



**GIDA KAYNAKLI *LACTOBACILLUS* İZOLATLARINDA BİYOFİLM
OLUŞUMU VE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI**

Derya AKÇAY

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2019

Derya AKÇAY tarafından hazırlanan “GIDA KAYNAKLI LACTOBACILLUS İZOLATLARINDA BİYOFİLM OLUŞUMU VE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Başkan: Prof. Dr. Ahmet BAŞUSTAOĞLU

Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Başkent Üniversitesi

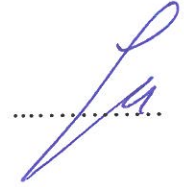
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Prof. Dr. Sumru ÇITAK

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Tez Savunma Tarihi: 08/07/2019

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Derya AKÇAY

08/07/2019

GIDA KAYNAKLI *LACTOBACILLUS* İZOLATLARINDA BİYOFİLM OLUŞUMU VE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Derya AKÇAY

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2019

ÖZET

Lactobacillus'lar; Gram pozitif, çubuk şeklinde, patojenik olmayan bakterilerdir. Bazı *Lactobacillus* türleri yoğurt, peynir, bira, şarap, turşu ve konserve gibi yiyeceklerde starter kültürü veya probiyotik olarak kullanılmaktadırlar. Genellikle güvenli (GRAS) olarak tanınırlar. Bununla birlikte, bazı çalışmalar bazı laktik asit bakteri (LAB) suşlarının slime/biyofilm oluşturabildiklerini, antibiyotik direnç genleri taşıyabildiklerini ve antibiyotiklere dirençli olduklarını göstermiştir. Biyofilm oluşturma yeteneği fermentasyon ve gıdaların korunması gibi işlemlerde kullanılan bakteriler için önemli bir özelliktir. Bu çalışmada Ankara'da tüketime sunulan peynir ve çiğ süt örneklerinden izole edilen toplam 103 *Lactobacillus* izolatının slime ve biyofilm oluşumları ile antibiyotik dirençlilikleri incelenmiştir. *Lactobacillus* türlerinin tanımlanmalarında morfolojik, kültürel ve biyokimyasal testler ve MALDI-TOF MS bakteri tanımlama yöntemi kullanılmıştır. Toplam 103 *Lactobacillus* spp. izolatının 48'i (%46,6) *L. plantarum*, 26'sı (%25,2) *L. fermentum*, 15'i (%14,6) *L. brevis*, 7'si (%6,8) *L. paracasei*, 2'si (%1,9) *L. zae*, 2'si (%1,9) *L. curvatus*, 1'i (%0,9) *L. amylolyticus*, 1'i (%0,9) *L. coryniformis*, 1'i (%0,9) *L. paracasei* spp. *tolerans* olarak tanımlanmıştır. Araştırma sonuçlarımıza göre, *Lactobacillus* izolatlarının %30,0'unun slime ve %87,4'ünün biyofilm ürettiği görülmüştür. Antimikrobiyal duyarlılık testinde izolatların ampisiline (%80,6) karşı oldukça dirençli, ancak tetrasiklin (%68,9), penisilin (%68,0), kloramfenikol (%96,1), gentamisine (%99,0), trimetoprim-sulfametoksazol (%85,4) ve eritromisine (%87,4) duyarlı olduğu görülmüştür.

Bilim Kodu	: 20325
Anahtar Kelimeler	: Peynir, Çiğ süt, <i>Lactobacillus</i> spp., Biyofilm, Antibiyotik direnci
Sayfa Adedi	: 81
Danışman	: Prof. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN

INVESTIGATION OF BIOFILM FORMATION AND ANTIBIOTIC RESISTANCE IN FOOD-BORNE *LACTOBACILLUS* ISOLATES

(M. Sc. Thesis)

Derya AKÇAY

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2019

ABSTRACT

Lactobacillus spp. are Gram-positive rod-shaped non-pathogenic bacteria. Most of the *Lactobacillus* spp. are widely used as starter cultures or probiotics in yoghurt, cheese, beer, wine, pickles and canned foods. They are generally recognized as safe (GRAS). However, studies have shown that some lactic acid bacteria (LAB) strains are able to form slime/biofilm and carry antibiotic resistance genes and are resistant to antibiotics. The ability to form a biofilm is an important feature for bacteria used in fermentation and food preservation. The present study was carried out to identify slime and biofilm formation, and antibiotic resistance of 103 *Lactobacillus* spp. isolates isolated from raw milk and cheese samples which were consumed in Ankara. The isolates characterized by morphological, cultural and biochemical tests and confirmed by MALDI-TOF MS. Out of the 103 *Lactobacillus* spp. isolates, 48 were identified as (46.6%) *L. plantarum*, 26 as (25.2%) *L. fermentum*, 15 as (14.6%) *L. brevis*, 7 as (6.8%) *L. paracasei*, 2 as (1.9%) *L. zae*, 1 as (0.9%) *L. amylolyticus*, 1 as (0.9%) *L. coryniformis*, and 1 as (0.9%) *L. paracasei* spp. *tolerans*. According to our results, 30.0% and 87.4% of the *Lactobacillus* spp. isolates produced slime and biofilm, respectively. In the antimicrobial susceptibility test, the isolates were highly resistant to ampicillin (80.6%), but sensitive to tetracycline (68.9%), penicillin (68.0%), chloramphenicol (96.1%), gentamisin (99.0%), trimetoprim-sulfametoksazol (85.4%), and erythromycin (87.4%).

Science Code	: 20325
Key Words	: Cheese, raw milk, <i>Lactobacillus</i> spp., biofilm, antibiotic resistance
Page Number	: 81
Supervisor	: Prof. Dr. Neslihan GÜNDÖĞAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN BAKIRCI'ya, katkılarından dolayı Prof. Dr. Sumru ÇITAK'a, her konuda olduğu gibi eğitimim boyunca da maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen biricik ve sevgili ailem babam Gürsel AKÇAY'a ve annem Gülten AKÇAY'a ve kardeşlerime, laboratuvar çalışmalarım boyunca bizden yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Meryem Burcu KOVUKOĞLU'na ve tez dönemim boyunca beraber olmaktan büyük mutluluk duyduğum çalışma arkadaşlarıma, bir de çalışmamda yapılan MALDI-TOF MS testi için yardımcı olan Ankara Halk Sağlığı'na ve çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR TARAMASI	5
2.1. Laktik Asit Bakterileri.....	5
2.2. <i>Lactobacillus</i> Cinsi Bakterileri ve Sınıflandırılması	7
2.3. <i>Lactobacillus</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri	9
2.4. <i>Lactobacillus</i> Cinsi Bakterilerin Gıdalardaki Önemi.....	9
2.5. Peynir ve sütte bulunan <i>Lactobacillus</i> türleri.....	10
2.6. Antibiyotik Direnci	10
2.6.1. Antibiyotiklerin tarihçesi	10
2.6.2. Antibiyotiklerin genel özellikleri	11
2.6.3. Antibiyotik direncinin önemi	12
2.7. Biyofilm	13
2.7.1. Biyofilm oluşumu	14
2.7.2. Biyofilmin antibiyotik direnci ile ilişkisi	16
2.7.3. Quorum Sensing (Çoğunluk Algılama).....	17

2.8. MALDI-TOF (Matriks Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight-Matriks Destekli Lazer Desorpsiyonu/İyonizasyonu) Bakteri Tanımlama Yöntemi.....	18
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. <i>Lactobacillus</i> spp. Bakterilerin İzolasyonu ve Tanımlanması	21
3.1.1. Koloni morfolojisi.....	21
3.1.2. Gram boyama testi	22
3.1.3. Katalaz testi.....	23
3.2. <i>Lactobacillus</i> spp. Bakterilerin İzolasyonunda Kullanılan Temel Besiyerleri ve Çözeltiler.....	24
3.3. <i>Lactobacillus</i> spp. Bakterilerinin Tanımlanması İçin Yapılan Testler	25
3.3.1. Vankomisin testi	26
3.3.2. MRS broth’da gaz oluşturma testi	26
3.3.3. 10°C’de ve 45°C’ de üreme testi	27
3.3.4. Arjinin hidroliz testi	27
3.3.5. Karbonhidrat deneyleri	28
3.4. <i>Lactobacillus</i> spp. bakterilerin biyokimyasal testlerinde kullanılan besiyerleri.	29
3.5. MALDI TOF MS Tanımlaması.....	30
3.6. <i>Lactobacillus</i> Türleri’nin Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi.....	30
3.7. Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi	33
3.7.1. Mikroplate yöntemi.....	33
3.7.2. Kongo kırmızılı agar yöntemi	36
4. BULGULAR	39
4.1. <i>Lactobacillus</i> İzolatlarının Tür Seviyesinde Tanımlanması.....	39
4.2. Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları.....	45
4.3. Biyofilm Sonuçları	51
4.3.1. Mikroplate yöntemiyle yapılan biyofilm sonuçları.....	52

	Sayfa
4.3.2. Kongo kırmızılı agarda slime sonuçları	59
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	81

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Antibiyotik dirençlilik testi için kullanılan diskler ve içerikleri.....	31
Çizelge 4.1. Peynir örneklerinden izole edilen <i>Lactobacillus</i> izolatlarının biyokimyasal test sonuçları.....	40
Çizelge 4.2. Çiğ süt örneklerinden izole edilen <i>Lactobacillus</i> izolatlarının biyokimyasal test sonuçları.....	43
Çizelge 4.3. MALDI-TOF MS bakteri tanımlama yöntemiyle tanımlaması yapılan <i>Lactobacillus</i> izolatlarının örneklerle göre dağılımı.....	44
Çizelge 4.4. Peynir örneklerinden izole edilen <i>Lactobacillus</i> izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri.....	47
Çizelge 4.5. Çiğ süt örneklerinden izole edilen <i>Lactobacillus</i> izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri	49
Çizelge 4.6. Peynir ve çiğ süttten izole edilen <i>Lactobacillus</i> izolatlarının antibiyotik dirençlilik yüzdelik dağılımları.....	50
Çizelge 4.7. <i>Lactobacillus</i> türlerinin antibiyotik dirençlilik dağılımları	51
Çizelge 4.8. Peynir ve çiğ süttten izole edilen <i>Lactobacillus</i> izolatlarının 540 nm’de ölçülen biyofilm testi sonuçları.....	53
Çizelge 4.9. Peynir ve çiğ süttten izole edilen <i>Lactobacillus</i> izolatlarının 540 nm’de ölçülen biyofilm testi sonuçları.....	55
Çizelge 4.10. Peynir ve çiğ süttten izole edilen <i>Lactobacillus</i> izolatlarının 540 nm’de ölçülen biyofilm testi sonuçları	58
Çizelge 4.11. <i>Lactobacillus</i> türlerinin mikropate yöntemiyle biyofilm oluşumlarının dağılımı	59
Çizelge 4.12. Kongo kırmızılı agarda slime sonuçları.....	60
Çizelge 4.13. <i>Lactobacillus</i> türlerinin CRA yöntemiyle slime oluşumlarının dağılımı	62

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. MALDI-TOF MS bakteri tanımlama mekanizması	19
Şekil 4.1. <i>Lactobacillus</i> türlerinin dağılımı	45

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. MRS agar besiyerinde <i>Lactobacillus</i> izolatlarının koloni oluşumu	22
Resim 3.2. Gram boyama yapılan <i>Lactobacillus</i> izolatlarının mikroskop görüntüsü (a, b, c)	23
Resim 3.3. MRS broth durham tüplü besiyerinde hava kabarcığı oluşumu	26
Resim 3.4. <i>Lactobacillus</i> izolatlarının 10°C’de ve 45°C’ de üreme görüntüsü.....	27
Resim 3.5. Arjinin hidroliz testi; portakal sarısı rengi (-), pembe renk (+)	28
Resim 3.6. Mor menekşe (-), Sarı renk (+), Kahverengi (d: değişken)	28
Resim 3.7. Antibiyotik disklerin Muller Hinton agar besiyerine yerleştirilmesi.....	32
Resim 3.8. Mikroplate lerde bakterilerin NB besiyerinde inkübasyonu.....	33
Resim 3.9. Kuyucukların kristal viyole boyama görüntüsü.....	34
Resim 3.10. Kristal viyole boyasının yıkandıktan sonra mikropalak görüntüsü	35
Resim 3.11. Mikroplate kuyucuklara %95’lik etilalkol eklenmesi.....	35
Resim 3.12. Kongo Kırmızılı Agar besiyerinde slime testi	37

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Derece santigrat
Da	Dalton
dk	Dakika
g	Gram
Hz	Hertz
ml	Mililitre
mg	Miligram
nm	Nanometre
pH	Potansiyel hidrojen
spp	Türleri
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre
Kısaltmalar	Açıklamalar
ATP	Adenozin Trifosfat
ÇA	Çoğunluk Algılama
DNA	Deoksiribonükleik asit
ELİSA reader	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay reader
EPS	Ekzopolisakkarit
FDF	Fruktoz Difosfat
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
G6F-DH	Glikoz-6-Fosfat-Dehidrogenaz
GRAS	Genellikle Güvenli (Generally Recognized as Safe)
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HMF	Heksoz Mono Fosfat
LAB	Laktik asit bakterileri

Kısaltmalar**Açıklamalar****MALDI-TOF MS**

Matriks Destekli Lazer Desorpsiyonu/İyonizasyonu

MRS

De Man, Rogosa and Sharpe

NADH

Nikotinamid Adenin Dinükleotid

NB

Nutrient Broth

O₂

Oksijen

PCR

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA

Ribonükleik asit

rRNA

Ribozomal RNA

TCS

İki Bileşenli Düzenleyici Sistem

1. GİRİŞ

Günümüz dünyasında doğal besin kaynakların azalması ve son zamanlardaki tarım ürünlerinin üretimindeki azalış sebebiyle paketlenmiş veya hazır gıda tüketimi çok fazla artış göstermiştir. Yaşam şekillerinin değişimi insanları bu şekilde beslenmeye yöneltmiştir. Ancak son zamanlarda doğal beslenmenin öneminin anlaşılmasıyla beraber organik besinlerin tüketimi yaygınlaşmıştır. Doğal süt ve süt ürünlerinin arayışına girilmiştir ve fermente gıda üretimi ve tüketimi artmıştır.

Bu bakımdan sıkça tüketilen gıdaların sağlık açısından uygun olması gerekmektedir. Gıda endüstrisinde tüketime sunulan gıdalarda patojen bir bakteri bulunması hiç de beklenilecek bir durum değildir ve sağlık açısından zararlı olabilmektedir. Genellikle gıdalarda, probiyotik bakteriler olan Laktik asit bakterilerinin (LAB) bulunması bir tehlike arz etmemekte ve aksine yararlı bakteriler olarak tanımlanan bu bakteriler ürünlerin kalitesini artırmak için starter kültür olarak da kullanılmaktadırlar. Süt ve süt ürünleri gıda endüstrisinde çok yaygın kullanılan gıda maddeleridir. Laktik asit bakteri grubundaki *Lactobacillus* cinsi bakteriler peynir ve sütte çokça bulunmaktadır.

Gıda mikrobiyolojisinde büyük öneme sahip olan *Lactobacillus* spp. bakterileri *Lactobacillaceae* familyasından olan Laktik asit bakteri çeşididir ve güvenli GRAS (Generally Recognized as Safe) olarak bilinen probiyotik bakterilerdir. *Lactobacillus*'lar, biyokimyasal, ekolojik, moleküler biyolojik ve immünolojik özellikler bakımından farklı 50 türe kadar çeşitlilik göstermektedirler (Wood ve Warner, 2003; Stiles ve Holzapfel, 1997).

Morfolojik olarak bu bakteriler çubuk, basil veya kokobasil şeklinde olmakla birlikte Gram pozitif, katalaz negatif ve anaerobiktirler. Genelde hareketsizdirler ve çoğunlukla spor oluşturmazlar. Doğada çok yaygın olarak bulunan *Lactobacillus* spp.'leri insan ve hayvan barsak mukozasında, bitkilerde ve gıdalarda (süt ve süt ürünlerinde, fermente gıdalarda) görmek mümkündür (Çon ve Gökalp, 2000). Gıda fermentasyonunda endüstride çeşitli şekillerde kullanılırlar. Laktik asit bakterileri süt ve süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanılırlar. Şeker çok hızlı bir şekilde dönüştürerek karbonu metabolize edip ara ürün olarak laktik asit üretirler. Laktik asit bakterileri karbon metabolizmalarına göre homofermentatif, heterofermentatif ve fakültatif heterofermentatif olarak üç gruba ayrılırlar (Dinçer, 2009).

Peynir ve süt gibi gıda ürünleri temel besin kaynaklarını oluşturmaktadır ve gıda endüstrisinde çok yaygın olarak işlenmektedir. Ayrıca ülkemizde de çok fazla yöresel peynir çeşidi ve doğal süt üretimi bulunmaktadır. Tüketime sunulan peynirlerin üretiminde probiyotik bakteriler starter kültür olarak kullanılmaktadır. Laktik asit bakterileri de probiyotik bakterilerdir ve süt ve süt ürünlerinin üretiminde çokça yer alırlar. Bu besinlerin sağlığa zararı olmadan üretilmesi ve tüketime sunulması bu bakımdan önemlidir.

Çiğ sütte genellikle *Clostridium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Arthobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* ve *Lactobacillus* gibi Gram pozitif bakteriler bulunur (Akan, 2014).

Bu zamana kadar araştırmalarda gıda maddelerinde *Lactobacillus* cinsi bakterilerin bulunması sağlık açısından herhangi bir risk oluşturmadığı yönündeydi. Ancak son zamanlarda antibiyotik direnç geni bulunduran bazı *Lactobacillus* suşlarının patojen bakterilerle gen alışverişi yaparak bu bakterilerin gıdaya bulaşmasıyla sağlık açısından zararlı olabileceği belirtilmiştir.

Fermente gıdaların tüketilmesiyle insan vücuduna çok fazla sayıda canlı bakteri girmektedir. Antibiyotik kullanımının artmasıyla birlikte bu bakterilerin dirençlilikleri de artmaktadır. Dolayısıyla bu bakteriler kommensal ya da patojen bakterilere antibiyotik direnç genlerini aktarabilir (Demir ve diğerleri, 2018).

Biyofilmler endüstriyel etkileri ve sağlık üzerine etkileri sebebiyle gıda sanayinde büyük öneme sahiptir. Özellikle süt ve süt ürünlerinin üretim aşamasında gıda ürününün kalitesi ve hijyenliği konusunda herhangi bir bakteriyel biyofilm tabakasının meydana gelmesi gıda endüstrisi açısından önemlidir. Süt endüstrisinde biyofilm oluşumu birçok faktöre bağlıdır. Süt işletmelerinin hijyenitesi, süt borularının temizliği, kullanılan malzemelerin kalitesi gibi etkenler buna yol açabilir.

Gıda endüstrisinde en yaygın biyofilm oluşturan mikroorganizmalar, *Pseudomonas* ve *Staphylococcus* türleridir. *Clostridium* spp., *L. monocytogenes*, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Salmonella* spp. gibi türlere de genellikle et yüzeylerinde rastlanılmaktadır (Gün ve Ekinci, 2009).

Araştırmalar bazı laktik asit bakteri suşlarının slime ve biyofilm oluşturabildiklerini ve antibiyotik duyarlılık testlerinde dirençli genleri tespit ettiklerinden dolayı bu çalışmada *Lactobacillus* türlerinin biyofilm oluşturma ve antibiyotik dirençlilikleri araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR TARAMASI

Peynir içerdiği besin kaynaklarıyla insanların beslenmesinde büyük öneme sahiptir ve süt endüstrisinde de ekonomik açıdan ayrıcalıklı besin türüdür. Ülkemizde çok fazla peynir çeşidi bulunmakla birlikte en çok tüketilen peynir çeşitleri beyaz peynir, kaşar peyniri ve tulum peyniridir. Diğer yöresel peynirler de %11-15 oranında tüketilmektedir (Yerlikaya, 2018).

Peynirin ham maddesi olan süt insanların sağlıklı beslenebilmeleri için yararlı bir kaynak olmasının yanısıra pek çok mikroorganizmanın gelişmesine yardımcı zengin bir besin ortamıdır. Süt ve süt ürünlerinden oluşan gıdaların hem üretimi hem de tüketimi olsun tüm aşamalarında kaliteli ve sağlık için güvenilir gıda statüsünde olmalıdır. Laktik asit bakterileri fermente süt ürünleri ve peynir gibi bir çok süt ürününün olgunlaşmasında kullanılan, peynirlerin normal mikroflorasında da çokça bulunabilen mikroorganizmalardır. Peynir teknolojisi açısından önemli olmalarının yanında ürünlerde istenilen karakteristik özelliklerinin oluşmasında rol almaktadırlar.

Yerlikaya'nın (2018) tüketime sunulan beyaz peynirlerden izole edilen mikroorganizmaların incelenmesi üzerine yaptığı bir çalışmada Laktik asit bakterinden *Lactobacillus* spp. izole edilmiştir ve MRS agarda koloni sayımları yapılmıştır.

Uraz ve Gündoğan (1998), beyaz peynir mikroflorasında çeşitli bakterilerin bulunduğunu, bunlardan *Lactobacillus* cinsi bakterilerin olgunlaşma aşamasında baskın mikroorganizmalardan biri olduğunu ve diğer mikroorganizmalardan daha yüksek oranda bulunduklarını bildirmişlerdir.

Durlu-Özkaya (2001), Salamura beyaz peynirden izole ettikleri *Lactobacillus* cinsi bakteri türlerinden *L. plantarum* ve *L. casei*'nin beyaz peynir mikroflorasını oluşturan türlerden bazıları olduğunu belirlemişlerdir.

2.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB) morfolojik, metabolik ve fizyolojik karakter özellikleriyle bir araya gelmiş Gram pozitif bakteri grubudur. LAB terimi gıda ve fermentasyonu içeren bakterilerle yakından ilişkili ve aslında insan ve hayvanların mukazal yüzeyleriyle ilişkili

bakterileri içermektedir. Bu bakteri grubu yaklaşık 20 cins bakteriden oluşmaktadır ve temel üyeleri *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus*'tur. Ancak pratikte gıda teknolojisi açısından temelde LAB üyelerini, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* oluşturur. *Bifidobacterium* cinsi ise tipik özellikleriyle aynı kontekst içerisinde düşünülse de filogenetik sınıflandırmada bu grupla ilişkili değildir. Laktik asit bakterileri glikoz fermentasyon modları, farklı sıcaklıklarda gelişebilme, yüksek tuz konsantrasyonunda gelişebilme yetenekleri, laktik asit üretme, asit ve alkalın toleransı gibi farklı özelliklere sahiptirler. Bununla birlikte, taksonomik ilişkilendirmede son zamanlarda doğru bir filogenetik sınıflandırma için rRNA sekanslarını belirleme üzerine yapılan çalışmalara yönelmektedir. Yeni tanımlamalar kolayca olügonükleotid problemlerle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sayesinde yapılmaktadır ve bu teknoloji bu sekansların kullanımı veya direkt 16S rRNA gen sekansına dayanır. Laktik asit bakterileri şeker fermentasyonları sırasında oluşan ürünlerin yapısına göre farklı alt gruplara ayrılırlar. Laktik asit bakterileri iki temel şeker fermentasyon yolağıyla birbirinden ayrılabilir. Bunlardan biri homolaktik fermentasyon, standart şartlarda son ürün laktik asit olan glikoliziz (Embden-Meyerhof- Parnas yolağı) yolağıdır. Diğerisi ise heterolaktik yolağı ve son ürün olarak etanol, asetat ve CO₂ meydana gelir (Salminen ve diğerleri, 2004: 1-66).

Lactobacillus cinsi bakteriler laktik asit bakterilerinin en geniş jenerasyonudur. Fenotipik, biyokimyasal ve gerekse fizyolojik özellikleriyle heterojen türlerini kapsamaktadırlar. Heterojenlik bu bakteri cinsinin içerdiği DNA'nın G-C içeriğini yansıtmaktadır ve bu alan %32-55'dir. *Lactobacillus*'lar üç alt gruba ayrılmaktadır: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* ve *Betabacterium*.

Laktik asit bakterileri Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, kok veya çubuk görünümünde ve fermentatif metabolizma sonucu laktik asit üreten bakterilerdir. Bu grubun üyelerinde porfirin ve sitokromlar olmadığı için elektron transport fosforilasyonunu gerçekleştiremezler, enerjilerini sadece substrat düzeyinde fosforilasyonla sağlarlar. Zorunlu anaeroplara hariç O₂'ye hassas değildirler ve anaerobik üreyebilir. Bazı suşları, flavoprotein oksidaz sistemi aracılığıyla oksijen alır, H₂O₂ üretirler. Ancak buna rağmen birçok suшта katalaz enzimi yoktur. H₂O₂ peroksidaz olarak adlandırılan alternatif enzimler yolu ile parçalanır. Flavoprotein oksidaz reaksiyonunda ATP üretilmez, fakat oksidaz sistem fermentasyon sırasında oluşan NADH'ın yeniden oksidasyonu için kullanılabilir (Uçar ve diğerleri, 2008).

