



**SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
İZOLASYONU VE MOLEKÜLER İDENTİFİKASYONU**

BARIŞ BOSTANCI

MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Sevim Feyza ERDOĞMUŞ

TEZ NO: 2019-004

2019 - Afyonkarahisar

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE MOLEKÜLER
İDENTİFİKASYONU**

Barış BOSTANCI

**MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Sevim Feyza ERDOĞMUŞ

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
17.SAĞ.BİL.06 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ NO:2019-004

2019-AFYONKARAHİSAR

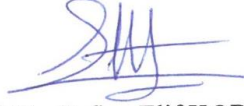
KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 31.01.2019



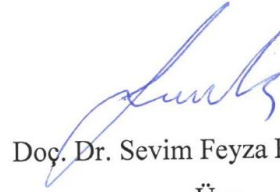
Prof. Dr. Safiye Elif KORCAN

Jüri Başkanı



Prof. Dr. Cevdet UĞUZ

Üye



Doç. Dr. Sevim Feyza ERDOĞMUŞ

Üye

Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı öğrencisi Barış Bostancı'nın "Süt ve Süt Ürünlerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Moleküler İdentifikasyonu" başlıklı tezi günü saat.....Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Zülfikar Kadir SARITAŞ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iii
ŞEKİLLER.....	iv
TABLolar	v
1. GİRİŞ	1
1.1. Laktik Asit Bakterileri	2
1.2. Bakteriyosinler, Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması	5
<i>Lactococcus lactis sub sp. cremoris</i>	6
2. GEREÇ VE YÖNTEM	9
2.1. Gereç	9
• 2.1.1 Çalışmada Kullanılan Örnekler.....	9
• 2.1.2 Çalışmada Kullanılan Besiyerler	9
• 2.1.3 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler, Ayıraçlar ve Boyalar	11
• 2.1.4. Çalışmada Kullanılan DNA İzolasyon ve PZR Kitleri	11
• 2.1.5. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	12
2.2. Yöntem.....	12
• 2.2.1 Çalışmada Kullanılan Örneklerin Hazırlanması	12
• 2.2.2 Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması	12
• 2.2.3 İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	13
• 2.2.4. Laktik Asit Bakterilerinden Genomik DNA İzolasyonu.....	14
• 2.2.5. Laktik Asit Bakterilerinin 16S rDNA PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi ile Tanımlanması.....	16
• 2.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi	17
• 2.2.7 Nükleotid Sekans Analizi ve Verilerin Değerlendirilmesi.....	17
• 2.2.8. Laktik Asit Bakterilerinin Antibakteriyel Etki Spektrumlarının Belirlenmesi	18
• 2.2.9. İstatistiksel Analiz.....	19
4. TARTIŞMA	32
5. SONUÇ	36
ÖZET	37
EKLER.....	48

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim sürecinde, tezimin hazırlanması aşamasında bana yol gösteren, tüm laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan değerli danışman hocam, Doç. Dr. Sevim Feyza ERDOĞMUŞ' a teşekkürlerimi sunarım. Bilgi ve deneyimlerini tüm yüksek lisans eğitimim boyunca aktaran, desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Cevdet UĞUZ'a, Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyeleri, Doç. Dr. Metin ERDOĞAN, Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT ve Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk LENGİR'e teşekkür ederim. Deney çalışmalarında benimle beraber çalışan Biyolog Mine ERİK ve tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Biyolog Selin GÜLEÇ'e de teşekkür ederim. Ayrıca hayatımın her aşamasında desteklerini asla esirgemeyen sevgili aileme de teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Bariş BOSTANCI

SİMGELER VE KISALTMALAR

cm	Santimetre
°C	Santigrat derece
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
g	Gram
kDa	Kilodalton
LAB	Laktik asit bakterisi
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
ng	Nanogram
OD	Optik densite
RNA	Ribo Nükleik asit
SK	Sulandırma katsayısı
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. İzolatların oksijensiz ortamda inkubasyonundan önce ve sonraki görüntüsü.....	13
Şekil 3.1. Süt örneklerinin dilüsyonlarından yapılan ekimler sonrası besiyerlerinde üreyen bazı mikroorganizmalar.....	20
Şekil 3.2. Saflaştırılan laktik asit bakterisi izolat örnekleri.....	21
Şekil 3.3. Gram pozitif, basil şeklinde laktik asit bakteri izolatı örneği.....	21
Şekil 3.4. PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri	22-23
Şekil 3.5. Laktik asit bakteri izolatlarının filogenetik ağacı.....	26
Şekil 3.6. Bakteriyosinlerin patojenler üzerindeki inhibisyon zon çapları etkisi....	31

TABLÖLER

Tablo 1.1. Bakteriyosin üreten bazı LAB'ları.....	6
Tablo 2.1. PZR bileşenleri ve miktarları.....	16
Tablo 3.1. Laktik asit bakteri izolatlarının mikroskopik görünümü.....	22
Tablo 3.2. LAB izolatlarının 16S rRNA analiz sonuçları.....	23-24
Tablo 3.3. Laktik asit bakteri izolatlarının indikatör bakteriler üzerine olan inhibisyon etkisi.....	26-27
Tablo 3.4. Laktik asit bakteri izolatlarının indikatör bakteriler üzerine olan antimikrobiyal etkilerinin agar kuyu difüzyon test sonuçları.....	28-29
Tablo 3.5. Bakteriyosinlerin patojen bakteriler üzerindeki inhibisyonunun varyans analizi sonuçları.....	30

1. GİRİŞ

Teknolojinin hızla gelişmesi, gıda güvenliğine verilen önemin artmasına rağmen gıdalardan kaynaklanan hastalıkların sayısı giderek yükselmektedir. Ayrıca, giderek artan nüfus yoğunluğuyla beraber ihtiyaç duyulan gıda ürünlerine talep artmıştır. Marketlerdeki gıdaların raf ömrünün dolması, mikroorganizmaların faaliyetleri nedeniyle ürünlerin bozulmaları, yüksek miktarda kayıplar meydana getirmektedir. Bu durum, gıdaların mikrobiyal patojenlerden ve bozulma etmenlerinden korunmasını gündeme getirmiştir. Gıdaların korunması ve raf ömürlerinin uzatılması için düşük sıcaklık veya ısıtma işlemi uygulaması, farklı şekilde paket kullanımları, tuz, şeker ve katkı maddeleri kullanılmaktadır. Kullanılan bu kimyasal katkı maddeleri ise insan ve çevre sağlığı üzerinde olumsuz etkiler yaratarak hastalıklara sebep olmaktadır. Bu sebeple, kalitesi yüksek, kimyasallar koruyucular içermeyen, güvenilir olan ve raf ömürleri uzun ürünler tüketiciler tarafından tercih edilmektedir (Schnurer ve Magnusson 2005; Abriouel ve ark., 2007; Dinçer ve ark., 2010). Bazı mikroorganizmalar antimikrobiyal bileşenler üretebilme yeteneğine sahiptirler (Goh ve Philip 2015). Bu mikroorganizmalar arasında yer alan laktik asit bakterileri, antimikrobiyal özellikte peptitler üretebilirler ve koruyucu olarak kullanılabilen organik asitleri nedeni ile gıdalarda uzun yıllardan beri güvenli bir şekilde kullanılan en önemli mikroorganizmalardan birisidir (De Martinis ve ark., 2002; Eijssink ve ark., 2002; Corr ve ark., 2007; Nespolo ve Brandelli 2010). Spor oluşturmeyen, gram pozitif, anaerob veya fakültatif aerob olan laktik asit bakterileri karbonhidratları fermente ederek laktik asit gibi fermentasyon ürünleri oluşturmaktadırlar (Zhang ve ark., 2014; López-Cuellar ve ark., 2016). Bu bakteriler tarafından üretilen metabolik ürünler, patojen mikroorganizmaların üremelerini engelleyerek, bağışıklık sistemini güçlendirerek enfeksiyonlara karşı direncin artmasını sağlamaktadırlar (Amirbozorgi ve ark., 2016). Pek çok çalışmada, gıda güvenliği için antagonistik mikroorganizmaların ve yine onlar tarafından üretilen, protein yapısındaki antimikrobiyal bileşenler olan bakteriyosinlerin kullanımıyla patojenlerin inaktive edilmesinin hedeflendiği biyokontrol yöntemlerinin kullanılması önerilmektedir (Rodriguez ve ark., 2000; Deegan ve ark., 2006; Evren

ve., 2006; Moshood ve Tengku 2013; Gülgör ve Özçelik 2014; Yang ve ark., 2014; Kaur 2015; Goh ve Philip 2015; López-Cuellar ve ark., 2016).

Ayrıca, infeksiyonlara karşı kullanılan antibiyotiklere karşı bakterilerde direnç oluşmaktadır. Bu durum, patojen mikroorganizmalara karşı antibiyotiklerin yetersiz kalmasını, sürekli olarak yeni antibiyotiklerin keşfedilmesinin gerekliliğini ve maliyetlerin artmasını da beraberinde getirmektedir (Blaser 2011; White 2011; Cooper ve Shlaes 2011; Arabestani ve ark., 2014). Bu nedenle, bakteriyosinler gelecekte çoklu ilaç direncine sahip patojenlerin sebep oldukları hastalıkları tedavi etmek için antibiyotiklerin yerini alabilirler (Cotter ve ark., 2013; Arabestani ve ark., 2014; Yang ve ark., 2014). LAB' ın gıda kökenli patojen mikroorganizmaların üremesini engellemek ve gıdaların raf ömrünü arttırmak amacı ile kullanılabilme kapasitesine sahip oldukları için yeni suşların izolasyonu ve identifikasyonu için yapılan çalışmalar oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, Afyonkarahisar İli'nde satışa sunulan markasız, paketsiz, doğal yöntemler ile üretilen 20 farklı süt ve fermente süt ürününden (peynir, kefir, yoğurt) 34 adet laktik asit bakterisi izole edilerek moleküler identifikasyonları yapılmıştır. Ayrıca, bakteriyosin üretim yetenekleri belirlenerek onların patojen mikroorganizmalar üzerine olan etkileri tespit edilmiştir.

1.1. Laktik Asit Bakterileri

Karbonhidrat fermentasyonu yapabilen laktik asit bakterileri (LAB), laktik asit üretebilen, çubuk ya da kok şeklinde olabilen, hareketsiz, spor oluşturmeyen, gram-pozitif ve katalaz negatif olan bakterilerdir (Hammes ve Hertel 2006; Zhang ve ark., 2014; López-Cuellar ve ark., 2016). LAB'lar anaerobiktir fakat birçok anaerobun aksine oksijene duyarlılık göstermezler. Oksijene karşı tolerans gösterebilen anaerob mikroorganizmalardır. Fermentasyon ürünü olarak laktik asit

üretebilen bu bakteriler sitokrom içermezler. LAB'ın enerji eldesi yalnızca substrat düzeyinde fosforilasyon ile gerçekleştirilir. LAB'ları fermentasyon sonucunda oluşturdukları ürünlere göre iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar; homofermentatif ve heterofermentatif gruplardır. Fermentasyon ürünü olarak laktik asit üretenler homofermentatif grup, laktik asit, etanol ve CO₂ üretenler ise heterofermentatif grup olarak ayrılmışlardır (Klein ve ark., 1998).

LAB'lar insanların ağız boşluğunda, intestinal bölgesinde, vajinada bulunurlar ve probiyotik özellikleri vardır. Son yıllarda LAB'ların gıda ürünlerinde ve yemlerde probiyotik olarak kullanımı giderek artmaktadır (Holzapfel ve Schillinger 2002; İşleroğlu ve ark., 2008). LAB'lar organik asit, diasetil, asetoin, hidrojen peroksit, reuterin, antifungal peptitler ve bakteriyosinler gibi birbirlerinden farklı antimikrobiyal bileşikler üretebilmektedirler. Bu özellikleri sebebiyle özellikle son yıllarda gıda koruyucusu olarak kullanımları bakımından ilgi odağı olmuşlardır (Magnusson ve Schnürer 2001; Dinçer ve ark. 2010; Bayram ve Yıldırım 2016; Erdoğan ve Korcan 2017).

Beslenmemizin bir parçası haline gelmiş olan fermente gıdaların üretimlerinde ana maddeler arasında; süt, et, çeşitli sebze ve meyveler yer almaktadır. Fermente ürünlerde lezzet oluşumu komplike olmakla beraber özde starter kültürün ana kısmını oluşturan LAB tarafından gerçekleştirilen glikolizis, lipolizis ve proteolizis olaylarını kapsamaktadır (Smith ve ark., 2002). Et, süt ve balık ürünlerinde koruyucu kültür ilave edilerek ürünlerin raf ömrünün ve güvenilirliğinin artırılması sağlanmaktadır (Devlieghere ve ark., 2004). Yapılan çalışmalar, LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin, et fermentasyonunun ön aşamalarında *L. monocytogenes* sayısını azalttığını göstermiştir (Foegeding ve ark., 1992; Hugas ve ark., 1995). Özellikle *Lactobacillus spp.* 'ler, probiyotik özellikleri, starter kültür olarak kullanım şansı bulabilmeleri ve koruyucu özellik göstermeleri nedeniyle gıda endüstrisinde oldukça önemli yer tutarlar. Ayrıca ürettikleri bakteriyosinler ile bazı antibiyotiklerin yerini alabilecekleri de düşünülmektedir

(Rauta ve ark., 2013). LAB tarafından üretilen bakteriyosinler patojen mikroorganizmalara karşı doğal koruyuculardır. Bakteriyosinlerin gıda koruyucusu olarak kullanılmalarının çeşitli sebepleri vardır. Bu sebepler arasında; genel olarak güvenli (GRAS) bulunmaları, ökaryotik hücrelere karşı zehirli olmamaları, pH ve sıcaklığa karşı tolerans göstermeleri, gıda kökenli patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki sergilemeleri, bakteriyi öldürücü etkilerinin hücre zarı ile ilgili olması sebebi ile antibiyotik direnci ile karşılaşmamaları yer almaktadır. (Galvez ve ark., 2007). Patojen mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç tüm dünyada önemli bir problemdir. Bu nedenle sürekli olarak yeni antibiyotiklerin keşfedilmeleri gerekmektedir. Bu durum ise hem maliyet hem de zaman bakımından oldukça önemli sıkıntıları beraberinde getirmektedir. Bakteriyosinlerin antibiyotiklerin yerine kullanılabilme potansiyellerinin olması onları hem sağlık hemde gıda sektöründe oldukça önemli bir duruma getirmiştir (Yang ve ark., 2014).

