzim aktivitesi bakımından pozitif olduğunu tespit etmişlerdir. Aguiar ve ark. (2000), Nurliana ve ark. (2022), Kıvanç ve Dinçer, (2018) bulgularının çalışmamızdan farklı olduğu görülmektedir. Çalışmamızda seçilen izolatlarda sadece proteaz enzim aktivitesinin gözlemlenmesi, Coimbra-Gomes ve ark. (2023) ve Zareie ve ark., (2023)'nın tespit ettikleri sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada laktik asit bakterileri ev yapımı turşulardan, anne sütünden ve bebek dışkılarından izole edilerek saflaştırılıp 16S rRNA dizileri kullanılarak moleküler tekniklerle identifikasyonu yapılmıştır. Elde edilen izolatların bazı patojenlere karşı inhibisyon etkisi, biyofilm oluşturma potansiyelleri, antibiyotik direncinin belirlenmesi ve bazı enzim aktivitelerinin tespitine dair bazı analizler gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla, dört anneden süt örnekleri, emzirilen dört çocuktan dışkı örnekleri, salatalık ve pancar turşusundan alınan örnekler steril koşullarda laboratuvara getirilmiştir. Anne sütünden (17), bebek dışkısından (21) ve turşulardan (8) laktik asit bakterisinin izolatları (46) elde edilmiştir. BST03-2 suşu dışında diğer suşlara ait sonuçlar pozitif olarak kaydedilmiştir. Tüm izolatlarda gram testi ve katalaz testi yapıldıktan sonra farklı görünen koloni ve hücre morfolojilerine sahip olan on izolat (BST01, BST02-05, BST02-07, BST02-10, TU01-01, BD01-05, BD02-02, BD03-01, BD04-03, BD04-05) seçilmiştir.

16S rRNA dizileri kullanılarak moleküler tekniklerle BST01 (*L. fermentum*) BST02-05 (*L. fermentum*), BST02-07 (*L. fermentum*), BST02-10 (*L. fermentum*), TU01-01 (*L. plantarum*), BD01-05 (*L. fermentum*), BD02-02 (*L. fermentum*), BD03-01 (*L. rhamnosus*), BD04-03 (*E. faecalis*), BD04-05 (*L. rhamnosus*) olarak tanılanmıştır. Tanılan türler NCBI/GenBank veri tabanına kaydedilmiştir.

İzolatların bazı patojenlere karşı inhibisyon etkisini belirlemek amacıyla agar spot testi, kuyu difüzyon testi, sıvı besiyerinde üreme ve çapraz çizgi yöntemi testleri yapılmıştır. Agar spot testinde incelenen on izolatın *P. aeruginosa* ATCC 22644, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 ve *S. epidermidis* ATCC 35948 referans izolatlar üzerinde inhibe edici etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Tüm izolatların *L. garvieae* LG1 üzerinde inhibe edici etkiye sahip olmadıkları belirlenmiştir. Kuyu difüzyon testinde incelenen on izolattan BST02-07 izolatı hariç tüm izolatların, *P. aeruginosa* ATCC 22644 referans izolatına karşı inhibe edici etkiye sahip oldukları saptanmıştır. Sıvı besiyerinde inhibisyon etkinin belirlenmesi testinde, TU01-01 izolatı ile aynı ortamda *E. coli* ATCC 25922 bakterisinin birlikte bulunması durumunda bakteri yoğunluğunda azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç bakteriyel antagonizm geliştiğini düşündürmektedir. Çapraz çizgi yöntemi testi sonucunda, TU01-01 ve BD02-02 izolatları *E. coli* ATCC 25922 karşı en yüksek inhibisyon aktivitesini gösterdiği tespit edilmiştir.

İzolatların biyofilm oluşturma potansiyeli, kongo kırmızısı boyama testi ve mikropalak yöntemi ile incelenmiştir. Kongo kırmızısı boyama testinde, BST01, BST02-05, BST02-07, BST02-10, TU01-01, BD01-05, BD04-03, BD04-05 izolatları biyofilm oluşturma yeteneği oluştururken BD02-02, BD03-01 izolatlarının bu özelliği taşımadığı tespit edilmiştir. Mikropalak yönteminde ise BST01, BST02-05, BST02-07 ve BD01-05 izolatlarının orta derecede biyofilm oluşturma yeteneğinde olduğu belirlenmiştir.

Antibiyotik duyarlılık testinde, tüm izolatların gentamisin (CN10), nalidiksik asit (NA30), oksolinik asit (OA2) ve sülfametoksazol (SMZ 100) antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Hücre dışı enzim üretme kapasitesinin değerlendirilmesi testinde çalışmada incelenen tüm izolatların (BST01, BST02-05, BST02-07, BST02-10, TU01-01, BD01-05, BD02-02, BD03-01, BD04-03, BD04-05) hücre dışı proteaz enzimi aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir.

