

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



AĞRI YÖRESİNDEKİ BAZI YOĞURT ÖRNEKLERİNDE ÇEŞİTLİ
BAKTERİLERİNİN
İZOLASYON VE KARAKTERİZASYONU

Abdullah DEMİRCİ

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Yrd. Doç. Dr. Furkan ORHAN

AĞRI-2017

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.

AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

ABDULLAH DEMİRCİ

**AĞRI YÖRESİNDEKİ BAZI YOĞURT ÖRNEKLERİNDE
ÇEŞİTLİ BAKTERİLERİNİN
İZOLASYON VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ

Yrd. Doç. Dr. Furkan ORHAN

AĞRI-2017

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “**AĞRI YÖRESİNDEKİ BAZI YOĞURT ÖRNEKLERİNDE ÇEŞİTLİ BAKTERİLERİNİN İZOLASYON VE KARAKTERİZASYONU**” adlı tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezimin kâğıt ve elektronik kopyalarının Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullarda saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

☐ Tezimin 1(bir) yıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir.

14.03.2017

ABDULLAH DEMİRCİ

(140801062)



T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

Ağrı Yöresi Yoğurt Örneklerinden Çeşitli Bakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Yrd. Doç. Dr. Furkan ORHAN danışmanlığında, Abdullah DEMİRCİ tarafından hazırlanan bu çalışma, 14/03/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyokimya Anabilim Dalı Kimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği / oy-çekluğu (4./0) ile kabul edilmiştir.

Başkan. Doç. Dr. Arzu GORMEZ

İmza

Uye Yrd. Doç. Dr. Furkan ORHAN

İmza

Uye Yrd. Doç. Dr. EFE

İmza

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 4/201 Ştarih ve /9 . / /F.-:-Q+. nolu kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. İbrahim N
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AĞRI YÖRESİNDEKİ BAZI YOĞURT ÖRNEKLERİNDE ÇEŞİTLİ BAKTERİLERİNİN

İZOLASYON VE KARAKTERİZASYONU

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Furkan ORHAN

2017, 91 sayfa

Jüri: Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

Yrd. Doç. Dr. Furkan ORHAN

Yrd. Doç. Dr. Derya EFE

Bu çalışmada, Ağrı ilinde bazı yöresel yoğurt örneklerindeki çeşitli bakterinin izolasyonu, kültüre alınması ve tanımlanması yapılmıştır. Ağrı ilini temsil edecek şekilde 5 farklı köyden 11 numune alınmış ve bu örneklerden 28 izolat elde edilmiştir. 28 izolatın ilk olarak morfolojik testleri (gram, hareketlilik ve morfoloji), fizyolojik testleri (tuz, pH ve sıcaklık), biyokimyasal testleri (oksidaz, katalaz, arjinin, eskulin kullanma ve glukozdan gaz üretimi) ve antibiyotiğe direnç testleri (neomisin ve tetrasiklin) yapılmıştır. Moleküler testler kapsamında 28 izolatın DNA izolasyonu ve 16S rDNA gen bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. 24 izolatın sekans verileri alınmış ve sekans verisi alınamayan 4 izolat ise VİTEK yöntemiyle çalışılmış fakat VİTEK yöntemiyle karakterize edilmiştir. LAB'lerin NCBI'daki nükleotit blastlama verilerine göre % 99 ile 89 benzerlik oranları tespit edilmiştir. %99 benzerlik tespit edilen izolatlardan 4 tanesi *Sphingonomas sp.* ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus paracasei* türlerinin her birinden birer izolat %99 benzerlik göstermiştir.

Anahtar sözcükler: LAB, yöresel yoğurt, 16S rDNA, izolasyon, identifikasyon, fizyolojik testler, morfolojik testler, biyokimyasal testler, antibiyotik direnç testleri

ABSTRACT

Master

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF VARIOUS BACTERIA IN SOME REGIONAL YOGHURT SAMPLES IN AĞRI

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Furkan ORHAN

2017, pages: 91

Jury: Assoc. Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

Assist. Prof. Furkan ORHAN

Assist. Prof. Derya EFE

In this study, various Bacteria of some local yoghurt samples in Ağrı province have been isolated and cultured and characterized. In order to represent the Ağrı province, 11 yoghurt samples were taken from 5 different villages and 28 isolates were obtained from these yoghurt samples. In the first step, morphological tests (Gram, mobility and morphology), the physiological tests (salt, pH and temperature tolerances), biochemical tests (oxidase, catalase, utilization of arginine and esculine, gas production from glucose) and antibiotic susceptibility (neomycin and tetracycline) of these 28 isolates have been performed. Within the molecular tests scope, DNA extraction and pcr amplification of 16S rDNA region of these 28 isolates have been performed. Among these 28 isolates, the 16S rDNA sequence of 24 isolates has been obtained and the rest 4 isolates have been characterised with WITEK 2 method, yet, no identification data was obtained. According to nucleotide blast data obtained from NCBI, the similarity of the isolates ranged between 99 and 89 %. 99% similarities were obtained from 4 isolates of *Sphingonomas sp* and each of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus paracasei* strains.

Keywords: LAB, local yogurt, 16S rDNA, isolation, identification, physiological tests, morphological tests, biochemical tests, antibiotic resistance tests

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca, benden bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, çalışmalarımın tamamlanabilmesi için bütün imkânları sağlayan ve bana her zaman her türlü desteği sunan çok değerli danışman hocam Sayın **Yrd. Doç. Dr. Furkan ORHAN**'a en içten duygularıyla müteşekkirim. Ayrıca üniversitemizin Eczacılık Fakültesinde Öğr. Üyesi Sayın **Yrd. Doç. Dr. Selçuk ÇEKER** hocama teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın tüm süreçlerinde her türlü destekleriyle beni hiç yalnız bırakmayan aileme ve verdikleri moral motivasyondan dolayı uzman çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

ABDULLAH DEMİRCİ

Mart 2017

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

>	Büyüktür
≤	Küçük veya Eşittir
≥	Büyük veya Eşittir
α	Alfa
μ	Mikro
AD	Abdullah DEMİRCİ, bakteri kodu
API	Programlanmış ara yüz uygulaması
ATP	Adenin trifosfat
b	baz
CO ₂	Karbondioksit
°C	santigrat derece
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
dk	Dakika
Dr	Doktor
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EPS	Ekstraselüler polisakkarit
GLS	Glikosfingolipit
Gr	Gram pozitif, negatif
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₂ S	Hidrojen sülfür
IDF	Uluslararası Sütçülük Federasyonu
kob/g	<i>bir gramma</i> kolini oluşturabilen birim
Kg	kilogram
L	Litre

Lb	<i>Lactobacillus</i>
Lc	<i>Lactococcus</i>
Leu	Leuconostoc
LAB	Laktik asit bakterileri
mm	milimetre
mg	miligram
M.Ö.	Milattan önce
M.S.	Milattan sonra
nm	Nanometre
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbon
PFGE	Pulse field jel elektroforezi
PTYG	Peptone triptone yeast extract glukoz
PYGV	Peptone yeast extract glucose vitamin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RPLP	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm
S	saniye
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBE	Trise base EDTA
TS	Türk Standartları
TSB	Tryptic soye broht
TSA	Tryptic soye agar

ŞEKİL VE ÇİZELGELER DİZİNİ

Şekil:2.1 <i>Staphylococcus epidermis</i> 'in asit üretimi.....	20
Şekil:3.1 Ağrı il ve ilçeleri haritası.....	22
Şekil 4.2 Farklı pH'larda gelişim	34
Şekil:4.3 Eskulin analizinde AD1 (+) ve AD5 (-)'in karşılaştırılması	39
Şekil:4.4 Glikozdan gaz üretimi	39
Şekil:4.5 <i>Sphingomonas spp</i> bakterilerinin sınıflandırılması (1990)	44
Şekil:5.1 Gen bölgeleri	53
Çizelge:2.1 LAB'ler tarafından fermente edilen yiyecek ve içecekler	10
Çizelge:3.1 16s PCR için mix oranları	28
Çizelge:4.1 İzolatların morfolojik test sonuçları	33
Çizelge:4.2 İzolatların fizyolojik test sonuçları	36
Çizelge :4.3 İzolatların biyokimyasal test sonuçları	38
Çizelge:4.4 İzolatların antibiyotik direnç test sonuçları	41
Çizelge:4.5 İzolatların 16S rDNA BLAST sonuçları	43
Çizelge:4.6 Vitek biyokimyasal test sonuçları (15 izolat)	47-51

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	iv
ŞEKİL ve ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1. Laktik Asit Bakterileri ve Genel Özellikleri	4
2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması.....	4
2.3. Laktik Asit Bakterileri Cinsleri	7
2.3.1. <i>Lactobacillus</i> spp.....	7
2.3.2. <i>Lactococcus</i> spp.	7
2.4. Laktik Asit bakterilerinin Oluşturduğu Metabolitler.....	8
2.5. LAB'nin Bazı Fermente Gıdalardaki Kullanımı	9
2.5.1. Yoğurt Üretimi	11
2.5.2. Peynir üretimi	12
2.5.3. Kefir Üretimi	13
2.5.4. Et ve Et Ürünleri Üretimi	14
2.5.5. Sebze ve Sebze Ürünleri Üretimi	14
2.6. LAB'nin Sağlık Açısından Önemi	14
2.7. Geleneksel Fermente Süt Ürünlerinde Muhtemel Patojen Mikroorganizmalar ..	16
2.7.1. <i>Sphingonomas</i> spp.	16
2.7.2. <i>Staphylococcus</i> spp.....	19
2.7.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
2.7.4. <i>Cyanobacterium</i>	21
3. MATERYAL VE METOD	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1 Kullanılan malzemeler.....	24
3.2. Metod.....	26
3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu	26
3.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin stoğa alınması	26