LAB'ın içerdiği önemli cinsler; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella*'dır. Diğer cinsler ise; *Aerococcus*, *Microbacterium*, *Propionibacterium* ve *Bifidobacterium*'dur (Hammes ve Hertel 2006; Parada ve ark., 2007). LAB'lar arasında yer alan *Lactobacillus* spp.'ler, çeşitli hayvansal ve bitkisel gıdalarda ve çeşitli yaşam alanlarında yer alabilirler (Felis ve Dellaglio 2007). Mikroskop altındaki görüntüleri çubuk şeklinde veya kokobasil formunda uzun zincirler şeklindedir. Homofermantatif ya da heterofermantatif olabilen Laktobasiller glikozu karbon kaynağı olarak kullanırlar. Patojen özellik göstermezler ve farklı sıcaklık aralıklarında (5-53 °C) gelişebilirler. Oluşturdukları bir takım maddeler sayesinde zararlı mikroorganizmaların gelişmelerini engellerler. Proteinleri parçalamalarını sağlayan hücre içi peptidazları ile fermente süt ürünlerinin olgunlaştırılma süreçlerinde kullanılırlar. Kok ya da ovoid şekilli olan Laktokoklar ise endospor oluşturmeyen, hareketsiz bakterilerdir. Bu bakteriler homofermantatif özelliktedir ve beta hemolitik reaksiyon göstermezler. Genellikle 30 °C'de iyi gelişim gösterirler, 10 °C'nin altında ve 45 °C'nin üzerinde iyi gelişim

göstermemeleri sebebiyle Streptokok ve Enterokok'lardan ayrılırlar. (Schleifer 1987). Çiğ sütte ve fermente süt ürünlerinde en fazla bulunan LAB'ı *Lactococcus* cinsileri arasında *L. lactis* türüdür. Küresel çapta, her sene yüz milyon tondan fazla süt starter olarak *L. lactis*'in kullanılarak fermente süt ürünlerine dönüştürülmektedir. Bu bakteriler endüstriyel işlemlerde probiyotik ve starter kültür olarak sıklıkla kullanılırlar, ekonomik değerleri oldukça yüksektir (Kimoto-Nira ve ark., 2010; Yonezawa ve ark., 2010; Odamaki ve ark., 2011, Fernandez ve ark., 2011). LAB'lar içinde yer alan Enterokoklar, fermente gıdaların tat, sertlik ve yumuşaklık gibi özelliklerinin oluşumunda oldukça etkilidirler. Enterokoklar, İnsan ve hayvanların doğal mikroflorasının önem arz eden büyük bir kısmını oluştururlar, yaygın olarak gastrointestinal sistemde yer alırlar. Bu bakteriler, tekli, ikili ya da kısa zincirler halinde bulunurlar ve Streptokok türlerinden mikroskobik olarak ayırt edilemezler. Alfa, beta veya gama hemoliz yetenekleri vardır. Kemoorganotrof olan bu bakteriler homofermantatif laktik asit fermentasyonu ile heksozlardan L-laktik asit oluştururlar. Çeşitli kimyasal ve fiziksel koşullara karşı karşı direnç gösterirler (Çelik ve Alhan 2008). Geleneksel fermente gıda ürünlerinde baskın mikroflora olarak görev üstlenirler. Bakteriyosin üretme yeteneğinde olan birçok Enterokok türü gıda patojenlerine karşı antimikrobiyal etki göstermektedirler (Giraffa 1995). *Leuconostoc* spp. kok veya oval şekilde, zincir ve grup şeklinde pleomorfik, spor oluşturmayan, hareketsiz bakterilerdir. Çoğu türleri %3 hatta %6.5 tuz konsantrasyonuna dayanabilmektedirler. Heterofermantatif olan bu bakteriler fakültatif anaerobtururlar ve optimum gelişme sıcaklıkları 20-30 °C arasındadır (Hayaloğlu ve Erginkaya 2001). *Pediococcus* spp. kok şeklinde tekli, çiftli kısa zincir veya tetrad oluşturan, hareketsiz, mikroaerofilik bakterilerdir. Homofermantatif olan bu bakteriler, tuza karşı dayanıklıdırlar (Hayaloğlu ve Erginkaya 2001, Erdoğan ve ark. 2002, Coşansu ve ark. 2007)

1.2. Bakteriyosinler, Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Antimikrobiyal etkiye sahip olan bakteriyosinler, bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen peptit yapısındaki bileşiklerdir (Kurt ve Zorba 2005, Nespolo ve

Brandelli 2010, Hegarty ve ark., 2016). LAB bakteriyosinlerinin çoğu, küçük moleküler ağırlıklı (<10 kDa), katyonik, ısıya dayanıklı, membran permeabilize edici peptitlerdir (Zacharof ve Lovitt 2012). Kromozom, plazmid ya da tranzpozonlar üzerinde bakteriyosin üretimini kodlayan genler bulunabilir. Bu genler: (i) prepeptidi kodlayan yapısal gen, (ii) immünite geni, (iii) ABC taşıyıcısı kodlayan gen ve (iv) bakteriyosinin dışarı taşınmasında gerekli olan aksesuar proteinini kodlayan gen (Garneu ve ark., 2002, Chen ve Hoover 2003). LAB'lar başta olmak üzere pek çok bakteri bakteriyosin üretebilmektedir (Goh ve Philip 2015). LAB bakteriyosinleri, patojen mikroorganizmalar üzerinde bakterisidal veya bakteriostatik etkiye sahip maddeler üretebilirler (Cotter 2005). Son yıllarda, araştırmacılar tarafından identifikasyonu yapılan pek çok bakteriyosin tanımlanmıştır (Atrih ve ark., 2001; Kışla ve Ünlütürk 2003; Beasley ve ark., 2004; Zacharof, 2012, Holzapfel ve Wood 2012, Goh ve Philip 2015). Bakteriyosin üreten bazı LAB'lar Tablo 1.1.'de gösterilmiştir (Erdoğan ve Korcan 2017).

Tablo 1.1. Bakteriyosin üreten bazı LAB'ları.

Bakteriyosin İsimleri	Bakteriyosin üreten LAB'lar	Kaynak
Lactacin F	<i>Lactobacillus spp.</i>	Fremaux ve ark., 1993
Lactocin 705	<i>Lactobacillus casei spp.</i>	Million ve ark., 2013
Lactococin A	<i>Lactococcus lactis sub sp. Cremoris</i>	Holo ve ark., 1991
Plantaricin	<i>Lactobacillus plantarum sp.</i>	Todorov 2009
Lactacin B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Barefoot ve Klaenhammer 1984
Nisin A	<i>Lactococcus lactis sub sp. lactic</i>	Field ve ark., 2012
Nisin U	<i>Streptococcus uberis</i>	Wirawan ve ark., 2006
Nisin Z	<i>Lactococcus lactis sub sp. lactic</i>	Mulders ve ark., 1991
Lactococin A	<i>Lactococcus lactis sub sp. Cremoris</i>	Holo ve ark., 1991
Helveticin J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Joerger ve Klaenhammer 1990
Plantaricin ST31	<i>Lactobacillus plantarum ST31</i>	Todorov ve Dicks 2004
Nisin Z ve pediocin PA-1/AcH	<i>Lactococcus lactis MM19 ve Pediococcus acidilactici MM33</i>	Millette ve ark., 2008

Bakteriyosinler, taksonomik olarak üretici suşa yakın türler de dahil olmak üzere birçok patojen ve bozulmaya sebep olan bakteri türü üzerinde durdurucu veya öldürücü etki gösterirler (Sullivan ve ark., 2002, de Vuyst ve Leroy 2007, Holzapfel ve Wood 2012). Ancak bu maddelerin bakteriyosini üreten bakteri suşu üzerinde öldürücü etkisi yoktur. Bakteriyosin kodlayan gen kümesi, bakterinin kendi kendini

öldürmesini engellemek için, birçok immün proteini kodlar. Bağışıklık proteinleri, bakteriyosinin hücre zarına adsorbsiyonunu engelleyebilir, membrandan geçen bakteriyosini dış ortama gönderebilir veya bakteriyosinin hücre içinde parçalanmasını sağlayarak bakteriyi bakteriyosinin zararlı etkisinden koruyabilir (Bizani ve ark., 2008). Bakteriyosinlerin gıda koruyucusu olarak kullanılmalarının pek çok sebebi vardır. Bunlardan en önemlileri; (i) uzun raf ömrü, (ii) muhafaza şartlarındaki sıcaklıklarda ilave koruma sağlamaları, (iii) gıda kökenli hastalık yapıcı mikroorganizmaların besin zinciri yolu ile yayılmasını azaltabilmeleri, (iv) gıdalarda bozulmalara yol açan mikroorganizmalar nedeni ile yaşanan ekonomik kayıplar en aza indirmeleri, (v) katkı maddelerinin kullanılmalarının azaltılmasını sağlamaları, (vi) koruma için daha az işlemin uygulanması yer almaktadır (Dinçer ve ark. 2010).

Bakteriyosinler antibiyotiklere benzer özellikler göstermelerine rağmen onları antibiyotiklerden ayıran farklı özellikleri bulunmaktadır. Bu özelliklerden en önemlisi ise, antibiyotiklere kıyasla daha az bir etki spektrumuna sahip olmalarıdır (Riley ve Wertz 2002). Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenirler, antibiyotikler ise genellikle sekonder metabolitlerdir (Beasley ve Saris 2004, Zacharof ve Lovitt, 2012). Mikroorganizmaların bakteriyosin üretmeleri, daha fazla besin elde etmek için rakiplerin sayısının azaltılmasını sağlayan oldukça başarılı bir strateji olarak kabul edilir. Bu sayede hem sayılarını hem yaşam alanlarını korurlar.

Bakteriyosinler için farklı sınıflandırmalar yapılabilmesine rağmen, genellikle dört ana sınıfa ayrılırlar (Ennahar ve ark., 2000; Oscáriz ve Pisabarro 2001; Hegarty ve ark., 2016). Bunlar; I) lantibiyotikler, II) küçük, ısıya dayanıklı hidrofobik peptidler, III) büyük, ısıya duyarlı proteinler, IV) protein kısmına lipit ve/veya karbonhidrat ilaveli kompleks bakteriyosinler (Klaenhammer 1993; Ouwehand 1998).

Sınıf I: Lantibiyotikler

Lantibiyotikler, küçük, translasyon sonrası değişikliğe uğrayarak aktive olan ve dehidre kısımlar (dehidroalanin, dehidrobutirin), lantionin ve β -metillantionin içeren küçük peptidlerdir (van Belkum ve Stiles 2000; Sullivan ve ark., 2002; Deraz ve ark., 2005; Todorov 2009). Lantibiyotikler genel olarak linear (Tip A) ve globular (Tip B) olarak iki alt gruba ayrılmakla birlikte ilave alt gruplar halen tartışılmaktadır.

Sınıf II: Lantibiyotik olmayan, küçük, ısıya dayanıklı hidrofobik peptidler

Sınıf II bakteriyosinler, ısıya dayanıklı, genellikle küçük (<10 kDa), lantionine içermeyen peptidlerdir. Bazıları yüksek sıcaklıklarda yapısını koruyabilmektedir (Sullivan ve ark., 2002, Oscáriz ve Pisabarro 2001). Bu sınıf bakteriyosinler araştırmacılar tarafından daha alt gruplara ayrılmışlardır. İlk grup, N-terminal ucunda Try-Gly-Asn-Gly-Val ve N-terminal ucunun ortasında, iki sistein (S-S) köprüsü içerir. İkinci grup, aktivitesi için iki peptit gerektiren por oluşturan kompleks içerir. Üçüncü grup ise, tiol gruplarıyla aktive edilmiş peptidlere sahiptir (Cleveland ve ark., 2001, Oscáriz ve Pisabarro 2001, Sullivan ve ark., 2002).

Sınıf III: Büyük, ısıya duyarlı proteinler

Sınıf III bakteriyosinleri genellikle ısıya duyarlı, büyük moleküler ağırlıklı (>30 kDa) proteinlerdir (van Belkum ve Stiles 2000, Oscáriz ve Pisabarro 2001). Genellikle 30 dakika, 100 °C veya 100 °C altındaki sıcaklıklarda etkinliklerini yitirirler (Dodd ve Gasson 1994).

Sınıf IV: Kompleks bakteriyosin

Bu sınıf bakteriyosinlerin etkin olabilmeleri için protein kısmına lipit ve/veya karbonhidrat ilavesi gereklidir (Ouwehand 1998, van Belkum ve Stiles 2000).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Örnekler

Bu çalışmada Afyon İli'nde satışa sunulan markasız, paketsiz, doğal yöntemler ile üretilen beşer adet süt, peynir, kefir ve yoğurt olmak üzere toplam 20 adet süt ve süt ürünü materyal olarak kullanılmıştır. Kullanılacak örnekler steril şartlarda toplanarak araştırma laboratuvarına getirilmiştir. Laktik asit bakterilerinin izolasyon işlemleri tamamlanana kadar 4°C'de saklanmıştır.

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Besiyerler

MRS (De Man, Rogosa ve Sharpe) Broth (Oxoid CM0359)

Besiyer içeriği; pepton 10,0 g/l, et özütü 8,0 g/l, maya özütü 4,0 g/l, D (+) glukoz 20,0 g/l, sorbitan mono-oleate 1ml/l, di-potasyum hidrojen fosfat 2,0 g/l, sodyum asetat 5,0 g/l, magnezyum sülfat 0,2 g/l, triamonyum sitrat 2,0 g/l, manganiz sülfat 0,05 g/l.

52,0 g besiyer ortamı distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

MRS (De Man, Rogosa ve Sharpe) Agar (Oxoid CM0361)

Besiyer içeriği; pepton 10,0 g/l, et özütü 8,0 g/l, maya özütü 4,0 g/l, D (+) glukoz 20,0 g/l, sorbitan mono-oleate 1 ml, di-potasyum hidrojen fosfat 2,0 g/l, sodyum

asetat 5,0 g/l, magnezyum sülfat 0,2 g/l, triamonyum sitrat 2,0 g/l, manganez sülfat 0,05 g/l , agar 10,0 g/l.

62,0 g besiyer ortamı distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 50 mg/l siklohegzimit içerecek şekilde hazırlanan MRS agar plakları ilk izolasyonda kullanılmıştır. Siklohegzimit içermeyen MRS agar plakları ise saflaştırma ve çalışmanın ilerleyen safhalarında stok kültürlerin aktifleştirilmesinde kullanılmıştır.

Nutrient Agar (Oxoid CM0003)

Besiyer içeriği; et özütü 1,0 g/l, maya özütü 2,0 g/l, pepton 5,0 g/l, sodyum klorid 5,0 g/l, agar 15,0 g/l.

28,0 g besiyer ortamı distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Kanamycin Aesculin Azide Agar (Oxoid CM0591)

Besiyer içeriği; tripton 18,8 g/l, maya özütü 5,0 g/l, sodyum klorid 5,0 g/l, sodyum sitrat 1,0 g/l, aesculin 1,0 g/l, ferrik amonyum sitrat 0,5 g/l, sodyum azid 0,15 g/l, nişasta 0,6 g/l, agar 10,0 g/l.

42,6 g besiyer ortamı distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

M17 Agar (Liofilchem 610192)

Besiyer içeriği; tripton 2,5 g/l, soyapepton 5,0 g/l, et özütü 5,0 g/l, laktoz 5,0 g/l, pepton 2,5 g/l, askorbik asit 0,5 ml/l, maya özütü 2,5 g/l, magnezyum sülfat 0,25 g/l, di sodyum beta gliserolfosfat 19,0 g/l, agar 15,0 g/l.

28,65 g besiyer ortamı distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler, Ayıraçlar ve Boyalar

% 0,1’ lik Peptonlu Su Çözeltisi

0,1 g Pepton (Oxoid CM0009) 100 ml distile suda çözündürülmüş ve 121 °C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

% 3’ lük Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Çözeltisi

3 ml H₂O₂ cam şişeye koyulduktan sonra distite su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Katalaz testi için kullanılmıştır.

TBE tamponunun hazırlanması

Tris borik asit-EDTA Tamponu (TBE) (pH: 8.0) stok solüsyonu; 1 litre (5x): 54,0 g Tris-base, 27,5 g Borik asit, 2,92 g EDTA. Çalışma solüsyonu (1x): 100 ml stok solüsyonuna 400 ml distile su ilave edilerek hazırlanmıştır.

2.1.4. Çalışmada Kullanılan DNA İzolasyon ve PZR Kitleri

Roche, High Pure PZR Template Preperation Kit (11796828001)

Laktik asit bakterilerinin DNA'larını izole etmek için kullanılmıştır.

Taq DNA Polimeraz Kiti (HelixAmp™)

16S rDNA gen bölgesinin PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) için kullanılmıştır.