Laktik asit bakterilerinin bazı patojenlere karşı inhibisyon özelliklerinin in vitro çalışmalarla belirlenmesi, hastalıklara karşı koruma sağlamada in vivo uygulamalar için, fonksiyonel bakteri izolatlarının seçiminin temelini oluşturur. Bu nedenle, etkin izolatların yararları oldukları söylenmeden önce belirtilmesi gereken önemli husus, yararlı bir etkinin ancak in vivo çalışmalarla gösterilebileceğidir. Daha ileri aşamalarda in vivo etkilerin ortaya konulabilmesi için, deneysel çalışmaların kurulması uygun olacaktır. Yapılan bu çalışmanın ileride bu konu ile ilgili yapılabilecek çalışmalara referans oluşturabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abd Mutalib, N., Syed Mohamad, S.A., Jusril, N.A., Hasbullah, N.I., Mohd Amin, M.C.I., and Ismail, N.H., 2023. Lactic Acid Bacteria (LAB) and Neuroprotection, What Is New? An Up-To-Date Systematic Review. *Pharmaceuticals* 16, 712. <https://doi.org/10.3390/ph16050712>
- Abdullah, D., Poddar, S., Rai, R.P., Purwati, E., Dewi, and N.P., Pratama, Y.E., 2022. Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria an Approach to Sustainable Food Security. *J Public Health Res* 10, jphr.2021.2508. <https://doi.org/10.4081/jphr.2021.2508>
- Aguliar, G., J Morlon-Guyot, J., Trejo-Aguilar, B., and Guyot, J.P., 2000. Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(6): 406-413.
- Akoğlu, A., 2020. The effect of some environmental conditions on planktonic growth and biofilm formation by some lactic acid bacteria isolated from a local cheese in Turkey. *Biotechnol Lett* 42, 481–492. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02794-4>
- Al-Allaf, M. A. H., Al-Rawi, A. M. M., and Al-Mola, A. T. (2009). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from minced beef meat against some pathogenic bacteria. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 23(3).
- Alang, H., Kusnadi, J., and Ardiyati, T., 2019. Identification of lactic acid bacteria as antimicrobial from milk Toraja Belang buffalo. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 230, 012092. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/230/1/012092>
- Albesharat, R., Ehrmann, M.A., Korakli, M., Yazaji, S., and Vogel, R.F., 2011. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology* 34, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.12.001>
- Al-Malkey, M. K., Ismeeal, M. C., Al-Hur, F. J. A., Mohammed, S. W., and Nayyef, H. J. (2017). Antimicrobial effect of probiotic *Lactobacillus* spp. on *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Contemporary Medical Sciences*, 3(10).
- Ambalam, P., Kondepudi, K.K., Nilsson, I., Wadström, T., Ljungh, Å., 2012. Bile stimulates cell surface hydrophobicity, Congo red binding and biofilm formation of *Lactobacillus* strains. *FEMS Microbiol Lett* 333, 10–19. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02590.x>
- Aplevicz, K.S., Mazo, J.Z., Ilha, E.C., Dinon, A.Z., and Sant'Anna, E.S., 2014. Isolation and characterization of lactic acid bacteria and yeasts from the Brazilian grape sourdough. *Braz. J. Pharm. Sci.* 50, 321–327. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502014000200011>
- Armstrong, J.A., and Schulz, J.R., 2015. Agarose Gel Electrophoresis. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 10, 7.2.1-7.2.22. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0702s10>