3.2.3. Laktik Asit Bakterilerine uygulanan testler	26
3.2.4. Genomik DNA izolasyonu ve PCR	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	33
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması	33
4.2. Laktik Asit Bakterilerine uygulanan testler.....	34
4.2.1. Morfolojik testler.....	34
4.2.2. Fizyolojik testler.....	34
4.2.3. Biyokimyasal Testler.....	39
4.2.4. Antibiyotiğe Direnç Testleri	40
4.3. İzolatlardan genomik DNA İzolasyonu ve 16S rDNA Pcr'ı	44
4.4. Vitek Test Sonuçları(BioMerieux Vitek 2 sistemleri versiyon 06.01).....	47
5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ	79

1.GİRİŞ

İnsanoğlu geçmişten bu güne bulduğu yiyecekleri daha uzun süre saklamak ve sağlıklı bir şekilde muhafaza etmek için deneme yanılma yoluyla pek çok yöntem geliştirmiştir. Ürünlerin zamanla farklı ürünlere dönüştüğünü fark etmesiyle ‘geleneksel fermente gıdalar tarihi’ başlamıştır. Kurutmadan sonra en eski gıda muhafaza metodu olan fermentasyon zaman içerisinde süt ürünleri haricinde et, meyve ve sebze gibi gıda ürünlerinde de kullanılmaya başlanmıştır. Fermentasyon sadece muhafaza tekniği değil, gıdalarda aynı zamanda farklı tat, yapı ve aroma da sağlayan bir işlemdir. Bu işlem medeniyetin başlangıcı ile popülerlik kazanmış ve insanoğlu zamanla fermente gıda ve içeceklerin besleyici ve iyileştirici değerini fark etmiştir. Bu durum ise fermente gıdaları her geçen gün daha da önemli hale getirmiştir. Fermentasyon metotları yöresel farklılıklarla kuşaktan kuşağa aktarılmıştır (Farnworth 2008).

Yoğurt, krema, kefir, tereyağı ve çeşitli peynir türleri fermentasyon yöntemiye üretilen önemli süt ürünleridir. Gelişen teknoloji ile geleneksel fermentasyon tesadüfi olmaktan çıkarılmış ve bu olayın laktik asit bakterileri, bazı küf ve mayalar tarafından gerçekleştirildiği bulunmuştur. Bu gelişmelerden sonra üretilen ürünlerde belli bir standart sağlamak ve durumu kontrol altında tutmak için starter kültürler kullanılmaya başlanmıştır. Üzerinde en çok çalışma yapılan ve ilk fermente ürün olduğu düşünülen yoğurtta starter kültür olarak *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* türleri kullanılmıştır. Bu bakteriler 28-32°C’de sütteki laktozdan laktik asit üreterek sütün asiditesini yükseltmekte, ekzopolisakkarit üreterek viskoz yapı oluşturmakta ve böylece asitlikle pıhtılaşma gerçekleştirerek tipik yoğurt aromasını ortaya çıkarmaktadır. Bu olay protokooperasyon olarak adlandırılır (Serra *et al.* 2009). Bir gram taze yoğurtta 10^8 kob ile 10^9 kob *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* bulunmaktadır. *Lactobacillus*’lar; proteinleri aminoasit ve dipeptidlere dönüştürmeye, *Streptococcus*’lar ise pH’yı düşürmeye yardımcı olurlar (Petti *et al.* 2001).

Yoğurdun starter suşlarının başında *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ile *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* gelmektedir. Yapılan çalışmalarda bu iki türün tanımlanmasının ve ayırt edilmesinin oldukça güç olduğu, *Lactobacillus delbrueckii* ve onun diğer iki alt türünün (*bulgaricus* ve *lactis*) %80’den fazla oranda DNA benzerliği taşıdığı ve bu iki alt türün fermente süt ürünlerinde sıklıkla bulunduğu bildirilmiştir.

Birçok kaynağa göre fermente süt ürünlerinin tarihsel gelişimine ait en eski bulgular, Balkanlar'dan elde edilmiştir. Balkanlar'da sütten, ekşimiş süt üretilerek; bu ürün “prokish” olarak adlandırılmıştır (Rasic *et al.* 1978).

Bazı kaynaklara göre ise yoğurt ilk defa 8.yüzyılda Asya'da Türkler tarafından yapılmış ve “yogurut” olarak adlandırılmıştır. Yine 11.yüzyılda daha uzun süre muhafaza etmek amacıyla kurutulmuş ve “kurut” olarak adlandırılmıştır. Türk lkelerinde yoğurdun 1000 yıl önce işlendiğine dair “Kutadgu Bilig” ve “Divanı Lugat-ı Türk” gibi bazı eserlerde bilgiler vardır (Tamime and Robinson 1988).

Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF,1983) fermente sütü; tam yağlı, yağlı, yarım yağlı, az yağlı, yağsız süt, konsantre süt ve süt tozu ile kuru maddesi artırılmış, homojenize edilmiş veya edilmemiş halde bulunabilen; sütün pastörizasyon veya sterilizasyon işleminden sonra soğutularak özel laktik asit bakterilerini içeren tek veya karışım haldeki starter kültürlerle fermente edildiği, inkübasyon işlemi sonrasında da soğumaya bırakıldığı bir ürün olarak tanımlamıştır.

Türk standartlarına göre de yoğurt (TS 1330); “TS 1018 ve/veya TS 1019 standartlarına uygun, tercihen homojenize edilmiş sütlerin *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*’ un laktik asit fermantasyonu sonucunda elde edilen ve yoğurt kültürlerini canlı olarak ihtiva eden fermente bir süt ürünüdür” şeklinde tanımlanmıştır (Giraffa *et al.* 2003).

Günümüzün önemli fermente süt ürünlerinden olan yoğurt Avrupa, Kuzey Amerika ve Orta Doğu lkelerinde yoğun olarak üretilmektedir (Pourahmad and Assadi 2007).

Bu alışmada Ağrı ilini temsil edecek şekilde Ağrı İli'nin farklı bölgelerinden toplanan bazı yöresel yoğurt ürünlerinde bulunan bazı bakteriler izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin morfolojik testleri (gram, hareketlilik, morfoloji), fizyolojik testleri (tuz, pH ve sıcaklık), biyokimyasal testleri (oksidaz, katalaz, arjinin, eskulin, glikozdan gaz üretimi) ve antibiyotiğe direnç testleri (neomisin ve tetrasiklin) gerçekleştirilmiştir. 16S rDNA bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltılarak sekans analizi yapılmıştır. Sekans analizi sonucunda elde edilen baz dizilimi NCBI veri tabanına blastlanarak bakteri izolatlarının tanıları gerçekleştirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1.Laktik Asit Bakterileri ve Genel Özellikleri

Laktik asit bakterileri (LAB), ilk olarak XX. yüzyılın başında Rus bilim adamı Eli Metchnikoff tarafından keşfedilmiştir. Daha sonra, Metchnikoff'un yoğurt üzerine yaptığı araştırmalar, bu bilim insanına 1908 yılında Nobel ödülünü kazandırmıştır. Bundan sonra LAB'leri ile ilgili çalışmalar artarak devam etmiş ve günümüze kadar pek çok çalışma yapılmıştır (Tamime *et al.* 1980).

Laktik asit bakterileri genel olarak gram-pozitif, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen (*Sporolactobacillus* hariç) katalaz-negatif ve sitokromdan yoksun, karbonhidrat fermantasyonuyla son ürün olarak laktik asit üreten bakterilerdir. Morfolojik olarak kısa veya uzun çubuk (*Lactobacillus*) ya da yuvarlak veya eliptik (*Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus*) şekillidirler. Bazı kaynaklar göre su ve toprakta hiç rastlanılmayan bu bakterilere cins ve türe göre değişmek üzere süt ve süt ürünlerinde, bitki ve bitki artıklarında, insan, hayvan ve diğer canlıların bağırsak sistemlerinde rastlanılmıştır (Yüksekdağ ve Beyatlı 2009).

2.2.Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması

Geleneksel olarak LAB'nin sınıflandırılmasında fenotipik ve genotipik özellikler göz önüne alınmaktadır. Fenotipik özellikler olarak bakterilerin morfolojisi, büyüme sıcaklıkları, glikoz fermantasyon biçimleri, çeşitli karbonhidatların fermantasyonu, laktik asit konfigürasyonu, bütün hücre yada hücre duvarındaki proteinlerin şekli dikkate alınır. Fakat bu metodlardan; net sonuçlar alınamaması ve az tekrarlanabilirliği gibi sebeplerden dolayı kesin bir ayırım yapılmadığına kanaat getirilmiş, farklı arayışlar içine girilmiştir (Mohanıa *et al.* 2008).

LAB karbonhidrat fermantasyonunda açığa çıkan son ürüne göre homofermantatif ve heterofermantatif olarak iki gruba ayrılır. Homofermantatif laktik asit bakterileri glukozu; fruktozdifosfat yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucunda %95–100 oranında laktik asit üretirler. Heterofermantatif laktik asit bakterileri ise glukozu; heksosmonofosfat yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucunda % 50 laktik asit üretirken, ayrıca yüksek oranda etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve fruktoz oluştururlar (Trias *et al.* 2008).