2.1.5. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar

İnkübatör (Thermo Heratherm)

Mikroskop (Zeiss Primo Star)

Otoklav (Nüve Steam Art OT90L)

Santrifüj (Nüve NF 1200 R)

PZR cihazı (Blue Ray Biotech Turbo Cyler)

Jel Görüntüleme Sistemi (Quantum)

Anaerobik Kavanoz (Oxoid Anaero Jar 2.5L)

Spektrofotometre (Thermo Multiskan Go)

2.2. Yöntem

2.2.1 Çalışmada Kullanılan Örneklerin Hazırlanması

Laboratuvara getirilen süt ve kefir örnekleri steril pipet yardımıyla 10'ar ml alınarak steril 90 ml % 0,1' lik steril peptonlu su çözeltisinde homojenize edilmiştir. Peynir ve yoğurt örnekleri ise 10'ar g olacak şekilde aseptik koşullarda tartılmıştır. Daha sonra 90 ml % 0,1' lik steril peptonlu su çözeltisinde homojenize edilmiştir. Her örnek % 0,1' lik steril peptonlu su içeren tüplerde 1/10 olacak şekilde ardışık olarak seyreltilmiştir.

2.2.2 Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması

İzolasyona hazırlanmış her bir örnek için uygun dilüsyonlardan 0.1 ml alınarak Laktokokların izolasyonu için M17 agara, Laktobasiller için de Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) agara ve Enterokoklar için Nutrient agara (NA) ve Kanamycin aesculin azide agarlı besiyerlerine yayma plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. MRS agar (pH 5.7 ± 0.2) 30 °C'de, M17 agar (pH 7.2 ± 0.2) 37 °C'de, NA (pH 7.0 ± 0.2)

37 °C’de, Kanamycin aesculin azide agar (pH 7.0 ± 0.2) 37 °C’de hem oksijenli ve oksijensiz koşullarda 48 saatlik inkübe edilmiştir. Oksijensiz ortamda inkübasyon için anaerobik kavanoz kullanılmıştır (Azadnia ve Nazer 2009). Oksijensiz ortamın sağlanabilmesi için Merck Microbiologia Anaerocult A (1.13829.0001) kullanılmıştır. Ortamın oksijensiz olup olmadığından emin olabilmek için test indikatörü (Merck Microbiology Anaerotest 1.15112.0001) kullanılmıştır. Test çubuğunun beyaz renkten, mavi renge dönüşmesi ortamın oksijensiz olduğunun bir göstergesidir. Şekil 2.1.’de petrilerin anerobik kavanoz ile inkübasyon öncesi ve sonrasında test çubuğunun renk değişimi gösterilmiştir.



Şekil 2.1. İzolatların oksijensiz ortamda inkubasyonundan önce ve sonraki görüntüsü

İnkübasyon sonrasında farklı morfolojik özelliklere sahip, laktik asit bakterisi olmasından şüpheli olan tüm koloniler seçilmiştir (Azadnia ve Nazer 2009). Laktobasiller seçilirken krem renkli, mat düzgün kenarlı kolonilere ve laktokokları seçerken beyaz düz kenarlı parlak kolonilere öncelik verilmiştir. Petri kutularından Enterokokların seçiminde ise küçük, beyaz ya da açık renkli ve düz kenarlı tipik kolonilere öncelik verilmiştir. Seçilen izolatların uygun besiyerlerine pasajlamaları yapılarak saf izolatlar elde edilmiştir. Elde edilen izolatlar, mikroskop altında incelenerek gram reaksiyonu ve katalaz aktiviteleri saptanmıştır (Halkman 2005).

2.2.3 İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Gram Boyama

İzolatların, Gram özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, gram boyamaları yapılmıştır (Temiz, 2000). Gram boyama için Norateks gram boyama seti kullanılmıştır. Bunun için, ilk izolasyon evresinde saflaştırılan kültürlerden (24 saatlikten az) lam üzerine, distile su ile yayılarak, preparat hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar, havada kurutularak, ateşte fikse edildikten sonra, Gram'ın kristal viyole boyası ile 1 dakika boyanmış ve distile su ile yıkanmıştır. Havada kurutulduktan sonra, iyot çözeltisi ile 1 dakika muamele edilen preparatlar, distile su ile yıkanıp, tekrar havada kurutulmuştur. Daha sonra alkol (%95) ile 15 saniye muamele edilip en son safranin boyası ile 30 saniye boyanmıştır. Distile su ile yıkandıktan sonra havada kurutulan preparatlar mikroskopta (Zeiss Primo Star), 100x'lik immersiyon objektifinde incelenmiştir. Laktik asit bakterileri gram pozitif özellik taşıdığı için gram pozitif olan izolatlar seçilmiştir.

Katalaz Testi

Saflaştırılan izolatların katalaz enzim aktivitesine sahip olup olmadıklarını anlayabilmek için katalaz testi yapılmıştır. Bu test için saflaştırılan her bir izolatdan bir miktar temiz lam üzerine alınıp üzerlerine % 3'lük H₂O₂ çözeltisi damlatılmıştır. Gaz çıkışının gözlemlendiği izolatlar katalaz pozitif olarak, gaz çıkışının gözlenmediği izolatlar katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir. Laktik asit bakterileri katalaz negatif oldukları için katalaz negatif olan izolatlar seçilerek tekrar uygun besiyer içeren petrilere pasajlanmışlardır. Katalaz pozitif çıkan izolatlar elenmiştir.

2.2.4. Laktik Asit Bakterilerinden Genomik DNA İzolasyonu

LAB'ın genomik DNA'larını izole etmek için Roche, High Pure PCR Template Preparation Kit kullanılmıştır. Her bir izolatın MRS sıvı besiyerine ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kit kullanımı için gerekli hazırlıklar yapılmıştır.

Liyofilize haldeki Proteinaz K 4,5 ml distile su eklenerek alikotlanmıştır. Inhibitör Removal Bufer 20 ml etanol eklenerek hazırlanmıştır. Wash Bufer ise 80 ml etanol eklenerek hazırlanmıştır. Daha sonra 1,5 ml lik steril ependorf tüplere sıvı besiyerinde çoğaltılmış bakteri süspansiyonundan 200 µl alınmıştır ve 5 dakika 70 °C’de Üzerine 200 µl Binding bufer ve 40 µl Proteinaz K eklenerek iyice karıştırılmıştır. 30 dakika 3000 x g’de santrifüjlenmiştir. Hücre peletleri 200 µl PBS içinde süspanse edilmiştir ve 5 µl lizozim (10 mg\ml, pH:8) eklenerek 15 dakika 37 °C’de inkübe edilmiş ara sıra alt üst edilerek karıştırılmıştır. İnkübasyondan sonra üzerlerine 200 µl Binding Bufer eklenerek iyice karıştırılmıştır. 10 dakika 70 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her tüpe 100 µl izopropanol alkol eklenmiş ve pipetle yavaşça karıştırılmıştır. İzolat sayısı kadar toplama tüpü çıkarılarak her birine filtreli tüpler yerleştirilmiştir. Elde edilen karışım filtreli toplama tüplerine aktararak 8000 x g’ de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alttaki toplama tüpleri atılarak filtreli tüpler yeni toplama tüplerine yerleştirilmiştir. Her tüpe 500 µl inhibitör removal bufer eklenerek 8000 x g’ de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpleri atılarak filtreli tüpler yeni toplama tüplerine aktarılmıştır. Her tüpe 500 µl wash bufer eklenmiş ve 8000 g’ de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpleri atılarak filtreli tüpler yeni toplama tüplerine aktarılmıştır. Her tüpe 500 µl wash bufer eklenerek 8000 x g’ de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüplerindeki sıvı dökülüp tekrar 13000 g’ de 10 saniye santrifüjlenmiştir. Toplama tüpleri atılarak filtreli tüpler 1,5 ml lik ependorflara alınmıştır. Her tüpe önceden ependorflara bölünerek hazırlanmış ve 72 °C’de bekleyen elution buferdan 200 µl eklenmiş 8000 x g’ de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra filtreli tüpler atılmıştır. Ependroflardaki genomik DNA’lar kullanılabilecek kadar -20 °C’de saklanmıştır. Elde edilen genomik DNA’ların bütünlükleri agaroz jel elektroforezinde, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometrik olarak Thermo Scientific-Nanodrop 2000c cihazı ile yapılmıştır. Cihazın çalışma prensibine göre, 2 µl DNA ile absorbanslar ölçülmüştür. 260 ve 280 nm’deki absorbans değerleri ile aşağıdaki formül kullanılarak DNA’ların konsantrasyonları hesaplanmıştır.

$$c_{DNA} = OD_{260\text{ nm}} \times SK \times 50$$

OD: Optik Dansite (260 nm’de okunan absorbans değeri)

SK: Sulandırma katsayısı

50: 260 nm’de 1 optik dansitenin içerdiği DNA miktarı

İzole edilen DNA’ların son konsantrasyonları 50 µl’de 20 ng olacak şekilde standart hale getirilmiştir. A₂₆₀ ve A₂₈₀ nm’de ölçülen absorbans değerlerinden yararlanılarak DNA örneklerinin kalitatif tayini yapılmıştır. A₂₆₀/A₂₈₀ oranı 1,8 ile 2 arasında olan DNA’ lar kullanılabilir olarak kabul edilmiştir (Turner ve ark. 2004).

2.2.5. Laktik Asit Bakterilerinin 16S rDNA PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi ile Tanımlanması

Laktik asit bakteri izolatlarının 16S rDNA yöntemiyle tanımlanabilmesi için Taq DNA Polimeraz Kiti (Helix Amp TM) kullanılmıştır. PZR için; 20F (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ve 1390R (5'- GAC GGG CGG TGT GTA CAA-3') primerleri kullanılmıştır. Yaklaşık 1300 baz çiftlik bölge PZR ile çoğaltılmıştır (Özteber 2013). Baz büyüklüğü tespiti için, markır (Fermentas Gene Ruler TM) kullanılmıştır. PZR tüpüne eklenecek bileşenler ve reaksiyon basamakları kit içeriğine göre düzenlenmiş olup Tablo 2.1' de belirtilmiştir.

Tablo 2.1. PZR bileşenleri ve miktarları

PZR Bileşenleri Miktarı	
DNA	5µl
10X Taq Buffer	5µl
dNTP	1µl
Primer – F	1µl
Primer – R	1µl
5X Tune Up Buffer	10µl
Taq Polimeraz	1,25 unit
Su	50 µl'ye tamamlanır

İstenilen gen bölgesini çoğaltabilmek için kullanılan PZR şartları; 94 °C’de 5 dakika ön denaturasyon, 94 °C’de 30 sn denaturasyon, 55 °C’de 30 sn bağlanma ve

72 °C’de 1 dakika 30 saniye uzamadan oluşan 35 döngülük amplifikasyon ve 72 °C’de 15 dakika son uzamadan olacak şekilde ayarlanmıştır.

2.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Temiz bir erlen içerisine 100 ml 1X TBE koyulmuş ve 1g agaroz tartılarak 1X TBE içerisine eklenmiştir. Agarozun erimesi ve homojen bir karışım elde edilebilmesi için tamamen berraklaşmaya kadar ısıtılmıştır. Agaroz jel, 45-50 °C’ye kadar soğutulurken içerisine belirtilen miktarda 2,5 µl Gel Red ilave edilmiştir. Taraklar elektroforez küvetine uygun şekilde yerleştirilmiştir, yaklaşık 1mm kalınlıkta dökülmüştür. Jel oda sıcaklığında yaklaşık 45 dakika bekletilerek donması sağlanmıştır. Elektroforez tankının içerisine jel yerleştirilmiştir, jelin yüzeyini 1-2 mm kaplayacak biçimde 1X TBE ilave edilmiş ve ardından taraklar çıkarılmıştır. 2µl DNA solüsyonu, 1µl yükleme boya solüsyonu ve 3 µl su ile karışımıyla birlikte kuyucuklara yüklenerek elektroforez başlatılmıştır (100 mA 90 V). 1,5 saat sonra elektroforez sonlandırılmış ve jel dikkatlice küvetten alınmıştır. Jel görüntüleme sistemi cihazı kullanılarak görüntülenmiş ve DNA fragmentleri DNA markır ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2.2.7 Nükleotid Sekans Analizi ve Verilerin Değerlendirilmesi

PZR ürünlerin nükleotid sekans analizlerinin yapılması için hizmet alımı yapılmıştır. Sekans analizi hizmet alımı Altigen Bio Firması tarafından yapılmıştır. Örneklerin sekans analizi sonuçları Gen Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov) adresinde yer alan Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) programı kullanılarak karşılaştırılmış ve her bir izolat için gen bankasındaki homolojileri belirlenmiştir.

2.2.8. Laktik Asit Bakterilerinin Antibakteriyel Etki Spektrumlarının Belirlenmesi

LAB izolatlarının antibakteriyel etkisini agar spot test ve agar kuyu difüzyon testi kullanılarak belirlenmiştir. *Listeria monocytogenes* ATCC 1911, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* NRRLB 4420, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11778, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Bacillus subtilis* NRS-744 test mikroorganizmaları olarak kullanılmıştır.

Agar Spot Test

Laktik asit bakteri izolatlarının MRS sıvı besiyerine ekimleri yapılarak 37 °C’de bir gün süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir izolattan 2 µl agarlı besiyerine damla şeklinde inokule edildikten sonra petriler bir gün süre ile uygun sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra %0,5 agar ile hazırlanmış 5 ml’lik yumuşak agar içerisine, indikatör mikroorganizmaların bir günlük sıvı kültürlerinden 0,5 ml inokule edilerek petrilerin yüzeyine dökülmüştür ve plaklar her bir test mikroorganizması için uygun olan sıcaklıklarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Schillinger ve Luke 1989).

Agar Kuyu Difüzyon Testi

Laktik asit bakteri izolatlarının antimikrobiyal etki spektrumlarını belirleyebilmek için 10 ml’lik sıvı besi ortamına her bir izolattan ekim yapılarak uygun sıcaklıklarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kültür sıvıları 8000 rpm’ de 10 dakika (+4°C’de) santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra kültür süpernatantları pelletten ayrılmış ve yeni, steril falkon tüplerde toplanarak 1 M NaOH/HCl kullanılarak asit inhibisyonunu ekarte edebilmek için pH: 6.0’ya ayarlanmıştır. Elde edilen bu süpernatantlar steril şırıngalarla çekilerek 0,2 µm por çaplı, steril membran filtreden (GUS 7041361) süzölmüş ve süzüntüler (CFS, cell-free supernatant) steril deney tüplerinde toplanmıştır. Antimikrobiyal etki spektrumlarını belirleyebilmek için kullanılan indikatör bakterilerden NA

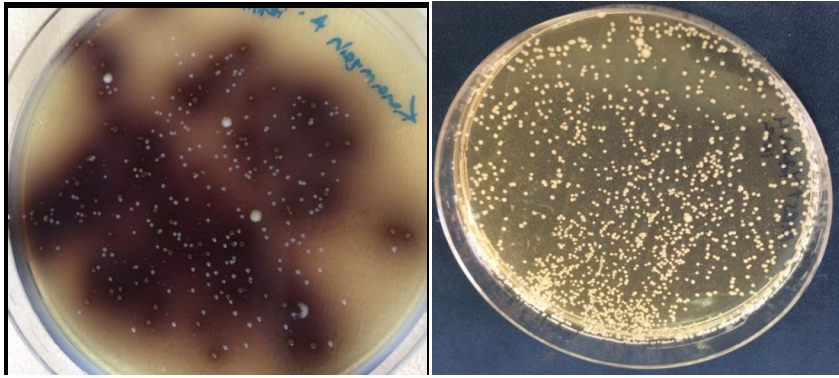
besiyerine ekim yapılmış ve 37 °C'de, 24 saat inkübe edilmişlerdir. Bir günlük kültürlerinden steril distile suda 0,5 McFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyonlar hazırlanmıştır. Her bir indikatör bakteri suşu için uygun olan agarlı besiyerlerine, steril eküvyon çubuğu kullanılarak ekimleri yapılmıştır. Steril agar delici kullanılarak agarlı besiyer ortamı içeren petrilere 6 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Hazırlanan kuyucuklara daha önce laktik asit bakteri izolatlarından elde etmiş olduğumuz CFS'lerden 100 µl koyulmuştur. İndikatör bakteriler için uygun şartlarda bir gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Pringsulaka ve ark., 2012).