- As, M.D., and James, L., Ch, A., 2020. Isolation and characterization of a lactic acid bacterium from infant Feces.
- Ayivi, Raphael, Edwards, A., Carrington, D., Brock, A., Krastanov, Albert, Sharaf Eddin, A., Ibrahim, S., Ayivi, R, Carrington, A., Brock, D., and Krastanov, A, 2022. The Cultivation, Growth, and Viability of Lactic Acid Bacteria: A Quality Control Perspective. Journal of Visualized Experiments 63314. <https://doi.org/10.3791/63314>
- Aydın, F., 2023. Su ürünleri yetiştiriciliğinde postbiyotik ve paraprobiyotiklerin yeri. Marine and Life Sciences 5(1). doi: 10.51756/marlife.1287544.
- Aytar, M., Oryaşın, E., Başbülbul, G. and Bozdoğan, B., 2019. Agar well difüzyon yönteminde standardizasyon çalışması. Bartın University International Journal of Natural and Applied Sciences, 2(2), pp.138-145.
- Bellali, S., Lagier, J.-C., Raoult, D., Bou Khalil, J., 2019. Among Live and Dead Bacteria, the Optimization of Sample Collection and Processing Remains Essential in Recovering Gut Microbiota Components. Front. Microbiol. 10, 1606. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01606>
- Beveridge, T. J., and Graham, L. L. (1991). Surface layers of bacteria. Microbiological reviews, 55(4), 684-705.
- Chapot-Chartier, M.-P., Kulakauskas, S., 2014. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. Microbial Cell Factories 13, S9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S9>
- Chatellier, S., Mugnier, N., Allard, F., Bonnaud, B., Collin, V., Belkum, A., Veyrieras, J. B., and Emler, S., 2014. Comparison of two approaches for the classification of 16S rRNA gene sequences. Journal of Medical Microbiology 63(109): 1311-1315.
- Chen, L., Wang, M., Huang, L., Zhang, Z., Liu, F., Lu, G., 2017. XC_0531 encodes a c-type cytochrome biogenesis protein and is required for pathogenesis in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. BMC Microbiology 17, 142. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1056-9>
- Chen, Y., Wu, H., Pan, S., Lin, B., Lin, Y., Tung, W., Li, Y., Chiang, C., Yanagida, F., 2013. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from yan-taozih (pickled peaches) in Taiwan. Annals of Microbiology 63, 607–614.
- Chen, Y.-L., Lee, C.-C., Lin, Y.-L., Yin, K.-M., Ho, C.-L., Liu, T., 2015. Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. BMC Bioinformatics 16, S13. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-16-S18-S13>
- Clarridge III, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clinical microbiology reviews, 17(4), 840-862.
- Coimbra-Gomes J, Reis PJM, Tavares TG, Faria MA, Malcata FX, Macedo AC, 2023. Evaluating the Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Implicated in Natural Fermentation of Table Olives, cv. Cobrançosa. Molecules, 28(8): 3285.

- Coman, M.M., Verdenelli, M.C., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Boyko, N., Cresci, A., 2014. In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 ®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502 ® and SYN BIO ® against pathogens. J Appl Microbiol 117, 518–527. <https://doi.org/10.1111/jam.12544>
- Daba, H., and Saidi, S. (2015). Detection of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from milk in various farms in north-east Algeria by a new procedure. Agronomy Research, 13(4).
- Dale, R. M., Schnell, G., W., J.P., 2004. Therapeutic Efficacy of “Nubiotics” against Burn Wound Infection by *Pseudomonas aeruginosa* [WWW Document]. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.8.2918-2923.2004>
- Daoudou, B., Leopold, T.N., Augustin, M., Moses, M.C., 2011. Assessment of physiological properties of some lactic acid bacteria isolated from the intestine of chickens use as probiotics and antimicrobial agents against enteropathogenic bacteria. Innovative Romanian Food Biotechnology 33–40.
- De Urza, P.J., Gómez-Zavaglia, A., Lozano, M.E., Romanowski, V., De Antoni, G.L., 2000. DNA fingerprinting of thermophilic lactic acid bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. J Dairy Res 67, 381–392. <https://doi.org/10.1017/s002202990000426x>
- Demirok, N. T., Durak, M. Z., and Arici, M. (2021). Probiotic *lactobacilli* in faeces of breastfed babies. Food Science and Technology, 42, e24821.
- Devi, M., Rebecca, L.J. and Sumathy, S., 2013. Bactericidal activity of the lactic acid bacteria *Lactobacillus delbreukii*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 5(2): 176-180.
- Devillers J., Steiman R. and Seigle-Murandi F. (1989). The usefulness of the agar-well diffusion method for assessing chemical toxicity to bacteria and fungi. Chemosphere, 19(10-11), 1693-1700.
- Diba, F.S., Hossain, K.M., Azim, M.A., 2013. Isolation, characterization and determination of antimicrobial properties of lactic acid bacteria from human milk. Jordan Journal of Biological Sciences 147, 1–6.
- Dickert, H., Machka, K., Braveny, I., 1981. The uses and limitations of disc diffusion in the antibiotic sensitivity testing of bacteria. Infection 9, 18–24. <https://doi.org/10.1007/BF01640803>
- Didinen, B. I., Yardimci, B., Onuk, E. E., Metin, S., & Yildirim, P. (2014). Naturally *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792): new histopathological observations, phenotypic and molecular identification. Rev Med Vet-Toulouse, 165, 12-19.
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging infectious diseases, 8(9), p.881.
- dos Santos, H.R.M., Argolo, C.S., Argôlo-Filho, R.C., Loguerio, L.L., 2019. A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information. BMC Microbiology 19, 74. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1446-2>