Bakteri izolatlarının tanı ve karakterizasyonu için konvensiyonel ve moleküler teknikler kullanılmaktadır (Özkan 2009). Konvensiyonel teknikler; bakteri izolatlarının

tanılanmasında geleneksel olarak kullanılan, morfolojik (hücre şekli, boyutu, koloni rengi ve tipi), fizyolojik (farklı sıcaklık ve pH'lardaki gelişim) ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesini içeren, fenotipik özelliklere dayalı yöntemlerdir (Madrid 2001; Adıgüzel 2006; Kıran 2006; Mosivand 2009). Bununla birlikte konvensiyonel yöntemlerin uzun süreli deneylere, fazla iş gücüne, yetişmiş araştırmacılara ihtiyaç duyması, ekonomik olmaması ve alınan sonuçların yoruma açık olması gibi birçok dezavantajı bulunmaktadır. Bundan dolayı, bakterilerin sadece bu özelliklerine göre sınıflandırılmaları, farklı bakteri grupları arasındaki evrimsel ilişkiyi tespit etmede ve özellikle de tür ve tür altı taksonomik grupları belirlemede yetersiz kalmaktadır. Konvensiyonel tekniklerin, bu dezavantajlarından yola çıkılarak bakterilerin tanımlanmasında moleküler teknikler geliştirilmiştir (Adıgüzel 2006; Adıgüzel 2009; Gırı 2009; Khiyami 2012).

Moleküler teknikler; özellikle PCR temelli olup mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın şekilde kullanılmaktadır. PCR yönteminin değişik formatları geliştirilerek hedef olan genomik DNA'nın yanı sıra, genomik RNA, 16S, 23S rDNA, mRNA molekülleri de kullanılmakta ve bakterilerin tür ve tür altı düzeyde tanımlamaları yapılmaktadır (Adıgüzel 2011; Durmaz 2012; Khiyami 2012). Özellikle son zamanlarda, 16S rDNA geninin *Escherichia coli*'ye klonlanması ve sekanslanması ile bakterilerin tanımlanması esas, ribozomal gen veritabanındaki sekans bilgilerinin benzerliğine dayanmaktadır. Bu yöntem özellikle klinik mikrobiyoloji ve mikrobiyal ekoloji alanlarında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Külekçi 2012).

Kontrollü şartlar altında oligonükleotid primerleri kullanılarak özel olarak hedeflenmiş DNA/RNA parçalarının seçici çoğaltılmasını sağlayan polimeraz zincir reaksiyonu (PZT) çeşitli düzeylerde ayırım gücüne sahip bir metoddur (Temmerman *et al.* 2008).

LAB'nin sınıflandırılmasında kullanılan moleküler tiplendirme yöntemlerinden bazıları; Restriksiyon fragment polimorfizmi (RFLP), Pulse field jel elektroforezi (PFGE), Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) ve Real-time PCR'dır (Mohanıa *et al.* 2008).

Bunların dışında genel olarak biyokimyasal testlerden oluşan; hazır API 50 CH, LRA Zym ve API AZM gibi enzimatik kitlere dayanan moleküler yöntemlerle fermente süt ürünlerimde LAB'lerini tanımlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Coeuret *et al.* 2003).

2.3.Laktik Asit Bakterileri Cinsleri

2.3.1. *Lactobacillus spp.*

Lactobacillus cinsi bakteriler spor oluşturmayan, Gram pozitif, hareketsiz, ince uzun çoğunlukla çubuk şeklinde görünen bakterilerdir. Glukozu karbon kaynağı olarak kullanan bu bakterilerin homofermentatif (% 85'ten fazla laktik asit üretir) ve heterofermentatif (laktik asit yanında karbondioksit, etanol ve asetik asit üretirler) olanları vardır. Bu bakterilerin sitrat metabolizması sonucu oluşturduğu asetat, etanol, asetaldehit, alkoller, diasetil ve karbonil bileşikler fermente süt ürünlerinden olan yoğurt ve peynirin tat, aroma ve yapısal özelliklerinin gelişimine katkı sağlamaktadır. Bu bakteriler sütte D (-) laktik asit oluşturma yeteneğine sahiptirler (Rea and Cogan 2003).

Lactobacillus cinsi bakteriler birçok ortamda görülmekle birlikte özellikle sindirim sisteminin doğal mikroflorasında bulunur. Üretilen laktik asit ortamın pH'sını düşürdüğü için asidik yerde gelişemeyen mikroorganizmalar için antimikrobiyal etkiye sahiptir (Coppala *et al.* 2005).

2.3.2. *Lactococcus spp.*

Lactococcus cinsi bakteriler; Gram pozitif, oval, mikraerofil ve homofermentatif olup 10°C'de gelişebilirken 45°C 'nin üzerinde gelişme gösteremeyen bakterilerdir. Glukozdan laktik asit L (+) üretirler. Süt teknolojisinde *Lactococcus lactis* starter kültür olarak kullanılmaktadır. Bu türün *Lactococcus lactis subsp.lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* ve *Lactococcus lactis subsp. diaseiylactis* olarak 3 alt türü vardır (Stiles and Holzapfel 1997; Sezer ve Güven 2009). *Lactococcus lactis subsp. diaseiylactis* türü yüksek miktarda diasetil üretimiyle, *Lactococcus lactis subsp. lactis* türü de arjininden amonyak üretebilmesiyle diğer türlerden ayrılır (Yörük ve Güner 2011).

2.4.Laktik Asit bakterilerinin Oluşturduğu Metabolitler

Fermente gıda üretim teknolojisinde son yıllarda yapay koruyucuların yerine biyoteknolojik yöntemlere yönelim artmıştır. Bunun için hem fermantasyonu sağlayan hem de zararlı bazı patojenik bakteriler üzerinde ürettikleri maddelerle antimikrobiyal etkiye sahip LAB tercih edilmektedir. LAB'nin karbonhidrat fermantasyonu sonucunda laktik asit, diasetil ve asetaldehit, hidrojen sülfür (H₂S), hidrojen peroksit (H₂O₂), reuterin ve bakteriyosin son ürün olarak çıkmaktadır (Evren vd 2006; Avşaroğlu vd 2008).

Bakteriyosinler ribozom tarafından sentezlenerek salgılanan küçük, ısıya dayanıklı peptit yada protein yapısındaki antimikrobiyal metabolik ürünlerdir (Yılmaz ve Yıldırım 2000; Kaya ve Gökalp 2005; Galvez vd 2007). Bu maddeyi üreten LAB yapılan çalışmalarda patojen olan *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* ve *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi birçok bakteri üzerine antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmüştür (Franz 1997; Dündar 2006).

LAB tarafından üretilen laktik asit fermente ve salamura gıdalarda mikroorganizma gelişimini engellemesine rağmen küf ve mayalar için etkin değildir. Laktik asit disosiyel olmadan hücreye girdiğinde orada disosiyel olur ve pH'nın düşmesiyle asitlik yükselir. Bu da proton motive gücünü azaltır ve elektrokimyasal dengeyi bozar. Ancak laktik asit çözünmezse bir inhibisyon etki meydana getirmez (Çon ve Gökalp 2002a).

LAB olan *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinsleri tarafından aerobik şartlar altında üretilen hidrojen peroksit (H_2O_2) güçlü oksitleyici özelliğinden dolayı antimikrobiyal özelliğe sahiptir. Fakat bu etkiyi ortamın sıcaklık, pH, iyon yükü ve muamele süresi etkiler (Çon ve Gökalp 2002b). H_2O_2 özellikle mikroorganizma DNA replikasyonunu engelleyerek kırılmalara sebep olur (Kılıç 2008).

Süt ürünlerinin karakteristik tat ve aroması, ağırlıklı olarak mezofilik ve termofilik starter bakteriler tarafından sentezlenen laktik, asetik, formik asit, bütirik, piruvik, oksalik ve süksinik asit gibi uçucu ya da uçucu olmayan organik asitler ile asetaldehit, diasetil, aseton gibi karbonil bileşiklerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, birçok laktik asit bakterisi aminoasitlerden aroma bileşenleri sentezleme yeteneğine sahiptir. Örneğin, *Lactococcus lactis* spp. *lactic*, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ve *Lactobacillus casei* metiyoninden metanetiyol, dimetilsülfid ve dimetiltrisülfid oluşturma yeteneğine sahiptir (Tamime and Robinson 2007).

Fermente süt ürünü yoğurtta belirgin tadı ve aromayı veren asetaldehid üretimini *Lactobacillus bulgaricus* tarafından ortam pH'sı 5'e ulaştığında başlar ve fermentasyon tamamlandığında asetaldehid miktarı 40 mg/kg seviyesine kadar yükselir (Tunail 2009).

Fermente süt ürünlerinde kullanılan LAB'nin birçoğunun ortam şartları uygun olduğunda EPS ürettiği bilinmektedir. Özellikle starter kültür olarak kullanılan *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* türleri yoğurtta ürettikleri EPS ile vizkoziteyi

artırıcı, yapıyı düzenleyici, su bağlayıcı, stabilize ve emülsüfiye edici özellikleri kazandırmaktadır (Milci ve Yaygın 2005; Gürsoy vd 2010).