2.2.9. İstatistiksel Analiz

Süt ve süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin çalıştığımız patojenler üzerindeki bakteriyosin etkisinin istatistiksel analizi XLSTAT excel programı ile ANOVA testi, tek yönlü varyans analizi ile yapıldı.

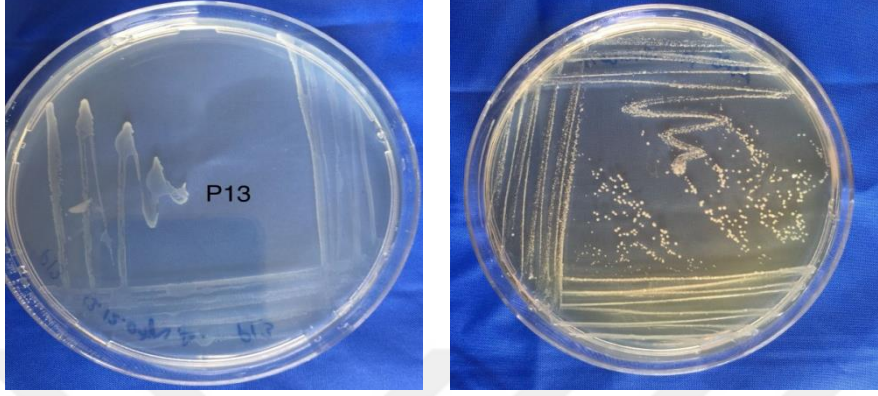
3. BULGULAR

Laktik asit bakterilerini izole etmek amacıyla Afyonkarahisar İli'nde satışa sunulan markasız, paketsiz, doğal yöntemler ile üretilen beşer adet süt, peynir, kefir ve yoğurt olmak üzere toplam 20 adet süt ve süt ürünü örneği aseptik koşullarda laboratuvara getirilerek örnekler hazırlanmış ve aynı gün analiz edilmiştir. Örneklerde LAB varlığını belirlemek için her bir süt ve kefir örneği çalışma için uygun hale getirilerek dilüsyon serileri hazırlanmıştır. Laktik asit bakterilerini izole edebilmek için daha önce hazırlanan uygun dilüsyonlardan ekim yapılmıştır. Laktokokların izolasyonu için M17 agar, Laktobasiller için de Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) agar ve Enterokoklar için Nutrient agar (NA) ve Kanamycin Aesculin Azide agar besiyerlerine yayma plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonucunda hem oksijenli hem oksijensiz ortamdaki petrilerde üreme gözlenmiştir, farklı morfolojik özelliklere sahip koloniler seçilmiştir. Küçük, beyaz ya da açık renkli ve kenarları düz tipik kolonilere Enterokokların seçiminde, krem renkli, mat kenarları düz kolonilere Laktobasillerin seçiminde ve beyaz düz kenarlı parlak kolonilere ise Laktokokların seçiminde öncelik verilmiştir. Kanamycin Aesculin Azide agarda ise siyah zon oluşturan Enterokokların seçimleri yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Süt örneklerinin dilüsyonlarından yapılan ekimler sonrası besiyerlerinde üreyen bazı mikroorganizmalar

Seçilen kolonilerin uygun agarlı besiyerlerine pasajları yapılarak örnekler saflaştırılmıştır. şekil 3.2' de saflaştırılmış olan izolat örnekleri gösterilmiştir.



şekil 3.2. Saflaştırılan laktik asit bakterisi izolat rnekleri

Saflaştırılan izolatların Gram zelliklerinin belirlenmesi amacıyla, gram boyamaları yapılmıştır (şekil 3.3). İzolatların katalaz enzimine sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla ilk izolasyon esnasında saflaştırılan izolatlar temiz bir lam üzerine alınıp % 3'lk H_2O_2 zeltisi damlatılmıştır. Gaz kabarcıklarının oluşumu katalaz testi açısından pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. LAB'lar katalaz negatif olduklarından katalaz negatif olan izolatlar seçilmiştir. Gram (+) ve katalaz (-) olduğu belirlenen 34 adet bakteri izolatu hazırlanarak $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.



şekil 3.3. Gram pozitif, basil şeklinde laktik asit bakteri izolatu rneęi

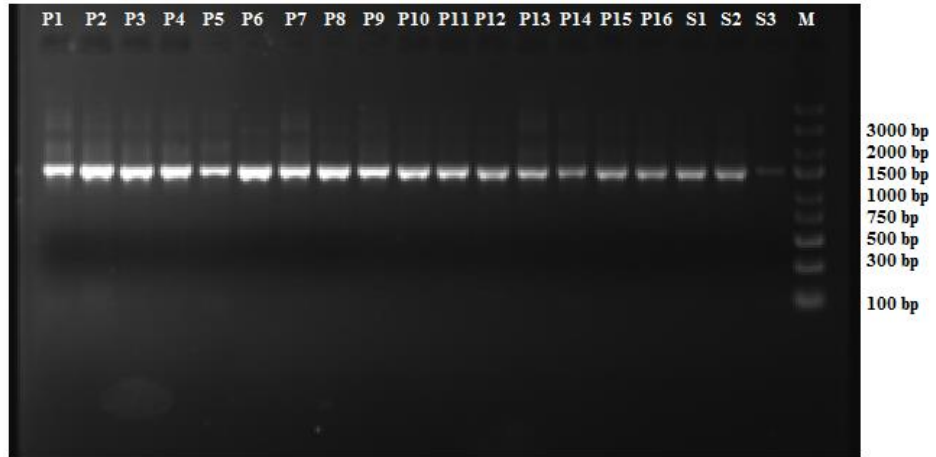
Tablo 3.1'de Gram (+) ve katalaz (-) olduğu belirlenen izolatlarının mikroskopik görünümü belirtilmiştir.

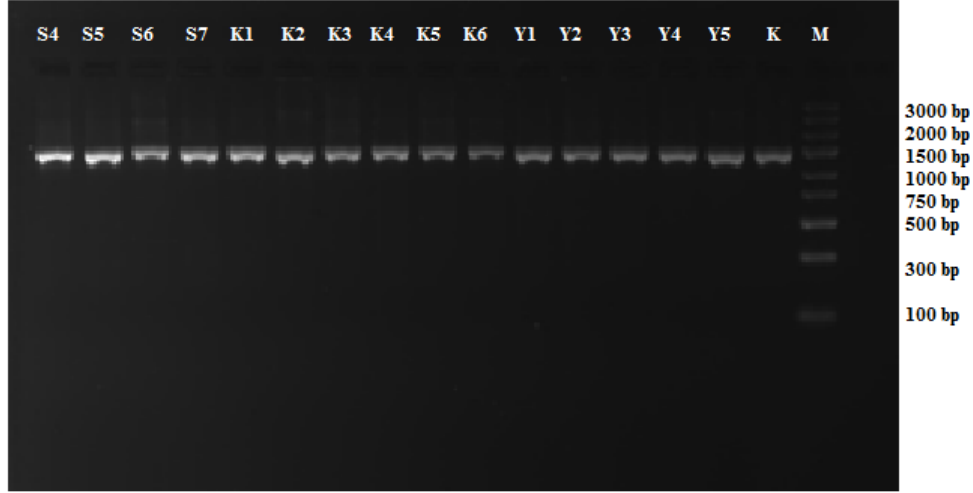
Tablo 3.1. Laktik asit bakteri izolatlarının mikroskopik görünümü

İzolat isimleri	Mikroskopik Görünüm	İzolat isimleri	Mikroskopik Görünüm
P1	çubuk	S2	Yuvarlak
P2	yuvarlak	S3	Yuvarlak
P3	çubuk	S4	Çubuk
P4	çubuk	S5	yuvarlak
P5	yuvarlak	S6	yuvarlak
P6	çubuk	S7	yuvarlak
P7	yuvarlak	K1	Çubuk
P8	çubuk	K2	yuvarlak
P9	yuvarlak	K3	yuvarlak
P10	çubuk	K4	Çubuk
P11	çubuk	K5	yuvarlak
P12	çubuk	K6	yuvarlak
P13	çubuk	Y1	Çubuk
P14	yuvarlak	Y2	yuvarlak
P15	yuvarlak	Y3	yuvarlak
P16	yuvarlak	Y4	yuvarlak
S1	çubuk	Y5	yuvarlak

P: Peynir örneklerinden elde edilen izolatlar, S: Süt örneklerinden elde edilen izolatlar, K: Kefir örneklerinden elde edilen izolatlar, Y: Yoğurt örneklerinden elde edilen izolatlar

Laktik asit bakterilerinin genomik DNA'ları High Pure PCR Template Preparation kiti kullanılarak izole edilen genomik DNA'ların saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometrik olarak Thermo Scientific-Nanodrop 2000c cihazı ile yapılmıştır (Turner ve ark., 2004). LAB'larının moleküler identifikasyonlarının yapılabilmesi için 16S rDNA PZR yöntemi kullanılmıştır. PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri Şekil 3.4.'de gösterilmiştir.





Şekil 3.4. PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri

PZR ürünlerin nükleotid sekans analizlerinin yapılması için hizmet alımı yapılmıştır. Örneklerin sekans analizi sonuçları Gen Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov) adresinde yer alan Nucleotide-nucleotide BLAST programı kullanılarak karşılaştırılmış ve her bir izolat için gen bankasındaki homolojileri belirlenmiştir. Karşılaştırma sonucunda, izolatlar ile veritabanında bulunan diğer türler arasındaki homolojiler yüzde olarak Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. LAB izolatlarının 16S rRNA analiz sonuçları

İzolatlar	16S rRNA Analiz Sonucu	Karşılaştırılan baz sayısı	(%) Benzerlik
P1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CAU8958 (Sequence ID: MF424671.1)	1402	%99
P2	<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU10244 (Sequence ID: MF429017.1)	1377	%99
P3	<i>Lactobacillus curvatus</i> strain 1TP06-BL06 (Sequence ID: MG031211.1)	1470	%99
P4	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CAU5103 (Sequence ID: MF424161.1)	1410	%99
P5	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> strain IMAU11239 (YM16-1) (Sequence ID: KP764102.1)	1438	%100
P6	<i>Lactobacillus helveticus</i> strain bcpca-qj-10 (Sequence ID: KX247766.1)	1510	%92
P7	<i>Lactococcus lactis</i> strain CAU9899 (Sequence ID: MF098112.1)	1373	%100
P8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain R19B (Sequence ID: MG685875.1)	1419	%99
P9	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> strain	1413	%98

	CAU9932 (Sequence ID: MF098094.1)		
P10	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain Lb17 (Sequence ID: MG825687.1)	1373	%100
P11	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain Lb32 (Sequence ID: MG825720.1)	1380	%99
P12	<i>Lactobacillus casei</i> strain SYB-H (Sequence ID: KY010410.1)	1397	%99
P13	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU6507 (Sequence ID: MF424168.1)	1419	%99
P14	<i>Enterococcus faecalis</i> strain E (Sequence ID: KM507563.1)	1456	%99
P15	<i>Lactococcus lactis</i> strain CAU9951 (Sequence ID: MF098133.1)	1398	%91
P16	<i>Lactococcus lactis</i> strain CAU9374 (Sequence ID: MF582953.1)	1382	%99
S1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU9954 (Sequence ID: MF098130.1)	1386	%100
S2	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL11-6 (Sequence ID: MF784165.1)	1390	%99
S3	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL2-16 (Sequence ID: MF784117.1)	1357	%100
S4	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU1968 (Sequence ID: MF428872.1)	1398	%100
S5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain Lc5 (Sequence ID: MG825736.1)	1387	%99
S6	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL11-6 (Sequence ID: MF784165.1)	1390	%99
S7	<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU2899 (Sequence ID: MF429602.1)	1401	%99
K1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341 (Sequence ID: MF354239.1)	1402	%98
K2	<i>Enterococcus durans</i> strain CAU6145 (Sequence ID: MF424830.1)	1407	%99
K3	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL6-4 (Sequence ID: MF784205.1)	1330	%99
K4	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341 (Sequence ID: MF354239.1)	1402	%98
K5	<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU10244 (Sequence ID: MF429017.1)	1377	%99
K6	<i>Enterococcus faecium</i> strain L030(LBF2)D03 (Sequence ID: KM269699.1)	1098	%99
Y1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU9902 (Sequence ID: MF098114.1)	1401	%98
Y2	<i>Lactococcus lactis</i> strain CAU9374 (Sequence ID: MF582953.1)	1382	%99
Y3	<i>Lactococcus lactis</i> strain CAU9374 (Sequence ID: MF582953.1)	1382	%99
Y4	<i>Lactococcus garvieae</i> strain CAU6586 (Sequence ID: MF108375.1)	1396	%99
Y5	<i>Enterococcus durans</i> strain GML-7 (Sequence ID: MF975715.1)	1428	%99

İzolatların 16S rRNA sekans analiz sonuçlarına göre, % 41,1'i *Lactobacillus*, % 26,4'si *Lactococcus*, % 32,3'ü *Enterococcus* cinsine dahil bulunmuştur. Tablo 3.1'de elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının filogenetik ağacı gösterilmiştir. En fazla LAB çeşitliliği peynir örneklerinde gözlenmiş olup yine en fazla sayıda LAB'ı bu örneklerden izole edilerek identifikasyonları yapılmıştır. Peynir örneklerinden en çok *Lactobacillus sp.* izolatları elde edilmiştir. Bunlar arasında en çok *Lactobacillus plantarum* olmak üzere, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus* türü tanımlanmıştır. Peynir örneklerinden izole edilen *Lactococcus sp.* izolatı olarak sadece *Lactococcus lactis* türü tanımlanmıştır. Yine peynir örneklerinden izole edilen *Enterococcus* cinsine ait izolatlar ise *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* olarak tanımlanmışlardır. Süt örneklerinden en çok *Enterococcus faecium* izolatları elde edilmiştir. *Lactococcus* ve *Lactobacillus* cinsine ait izolat olarak sırasıyla *Lactococcus lactis* ve *Lactobacillus fermentum* türü tanımlanmıştır. Kefir örneklerinden en çok *Enterococcus* cinsine ait izolatlar elde edilmiştir. Bunlar; *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca *Lactobacillus fermentum* izolatları tanımlanmıştır. Yoğurt örneklerinden ise en çok *Lactococcus* cinsine ait izolatlar elde edilmiştir. Bunlar; *Lactococcus lactis* ve *Lactococcus garvieae* olarak tanımlanmışlardır. *Enterococcus* cinsine ait izolat olarak *Enterococcus durans* ve *Lactobacillus* cinsine ait olan *Lactobacillus fermentum* izolatı tanımlanmıştır. Laktik asit bakterileri için oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 3.5'de gösterilmiştir.