- Duche, R.T., Singh, A., Wandhare, A.G., Sangwan, V., Sihag, M.K., Nwagu, T.N.T., Panwar, H., Ezeogu, L.I., 2023. Antibiotic resistance in potential probiotic lactic acid bacteria of fermented foods and human origin from Nigeria. *BMC Microbiol* 23, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02883-0>
- Elhariry, H.M. (2011): Biofilm formation by *Aeromonas hydrophila* on green-leafy vegetables: cabbage and lettuce. *Foodborne Pathog Dis*, 8(1): 125-131
- Fang, W., Shi, M., Huang, L., Chen J., and Wang, Y., 1996. Antagonism of lactic acid bacteria towards *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* on agar plates and in milk. *Veterinary Research*, 27(1):3-12, fahal-00902393f.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Fernández Ramírez, M.D., Smid, E.J., Abee, T., Nierop Groot, M.N., 2015. Characterisation of biofilms formed by *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and food spoilage isolates. *International Journal of Food Microbiology* 207, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.030>
- Filimon, R.V., Bunea, C.-I., Nechita, A., Bora, F.D., Dunca, S.I., Mocan, A., Filimon, R.M., 2022. New Malolactic Bacteria Strains Isolated from Wine Microbiota: Characterization and Technological Properties. *Fermentation* 8, 31. <https://doi.org/10.3390/fermentation8010031>
- Furtuna, D.K., Debora, K., Warsito, E.B., 2018. Comparison of Microbiological Examination by Test Tube and Congo Red Agar Methods to Detect Biofilm Production on Clinical Isolates. *FMI* 54, 22. <https://doi.org/10.20473/fmi.v54i1.8047>
- Gabriele, M., Frassinetti, S., Caltavuturo, L., Montero, L., Dinelli, G., Longo, V., Di Gioia, D., Pucci, L., 2017. *Citrus bergamia* powder: Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties. *Journal of Functional Foods* 31, 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.007>
- Gilliland, S. E, S., M.L., 1977. Antagonistic Action of *Lactobacillus acidophilus* Toward Intestinal and Foodborne Pathogens in Associative Cultures | Elsevier Enhanced Reader [WWW Document]. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-40.12.820>
- Giordani, B., Naldi, M., Croatti, V., Parolin, C., Erdoğan, Ü., Bartolini, M., Vitali, B., 2023. Exopolysaccharides from vaginal *lactobacilli* modulate microbial biofilms. *Microb Cell Fact* 22, 45. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02053-x>
- Gomez N.C., Ramiro, J.M.P., Quecan, B.X.V., and de Melo Franco, B.D.G., 2016. Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. *Food Microbiology*, 7(863): 1-15.
- Hajwal, Mrs.S.I., Najeeb, L.M., 2023. Product Activity of Lactic acid Bacteria Isolated from Samples of New Born from Women and Children Hospital in Ramadi, Iraq. *Saudi J. Pathol. Microbiol.* 8, 131–139. <https://doi.org/10.36348/sjpm.2023.v08i06.004>

- Han, J., Chen, D., Li, S., Li, X., Zhou, W. W., Zhang, B., & Jia, Y. (2015). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Italian Journal of Food Science*, 27(3), 282-289.
- Haney, E.F., Trimble, M.J., Cheng, J.T., Vallé, Q., Hancock, R.E.W., 2018. Critical Assessment of Methods to Quantify Biofilm Growth and Evaluate Antibiofilm Activity of Host Defence Peptides. *Biomolecules* 8, 29. <https://doi.org/10.3390/biom8020029>
- Hernández, T., Sánchez, I., López, N., Prieto, L., Hernández, A., Arenal, A., 2023. Antibiotic resistance *Lactobacillus* spp. from human breast milk: can be an option as probiotics? (preprint). In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2428195/v1>
- Herreros, M.A., Sandoval, H., L. González, L., J.M. Castro, J.M., J.M. Fresno, J.M., and Tornadijo, M.E., 2005. .Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology*, 22(5):455-459.
- Hinton, A. Jr., D.E. Corrier and J.R. DeLoach, 1992. In vitro inhibition of the growth of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* 0157:H7 by an anaerobic gram-positive coccus isolated from the cecal contents of adult chickens. *J. Food Prot.*, 55: 162-166.
- Hou, F., Tang, J., Liu, Y., Tan, Y., Wang, Y., Zheng, L., Liang, D., Lin, Y., Wang, L., Pan, Z., Yang, R., Bi, Y., Zhi, F., 2023. Safety Evaluation and Probiotic Potency Screening of *Akkermansia muciniphila* Strains Isolated from Human Feces and Breast Milk. *Microbiol Spectr* 11, e03361-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03361-22>
- Husain, D.R., Gunawan, S., Sulfahri, S., 2020. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria from domestic chickens (*Gallus domesticus*) from south Celebes, Indonesia, in different growth phases: *in vitro* experiments supported by computational docking. *Iran J Microbiol* 12, 62–69.
- Hütt, P., Shchepetova, J., Loivukene, K., Kullisaar, T., & Mikelsaar, M. (2006). Antagonistic activity of probiotic *lactobacilli* and *bifidobacteria* against entero-and uropathogens. *Journal of applied microbiology*, 100(6), 1324-1332.
- Ismail, Y., Yulvizar, C., Mazhitov, B., 2018. Characterization of lactic acid bacteria from local cow's milk kefir. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 130, 012019. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/130/1/012019>
- İlhan, G.Ü.N. and Ekinci, F.Y., 2009. Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda*, 34(3), pp.165-173.
- İspirli, h., dertli, e., 2023. Geleneksel yollarla üretilmiş turşu örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması ve bazı fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi. *Gıda* 360–380. <https://doi.org/10.15237/gida.gd23019>
- Jacobsen, C.N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A.E., Møller, P.L., Michaelsen, K.F., Pærregaard, A., Sandström, B., Tvede, M., Jakobsen, M., 1999. Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. *Appl Environ Microbiol* 65, 4949–4956.