Laktik asit bakterilerinin çoğu enerjilerini sadece şeker ve fermente edilebilen bileşiklerden sağlamaktadırlar, böylece şekerin bulunduğu ortamlarda gelişirler. Biyosentetik kapasiteleri sınırlı olduğu için amino asit , vitamin, pürin, pirimidin gibi bileşikleri içeren, ihtiyaçlarını sağlayabilen kompleks besiyerlerinde gelişirler.

2.2. *Lactobacillus* Cinsi Bakterileri ve Sınıflandırılması

Lactobacillus cinsi laktik asit bakterileri Firmucutes şubesinden, *Lactobacteriaceae* familyasından olup glikozu fermente etme mekanizmaları ve morfolojik ve fizyolojik özelliklerine göre birçok tür çeşidine sahiptirler. Bazı *Lactobacillus* türleri ve özellikleri şunlardır:

L. plantarum, düzgün çubuk şeklinde genişliği 0,9-1,2 µm ve uzunluğu 3-8 µm'dir. Tek, çift veya kısa zincirler halinde bulunabilir. Genellikle flagellumsuz olan bu bakteriler hareketlidirler. Koloni görünimleri yuvarlak, kalkık ve yoğun olmakla birlikte renkleri beyaz, açık sarı ya da koyu sarı olabilmektedir. *L. plantarum*'un bazı suşları arabinoz ve ksilozu fermente edebildiklerinden ayrı bir türmüş gibi *L. arabinosus* ve *L. pentosus* adlandırılırlar. *L. plantarum* hücre duvarı peptidoglukan yapısı m-diaminopimelik asit tipidir ve serolojik grubu D'dir. Tanımlaması yapılırken bu özelliğiyle *L. casei*'den kolaylıkla ayırt edilebilir. DL-laktik asit üretir ve FDF- aldolaz enzimi vardır. FDF yolunu kullanabildiği gibi HMF yol aktivitesine de sahip olan bu bakteriler glukonat içeren besiyerinde bol miktarda CO₂ çıkararak ürerler. Arjininde amonyak oluşturmazlar. Optimum gelişme sıcaklıkları 30-35°C olan *L. plantarum* bakterileri 15°C' de gelişirken, 45 °C'de çoğunlukla gelişmemektedirler. Gelişimleri için Ca-pantotenat ve niasin gibi vitaminlere ihtiyaç duyarlar. Süt, peynir, silaj, fermente bitki, turşu bozulmuş besinler vs. birçok habitatta bulunurlar.

L. fermentum, genişliği 0,5-1,0 µm olup boyu 3,0 µm ve daha fazla olan bu bakteriler çubuk şeklinde hareketsiz ve bazen de zincirler halinde bulunabilirler. Kolonileri yaygın, pürüzlü yapıdadır ve ışık geçirebilecek saydamlıktadır. Heterofermentatif bir laktobasil olup glikozdan asit ve gaz üretir. Glukoz büyük olasılıkla HMF yoluyla katabolize edilir ve FDF-aldolaz aktivitesinin bulunmamasına karşın G6F-DH ve F-glukonat- DH enzim aktiviteleri saptanmıştır. *L. fermentum* DL- laktik asit oluşturur ve bunun yanında asetat, etanol ve CO₂ yan ürünleri oluşur. Bu bakteriler nitratı redükte edemedikleri için arjininden amonyak

oluşturamazlar. 41-42°C’de normal gelişirler. 15°C’de üremezler ve buna karşın 45°C’de ürerler. Süt ve mamullerinden, fermente bitkilerden, silo yemlerden, ekşi hamurdan, şaraptan, insan ağız florası ve gübreden izole edilirler.

L. brevis, 0, 7- 1,0 µm eninde, 2,0-4,0 µm boyunda, pürüzlü ve intermediyer tipte koloni oluşturan bu bakteriler saydam yapıdadırlar ve pigment meydana getirmezler. Çubuk şeklinde uçları yuvarlak olup gram boyamayla mikroskop görüntüsünde hücreler bipolar veya granüllü olarak görülürler. Heterofermentatif bir bakteri olan bu suşlar pürivatın anaerobik koşullarda ve aerobik koşullarda parçalaması mümkün ancak asetoin oluşturmamaktadırlar. Glukoz metabolizması HMF yoluyla gerçekleşir ve G6F-DH aktivitesi yüksek ancak buna karşın 6F-Glokonat-DH aktivitesi düşük bulunmuştur. FDF-aldolaz aktivitesi ise saptanamamıştır. DL tipinde olup toplam glukoz karbonun %50’sini kapsamaktadır. Diğer son ürünler ise asetat, etanol ve karbondioksittir. Diğer *Lactobacillus* türlerine nazaran arjininden amonyak oluştururlar. Hücre duvarı gliseroltaykoik asit içermektedir ve peptidoglukan yapısı L-lisin, D-aspartat tipi olup serolojik grubu E’dir. Karmaşık beslenme sistemlerine sahip *L. brevis*’ler C-pantotenat, niasin, tiyamin ve folik asit gibi bazı vitaminlere gereksinim duyarlar. Optimum gelişme sıcaklığı 30°C olan bu bakteriler 15°C’de gelişebilirken, 45°C’de gelişemezler. Avrupa dilim peynirlerinin olgunlaşması için kullanılan bu bakteriler gıda endüstrisinde bunun gibi birçok farklı alanda ve yem sanayinde kullanılmaktadırlar. Süt, peynir, kefir ve birçok bitkisel materyalden izole edilebilirler.

L. acidophilus, hücre büyüklükleri 0,6-0,9 µm ile 1,5-6,0 µm arasındadır. Hücreler yuvarlak sonlanır ve çifttirler ve kısa zincirler halinde görülürler. Bu bakteriler 45°C’de gelişebilirler. Nişastayı hidrolizler ve B kompleks vitaminlere gereksinimleri yoktur. Ağız, bağırsak ve vajina florasından izole edilebilirler ve diş çürüğü etyolojisinde önemli rolleri vardır (Aydın, 1997).

L. curvatus, bu bakteriler uçları yuvarlak fasulye biçiminde, 0,7-0,9 µm ile 1,0-2,0 µm arasında çomak yapıdadırlar. İlk izolasyonda hareketli olurken sonraki pasajlamalarda hareketsizleşebilirler ve kısa zincirler şeklinde at nalı biçimini alabilirler. Bazıları 2-4°C’de üreyebilirler ancak 45°C’de üremezler. Ekşi hamur, süt ve süt ürünlerinden ve etten izole edilebilirler. Vakumlu paketlenmiş ve soğuk zincirde saklanmış et ürünlerinde bulundukları rapor edilmiştir (Aydın, 1997).

2.3. *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Lactobacillus cinsi morfolojik ve fizyolojik özellikleri göz önüne alınarak 1901’de Beijerinck tarafından önerilmiştir. *Lactobacillus*’lar Gram pozitif, genellikle hareketsiz, sporsuz, çubuk, kokobasil veya uzun zincir oluşturan çubuk şekillerinde olabilen anaerobik bakteri türleridir. Mikroskop görüntülerinde bazen zincir yapısında bazen tekli, genellikle genç olanları tekli yapılar halinde görülmektedir. *Lactobacillus* türleri sitokromları bulunmaz ve katalaz negatif bakterilerdir. Kemoorganotrofiklerdir ve gelişimleri için zengin besiyeri ortamı gereklidir ve enerji kaynağı olarak karbonhidratları kullanırlar. Homofermentatif Laktobasiller esasen fermentasyon ürünü olarak laktat üretirler ve heterofermentatif olanları ise asetat, etanol ve karbondioksit üretirler. *Lactobacillus* spp. lerin anaerobik kültür şartlarında üremeleri çok iyi olmasına rağmen mikroaerofilik şartlar gibi oksijen basıncının azaltıldığı ortamlarda daha da iyi gelişirler (Schleifer, 1995). Birçok *Lactobacillus* spp. peptidoglikan tip L-Lys-D Asp yapısı içerir.

Lactobacillus’lar fermente olan günlük besinlerin, et ürünlerinin ve sebzelerin üretilmesinde kritik bir rol oynar. Ayrıca *Lactobacillus*’lar çeşitli habitatlarda bulunabilir örneğin insanların ve hayvanların mukozal membranlarında veya hayvanlarda (ağız boşluğu, bağırsak ve vajina), bitkiler ve bitki kaynaklı materyallerde, fermente veya çürümüş besinlerde bulunurlar. (Bernardeau, 2008).

2.4. *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerin Gıdalardaki Önemi

Laktik asit bakteri grubunda yer alan *Lactobacillus* spp. probiyotik bakteri özelliğini taşımaları sebebiyle ve bazı patojenlere antogonistik tepki göstermeleriyle güvenli bakteriler olarak tanımlanırlar. Bu bakteri türlerinin gıdalarda bulunması tehlikeli bulunmadığı ve hatta starter kültürleri yapılarak gıdalarda kullanılmaları oldukça yaygındır. Ancak son zamanlarda bu bakterilerde antibiyotik direnç genlerinin bulunması ve bu gen çeşitlerinin giderek daha da artması patojen bakterilere bu direnç genlerinin günlük tüketime sunulan süt ürünleri ve fermente gıdalar aracılığıyla aktarılması büyük kompleks yapılar olan biyofilm yapıları oluşturarak bakteri plazmitleri aracılığıyla patojen bakterilerin daha dirençli hale gelmesi tehlikesiyle karşı karşıya kalınabilir. Bu yüzden bu dirençli bakterilerin gıdalarda rastlanması önem arz etmektedir. Ayrıca bu tür insan sağlığını etkileyebilecek gıdaların tüketime sunulmuş olması yapılan çalışmalarla önemli hale gelmiştir.

2.5. Peynir ve sütte bulunan *Lactobacillus* türleri

Gıdalarda çeşitli mikroorganizmalar bulunmakla birlikte gıdalarda bulunan probiyotik bakteriler önem arz etmektedir. Probiyotik bakterilerden *Lactobacillus* spp. çok geniş bir yelpazede hemen hemen heryerde bulunabilen insanlarda, hayvanlarda, bitkilerde ve fermente gıdalarda en çok da süt ve süt ürünlerinde bulunan bakteri çeşididir.

Süt ve süt ürünleri ile süt tesisleri için önemli olan *Lactobacillus* türleri *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*'dir. Ayrıca *L. curvatus* süttten izole edilmiş olmasına rağmen *L. corynoformis* gibi daha çok inek gübresinde ve ahırların havasında rastlanıldığı da olmaktadır.

Peynirlerde bulunan *Lactobacillus* türleri ise *L. delbrueckii*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*'dir (Evren ve diğerleri, 2011).

2.6. Antibiyotik Direnci

2.6.1. Antibiyotiklerin tarihçesi

Antibiyotikler, mikroorganizmaların gelişimini durduran ya da onları öldüren, biyolojik kaynaklı veya sentetik olarak elde edilebilen ve etki mekanizmalarına ya da etkiledikleri mikroorganizmaya göre çok fazla çeşidi olan biyoaktif maddelerdir. Mantar ya da benzeri mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, hedefi diğer canlıların gelişimini durdurmak veya öldürmek olan maddelere doğal ya da kimyevi maddelere “antibiyotik” denir. Antibiyotik terimi Yunanca “anti (karşı)” ve “bios (yaşam)” kelimelerinden türetilmiştir (Topal ve diğerleri, 2015).

19. yüzyılın ortalarında Louis Pasteur yaptığı çalışmalarda bazı mikroorganizmaların diğerlerini öldürdüğünü bulmuştur. İlk antibiyotik 1928 yılında Sir Alexander Fleming tarafından keşfedilmiştir. Alexander Fleming stafilokok varyantlarında yaptığı çalışmalarda tesadüfen kültür ortamına bulaşmış bir küf mantarı etrafında stafilokokların üreyemediklerini ve hatta öldüklerini gözlemlemiş ve bu küf mantarlarına *Penicillium* türünden esinlenerek ilk antibiyotik olan yani ‘penicillin’ adını vermiştir. 1970 yılların sonlarında, gonokokların çoğu penisilinlere dirençli hale gelmişlerdir. Bu yıllarda özellikle penisilin, metisilin, sefalosporinler, aminoglikozidler, klindamisin, eritromisin ve diğer

ajanlara dirençli hastane kaynaklı *S. aureus* infeksiyonları dikkati çekmiştir. Bu dönemde, yeni kuşak sefalosporinler, karbapenemler, sefamisin ve fluorokinonlar gibi birçoğu geniş spektrumlu ve düşük dozlarda bakterisid etkili olan antibiyotikler kullanıma girmiştir. 1990’larda vankomisin gibi direncin mümkün olmadığı düşünülen antibiyotiklerde de direnç oluşumu belirlenmiştir (Topal ve diğerleri, 2015).

2.6.2. Antibiyotiklerin genel özellikleri

Antibiyotikler, hücre duvarı yapısını bozma, sitoplazma membran permeabilitesini bozma, ribozomlarda protein sentezini inhibe etme ve bakteri genetik materyaline etki etme gibi etki mekanizmalarına göre sınıflandırılırlar. Bakteri hücre duvarı yapısını bozan antibiyotikler; beta laktamlar (penisilin, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler), siklosein, ristosetin, basitrasin, teikoplanin ve vankomisinidir. Sitoplazma membran permeabilitesini bozan antibiyotikler; polimiksinler, gramisidin, nistatin, kandisein, amfoterisin B, heksaklorofen ve katyonik deterjanlardır. Ribozomlarda protein sentezini inhibe eden antibiyotikler ise; tetrasiklinler, aminoglikozidler, makrolidler, amfenikoller, ve linkozamidlerdir. Bakteri genetik materyaline etki eden antibiyotikler DNA, RNA sentezini bozan maddelerdir. Bunlar; fluorokinonlar, aktinomisetler, rifamisinler, nalidiksik asit, mitomisinler, doksorubisin olarak sınıflandırılabilirler (Topal ve diğerleri, 2015).

Antibiyotik direnç bakterilerde doğal ya da kazanılmış direnç olmak üzere ikiye ayrılır. Doğal direnç kalıtsaldır, horizontal olarak aktarılmaz. Antibiyotiklere karşı kazanılmış direnç ise genomda meydana gelen mutasyon veya direnç oluşumunu kodlayan genlerin kazanımıyla gerçekleşmektedir (Demirel, 2016).

Antibiyotikler, insan ve hayvanlardaki hastalıkların tedavisinde ve hayvanlarda büyümeyi destekleme amacıyla tüm dünyada yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Antibiyotikler ayrıca gıda sektöründe besinlerin korunmasında, ilaç endüstrisinde ve bilimsel çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Ancak antibiyotiklerin bilinçsizce aşırı ve gereksiz kullanımı insan sağlığını hem doğrudan hem de besin zinciri yoluyla dolaylı olarak etkilemektedir (Topal ve diğerleri, 2015).

2.6.3. Antibiyotik direncinin önemi

İleri derecede gelişmiş starter kültürlerin gıdalarda artan bir ivmeyle kullanılması ve probiyotiklere olan ilginin artması, laktik asit bakterileri arasında değişen bilimsel adlandırmayı ve taksonomiye gıda mikrobiyoloji çalışanları için önemli hale getirmiştir. Antibiyotik direncinin artmasıyla son yıllarda probiyotik Laktik asit bakterileri üzerine yapılan çalışmaları artırmıştır.

Laktik asit bakterilerinde potansiyel olarak taşınabilir genler tanımlanmıştır. Laktik asit bakterilerinde en sık bulunan iki direnç geni; *tet(M)* (tetrasiklin direnç geni) ve *erm(B)* (eritromisin direnç geni)'dir. Bu direnç sırasını *cat* (kloramfenikol Direnç geni) genleri takip eder.

Yapılan bir çalışmada hayvan ve gıdalardan izole edilen Laktik asit bakterileri bulunan konjugatif genetik elementlerinin daha önce çalışılmış patojenik streptokok ve enterokok bakterileriyle çok benzerlik gösterdikleri bildirilmiştir. Gözlemlenen direnç genleri bilinen genleri içermektedir ve benzer olarak bunlar; *tetM*, *ermAM*, *cat*, *sat* ve *vanA* direnç genleridir (Teuber ve diğerleri, 1999).

Fermente gıdalar, yoğurt (Temmerman ve diğerleri, 2003; Hummel ve diğerleri, 2007), peynir (Florez ve diğerleri, 2005) ve et ürünlerinde (Gevers ve diğerleri, 2000) antibiyotik direnç unsurlarını içeren *Lactobacillus* suşları bulunmuştur.

Laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus* türlerinin, penisilin ve ampisilin gibi pek çok hücre duvarı sentezi inhibitörüne karşı duyarlı oldukları bulunmuştur. Zorunlu heterofermentatif türler hariç birçok *Lactobacillus* türünün, vankomisin gibi glikopeptitlere dirençli oldukları bulunmuş ve bu direncin enterik olduğu kanıtlanmıştır. *Lactobacillus* türleri, protein sentezini inhibe eden kloramfenikol, eritmosin, klindamisin antibiyotiklerine karşı duyarlıdırlar. Ayrıca bu türlerin, trimetoprim gibi nükleik asit sentezi inhibitörlerine karşı dirençlerinin enterik olduğu düşünülmesine rağmen bu konuda daha ileri tanımlamalar yapılmalıdır.

Antibiyotik direncin büyük bir sağlık sorun haline gelmesi tüm dünyada ilgiyi bu yöne çekmektedir ve antibiyotik direncin artması ve direnç genlerinin patojenlere aktarılması

genel bir kaygı oluşturmaktadır (Meral ve Korukluoğlu, 2014). Antibiyotik ajanlara karşı bakteriyel direnç çeşitli mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Bu mekanizmalar bakteri hücre genomunun mutasyonla var olan değişimi, bakteriyel hücre etkileşiminin meydana gelmesi yani bakterilerin biyofilm oluşturmaları ve en önemlisi de bakteri gen transferi şeklindedir (Shousha ve diğerleri, 2015).

Mikrobiyal patojenlerin antibiyotik dirençliliklerinin araştırılması özellikle de çoklu ilaca karşı dirençlerinin incelenmesi potansiyel tehlikelere karşı oldukça önemlidir ve bu konuda çokça çalışma mevcuttur (Kanak ve diğerleri, 2018). *Lactobacillus* spp. bakterilerinin virülans özellik göstermedikleri hatta çevreye faydalı bakteriler olmaları sebebiyle bu konuda çok az çalışma mevcuttur. Ancak tüketime sunulan gıdalar aracılığıyla bakteri antibiyotik direnç genlerinin patojen bakterilere taşınımı insan sağlığında olumsuz etkilere sebep olmaktadır. Son zamanlarda probiyotik bakterilerin gıdalardaki öneminin anlaşılması özellikle de *Lactobacillus* cinsi bakterilerinin fermantasyon ürünlerinde starter kültür olarak kullanılmaları (peynir, yoğurt, kefir, vs.) artan antibiyotik kullanımıyla dirençli genlerin çoğalması sebebiyle bu bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları konusunda çalışmalara yönlendirmiştir.

Gıda endüstrisinde starter bakteri kültürlerinin dikkatli seçimi gıda güvenliği açısından önemlidir. Probiyotik bakterilerin güvenli (GRAS) bakteriler olarak kabul edilmesi doğal olarak gıdalarda kültür olarak kullanılmalarında tehlike oluşturmaz. Ancak bu bakterilerin tüketime sunulan gıdalardaki saf kültürlerinde antibiyotik direnç genlerinin rastlanması gıda güvenliği açısından bir risk oluşturmaktadır. Bu durum Gıda Tarım Örgütü (FAO) tarafından hazırlanmış gıda kodeksi rehberinde “gıda kaynaklı antibiyotik direncinin risk analizi” başlığıyla ele alınmıştır (Turhan ve Enginkaya, 2016).

2.7. Biyofilm

Mikroorganizmalar nemli ve sulu çevrelerdeki uygun yüzeylerde kolonize olurlar ve yüzeylere yapışık mikroorganizmalar yapışmayanlara göre daha büyük çoğunlukta olurlar. Yüzeylerde bu şekilde yaşayan mikroorganizmalar yoğun olarak etkileşimli, kompleks ve interaktif topluluklar meydana getirirler ve bu topluluklar, canlı hücreler ve bunların gömülü olduğu organik ve inorganik maddelerden oluşan biyofilm adını alır (Jenkinson ve Lapin-Scott, 2000).

Doğada yüzeye tutunma eğilimi kendiliğinden olan bir süreçtir ve mikroorganizmaların gelişiminde çok yaygın bir durumdur. Mikroorganizmalarda biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi 1684'lere dayanır. İlk olarak bu mikroorganizma toplulukları ilkel mikroskop kullanılarak Leeuwenhoek tarafından dişlerde oluşan mikrobiyal tabakaları incelenmiş ve bunlarla ilişkilendirilmiştir. Bakteriyel biyofilm, 1920'de gemilere yapışan deniz bakterileri incelenerek açıklanmıştır (Bevilacqua ve diğerleri, 2017).

1973'lerde Characklis, endüstriyel su sistemlerinde mikrobiyal slime oluşumunu çalışmıştır (Donlan, 2002). Daha sonraki yıllarda da mikroskop tekniklerinin gelişimiyle farklı birçok bölgelerde bakteri biyofilm tabakası gözlemlenmeye başlamıştır. Gıda kaynaklı bakteriyel biyofilm üzerine ilk raporlar *Salmonella*'nın gıda yüzeylerin oluşturduğu biyofilm ile ilişkiliydi. Sonraki çalışmalarda diğer patojen bakteriler *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolita*, *Campylobacter jejuni* ve *Escherichia coli* O157: H7 üzerineydi (Bevilacqua ve diğerleri, 2017). Araştırma teknikleri geliştikçe patojen ve patojen olmayan mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilm yapısının önemi artmaktadır ve bu yönde çalışmalar daha da çoğalmaktadır.

2.7.1. Biyofilm oluşumu

Biyofilm, yüzeye tutunan birkaç bakteri hücresinin matriks ve hücre dışı polimerik yapı "ekzopolisakkarit" (EPS) yapı içine gömülmüş ve genelde katı ve sıvı arasında bir arayüz olarak ilişkilendirilen mikrobiyal kominitelerdir (Ghannoum ve O'Toole, 2004).

Bir başka tanımda ise biyofilmler, mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, mikroorganizmaların herhangi bir yüzeye ya da birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ile gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen matriks içine gömülü karmaşık topluluklardır (Şimşek ve diğerleri, 2012). Biyofilmin %97 gibi büyük bir kısmını su oluşturmaktadır ve geri kalanını matriks içindeki EPS, nükleik asitler, lipit, glikoproteinler ve fosfolipitler oluşturur.

Biyofilm oluşum mekanizması çok farklı yüzeylerde olmakla birlikte karmaşık bir dinamiğe sahiptir. Biyofilm aşamaları sırasıyla; başlangıç tutunma, dönüşümsüz tutunma, gelişim ve olgunlaşma ve biyofilm yayılma gibi dört aşamalı gerçekleşmektedir. Ortamda besin var

oldukça bakteriler yüzeye tutunabilir ve biyofilm oluşumu başlar. Besin azaldıkça yüzeye tutunma bağları da azalır (Bevilacqua ve diğerleri, 2017; Gün ve Ekinci, 2009).

Bakterilerin yüzeye tutunması (Başlangıç): bireysel olarak serbest yaşayan planktonik hücrelerin biyofilm yüzeyine taşınmasıyla biyofilm oluşumu başlar. Planktonik hücreler başlangıçta uzak mesafeden hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals gibi zayıf bağlarla etkileşimdedir ve yüzeye uzak mesafeden tutunurlar. Bu şekilde tutunma da dönüşümlü tutunma olarak tanımlanır.

Dönüşümsüz tutunma: bakteriler burada yüzeye çok yakın mesafede dipol-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar gibi etkileşimlerde bulunurlar ve yüzeye dönüşümsüz olarak tutunurlar. Bakteri hücreleri flagella ve pili gibi organelleri ve EPS oluşturarak yüzeye tutunabilirler. Dönüşümsüz olarak yüzeye tutunan bakteriler basit işlemlerle veya suyla çözdürülemez. Bu basamakta hücrelerin yüzeyden uzaklaştırılması için fırçalama veya kazıma gibi işlemler gerekir.