Şekil 3.5 Laktik asit bakteri izolatlarının filogenetik ağacı



Laktik asit bakteri izolatlarının antibakteriyel etki spektrumları agar spot test ve agar kuyu difüzyon testi kullanılmıştır. Agar spot testi sonucunda Tablo 3.3’de verildiği gibi örneklerin hepsinin çalışmada kullanılan tüm patojen mikroorganizmalara karşı zon oluşturduğu görülmüştür. İnhibisyon zonlarının çapları $+<0,5$ cm, $0,5$ cm $<++<1$ cm, $1,5$ cm $<+++<2$ olarak kontrol grubuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Tablo 3.3. Laktik asit bakteri izolatlarının indikatör bakteriler üzerine olan inhibisyon etkisi

İzolatlar	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 1911	<i>E. coli</i> 35218	<i>B. subtilis</i> NRS- 744	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>K. pneumoniae</i> NRRLB 4420	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 11778	<i>S. faecalis</i>
P1 <i>Lactobacillus plantarum</i> strain CAU8958	+++	++	+	+++	+++	+++	++
P2 <i>Enterococcus faecium</i> strain CAU10244	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
P3 <i>Lactobacillus curvatus</i> strain 1TP06-BL06	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
P4 <i>Lactobacillus plantarum</i> strain CAU5103	+++	++	+	+++	+++	+++	++
P5 <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> strain IMAU11239 (YM16-1)	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
P6 <i>Lactobacillus helveticus</i> strain bcpca-qj-10	++	++	+++	+++	+++	+++	+++

P7	<i>Lactococcus lactis</i> strain CAU9899	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
P8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain R19B	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
P9	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain CAU9932	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
P10	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain Lb17	+++	++	+	+++	+++	+++	++
P11	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain Lb32	+++	++	+	+++	+++	+++	++
P12	<i>Lactobacillus casei</i> strain SYB-H	+++	++	+	+++	+++	+++	+++
P13	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU6507	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
P14	<i>Enterococcus faecalis</i> strain E	+++	++	+	++	+++	+++	++
P15	<i>Lactococcus lactis</i> strain CAU9951	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
P16	<i>Lactococcus lactis</i> strain CAU9374	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
S1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU9954	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
S2	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL11-6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S3	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL2-16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S4	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU1968	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
S5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain Lc5	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
S6	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL11-6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S7	<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU2899	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
K1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
K2	<i>Enterococcus durans</i> strain CAU6145	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
K3	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL6-4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
K4	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
K5	<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU10244	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
K6	<i>Enterococcus faecium</i> strain L030(LBF2)D03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Y1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU9902	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
Y2	<i>Lactococcus lactis</i> strain CAU9374	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
Y3	<i>Lactococcus lactis</i> strain CAU9374	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
Y4	<i>Lactococcus garvieae</i> strain CAU6586	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Y5	<i>Enterococcus durans</i> strain GML-7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

Agar spot test sonuçlarına göre; elde edilen laktik asit bakterileri en çok *L. monocytogenes* ATCC 1911, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *K. pneumoniae* NRRLB 4420, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11778, *Streptococcus. faecalis* mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Bacillus subtilis* NRS-744 mikroorganizmaları üzerinde ise daha düşük seviyede etki göstermiştir. İzolatların antimikrobiyal etki spektrumlarını belirleyebilmek için ayrıca agar kuyu difüzyon testi uygulanmıştır. Laktik asit bakteri izolatlarının indikatör bakteriler üzerine olan antimikrobiyal etkilerinin sonuçları ise Tablo 3.4'de gösterilmiştir. İzolatlar tüm patojen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki göstermişlerdir. Özellikle *L. monocytogenes* ATCC 1911, *K. pneumoniae* NRRLB 4420, *P. aeruginosa* ATCC 11778 karşı yüksek antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir. Elde edilen zon çapları kontrol grubuna oldukça yakın değerler göstermiştir.

Tablo 3.4. Laktik asit bakteri izolatlarının indikatör bakteriler üzerine olan antimikrobiyal etkilerinin agar kuyu difüzyon test sonuçları

İzolatlar		<i>L. monocytogenes</i> ATCC 1911	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>B. subtilis</i> NRS-744	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>K. pneumoniae</i> NRRLB 4420	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 11778	<i>S. faecalis</i>
P1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CAU8958	20	7	11	12	20	19	19
P2	<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU10244	18	15	10	14	23	19	15
P3	<i>Lactobacillus curvatus</i> strain 1TP06-BL06	21	11	9	12	22	23	13
P4	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CAU5103	21	8	11	12	20	19	19
P5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain IMAU11239 (YM16-1)	19	12	10	14	21	22	14
P6	<i>Lactobacillus helveticus</i> strain bcpcq-j-10	15	12	19	14	18	25	21
P7	<i>Lactococcus lactis</i> strain CAU9899	17	12	10	16	21	22	14
P8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> strain R19B	15	20	14	17	16	24	18
P9	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain CAU9932	19	11	10	15	20	22	14
P10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	21	7	11	12	20	18	19

	strain Lb17							
P11	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain Lb32	20	8	11	12	20	20	19
P12	<i>Lactobacillus casei</i> strain SYB-H	18	12	7	14	18	22	18
P13	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU6507	17	9	10	12	20	18	15
P14	<i>Enterococcus faecalis</i> strain E	15	8	10	11	24	18	16
P15	<i>Lactococcus lactis</i> strain CAU9951	18	12	11	14	20	22	14
P16	<i>Lactococcus lactis</i> strain CAU9374	18	12	10	14	20	22	14
S1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU9954	17	8	10	12	21	18	15
S2	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL11-6	19	13	10	14	22	19	16
S3	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL2-16	18	14	10	15	22	20	16
S4	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU1968	17	9	10	12	20	18	15
S5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> strain Lc5	19	12	9	14	21	22	14
S6	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL11-6	18	14	10	14	22	19	16
S7	<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU2899	20	15	10	14	22	18	16
K1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341	17	9	10	12	21	18	15
K2	<i>Enterococcus durans</i> strain CAU6145	18	16	13	18	17	23	12
K3	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL6-4	18	14	9	14	22	19	16
K4	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341	19	9	11	12	20	18	15
K5	<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU10244	18	14	10	15	22	19	16
K6	<i>Enterococcus faecium</i> strain L030(LBF2)D03	18	14	10	14	22	19	16
Y1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU9902	17	9	10	12	20	18	15
Y2	<i>Lactococcus lactis</i> strain CAU9374	17	12	10	14	20	22	14
Y3	<i>Lactococcus lactis</i> strain CAU9374	18	13	10	14	20	22	14
Y4	<i>Lactococcus garvieae</i> strain CAU6586	16	14	20	15	15	17	15
Y5	<i>Enterococcus durans</i> strain GML-7	20	16	14	18	17	24	12
Kontrol	10 µg amikasin	20	21	22	20	24	20	20

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda LAB'lardan elde edilen bakteriyosinlerin patojen bakteriler üzerindeki inhibisyon zon çapı değerleri 7-25 mm arasında olup, *K. pneumoniae*'da 15-24 mm, *P. aeruginosa*'da 17-25 mm, *L. monocytogenes*'de 15-21 mm, *S. feacalis* 'de 12-19 mm, *S. aureus* 12-18 mm, *E.coli* 'de 7-20 mm, *B. subtilis*'de 7-20mm, kontrolde ise 20-24 mm arasında değiştiği belirlenmiştir (Tablo 3.5.).

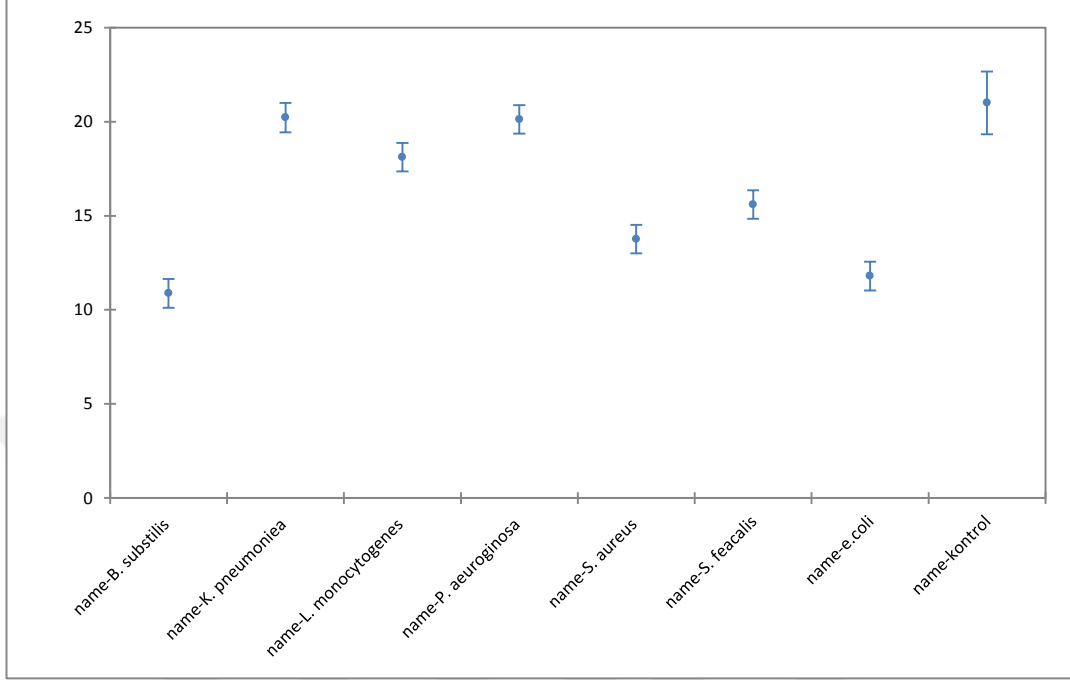
Tablo 3.5. Bakteriyosinlerin patojen bakteriler üzerindeki inhibisyonunun varyans analizi sonuçları.

Patojen Bakteri	N	ORT.	SH.	Minimum	Maximum
<i>K. pneumoniae</i>	34	20,2	0,93	15	24
<i>P. aeruginosa</i>	34	20,1	0,93	17	25
<i>L. monocytogenes</i>	34	18,1	0,93	15	21
<i>S. feacalis</i>	34	15,5	0,93	12	19
<i>S. aureus</i>	34	13,7	0,93	12	18
<i>E.coli</i>	34	11,7	0,93	7	20
<i>B. subtilis</i>	34	10,8	0,93	7	20
Kontrol	7	21,0	0,00	20	24
Toplam	242	15,9	4,21	7	25

(N: Bakteri Sayısı, ORT: Ortalama SH: Standart Sapma, LSD < 0.001)

Ortalama inhibisyon zon çapları *K. pneumoniae*'de $20,2 \pm 0,93$ mm, *P. aeruginosa*' da $20,1 \pm 0,93$ mm, *L. monocytogenes*'de $18,1 \pm 0,93$ mm, *S. feacalis*'de $15,5 \pm 0,93$ mm, *S. aureus* 'da $13,7 \pm 0,93$ mm, *E.coli*'de $11,7 \pm 0,93$ mm, *B. subtilis* 'de $10,8 \pm 0,93$, kontrolde ise $21 \pm 0,00$ mm olarak saptanmıştır. Gruplar arasındaki farklılıkların varyans analizi yapılmış, her üç grubunda birbirinden farklı olmadığı belirlenmiştir ($F_{5,0254}=88,5321$, LSD < 0,001) (Şekil 3.6.).

Şekil 3.6. Bakteriyosinlerin patojenler üzerindeki inhibisyon zon çapları etkisi ($P < 0,0001$)



4. TARTIŞMA

Son yıllarda gıda ve ilaç güvenliğinin geliştirilmesi konusunda giderek artan bir eğilimin olması, araştırmacıları yeni antimikrobiyal alternatifler bulmaya teşvik etmektedir. Bazı mikroorganizmalar antimikrobiyal bileşenler üretebilme yeteneğine sahiptirler (Goh ve Philip 2015). Bu mikroorganizmalar arasında yer alan laktik asit bakterileri, antimikrobiyal özellikte bakteriyosin üretebilirler, gıdalarda uzun yıllardan beri güvenli bir şekilde kullanılan en önemli mikroorganizmalardan birisidir (Nespolo ve Brandelli 2010; Lopez-Cuellar ve ark., 2016). Bakteriyosinler, üretici hücreler üzerine öldürücü etki göstermeyen, sınırlı sayıdaki bakterilere etkili olan antagonistik maddeler olduklarından antibiyotikler için alternatif rol oynayabilirler (Evren ve. 2006).

Bu çalışmada, LAB'ları izole etmek amacıyla Afyonkarahisar İli'nde satışa sunulan paketsiz 20 farklı süt ve süt ürününden (peynir, kefir, yoğurt) 34 adet laktik asit bakterisi izole edilmiştir. İzolatların moleküler identifikasyonları için 16S rDNA PZR analizi yapılmıştır. İzolatların 16S rDNA sekans analiz sonuçlarına göre, % 41,1'i *Lactobacillus*, % 26,4'ü *Lactococcus*, % 32,3'ü *Enterococcus* cinsine dahil bulunmuştur. En fazla LAB örneği peynir örneklerinden izole edilerek identifikasyonları yapılmıştır. Peynir örneklerinden en çok *Lactobacillus* cinsine ait türler tanımlanmış olup bunlar arasında; *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus* yer almaktadır. Ayrıca peynir örneklerinden elde edilen LAB'lar arasından *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* türleri tanımlanmıştır. Süt örneklerinden elde edilen LAB'leri *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* türleri olarak tanımlanmıştır. Kefir örneklerinden elde edilen LAB'ları *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* türleri olarak tanımlanmıştır. Yoğurt örneklerinden

ise *Lactococcus lactis* ve *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus fermentum* türleri olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular daha önce yapılmış olan bazı çalışmalarla oldukça benzerlik göstermektedir (Jafari ve ark., 2011; Wang ve ark., 2016; Bennani ve ark., 2017, Masalam ve ark., 2018).

İşleyici ve Akyüz (2009), Van İli'nden topladıkları otlu peynir numenelerinden LAB'ları izole etmişlerdir. Bu izolatları *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* cinsine ait olduklarını tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada Kermanshasi ve Peymanfar (2012), peynir, yoğurt ve mısır silajından heterofermantatif LAB izole etmişler ve elde ettikleri izolatlarının 16S rDNA gen sekansları karşılaştırılarak *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus kefir* olarak tanımlamışlardır. Wassie ve Wassie (2016) ise çiğ süt örneklerinden 83 adet LAB izole ederek tanımlamışlardır. Elde ettikleri izolatların %26.51'i *Lactobacillus*, %21.69'u *Lactococcus*, %18.07'si *Leuconostocs*, %9.64'ü *Streptococcus*, %12.05'i *Pediococcus* ve %9.64'ü *Entrococcus* cinsi olarak belirlemişlerdir. Amirbozorgi ve ark., (2016), İran'ın geleneksel mandıra ürünlerinden LAB'ları izole ederek 16S rRNA analizi yöntemiyle tanımlamışlardır. Elde edilen izolatlar *Lactococcus lactis helveticus* ve *Lactobacillus brevis* türleri olarak belirlenmiştir. Başka bir çalışmada Wang ve ark., (2016), Moğolistan'ın geleneksel mandıra ürünlerinden laktik asit bakterilerini izole ederek tanımlamışlardır. Laktik asit bakterilerini tanımlamak için 16S rRNA gen analiz yöntemini kullanmışlardır. Baotou ve Bayannur'dan toplanan 66 adet mandıra ürününden 200 adet LAB izole etmişlerdir. LAB bakterileri, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* cinsleri olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlardan %32.18'i *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, %12.38'i *Lactobacillus plantarum* ve %11.39'u *Leuconosto mesenteroides* olarak belirlenmiştir. Bu çalışma mandıra ürünlerinin LAB çeşitliliği bakımından oldukça zengin olduğunu ve ileride yapılabilecek olan probiyotik seçimleri için oldukça önemli bir kaynak olduklarını göstermiştir. Luis ve ark., (2017), Brezilya'daki çiftliklerden topladıkları yöresel peynir örneklerinden LAB'ları izole ederek tanımlamışlardır. İzole ettikleri LAB'ların *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* ve *Lactococcus* cinsine ait

olduklarını belirlemişlerdir. En yaygın türlerin *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus rhamnosus* oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca peynir örneklerinde ilk kez *Enterococcus rivorum* türü izole edilerek tanımlamışlardır. Masalam ve ark., (2018), Suudi Arabistan'da yaptıkları bir çalışmada çiğ ve fermente sütlerden probiyotik potansiyeli olan LAB'ları izole ederek tanımlamışlardır. Çalışmada 46 adet LAB'ını 16S rDNA gen sekanslarını karşılaştırarak tanımlamışlardır. Sonuç olarak, *Lactobacillus casei* MSJ1, *Lactobacillus casei* Dwan5, *Lactobacillus plantarum* EyLan2 ve *Enterococcus faecium* Gail-BawZir8 türleri probiyotik potansiyeli en yüksek türler olarak saptanmıştır. Qian ve ark., (2018), Çin'de yapmış oldukları bir çalışmada yoğurt örneklerinden LAB izole etmişlerdir. 16S rDNA gen sekanslarını karşılaştırarak izolatları *Lactobacillus plantarum* YS2 olarak tanımlamışlar ve probiyotik özelliklerini belirlemişlerdir.