- Jalilsood, T., Baradaran, A., Song, A.A.-L., Foo, H.L., Mustafa, S., Saad, W.Z., Yusoff, K., Rahim, R.A., 2015. Inhibition of pathogenic and spoilage bacteria by a novel biofilm-forming *Lactobacillus* isolate: a potential host for the expression of heterologous proteins. *Microb Cell Fact* 14, 96. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0283-8>
- Joghataei, M., Shahidi, F., Pouladfar, G., Mortazavi, S., Ghaderi, A., 2019. Probiotic potential comparison of *Lactobacillus* strains isolated from Iranian traditional food products and human feces with standard probiotic strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9945>
- Kafkaskıray, E.S., 2020. Şalgam suyu fermantasyon sürecinin mikrobiyal profilinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi (Master's thesis, İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı).
- Kalkan, S., Taş, E., Erginkaya, Z., Turhan, E.Ü., 2017. Determination of Antimicrobial Effects of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Garlic Extract Against Some Foodborn Pathogenic Bacteria. *Turkish Journal of Agriculture- Food Science and Technology* 5, 125–131. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v5i2.125-131.965>
- Karasu, N., 2006. Turşu ve zeytinden antagonistik ve probiyotik özellikte laktik starter kültür eldesi (Master's thesis, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Katina, K., Poutanen, K., Gobbetti, M., 2023. Nutritional Aspects of Cereal Fermentation with Lactic Acid Bacteria and Yeast, in: Gobbetti, M., Gänzle, M. (Eds.), *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 303–324. https://doi.org/10.1007/978-3-031-23084-4_10
- Khan, M.I.R., Choudhury, T.G. and Kamilya, D., 2023. In vitro assessment of probiotic properties of *Pseudomonas entomophila* COFCAU_PEP4 isolated from *Labeo rohita* intestine. *Journal of the World Aquaculture Society*, 54(3), pp.635-644.
- Kıvanç, M., and Dinçer, E., 2018. Lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from turkish pastırma. *Anadolu University Journal of Science and Technology C- Life Sciences and Biotechnology*, 7(1): 12-19.
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Küçükönder, G., ERDEM, T., AYMAN, S. and GEZGİNÇ, Y., 2022. Tulum peynirinden *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus paracasei* izolasyonu, tanımlanması ve antibiyotik dirençlilik özelliklerinin belirlenmesi. *Kahramanmaraş sütçü imam üniversitesi mühendislik bilimleri dergisi*, 25(özel sayı), pp.28-35

- Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Dey, A., Ray, R.R., 2022. Chapter 1- Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function, in: Shah, M.P. (Ed.), Application of Biofilms in Applied Microbiology, Developments in Applied Microbiology and Biotechnology. Academic Press, pp. 1–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90513-8.00003-0>
- Landeta, G., Curiel J.A., Carrascosa A.V., R. Muñoz, R., and de las Rivas, B., 2013. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. *Meat Science*, 95(2):272-280.
- Lebeer, S., Verhoeven, T. L., Perea Vélez, M., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2007). Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 6768-6775.
- Liu, Y., Yin, X., Xia, X., Liu, Z., Chen, L., Dong, M., 2023. 3D printed lactic acid bacteria hydrogel: cell release kinetics and stability. *Food Science and Human Wellness* 12, 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.07.049>
- Mahgoub, M.A., Abbass, A.A.G., Amani Farouk Abaza A.F., and Shoukry M.S., 2022. Probiotic lactic acid bacteria as a means of preventing in vitro urinary catheter colonization and biofil formation. *Journal of the Egyptian Public Health Association*, 97(30): 1-9.
- Manzoor, A., Ul-Haq, I., Baig, S., Qazi, J. I., & Seratlic, S. 2016. Efficacy of locally isolated lactic acid bacteria against antibiotic-resistant uropathogens. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(1).
- Martín, V., Maldonado-Barragán, A., Moles, L., Rodríguez-Baños, M., Campo, R. del, Fernández, L., Rodríguez, J.M., Jiménez, E., 2012. Sharing of Bacterial Strains Between Breast Milk and Infant Feces. *J Hum Lact* 28, 36–44. <https://doi.org/10.1177/0890334411424729>
- Mohammad, M.S.D., Niloofar, M.M., Zahra, R., Mohammad, B.H., Moslem, P., Gholamreza, H., Sara, S.Y., Mojtaba, M., Shabnam, H.K., Seyede, M.A.L., Hedroosha, M.A.M., Mehrnaz, M., 2021. Probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from human milk and their inhibitory effect on gastrointestinal pathogenic bacteria. *Afr. J. Microbiol. Res.* 15, 318–324. <https://doi.org/10.5897/AJMR2021.9528>
- Mohan Keerthivasan, M.S., 2023. Probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from homemade fermented food products | Elsevier Enhanced Reader [WWW Document]. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100517>
- Moraes, P.M., Perin, L.M., Júnior, A.S., Nero, L.A., 2013. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Braz J Microbiol* 44, 109–112. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000100015>
- Morifuji, G.D., Flomenbaum, L., Zárate, G., 2018. Lactic Acid Bacteria from Argentinean Fermented Foods: Isolation and Characterization for their Potential Use as Starters for Fermentation of Vegetables. *Food Technol Biotechnol* 56, 398–410. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5631>

- Morifuji, M., Ichikawa, S., Kitade, M., Fukasawa, T., Asami, Y., Manabe, Y., Sugawara, T., 2020. Exopolysaccharides from milk fermented by lactic acid bacteria enhance dietary carotenoid bioavailability in humans in a randomized crossover trial and in rats. *Am J Clin Nutr* 111, 903–914. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa020>
- Muruzović, M.Ž., Mladenović, K.G., Čomić, L.R., 2018. In vitro evaluation of resistance to environmental stress by planktonic and biofilm form of lactic acid bacteria isolated from traditionally made cheese from Serbia. *Food Bioscience* 23, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.03.005>
- Mutlu, M.B. and Mammadova, K., 2019. Azerbaycan'ın farklı süt ürünlerinden probiyotik bakteri izolasyonu ve tanımlanması (Master's thesis, Tez (yüksek lisans)-Anadolu Üniversitesi).
- Nguyen, T.K.N., Duong, H.V., Nguyen, T.T., Dinh, M.T.N., Nguyen, M.H., 2020. Characteristic of Co-Culture Biofilm Formed by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*, and Antagonistic Effects of This Biofilm on Pathogen Growth. *Jpn. J. Food Eng.* 21, 81–87. <https://doi.org/10.11301/jsfe.20564>.
- Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Peláez-Martínez, M.C., Hardisson de la Torre, A., 2002. Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. *Meat Science* 62, 237–243. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00252-2](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00252-2)
- Nurliana, N., Siregar, B. H., Sari, W. E., Helmi, T. Z., and Sugito, S., 2022. Identification of cellulolytic lactic acid bacteria from the intestines of laying hens given AKBISprob based on 16S ribosomal ribonucleic acid gene analysis. *Veterinary World*, 15(7): 1650–165
- Odeyemi, O.A., Ahmad, A., 2017. Population dynamics, antibiotics resistance and biofilm formation of *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from aquatic sources in Northern Malaysia. *Microbial Pathogenesis* 103, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.007>
- Okoye, C.O., Gao, L., Wu, Y., Li, X., Wang, Y., Jiang, J., 2023. Identification, characterization and optimization of culture medium conditions for organic acid-producing lactic acid bacteria strains from Chinese fermented vegetables. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 0, 1–12. <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2204507>
- Onuk, E.E., Findik, A., Turk, N., Altun, S.O.N.E.R., Korun, J.A.L.E., Ozer, S., Avsever, M.L. and Ciftci, A., 2013. Molecular identification and determination of some virulence genes of *Aeromonas* spp. in fish and water from Turkish coastal regions. *Revista de Medicina Veterinaria*, 164, pp.200-206.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology*, 28(3), 449-461.
- Öztürk, Ş. B., Ertuğrul, M. B., & Çörekli, E. 2017. Diyabetik ayak enfeksiyonlarında etken bakteriler ve biyofilm oluşturma oranları. 47, 33–38.