Yapının gevşek olması ve yoğurdun sulanması gibi yoğurt üretimi sırasında çok karşılaşılan problemler tüketici ve üretici için istenmeyen durumlardır. Üreticiler bu sorunu fermente ürünlere dışardan stabilizatör, emülgatör ve kıvam artırıcı gibi kimyasal maddeler ilave ederek çözmeye çalışmışlardır. Ancak LAB'nin EPS üretimi keşfedildikten sonra doğal yollardan sorunlar halledilmeye başlanmıştır (Duboc and Mollet 2001; Hassan *et al.* 2003).

Günümüzde LAB'leri fermente süt ürünlerinin, etlerin ve sebzelerin fermantasyonunda önemli görev üstlenen, faydalı, güvenilir ve ürün kalitesini artıran mikroorganizmalar olarak kabul edilmektedirler (Dinçer vd 2010).

2.5. LAB'nin Bazı Fermente Gıdalardaki Kullanımı

Fermentasyon, gıdaları uzun süre saklamak için kullanılan yöntemlerin en eskilerinden biri olup, binlerce yıl öncesine kadar gitmektedir. İlk defa 8000 yıl önce Irak'ta peynir yapımı gerçekleştirilmiştir. M.Ö. 4000-2000 yıllarında Mısır ve Sümerlerde alkol fermantasyonu sonucu şarap üretilmiştir. Yine Mısır'da hamur fermantasyonu ile ekmek yapılmıştır. Bu geçen zaman içerisinde gıda ve içeceklerin muhafazası ve fermantasyon işleminde mikroorganizmaların rolü keşfedilememiştir. M.S.1500 yıllarında yoğurt ve lahana turşusu üretilmiş, ancak 1861'de Louis Pasteur'ün pastörizasyonu keşfinden sonra mikroorganizmaların fermantasyondan sorumlu olabileceği düşünülmüştür (Ross *et al.* 2002).

Fermentasyon, mikroorganizmaların keşfinden önce gizemli bir işlem iken mikroorganizmaların keşfi ile karakterize edilen kültürün kullanımı yaygınlaşmıştır. Daha sonra farklı fermantasyon şartları sağlanarak değişik starter kültürlerle çeşitli gıdaların üretimi sağlanmıştır (Hansen 2002).

Çeşitli fermente edilmiş ürünlerde LAB'nin kullanım alanları **Çizelge:2.1**'de özetlenmiştir (Ross *et al.* 2002).

Besin	Mikroorganizma	Fermente Ürün
Süt	<i>Streptococcus thermophilus</i> ve <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Yoğurt
Süt	<i>Lactococci</i> , <i>Lactobacillus kefir</i>	Kefir
Süt	<i>Lactococcus (cremoris, lactis)</i> , <i>Leuconostoc</i>	Cheddar peyniri
Süt	<i>Lactobacillus (delbrueckii, bulgaricus, helveticus)</i>	İsviçre peyniri
Sığır ve Tavuk eti	<i>Pediococci</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i>	Fermente etler
Buğday, Çavdar	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Ekmek
Sebzeler	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	Sebzeler

Çizelge:2.1 LAB tarafından fermente edilen yiyecek ve içecekler

2.5.1. Yoğurt Üretimi

Ülkemizde ve dünyanın çeşitleri yerlerinde üretilen fermente gıdaların çoğunun üretimi farklı olabilmekte ve bazıları üretildikleri yöreye göre farklı isimlerle bilinmektedir. Laktik asit bakterileri söz konusu fermente ürünlerin kalitesini ve niteliğini belirlemede en önemli faktörlerden biri olarak rol oynamaktadır (Erginkaya ve Hayaloğlu 2001).

Fermente süt ürünlerinden en önemlisi olan yoğurdun oluşmasını LAB'nden *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ve *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* sağlamaktadır. Bu yoğurt bakterilerinin ayırt edilmesinin oldukça güç olduğu, *Lactobacillus delbrueckii* ve onun diğer iki alt türünün (*bulgaricus* ve *lactis*) %80' den fazla oranda DNA benzerliğinin bulunduğu bildirilmiştir. Fermantasyon sırasında ürünün pH değeri düşer ve sütteki laktoz laktik asite dönüşür. pH5.3'e ulaştığında kazein miselleri stabilize olarak geri dönüşümsüz bir şekilde homojenize hale gelen jel yoğurdu oluşturur. (Giraffa *et al.* 2003).

Lerov ve Vuyst yaptıkları bir çalışmada fermente gıdaların üretiminde ham materyalin hızlı asidifikasyonunun başlangıcının LAB'nin starter kültür olarak kullanımına bağlı olduğunu ve yakın geçmişte LAB'nden yeni starter kültürlerinin geliştirildiğini belirtmişlerdir. Gıda güvenliği açısından da bu bakterilerinin besinsel özellik ve sağlık

açısından avantaj sağlayacak nitelikte olması gerektiğini; bunun yanında antimikrobiyal maddeler, şeker polimerleri, tatlandırıcılar, aromatik bileşikler, vitaminler ya da enzimler gibi faydalı probiyotik özelliklerede genetik olarak sahip olmaları gerektiğini bildirmişlerdir (Leroy and Vuyst 2004).

Yine başka bir çalışmada bütün dünyada tüketimi hızla yayılan yoğurdun sağlıklı bir gıda olarak kabul edilen, popüler fermente bir süt ürünü olduğu, önemli miktarda dengeli beslenmeyi sağladığı, vücut için gerekli olan kalsiyumun önemli bir miktarını karşıladığı belirtilmiştir. Temel besin maddelerinden bir kısmını karşılaşmasının yanında, laktoz toleransını geliştirdiği, vücut ağırlığını dengelediği ve içerdiği probiyotik bakteriler ile sağlığa çeşitli katkılarının bulunduğu bildirilmiştir (McKinley 2005).

2.5.2. Peynir üretimi

Dünyada yaklaşık olarak 2000 kadar peynir çeşidinin bulunduğu, ülkemizde ise bu sayının 50'ye yakın olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında en fazla salamura beyaz peynir, kaşar peyniri, tulum peyniri ve mihaliç peyniri üretilmektedir (Ateş ve Patır 2001).

Peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılan ya da birçok peynir çeşidinin starter olmayan mikroflorasında dominant mikroorganizmalar olarak bulunabilen homofermantatif ve heterofermantatif LAB birçok peynir çeşidinin olgunlaşmasında önemli rol oynamaktadır (Yiğit vd 2009).

Peynir üretiminde starter kültür olarak en çok kullanılan bakteri türleri *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subs. *diacetilactis* ve *Streptococcus thermophilus*'tur. Homofermantatif karakterde bu bakteriler, glukoz fermentasyonu sonucu, laktik asit üretmektedirler (Erginkaya ve Hayaloğlu 2001).

Peynir lezzeti üzerine etkili bileşiklerin önemli bir bölümü starter bakterilerin etkileriyle oluşmaktadır. Starter bakterilerin erken lizisi, hücre içi enzimlerin substratlara daha kolay ulaşmasını sağlamakta ve bu durum peynir lezzetinin gelişimini hızlandırabilmektedir (Dinçer vd 2010).

Tulum peyniri, sütün mayalanması sonucu oluşan pıhtının usulüne göre işlenmesi ve tulumlara ya da plastik bidonlara basılıp belli bir süre olgunlaştırılması ile elde edilmektedir. Ticari ya da deneysel olarak üretilen tulum peynirlerinin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Yapılan birçok çalışmada tulum peynirinin

olgunlaşmasında rol alan ve karakteristik tat oluşumunda etkili olan *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ve *Lactococcus lactis* türlerinin olgunlaşmada etkili olduğu bulunmuştur (Ateş ve Patır 2001).

2.5.3. Kefir Üretimi

Araştırmacılar, kefirin anavatanının Kafkas Dağları olduğunu bildirmişlerdir. Kefirin Kafkasya'da Elburus Dağları eteklerinde yapıldığı ve yapımının gizli tutulduğu; Rusya'da yayınlanan 'Kefyr' kitabının 1984 yılında Moritz Schulz tarafından Almanca'ya çevrilmesi ile Avrupa'da tanındığı bildirilmiştir (Kwak *et al.* 1996).

Kwak ve arkadaşlarına göre, kefir taneleri laktobasil (*Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus bulgaricus* ve *Lactobacillus helveticus* spp. *Jugurti*), laktokok (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* spp. *Cremoris*), lökonostok (*Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides* ve *Leuconostoc kefir*) ve *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus filant*, *Streptococcus durans* yaygın olarak bulundurmıştır. Kefir tanelerindeki mayaları ise *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Torula kefir* ve *Saccharomyces kefir* gibi laktozu fermente eden mayalar ve *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis* gibi laktozu fermente edemeyen mayalar olarak bildirmişlerdir (Kwak *et al.* 1996).

Kefir yapımı sırasında laktik asit fermantasyonuna ve alkol fermantasyonuna bağlı olarak laktozdan uçucu olmayan asitler ve bazı uçucu maddelerin yanı sıra alkol ve karbondioksit meydana gelmektedir. Kefirin yapısında bulunan laktik asit, oksalik asit ve α -ketoglutarik asit kefire ekşimsi ve ferahlatıcı bir tat vermektedir. Kefirin tipik aromasında ise uçucu yağ asitleri, alkoller ve karbonil bileşikler rol oynamaktadır (Erginkaya ve Hayaloğlu 2001).