Çalışmamızda, LAB izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerini belirleyebilmek için agar spot testi ve agar kuyu difüzyon testi yapılmıştır. Test sonuçlarına göre; elde edilen laktik asit bakterileri en çok *L. monocytogenes* ATCC 1911, *S. aureus* ATCC 25923, *K. pneumoniae* NRRLB 4420, *P. aeruginosa* ATCC 11778, *S. faecalis* mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir.

İşleroğlu ve ark., (2008), yöresel peynir örneğinden antimikrobiyal aktiviteye sahip bakteri izole etmişlerdir. Karbonhidrat fermentasyonu ile yağ asidi profili testleri sonucunda bakterinin *Enterococcus faecalis* olduğunu saptamışlardır. Bu bakteri tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* ve *Listeria monocytogenes*'e karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğunu, ancak *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*'a karşı etkili olmadığını gözlenmiştir. Bu çalışmaya benzer olarak bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerde en yüksek antimikrobiyal etki *Listeria monocytogenes*'e karşı tespit edilirken *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Bacillus subtilis* NRS-744 üzerinde daha düşük etki tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada ise

Bayram ve Yıldırım (2016), yöresel bir peynir çeşidinden izole edilen bakteri ve bu bakterinin ürettiği antimikrobiyal bileşikler karakterize etmişlerdir. İzole edilen bakteri, genel mikrobiyolojik analizler, karbonhidrat fermantasyonu ve yağ asidi profili testleri sonucunda *Enterococcus faecium* BP olarak tanımlanmıştır. Antimikrobiyal bileşiğin antimikrobiyal spektrumu belirlenmiş ve inhibitör aktivitesi üzerine bazı enzimlerin, organik çözücülerin, ısıtılmanın, depolama koşullarının ve üretici bakterinin gelişim fazının etkileri araştırılmıştır. Antimikrobiyal bileşiğin bir bakteriyosin olduğunu ortaya koymuşlardır. Antimikrobiyal bileşik, test edilen bazı *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Campylobacter* ve *Citrobacter* cinslerine karşı inhibitör etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

5. SONUÇ

Yapılan çalışmalar süt ve süt ürünlerinin LAB'lar bakımından önemli birer kaynak olduklarını ve LAB'ların antimikrobiyal etki bakımından yüksek bir potansiyele sahip olduklarını göstermektedir. Bizim elde etmiş olduğumuz bulgular da bu çalışmaları desteklemektedir. Sonuç olarak bu çalışmada, Afyonkarahisar İli'nde satışa sunulan paketsiz 20 farklı süt ve süt ürününden (peynir, kefir, yoğurt) 34 adet laktik asit bakterisi izole edilmiştir. İzolatların moleküler identifikasyonları için 16S rDNA PZR analizi yapılmıştır. İzolatların 16S rDNA sekans analiz sonuçlarına göre, % 41,1'i *Lactobacillus*, % 26,4'sı *Lactococcus*, % 32,3'ü *Enterococcus* cinsine dahil bulunmuştur. Elde edilen LAB'lardan *Lactobacillus* cinsine ait tanımlanmış türler arasında en çok *Lactobacillus fermentum*, *Locatococcus* cinsine ait tanımlanmış türler arasında *Lactococcus lactis* ve *Enterococcus* cinsine ait tanımlanmış türler arasında ise *Enterococcus faecium* tespit edilmiştir. İzolatların antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için agar spot ve agar kuyu difüzyon testi kullanılmıştır. İzolatların tümü test edilen patojen mikroorganizmalar üzerinde farklı seviyelerde antimikrobiyal etki göstermiştir.

Elde edilen LAB izolatları en çok *L. monocytogenes* ATCC 1911, *S. aureus* ATCC 25923, *K. pneumoniae* NRRLB 4420, *P. aeruginosa* ATCC 11778, *S. feacalis* üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. *E. coli* ATCC 35218 ve *B. subtilis* NRS-744 mikroorganizmaları üzerinde ise daha düşük seviyede antimikrobiyal etkiye sahip oldukları saptanmıştır. Bu durum süt ve süt ürünlerinden izole edilen LAB'ların antimikrobiyal aktiviteye sahip bakteriyosin ve/veya bakteriyosin benzeri madde üretebildiklerini göstermiştir. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalar ile izole edilen LAB'ların ürettiği oldukları bakteriyosin ve/veya bakteriyosin benzeri maddeleri izole edilip saflaştırılarak karakterize etmeye yönelik olmalıdır. Böylece bu izolatlar hem gıda hemde sağlık sektöründe, biyoteknolojik çalışmalarda potansiyel olarak kullanılabilirler.

ÖZET

Laktik asit bakterileri antimikrobiyal etkiye sahip bakteriyosin gibi bazı maddeler üretirler. Bunlar, hem gıda üretiminde hem de sağlık sektöründe patojen mikroorganizmalara karşı inhibitör olarak kullanılma potansiyeline sahiptirler. Bu çalışmada, Afyonkarahisar İli'nde satışa sunulan markasız, paketsiz 20 farklı süt ve süt ürününden (peynir, kefir, yoğurt) 34 adet laktik asit bakterisi izole edilmiştir. İzolatların moleküler identifikasyonları için 16S rDNA PZR analizi yapılmıştır. İzolatların 16S rDNA sekans analiz sonuçlarına göre, % 41,1'i *Lactobacillus*, % 26,4'sı *Lactococcus*, % 32,3'ü *Enterococcus* cinsine dahil bulunmuştur. En fazla laktik asit bakterisi peynir örneklerinden izole edilerek identifikasyonları tamamlanmıştır. 16S rDNA sekans analizi sonuçlarına göre peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterileri *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* olarak tanımlanmıştır. Süt örneklerinden elde edilen laktik asit bakterileri *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* türleri olarak tanımlanmıştır. Kefir örneklerinden elde edilen laktik asit bakterileri *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* türleri olarak tanımlanmıştır. Yoğurt örneklerinden ise *Lactococcus lactis* ve *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus fermentum* türleri olarak tanımlanmıştır. İzolatların antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için agar spot ve agar kuyu difüzyon testi kullanılmıştır. İzolatların tümü test edilen patojen mikroorganizmalar üzerinde farklı seviyelerde antimikrobiyal etki göstermiştir. LAB izolatları *Listeria monocytogenes* ATCC 1911, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* NRRLB 4420, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11778, *Streptococcus faecalis* üzerinde *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Bacillus subtilis* NRS-744 göre daha yüksek seviyede antimikrobiyal etki göstermiştir. LAB izolatları en yüksek antimikrobiyal etkiyi ise *Listeria monocytogenes* ATCC 1911 üzerinde göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyosin, İzolasyon, İdentifikasyon, Laktik asit bakterileri

SUMMARY

Lactic acid bacteria produce some substances that has got a antimicrobial activity, such as bacteriocin. They have the potential to be used as inhibitors against pathogenic microorganisms in both food production and health sector. In this study, 34 lactic acid bacteria were isolated from 20 different milk and fermented milk products (cheese, kefir, yogurt) in Afyonkarahisar province. 16S rDNA PCR analysis was performed for molecular identifications of isolates. According to the results of 16S rDNA sequence analysis of isolates, 41,1% were found to belong to *Lactobacillus*, 26,4 % to *Lactococcus* and 32,3 % to *Enterococcus* genus. Most of lactic acid bacteria were isolated from cheese samples and their identified. As a result of 16S rDNA sequence analysis isolates of cheese samples were identified as *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*. Isolates of milk samples were identified as *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*. Lactic acid bacteria of kefir samples were identified as *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*. Lactic acid bacteria of yogurt samples were identified as *Lactococcus lactis* ve *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus fermentum*. Agar spot and agar-well diffusion assay method were used to determine the antimicrobial activity of the lactic acid bacteria isolates. All of the isolates showed antimicrobial activity at different levels on the tested pathogenic microorganisms. LAB isolates showed higher antimicrobial activity on *Listeria monocytogenes* ATCC 1911, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* NRRLB 4420, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11778, *Streptococcus. faecalis* than *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Bacillus subtilis* NRS-744. LAB isolates showed the highest antimicrobial activity on *Listeria monocytogenes* ATCC 1911.

Key words: Bacteriocin, Identification, Isolation, Lactic Acid Bacteria

7. KAYNAKLAR

- ABRIOUEL, H., GÁLVEZ, A., LÓPEZ, R.L., OMAR, N.B. (2007). Bacteriocin based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, **120**: 51-70.
- AMIRBOZORGI, G., SAMADLOUIE, H., SHAHIDI, S.A. (2016). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Iranian traditional dairy products, *IBBJ Winter*, **2 (1)**: 47-52.
- ARABESTANI, M.R., MOUSAVI, S.M., ALIKHANI, M.Y. (2014). Bacteriocins as the alternatives to antibiotics, *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, **Doi**: 1(2): e21086. doi: 10.17795/ajcmi-21086.
- ATRIH, N. R., MOIR, A.J.G., LEBRIHI, A., LEFEBVRE, G. (2001). Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *International Journal of Food Microbiology*, **68**: 93-104.
- AZADNIA, P. and KHAN-NAZER, A. H. (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional drinking yoghurt in tribes of Fars province. *Iranian Journal of Veterinary Research Shiraz University*, **10**: 235-240.
- BAREFOOT, S.F. and KLAENHAMMER T.R. (1984). Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin Lactacin B, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **26 (3)**: 328-334.
- BAYRAM, M. ve YILDIRIM, Z. (2016). Beyaz peynirden bakteriyosin üreten bakterinin (*Enterococcus faecium*) izolasyonu ve bakteriyosinin karakterizasyonu, *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, **13**:103-115.
- BEASLEY, S.S. and SARIS, P.E.J. (2004). Nisin producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk, *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 5051-5053.
- BENNANI S. , MCHIOUER K. , ROKNI Y. , MEZIANE M. (2017). Characterisation And Identification Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Moroccan Raw Cow's Milk. *J. Mater. Environ. Sci.* Page 4934-4944.
- BIZANI, D., MORRISSY, J.A.C., DOMINGUEZ, A.P.M., BRANDELLI, A. (2008). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A, *International Journal of Food Microbiology*, **121**: 229-233.
- BLASER, M. (2011). Antibiotic overuse: stop the killing of beneficial bacteria, *Nature*, **476 (7361)**: 393-394.

- CHEN, H., HOOVER, D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2**: 82-100.
- CLEVELAND, J., MONTVILLE, T.J., NES, I.F., CHIKINDAS, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, *International Journal of Food Microbiology*, **71**: 1-20, 2001.
- COOPER, M.A. and SHLAES, D. (2011). Fix the antibiotics pipeline, *Nature*, **472** (7341): 32 (Doi: 10.1038/472032a.).
- CORR, S.C., LI, Y. RIEDEL, C.U., O'TOOLE, P.W., HILL, C., GAHAN, C.G. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**: 7617-7621.
- COŞANSU, S., KULEASAN, H., AYHAN, K., MATERON, L. (2007). Antimicrobial activity and protein profiles of *Pediococcus* spp. isolated from Turkish, sucuk. *Journal of Food Processing and Preservation*, **31**(2): 190-200.
- COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, R.P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food, *Nature Reviews Microbiology*, **3**(10): 777–788.
- COTTER, P.D., ROSS, R.P., HILL, C. (2013). Bacteriocins aviable alternative to antibiotics *Nature Reviews Microbiology*, **11**: 95-105, 2013.
- ÇELİK, Ü. and ALHAN, E. (2008). Pediatrik enfeksiyonlarda zorlu patojen: Enterokoklar, *Journal of Pediatric Infection*, **3**: 58-66.
- KIŞLA, D. ve ÜNLÜTÜRK, A. (2003). Nisinin antimikrobiyal etkisi, taze ve işlenmiş balıklarda kullanımı, *Ege University Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **20**(3-4): 543- 550.
- DE MARTINIS, E.C.P., ALVES, V.F., FRANCO, B.D.G.M. (2002). Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat. *Food Reviews International*, **18** (2): 191-208.
- DE VUYST, L. and F. LEROY (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **13**: 194-199.
- DEEGAN, L.H., COTTER, P.D., COLIN, H., ROSS, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension, *International Dairy Journal*, **16**: 1058-1071.
- DERAZ, S.F., KARLSSON, E.N., HEDSTRÖM, M., ANDERSSON M.M., MATTIASSON, B. (2005). Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *Journal of Biotechnology*, **117**: 343-354.

- DEVLIEGHERE, F., VERMEIREN, L., DEBEVERE, J. (2004). New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, **14**: 273-285.
- DİNÇER, E., KIVANÇ, M., KARACA, H. (2010). Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri, *Gıda / The Journal of Food*, **35(1)**: 1-8.
- DODD, H.M. and GASSON, M.J. (1994). Bacteriocin of lactic acid bacteria. In: M.J. GASSON and de VOS, W.M. (Eds). *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, Blackie Academic and Professional, London, 211-251.
- EIJSSINK, V.G.H., AXELSSON, L., DIEP, D.B., HAVARSTEIN, L.S., HOLO, H., NES, I.F. (2002). Production of class II bacteriocins by LAB; an example of biological warfare and communication, *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**: 639-654.
- ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K., ISHIZAKI, A. (2000). Class II bacteriocins: Biosynthesis, structure and activity, *Journal of FEMS Microbiology Review*, **24**: 85-106.
- ERDOĞMUŞ, S.F., KORCAN, S.E. (2017). Researches on Science and Art in 21 st Century Turkey, Chapter: Investigations of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *Gece Kitapevi* vol:1, 1497-1503.
- ERDOĞRUL, Ö.Z, ÇETİN, Ö., ERGÜN, Ö. (2002). Fermente sucuklardan izole edilen *Pediococcus pentosaceus* suşlarının bazı metabolik ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalışmalar. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **28 (1)**: 249-254.
- EVREN, M., ALBAYRAM, C., APAN, M. (2006), Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu antimikrobiyal maddeler. *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, May 24-26, Bolu, Türkiye, Kongre Bildiri Kitabı, 977-980.
- FELIS, G.E. and DELLAGLIO, F. (2007). Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues Intestinal Microbiology*, **8**: 44-61.
- FERNANDEZ, E., ALEGRIA, A., DELGADO, S., MARTIN, M. (2011). Comparative phenotypic and molecular genetic profiling of wild *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains of the *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* genotypes, isolated from starter-free cheeses made of raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 5324-5335.
- FIELD, D., BEGLEY, M., O'CONNOR, P.M., DALY, K.M., HUGENHOLTZ, F., COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, R.P. (2012). Bioengineered nisin a derivatives with enhanced activity against both gram positive and gram negative pathogens. *PLOS ONE*, **Doi**: 10.1371/journal.pone.0046884.
- FOEGEDİNG, P.M., THOMAS, A.B., PİLKİNGTON, D.H., KLAENHAMMER, T.R. (1992). Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ produced

- pediocin during dry fermented sausage production. *Applied Environmental Microbiology*, **58**: 884-890.
- FREMAUX, C., AHN, C., KLAENHAMMER, T.R. (1993). Molecular analysis of the lactacin foperon, *Applied and the Environmental Microbiology*, **59**: 3906–3915.
- GÁLVEZ A., ABRIOUEL, H., LÓPEZ, R.L., OMAR, N.B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, **120**: 51-70.
- GARNEAU, S., MARTIN, N. I., VEDERAS, J.C. (2002). Two peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, **84**: 577-592.
- GIRAFFA, G. (1995). Enterococcal bacteriocins: Their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiology*, **12**: 291-299.
- GOH, H.F., and PHILIP, K. (2015). Purification and characterization of bacteriocin produced by *Weissella confusa* A3 of dairy origin, *PLOS ONE*,| **Doi**:10.1371/journal.pone.0140434.
- GÜLGÖR, G. ve ÖZÇELİK, F. (2014), Bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin probiyotik amaçlı kullanımı, *Akademik Gıda*, **12(1)**: 63-68.
- HALKMAN, A.K. (2005). Gıda Mikrobiyoloji Uygulamaları. Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ankara.
- HAMMES, W.P. and HERTEL, C. (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Prokaryotes*, **4**: 320-403.
- HAYALOĞLU, A.A, ERGİNKAYA, Z. (2001). Gıda endüstrisinde kullanılan laktik asit bakterileri, Gıda Teknolojileri Derneği, Yayın No:23. Ankara.
- HEGARTY, J.W., GUINANE, C.M., ROSS, R.P., HILL, C., COTTER, P.D. (2016). Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait?, *F1000 Research*, **27(5)**:2587, **Doi**:10.12688/f1000research.9615.1).
- HOLO, H., NILSSEN, O., Nes, I.F. (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* sub sp.cremoris: Isolation and characterization of the protein and its gene, *Journal of Bacteriology*, **173**: 3879–3887.
- HOLZAPFEL, W. and WOOD, B.J. (2012). The genera of lactic acid bacteria: Lactic acid bacteria in contemporary perspective, Springer Science & Business Media, 1-6, eBook ISBN: 978-1-4615-5817-0.
- HOLZAPFEL, W.H. and SCHILLINGER, U. (2002). Introduction to pre-and probiotics. *Food Research International*, **35**: 109-116.