Olgunlaşma: Bu evrede hücreler arası sinyal iletim molekülleri üretimi, EPS üretimi, replikasyon ve hücre gelişimini içeren birtakım işlemler gerçekleşmektedir. Böylece yüzey kolonizasyonu gerçekleşir ve mikrokoloniler meydana gelir. Daha sonra mikrokoloniler büyümeye başlar ve çeşitli yükseklikte kuleler oluştururlar. Bunun sonucunda da biyofilm olgunlaşmasını tamamlar.

Yayılma: Biyofilm oluşumunun son aşaması olan yayılma basamağında biyofilm tabakasında çözünmeler meydana gelerek tek bir bakteri hücresi ya da bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ayrılır. Bu ayrılmanın sebebi dış güçler kaynaklı ya da tek bir hücrenin kopmasıyla olabilir.

Biyofilm oluşumunun avantaj veya dezavantajları vardır. Biyofilm oluşumunun hem mikroorganizma açısından hem de çevre açısından avantajları bulunmaktadır. Bir mikroorganizmanın oluşturduğu biyofilm yapısı insanların birlikte yaşamlarını sürdürmesine benzetilebilir. Bu şekilde biyofilm oluşturarak bir araya gelmiş hücre toplulukları antibiyotik, deterjan ve klorin gibi birçok maddeye karşı korunmasını ve daha dirençli olmasını sağlamaktadır. Biyofilm oluşturmaktan kaçınan bakteriler tek başlarına besinsel ihtiyaçlarını karşılayamayabilir, gelişim azalır ve bu da hücre ölümlerine yol

açabilir (Watnick ve Kolter, 2000). Ayrıca biyofilmler bakterileri nem, ısı, pH gibi çevresel koşullara karşı ve ultraviyole ışınlardan da korunmasını sağlar (Gün ve Ekinci, 2009).

Biyofilmler süt ve diğer gıda sanayilerinde ısısının yüzeyden akışının engellenmesi, yüzeydeki kimyasal sürtünme direncinin artması, boru hatlarında sıvı akışının azalması gibi sorunlara yol açabilir (Gün ve Ekinci, 2009). Bununla birlikte, biyofilm oluşumu endüstriyel yüzeylerde ciddi hijyen problemlerine ve ekonomik kayıplara sebep olabilir. Bu da besinlerin çürümesiyle ve araç gereçlerin bozularak ortamda bir kontaminasyona sebep olmasından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla böyle bir durumda hastalıkların yayılması ve gıda üretiminin aksamasına sebep olmaktadır.

Biyofilmler sadece hijyenlikte risk oluşturmakla kalmamakla birlikte gıda endüstrisinde önemli ekonomik kayıplara sebep olabilir. Biyofilm bakteriye hem besin sağlanması açısından hem de üretildiği bakteriye antibiyotiklerden, dezenfektanlardan ve çeşitli kimyasallardan korunmayı sağlar (Gündoğan ve Ataol, 2012).

Biyofilm oluşturma yeteneği fermentasyon ve gıdaların korunması gibi işlemlerde kullanılan bakteriler için önemli bir özelliktir. Ancak bazen biyofilmlerden gıdaya bakteri transferi bir sorun haline gelebilir ve gıdalarda çürümeye veya hastalıkların bulaşmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle gıda endüstrisinde gıdaların hijyeni ve kaliteli üretimini etkileyebilir (İset, 2016; Adetunji ve diğerleri, 2014).

2.7.2. Biyofilmin antibiyotik direnci ile ilişkisi

Biyofilm içerisindeki bakterilere ve kullanılan ilaç veya biyosite bağlı olarak biyofilm direncinin etkili olduğu bazı mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalar biyofilm içerisine antimikrobiyallerin penetrasyonunun fiziksel ya da kimyasal bariyeri, ortamdaki besin miktarına bağlı biyofilm büyümesinin yavaşlaması ve genel stres cevabının aktifleşmesini içermektedir. Antimikrobiyal ajanların biyofilm içerisine tamamen girememesi biyofilm matrisindeki polimerik maddenin antibiyotiklerin difüzyonunu engellemesinden kaynaklanmaktadır. Besinsel nedenlerden dolayı biyofilm büyümesinin yavaşlaması antibiyotiklere karşı bir direnç oluşturduğu düşünülmektedir (Şimşek ve Bulut, 2012).

2.7.3. Quorum Sensing (Çoğunluk Algılama)

Biyofilm oluşumunda önemli mekanizmalardan birisi de çoğunluk algılama (QS: Quorum sensing) mekanizmasıdır. Bu mekanizmayla bakteriler sinyal iletim molekülleri yayarak çevreyle iletişim halinde kalıp kendi aktivitelerini koordine edebilmektedir (Gün ve Ekinci, 2009).

Laktik asit bakterileri (LAB) probiyotik olmaları sebebiyle mikroorganizmalar arasında önemli bir yere sahiptirler ve gıda endüstrisinde çokça kullanılmaktadırlar. Özellikle LAB grubunda bulunan *Lactobacillus* cinsi bakteriler starter kültür olarak gıda sanayisinde kullanılan önemli probiyotiklerdir (Yılmaz-Yıldıran ve diğerleri, 2015). Probiyotik bakterilerin etkin mekanizmaları inhibe edici maddeler üretmek, toksin reseptörlerinin yıkımı, besin maddeleri için rekabet, bağışıklık sistemini güçlendirmek ve sindirim sisteminde patojenlerin tutunma bölgelerini bloke etmektir. Bu özelliklerinden dolayı probiyotik LAB'lerinin gıdalardaki önemi büyüktür.

Laktik asit bakterilerinin çoğunluk algılama (ÇA) mekanizmaları da farklıdır. LAB genellikle oligopeptit yapıdaki sinyal molekülleriyle iletişim kurmaktadır. Sinyal moleküllerinin aktifleştirilmesiyle bakteri hücre yüzeyindeki alıcı bölgeler tarafından bu sinyaller tanınmaktadır. LAB, koloni oluşturmak ve değişen çevre şartlarına uyum sağlayıp canlılığını korumak için bu sinyal sistemine ihtiyaç duymaktadır.

LAB yaygın olarak TCS (two- component regulatory system) adı verilen iki bileşenli düzenleyici sistemi kullanırlar. Bu sistem *Lactobacillus* türlerinden *L. acidophilus* bakterisinde tanımlanmıştır (Yılmaz-Yıldıran ve diğerleri, 2015). Bu sistem LAB açısından probiyotik işlevlerin gerçekleşmesi için önemlidir. Çoğunluk algılama mekanizması LAB'ların yüzeye tutunmada, diğer mikroorganizmalarla rekabet etmede, patojen bakterilerin engellenmesinde, bakteriyosin üretiminde ve işlevi gerçekleştirmesinde etkili olmaktadır.

Antibiyotik kullanımının çok yaygın hale gelmesiyle bakteri direnç genlerinin artması sağlık açısından problemlere sebep olmaktadır. Son zamanlarda antibiyotik kullanmadan bakteriyal enfeksiyonların kontrol altına alınmasında probiyotiklerden yararlanılmasıyla ilgili çalışmalar artmaktadır ve ilgiyi bu yöne çekmektedir. Bununla birlikte probiyotiklerin

ürettiği asetik asit ve laktik asit gibi organik asitlerin özellikle ilaçlara karşı direnç genlerinin oluşumunu engellediği yani ÇA inhibitörleri olarak rol oynadığı tespit edilmiştir. Ancak fermente gıdalarda yaygın olarak bulunan *Enterococcus faecalis* laktik asit bakterisinin virülans özellik göstererek septisemiye veya bakterimiye neden olabilmektedir. LAB'ların probiyotik özellikte olması sebebiyle virülans özellik gösterdiği çok fazla gözlenmemiştir (Yılmaz-Yıldıran ve diğerleri, 2015).

Çoğunluk algılama mekanizması, patojen bakterilerin gelişimlerinin kontrol altına alınmasında, biyofilm oluşumunda, antibiyotik direnç genlerinin oluşumunun engellenmesinde, probiyotik bakterilerin gıdalarda starter kültür olarak kullanımı gibi sinyal iletilişimle gerçekleşen durumlarda etkili olduğundan insan sağlığı açısından gıda endüstrisinde ve ilaç sanayinde önemli bir mekanizmadır.

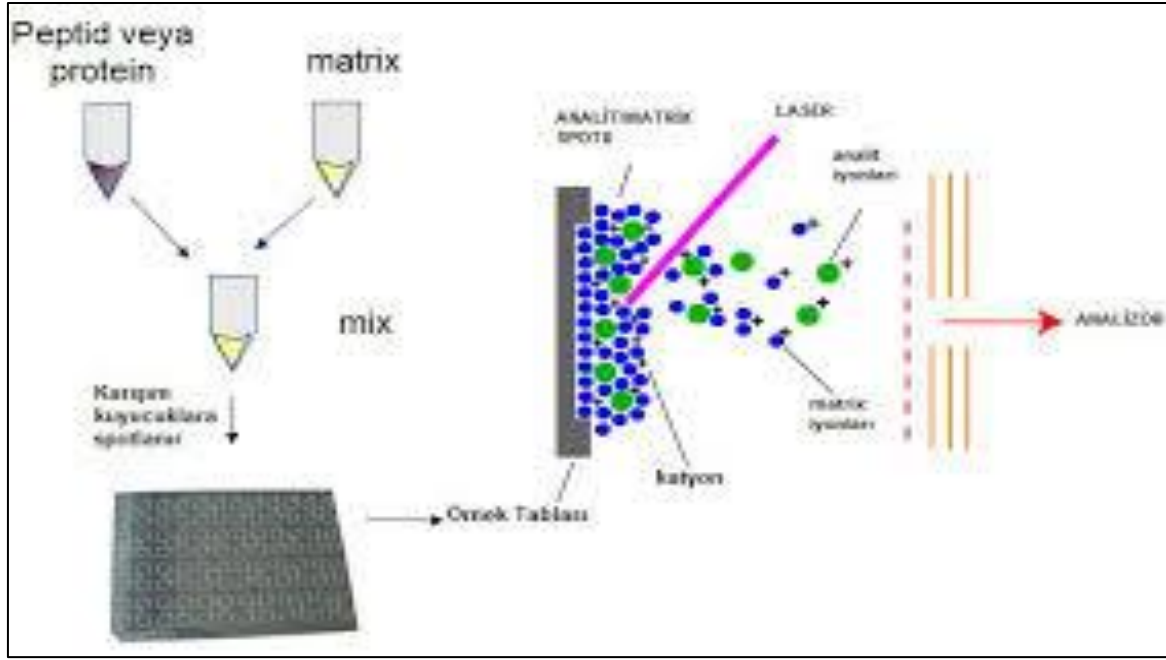
2.8. MALDI-TOF (Matriks Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight- Matriks Destekli Lazer Desorpsiyonu/İyonizasyonu) Bakteri Tanımlama Yöntemi

Moleküler teknik yöntemlerinin teknolojinin gelişimiyle her geçen gün yenilenmesi ve kullanım alanlarının artmasıyla bilimsel çalışmalarda büyük bir avantaj sağlamaktadır. Özellikle moleküler tanımlama yöntemlerinin kullanımının yaygınlaşması mikrobiyoloji dalındaki çalışmalara hız kazandırmıştır. Son zamanlarda kullanımı artan bakteri tanımlama yöntemlerinden birisi de MALDI-TOF yöntemidir. Bu yöntem proteinler, peptitler ve şekerler gibi biyomoleküllerin ve polimerler, dendrimerler gibi büyük organik moleküllerin analizini sağlayan ve kütle spektrometresinde kullanılan hassas bir tekniktir.

MALDI-TOF bakteri tanımlaması incelenecek olan mikroorganizmaya ait tek kolonini doğrudan hedef noktası üzerine yayılır ve matriksle kaplanır. Matriks içindeki numune otomatik modda lazer ışınıyla iyonize edilir. Oluşan kütle spektrumları da ilgili yazılımla incelendikten sonra kayıtlı profillerle karşılaştırılarak tür tayini yapılır (Çetinkaya ve Ayhan, 2012).

Gıda kaynaklı patojen bakterilerin hızlı bir şekilde identifikasyonlarının gerçekleşmesi kaliteli ve güvenli ürün elde edilebilmesi için büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle bakteriyel tehlikelere karşı erken tanıda MALDI-TOF MS yönteminin kullanımının daha hızlı ve faydalı olduğu görülmüştür. Bilinmeyen türlerin sınıflandırılması da genellikle doğru bir şekilde sağlandığı gözlenmiştir. Mikroorganizmaların tür tayininde kullanılan birçok

biyokimyasal tanımlama testleri ve bakteri tanımlama kitlerinin sonucuyla karşılaştırıldığında bu yöntemin daha hızlı, kolay ve ucuz olması bu yöntemin daha çok tercih edilmesinin sağlamıştır. Ancak nükleik asit dizilemlendirilmesine dayanan 16S rRNA dizi analizi ve MLST gibi yöntemlerin tür seviyesinde tanımlamada daha güvenilir sonuçlar verdiği tartışılır (Singhal ve diğerleri, 2015).



Şekil 2.1. MALDI-TOF MS bakteri tanımlama mekanizması (<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/images/maldi-mechanism.gif>. Erişim: 06.05.2019)

3. MATERYAL VE METOT

Araştırmamızda Temmuz 2018 ve Aralık 2018 tarihleri arasında Ankara'nın çeşitli semt pazarlarından, küçük mandıralardan ve sokak sütçülerinden toplanan 20 peynir (beyaz peynir, tulum peyniri ve diğer yöresel peynirler) ve 20 çiğ süt örneği materyal olarak kullanılmıştır. Soğuk zincirle laboratuvara getirilen örneklerden *Lactobacillus* spp. bakterileri izole edilmiştir. Slime pozitif kontrol suşu olarak *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ve slime negatif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanıldı.

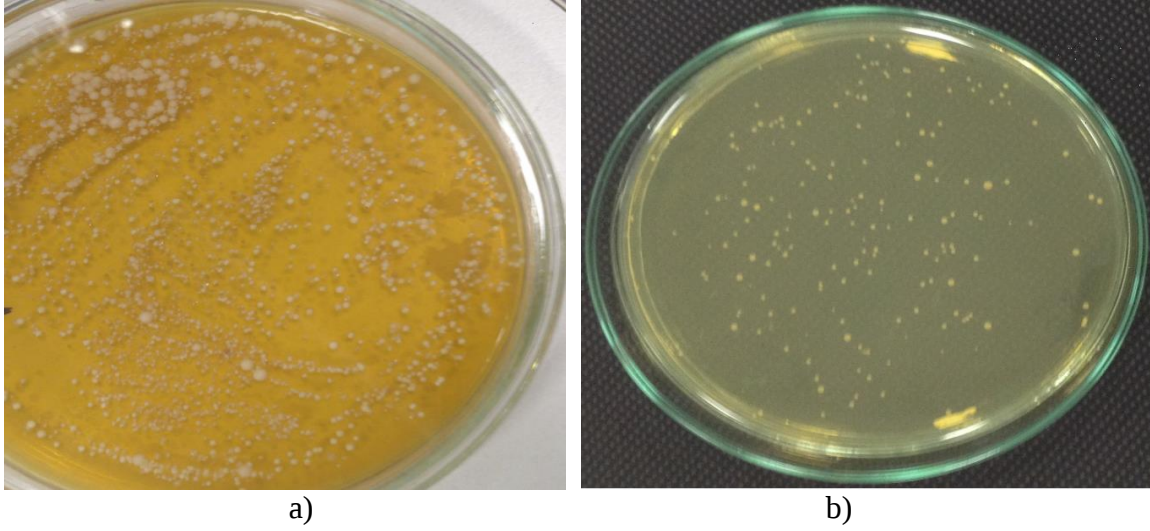
3.1. *Lactobacillus* spp. Bakterilerin İzolasyonu ve Tanımlanması

Çiğ süt örnekleri steril pipetle 5ml alınıp 45ml pepton'lu su içerisine eklenerek 10^{-1} dilüsyonu hazırlanmış, daha sonra cam tüplerdeki steril 9'ar ml'lik pepton'lu su içerisinde 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} dilüsyonları hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlardan de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar besiyerlerine 100 µl olacak şekilde pipetle alınarak drigalski ile yayma ekimleri yapılmıştır (Harrigan , 1998, 391-478). Steril koşullarda 5 g tartılan peynir örnekleri yine steril havan içinde bulunan 45ml pepton'lu su ile ezildikten sonra aynı dilüsyon sıvısında 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 'e kadar dilüe edilmiş ve MRS agar besiyerlerine 100 µl olacak şekilde pipetle alınarak drigalski ile yayma ekimleri yapılmıştır.

Tüm besiyerleri 37°C'de 24-48 saat etüvde üremeye bırakılmıştır. Petriler kontrol edilerek farklı çeşitte koloniler seçilip tekrar MRS agara ekimleri yapılarak 37°C'de 24-48 saat etüvde bekletilmiş ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan bakteriler tanımlanmak üzere nutrient agara ekilerek etüvde 37°C'de 24-48 saat bekletilmiştir ve daha sonra identifikasyon testleri uygulanmıştır.

3.1.1. Koloni morfolojisi

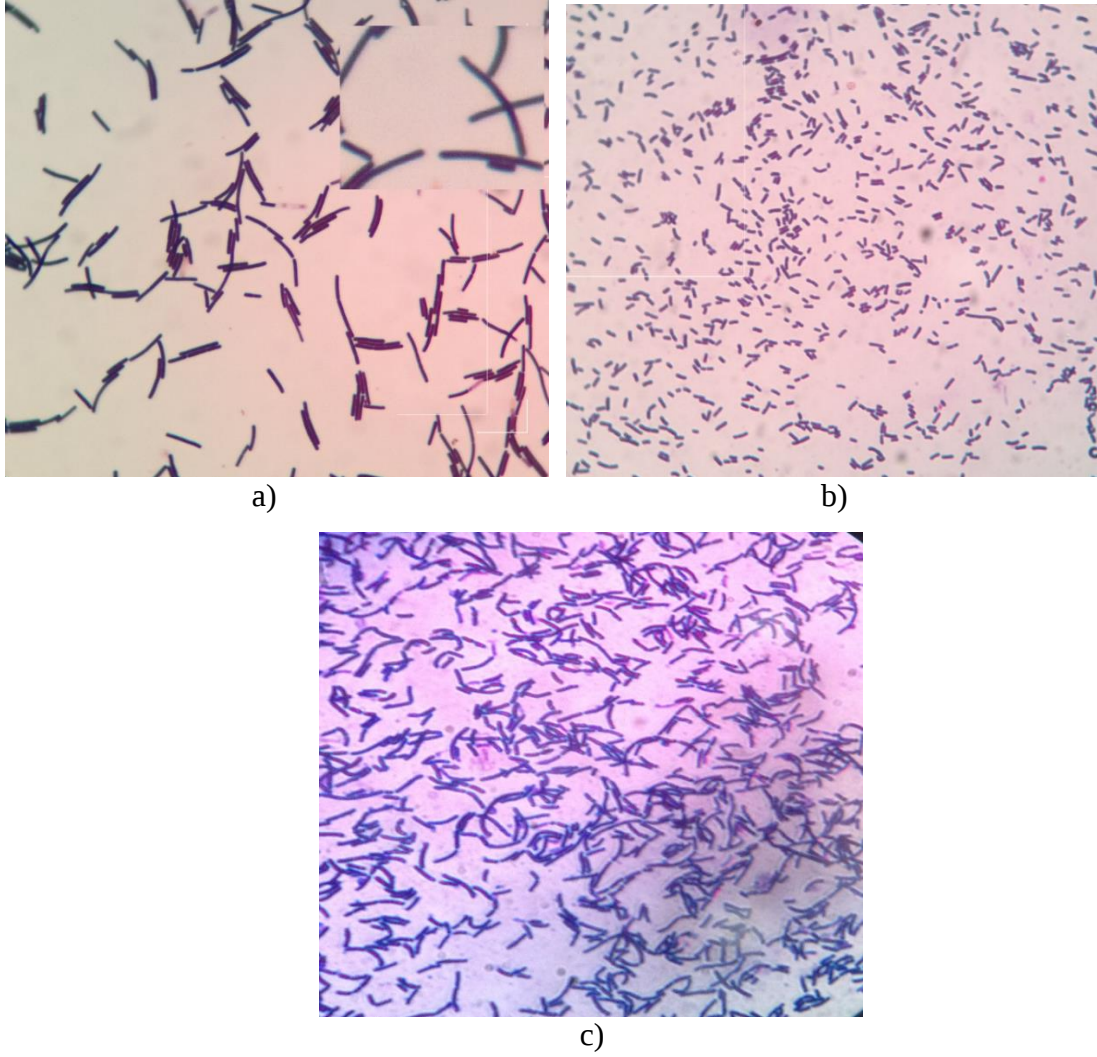
MRS agar besiyerinde üremiş bakteri kolonileri şekillerine ve renklerine göre morfolojik açıdan incelendikten sonra farklı görünen koloniler seçilip tekrar MRS agara ekimleri yapıp 37°C'de 24-48 saat etüvde üremeye bırakılmıştır. Tek koloni ekimleri yapılan bakterilere daha sonra birtakım testler uygulanmıştır (Resim 3.1).



Resim 3.1. MRS agar besiyerinde *Lactobacillus* izolatlarının koloni oluşumu (Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Derya Akçay)

3.1.2. Gram boyama testi

MRS agar besiyerinde tek koloni ekimi yapılarak saf kültürleri hazırlanan bakterilerden öze yardımıyla alınan bakteri kolonileri distile su ile lam üzerine iyice yayılmıştır ve kurutulmuştur. Bek alevinde fiksasyon işlemi gerçekleştirilerek kristal viyole, lügol çözeltisi, etilalkol ve safranine sırasıyla boyanarak kurutulur ve daha sonra üzerlerine immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta 100x büyütmede bakteri koloni görüntülerine bakılmıştır. Gram pozitif bakteriler için mavi ya da mor renginde olan ve çubuk veya kokobasil şeklinde olan bakteriler *Lactobacillus* cinsi bakteriler olarak kabul edilmiştir ve diğer testler uygulanmıştır (Resim 3.2).



Resim 3.2. Gram boyama yapılan *Lactobacillus* izolatlarının mikroskop görüntüsü (a, b, c)
(Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Derya Akçay)

3.1.3. Katalaz testi

%3'lük hidrojen peroksit, mikroskop lamı üzerine yayılan kolonilerin üzerine 2-3 damla damlatılarak köpük şeklinde kabarcık oluşup oluşmadığı gözlemlenmiştir. *Lactobacillus* türlerinin katalaz enzimi olmadığından burada kabarcık olması beklenmez. Lam üzerinde kabarcık görünmüyorsa katalaz negatif olarak kabul edilir.

Gram boyama ve katalaz testleri yapılan bakterilerin *Lactobacillus* cinsi bakteriler olarak kabul edilen izolatları daha sonra manuel tanımlama testleri uygulanmak üzere -20°C'de buzdolabında gliserol içerisinde stoklanmıştır.

3.2. *Lactobacillus* spp. Bakterilerin İzolasyonunda Kullanılan Temel Besiyerleri ve Çözeltiler

MRS broth LAB 94 (de Man, Rogosa and Sharpe Broth)

Mixed Peptones	10.0 g
Yeast Extract	5.0 g
Meat Extract	10.0 g
Glucose	20.0 g
Potassium phosphate	2.0 g
Sodium acetate	5.0 g
Manganese sulphate	0.05 g
Magnesium sulphate	0.2 g
Tween 80	1.08 g
Amonium citrate	2.0 g

pH 6.4 ± 0.2 ayarlanarak 1000 ml distile su ile çözdürölüp 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır.

MRS agar

MRS broth besiyerine ilaveten 1000 ml’sine 15 g agar (Lab M Agar No 1) konularak elde edilmiştir. Daha sonra distile suyla çözdürölüp 121°C de 15 dakika otoklavlanmıştır.

Nutrient agar (LAB M- LAB8)

Peptone	5 g
Beef Extract	3 g
Sodium chloride	8 g
Agar	12 g
Distile su	1000 ml

pH $7,3 \pm 0.2$ ’ye ayarlanarak 121°C’de 15 dakika otoklavlanıp petri kaplara 25’er ml olacak şekilde dökölür.

Nutrient Broth besiyeri (MERCK)

Peptone	5 g
Meat Extract	3 g
Distile su	1000 ml

pH: $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlanarak cam tüplere 5 ml olacak şekilde hazırlanır ve 121°C 'de 15 dakika otoklavlanmıştır.