Geleneksel yöntemlerde kefir taneleri oda sıcaklığında yaklaşık olarak 24 saat fermantasyondan sonra süzgeçten geçirilerek elde edilir. Birinci fermantasyondan sonra süt tüketilebilir ya da süspansiyon içindeki hücreler tarafından fermente edilerek pastörize sütün aşılınması için kullanılabilir. Bu yöntemle grup halinde kefir üretmek mümkündür. Sanayi

retimi için seçilen başlangıç kültürleri farklı türler arasında bir dengeye ulaşmak için kullanılmaktadır. Bu süreçte fermentasyon işlemi LAB fermentasyonu (laktik asit biyosentezi) ve mayaların fermentasyonu (etanol üretimi) olarak iki faza bölündüğü zaman daha fazla tekrarlanabilir ve kontrol edilebilir (Yüksekdağ ve Beyatlı 2003).

2.5.4. Et ve Et rnleri retimi

Fermente sucuklarda baskın flora laktik asit bakterileridir. Bunlarda en fazla *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake* ve *Lactobacillus curvatus* türleri bulunmaktadır (zdemir 1999; Kaban 2007). Bu mikroorganizmalar oluşturdukları metabolitler ile sucuğa has özelliklerin kazandırılmasında etkindirler. Sucukta laktik asit bakterileri karbonhidratları indirgeyerek aroma oluşumuna katkı sağlar. Bu bakteriler pH düşürücü etkisiyle (>5.3) rnn daha çabuk kurumasını, nitrit parçalanması ile renk oluşumunu hızlandırır. Fazla şeker ilave edilmesi durumunda aşırı asitlik meydana getiren homofementatif laktik asit bakterilerinin gelişimi yavaşlarken, heterofermentatif laktik asit bakterileri ortama hakim olur. Bu da aşırı gaz oluşumuna neden olarak sucukta gözenekli yapı oluşturabilmektedir (Alperden 1993).

2.5.5. Sebze ve Sebze rnleri retimi

Turşularda en baskın mikroorganizma *Lactobacillus plantarum*'dur. Turşu yapımında salamura konsantrasyonu bu mikroorganizmaya göre ayarlanmaktadır. Turşu retiminde kontrollü bir fermentasyon sağlanabilmesi için *Lactobacillus plantarum*'un starter kültür olarak kullanılması gerekmektedir. Böylece daha fazla miktarda ve yüksek konsantrasyonda laktik asit eldesi söz konusudur. Kullanılan *Lactobacillus plantarum* başlıca etmen olmasa da hıyar turşusunda şişme meydana getirilmesine neden olabilir. Bu duruma *Lactobacillus plantarum*'un malik asidi de-karboksile ederek CO₂ oluşturmasıyla meydana gelebileceği belirtilmiştir (Aktan vd 1999).

2.6.LAB'nin Sağlık Açısından nemi

Laktik asit bakterileri gıdaların bozulmasına neden olan mikroorganizmalar ile patojen mikroorganizmalar üzerinde sentezledikleri organik asitler, hidrojen peroksit, laktoperoksidaz, diasetil ve bakteriyosinler aracılığı ile antagonistik etki yaratmaktadır. Bu nedenle, bu mikroorganizmalar kullanılarak üretilen gıdalar, insan sağlığı açısından 'güvenli gıdalar' olarak, bu tip bakteriler de 'güvenli bakteriler' olarak tanımlanmaktadır (Klein et al. 1998).

Fermantasyon, gıdalarda patojenik flora ve bozulma meydana gelmesini önlemede koruyucu etkiye sahiptir. Ayrıca diasetil, asetaldehit gibi istenen aromatik bileşenlerin miktarı kaliteyi etkilemekte, vitaminler, antioksidanlar, biyoaktif peptitlerin oluşumu da tüketici sağlığını pozitif yönde etkilemektedir (Turantaş 1999).

Bu bakteriler, patojenlere karşı bağırsak sisteminde kolonize olabilmektedirler. Yoğurt mikroorganizmalarının yarışıl aktivitesi ve üründeki antimikrobiyal maddelerin varlığı bu bakterilere ait ürünlerin gastrointestinal ve ürogenital hastalıklara neden olan enfeksiyonlara karşı koruyucu etki göstermesini sağlamaktadır. Ayrıca yoğurdun, diş plaklarının oluşumuna neden olan mikroorganizmaların gelişmesine engel olduğu yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır (Petti *et al.* 2001).

Yoğurtta bulunan *Lactococcus lactis ssp. lactis* gibi LAB'nin kolesterol düşürücü olduğu, üretilen laktik asit ve yoğurdun sahip olduğu diğer antibakteriyel maddelerin kalın bağırsakta indol ve skatol gibi fenolik bileşikler üreterek canlı dokuya zarar veren ve hatta kanser başlangıcına neden olan bakterileri engellediği, bağışıklık sistemini güçlendirdiği, kadınlarda hamilelik süresince ve sonrasında kan basıncını düzenleyici etkisi olduğu bildirilmiştir (Canan vd 2004).

LAB'nin gastrointestinal sistemde canlılıklarını sürdürebilme kabiliyetleri bu mikroorganizmaların düşük pH ve/veya safra tuzları ile geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilme özelliğiyle alakalıdır. Taksonomik değerlendirilmelerinde kullanılan önemli fizyolojik özellikleri; karbonhidratları fermantasyon biçimleri, farklı tuz konsantrasyonlarına direnç, farklı besin ortamlarında ve sıcaklıklarda gelişebilme özelliği ve antibiyotiklere direnç olarak sıralanabilmektedir (Gürsoy ve Kınık 2005).

LAB'nin çoğu insan, hayvan, bitki gibi doğal ortamlarda bulunan, bu ortamlardan izole edilebilen, biyoteknolojik çalışmalarda ve endüstriyel birçok alanda kullanılan, insan beslenme ve sağlığında oldukça önemli bir konuma sahip mikrobiyal ajanlardır. Et, süt, balık, tahıl ve sebze gibi çoğu ham gıda maddelerinin fermantasyonla korunmasında, üretilen fermente gıda ve yemlerin organoleptik, reolojik ve besinsel değerine katkıda bulunmada aktif rol üstlenmektedirler (Furet *et al.* 2004; Leroy and Vuyst 2004; Kılıç 2008).

2.7. Geleneksel Fermente Süt Ürünlerinde Muhtemel Patojen Mikroorganizmalar

2.7.1. *Sphingomonas spp.*

Bu tür ilk defa 1990 yılında G (-), çubuk, spor oluşturmeyen, hareketsiz, kemoheterotrofik ve mutlak aerobik, katalaz, eskulin ve jelatin hidrolizasyonuna pozitif sonuç veren bakteriler olarak tanımlanmıştır. Daha sonra ekolojik, fizyolojik ve filogenetik özelliklerinin çok farklı olduğu anlaşılan *Sphingopyxis Sphingosinella*, *Novosphingobium* ve *Sphingomonas*'lar olarak 4 ana alt grupta toplanmıştır (Takeuchi *et al.* 2001). *Sphingomonas* türü yaygın bir şekilde *Sphingonoma*d olarak da adlandırılır. *Sphingomonas*'ın morfolojisi; sarı veya beyaz olurken diğerleri sarı veya kahverengi pigmentli koloniler üretirler. *Sphingomonas*, *Sphingopyxis* ve *Sphingosinella*'nın bazı alt türleri nitrat redüktaz pozitif (+) sonuç verirken, *Novosphingobium* türü negatif (-) sonuç verir. Hücre yapısındaki büyük 2-OH yağ asidi en fazla ve karmaşık olan *Sphingopyxis* iken *Sphingobium* ve *Novosphingobium*'ın yağ asidi bileşimi birbirine benzer. Büyük poliamin bileşiği homojen olan sadece *Sphingomonas* türüdür. 16S rDNA gen sekansında işaretli bölge olarak *Sphingobium* ve *Novosphingobium* birbirine benzerken diğer ikisi de birbirine benzer. Genel olarak hücre yapılarında glikosfingolipit yerine lipopolisakkarit vardır. Metabolik açıdan çok yönlüdürler (Balkwill *et al.* 2006).

Sphingomonas'lar genel olarak bitki kök sistemlerinden, farklı toprak ve su habitatlarından, klinik örneklerden ve birçok kaynaktan izole edilebilir. Genel besiyerinde (TSB, TSA, NA, PTYG ve PYGV) gelişebilmelerine rağmen bazı türler için özel besiyeri hazırlanır. Örneğin insanlarda enfeksiyona sebep olan türler için Brain-Heart İnfusiyon Medium (BHI) kullanılır. Japon'ya ve Alaska'da yapılan bir çalışmada *Sphingomonas alaskensis* için filtrelenmiş deniz suyu ve yok etme dilüent metodu kullanılmıştır. En iyi gelişme sıcaklığı 30 °C olan bu tür mezofilken psikrofilik olanları da vardır. Fakat termofil olarak izole edilen örnek yoktur. Zorunlu aerob olup fakültatif olanları yoktur. Deniz ve tuzlu sulardan izole edilenler için tuzun gerekli olup olmadığı bilinmemektedir. İdentifikasyon için hızlı hazır kit tekniği yoktur. Hücre yapısında bulunan glikosfingolipit'nin (GSL) olup olmamasına bakarak klasik yöntemlerle tanımlama yapılır. Son geliştirilen RNA/DNA sekans analizi gibi moleküler yöntemler en iyi tanımlama yöntemleridir (Balkwill *et al.* 2006).

Fizyolojik olarak arabinoz, fukoz, galaktoz, laktoz, mannoz, melibioz, sukroz, ksiloz ve terhalozu asimile edebilir. Birçok türü mono-, di- ve polisakkariti indirger. Bazıları

oksijenli şartlar altında arsenatı arsenite dönüştürür. Birçok kimyasal bileşik (tolüen, xylene, cresol, abietic ve palustric asit vb.) bazı türleri tarafından metabolize edilebilir.