- HUGAS, M., GARRIGA, M., AYMERICH, M.T., MONFORT, J.M. (1995). Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *Applied Bacteriology*, **79**: 322-330.
- İŞLEROĞLU H., YILDIRIM Z., DEMİRPENÇE Y., YILDIRIM M. (2008). Enterekokların biyokimyasal, fizyolojik ve fonksiyonel özellikleri ile patojenitesi. *Akademik Gıda Bilimi ve Teknoloji Dergisi*, **6(3)**: 16-26.
- İŞLEROĞLU, H., YILDIRIM, Z., YILDIRIM, M. (2008). Yöresel peynirden antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı, *Gazi Osmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **25 (1)**: 1-6.
- İŞLEYİCİ Ö. , AKYÜZ N. (2009). Van İlinde Satışa Sunulan Otlı Peynirlerde Mikrofloranın ve Laktik Asit Bakterilerinin Belirlenmesi. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*. ISSN: 1017-8422; e-ISSN: 1308-3651.
- JAFARI B. , REZAIE A. and ALIZADEH S. (2011). Isolation and Identification of potentially probiotic bacteria from Traditional Dairy Products of Ardabil region in Iran. *Annals of Biological Research*. 2 (6):311-317
- JOERGER, M.C. and KLAENHAMMER, T.R. (1990). Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gen encoding the bacteriocin helveticin J, *Journal of Bacteriology*, **172**: 6339-6347.
- KAUR, S. (2015). Bacteriocins as potential anticancer agents, *Front Pharmacol*. 6: 272, **Doi**: 10.3389/fphar.2015.00272.
- KERMANSHAHI K.R. , PEYMANFAR S. (2012). Isolation and Identification of Lactobacilli From Cheese, Yoghurt and Silage by 16S rDNA Gene and Study of Bacteriocin and Biosurfactant Production *Jundishapur J Microbiol*.Page;5(4):528-532.
- KIMOTO-NIRA, H., SUZUKI, C., SASAKI, K., KOBAYASHI, M., MIZUMACHI, K. (2010). Survival of a *Lactococcus lactis* strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions simulated gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, **143**: 226-229.
- KLAENHAMMER, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *Journal of FEMS Microbiology Review*, **12**: 39-86.
- KLEIN, G., PACK, A., BONAPARTE, C., REUTER G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **41**: 103-125.
- KURT, Ş. and ZORBA, Ö. (2005). Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanım olanakları. *YYÜ Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, **16 (1)**: 77-83.

- LÓPEZ-CUELLAR, R., RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A.I., CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N. (2016). LAB bacteriocin applications in the last decade, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **30(6)**: 1039-1050.
- LUIZ L. M. P., CASTRO R. D., SANDES S. H. C., SILVA J. G., OLIVEIRA L. G., SALES G. A., NUNES A. C. & SOUZA M. R. Isolation And Identification Of Lactic Acid Bacteria From Brazilian Minas Artisanal Cheese. (2017). *CyTA - Journal of Food*. ISSN: 1947-6337
- MAGNUSSON, J. and SCHNÜRER, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied Environmental Microbiology*, **67**: 1-5
- MASALAM M. S, BAHIELDİN A. , ALHARBİ M. G. , AL-MASAUDİ S. ,AL-JAOUNİ S. K. , HARAKEH S.M. AND AL-HİNDİ R. (2018). Isolation, Molecular Characterization and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria in Saudi Raw and Fermented Milk. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2018/7970463>.
- MILLETTE, M., CORNUT, G., DUPONT, C., SHARECK, F., ARCHAMBAULT, D., LACROIX, M.. (2008). Capacity of human nisin and pediocin producing lactic acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin resistant enterococci, *Applied and Environmental Microbiology*, **74**:1997- 2003.
- MILLION, M., ANGELAKIS, E., DRISSI, F., RAOULT, D. (2013). Occam's razor and probiotics activity on *Listeria monocytogene*, *Proceedings of National Academy of Sciences*, **Doi**: 10.1073/pnas.1218418110.
- MOSHOOD, A.Y. and TENGKU, H.A. (2013). Lactic acid bacteria: Bacteriocin producer. *IOSR Journal of Pharmacy*, **3(4)**: 44-50.
- MULDERS, J.W., BOERRIGTER, I.J., ROLLEMA, H.S., SIEZEN, R.J., DEVOS, W.M. (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin_Z, a natural nisin variant, *European Journal of Biochemistry*, **201**: 581–584.
- NESPOLO, C.R. and BRANDELLI, A. (2010). Production of bacteriocin-like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese, *Brazilian Journal of Microbiology*, **41(4)**: 1009-1018.
- ODAMAKI, T., YONEZAWA, S., KITAHARA, M., SUGAHARA, Y., XIAO, J. Z., YAESHIMA, T., IWATSUKI, K., OHKUMA, M. (2011). Novel multiplex polymerase chain reaction primer set for identification of *Lactococcus* species. *Letters in Applied Microbiology*, **52**: 491-496.
- OSCÁRIZ, J.C. and PISABARRO, A.G. (2001). Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *International of Microbiol*, **4**: 13-19.

- OUWEHAND, A.C. (1998). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: S. Salminen and A. Von Wright (Eds.). *Lactic Acid Bacteria : Microbiology and Functional Aspects*. Marcel Dekker, Inc., New York. 139-159.
- ÖZTEBER, M. (2013). Fermente süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliklerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- PARADA, J. L., CARON, C. R., MEDEIROS, A. B. P., SOCCOL, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **50**: 521-542.
- PRINGSULAKA, O., THONGNGAM, N., SUWANNASAI, N., ATTHAKOR, W., POTHIVEJKUL, K., RANGSIRUJI, A. (2012). Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from thai fermented meat and fish. *Food Control*, **23**: 547- 551.
- QIAN Y. ,LONG X. ,PAN Y. ,Lİ G. ,ZHAO X. (2018). Isolation and identification of lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* YS2) from yak yogurt and its probiotic properties. *Biomedical Research* ;29 (4): 815-820
- RAUTA, P.R., DHUPAL, M., NAYAK, B. (2013). Screening and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from vegetable waste and fish intestine. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **2(8)**: 234-244.
- RILEY, M.A. and WERTZ, J.E. (2002). Bacteriocins: Evolution, ecology and application, *Annual Reviews in Microbiology*, **56**: 117-137.
- RODRIGUEZ, E.G.B., GAYA, P., NANEZ, M., MEDINA, M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk, *International Dairy Journal* , **10**: 7-15.
- SCHILLINGER U. and LUKE, F. K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, **55(8)**: 1901-1906.
- SCHLEIFER, K. H. and KILPPER-BÄLZ, R. (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci. *Systematic and Applied Microbiology*, **10**: 1-19.
- SCHNURER, J. and MAGNUSSON, J. (2005). Antifungal activity against *Aspergillus parasiticus* of supernatants from whey permeates fermented with kefir grains, antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*, **16**: 70-78.

- SMIT, G., VLIEG, J.H., SMIT, B.A., AYAD, E.H.E. (2002). Fermentative formation of flavour compounds by lactic acid bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, **57 (2)**: 61-68.
- SULLIVAN, O., ROSS, R.P., HILL, C. (2002). Review: Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality, *Journal of Biochimie*, **84**: 593-604.
- TEMİZ, A. (2000). Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatiboğlu Yayınevİ, 291 s, Ankara.
- TODOROV, S.D. (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* production, genetic organization and mode of action, *Brazilian Journal of Microbiology*, **40**: 209-221.
- TODOROV, S.D. and DICKS, L.M.T. (2004). Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31, *Enzyme and Microbial Technology*, **36**: 318-326, 2004.
- TURNER, P.C., MCLENNAN, A.G., BATES, A.D., WHITE, M.R.H. (2004). Moleküler Biyoloji Önemli Notlar, Konuk, M. (Eds) Nobel Yayın, 613: 346 s.
- VAN BELKUM, M.J. AND STILES, M.E. (2000). Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria, *Natural Product Reports*, **17**: 323-335.
- WANG D. , LIU W. , REN Y. , DE L. , ZHANG D. , YANG Y. ,BAO Q. , ZHANG H. , AND MENGH B. (2016). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Traditional Dairy Products in Baotou and Bayannur of Midwestern Inner Mongolia and q-PCR Analysis of Predominant Species. *Korean J. Food Sci. An.* Vol. 36, No. 4, pp. 499~507.
- WASSIE M. and WASSIE T. (2016). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Raw Cow Milk. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 3(8): 44-49.
- WHITE, A.R. (2011). Bsac working party on the urgent need: Regenerating antibacterial drug discovery, development. effective antibacterials: at what cost? the economics of antibacterial resistance and its control, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **66(9)**:1948–1953.
- WIRAWAN, R.E., KLESSE, N.A., JACK, R.W., TAGG, J.R. (2006). Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*, *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 1148–1156.
- YANG, S.C., LIN, C.H., SUNG, C.T., FANG, J.Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals, *Frontiers in Microbiology*, **Doi**: 10.3389/fmicb.2014.00241, 2014.

- YONEZAWA, S., XIAO, J. Z., ODAMAKI, T., ISHIDA, T., MIYAJI, K., YAMADA, A., YAESHIMA, T., IWATSUKI, K. (2010). Improved growth of bifidobacteria by co-cultivation with *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. *Journal of Dairy Science*, **93**: 1815-1823.
- ZACHAROF, M.P. and LOVITT, R.W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: a review article, *APCBEE Procedia*, **2**: 50-56.
- ZHANG, Z., VRIESEKOOOP, F., YUAN, Q., LIANG, H. (2014). Effects of nisin on the antimicrobial activity of d-limonene and its nanoemulsion, *Food Chemistry*, **150**:307-312.



EKLER

K1 *Lactobacillus fermentum* strain CAU:3341 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF354239.1](#) Length: 1402 Number of Matches: 1

CGGTAGCACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTC
TGGGAAACTGCCCCGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAA
CGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATG
GGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGA
GAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGA
AGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCKC
AGCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGT
CTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCGAAACTGGC
AGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTG
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
TCGACTTGAGAGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACC
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACAT
CCACAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGAGACAGGTGCTGCAT
GGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCT
TAT

K2 *Enterococcus durans* strain CAU6145 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF424830.1](#) Length: 1407 Number of Matches: 1

ACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTG
AGTAACACGTGGGTAACTGCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAA
TACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCT
GATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCYAC
GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCA
ACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACA
AGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTA
AAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAG
GGTCATTGGAAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTG
TAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT

CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGC
 TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT
 TGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAA
 CCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCCTTCGGGGG
 CAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTT

K3 *Enterococcus faecium* strain BL6-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF784205.1](#) Length: 1330 Number of Matches: 1

GGGATAAACAATTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAACCGCATGGTTT
 TGATTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGT
 TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACRATGCATAGCCKACCTGAGAGGGTGATCGG
 CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
 CGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCRCGTGAGTGAARAAGGTTTTTCGGAT
 CGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGG
 TATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
 GCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGA
 TGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCA
 GAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACA
 CCAGTGCGGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTSAGGCTCGAAAGCGTGGGG
 AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT
 GGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
 CGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCAT
 GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACT
 CTAGAGATAGAGCTTCCCCCTTCGGGGGCAAARTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
 CTCGTGTCTGTG

K4 *Lactobacillus fermentum* strain CAU:3341 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF354239.1](#) Length: 1402 Number of Matches: 1

GAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTG
 CCCGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGA
 CCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTA
 GTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACC
 AGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
 TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGG
 GTTGTAAGTACTTTTACGCGAGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCKCAGCAATTGAC
 GTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG
 GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTC
 GGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCGAACTGGCAGGCTAGAGT
 CTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA
 ATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTG
 GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGA
 GGTGTGTCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAG
 TACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGC
 ATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCASAGAAMT

TAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCCTGTCGT
CAGCTCGTGTGTGAAATGTTTGGGTAAAGTCCCGCCAAC

K5 *Enterococcus faecium* strain CAU10244 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF429017.1](#) Length: 1377 Number of Matches: 1

CTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGT
ATAACAATCAAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGA
TGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACRATGCAT
AGCKKACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCRC
GTGAGTGAARAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGA
GAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGA
GCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATT
GGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGA
CGCTSAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCA
TTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACC
AGGTCTTGACATCCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAARTGA
CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC
GAGMGAACCCTTATGGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGC

K6 *Enterococcus faecium* strain L030(LBF2)D03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KM269699.1](#) Length: 1098 Number of Matches: 1

TCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAA
CACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCG
TATAACAATCAAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGG
ATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGC
ATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCC
GCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGAT
GAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGC
GAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTC
ATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAC
TGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTANACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAAC
GCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
TACCAGGTCTTGACATCCCTTTGACCACTCTAGAGATRGAGCTTCCCCCTTCGGGGGCA
AAGTGACC

P1 *Lactobacillus plantarum* strain CAU8958 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [MF424671.1](#) Length: 1402 Number of Matches: 1

GAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC
TGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAA
ACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGT
GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGA
GAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGA
AGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTT
ATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGT
TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGG
AGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
ATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCT
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
AGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
CGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
ATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGGCAAARTGACAGGTGGTGC
AGGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTATTGTTAGTTGCCATCATTACAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACC
GGAAG

P2 *Enterococcus faecium* strain CAU10244 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [MF429017.1](#) Length: 1377 Number of Matches: 1

TTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAC
GTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTAT
AACAAATCAAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATG
GACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCG
TGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAG
AGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG
CGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG
GAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTAC
GCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT
TAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
GCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGGCAAAGTGAC
AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTACAGTTNGGGCACTCTAGCAAGAMTGGCC
GGTGACAAACCGGAAGGAAGGT

P3 *Lactobacillus curvatus* strain 1TP06-BL06 16S ribosomal RNA gene, partial sequenceSequence ID: [MG031211.1](#) Length: 1470 Number of Matches: 1