Pepton Water (OXOID)

Peptone	10.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Distile su	1000 ml

pH 7.2 ± 0.2 'ye ayarlanarak her bir tüpe 9 ml olacak şekilde hazırlanıp 121°C 'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Dilüsyon için kullanılır.

%3'lük Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Çözeltisi

3 ml H_2O_2 100 ml balon jojeye konduktan sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Katalaz testi için kullanılmıştır.

3.3. *Lactobacillus* spp. Bakterilerinin Tanımlanması İçin Yapılan Testler

Peynir ve çiğ süt örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* izolatlarına Gram boyama ve katalaz testleri yapıldıktan sonra bazı manuel testler uygulanmıştır. İdentifikasyon testleri için stoktan alınan *Lactobacillus* izolatları MRS broth sıvı besiyerinde 37°C 'de 24-48 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. İnkübasyondan sonra tüplerde bulunan MRS broth besiyerindeki aktif kültürlerden vorteks ile karıştırıldıktan sonra öze ile alınarak MRS agar besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Taze kültürleri hazırlanan izolatlara Bergey's Manual of Systematic Bacteriology referansı ile tanımlama testleri uygulanmıştır.

3.3.1. Vankomisin testi

İzole edilen bakterilerin taze kültürleri yapıp daha önceden petrilerde hazırlanmış Muller Hinton Agar'a ekimleri yapılarak 37°C'de 24-48 saat etüvde bekletildikten sonra tekrardan bakteriler özeyle alınarak tüplerdeki 3'er ml'lik fizyolojik su içerisine eklenip 0,5 Mc Farland bulanıklığına ayarlanmıştır. Eküvyon çubukla petrilerdeki Muller Hinton Agar'a her yerine dağılacak şekilde ekimi yapıp vankomisin antibiyotik diski yerleştirilir. Petriler 37°C'de 24-48 saat etüvde bekletildikten sonra zon oluşumu gözlemlenerek varsa bakteri inhibisyon zon çaplarının ölçümü alınmıştır. Bakteri zonları Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI, 2017) kriterlerine göre *Lactobacillus* suşlarının vankomisin duyarlılık sınır değerleri baz alınarak değerlendirilmiştir.

3.3.2. MRS broth'da gaz oluşturma testi

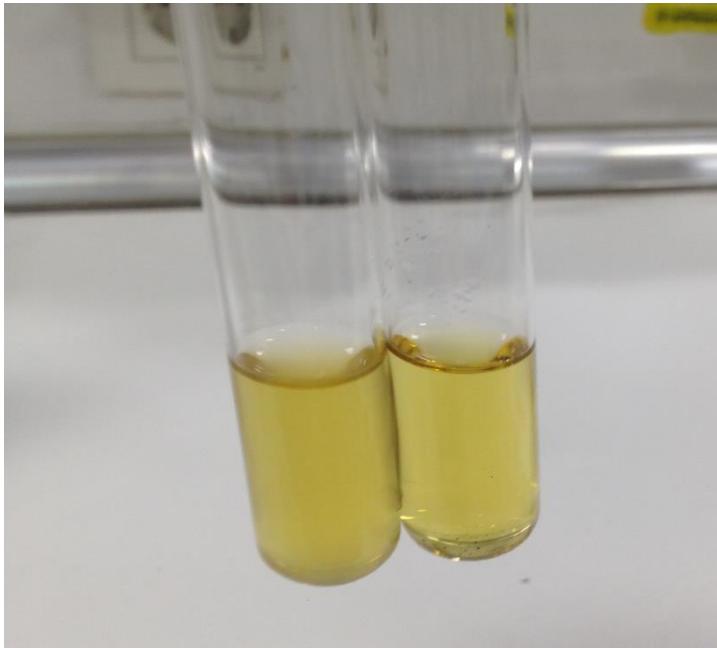
MRS broth besiyeri hazırlanarak durham tüpü yerleştirilen büyük tüplere 9 ml olacak şekilde konulduktan sonra 121°C'de 15 dakika sterilizasyonu yapılmıştır. Daha sonra kültürden alınan bakterilerin özeyle tüplere ekimleri yapılmıştır ve 37°C'de 24 saat etüvlelendikten sonra tüplerde hava kabarcığı olup oluşmadığına bakılmıştır. Kabarcık oluşuyorsa pozitif oluşmuyorsa negatif olarak test edilmiştir (Resim 3.3).



Resim 3.3. MRS broth durham tüplü besiyerinde hava kabarcığı oluşumu

3.3.3. 10°C’de ve 45°C’ de üreme testi

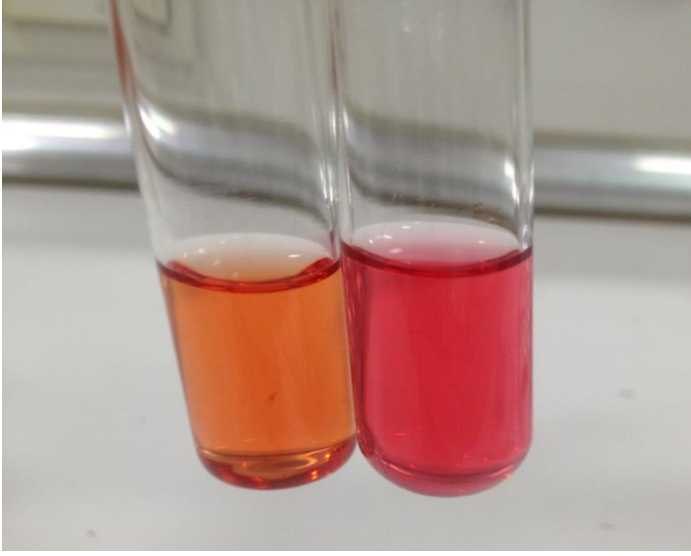
Elde edilen *Lactobacillus* izolatlarına farklı derecelerde gelişimlerini incelemek için 10°C’de ve 45°C’ de üreme testleri yapılmıştır. Bunun için Todd Hewit Broth besiyeri kullanılmıştır. Tüplere 5’er ml besiyeri konularak steril edilmiştir ve taze kültürden özeyle tüplere bakteri ilave edildikten sonra etüv derecesi ayarlanarak üremeye bırakılmıştır. 45°C’ de 1 gün etüvde bekletilmiştir ve 10°C’de 7 gün buzdolabında bekletilmiştir. Sonuçlar incelenerek tüplerde bulanıklık varsa pozitif olarak test edilmiştir (Resim 3.4).



Resim 3.4. *Lactobacillus* izolatlarının 10°C’de ve 45°C’ de üreme görüntüsü

3.3.4. Arjinin hidroliz testi

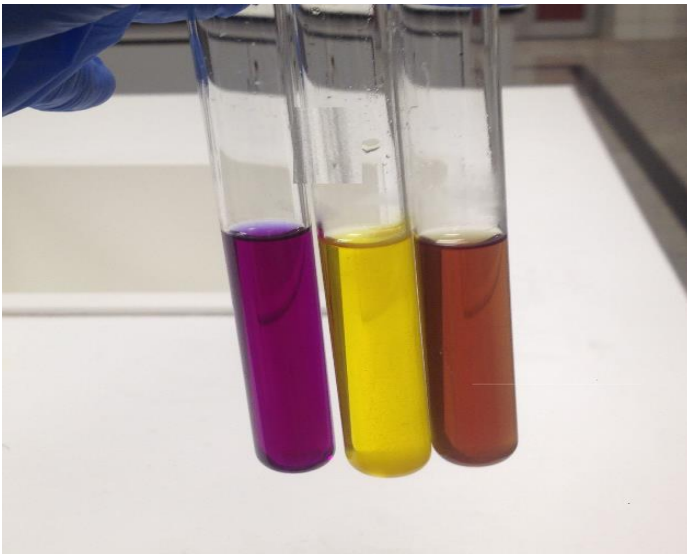
Petride üremiş bakterilerden öze yardımıyla birkaç koloni alınarak daha önce hazırlanarak otoklavlanmış tüplerdeki 4’er ml arjinin testi için hazırlanan sıvı besiyerine ilave edilmiştir. 37°C’ de 24 saat etüvde bekletilmiştir. Portakal sarısı renginde olan besiyerinin pembe- mor renge dönüşümü testin pozitif olduğunu göstermektedir (Resim 3.5).



Resim 3.5. Arjinin hidroliz testi; portakal sarısı rengi (-), pembe renk (+)

3.3.5. Karbonhidrat deneyleri

Karbonhidrat genel besiyeri (Purple Broth Base Bileşimi) hazırlanmış tüplere 9'ar ml pipetlenerek steril edildikten sonra her bir tüpe filtrelenmiş (0,2, 0,45 μm 'lik membran filtreleriyle) şeker solüsyonlarından (laktoz, maltoz, sakkaroz) 1'er ml pipetle ilave edilmiştir. Katı besiyerinde kültüre alınmış bakterilerden 3-5 koloni alınıp karbonhidrat sıvı besiyeri bulunan tüplere ekimi yapılarak 7 gün boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Deney tüplerindeki koyu menekşe rengi sarıya dönüştüğünde sonuç pozitif olarak kabul edilmiştir (Resim 3.6).



Resim 3.6. Mor menekşe (-), Sarı renk (+), Kahverengi (d: değişken)

3.4. *Lactobacillus* spp. bakterilerin biyokimyasal testlerinde kullanılan besiyerleri

Arjinin hidrolizi için besiyeri bileşimi

Pepton	1 g
Sodium chloride	5 g
Di- potasium hydrogen phosphate	0,3 g
Agar	3 g
Phenol red	0,01 g
L-arginine monohydrochloride	10 g
Distile su	1000 ml

pH 7,4 $\pm$ 0,2'ye ayarlanarak tüplere 4'er ml besiyeri konulup 121°C' de 15 dakika otoklavlanmıştır.

Todd Hewit Broth besiyeri

Beef extract	10 g
Tryptone	20 g
Sodium bicarbonate	2 g
Sodium chloride	2 g
Di- potasyum fosfat	0,4 g

pH 7.4 $\pm$ 0.2'ye ayarlanarak 1000 ml distile su ile çözdürölüp cam tüplere 5'er ml ilave edilerek 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır.

Karbonhidrat testi genel besiyeri

Purple Broth Base Bileşimi

Protease peptone	10 g
Beaf extract	1 g
Sodium chloride	5 g
Brom cresol purple	0,02 g
Distile su	1000 ml

pH: $6,8 \pm 0,2$ olarak ayarlanılarak 9'ar ml tüplere pipetlenip otoklavda 121°C ' de 15 dakika otoklavlanmıştır.

Karbonhidrat solüsyonu

Karbonhidrat	1 g
Distile su	10 ml

Laktoz, galakoz, maltoz, rafinoz, sükroz, mannitol, ksiloz, sorbitol, arabinoz şekerleri kullanılarak hazırlanan solüsyon 0,2, 0,45 μm 'lik membran filtreleriyle bek alevinin yanında steril edilmiştir.

3.5. MALDI TOF MS Tanımlaması

Bakterilerin tanımlaması MALDI-TOF MS Bruker Microflex LT model Flex Control 3.0 yazılımı (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Örneklerin hazırlanmasında direkt transfer metodu kullanılmıştır. 37°C 'de 24-48 saatlik inkübasyon sonunda tek koloniden küçük bir miktar tahta çubuk ile plakaya sürülmüştür ve üzerine 1 μl matriks solüsyonu (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50 acetonitrile/%2.5 trifluoroacetic acid, Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) eklenmiştir. Sistemle çalışırken, lineer pozitif iyon modunda 2000-20.000 Da kütle aralığında, mikroorganizma tanımlama için optimize edilmiş uygun yöntem ile çift ölçümler gerçekleştirilmiştir. İyon kaynağı olarak 340 nm'de, 60Hz'lik nitrojen lazer kullanılmıştır. Spektrumların elde edilmesi için her bir numunenin ölçümünde, toplamda 240 olacak şekilde 40'arlı paketlerden oluşan lazer atışları gerçekleştirilmiştir.

3.6. *Lactobacillus* Türleri'nin Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi

Lactobacillus izolat'larının bazı antibiyotiklere karşı duyarlılıkları Kirby-Bayer disk difüzyon yöntemine göre yapılmıştır. Stoktan alınan bakteri izolatları cam tüplerdeki 9'ar ml steril MRS broth besiyerine ekimleri yapılarak aktifleştirilmiştir. Daha sonra MRS agar besiyerinde taze kültürleri yapıp daha önceden petrilere hazırlanmış Muller Hinton Agar'a tekrar ekilmiştir. 37°C 'de 24-48 saat etüvde bekletildikten sonra tekrardan bakteriler özeyle alınarak tüplerdeki 3'er ml'lik steril fizyolojik su içerisine eklenip 0,5 Mc Farland

bulanıklığına ayarlanmıştır. Eküvyon çubukla petrilerdeki Muller Hinton Agar'a her yerine dağılacak şekilde ekimi yapılarak dispenser ile antibiyotik diskler yerleştirilmiştir.

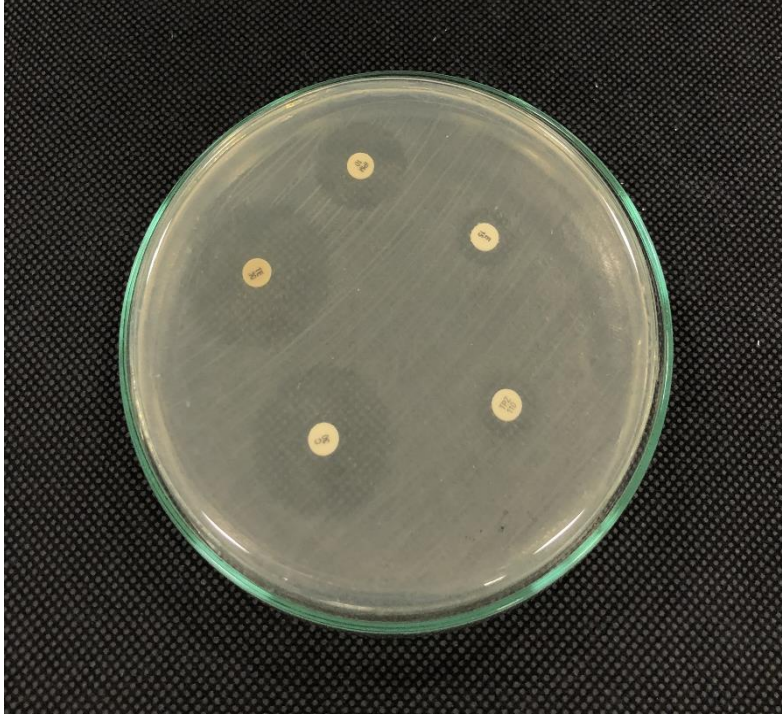
Petriler 37°C'de 24-48 saatlik anaerobik şartlarda inkübasyona bırakıldıktan sonra cetvelle bakteri inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. Bakteri inhibisyon zon çapları Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI, 2017) kriterlerine göre *Lactobacillus* suşlarının antibiyotik duyarlılık sınır değerleri baz alınarak değerlendirilmiştir. Antibiyotik dirençlilik deneyi için ampisilin, tetrasiklin, penisilin, kloramfenikol, gentamisin, trimetoprim-sulfametoksazol ve eritromisin antibiyotikleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Antibiyotik dirençlilik testi için kullanılan diskler ve içerikleri

Antibiyotik adı	Disk içeriği (µg)	Kullanılan disk markası
Ampisilin (Amp)	2	OXOID
Gentamisin (CN)	10	OXOID
Trimetoprim-sulfametoksazol (SXT)	(1,25 +23,75)	Bioanalysis
Penisilin G (P)	10	OXOID
Kloramfenikol (C)	30	Bioanalysis
Tetrasiklin (TE)	30	Bioanalysis
Eritromisin (E)	15	Bioanalysis

*Bakteri inhibisyon zon çapları CLSI kriterlerine göre değerlendirilmiştir (CLSI, 2017)

Muller Hinton Agar'da üremeleri gerçekleşen bakterilerin zon çaplarının ölçümleri alındıktan sonra petrilerin görüntüleri fotoğraflanmıştır (Resim 3.7).



Resim 3.7. Antibiyotik disklerin Muller Hinton agar besiyerine yerleştirilmesi

Mueller Hinton agar II (LAB M-LAB39)

Beef infusion solids	2.0 g
Acid hydrolysed casein	17.5 g
Starch	1.5 g
Agar No 1	17.0 g

Calcium ions 5-100 mg/litre

Magnesium ions 20-35mg/litre

pH 7.3-+ 0.1 'e ayarlanarak 1000 ml distile suda çözdürülür ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır.

%0,9'luk fizyolojik tuzlu su çözeltisi

0.9 g NaCl 100 ml distile su içerisinde çözülür, küçük tüplere 3'er ml konularak sterilizasyon için 121°C'de 15 dk otoklavlanmıştır.

McFarland bulanıklılık tüpü

0,5 McFarland standardına uygun bulanıklık tüpü hazırlamak için baryum klorür ve sülfürikasit kullanılmıştır.

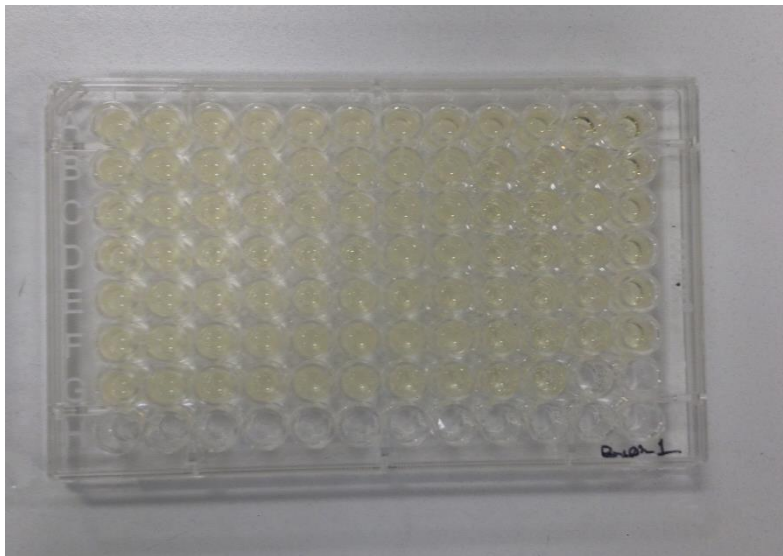
0,048 M BaCl₂ (%1,175 g BaCl₂·2H₂O) 0,5 ml
 + 0,18 M H₂SO₄/ H₂O (%1 v/v) 99,5 ml
 0,5 McFarland = 10⁸ kob/ml

Hazırlanan bu solüsyon deney tüplerine 5'er ml ilave edilerek oda sıcaklığında, karanlıkta saklanmıştır.

3.7. Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

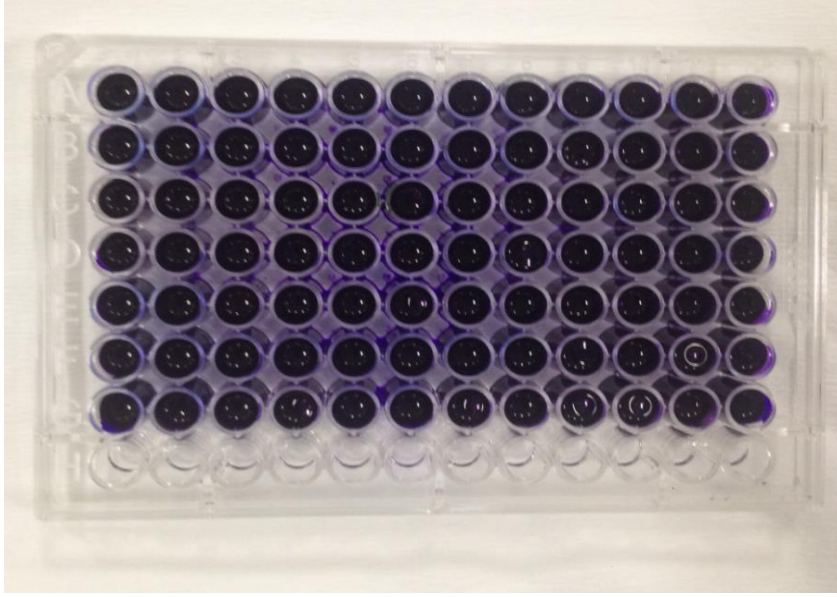
3.7.1. Mikroplate yöntemi

Lactobacillus izolatları MRS agarda 37°C'de 48 saat inkübasyonla taze kültürleri hazırlandıktan sonra %1'lik glikoz içeren 5ml'lik NB [Nutrient Broth Besiyeri (MERCK)] besiyeri bulunan tüplere bakteriler ilave edilmiştir ve 0,5 Mc Farland'a uyarlanarak steril pipetle 200 µl alınarak mikroplak kuyucuklarına 2'şerli aynı örnekten yerleştirilmiştir. 24 ve 48 saat olmak üzere iki ayrı plak hazırlanarak 37°C'de inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak plaklardaki son iki kuyucuk sadece sıvı besiyeri ile doldurulmuştur (Resim 3.8).



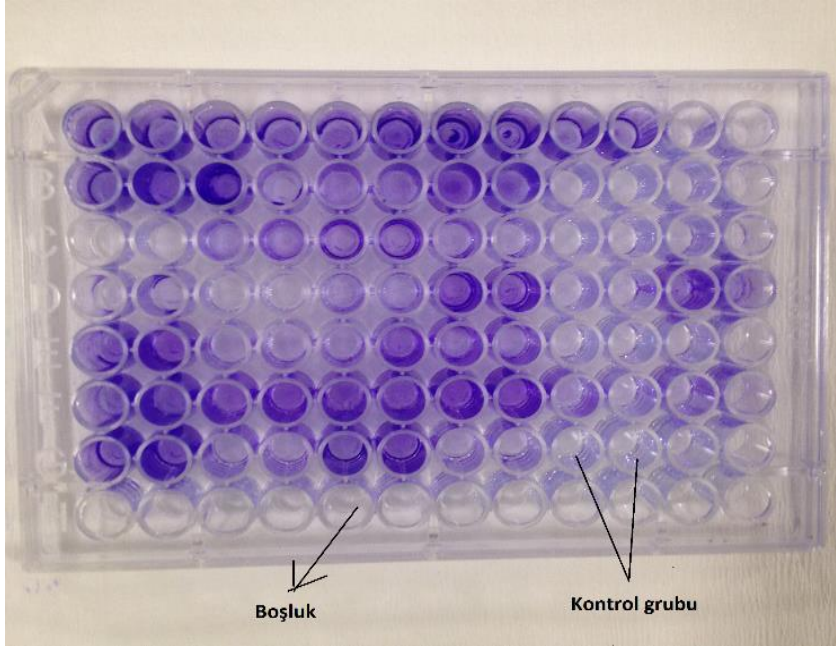
Resim 3.8. Mikroplate'lerde bakterilerin NB besiyerinde inkübasyonu

İnkubasyondan sonra mikropalaklar hassas bir şekilde distile suyla üç kez yıkandıktan sonra etüvde kurutmaya bırakılmıştır. Mikropalaklar kuruduktan sonra önceden hazırlanmış Kristal viyole boya (steril pipetle 200'er µl) ile kuyucuklar boyanarak 15 dakika bekletilmiştir. Distile suyla üç kez iyice yıkaması yapılan mikropalaklar tekrar kurutmaya alınmıştır (Resim 3.9).



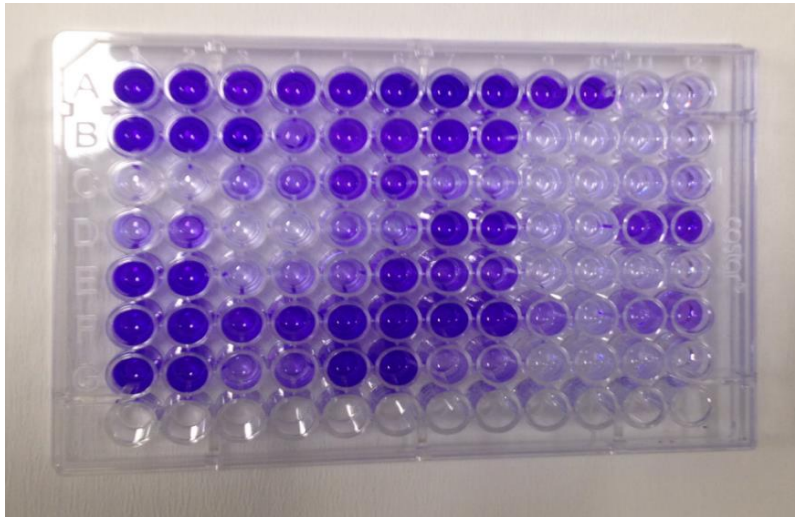
Resim 3.9. Kuyucukların kristal viyole boyama görüntüsü

Burada kristal viyole boyanın kuyucuklarda sonucu değiştirecek şekilde çok koyu kalmaması için iyice yıkanmasına dikkat edilmelidir. Kristal viyole boya ile boyanıp yıkandıktan sonra kuyucuklarda oluşan tabakalar gözlemlenmiştir (Resim 3.10).