- Petchkongkaew, W.W. a, 2023. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria from Thai fermented foods: Potential food applications. Food Bioscience 52, 102385. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102385>
- Ramírez, M. D. F., Smid, E. J., Abee, T., & Groot, M. N. N. (2015). Characterisation of biofilms formed by *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and food spoilage isolates. International Journal of Food Microbiology, 207, 23-29.
- Rastogi, S., Mittal, V., Singh, A., 2020. In Vitro Evaluation of Probiotic Potential and Safety Assessment of *Lactobacillus mucosae* Strains Isolated from Donkey's Lactation. Probiotics & Antimicro. Prot. 12, 1045–1056. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09610-0>
- Reiner, Karen, 2010. Catalase Test Protocol. Thursday, 11 November 2010 pp.1-6.
- Ren, J., He, W., Li, C., He, S., & Niu, D. (2019). Purification and identification of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* XB-1. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 35, 1-7.
- Robert, A. P., & Mullany, P. (2010). Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. Expert review of anti-infective therapy, 8(12), 1441-1450.
- Rogers A. M. & Montville T. J. (1991). Improved agar diffusion assay for nisin quantification. Food Biotechnology, 5(2), 161-168.
- Roy, A. and Rai, C., 2017. Isolation and characterization of lactic acid bacteria with probiotic potential from pickles. Bioscience Discovery, 8(4), pp.866-875.
- Ruchi, T., Sujata, B., & Anuradha, D. (2015). Comparison of phenotypic methods for the detection of biofilm production in uro-pathogens in a tertiary care hospital in India. Int J Curr Microbiol App Sci, 4(9), 840-49.
- Rzhetsky, A. and Nei, M., 1992. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. Mol Biol Evol, 9(5), pp.945-967.
- Sáez, G.D., Flomenbaum, L., Zárate, G., 2018. Lactic Acid Bacteria from Argentinean Fermented Foods: Isolation and Characterization for their Potential Use as Starters for Fermentation of Vegetables. Food Technol Biotechnol 56, 398–410. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5631>
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular biology and evolution 4, 406–425.
- Salas-Jara, M. J., Ilabaca, A., Vega, M., & García, A. (2016). Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics. Microorganisms, 4(3), 35.
- Salminen, S., Wright, A. von, 2004. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Third Edition. CRC Press.
- Schillinger, U., Lücke, F.K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl Environ Microbiol 55, 1901–1906.

- Schleifer, K.-H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W., Amann, R., 1995. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, International Dairy Lactic Acid Bacteria Conference 5, 1081–1094. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00047-X](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00047-X)
- Sharma, A., Lee, S., Park, Y.-S., 2020. Molecular typing tools for identifying and characterizing lactic acid bacteria: a review. *Food Sci Biotechnol* 29, 1301–1318. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00802-x>.
- Shokri, D., Khorasgani, M.R., Mohkam, M., Fatemi, S.M., Ghasemi, Y., Taheri-Kafrani, A., 2018a. The Inhibition Effect of *Lactobacilli* Against Growth and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 10, 34–42. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9267-9>
- Shokryazdan, P., Sieo, C.C., Kalavathy, R., Liang, J.B., Alitheen, N.B., Faseleh Jahromi, M., Ho, Y.W., 2014. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains. *Biomed Res Int* 2014, 927268. <https://doi.org/10.1155/2014/927268>
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 573–583.
- Singh, N., Sharma, C., Gulhane, R.D., Rokana, N., Singh, B.P., Puniya, A.K., Attri, S., Goel, G., Panwar, H., 2018. Inhibitory effects of lactobacilli of goat's milk origin against growth and biofilm formation by pathogens: an in vitro study. *Food Bioscience* 22, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.02.001>
- Smith, L., Mann, J.E., Harris, K., Miller, M.F., Brashears, M.M., 2005. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in Ground Beef Using Lactic Acid Bacteria and the Impact on Sensory Properties. *Journal of Food Protection* 68, 1587–1592. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.8.1587>
- Speranza, B., Liso, A., Russo, V., Corbo, M.R., 2020. Evaluation of the Potential of Biofilm Formation of *Bifidobacterium longum* subsp. infantis and *Lactobacillus reuteri* as Competitive Biocontrol Agents Against Pathogenic and Food Spoilage Bacteria. *Microorganisms* 8, 177. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020177>
- Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tatsaporn, T., Kornkanok, K., 2020. Using Potential Lactic Acid Bacteria Biofilms and their Compounds to Control Biofilms of Foodborne Pathogens. *Biotechnology Reports* 26, e00477. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00477>
- Terraf, M.C.L., Juárez Tomás, M.S., Nader-Macías, M.E.F., Silva, C., 2012. Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *J Appl Microbiol* 113, 1517–1529. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05429.x>