GATTGAAGAAGCTTGCTTCTGATTGATAACATTTGAGTGAGTGGCGGACGGGTGASTAN
CACGTGGGTAACYTGCCCTAAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCG
CATAAAACCTAGCACCGCAYGGTGCAAGGTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTTAGG
ATGGACCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGACCGTGATGC
ATAGCCSACCTGAGAGGGTAATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCC
GCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACGTATTTG
ATAGTAAGTATGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTTGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGC
GAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGC
ATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAKAGGACAGTGGAATCCATGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC
TGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAT
GCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAAC
GCATTAAGCACTCCGCCTGAGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC
AGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT
ACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTRGAGATAGAGCTTTCCTTCGGGGACAAAG
TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC

P4 *Lactobacillus plantarum* strain CAU5103 16S ribosomal RNA gene, partial sequenceSequence ID: [MF424161.1](#) Length: 1410 Number of Matches: 1

AGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTT
GCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAA
CCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTG
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAA
GGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTCA
TCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTT
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAG
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCG
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
TGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCG
CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCCGCACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC
CTTTGACCACTCTGGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAARTGACAGGTGGTGCATG
GTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
ATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGA

P5 *Lactococcus lactis subsp. lactis* strain IMAU11239 (YM16-1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, Sequence ID: [KP764102.1](#) Length: 1438 Number of Matches: 1

TCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGA
 GTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAAT
 ACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTT
 TTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGA
 TACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCT
 CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAAC
 GCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATA
 TCTGAGAGTAACTGTTTACAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG
 TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAA
 GCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTG
 CATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG
 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAA
 CTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
 TACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAA
 CGCATTAAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGA
 CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCT
 TACCAGGTCTTGACATACTATGCAAACTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATG
 GATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT

P6 *Lactobacillus helveticus* strain bcpcq-j-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KX247766.1](#) Length: 1510 Number of Matches: 1

GAATGACGAGAAGCTTGCTTCTCTGATTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGC
 AACCTGCCCTACAGATTGGGATAACTCAGGGAACCTGGGCTAATACCGAATAATCCTT
 CGAATCACATGTTTTGAAGTTGAAAGGCGCTTCGGCGTCACTGTAGGATGGGCCCCGCGG
 TGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTG
 AGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGC
 AGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
 AAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACGTTAGGAAATGA
 ACGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
 TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGT
 TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGG
 AACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA
 TTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTGTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGC
 GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA
 GTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAAGCACTCC
 GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
 GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAAACCTTACCAGGTCTTGAC
 ATCCCAATGA

P7 *Lactococcus lactis* strain CAU9899 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF098112.1](#) Length: 1373 Number of Matches: 1

CAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCG
 CATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTAT
 TAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGG
 GTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
 GGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGG
 TTTCCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTACAGT

ATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTT
AAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACT
TGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATG
GAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAA
GTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGC
TAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGTGTCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCT
GGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACT
ATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGG

P8 *Lactobacillus rhamnosus* strain R19B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MG685875.1](#) Length: 1419 Number of Matches: 1

CGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTAAATTTGAACGAGTGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGAAACAGAT
GCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCT
ATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCAATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGC
CCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG
GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAA
GAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCG
AGGAAGTGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATG
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTG
GTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCC
GCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAA
GGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG
AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGARATCAGGTTTCCCCTTCGG
GGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC

P9 *Lactococcus lactis subsp. lactis* strain CAU9932 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF098094.1](#) Length: 1413 Number of Matches: 1

TTGGCCCAATTGATTGANGGTGCTTGCACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCAGAAAGCGGGGGACAACATTTGAAACA
GATGCTAATACCGCATAACAACGTTGTTTCGCATGAACAACGCTKAAAAGATGGCTTCTC
GCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAAYGGCCTACC
AAGGCKATGATGCATAGCCGAGTTGASAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACAC
GGCCATACTCCTACGGGAGGCARCASTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTG
ATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAA
RAAKAACACGTAYGAGAGTAACTGTTTCATACRTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTACGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGWCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTA
ACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAAGTC
CATGTGTAGCGGTGGAATGCKTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTA
CCTGGTCTGCAACTGACGCTAAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAC

CCTGGTAGTCCATGCCGTANACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAS
 TGCCGGAGCTAACGCAMTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT
 CAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGRAGCTA
 CNCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTYGCGCCAACCTAGAGATAGGGCGTTTCC
 TTCGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCNTCAGCTCGTGTCT

P10 *Lactobacillus plantarum* strain Lb17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: MG825687.1 Length: 1373 Number of Matches: 1

AAGCGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCAT
 GGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAG
 CTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTA
 ATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTT
 CGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATT
 GACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
 AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAG
 TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGA
 GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAA
 GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTA
 TGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAA
 GTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGG
 GAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG
 GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATG
 CAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTT

P11 *Lactobacillus plantarum* strain Lb32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: MG825720.1 Length: 1380 Number of Matches: 1

TATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAAC
 ACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGC
 ATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGG
 TGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGRGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGT
 AGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTAC
 GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGC
 GTGAGTGAAGAAGGGTTTCCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGACATATCTGA
 GAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
 GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGA
 GCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATC
 GGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAA
 ATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTGA
 CGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACC
 GTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCA
 TTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
 GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACC
 AGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATA
 CAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC
 GAGC

P12 *Lactobacillus casei* strain SYB-H 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KY010410.1](#) Length: 1397 Number of Matches: 1

AGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACT
 GCCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAA
 CCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTG
 CAKTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAG
 AGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 TAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAA
 GGTTCGCGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTCA
 TCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
 ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTT
 CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAG
 ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
 ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCG
 AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
 TGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCG
 CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAG
 CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATC
 CTTTGACCACTCTTGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAAGTGGTGCAAG
 GTTGTCTGTCAGCTCGTG

P13 *Lactobacillus fermentum* strain CAU6507 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF424168.1](#) Length: 1419 Number of Matches: 1

CGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA
 CCTGCCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCA
 AAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCG
 GTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCT
 GAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAG
 CAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA
 GAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTG
 TTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
 GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCG
 GTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGG
 GAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 TATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC
 TCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
 GAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACT
 CCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCAC
 AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGA
 CATCCTTTGACCACTCTGGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTG
 CATGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
 CCTTATGGTTA

P14 *Enterococcus faecalis* strain E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KM507563.1](#) Length: 1456 Number of Matches: 1

CTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTA
 ACACGTGGGTAACTGCCCATCAGAAGGGGATAAACACTTGGAACAGGTGCTAATACC
 GTATAACAATCAAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATG

GATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATG
 CATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCC
 TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGC
 CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGA
 TGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
 CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAG
 CGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGT
 CATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGG
 TGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAA
 CTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
 CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAA
 CGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA
 CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCT
 TACCAGGTCTTGACATCCTTTGAWCACTCTGGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAA
 GTGACAGGTGG

P 15 *Lactococcus lactis* strain CAU9951 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF098133.1](#) Length: 1398 Number of Matches: 1

ACGAGAAGCTTGCTTCTCTGATTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT
 GCCCTACAGATTGGGATAACTCAGGGAAACCTGGGCTAATACCGAATAATCCTTCGAAT
 CACATGTTTTGAAGTTGAAAGGCGCTTCGGCGTCACTGTAGGATGGGCCCCGCGGTGCAT
 TAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGG
 GTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
 GGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGT
 TTTCCGATCGTAAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACGTTAGGAAATGAACGTA
 CCTTGACGGTACCTTATTAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
 CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTT
 AAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCT
 TGAGTGCAGAAGAGGATAGTGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTG
 GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTGTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAA
 GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC
 TAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC

P16 *Lactococcus lactis* strain CAU9374 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF582953.1](#) Length: 1382 Number of Matches: 1

CACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGG
 TAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAA
 TCAAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCC
 GCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGA
 CCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGG
 CAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGT
 GAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAA
 CTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
 GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG
 GCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAAC
 TGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT
 AGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGA
 GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC

GATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGC
 ACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
 CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAAGAACCTTACCAGGTC
 TTGACATCCTTTTGAYCACTCTAGAGATAGAGCT

S1 *Lactobacillus fermentum* strain CAU9954 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [MF098130.1](#) Length: 1386 Number of Matches: 1

ACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGGAATCTGCCTTT
 GAGCGGGGACAAACATTTGGAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTTTAAACACAA
 GTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTGTATTAGCT
 AGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
 CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
 CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCG
 GATCGTAAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAAGCTTGGTGAGAGTGGAAGCTCATCAWGT
 GACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
 AGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAG
 TCTGGTGTAAGGAGCAGTGGCTCAACCATTTGTATGCATTGGAACTGGTAGACTTGAGT
 GCAGGAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGA
 ACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCTGTAAGTACACTGAGGCTCGAAAGCGTG
 GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGAT
 GTAGGGAGCTATAAGTTCTCTGTATCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAG
 TACGACCGCAAGGTTGAAACTC

S2 *Enterococcus faecium* strain BL11-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [MF784165.1](#) Length: 1390 Number of Matches: 1

CTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCAT
 CAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAACCGCAT
 GGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCAKTAG
 CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTG
 ATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTT
 CGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTT
 GACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
 AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAG
 TCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGA
 GTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAG
 GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCG
 TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA
 GTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
 GAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGA
 CCACTCTTGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAAGTGGTGCAAGGTTGTC
 GTCAGCTCG

S3 *Enterococcus faecium* strain BL2-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [MF784117.1](#) Length: 1357 Number of Matches: 1

CTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCAT
 CAGAAGGGGATAAACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCAT
 GGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAG
 CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTG
 ATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
 ATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTT
 CGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTT
 GACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
 AGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAG
 TCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGA
 GTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAG
 GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGCG
 TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA
 GTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG
 GAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG
 AGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGA
 CCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC
 GTCAGCTCG

S4 *Lactobacillus fermentum* strain CAU1968 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF428872.1](#) Length: 1398 Number of Matches: 2

CTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGG
 GGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGTGGGG
 GACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTA
 ATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA
 ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGG
 CGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACT
 TTCAGCGAGGAGGAAGGCATTAAGGTTAATAACCTTAGTGATTGACGTTACTCGCAGA
 AGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAGGGTGCAAGCGTTA
 ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTAAAGTCAGATGTGAAATC
 CCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGAGAGGGG
 GGTAAGATTCCAGGTAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
 ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTGCACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAG
 GAGTGGCTTCGGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
 TAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT-
 AATTCGATGC

S5 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain Lc5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MG825736.1](#) Length: 1387 Number of Matches: 1

TTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGGAATCTGCCTTTGA
 GCGGGGGACAACATTTGAAACGAATGCTAATACCGCATAAAACTTTAAACACAAGT
 TTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTGTATTAGCTAG
 TTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCRACCTGAGAGGGTGATCG
 GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
 TCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGA

TCGTAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGGAAGCTCATCAAGTGA
 CGGTAACACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAG
 GTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTC
 TGGTGTAAGGAGCAGTGGCTCAACCATTGTATGCATTGGAACTGGTAGACTTGAGTGC
 AGGAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAAC
 ACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACACTGAGGCTCGAAAGCGTGCG
 GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGATGT
 AGGGAGCTATAAGTTCTCTGTATCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCTGGGGAGTA
 CGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT
 GTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTCGTGCTATT
 CCTAGAGATAGGAAGTTCCTTCGGGACACGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA
 GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC

S6 *Enterococcus faecium* strain BL11-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF784165.1](#) Length: 1390 Number of Matches: 1

TTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCC
 CATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCAAAACCG
 CATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCAK
 TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGG
 GTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG
 GGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGT
 TTTCCGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCC
 CTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
 CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTT
 AAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACT
 TGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATG
 GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAA
 GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC
 TAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCT
 GGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
 GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT
 TTGACCACTCTTGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAAGTGGTGCAAGGT
 TGTCGTCAGCTCG

S7 *Enterococcus faecium* strain CAU2899 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF429602.1](#) Length: 1401 Number of Matches: 1

TTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAC
 GTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTAT
 AACAATCAAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATG
 GACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCCACGATGCATA
 GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACG
 GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCG
 TGAGTGAAGAAGGTTTTCCGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAG
 AGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG
 CGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTG
 GAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAA

TGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTAC
 GCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
 TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT
 TAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
 GCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
 GGTCTTGACATCCTTTGAWCACTCTGGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGAC
 AGGT

Y1 *Lactobacillus fermentum* strain CAU9902 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF098114.1](#) Length: 1401 Number of Matches: 1

AAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGA
 TAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCAKGGTTTTGATT
 GAAAGGCGCTTTCGGGTGTCRGTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGA
 GGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCSACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAT
 TGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCYACGGGAGGCAGCASTAGGGAATCTTCGGCAA
 TGGAMRAAAGTCTGACCGAGCAACGCCRCGTGAGTGAAGAARGTTTTTCGGATCGTAAA
 ACTCTSTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTRTCTA
 ACCMGAAGCCACGGCTAACTACRTGCCAGCAGCCGCGGTAATACRTAGGTGGCAAGC
 GTTGTCGGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA
 AGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG
 GAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTG
 GCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
 CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGG
 TTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCG
 CAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
 TAATTCTAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTCGAG
 ATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAA

Y2 *Lactococcus lactis* strain CAU9374 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF582953.1](#) Length: 1382 Number of Matches: 1

TTCTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTA
 ACACGTGGGTAACTGCCCATCAGAAGGGGATAAACTTGGAACAGGTGCTAATACC
 GTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCRGTGATG
 GATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATG
 CATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCC
 TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGC
 CGCGTGAGTGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGA
 TGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
 CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAG
 CGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGT
 CATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGG
 TGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAA
 CTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
 CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAA
 CGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTG
 ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAAAAAC

CTTACCAGGGTCTTGACATCCTTTTGACCACTTCTAGAAGATAGAGCTTNCCCCTTCGGG
GGGCAAAGTGA

Y3 *Lactococcus lactis* strain CAU9374 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF582953.1](#) Length: 1382 Number of Matches: 1

TTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
GGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAA
CAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCRCTGATGGATGGA
CCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGC
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGG
AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTG
AGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAG
TAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCG
CAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA
AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGC
TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTA
AGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAAAAACCTTACCA
GGGTCTTGACATCCTTTTGACCACTTCTAGAAGATAGAGCTTNCCCCTTCGGGGGGCAA
AGTG

Y4 *Lactococcus garvieae* strain CAU6586 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF108375.1](#) Length: 1396 Number of Matches: 1

GAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAAC
ACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAA
GGCGCTTTCGGGTGTCRCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGG
ACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGA
CGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTC
TGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG
TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGA
GTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAGACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCC
GCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCWGGGGAGTACGACCGCAAG
GTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
TCGAAGCAA

Y5 *Enterococcus durans* strain GML-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF975715.1](#) Length: 1428 Number of Matches: 1

GTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGT
GAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTA

ATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCRC
 TGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCA
 CGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGC
 AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAAC
 AAGGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT
 ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT
 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGA
 GGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTA
 GCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCT
 GTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGAGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
 TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAG
 CTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGA
 ATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAA
 AAACCTTACCAGGGTCTTGACATCCTTTTGACCACTTCTAGAAGATAGAGCTT

Y6 *Lactococcus lactis* strain CAU9374 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MF582953.1](#) Length: 1382 Number of Matches: 1

GCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGCGAACGGGTGAGT
 AACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATAC
 CGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCRGTGAT
 GGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGAT
 GCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACG
 CCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG
 ATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
 GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAA
 GCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGG
 TCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCG
 GTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTA
 ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGAGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
 ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTA
 ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT
 GACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAAAAA
 CCTTACCAGGGTCTTGACATCCTTTTGACCACTTCTAGAAGATAGA