Resim 3.10. Kristal viyole boyasının yıkandıktan sonra mikropalak görüntüsü

Daha sonra mikropalalara %95'lik alkol 200'er µl her bir kuyucuğa konularak 15 dk civarında alkolde boyanın çözünmesi beklenmiştir. Alkol eklenen mikropalaklar ELISA reader okuyucuda 540 nm'de okutulmuştur. Sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak kuvvetli (+++), orta (++), zayıf (+) pozitif veya negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Resim 3.11).



Resim 3.11. Mikroplate kuyucuklara %95'lik etilalkol eklenmesi

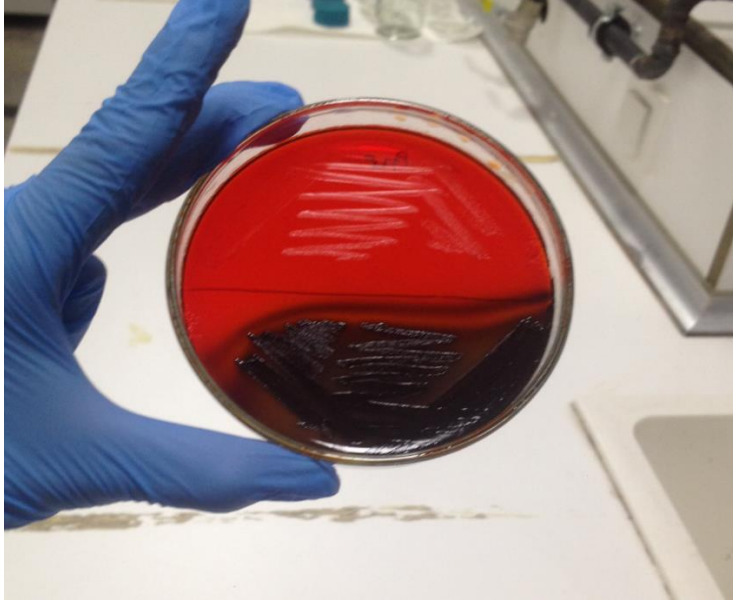
Kristal Viyole Çözeltilisi

Kristal viyole	2 g
Ethyl alcohol (% 95'lik)	20 ml
Ammonium oksalate	0,8 g
Distile su	80 ml

2g kristal viyole ile 20ml etilalkol karıştırılır ve amonyum oksalat ile de 80 ml distile su iyice karıştırılır ve daha sonra bu karışımlar iyice birbiriyle karıştırılıp bir gece bekletilerek karışım süzölmüştür.

3.7.2. Kongo kırmızılı agar yöntemi

Lactobacillus suşlarının slime oluşturmaları Kongo Kırmızılı Agar besiyerinde kolonilerin renk değişimine bakılarak incelenmiştir. *Lactobacillus* izolatlarının slime oluşumlarının incelenmesinde *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) suşu pozitif kontrol, *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) suşu negatif kontrol olarak kullanılmıştır. MRS agar besiyerinde taze kültürleri hazırlanan izolatlar Kongo Kırmızılı Agar'da (sükroz 50 g, brain heart infusion broth 37 g, Congo red agar 0,8 g, agar 10 g, distile su 1000 ml) tek koloni olarak çizgi ekimleri yapıp 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra biyofilm oluşumları incelenmiştir (Yazdani ve diğerleri, 2006). Siyah ve kahverengi renkli olan petrilerdeki kolonilerin slime oluşumu pozitif, pembe ve kırmızı renkli olanların ise slime oluşturmaları negatif kabul edilmiştir (Resim 3.12).



Resim 3.12. Kongo Kırmızılı Agar besiyerinde slime testi

Kongo Kırmızılı Agar

Sükroz	50 g
BHI broth	37 g
Kongo kırmızısı	0,8 g
Agar	10 g
Distile su	1000 ml

Karışım 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir ve steril petrilere dökülmüştür.

4. BULGULAR

Bu çalışmamızda Temmuz 2018 ve Aralık 2018 tarihleri arasında Ankara'nın çeşitli semtlerinden toplanan 20 peynir ve 20 çiğ süt örneklerinden 103 *Lactobacillus* izolatu izole edilmiştir. İzole edilen *Lactobacillus* izolatlarına identifikasyon testleri uygulanarak tür seviyesinde tanımlamaları yapılmıştır. Bununla birlikte antibiyotik dirençlilik testleri yapılmıştır ve biyofilm oluşumları incelenmiştir.

4.1. *Lactobacillus* İzolatlarının Tür Seviyesinde Tanımlanması

Peynir ve çiğ süttten elde edilen *Lactobacillus* spp. bakterilerinin tanımlanmasında cins ve tür özelliklerine göre geleneksel biyokimyasal testler yapılmıştır ve Bergey's Manual of Systematic Bacteriology referansına göre tanımlanmıştır. Ayrıca *Lactobacillus* izolatlarının tür seviyesinde tanımlanması için MALDI-TOF MS bakteri tanımlama yöntemi kullanılmıştır. Çizelge 4.1'de MALDI-TOF MS bakteri tanımlama yöntemine göre yapılan test sonuçları verilmiştir.

Lactobacillus suşlarının identifikasyonları için Gram boyama ve katalaz testleri yapıp cins düzeyinde tanımlamaları yapıldıktan sonra bazı biyokimyasal testler uygulanarak tür seviyesinde tanımlamaları yapılmıştır. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology referans alınarak uygulanan bu testler vankomisin, arjinin, MRS broth'da gaz oluşumu (durham tüplü), 10°C ve 45°C'de üreme testleri ve karbonhidrat testleridir (laktoz, maltoz, sükroz).

Lactobacillus cinsi bakterilerinin son yapılan çalışmalarda da belirtildiği üzere genellikle vankomisin antibiyotigine dirençli oldukları tespit edildiğinden izole edilen *Lactobacillus* cinsi olarak belirlediğimiz izolatlara vankomisin testi uygulanmıştır. Test sonuçlarında vankomisin testi yapılan 103 *Lactobacillus* izolatının 15'i (%14,6) vankomisine duyarlı, 88'i (%85,4) vankomisine dirençli olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada peynir ve çiğ süttten izole edilen *Lactobacillus* spp. izolatlarına uygulanan biyokimyasal test sonuçları Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Peynir örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının biyokimyasal test sonuçları

İzolatlar	Morfoloji	Gram Boyama	Katalaz	Vankomisin	MRS Broth Gaz Testi	Arjinin Testi	10°C'de Gelişme	45°C'de Gelişme	Maltoz	Laktoz	Sükroz	<i>Lactobacillus</i> Türleri
P1A	Çubuk	+	–	R	d	+	–	–	+	–	–	<i>L. brevis</i>
P1B	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P2A	Çubuk	+	–	R	+	–	–	–	+	+	N	<i>L. fermentum</i>
P3A	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	N	<i>L. plantarum</i>
P3B	Çubuk	+	–	R	d	–	–	–	+	+	+	<i>L. paracasei</i>
P4B	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P4O	Çubuk	+	–	R	+	+	–	–	+	+	N	<i>L. fermentum</i>
P5A	Çubuk	+	–	R	–	d	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P5B	Kokobasil	+	–	R	–	–	–	–	+	–	–	<i>L. brevis</i>
P5D	Çubuk	+	–	R	–	–	–	N	+	N	+	<i>L. plantarum</i>
P5F	Kokobasil	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P5P	Kokobasil	+	–	R	–	d	+	–	+	–	+	<i>L. plantarum</i>
P6B	Kokobasil	+	–	R	+	d	–	–	+	–	+	<i>L. fermentum</i>
P6D	Kokobasil	+	–	R	+	d	–	–	+	+	N	<i>L. fermentum</i>
P7A	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P7B	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	–	+	<i>L. brevis</i>
P7C	Çubuk	+	–	R	–	+	–	–	+	+	–	<i>L. brevis</i>
P7E	Çubuk	+	–	R	+	d	–	–	+	+	–	<i>L. fermentum</i>
P7F	Çubuk	+	–	R	+	d	–	–	+	–	–	<i>L. fermentum</i>
P8A	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P8B	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P8D	Çubuk	+	–	R	d	–	–	–	+	+	+	<i>L. paracasei</i>
P8E	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	–	+	N	<i>L. plantarum</i>
P8F	Çubuk	+	–	R	+	–	+	–	–	+	–	<i>L. fermentum</i>
P8G	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	N	d	<i>L. plantarum</i>
P8P	Çubuk	+	–	R	–	d	–	–	+	–	–	<i>L. plantarum</i>
P9C	Çubuk	+	–	D	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P9E	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P10A	Çubuk	+	–	R	d	–	–	–	+	d	N	<i>L. curvatus</i>

Çizelge 4.1. (devam) Peynir örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının biyokimyasal test sonuçları

İzolatlar	Morfoloji	Gram Boyama	Katalaz	Vankomisin	MRS Broth Gaz Testi	Arjinin Testi	10°C'de Gelişme	45°C'de Gelişme	Maltoz	Laktoz	Sükroz	<i>Lactobacillus</i> Türleri
P10D	Çubuk	+	–	R	d	–	–	–	+	–	N	<i>L. brevis</i>
P11G	Çubuk	+	–	R	+	–	–	–	+	+	+	<i>L. fermentum</i>
P11F	Çubuk	+	–	R	+	–	–	–	+	+	+	<i>L. fermentum</i>
P12A	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P12E	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P12G	Çubuk	+	–	R	d	–	–	–	+	+	N	<i>L. paracasei</i>
P12P	Çubuk	+	–	R	+	+	–	–	+	–	–	<i>L. brevis</i>
P13B	Çubuk	+	–	R	+	–	–	–	+	+	N	<i>L. fermentum</i>
P13C	Çubuk	+	–	R	+	+	–	–	+	+	+	<i>L. fermentum</i>
P13D	Çubuk	+	–	R	+	d	–	–	+	+	N	<i>L. fermentum</i>
P13E	Kokobasil	+	–	R	+	d	–	–	+	+	+	<i>L. fermentum</i>
P13F	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P13G	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	N	<i>L. plantarum</i>
P13H	Çubuk	+	–	R	d	+	–	–	+	+	+	<i>L. fermentum</i>
P13I	Çubuk	+	–	R	d	d	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P13J	Çubuk	+	–	R	+	d	–	–	+	+	+	<i>L. fermentum</i>
P14B	Çubuk	+	–	R	–	d	–	–	+	+	N	<i>L. fermentum</i>
P14D	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P15A	Çubuk	+	–	R	+	+	–	–	+	+	+	<i>L. fermentum</i>
P15B	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P15E	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P16B	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	N	<i>L. plantarum</i>
P16D	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P16F	Çubuk	+	–	R	+	–	–	–	+	+	+	<i>L. fermentum</i>
P16G	Kokobasil	+	–	R	+	d	–	–	+	+	N	<i>L. fermentum</i>
P17A	Çubuk	+	–	R	d	–	–	–	+	–	d	<i>L. brevis</i>
P17B	Çubuk	+	–	R	–	d	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P17C	Çubuk	+	–	R	–	+	–	–	+	+	+	<i>L. brevis</i>
P17D	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P17F	Çubuk	+	–	R	–	+	–	–	+	+	–	<i>L. brevis</i>
P17G	Çubuk	+	–	R	d	–	–	–	+	+	+	<i>L. paracasei</i>
P18A	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P18B	Çubuk	+	–	R	+	–	–	–	+	+	N	<i>L. fermentum</i>

Çizelge 4.1. (devam) Peynir örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının biyokimyasal test sonuçları

İzolatlar	Morfoloji	Gram Boyama	Katalaz	Vankomisin	MRS Broth Gaz Testi	Arjinin Testi	10°C'de Gelişme	45°C'de Gelişme	Maltoz	Laktoz	Sükroz	<i>Lactobacillus</i> Türleri
P18E	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	–	<i>L. plantarum</i>
P18F	Çubuk	+	–	R	d	–	–	–	+	+	d	<i>L. paracasei</i>
P19B	Çubuk	+	–	R	–	+	–	–	+	+	N	<i>L. brevis</i>
P19C	Çubuk	+	–	R	+	d	–	–	+	+	+	<i>L. fermentum</i>
P19D	Çubuk	+	–	R	+	+	–	–	+	+	+	<i>L. fermentum</i>
P19E	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	N	<i>L. plantarum</i>
P19G	Çubuk	+	–	R	+	+	–	–	+	+	+	<i>L. fermentum</i>
P19H	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	d	N	<i>L. curvatus</i>
P19I	Çubuk	+	–	R	+	–	–	–	+	–	–	<i>L. brevis</i>
P19J	Çubuk	+	–	R	+	–	–	–	+	+	+	<i>L. fermentum</i>
P20B	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P20C	Çubuk	+	–	R	+	–	–	–	+	–	–	<i>L. brevis</i>
P20F	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P20G	Çubuk	+	–	R	+	d	–	–	+	–	–	<i>L. brevis</i>
P20I	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
P20J	Çubuk	+	–	R	–	–	–	–	+	N	–	<i>L. plantarum</i>

R: dirençli, D: duyarlı, (+): pozitif sonuç, (–): negatif sonuç, d: değişken, N: test edilmedi.

Çizelge 4.2. Çiğ süt örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının biyokimyasal test sonuçları

İzolatlar	Morfoloji	Gram Boyama	Katalaz	Vankomisin	MRS Broth Gaz Testi	Arjinin	10°C'de Üreme	45°C'de Üreme	Maltoz	Laktoz	Sükroz	<i>Lactobacillus</i> Türleri
S1A	Çubuk	+	-	D	-	-	-	-	+	+	d	<i>L. plantarum</i>
S1C	Kokobasil	+	-	D	-	-	-	-	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
S1D	Çubuk	+	-	D	-	-	-	-	+	+	N	<i>L. plantarum</i>
S1F	Çubuk	+	-	R	-	-	-	-	+	N	N	<i>L. paracasei</i>
S2B	Çubuk	+	-	R	-	-	-	-	+	-	-	<i>L. brevis</i>
S4B	Çubuk	+	-	D	-	-	+	-	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
S5A	Çubuk	+	-	R	-	-	+	-	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
S6B	Çubuk	+	-	R	-	-	-	-	N	-	+	<i>L. brevis</i>
S6C	Çubuk	+	-	R	+	-	-	-	N	+	+	<i>L. fermentum</i>
S7C	Kokobasil	+	-	D	-	-	-	-	+	+	N	<i>L. plantarum</i>
S11B	Kokobasil	+	-	D	-	-	-	-	+	+	N	<i>L. plantarum</i>
S11C	Çubuk	+	-	D	-	-	-	-	+	+	d	<i>L. plantarum</i>
S13E	Çubuk	+	-	D	-	-	-	-	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
S14A	Çubuk	+	-	D	-	-	-	-	+	+	+	<i>L. coryniformis</i>
S14B	Çubuk	+	-	R	d	-	-	-	+	+	+	<i>L. paracasei</i>
S14H	Çubuk	+	-	R	-	-	-	-	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
S15A	Çubuk	+	-	R	-	-	-	N	+	+	+	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>
S15I	Çubuk	+	-	D	-	N	-	-	+	+	+	<i>L. amylolyticus</i>
S16D	Çubuk	+	-	R	+	-	+	N	N	+	+	<i>L. fermentum</i>
S17D	Çubuk	+	-	R	-	-	-	-	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
S17F	Çubuk	+	-	D	-	-	-	-	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
S18A	Çubuk	+	-	R	-	-	-	+	+	+	+	<i>L. zeae</i>
S18E	Çubuk	+	-	R	-	-	-	-	+	+	+	<i>L. plantarum</i>
S18H	Çubuk	+	-	R	-	-	-	+	+	+	+	<i>L. zeae</i>
S20A	Kokobasil	+	-	D	-	-	-	-	+	+	d	<i>L. plantarum</i>

R: dirençli, D: duyarlı, (+): pozitif sonuç, (-): negatif sonuç, d: değişken, N: test edilmedi

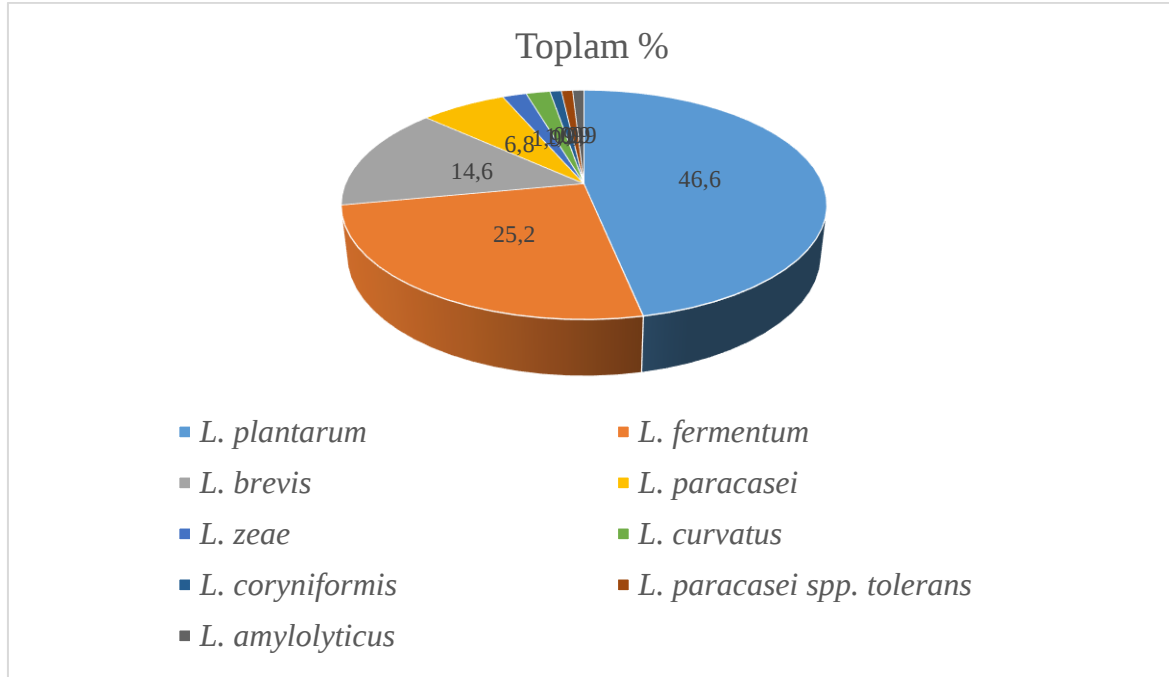
Biyokimyasal test sonuçları ile Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'deki *Lactobacillus* tür özellikleri karşılaştırılarak elde edilen izolatların ön tanımlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu veriler doğrultusunda tür seviyesinde tanımlamada daha iyi sonuçlar elde etmek için MALDI-TOF MS bakteri tanımlama yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre 9 çeşit *Lactobacillus* türü tanımlanmıştır ve bunlar peynir ve çiğ süttten elde edilenler olarak ayrımı yapılmıştır.

Çizelge 4.3. MALDI-TOF MS bakteri tanımlama yöntemiyle tanımlaması yapılan *Lactobacillus* izolatlarının örneklere göre dağılımı

<i>Lactobacillus</i> türleri	Peynir		Çiğ süt		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
<i>L. plantarum</i>	34	43,6	14	56	48	46,6
<i>L. fermentum</i>	24	30,8	2	8	26	25,2
<i>L. brevis</i>	13	16,7	2	8	15	14,6
<i>L. paracasei</i>	5	6,4	2	8	7	6,8
<i>L. zeae</i>	—	—	2	8	2	1,9
<i>L. curvatus</i>	2	2,6	—	—	2	1,9
<i>L. coryniformis</i>	—	—	1	4	1	0,9
<i>L. paracasei</i> spp. <i>tolerans</i>	—	—	1	4	1	0,9
<i>L. amylolyticus</i>	—	—	1	4	1	0,9
Toplam	78	100	25	100	103	100

n: izolat sayısı

Toplam 103 *Lactobacillus* spp. izolatının 48'i (%46,6) *L. plantarum*, 26'sı (%25,2) *L. fermentum*, 15'i (%14,6) *L. brevis*, 7'si (%6,8) *L. paracasei*, 2'si (%1,9) *L. zeae*, 2'si (%1,9) *L. curvatus*, 1'i (%0,9) *L. amylolyticus*, 1'i (%0,9) *L. coryniformis*, 1'i (%0,9) *L. paracasei* spp. *tolerans* olarak tanımlanmıştır. Adlandırılması yapılan 103 *Lactobacillus* cinsi bakterilerden en fazla *L. plantarum* türü tanımlanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Lactobacillus* türlerinin dağılımı

Peynir örneklerinden toplamda 78 adet *Lactobacillus* izolatu izole edilmiştir; Çiğ süt örneklerinden ise 25 adet *Lactobacillus* izolatu izole edilmiştir.

Peynir örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* izolatlarından 34'ü (%43,6) *L. plantarum*, 24'ü (%30,8) *L. fermentum*, 13'ü (%16,7) *L. brevis*, 5'i (%6,4) *L. paracasei*, 2'si (%2,6) *L. curvatus* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.1).

Çiğ süt örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının tür dağılımları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Bu verilere göre 25 *Lactobacillus* izolatının 14'ü (%56) *L. plantarum*, 2'si (%8) *L. fermentum*, 2'si (%8) *L. brevis*, 2'si (%8) *L. paracasei*, 2'si (%8) *L. zeae*, 1'i (%4) *L. amyolyticus*, 1'i (%4) *L. coryniformis*, 1'i (%4) *L. paracasei spp. tolerans* olarak tür seviyesinde tanımlamaları yapılmıştır.

Lactobacillus spp. izolatlarının tür seviyesinde tanımlamaları yapıldıktan sonra antibiyotik dirençlilikleri test edilmiştir ve biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir.

4.2. Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları

Antibiyotik dirençlilik deneyi için Kirby-Bayer disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Disk difüzyon yöntemi için Muller Hinton agar besiyeri kullanılmıştır. Bakteri inhibisyon zon

Çapları ölçüldükten sonra CLSI kriterlerine göre değerlendirilen sonuçlar izelge 4.4 ve izelge 4.5’de yer almaktadır.

Antibiyotik dirençlilik testi için mikrobiyoloji laboratuvarında bulunan belirli miktarlardaki ve markalardaki standart antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Bunlar ampisilin, penisilin, gentamisin, trimetoprim-sulfametoksazol, eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol antibiyotik diskleridir.

Antimikrobiyal duyarlılık testinde *Lactobacillus* spp. izolatların ampisiline (%80,6) karşı oldukça dirençli, ancak tetrasiklin (%68,9), penisilin (%68,0), kloramfenikol (%96,1), gentamisin (%99,0), trimetoprim-sulfametoksazol (%85,4) ve eritromisine (%87,4) duyarlı olduğu grlmştr.