Ekstraselüler biyopolimer olarak ekzopolisakkarit (EPS) üretirler. Bu madde türden türe değişmekle birlikte hidrofobik özelliğe sahiptir. Bu yüzden hidrofobik antibiyotiklere karşı savunmasızdırlar.

EPS, ksantan gamdan (yağışkan bir madde, zamlık) 5.5 kat daha büyüktür. % 0.05'lik NaCl varlığında ve pH 2.0-10 arasında stabildir. Otoklava dayanıklıdır. Ksantan gamdan 4 kat daha sağlam olup hücreyi dış kontaminasyona karşı korur. Ayrıca bu türler polisakkaritlerin polimerizasyonunu da gerçekleştiren enzimler üretebilirler (Balkwill *et al.* 2006).

Ekolojik olarak birçok kaynaktan izole edilen bu bakterilerin bulunduğu ortamda karbon ve diğer besin döngüsünde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Özellikle denizlerdeki fitoplankton popülasyonu üzerine dominant etkisi vardır (Balkwill *et al.* 2006).

Genelde kontamine olmuş veya kirli alanlardan izole edilen *Sphingomonas*'ların, yapılan bazı çalışmalarda kontaminasyonlu ortamlardaki istenmeyen maddeleri parçalayarak büyüme ve enerji kaynağı olarak kullandığı belirlenmiştir (Balkwill *et al.* 2006).

Sphingomonas'ın 1977'de *Pseudomonas paucimobilis* (son tanımlama *Sphingomonas paucimobilis*) patojen olarak tanımlanan türü; hastanelerdeki sıvı solüsyonlar, nemlendiriciler, solunum tedavi aletleri, su, hava, su şişeleri ve sıcaklık problemlerinden izole edilmiştir. Bunun dışında kan kültürü, vajinal sıvısı, idrar, balgam, burun akıntısı ve omurga sıvısından da izole edilmişlerdir. İnsanlarda yaptığı enfeksiyonlar arasında Bakteriemi'nin 6 çeşidine rastlanmıştır. Bunlardan ikisi bacak ülseri diğer dördü ise ayakta tedavi edilebilen kronik diyalizdir. Ayrıca beyin ve dalak absesi, solunum sistemi ve idrar yolu enfeksiyonu ve menenjitte sebep olduğu rapor edilmiştir (Balkwill *et al.* 2006).

Sphingomonas türünün hastada her bulunuşu hastalığın sebebinin kendisi olduğu anlamına gelmemelidir. Ancak bu bakteri türünün bazı enfeksiyonları desteklediği düşünülmektedir. Saprofit *Sphingomonas* türlerinin bitkilerde de hastalığa sebep olduğu söylenmektedir. Fakat bu alanda yeterince çalışma bulunmamaktadır (Balkwill *et al.* 2006).

Sphingomonas türlerinin metabolik çeşitlilikleri ve jel gibi ekstraselüler polisakkarit üretim yetenekleri Dünya'da gıda, ilaç ve petrol gibi birçok alanda kullanılmalarını sağlamıştır. Petrol endüstrisinde fosil yakıttan kükürt gidermede, biomeditasyon (tıbbi iyileştirme)

yönüyle ilaç sanayinde ve gıda sektöründe biyotin, EPS, yeni katalizör üretimiyle kullanılmaktadır. Biyokatalitik uygulamada, zararlı organik bileşiklerin indirgenmesi ve yeni özel kimyasallara dönüşümde kullanılır. Pirolidinlerin stereoselektif hidrokarboksilasyonu için mükemmel bir katalizördür. EPS'nin sıcaklık, tuzluluk ve yüksek pH'da oldukça stabil, emülsüfiye bir bileşik olmasından dolayı petrol sondaj sıvısı olarak kullanılabildiği belirtilmiştir (Balkwill *et al.* 2006).

Aynı zamanda bu bakterilerden bazılarının da kirlenmiş ve kontamine olmuş alanlardaki kirlilikleri büyüme ve enerji eldeleri için parçalayarak kullanıp ortamı temizlediği görülmüştür (Balkwill *et al.* 2006).

2.7.2. *Staphylococcus spp.*

Staphylococcus'lar Eubacteriales takımının Mirococcaceae familyasına ait, G (+), sporsuz, kok şekilli, kapsülsüz ve fakültatif anaerobik mikroorganizmalardır. En iyi gelişme sıcaklıkları 30-37 °C'dir. Stafilocoklar +4 °C'de 2-3 ay,-20 °C'de 3-6 ay yaşayabilirken 60 °C'de 30 dakika ve %2'lik fenolde; 15 dakika canlı kalabilmektedirler (Kloos *et al.* 1982).

Tüm stafilocoklar katalaz enzimine sahiptir. Bu tür doğada çok yaygın olduğu gibi insanlar ve hayvanların derilerinin mukozalarında da bulunur. Koagulaz enzimi (K) bir patojenite kriteri olarak bilinir ve stafilocoklar K (+), K (-) olarak ikiye ayrılır (Devriese *et al.* 1983; Martineau *et al.* 1996; Heilmann *et al.* 2003; Otto 2009).

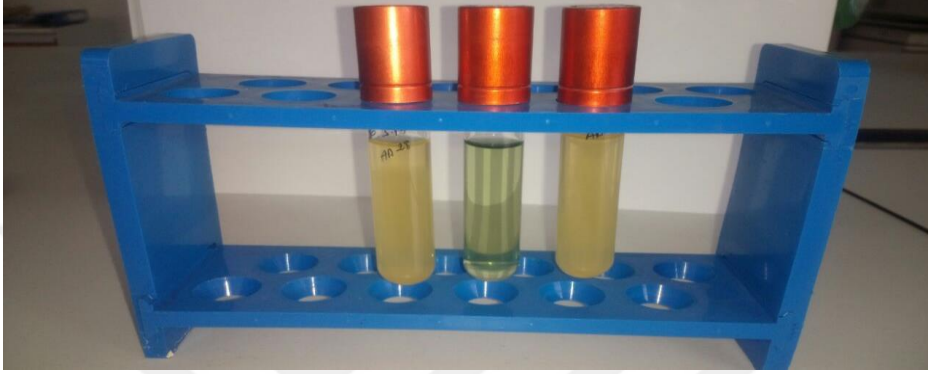
Staphylococcus'un 32 tane alt türünün olduğu ve bunların insan sağlığı için en tehlikeli türünün; 40-45 °C'de, pH 7.0-8.0 ve su aktivitesinin 0,98 olduğu ortamda enteretoksin üreterek zehirlenmelere sebep olan *Staphylococcus aureus* olduğu bilinmektedir. Üretmiş olduğu enteretoksinlerin; 100 °C'de 10 dakika ısıl işlemle %50'si inaktif olurken, aynı sıcaklıkta 30 dakika veya 121 °C'de 1-2 dakikayla tamamen inaktif olmaktadır (Karapınar ve Demirel 2003).

Hayvanlarda mastitis, botryomycosis, enzootik piyemi ve arthritise sebep olurken insanlarda keçi sütünden izole edilen *Staphylococcus caprae* bakteriyemi ve idrar yolları enfeksiyonuna sebep olduğu bilinmektedir. Antibiyotiğe duyarlıdırlar (Vandenesch *et al.* 1995).

Staphylococcus epidermis türü özellikle hastanelerde ameliyat veya sondaj gibi kliniksel uygulamalarda, kullanılan ekipmanlarla dolaşım ve boşaltım sistemine enfekte olan

patojen bir stafilokoktur. Kullanılan aletlerin sterilizasyonuna dikkat ederek ve antibiyotik kullanarak bu sorun aşılabilmektedir (Mack *et al.* 2013).

16s rDNA sekans identifikasyon yöntemiyle %99 benzerliği bulunan *Staphylococcus epidermis* ve *Staphylococcus caprae* türlerinin ayrılmasında Namvar ve arkadaşları 2014'te yaptıkları çalışmada *Staphylococcus epidermis*'in süktrozdan asit üretebildiği bulunmuştur. *Staphylococcus epidermis*'in asit üretimi **şekil 2.1**'de verilmiştir.



Şekil:2.1 *Staphylococcus epidermis*'in sukrozdan asit üretimi

2.7.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa G (-), hareketli, sporsuz, kapsülsüz, arjinin, hidrolaz, jelatin hihrolizi, katalaz ve oksidaz (+) , lizin, ornitin dekarboksilaz, indol, H₂O oluşumu, metil kırmızısı ve Vages-Proskauer testleri (-) negatif, şekeri oksidasyonla parçalayıp fermantasyon yapmayan, çoğu kez bir kutbunda 1-2 kamçı bulunduran çiftli veya kısa zincir halinde görülen çomak şeklinde en iyi 30-37 °C'de gelişen, toprakta, sulara, insan ve memeli hayvanların bağırsak florasında ve organik maddelerin bol bulunduğu hastane ortamlarında bulunan patojen bir mikroorganizmadır. Bu türün proteolitik enzimleri, letal ekzotoksin ve enterotoksin gibi hücre dışı salgılarının olması çeşitli hasalıklara sebep olmaktadır. Bunlar menenjit, bronşit, bronkopronomi, esteomiyetli, septisemi, psedömemranöz, idrar yolu, göz ve kulak hastalıkları olarak sıralanabilir (Hayness 1951; Freeman 2015).