- Thakur, B., Kaur, S., Tripathi, M., Upadhyay, S.K., 2023. Exploring the potential of lactic acid bacteria and its molecular mechanism of action in the development of biosurfactants: Current finding and future outlook. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 0, 1–32. <https://doi.org/10.1080/02648725.2023.2216421>
- Toe, C.J., Foo, H.L., Loh, T.C., Mohamad, R., Abdul Rahim, R., Idrus, Z., 2019. Extracellular Proteolytic Activity and Amino Acid Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Malaysian Foods. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1777. <https://doi.org/10.3390/ijms20071777>
- Vasudha, M., Prashantkumar, C.S., Bellurkar, M., Kaveeshwar, V., Gayathri, D., 2023. Probiotic potential of β -galactosidase-producing lactic acid bacteria from fermented milk and their molecular characterization. *Biomedical Reports* 18, 1–12. <https://doi.org/10.3892/br.2023.1605>
- Wang, X., Wang, W., Lv, H., Zhang, H., Liu, Y., Zhang, M., Wang, Y., Tan, Z., 2021. Probiotic Potential and Wide-spectrum Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Infant Feces. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 13, 90–101. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09658-3>
- Wang, Y., Li, A., Jiang, X., Zhang, H., Mehmood, K., Zhang, L., Jiang, J., Waqas, M., Iqbal, M., Li, J., 2018. Probiotic Potential of *Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Lactobacillus* Strains Isolated From Yaks. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Wang, Y., Takano, T., Zhou, Y., Wang, R., Toshimitsu, T., Sashihara, T., Tanokura, M., Miyakawa, T., Nakajima-Adachi, H., Hachimura, S., 2023. Orally administered *Lactiplantibacillus plantarum* OLL2712 decreased intestinal permeability, especially in the ileum: Ingested lactic acid bacteria alleviated obesity-induced inflammation by collaborating with gut microbiota. *Front Immunol* 14, 1123052. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1123052>
- Xu, J., Chen, Y., Fan, X., Shi, Z., Liu, M., Zeng, X., Wu, Z. and Pan, D., 2022. Isolation, identification, and characterization of corn-derived antioxidant peptides from corn fermented milk by *Limosilactobacillus fermentum*. *Frontiers in Nutrition*, 9, p.1041655
- Yousef, A.E., Carlstrom, C., 2003. *Food Microbiology: A Laboratory Manual*. John Wiley & Sons.
- Yusuf, M. A., and Hamid, T. H. (2013). Lactic acid bacteria: bacteriocin producer: a mini review. *IOSR J Pharm*, 3(4), 44-50.
- Zareie Z, Moayedi A, Garavand F, Tabar-Heydar K, Khomeiri M, Maghsoudlou Y, 2023. Probiotic Properties, Safety Assessment, and Aroma-Generating Attributes of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from Iranian Traditional Cheese. *Fermentation*, 9(4):338. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040338>
- Zheng, C.N., Wang, W., 2017. Effects of *Lactobacillus pentosus* on the growth performance, digestive enzyme and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture Research* 48, 2767–2777. <https://doi.org/10.1111/are.13110>

ZMR, H., BAM, E., MNI, M., NF, T. and AMM, M., 2016. Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Dairy Product. Food Science, 2, p.1.



ÖZGEÇMİŞ

Rayyan Nawfal Mahmood ALNUAIMI, ilköğretim ve ortaöğretimi 1996-1999 yılında Irak'da tamamladı. Lisans eğitimine Mikrobiyoloji 1999-2003 yılında Musul Üniversitesin'de tamamladı. Irak'da 2003-2004 yılında Alzahraa laboratuvarında Bakteriyolog olarak atandı. 2004-2005 yılında Ninova ilaç Endüstrileri ve tıbbi cihazlar (NDI) 'da Bakteriyolog olarak görev yaptı. 2005-2006 yılında Musul Üniversitesi / Dış Hekimliği Fakültesi / kliniklerinde Patoloji (Histopatoloji)Laboratuvarlarında Müdürü olarak atandı. 2006-2014 yılında Al Hokama ilaç Endüstrileri (HDI) Irak Cumhuriyetinde Üretim Müdürü ve Genel Müdür vekili olarak görev yaptı. 2014-2017 yılında Irak Sağlık Bakanlığı - Adli Tıp 'da Kıdemli bakteriyolog olarak görev yaptı. 2023-Halen yılında Irak Sağlık Bakanlığı - Adli Tıp 'da Narkotik ve Psikotrop Maddeler birim yöneticisi olarak atandı. 2020 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.