Peynirden izole edilen *Lactobacillus* trlerinin antibiyotik dirençlilik test sonuçları ile iğ stten elde edilen *Lactobacillus* trlerinin antibiyotik dirençlilik test sonuçları Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Peynir örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri

İzolatlar	AMP	P	CN	SXT	E	TE	C
P1A	R	I	S	S	R	R	S
P1B	R	R	S	S	S	R	S
P2A	R	S	S	S	S	S	S
P3A	R	I	S	S	I	S	S
P3B	R	S	S	S	S	S	S
P4B	R	I	S	S	S	S	S
P4O	R	I	S	S	S	S	S
P5A	R	R	S	S	S	I	S
P5B	R	I	S	S	S	S	S
P5D	R	R	S	S	S	I	S
P5F	R	I	S	S	S	S	S
P5P	R	R	S	S	S	I	S
P6B	R	S	S	R	S	S	S
P6D	R	R	S	S	I	S	S
P7A	R	S	S	S	S	R	S
P7B	R	R	S	S	S	S	S
P7C	R	S	S	S	S	S	S
P7E	R	R	S	S	S	S	S
P7F	R	I	S	S	S	S	S
P8A	R	S	S	S	S	R	S
P8B	R	R	S	S	S	I	S
P8D	R	I	S	S	S	I	S
P8E	R	S	S	S	S	I	S
P8F	R	S	S	R	S	S	S
P8G	S	S	S	S	S	S	S
P8P	R	S	S	S	S	I	S
P9C	R	S	S	S	S	S	S
P9E	R	S	S	S	S	S	S
P10A	I	S	S	S	S	S	S
P10D	R	S	S	S	S	S	S
P11G	R	S	S	R	S	S	S
P11F	R	S	S	R	S	S	S
P12A	R	I	S	S	I	S	S
P12E	R	S	S	S	S	R	S
P12G	R	I	S	S	S	I	S
P12P	R	I	S	S	S	S	S
P13B	R	S	S	S	S	S	S
P13C	R	S	S	I	S	S	S

Çizelge 4.4. (devam) Peynir örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri

İzolatlar	AMP	P	CN	SXT	E	TE	C
P13D	R	S	S	S	S	S	S
P13G	R	S	S	S	S	S	S
P13J	R	S	S	S	S	S	S
P14B	R	S	S	S	S	S	S
P14D	R	I	S	S	S	R	S
P15A	I	S	S	S	S	S	R
P15B	R	S	S	S	S	S	S
P15E	I	S	S	R	S	S	S
P16B	R	I	S	S	S	I	S
P16D	R	S	S	S	S	R	S
P16F	S	S	S	S	I	S	S
P16G	I	S	S	S	R	S	S
P17A	R	R	S	S	S	I	R
P17B	I	S	S	S	R	R	S
P17C	S	S	S	S	R	S	S
P17D	R	I	S	S	S	I	S
P17F	R	S	S	S	S	S	S
P17G	R	S	S	S	S	S	S
P18A	R	I	S	S	I	S	S
P18B	R	S	S	S	S	S	S
P18E	I	I	S	S	S	S	S
P18F	R	S	I	S	R	S	S
P19B	I	I	S	S	R	S	S
P19C	S	S	S	S	S	I	S
P19D	R	S	S	S	S	S	S
P19E	R	S	S	R	S	S	S
P19G	R	S	S	S	S	S	S
P19H	R	R	S	S	S	S	S
P19I	R	I	S	S	S	S	S
P19J	S	S	S	S	S	I	S
P20B	S	S	S	S	S	S	S
P20C	R	I	S	S	N	I	S
P20F	R	R	S	S	S	I	S
P20G	R	R	S	S	S	I	S
P20I	R	I	S	S	S	R	S
P20J	R	S	S	S	S	S	S

Antibiyotikler; AMP: ampicilin, P: penisilin, CN: gentamisin, SXT: trimetoprim-sulfametoksazol, E: eritromisin, TE: tetrasiklin, C: kloramfenikol; Sonuçlar: R: dirençli, S: duyarlı, I: orta duyarlı, N: test edilmedi.

Çizelge 4.5. Çiğ süt örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri

İzolatlar	AMP	P	CN	SXT	E	TE	C
S1A	R	S	S	I	S	S	S
S1C	R	S	S	S	S	S	S
S1D	R	S	S	S	S	S	S
S1F	R	S	S	S	S	S	S
S2B	I	S	S	S	S	R	R
S4B	R	S	S	S	S	R	S
S5A	R	S	S	S	R	S	S
S6B	R	S	S	R	S	S	S
S6C	R	S	S	R	S	S	S
S7C	R	S	S	S	S	R	S
S11B	I	I	S	S	S	R	S
S11C	R	S	S	S	S	S	S
S13E	S	S	S	S	S	S	S
S14A	R	S	S	R	S	S	N
S14B	R	S	S	S	S	R	S
S14H	R	S	S	S	S	S	S
S15A	S	S	S	S	S	S	S
S15I	S	S	S	S	S	S	S
S16D	S	S	S	R	S	S	S
S17D	R	S	S	S	S	S	S
S17F	S	S	S	S	S	S	S
S18A	R	S	S	R	S	S	S
S18E	R	S	S	R	S	S	S
S18H	R	S	S	R	S	S	S
S20A	R	S	S	S	S	R	S

Antibiyotikler; AMP: ampicilin, P: penisilin, CN: gentamisin, SXT: trimetoprim-sulfametoksazol, E: eritromisin, TE: tetrasiklin, C: kloramfenikol; Sonuçlar: R: dirençli, S: duyarlı, I: orta duyarlı, N: test edilmedi

Lactobacillus izolatlarının kloramfenikol (%97,4), trimetoprim-sulfametoksazol (%91), tetrasiklin (%66,7), eritromisin (%84,6) ve penisilin antibiyotiğine (%59) duyarlı oldukları bulunmuştur.

Peynirden izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının antibiyotik dirençlilik yüzdelik dağılımlarına bakıldığında %83,3 oranında ampiciline dirençli olduğu bulunmuştur. % 98,7 oranında gentamisin ve % 97,4 oranında kloramfenikol antibiyotiğine duyarlı olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.6).

Çiğ süttten izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının antibiyotik dirençlilik yüzdelerik dağılımlarına bakıldığında %72 oranında ampisiline dirençli oldukları; %96 oranında penisilin ve eritromisine duyarlı oldukları , %100 gentamisine duyarlı oldukları bulunmuştur (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Peynir ve çiğ süttten izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının antibiyotik dirençlilik yüzdelerik dağılımları

Antibiyotikler	Peynir %			Çiğ süt %		
	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
AMP	7,7	8,9	83,3	20	8	72
P	59	25,6	15,4	96	4	0
CN	98,7	1,3	0	100	0	0
SXT	91	1,3	7,7	68	4	28
E	85,7	6,5	7,8	96	0	4
TE	66,7	21,8	11,5	76	0	24
C	97,4	0	2,6	95,8	0	4,2

Lactobacillus türlerinin antibiyotik dirençlilik dağılımları izolat sayısına göre Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. *Lactobacillus* türlerinin antibiyotik dirençlilik dağılımları

	<i>Lactobacillus</i> Türleri	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. zeae</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. coryniformis</i>	<i>L. paracasei</i> spp. <i>tolerans</i>	<i>L. amylolyticus</i>	Toplam
AMP	R	41	20	13	7	2	1	1	0	0	85
	S	6	6	1	0	0	0	0	1	1	15
	I	1	0	1	0	0	1	0	0	0	3
P	R	6	2	3	0	0	1	0	0	0	12
	S	31	22	6	5	2	1	1	1	1	70
	I	11	2	6	2	0	0	0	0	0	21
CN	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S	48	26	15	6	2	2	1	1	1	102
	I	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
SXT	R	3	6	1	0	2	0	1	0	0	13
	S	44	19	14	7	0	2	0	1	1	88
	I	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
E	R	2	1	3	1	0	0	0	0	0	7
	S	43	23	11	6	2	2	1	1	1	90
	I	3	2	0	0	0	0	0	0	0	5
TE	R	12	0	2	1	0	0	0	0	0	15
	S	27	25	9	4	2	2	1	1	1	72
	I	9	1	4	2	0	0	0	0	0	16
C	R	0	1	2	0	0	0	0	0	0	3
	S	48	25	13	7	2	2	0	1	1	99
	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Antibiyotikler; AMP: ampisilin, P: penisilin, CN: gentamisin, SXT: trimetoprim-sulfametoksazol, E: eritromisin, TE: tetrasiklin, C: kloramfenikol; Sonuçlar: R: dirençli, S: duyarlı, I: orta duyarlı

4.3. Biyofilm Sonuçları

Biyofilm oluşumu için mikropate test yöntemi ve Kongo kırmızılı agarda gelişim yöntemleri kullanılmıştır.

4.3.1. Mikroplate yöntemiyle yapılan biyofilm sonuçları

Lactobacillus spp. izolatlarının mikroplate yöntemi ile biyofilm oluşum sonuçları tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumunun tespiti için izolatlar 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda ELISA’da 540 nm’de okutulmuştur. Mikroplak kuyucuklarında biyofilm oluşumları gözlemlenmiştir ve sonuçlar elde edilen sayısal değerlerin ortalaması alınarak kontrol grubu olarak konulan kuyucuklardaki okutulan değerlerin ortalamasından çıkarılmıştır. Bu ortalama değer kontrol grubunun 540 nm’deki değeriyle karşılaştırılmıştır ve kontrol ortalama değer altındaki değer negatif, bu değerin eşiti ve iki katı arasındakiler zayıf biyofilm (+), kontrol değerinin iki katına eşit ve bu değer ile dört katı arasındaki değer orta seviyede biyofilm (++), kontrol değerinin dört katı ve bunun üzerindeki değer kuvvetli (+++) pozitif biyofilm oluşumu olarak kabul edilmiştir.

Peynir ve çiğ süt örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının mikroplate yöntemiyle biyofilm oluşum sonuçlarının değerlendirilmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$OD \leq OD_c$ Negatif

$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ Zayıf

$2 \times OD_c \leq OD < 4 \times OD_c$ Orta

$4 \times OD_c < OD$ Kuvvetli

Mikroplate yöntemiyle yapılan biyofilm deneyinde 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda %1’lik Glikoz içeren NB’deki negatif kontrollerin ortalaması ve standart sapması hesaplanarak OD_c ’ler belirlenmiştir (Stepanovic ve diğerleri, 2007).

Çizelge 4.8. Peynir ve çiğ süttten izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının 540 nm’de ölçülen biyofilm testi sonuçları

		24. saat (Kontrol=0,08)		48. saat (Kontrol=0,072)	
İzolat Kodu	Ürün Çeşidi	OD540 Ortalama-Kontrol Ortalama	Sonuç	OD540 Ortalama-Kontrol Ortalama	Sonuç
P4B	Peynir	0,88	+++	0,964	+++
P20I	Peynir	0,727	+++	0,875	+++
P13I	Peynir	0,989	+++	0,78	+++
P8A	Peynir	0,807	+++	0,935	+++
P5A	Peynir	0,822	+++	0,749	+++
P4O	Peynir	0,039	—	0,099	+
P17G	Peynir	0,757	+++	0,709	+++
P2A	Peynir	1,686	+++	3,709	+++
P13B	Peynir	0,571	+++	0,292	+++
P15A	Peynir	0,789	+++	0,383	+++
P20G	Peynir	0,022	—	0,151	++
P19C	Peynir	0,063	—	0,032	—
P12P	Peynir	0,07	—	0,515	+++
P13H	Peynir	0,38	+++	0,33	+++
P7C	Peynir	0,637	+++	0,888	+++
P20C	Peynir	0,303	++	3,261	+++
P19H	Peynir	0,019	—	0,014	—
P1A	Peynir	0,369	+++	1,546	+++
P17A	Peynir	0,254	++	2,238	+++
P10A	Peynir	0,018	—	1,434	+++
S5A	Çiğ süt	0,149	+	0,647	+++
S1C	Çiğ süt	0,745	+++	0,659	+++
S14A	Çiğ süt	0,071	—	0,079	+
S17F	Çiğ süt	0,345	+++	0,442	+++
S18A	Çiğ süt	0,689	+++	0,579	+++
S4B	Çiğ süt	0,339	+++	0,391	+++
S1A	Çiğ süt	0,049	—	0,128	+
S6C	Çiğ süt	0,223	++	0,092	+
S15I	Çiğ süt	0,017	—	0,024	—
S2B	Çiğ süt	0,026	—	0,064	—
S1F	Çiğ süt	0,966	+++	1,37	+++
S14H	Çiğ süt	1,477	+++	1,164	+++
S17D	Çiğ süt	0,533	+++	0,624	+++

Çizelge 4.8. (devam) Peynir ve çiğ süttten izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının 540 nm’de ölçülen biyofilm testi sonuçları

		24. saat (Kontrol=0,08)		48. saat (Kontrol=0,072)	
İzolat Kodu	Ürün Çeşidi	OD540 Ortalama-Kontrol Ortalama	Sonuç	OD540 Ortalama-Kontrol Ortalama	Sonuç
S18E	Çiğ süt	0,625	+++	0,317	+++
S15A	Çiğ süt	0,025	–	0,053	–
S18H	Çiğ süt	0,654	+++	0,912	+++
S6B	Çiğ süt	0,165	++	0,439	+++
S14B	Çiğ süt	0,847	+++	1,027	+++
S16D	Çiğ süt	0,126	+	0,391	+++

Kuvvetli biyofilm (+++), orta seviyede biyofilm (++), zayıf biyofilm (+) ve negatif biyofilm oluşumu (-).

Peynir ve çiğ süttten izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının %1’lik Glikoz içeren NB’de 24 saatlik inkübasyon sonundaki biyofilm oluşumlarına bakıldığında; toplam 39 izolatın 22’si (%56,4) kuvvetli, 4’ü (%10,3) orta, 2’si (%5,1) zayıf derecede biyofilm pozitif olarak bulunmuştur. İzolatların 11’i (%28,2) ise biyofilm negatif olarak bulunmuştur (Çizelge 4.8).

Peynir ve çiğ süttten izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının %1’lik Glikoz içeren NB’de 48 saatlik inkübasyon sonundaki biyofilm oluşumlarına bakıldığında; toplam 39 izolatın 29’u (%74,4) kuvvetli, 1’i (%2,6) orta, 4’ü (%10,3) zayıf derecede biyofilm pozitif olarak bulunmuştur. İzolatların 5’i (%12,8) ise biyofilm negatif olarak bulunmuştur (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8’de gösterilen peynir ve çiğ süt örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının mikropate yöntemiyle biyofilm oluşum sonuçlarının değerlendirilmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$OD \leq OD_c$ Negatif

$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ Zayıf

$2 \times OD_c \leq OD < 4 \times OD_c$ Orta

$4 \times OD_c < \text{Kuvvetli}$

Çizelge 4.9’daki %1’lik Glikoz içeren NB’de 24 saat inkübasyon sonundaki biyofilm sonuçlarına göre 45 izolatın 28’i (%62,2) kuvvetli, 3’ü (%6,7) orta, 8’i (%17,8) zayıf

derecede biyofilm pozitif olarak bulunmuştur. İzolatların 6'sı (%13,3) ise biyofilm negatif olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.9'daki %1'lik Glikoz içeren NB'de 48 saatlik inkübasyon sonundaki biyofilm sonuçlarına göre 45 izolatın 32'si (%71,1) kuvvetli, 5'i (%11,1) orta, 3'ü (%6,7) zayıf derecede biyofilm pozitif olarak bulunmuştur. İzolatların 5'i (%11,1) ise biyofilm negatif olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.9. Peynir ve çiğ süttten izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının 540 nm'de ölçülen biyofilm testi sonuçları

İzolat Kodu	Ürün Çeşidi	24 saat (Kontrol=0,075)		48. saat (Kontrol=0,082)	
		OD Ortalama-Kontrol Ortalama	Sonuç	OD Ortalama-Kontrol Ortalama	Sonuç
P5D	Peynir	0,681	+++	0,957	+++
P5B	Peynir	0,565	+++	0,627	+++
P12A	Peynir	0,633	+++	0,808	+++
P19B	Peynir	0,582	+++	0,845	+++
P8P	Peynir	2,339	+++	2,304	+++
P18F	Peynir	0,666	+++	0,871	+++
P7A	Peynir	0,221	++	0,656	+++
P17F	Peynir	0,079	+	0,145	+
P13F	Peynir	0,935	+++	1,187	+++
P13E	Peynir	0,723	+++	0,921	+++
P13D	Peynir	1,101	+++	0,63	+++
P13G	Peynir	0,132	+	0,612	+++
P3B	Peynir	0,099	+	0,35	+++
P8B	Peynir	0,421	+++	0,636	+++
P1B	Peynir	0,509	+++	0,534	+++
P20B	Peynir	0,493	+++	0,446	+++
P10D	Peynir	0,437	+++	0,405	+++
P13C	Peynir	0,006	—	0,035	—
P11F	Peynir	0,098	+	0,119	+
P14B	Peynir	0,682	+++	1,017	+++
P12G	Peynir	0,426	+++	0,582	+++

Çizelge 4.9. (devam) Peynir ve çiğ süttten izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının 540 nm’de ölçülen biyofilm testi sonuçları

		24 saat (Kontrol=0,075)		48. saat (Kontrol=0,082)	
İzolat Kodu	Ürün Çeşidi	OD Ortalama-Kontrol Ortalama	Sonuç	OD Ortalama-Kontrol Ortalama	Sonuç
P16B	Peynir	0,634	+++	0,497	+++
P17C	Peynir	0,087	+	0,071	—
P16G	Peynir	0,095	+	0,152	+
P9C	Peynir	0,127	+	0,302	++
P6B	Peynir	0,337	+++	0,522	+++
P19D	Peynir	0,013	—	0,275	++
P19I	Peynir	2,323	+++	1,016	+++
P15B	Peynir	0,728	+++	0,765	+++
S11C	Çiğ süt	0,351	+++	0,293	++
P5B	Peynir	0,411	+++	2,526	+++
P5F	Peynir	0,415	+++	0,519	+++
P11G	Peynir	0,042	—	0,045	—
P17D	Peynir	1,886	+++	0,547	+++
P18A	Peynir	0,25	++	0,343	+++
P16F	Peynir	0,111	+	0,206	++
P3A	Peynir	0,619	+++	1,042	+++
P19J	Peynir	0,012	—	0,067	—
P20F	Peynir	1,124	+++	1,215	+++
P18B	Peynir	0,023	—	0,045	—
S20A	Çiğ süt	0,518	+++	0,421	+++
S7C	Çiğ süt	0,605	+++	0,6	+++
P19G	Peynir	0,24	++	0,712	+++
P8G	Peynir	0,053	—	0,295	++
P8D	Peynir	2,044	+++	0,482	+++

Kuvvetli biyofilm (+++), orta seviyede biyofilm (++), zayıf biyofilm (+) ve negatif biyofilm oluşumu (-).

Çizelge 4.9’de gösterilen peynir ve çiğ süt örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının mikropate yöntemiyle biyofilm oluşum sonuçlarının değerlendirilmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$OD \leq OD_c$ Negatif

$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ Zayıf

$2 \times OD_c \leq OD < 4 \times OD_c$ Orta

$4 \times OD_c < OD$ Kuvvetli

Peynir ve çiğ süttten izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının biyofilm oluşumu ELISA okuyucuda 540 nm’de belirlenirken bu değerler dışında 570 nm, 595 nm’de de ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçüm değerlerine göre elde edilen sonuçlar aynı şekilde hesaplanarak karşılaştırmaları yapılmıştır. Sonuç olarak bu değerlere yakın veriler elde edilmiştir.

Çizelge 4.10’daki %1’lik Glikoz içeren NB’de 24 saatlik inkübasyon sonundaki biyofilm sonuçlarına göre 19 izolatın 15’i (%63,1) kuvvetli, 10’u (%21) orta derecede biyofilm pozitif olarak bulunmuştur. İzolatların 4’ü (%15,8) ise biyofilm negatif olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.10’daki %1’lik Glikoz içeren NB’de 48 saatlik inkübasyon sonundaki biyofilm sonuçlarına göre 19 izolatın 12’si (%63,1) kuvvetli, 4’ü (%21) orta derecede biyofilm pozitif olarak bulunmuştur. İzolatların 3’ü (%15,8) ise biyofilm negatif olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.10’da gösterilen peynir ve çiğ süt örneklerinden izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının mikropate yöntemiyle biyofilm oluşum sonuçlarının değerlendirilmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$OD \leq OD_c$ Negatif

$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ Zayıf

$2 \times OD_c \leq OD < 4 \times OD_c$ Orta

$4 \times OD_c < OD$ Kuvvetli

Çizelge 4.10. Peynir ve çiğ süttten izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının 540 nm’de ölçülen biyofilm testi sonuçları

İzolat Kodu	Ürün Çeşidi	24. saat (Kontrol=0,084)		48. saat (Kontrol=0,074)	
		OD Ortalama-Kontrol Ortalama	Sonuç	OD Ortalama-Kontrol Ortalama	Sonuç
P15E	Peynir	0,337	+++	0,35	+++
P8E	Peynir	0,245	++	0,266	++
P7F	Peynir	1,698	+++	1,847	+++
S13E	Çiğ süt	0,008	—	0,177	++
P12E	Peynir	0,247	++	0,341	+++
P13J	Peynir	0,309	++	0,43	+++
P14D	Peynir	0,397	+++	0,458	+++
P16D	Peynir	0,205	++	0,315	+++
P6D	Peynir	0,304	++	0,413	+++
P9E	Peynir	0,246	++	0,451	+++
S11B	Çiğ süt	0,177	++	0,241	++
P18E	Peynir	0,316	++	0,27	++
P8F	Peynir	0,037	—	0,042	—
P7B	Peynir	0,296	++	0,299	+++
P19E	Peynir	0,393	+++	0,642	+++
S1D	Çiğ süt	0,007	—	0,012	—
P7E	Peynir	0,649	+++	3,505	+++
P20J	Peynir	0,009	—	0,015	—
P17B	Peynir	0,333	++	0,391	+++

Kuvvetli biyofilm (+++), orta seviyede biyofilm (++), zayıf biyofilm (+) ve negatif biyofilm oluşumu (-).

Çalışmamızda gıda örneklerinden toplamda 103 *Lactobacillus* izolatı izole edilmiştir. Mikroplate yöntemiyle yapılan biyofilm testi sonuçlarına göre bu izlatların 90’ı (87,4) biyofilm pozitif, 13’ü (12,6) ise biyofilm negatif sonuç bulunmuştur (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. *Lactobacillus* türlerinin mikropate yöntemiyle biyofilm oluşumlarının dağılımı

<i>Lactobacillus</i> Türleri	Mikroplate yöntemi				Toplam
	Biyofilm pozitif		Biyofilm negatif		
	n	%	n	%	
<i>L. plantarum</i>	46	95,8	2	4,2	48
<i>L. fermentum</i>	20	76,9	6	23	26
<i>L. brevis</i>	13	86,6	2	13,3	15
<i>L. paracasei</i>	7	100	0	0	7
<i>L. zeae</i>	2	100	0	0	2
<i>L. curvatus</i>	1	50	1	50	2
<i>L. coryniformis</i>	1	100	0	0	1
<i>L. paracasei spp. tolerans</i>	0	0	1	100	1
<i>L. amylolyticus</i>	0	0	1	100	1
Toplam	90	87,4	13	12,6	103

n: İzolat sayısı

Araştırma sonuçlarımıza göre mikropate yöntemi ile yapılan biyofilm deneyinde, peynir ve çiğ süt örneklerinden toplamda 103 *Lactobacillus* izolatlarının %87,4'ünün biyofilm ürettiği görülmüştür. İzolatların %12,6'sının ise biyofilm negatif sonuçlanmıştır yani biyofilm oluşturmamıştır.

4.3.2. Kongo kırmızılı agarda slime sonuçları

Kongo Kırmızılı Agar besiyerinde tek koloni ekimi yapılarak inkübasyonu sağlanan *Lactobacillus* izolatlarının besiyerinde oluşturduğu renk değişimi incelenmiştir. Kahverengi ya da siyah renk değişimi gözlenen petrilere slime oluşumu pozitif olarak kabul edilmiştir. Pembemsi ya da kırmızı renkli koloniler negatif slime oluşumu olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.12'de verilen değerlendirme sonuçlarına göre 103 *Lactobacillus* bakterisinin %30'u slime oluşturmuştur. Bunların %70'i ise slime oluşturmamıştır.