Antiyotiğe karşı oldukça dirençli olan ve kısa süre içinde verilen antibiyotiğe yeniden direnç geliştiren *Pseudomonas aeruginosa* cinsi enfeksiyonlarına karşı uygulanacak bir tedavi yöntemi bulmak gün geçtikçe zorlaşmaktadır (Dündar vd 2004).

Pseudomonas aeruginosa, özellikle hastanelerde fırsatçı enfeksiyoncu olarak bilinen ve hastane enfeksiyonlarının yaklaşık %10'unu oluşturan (üriner, solunum ve bakteriamiye

sistemi hastalıkları) ve bu nedenle mortaliteye sebebiyet verme oranı en yüksek olan bakteri olduğu belirtilmiştir (Murray *et al.* 2015). Bu bakteri sebep olduğu hastalıkları tedavi için verilen antibiyotiği tedavi sürecinde inaktive eden beta laktamaz enzimi salgılayarak, dış membranlarındaki koruyucu proteinlerde mutasyon yaparak ya da dirençli organizmalardan plazmid aracılığıyla direnç aktarımı yaparak antibiyotiğe dirençli hale gelir (Murray *et al.* 2015). Yapılan çalışmalarda bu tür için birçok antibiyotik çalışması yapılmış fakat tek başına hiçbir ilaç çözüm olmamıştır. Hastaneler kendilerine ve hastaya özel yeni yöntem profilleri kullanarak sorunları çözmeye çalışmıştır. En etkili sonuç, beta-laktam antibiyotik kullanımında görülmüştür (Coşar vd 2009).

2.7.4. *Cyanobacterium*

Cyanobacteria prokaryot grubunun en yaygın olanlarından biridir. Kendi enerjisini yapısında bulundurduğu klorofil sayesinde üretir. Aynı zamanda hem karada hem de sularda bulunan bir bakteri türüdür. Sulardaki kayaların ve katmanların yüzeyinde biyofilm oluşturan, ıslak ve nemli yerlerde, bataklıklarda, içme sularında, mineralli sularda, gel-git olayının olduğu katmanlarda ve çöl üst tabakasında yaygın olarak bulunur (Schönhuber *et al.* 1999).

Ekolojik olarak 5 gruba ayrılmıştır. Bunlar Chroococcales (bölünme veya tomurcuklanma ile coccoid hücreleri üretenler), Pleurocapsales (baecocytes ile pseudo-filamentleri oluşturanlar), Oscillatoriales (düzensiz filamentlere sahip olanlar), Nostocales (sadece bir düzlemde bölünen fakat farklı bir türde sınıflandırılanlar) ve Stigonematales (birçok düzlemde bölünebilenler)'tir. Yaklaşık 150 cins ve 2000 türü olduğu bilinmektedir. G (-) , kok ve zincir şeklinde, yaygın bir sıcaklık toleransına sahip olmakla birlikte 15 -74 °C'de gelişme gösterirler. Psikrofilik değildirler ama soğuğa toleranslıdırlar (Schönhuber *et al.* 1999).

Kutuplarda ve buzullarda var olduğu görülmüştür. pH 9.0'dan büyük olan alkali ortamlarda yaşarlar. Çünkü karbon ve bikarbonatın karbon kaynağı olarak kullanılması için alkali ortam gereklidir (Vincent and Laybourn-Parry 2008).

Cyanobacteria 'lerin saflaştırılması ve tanımlanması için birçok metot vardır. Ancak çoğu spesifik gruplar için geliştirilmiştir. Bunun için en iyi yol 16S rDNA gen sekansı olarak kabul edilmiştir. Deniz ve okyanuslardaki azot, oksijen ve karbon çevriminin önemli bir bileşenidir. Bulundukları ortamlarda simbiyotik yaşama uyumludurlar. Yapılarında karbon kaynağı için poliglukoz granüllerini, fotosentetik enzimleri, polifosfat granüllerini ve aspartik

asit ile arjinine bağlı azot kaynaklarını bulundurur. Olumsuz şartlar altında bu kaynaklardan faydalanırlar (Schönhuber *et al.* 1999).

Güneş ışınlarından gelen toksik radyasyona karşı kendilerince bazı korunma yöntemleri geliştirmişlerdir. Bunun için bazıları daha derinlerde, bazıları güneş ışığını direkt almayan göl kenarlarında yaşarken bazıları da bu ışınları absorbe etmeden geçirir ve zararlı etkisinden kurtulur (Schönhuber *et al.* 1999).

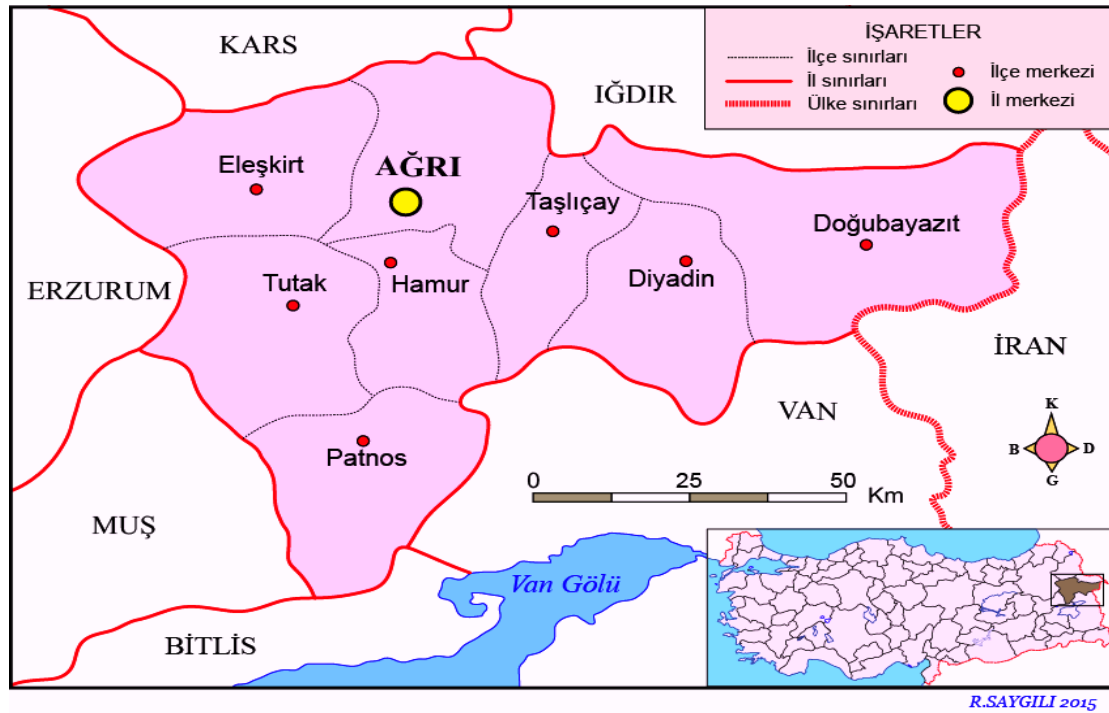
Cyanobacteria'nın üyeleri birçok metabolit oluşturmaktadır. Bazı türleri karatenoid ürünlerini parçalayarak sularda yağimsı kokuya sebep olurken bazı türleri geosmin ve 2-metilsorbanol üreterek suyun toprağımsı ve küflü kokmasına sebep olmaktadır (Vincent and Laybourn-Parry 2008).

Yapılan araştırmalarda en az 46 *Cyanobacterium* türünün çevre kıyı sularında toksik madde ürettiği bulunmuştur. Bunlar ciğerlere zarar veren hepatotoksinler, sinir sistemine zarar veren neurototoksinler ve deri iltihaplanmalarına sebep olan dermatotosinlerdir. Bu toksinler kuşlar, çiftlik hayvanları, köpekler ve az sayıda insan ölümlerine sebep olmuştur (Schönhuber *et al.* 1999).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Ağrı İli'ni temsilen **Şekil.3.1**'de görüldüğü gibi belirlenen 5 farklı bölgelerden(Akyemiş Köyü-Patnos, Konuktepe Köyü-merkez, Aşağı karakol Köyü-Hamur, Yeşilova Köyü-Eleşkirt ve Güneş Gören Köyü-Tutak) toplanan yöresel yoğurt örneklerinde LAB'nin izolasyonu ve identifikasyonu yapılmıştır.



Şekil.3.1 Ağrı İl'i ve İlçeleri haritası

3.1.1. Kullanılan malzemeler

3.1.1.a. MRS Agar (Merck 1.10660)

Peptone from casein 10,0 g/L; meat extract 10,0 g/L; yeast extract 4,0 g/L; D(+) glucose 20,0 g/L; K_2HPO_4 2,0 g/L; tween 80 1,0 g/L; di-ammonium hydrogen citrate 2,0 g/L; sodyum asetat 5,0 g/L; $MgSO_4$ 0,2 g/L; $MnSO_4$ 0,04 g/L; agar-agar 14,0 g/L. dehidre besiyeri 68,2 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir, otoklavda 121 °C'de 15 dk. sterilize edilir. Otoklav sonrası 45-50 °C'ye soğutulup, steril petri kutularına dökülür.

3.1.1.b. MRS Broth (Merck 1.10661)

Peptone from casein 10,0 g/L; meat extract 8,0 g/L; yeast extract 4,0 g/L; D (+) glucose 20,0 g/L; K₂HPO₄ 2,0 g/L; tween 80 1,0 g/L; di-amonyum hidrojen citrate 2,0 g/L; sodyum asetat 5,0 g/L; MgSO₄ 0,2 g/L; MnSO₄ 0,04 g/L. dehidre besiyeri 52,2 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilir, amaca uygun kaplara dağıtılıp, otoklavda 121 ° C’de 15 dk. sterilize edilir.