Çizelge 4.12. Kongo kırmızılı agarda slime sonuçları

İzolat Kodu	<i>Lactobacillus</i> türleri	CRA sonuçları
P1A	<i>L. brevis</i>	negatif (pembe)
P2A	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P4B	<i>L. plantarum</i>	pozitif (siyah)
P4O	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P5A	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
P7C	<i>L. brevis</i>	negatif (pembe)
P8A	<i>L. plantarum</i>	pozitif (siyah)
P10A	<i>L. curvatus</i>	negatif (pembe)
P12P	<i>L. brevis</i>	negatif (pembe)
P13B	<i>L. fermentum</i>	pozitif (siyah)
P13H	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P13I	<i>L. plantarum</i>	pozitif (siyah)
P15A	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P17A	<i>L. brevis</i>	negatif (pembe)
P17G	<i>L. paracasei</i>	pozitif (siyah)
P19C	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P19H	<i>L. curvatus</i>	negatif (pembe)
P20C	<i>L. brevis</i>	negatif (pembe)
P20G	<i>L. brevis</i>	negatif (pembe)
P20I	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
S1A	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
S1C	<i>L. plantarum</i>	pozitif (siyah)
S1F	<i>L. paracasei</i>	pozitif (kahverengi)
S2B	<i>L. brevis</i>	negatif (pembe)
S4A	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
S5B	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
S6B	<i>L. brevis</i>	negatif (pembe)
S6C	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
S14A	<i>L. coryniformis</i>	negatif (pembe)
S14B	<i>L. paracasei</i>	pozitif (kahverengi)
S14H	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
S15A	<i>L. paracasei ssp. tolerans</i>	negatif (pembe)
S15I	<i>L. amylolyticus</i>	negatif (pembe)
S16D	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
S17D	<i>L. plantarum</i>	pozitif (siyah)
S17F	<i>L. plantarum</i>	pozitif (siyah)
S18A	<i>L. zeae</i>	negatif (pembe)
S18E	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
S18H	<i>L. zeae</i>	negatif (pembe)
P13D	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P13G	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P8P	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P18F	<i>L. paracasei</i>	negatif (pembe)
P19J	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)

Çizelge 4.12. (devam) Kongo kırmızılı agarda slime sonuçları

İzolat Kodu	<i>Lactobacillus</i> türleri	CRA sonuçları
P13J	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P10D	<i>L. brevis</i>	negatif (pembe)
S20A	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P8E	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
P12A	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
P5P	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
P5D	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
P7A	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P7F	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P13F	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P13E	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P16B	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
P17D	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
P17C	<i>L. brevis</i>	negatif (pembe)
P16G	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P5B	<i>L. brevis</i>	negatif (pembe)
P5F	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
P16F	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P8D	<i>L. paracasei</i>	pozitif (kahverengi)
S7C	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P11F	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P11G	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P20B	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
P18A	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
S13E	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
P17F	<i>L. brevis</i>	negatif (pembe)
P12E	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P12G	<i>L. paracasei</i>	pozitif (kahverengi)
P14B	<i>L. fermentum</i>	pozitif (kahverengi)
P19D	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P19I	<i>L. brevis</i>	negatif (pembe)
P18B	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P16D	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P8B	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
P9E	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
P3B	<i>L. paracasei</i>	negatif (pembe)
P13C	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P15E	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P19G	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P8G	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P1B	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
P6B	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P9C	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
S11C	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)

Çizelge 4.12. (devam) Kongo kırmızılı agarda slime sonuçları

İzolot Kodu	<i>Lactobacillus</i> türleri	CRA sonuçları
P15B	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P14D	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P20F	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P6D	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P3A	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P7B	<i>L. brevis</i>	negatif (pembe)
P19B	<i>L. brevis</i>	negatif (pembe)
P20J	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P18E	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P19E	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)
P17B	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
S1D	<i>L. plantarum</i>	negatif (pembe)
P8F	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
P7E	<i>L. fermentum</i>	negatif (pembe)
S11B	<i>L. plantarum</i>	pozitif (kahverengi)

Çizelge 4.13. *Lactobacillus* türlerinin CRA yöntemiyle slime oluşumlarının dağılımı

<i>Lactobacillus</i> Türleri	CRA				Toplam
	Slime pozitif		Slime negatif		
	n	%	n	%	
<i>L. plantarum</i>	24	50	24	50	48
<i>L. fermentum</i>	2	7,8	24	92,3	26
<i>L. brevis</i>	0	0	15	100	15
<i>L. paracasei</i>	5	71,4	2	28,6	7
<i>L. zeae</i>	0	0	2	100	2
<i>L. curvatus</i>	0	0	2	100	2
<i>L. coryniformis</i>	0	0	1	100	1
<i>L. paracasei</i> spp. <i>tolerans</i>	0	0	1	100	1
<i>L. amylolyticus</i>	0	0	1	100	1
Toplam	31	30	72	70	103

CRA: Kongo kırmızılı agar, n: İzolat sayısı

Sonuç olarak 103 *Lactobacillus* izolatının slime oluşturma yetkinliğinin mikrobiyalarda biyofilm oluşturmaya karşılaştırıldığında daha az olduğu görülmüştür. Bu *Lactobacillus* izolatlarının tanımlanması yapılarak belirlenen türlerinden %46,6'sını oluşturan *L. plantarum* bakterilerinin %50'si slime pozitif %50'si slime negatif ; *L. fermentum* türünün 24'ü (%92,3) slime negatif (pembe), 2'si (%7,8) slime pozitif (siyah); *L. brevis* 15'i (%100) slime negatif (pembe) sonuç vermiştir.

5. TARTIŞMA

Laktik asit bakterileri, başta peynir olmak üzere birçok süt ürününün üretimi ve olgunlaşması sırasında aroma geliştirme yetenekleri, bakteriyosin ve ekzopolisakkarit oluşturabilmeleri, bakteriyofaj dirençlilikleri, proteolitik aktiviteleri gibi sahip oldukları bir çok özellikleri nedeni ile peynir endüstrisinde teknolojik öneme sahip mikroorganizmalardır. Çiğ süttten üretilen peynirlerde tat ve aroma ile tekstür gelişimi tamamen doğal laktik floraya bağlıdır (Akoğlu ve diğerleri, 2017).

Bu çalışmada Ankara'da tüketime sunulan çiğ süt ve çeşitli peynir örneklerinden *Lactobacillus* izolatları izole edilerek biyokimyasal testler ve MALDI-TOF MS ile tanımlamaları yapılmıştır. Daha sonra *Lactobacillus* izolatlarının biyofilm ve slime oluşturma yetenekleri ile antibiyotik dirençlilikleri tespit edilmiştir.

MALDI-TOF MS yönteminde, doğrudan koloni alınarak sisteme yüklenmekte ve veri tabanındaki protein sekansı ile karşılaştırılarak tanı yapılmaktadır. Böylece her mikroorganizma için spesifik olan bir çeşit parmak izi oluşturulmakta ve mikroorganizmaların tanımlanması yapılabilmektedir. Özellikle son yıllarda bu yöntem kullanılarak bakteri tanımlamasının yapıldığı çalışmalar artış göstermiştir.

Gıdalardan izole edilen probiyotik bakterilerin en yaygın olanlarını Laktik asit bakterileri (LAB) oluşturmaktadır. Bu grubun içerisinde yer alan *Lactobacillus* cinsi bakteriler de özellikle fermente gıdalarda starter kültür olarak kullanılan ve güvenli (GRAS) bakteriler olarak bilinen probiyotik bakteri türleridir.

Laktik asit bakterileri fermente ya da fermente olmayan gıdalarda hemen hemen her yerde bulunmaktadır ve insan kommensal mikroflorasının ortak bileşenini oluşturur. Probiyotik olarak kullanılan türlerin yeni suşlarının güvenilirliğinin iyi araştırılması gerektiği ve özellikle genetik olarak modifikasyonlarının incelenmesi sağlık açısından önemlidir (Adams, 1999).

Araştırmamızda toplam 40 çiğ süt ve peynir örneğinden 103 *Lactobacillus* spp. izolatı izole edilmiştir. MALDI-TOF MS ile bu izolatların 48'i (%46,6) *L. plantarum*, 26'sı (%25,2) *L. fermentum*, 15'i (%14,6) *L. brevis*, 7'si (%6,8) *L. paracasei*, 2'si (%1,9) *L. zeae*, 2'si

(%1,9) *L. curvatus*, 1'i (%0,9) *L. amylolyticus*, 1'i (%0,9) *L. coryniformis*, 1'i (%0,9) *L. paracasei* spp. *tolerans* olarak tanımlanmıştır.

Peynir ve çiğ süt ürünlerinden izole edilen 103 *Lactobacillus* izolatının çoğunluğunu *L. plantarum* ve *L. fermentum* izolatlarının oluşturduğu bulunmuştur. En fazla *Lactobacillus* izolatının izole edildiği ürün ise peynirdir.

Araştırma sonuçlarımızdan farklı olarak, ülkemizde Tulum peynirleri ile yapılan iki ayrı çalışmada *L. paracasei* en fazla izole edilen tür olmuştur (Sengül ve Çakmakçı, 2003; Gürses ve Erdoğan, 2008).

Daha önce yapılan bir çalışmada çeşitli illerden toplanan 3 adet çiğ süt ve 9 adet peynir örneğinden 63 adet laktik asit bakterisi izole edilmiştir. Gram pozitif olan laktik asit bakterilerinin %43'ünün çubuk şeklinde ve %22'sinin kokobasil şeklinde olduğu belirlenmiştir. İzole edilen bakterilerden bazılarının da *Lactobacillus* cinsinden *L. plantarum* ve *L. paracasei* spp. *paracasei* türleri olduğu belirlenmiştir (Altuntaş ve diğerleri, 2010). Çalışmamızda genellikle izole edilen bakteri izolatları çubuk ve kokobasil şeklindedir. Tanımlamaları yapılan bu izolatların içerisinde cinsinden *L. plantarum* ve *L. paracasei* türleri de bulunmaktadır.

Botes ve diğerleri. (2007), spesifik primerlerle yaptıkları PCR çalışmasında bozadan izole ettikleri *Lactobacillus* türlerini *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. paracasei* spp. *paracasei*, *L. pentosus*, *L. rhamnosus* olarak belirlemişlerdir. Yine yapılan başka bir araştırmaya göre Afyon tulum peynirlerinden elde edilen toplam 44 *Lactobacillus* spp.'den %15,6 gibi yüksek bir oranda *L. paracasei* spp. *paracasei* türü izole edilmiştir (Kara ve Akkaya, 2015). Bizim çalışmamızda ise farklı olarak en yüksek sayıda *L. plantarum* türü izole edilmiştir.

Nicolic ve diğerleri (2008)'nin Sırbistan'da yaptığı bir araştırmada *L. paracasei* subsp. *paracasei* ev yapımı olarak üretilen, ısıl işlem görmüş keçi sütünden üretilen Bukuljac peynirinden en fazla izole edilen tür olmuştur.

Dolchi ve diğerleri (2008)'nin yapmış olduğu çalışmada, peynir örneklerinden genetik identifikasyonları yapılarak izole ettikleri laktik asit bakterilerinden bazıları *L. plantarum*,

L. paracasei, *L. casei*, *L. coryniformis* spp. *torquens* ve *L. delbrueckii* türleridir. *L. plantarum*, *L. paracasei* türleri diğerlerine göre daha fazla sayıda izole edilmiştir. Buna paralel olarak bizim çalışmamızda *L. plantarum* türü daha fazla sayıda izole edilmiştir.

Gheyntanchi ve diğerleri (2010), süt ve peynirden izole ettikleri toplam 41 *Lactobacillus* izolatının *L. curvatus* 1 (%2), *L. plantarum* 7 (%18), *L. fermentum* 1 (%2) ve *L. brevis* 1 (%2) olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca çalışmalarında *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fructosus*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* ve *L. bifementas* türleri de izole edilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda bu türler izole edilmemiştir.

Smetanková ve diğerleri (2014), koyun çiğ sütlerinden yapılmış Slovak peynirlerinden 34 *Lactobacillus* izolatını izole ederek, MALDI-TOF MS ile tanımlamışlar ve izolatların *L. paracasei* ve *L. plantarum* olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlar bizim araştırma sonuçlarımız ile paralellik göstermektedir.

Ertürkmen ve Öner (2015) tarafından yapılan bir çalışmada çiğ süt ve beyaz peynir örneklerinden izole edilerek biyokimyasal yöntemlerle tanımlanan 24 *Lactobacillus* spp. izolatının 7'si *L. plantarum*, 7'si *L. curvatus* ve 10'u ise *L. jensenii* olarak belirlenmiştir.

Türkiye'de yapılan bir başka çalışmada ise 50 adet Mengen peyniri örneğinden toplam 117 adet laktik asit bakterisi izole edilerek biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanmış ve laktik asit bakteri florası %44,5 *Enterococcus* spp., % 29,9 *Lactobacillus* spp., %25,6 *Lactococcus* spp. olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar tanımladıkları *Lactobacillus* izolatlarının tamamının *L. casei* olduğunu belirtmişlerdir (Akoğlu ve diğerleri, 2017).

Nacef ve diğerleri (2017)'i çiğ sütlerden yapılmış Fransız tipi peynirlerde laktik asit bakterilerinin (LAB) izolasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. Araştırmalarında izole ettikleri LAB tanımlanmasında MALDI-TOF MS yöntemini kullanmışlardır. Araştırmacılar *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve *Leuconostoc* olarak belirledikleri LAB bakterileri arasında en fazla *Lactobacillus* cinsine ait türleri izole ettiklerini ve bu türlerin *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. curvatus*, *L. rhamnosus*, *L. fructivorans*, *L. parabuchneri*, *L. brevis* olduğunu belirtmişlerdir.

Kanak ve diğerkleri (2018) Sakarya ilinde yaptıkları çalışmada bazı yöresel peynirlerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerini MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlamışlar ve tanımladıkları izolatlardan 5 tanesini *Enterococcus faecalis*, 4 tanesini *Enterococcus faecium*, 1 tanesini *Lactobacillus paracasei* ve 6 tanesini *Leuconostoc mesenteroides* olarak belirlemişlerdir.

Dünya üzerinde farklı ülke ve költürlere ait çok sayıda peynir çeşidi bulunmaktadır. Ülkemizde ise peynir çeşidi olarak en çok beyaz peynir, kaşar peyniri ve tulum peyniri üretilmektedir. Bunların dışında da sütün elde edildiği hayvan (inek, koyun, keçi vb.), yöresel ve iklimsel farklılıklar ile uygulanan geleneksel ve teknolojik işlemlere bağılı olarak çok fazla yöresel ve bölgesel peynir çeşidi bulunduğı belirtilmektedir. Araştırmamızda peynirlerden izole ederek tanımladığımız *Lactobacillus* türleri ile diğerk çalışmalarda tanımlanan *Lactobacillus* türlerinin farklı olmasının peynirlerin yukarıda belirtilen özelliklerine bağılı olabileceğı düşünölmektedir.

Bunun dışında, laktik flora, peynir üretiminde ve depolanmasında kullanılan tekniklerin ve sürelerin farklı olması, coğrafi konuma özgü mikrofloranın farklılığı gibi birçok etkene bağılı olarak değışiklik göstermektedir.

Bakterilerde antibiyotik direnç genlerinin hızlı bir şekilde artması doğal olarak sağıık problemlerini de beraber getirmektedir. Bu durum da araştırmacıları antibiyotik test çalışmalarına yönlendirmiştir. Probiyotik bakteriler olarak bilinen laktik asit bakterilerinin de antibiyotik direnç genleri taşıdığı bilinmekte olup bu konuda çalışmalar önem arz etmektedir.

Laktik asit bakterileri (LAB), Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından uzun zaman önce GRAS (generally regarded as safe) yani “güvenli olarak kabul edilen” statüsüne alınmışlardır. Bununla birlikte son on yıl içerisinde, gıda ve yem uygulamalarında LAB költürlerinin güvenli kullanımına ilişkin artan bir ilgi söz konusudur. Bunun sebebi, LAB’nin antibiyotik direnç genleri açısından rezervuar olarak rol oynamalarıdır.

LAB’nde doğal ve kazanılmış dirençlilik bilinmektedir. Örneğin, *Lactobacillus Pediococcus*, *Leuconostoc* ve bazı diğerk Gram pozitif bakteriler doğal olarak vankomisine yüksek direnç göstermektedir (Meral ve Korukluoğlu, 2014).

Lactobacillus türlerinin penisilin ve ampisilin gibi pek çok hücre duvarı sentezi inhibitörüne duyarlı oldukları bulunmuştur. Yapılan birçok çalışmada *Lactobacillus* suşlarının vankomisine yüksek derecede dirençli oldukları bulunmuştur ve buna paralel olarak bizim çalışmamızda da *Lactobacillus* izolatlarının vankomisine yüksek sayıda dirençli oldukları belirlenmiştir (Meral ve Korukluoğlu, 2014; Duskova ve Krpiskova , 2013).

Bu tez çalışmasında peynir ve çiğ süttten izole edilen 103 *Lactobacillus* izolatının antibiyotik dirençlilik dağılımlarına göre en fazla izole edilen türlere bakıldığında 41 adet *L. plantarum*, 20 adet *L. fermentum* ve 13 adet *L. brevis*'in ampisilin antibiyotiğine dirençli olduğu bulunmuştur. 31 adet *L. plantarum*, 22 adet *L. fermentum* ve 6 adet *L. brevis*'in penisiline; 48 adet *L. plantarum*, 26 adet *L. fermentum* ve 15 adet *L. brevis*'in gentamisine; 44 adet *L. plantarum*, 19 adet *L. fermentum* ve 14 adet *L. brevis*'in trimetoprim-sulfametoksazole; 43 adet *L. plantarum*, 23 adet *L. fermentum* ve 11 adet *L. brevis*'in eritromisine; 27 adet *L. plantarum*, 25 adet *L. fermentum* ve 9 adet *L. brevis*'in tetrasikline ve 48 adet *L. plantarum*, 25 adet *L. fermentum* ve 13 adet *L. brevis*'in kloramfenikol antibiyotiğine duyarlı oldukları bulunmuştur.

Coppola ve diğerleri (2005), Parmigiano Reggiano (İtalya) tipi peynirlerinden izole edilen 63 *L. rhamnosus* suşunun antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için 41 farklı antibiyotik kullanmışlardır. Disk difüzyon metoduyla antimikrobiyal duyarlılıklarına bakılan izolatların, inhibisyon zonları ölçülmüş ve dirençlilik özellikleri tespit edilmiştir. Tüm izolatların 6 antibiyotiğe (sefiksime, vankomisin, neomisin, enoksasin, perfloksasin ve sülfamethoksazol) direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Florez ve diğerleri (2005), İspanyol geleneksel mavi damarlı Cabrales peynirlerinden izole edilen 146 laktik asit bakteri suşunun mikrodilüsyon ve agar dilüsyon teknikleriyle 12 farklı antibiyotik kullanılarak minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. ve *Lactococcus* spp. suşlarının kloramfenikol, eritromisin, klindamisin ve tetrasiklin antibiyotiklerine dirençli oldukları bulunmuştur.

Erginkaya ve diğerlerinin (2018) yaptıkları çalışmada 50 farklı gıda ürününden 46 *Lactobacillus* izolatı elde etmişler ve *Lactobacillus* spp.'ların vankomisin (%58), eritromisin (%10,8), tetrasiklin (%4,3) ve gentamisine (%28) dirençli oldukları bulunmuştur. Çalışmamızda da elde edilen *Lactobacillus* bakterilerinin vankomisine dirençli olduğu

bulunmuştur. Bununla birlikte antibiyotik dirençlilik testinde izolatların ampisiline (%80,6) karşı oldukça dirençli, ancak tetrasiklin (%68,9), penisilin (%68,0), kloramfenikol (%96,1), gentamisin (%99,0), trimetoprim-sulfametoksazol (%85,4) ve eritromisin'e (%87,4) duyarlı olduğu görülmüştür.

Laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlilik çalışmasında D'Aimmo ve diğerlerinin (2007) süt ve farmosotik ürünlerden izole ettikleri *L. acidophilus*, *L. casei* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türlerinin minimal inhibisyon konsantrasyonları mikrodilasyon yöntemiyle değerlendirildiğinde bütün suşların ampisilin basitrasin klindamisin, dikloksasilin, eritromisin, penisilin, rifampisin ve novobiyosin antibiyotiklerine duyarlı oldukları;

Antibiyotik dirençlilik çalışmalarından birinde yine 9 antibiyotik kullanılarak yapılan Etest'de MIC sonuçlarına göre belirlenen 143 laktik asit bakteri suşunun duyarlı oldukları ya da doğal dirençli olduklarını bildirmişlerdir (Ammor ve diğerleri, 2008). Bu tezde ise antibiyotik dirençlilik deneyi için disk difüzyon testi yapılmıştır, E test yapılmamıştır. Bakteri inhibisyon zon çapları ölçülmüştür ve standart değerler baz alınarak değerlendirilmiştir. Bulgularımızda gıdalardan izole edilen 103 *Lactobacillus* izolatının 85'inin ampisiline dirençli olduğu tespit edilmiştir. Diğer antibiyotiklere ise duyarlı oldukları belirlenmiştir.

Liasi ve diğerlerinin (2009), çalışmasında fermente gıdalardan izole ettikleri *Lactobacillus* cinsine ait üç türe (*L. casei* LA17, *L. plantarum* LA22, *L. paracasei* LA02) disk difüzyon yöntemi ile 18 farklı antibiyotik uygulanarak antibiyotik duyarlılıkları test edilmiştir. Sonuçta streptomisin, kanamisin, neomisin, amikasin, basitrasin gibi antibiyotiklere dirençli oldukları; penisilin G, ampisilin, eritromisin, kloramfenikol, tetrasiklin ve nitrofurantoin antibiyotiklerine duyarlı oldukları bulunmuştur. Aksine araştırmamızda 7 farklı antibiyotik kullanılarak yapılan deneyde bakteri inhibisyon zon sonuçları değerlendirildiğinde *Lactobacillus* izolatlarının ampisiline dirençli olduğu bulunmuştur; penisilin G, eritromisin, kloramfenikol, tetrasiklin antibiyotiklerine ise duyarlı oldukları bulunmuştur ve diğer antibiyotikler çalışmamızda kullanılmamıştır.

Botina ve diğerlerinin (2011) yaptıkları antibiyotik dirençlilik çalışmasında gastrointestinal mikrobiyomdan elde ettikleri 13 *Lactobacillus* suşlarının hiçbirinin çalışılan antibiyotiklere duyarlılık göstermediği bulunmuştur. Fakültatif anaerob bakteriler aerob bakterilere göre

aminoglikozitlere daha dirençlilik gösterdiğinden bu çalışmada da fakültatif anaerop *Lactobacillus* suşları tetrasikline daha dirençli bulunmuştur. *L. plantarum* ise büyük dirençlilik profili çizerek ampisilin, tetrasiklin, klindamisin, linkomisine dirençli olduğu belirlenmiştir.

Duskova ve Karpiskova (2013) yaptıkları antibiyotik çalışmalarında MIC (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) sonuçlarına göre 10 *L. plantarum* izolatlarının %7,8'sinin gentamisin antibiyotiğine dirençli olduklarını bulmuşlardır.

Çalışmalardan birinde yine fermente gıdalardan izole edilen 120 *Lactobacillus* spp. izolatının antibiyotik direnç profilleri araştırılmış ve farklı *Lactobacillus* suşlarında antibiyotik direnç seviyelerinin çeşitliliği incelenmiştir. Burada 54 izolatın kloramfenikole, 16 izolatın da eritromisine dirençli olduğu tespit edilmiştir (Sukmarini ve diğerleri, 2014).

Alp ve Öner (2014) çalışmalarında çiğ süttten yapılmış beyaz peynir ve kaşar peynirinden izole ettikleri 33 *Lactobacillus* izolatının en fazla vankomisin (28) ve siprofloksasin (25) antibiyotiklerine dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada ise *Lactobacillus* izolatlarının en fazla vankomisin ve ampisilin antibiyotiklerine dirençli oldukları belirlenmiştir.

Turhan ve Enginkaya'nın (2016) yaptıkları antibiyotik dirençlilik çalışmasında *Lactobacillus* spp. izolatlarında vankomisin (%20), ampisilin (%20), tetrasiklin (%20), gentamisin (%20) ve siprofloksasin'e (%80) karşı direnç saptanırken; eritromisin, kloramfenikol (%100) ve nitrofurantoin'e (%100) duyarlı oldukları bulunmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada buna benzer olarak *Lactobacillus* spp. izolatlarının ampisilin'e (80.6%), dirençli oldukları saptanmıştır ancak eritromisin (%87,4), gentamisin (%99,0), ve kloramfenikol'e (%96,1), duyarlı oldukları bulunmuştur. Ayrıca araştırmamızda siprofloksasin ve nitrofurantoin antibiyotik çeşitleri kullanılmamıştır.

Kanak ve diğerleri (2018) 15 laktik asit bakterisi suşunun antibiyotik duyarlılığı incelemişlerdir. Bu suşların %40'ı vankomisine ve nitrofurantoin'e, %33'ü gentamisine, %20'si eritromisine ve tetrasikline, %13'ü rifampisine ve kloramfenikole dirençli olarak tespit edilmiştir.

Biyofilm, farklı türden mikroorganizmaların kendilerini çevresel etmenlerden korumak ve hem besin kaynağı sağlamak hem de var olan besin kaynaklarını en verimli biçimde kullanabilmek için oluşturdıkları bir mikro-ekosistem olarak tanımlanabilen biyolojik bir oluşumdur. Biyofilm oluşumu sistemin yapısına, mikroorganizmanın türüne ve çevresel etmenlere bağlıdır.

Peynir gibi süt ürünlerinin kalitesi, çiğ sütün kalitesinden etkilenir. Çiğ sütün kalitesi taşıma, uygun olmayan sıcaklıklarda depolama mikrobiyal kirleticiler, doğal olarak oluşan enzimler, bakteri enzimleri ile bozulabilir. Süt ürünlerinin işlenmesi için kullanılan ekipmanların yüzeyleri mikrobiyal kontaminasyon kaynakları olarak tanınır ve yüzeylerde bulunan biyofilmler bu ürünler için potansiyel bir kontaminasyon kaynağıdır. Non-starter laktik asit bakterilerinin (NSLAB) kontaminasyon kaynağının pastörizasyon kaynaklarından, ekipman yüzeyleriyle veya havadan temas yoluyla olduğu düşünülmektedir (Soomers ve diğerleri, 2001).

Süt ve süt ürünlerinde biyofilm araştırmalarının büyük çoğunluğu gıda kaynaklı patojenler ve biyofilm oluşumu üzerinde olmasına rağmen, NSLAB ve starter laktik asit bakterilerinin slime ve biyofilm oluşturmaları üzerine çok az sayıda çalışma mevcuttur.

Laktik asit bakterileri (LAB) virülans özellik göstermeseler de bazı türleri oluşturdıkları biyofilm yapısıyla sağlık açısından bir risk oluşturabilmektedir. Laktik asit bakterilerinden Enterokokların bazı türleri toplum kaynaklı ve hastane kaynaklı enfeksiyonlar oluşturabilmektedirler. Bir çok patojen bakteride biyofilm oluşumu, quorum sensing (çoğunluk algılama) sistemiyle düzenlenmektedir. Biyofilm oluşturmak üzere biraraya gelen mikroorganizmalar planktonik hücre yapılarından daha kararlı bir yapıya dönüşmekte ve daha yüksek düzeyde direnç göstermektedir (Diani ve diğerleri, 2016).

LAB'larda çoğunluk algılama mekanizması iki bileşenli sistem tarafından düzenlenmektedir. Bu sistem LAB'ların mikroorganizmalarla rekabet etmesinde ve patojen bakterileri engellenmesinde işlev görmektedir. Probiyotik bakteri olan bu bakteriler antibiyotik direnç genlerinin oluşumunu, ürettikleri laktik asit ve asetik asit ile engellemektedirler. Ancak güvenilir bakteriler (GRAS) olarak bilinen *Lactobacillus* bakterileri biyofilm yapısı ile dirençli genlerini patojen bakterilere aktarabilir ve gıdalarda bulunan bu bakteriler sağlık

açısından bir tehdit oluşturabilmektedir. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin de yapılan bazı çalışmalarda biyofilm yapısı oluşturduğu gözlenmiştir.

Araştırmamızda mikropate yöntemiyle yapılan biyofilm testi sonuçlarında peynir ve çiğ süt örneklerinden izole edilen *L. plantarum*'ların 46'sı (95,8), *L. fermentum*'ların 20'si (76,9), *L. brevis*'lerin 13'ü (86,6), *L. paracasei*'lerin 7'si (%100), *L. zae*'lerin 2'si (%100), *L. curvatus*'ların 1'i (%50), *L. coryniformis* 1'i (100) pozitif biyofilm oluşumu göstermiştir.

Araştırmamızda mikropate yöntemiyle yapılan biyofilm testi sonuçlarında peynir ve çiğ süt örneklerinden izole edilen *L. plantarum*'ların 2'si (4,2), *L. fermentum*'ların 6'sı (23), *L. brevis*'lerin 2'si (13,3), *L. curvatus*'ların 1'i (%50), *L. paracasei spp. tolerans* 1'i (100), *L. amylolyticus* 1'i (100), negatif biyofilm oluşturdukları bulunmuştur. Bu çalışmada genel olarak yüksek derece biyofilm oluşumu gözlenmiştir ve daha az sıklıkla slime oluşumu gözlemlenmiştir.

Çalışmalardan birinde *L. curvatus* türünün oluşturduğu biyofilm, kalsiyum laktat kristalleriyle peynir yapısında hasara sebep olduğu belirlenmiştir (Wong, 1998).

Soomers ve diğerleri (2001), peynir üretimi sırasında NSLAB'nin biyofilm oluşturma potansiyelini inceledikleri araştırmalarında, *L. curvatus* ve *L. fermentum* suşlarının biyofilm oluşturabildiklerini göstermişlerdir.

Kubota ve diğerleri (2008), yaptıkları çalışmada *Lactobacillus* suşlarından üçünde *L. plantarum*, *L. brevis* ve *L. fructivorans* türlerinde biyofilm oluşumu ve çevresel strese karşı direnci araştırmışlardır. Yapılan testlerle soğandan izole edilen 43 adet LAB bakterisinin güçlü biyofilm yapısı oluşturdukları ve *L. plantarum* suşunun strese karşı yüksek direnci gösterdiği bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise 103 adet *Lactobacillus* izolatından *L. plantarum* türlerinin 46'sının (%95,8) biyofilm pozitif olduğu bulunmuştur.

Süt işletmesinin çeşitli bölgelerinden alınan biyofilm tabakalarının bir miktar alınıp analiz edilmesi sonucu *Lactobacillus* cinsi bakterilerin izole edildiği görülmüştür. (Ölmez, 2009). Bizim araştırmamızda yapılan deneyler sonucunda biyofilm oluşumu %87,4 oranında pozitif olduğu bulunmuştur.

Muruzovic ve diğ erleri (2018), geleneksel Sırp peynirleri ile yaptıkları bir çalışmada *Lactobacillus* ve *Lactococcus* izolatlarının mikropalak yöntemi ile biyofilm oluşturma yeteneklerini incelemişler ve tüm *L. fermentum* izolatlarının biyofilm oluşturabildiklerini göstermişlerdir.

Kandan izole edilen laktik asit bakteri grubundan 170 adet *Enterococcus* türlerinin mikropalak yöntemiyle yapılan biyofilm deneyinde 27 suşun (%31,8) biyofilm pozitif olduğu sonucuna varılmıştır. Vankomisin duyarlılığı incelendiğinde ise 29 tanesinin (%34,1) dirençli olduğu bulunmuştur ( zk k, 2018).

Yapılan bir diğer araştırmada Goerge ve Halami, (2019) gentamisin dirençli *L. plantarum* bakterilerinin oluşturduğu biyofilmdeki DNA- protein yapısı incelenmiştir ve *L. plantarum* izolatlarının oldukça fenotipik olarak duyarlı oldukları ve biyofilm oluşturma yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir. Araştırmamızda bizim elde ettiğimiz *L. plantarum* izolatlarının yüksek oranda biyofilm oluşumlarının pozitif olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada, gıdalardan izole edilen 103 *Lactobacillus* izolatının Kongo kırmızılı agarda slime oluşumu çalışılmıştır. Sonuçlara bakıldığında *L. plantarum* izolatlarının 24'  (%50), *L. fermentum*' ların 2'si (%7,8), *L. paracasei*'lerin 5'i (%71,4) slime pozitif olarak bulunmuştur.

Bu  alışmada, *L. plantarum*'ların 24'  (%50), *L. fermentum*' ların 24'  (% 92,3), *L. brevis*'lerin 15 (%100), *L. paracasei*'lerin 2'si (%28,6), *L. zae*'lerin 2'si (%100), *L. curvatus*'ların 2'si (%100), *L. coryniformis* 1'i (100), *L. paracasei spp. tolerans* 1'i (100), *L. amyolyticus* 1'i (100) slime negatif olarak bulunmuştur.

Araştırma sonuçlarımıza göre, *Lactobacillus* izolatlarının %30,0'unun slime ve %87,4'ünün biyofilm ürettiği görülmüştür. Antimikrobiyal dirençlilik testinde izolatların ampisiline (%80,6) karşı oldukça dirençli, ancak tetrasiklin (%68,9), penisilin (%68,0), kloramfenikol (%96,1), gentamisine (%99,0), trimetoprim-sulfametoksazol (%85,4) ve eritromisine (%87,4) duyarlı olduğu görülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Geleneksel peynirler tüketici tarafından fazla talep gören peynirlerdir. Ülkemizde üretilen birçok geleneksel peynir vardır. Laktik asit bakterilerinin ürettikleri bileşikler, peynirlerde dokuyu geliştirir ve ürünün hoş duyuşal profiline katkıda bulunurlar.

Bu araştırmada Ankara’da üretilen ve tüketime sunulan çiğ süt ve geleneksel peynirlerden *Lactobacillus*’lar izole edilip, MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanmıştır. Ayrıca izole edilen *Lactobacillus* bakterilerinin antibiyotik dirençlilikleri ile slime ve biyofilm oluşumları incelenmiştir.

MALDI-TOF MS yöntemi ile çiğ süt ve peynirlerden *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. paracasei*, *L. zeae*, *L. curvatus*, *L. amylolyticus*, *L. coryniformis*, ve *L. paracasei* spp. *tolerans* türleri tanımlanmıştır. Araştırmamızda izole ettiğimiz bu türler, peynir üretiminde kültür ya da destek kültür olarak kullanılabilir. Aynı zamanda bu *Lactobacillus* türlerinin özellikle çeşitli peynir tiplerinde starter olmayan mikrofloranın önemli bir kısmını oluşturduğu bilinmektedir.

Araştırmamızda *Lactobacillus* izolatlarının tanımlanmasında kullandığımız MALDI-TOF MS yönteminin büyük oranda doğru sonuç vermesi, analizin kısa sürede gerçekleşmesi ve maliyetinin düşük olması gibi avantajlarından dolayı biyokimyasal testler ile birlikte bakteri türlerinin tanımlanmasında iyi bir seçenek olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda *Lactobacillus* türlerinin bazılarının ampisilin, vankomisin gibi antibiyotiklere dirençli olduğu, penisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, gentamisin, eritromisin, trimetoprim-sulfametoksazol gibi antibiyotiklere de duyarlı oldukları bulunmuştur. Bu sonuçlar, gıda kaynaklı bakterilerin, antibiyotik direnç genlerinin kaynaklarından biri olabileceği kuşkusunu destekler niteliktedir. Bu nedenle gıdalarda bulunan veya starter olarak kullanılan laktik asit bakterileri antibiyotik direnç riskine karşı sürekli denetlenmeli ve antibiyotik kullanımı kontrol altına alınmalıdır.

Bakterilerin bulunduğu yüzeye yapışma ve biyofilm oluşumları çapraz bulaşmayı kolaylaştırır. Eğer ortamda patojen bakteriler varsa, kontamine yiyeceklerin tüketimi halk sağlığı açısından riski oluşturabilir.

Araştırmamızda %87,4 gibi büyük bir oranla *Lactobacillus* izolatlarının mikropate yöntemine göre biyofilm oluşturduğu, %30'u da Kongo kırmızılı agarda slime oluşturduğu tespit edilmiştir.

Gıda kalitesi ve güvenliği için gıdaların hazırlanması, ve ekipman tasarımı gibi koruyucu ve kontrol stratejilerinin doğru uygulanması, fiziksel yöntemlerle birleştirilmiş deterjan ve dezenfektan seçimleriyle gıda ile temas eden yüzeylerde biyofilm oluşumunun kontrol edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Adams, M. R. (1999). Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 68(2-3), 171-178.
- Adetunji, V. O., Adediji, A. O. and Kwaga, J. (2014). Assessment of the contamination potentials of some foodborne bacteria in biofilms for food products. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(1), 232-237.
- Akan, E., Yerlikaya, O. ve Kınık, Ö. (2014). Psikrotrof bakterilerin çiğ süt ve süt ürünleri kalitesine etkisi. *Akademik Gıda*, 12(4), 68-78.
- Akoğlu, A., Yaman, H., Coşkun, H. ve Sarı, K. (2017). Mengen peynirinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler tanımlaması ve bazı starter kültür özelliklerinin belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21(2), 453-459.
- Alp, D. ve Öner, Z. (2014). Bazı laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlilikleri ve aroma maddeleri oluşturma özelliklerinin belirlenmesi. *GIDA*, 39(6), 331-337.
- Altuntaş E. G., Ayhan K., Okçu G., Erkanlı K., Balcı M. H., Sonakın Ş. S. (2010). Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel aktiviteleri. *GIDA*, 35(3), 197-203.
- Ammor, M. S., Flórez, A. B., Van Hoek, A. H., Clara, G., Aarts, H. J., Margolles, A. and Mayo, B. (2008). Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14(1-3), 6-15.
- Ataol, Ö. (2011). *Gıda örneklerinden izole edilen Staphylococcus'larda Biyofilm Oluşumu ve Antibiyotik Dirençliliğinin araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Aydın, M. (1997). *Anaeroplara*. Adana: Özak Matbaası, 10, 83-85.
- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S. and Gueguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the Lactobacillus genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), 278-285.
- Bevilacqua A. , Corbo M. R. , Sinigaglia M. (2017). *The microbiological quality of food* (First Edition). Italy: Woodhead Publishing. 259-282.
- Botes, A., Todorov, S. D., Von Mollendorff, J. W., Botha, A. and Dicks, L. M.T. (2007). Identification of lactic acid bacteria and yeast from boza. *Process Biochemistry*, 42(2), 267-270.
- Botina, S. G. , Poluektova, E. U. , Glazova, A. A., Zakharevich, N. V. , Koroban, N. V., Zinchenko, V. V., Babykin, M. M. , Zhilenkova, O. G., Amerkhanova, A. M. and Danilenko, V. N. (2011). Antibiotic resistance of potential probiotic bacteria of the genus Lactobacillus from human gastrointestinal microbiome. *Microbiology*, 80(2), 164-171.

- CLSI. (2017). *Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing* (27th ed. CLSI supplement M100). Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standarts Institute.
- Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G. and Sorrentino, E. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*, 85(3), 193-204.
- Çelik, H., Durak, Y. ve Uysal, A. (2016). Bazı ticari ve ev yapımı yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 42(2), 149-160.
- Çetinkaya, E. ve Ayhan, K. (2012). Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2(1), 53-62.
- Çon, A. H. ve Gökarp, H. Y. (2000). Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri. *Türk Mikrobiyol Cem Dergisi*, 30, 180-190.
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey F. A. and Shleifer, K. H. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Second Edition). USA: Springer, 3, 464-532.
- Demir, E., Kılıç, B. A. ve Uşan, E. (2018). Farklı gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç profilleri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(2), 197-204.
- Demirel, Y. N. ve Gürler, Z. (2016). Hayvansal gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç profilleri. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 9(4), 372-378.
- Diani, M., Ariaifar, M. N. ve Akçelik, N. (2016). İnsan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturan enterokokal biyofilm yapısının doğası. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 73(1), 71-80.
- Dinçer, E., Kıvanç, M. ve Karaca, H. (2009). Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri ve bakteriyosinler. *GIDA*, 20(3).
- Dolchi, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Rolle, L., Zeppa, G. and Cocolin, L. (2008). Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with a focus on lactic acid bacteria ecology. *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), 302-311.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881.
- Durlu-Özkaya F. (2001). *Salamura beyaz peynirden izole edilen bazı Laktokok, Enterokok ve Laktobasil suşlarının proteolitik aktivite, bakteriyosin etkenliği ve biyojen amin oluşumu açısından karşılaştırılması*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Duřková, M. and Karpíšková, R. (2013). Antimicrobial resistance of lactobacilli isolated from food. *Czech Journal of Food Sciences*, 31(1), 27-32.

- Erginkaya, Z., Turhan, E. U. and Tatlı, D. (2018). Determination of antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from traditional Turkish fermented dairy products. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 19(1), 53-56.
- Ertürkmen, P. ve Öner, Z. (2015). Beyaz peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin başlatıcı (starter) kültür özelliklerinin biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesi. *Journal of Natural and Applied Sciences*, 19(3), 9-16.
- Florez, A. B., Delgado, S. and Mayo, B. (2005). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(1), 51-58.
- Ghannoum, M. and O'Toole, G. A. (2004). *Microbial biofilms*. USA: American Society for Microbiology Press, 379-396.
- Gevers, D., Huys, G., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., Debever, J. and Swings, J. (2000). Isolation and identification of tetracycline resistance lactic acid bacteria from pre-packed sliced meat products. *Systematic and Applied Microbiology*, 23, 279-284.
- Gheytanchi, E., Heshmati, F., Shargh, B. K., Nowroozl, J. and Movahedzadeh, F. (2010). Study on β -galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. *African Journal of Microbiology Research*, 4(6), 454-458.
- Goerge, J. and Halami, P. M. (2019). Presence of extracellular DNA & protein in biofilm formation by gentamicin-resistance *Lactobacillus plantarum*. *Indian Journal of Medical Research*, 149(2), 257-262.
- Gurses, M. and Erdogan, A. (2006). Identification of lactic acid bacteria isolated from Tulum cheese during ripening period. *International Journal of Food Properties*, 9(3), 551-557.
- Gün, İ. and Ekinci, Y. F. (2009). Biyofilmler: Yüzeylerdeki mikrobiyal yaşamlar. *GIDA*, 34(3), 165-173.
- Gündoğan, N. and Ataol, Ö. (2012). Et örneklerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif *Stafilokok*'ların biyofilm üretimi ve DNaz aktivitelerinin belirlenmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(3), 135-142.
- Gündüz, S. (2012). *Çiğ süttten izole edilen Bacillus'ların adlandırılması ve biyofilm varlığının araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Harrigan, W. F. (1998). *Laboratory methods in food microbiology* (Third Edition). USA: Academic Press, 391-478.
- Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H. and Franz, C. M. A. P. (2007). Antibiotic resistance of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied Enviroment. Microbiology*, 73, 730-739.
- İnternet: 10. Kütle spektrometresi sistemlerine giriş ve uygulamalı kütle spektrometresi analizleri (Maldi-Tof-Ms) *Ankara Üniversitesi açık ders malzemeleri*. URL:

<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/images/maldi-mechanism.gif>, Son Erişim Tarihi: 06.05.2019.

- İset, ř. (2016). *Çeşitli gıda örneklerinden izole edilen salmonella ve listeria monocytogenes suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin araştırılması ve elektron mikroskopik tekniklerle değerlendirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Jenkinson, H. F. and Lappin-Scott, H. M. (2000). Biofilms adhere to stay. *Trends in Microbiology*, 9(1), 9-10.
- Kanak, E. K. , Yılmaz, S. Ö. ve Mumcuoğlu İ. (2018). Sakarya’da geleneksel olarak üretilen bazı yöresel peynirlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin MALDI-TOF MS Yöntemi ile tanımlanması ve antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22(3), 1055-1062.
- Kara, R. ve Akkaya, L. (2015). Afyon tulum peynirinin mikrobiyolojik ve fiziko-kimyasal özellikleri ile laktik asit bakteri dağılımlarının belirlenmesi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 15(1), 1-6.
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H. and Uchiyama, H. (2008). Biofilm formation by Lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(4), 381-386.
- Liasi, S. A., Azmi, T. I., Hassan, M. D., Shuhaim,i M., Rosfarizan, M. and Ariff, A. B. (2009). Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, Budu. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(1), 33-37.
- Mah, T. F. C. and O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1), 34-39.
- Meral, H. ve Korukluoğlu, M. (2014). Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Kazanımları. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2), 71-82.
- Muruzovic, M. Z., Mladenovic, K. G., Zugic-Petrovic, T. D. and Comic, L. R. (2018). Characterization of lactic acid bacteria isolated from traditionally made Serbian Cheese and evaluation of their antagonistic potential against Enterobcateriaceae. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42, 4.
- Nacef, M., Chevalier, M., Chollet, S., Drider, D. and Flahaut, C. (2017). MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 2-8.
- Nikolic, M., Terzic-Vidojevic, A., Jovcic, B., Begovic, J., Golic, N. and Topisirovic, L. (2008). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2), 162-170.
- O'Toole, G. A. and Ghannoum, M. (2004). Microbial biofilms. *American Society for Microbiology, Washington, USA*. 20, 43-44.

- Oguntoyinbo, F. A. and Narbad, A. (2015). Multifunctional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from fermented cereal foods. *Journal of Functional Foods*, 17, 621–631.
- Orhan, E. (2013). *Sütten izole edilen Laktik bakteriler ve Streptokokların enzim aktiviteleri*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Özden A. (2008). Diğer Fermente Süt Ürünleri (biyoyoğurt-probiyotik yoğurt). Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, *Güncel Gastroenteroloji* 12(3), 169-181.
- Salminen S., Wright A. and Ouwehand A. (2004). *Lactic acid bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. (Third Edition). New York: Marcel Dekker, 1-66.
- Salveti, E., Torriani, S. and Felis, G. E. (2012). The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4), 217-226.
- Schleifer, K. H. and Ludwig, W. (1995). Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Systematic and Applied Microbiology*, 18(4), 461-467.
- Sengül, M. and Cakmakci, S. (2003). Characterization of natural isolates of lactic acid bacteria from Erzincan (Savak) Tulum cheese. *Milchwissenschaft*, 58(9-10), 510-513.
- Shousha, A., Awaiwanont, N., Sofka, D., Smulders, F. J., Paulsen, P., Szostak, M. P., and Hilbert, F. (2015). Bacteriophages isolated from chicken meat and the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes. *Applied Environment Microbiology*, 81(14), 4600-4606.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. and Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 791.
- Smetanková, J., Hladikova, Z., Zimanova, M., Greif, G. and Greifova, M. (2016). *Lactobacilli* isolated from lump sheep's cheeses and their antimicrobial properties. *Czech Journal of Food Sciences*, 32(2), 152-157.
- Somers, E. B., Johnson, M. E. and Wong, A. C. L. (2001). Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *Journal of Dairy Science*, 84(9), 1926-1936.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I. and Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891-899.
- Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36(1), 1-29.
- Sukmarini, L., Mustopa, A. Z., Normawati, M. and Muzdalifah, I. (2014). Identification of antibiotic-resistance genes from lactic acid bacteria in Indonesian fermented foods. *Journal of Biosciences*, 21(3), 144-150.

- Şimşek, N. ve Bulut, E. T. (2012). Biyofilm ve endodonti: Bölüm 1. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2, 1-5.
- Temiz, A. (2000). *Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri*. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi, 291.
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G. and Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Microbiology*, 81, 1-10.
- Teuber, M., Meile, L. and Schwarz, F. (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Swiss Federal Institute of Technology*, 76(1-4), 115-37.
- Topal, M., Şenel, G. U., Topal, A. E. I. ve Öbek, E. (2015). Antibiyotikler ve kullanım alanları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 31(3), 121-127.
- Turhan, E. Ü. ve Enginkaya, Z. (2016). Probiyotik gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 22(7), 620-624.
- Uçar, F., Tamer, A. Ü., Yaşa, İ. ve Koçyiğit, A. (2008). *Prokaryotik Çeşitlilik: Ders Kitabı*. İzmir: Güven Kitapevi, 246-259.
- Uraz, G. ve Gündoğan, N. (1998). Beyaz peynirlerin mezofil mikroflorasında Koliform, Streptokok, Laktobasil, Leukonostok, Pediokok, Stafilokok ve Basillusların bulunma sıklıkları. *Gıda*, 23, 391-401.
- Watnick, P. and Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *Journal of bacteriology*, 182(10), 2675-2679.
- Wong, A. C. L. (1998). Biofilms in food processing environments. *Journal of Dairy Science*, 81(10), 2765-2770.
- Wood, B.J.B. , Warner, P. J. (2003). *Genetics of lactic acid bacteria*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 3, 143-188.
- Yangılar F. (2015). Probiyotik mikroorganizmaların biyokoruyucu özelliği. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, 20, 1.
- Yazdani, R., Oshaghi, M., Havayi, A., Pishva, E., Salehi, R., Sadeghizadeh, M. and Forooresh, H. (2006). Detection of icaAD gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections. *Iranian Journal of Public Health*, 35(2), 25-28.
- Yerlikaya, O. (2018). Ege ve Marmara Bölgesi'nde üretilen ve tüketime sunulan beyaz peynirlerin bazı mikrobiyolojik özelliklerinin incelenmesi üzerine bir araştırma. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 55(4), 499-505.
- Yılmaz-Yıldıran, H., Karahan, A. G. ve Başıyigit-Kılıç, G. (2015). Laktik asit bakterilerinde çoğunluğu algılama mekanizması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72(1), 79-90.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : AKÇAY, Derya
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 23.12.1987, Çankaya
 Medeni hali : Bekar
 E-mail : akcy.derya@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji	Devam Ediyor
Lisans	Bilecik Şeyh Edebali Üni/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2014
Lise	Etimesgut Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012	Gazi Üniversitesi	Staj

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Akçay, D. and Gündoğan, N. (2019). *3rd International Symposium on Innovative Approaches in Scientific Studies*. Slime and Biofilm Formation and Antibiotic Resistance of *Lactobacillus* spp. Isolates Isolated From Raw Milk and Cheese Samples ISAS, Ankara, 4(1), 634-639.

Hobiler

Seyahat etmek, Kitap okumak



GAZİ GELECEKTİR..