3.1.1.c. TSA Agar (Merck 1.05458)

Pepton from casein 15,0 g/L; pepton from soymeal 5,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; agar-agar 15,0 g/L. dehidre besiyeri, 40,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121 °C’de 15 dk. sterilize edilir ve steril petri kutularına dökülür.

3.1.1.d. TSB Broth (Merck 1.05459)

Pepton from casein 17,0 g/L; pepton from soymeal 3,0 g/L; D (+) glucose 2,5 g/L; NaCl 5,0 g/L; K₂HPO₄ 2,5 g/L. dehidre besiyeri, 30,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde gerekirse ısıtılarak eritilip, amaca uygun kaplara (tüp, erlen vb.) dağıtılır ve otoklavda 121 ° C’de 15 dk. sterilize edilir.

3.1.1.e. Nutrient Broth (Merck 1.05443)

Pepton from meat 5,0 g/L; meat extract 3,0 g/L. dehidre besiyeri, 8,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilir ve amaca uygun kaplara (tüp, erlen vs.) dağıtılır ve otoklavda 121 °C’de 15 dk. sterilize edilir.

3.1.1.f. Brom timol mavisi

Bir pH indikatörü olan brom timol mavisi pH 6.0’da sarı ve pH 7.6’da maviye renk değişimi sağladığından, glikozdan asit üretimi testinde kullanılmıştır. 100 mg brom timol mavisi, %50’lik 100 ml etanolde çözünerek hazırlanır ve 100 mL besiyerine 0.1 g’ının eklenmesi şeklinde kullanılır.

3.1.1.g. 10X TBE hazırlama

Trise base 121.1 g, borik asit 61.8 g, EDTA 7.4 g ve üzerine 1L distile suda çözerek hazırlanır. Bu çözeltiden seyreltilerek kullanılır.

3.1.1.h. Agaroz jel hazırlama

Agaroz jel genelde %0.9-1'lik olarak kullanılmaktadır. 1 g agaroz üzerine 100mL %1'lik TBE ilave edilerek mikro dalga fırında 2-3 dk eritildikten sonra yaklaşık 45-50 °C'de 1 µL etityumbromit karıştırılarak hazırlanan jel, elektroforez tankına kabarcık oluşturmada dökülerek donması sağlanır.

3.1.1.I. %3'lük KOH çözeltisi hazırlama

3 g KOH 100 mL steril saf su içerisinde çözülerek hazırlandı.

3.1.1.İ. Bactident Oxidase (Merck 1.13300)

Teste kullanılan oksidaz çubuğu reaktif bölgesi; N,N-Dimethyl-1,4-fenilindiamonyum klorit (0,1 µmol) ve α-naphthol (1,0 µmol) içerir.

3.2. METOT

3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Aseptik şartlar altında 150 ml steril kaplara alınan yoğurt örnekleri laboratuvara getirildikten sonra 10^{-9} - 10^{-10} oranlarında %0.85'lik NaCl ile dilüsyonları hazırlandı. Bu dilüsyonlardan MRS agar'a hem dökme hem de yayma yöntemiyle ekim yapılarak 37 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kolonilerden morfolojik olarak farklı görünenler seçilerek yeni petrilere ekimler yapıldı. Bu işlem her bir koloni saf olarak elde edilene kadar tekrarlandı (Batdorj *et al.* 2006; İşleroğlu vd 2008).

3.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin stoğa alınması

Saf kültür olduğu teyit edilen izolatlar için; 100mL'lik stok besiyeri (4g/L nutrient broth ve 15 mL gliserol) hazırlanarak üzerine bir öze dolusu bakteri kolonisi eklendi. AD şeklinde kodlanarak, -20 °C'de 1-2 saat beklendikten sonra -80 °C'ye konarak, bundan sonraki çalışmalar için stoklandı (Batdorj *et al.* 2006; İşleroğlu vd 2008).

3.2.3. Laktik Asit Bakterilerine uygulanan testler

1. Morfoloji ve hareketlilik testi

Saf kültürlerden alınan bakteriler steril iğne öze yardımıyla lamel üzerine bir damla su içinde iyice yayıldı ve üzerine hava kabarcığı oluşturmada lam kapatıldı. Mikroskop altında morfolojik ve hareketlilik açısından incelemeler yapıldı.

2. Fizyolojik testler

a. Farklı sıcaklıklarda gelişim (10 °C ve 45 °C)

MRS agar besiyerine, saflaştırılan kolonilerden çift paralel şekilde öze ile ekim yapılarak 10 °C ve 45 °C de 48 saat beklendikten sonra sonuçlar gelişip gelişmediklerine göre değerlendirildi (Tunail *et al.* 2001; Fortina *et al.* 2003; Halkman 2005).

b. Farklı pH'da gelişim (4.4-9.6)

Hazırlanan MRS broth besiyerinin pH'ları NaOH ve HCl kullanılarak 4.4 ile 9.6'ya ayarlandı ve vida kapaklı tüplere 10 ml eklenerek 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı. Saflaştırılan kolonilerden tüplere iğne öze ile ekim yapılarak 35-37 °C de 48 saat beklendikten sonra 600 nm'de spektrometre ile sonuçlar değerlendirildi (Tunail *et al.* 2001; Fortina *et al.* 2003; Halkman 2005).

c. Farklı tuz konsantrasyonunda gelişim (%NaCl 6,5-12-18)

MRS broth besiyeri hazırlanırken hacimce konsantrasyonları %6.5, %12 ve %18 olacak şekilde tuz ilave edilerek, 10 ml tüplere aktarılıp 121 °C'de 15 dk. otoklavda steril edildi. Saflaştırılan kolonilerden tüplere iğne öze ile ekim yapılarak 35-37 °C de 48 saat beklendikten sonra sonuçlar 600 nm'de spektrometre ile ölçüldü (Tunail *et al.* 2001; Fortina *et al.* 2003; Halkman 2005).

3. Biyokimyasal testler

a. Katalaz testi

Sıvı veya katı besiyerinde geliştirilen bakteri kültürüne H₂O₂ (hidrojen peroksit) ilave edildiğinde serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlelenebilmesi, hidrojen peroksit ayrışmasını, katalaz enzim varlığını göstermektedir. Aerobik solunum yapan mikroorganizmalarda katalaz enzimi vardır. MRS agar'da gelişen kolonilerden bir miktar

alınarak üzerine 1 ml %3'lük H₂O₂ damlatıldığında gaz kabarcığı oluşan örnekler katalaz pozitif (+), gaz kabarcığı oluşmayanlar katalaz negatif (-) olarak değerlendirildi (Whittenbury 1964; Harley and Prescott 2002).

b. Glukozdan gaz üretimi

Bu test, LAB'lerinin glukozdan CO₂ (karbondioksit) üretimi belirlemek için yapılmaktadır. MRS broth'a 1 gr glikoz ilave edilerek pH 7.2 'ye ayarlandı ve 10 ml tüplere (içinde ters konmuş durham tüpü olan) kondu ve 121 °C'de 15 dk. steril edildikten sonra, MRS agar'da gelişen kolonilerden iğne öze ile ekim yapılarak 35-37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda durham tüpünde gaz oluşturan pozitif (+), gaz oluşturmamayan negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Müller *et al.* 1990; Fortina *et al.* 2003).

c. Arjinin aminoasitinden amonyak üretimi

LAB'lerinin arjinin aminoasitini parçalayarak amonyak (NH₃) oluşturma özelliğine bakmak için; pepton 1g, NaCl 5g, dipotasyumbikarbonat (K₂HPO₄) 0.3 g, arjinin aminoasitini 10 g, distile su 1L ve brom timol mavisi 0.01 g hazırlanarak pH 6.7'ye ayarlandı. 5 ml tüplere konuldu ve steril edildikten sonra MRS agar'da gelişen kolonilerden öze ile ekim yapılarak 35-37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Brom timol mavisi pH 6.0-7.6 arasında bir indikatör olup, sonuçlar sarıdan maviye dönüşenler pozitif (+) olarak değerlendirildi (Papamanoli *et al.* 2003).

d. Eskulin analizi

Bu analiz, saflaştırdığımız bakterilerin bir glikozit olan eskulini parçalayan eskulinaz enziminin varlığını belirlemek için yapılmaktadır. Hazırlanan eskulin agar 5 ml tüplere konarak otoklavda steril edildi. Daha sonra MRS Agar'da gelişen kolonilerden öze ile ekim yapılarak 35-37 °C'de 1-7 gün inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda sarı olan besiyerlerinde siyah renge dönüşenler pozitif olarak kabul edildi (Chuard and Reller 1998).

e. Oksidaz testi

Bu test bakteride hücre içi ATP oluşumu sırasında görev yapan sitokrom-c oksidaz enziminin varlığını belirlemek için yapılmaktadır. Bu testte hazır kitler kullanıldı. MRS agar'da geliştirilen bakteriler steril kürdanla alınarak oksidaz test çubuğuna inoküle edildi ve 20-60 sn. içinde mavi menekşe renk oluşumu pozitif (+) sonuç olarak değerlendirildi.

f. Vitek 2 Biyokimyasal Analizi

Vitek 2 biyokimyasal test analizi; mikroorganizmaların asidifikasyon, alkalizasyon ve enzim hidrolizi gibi metabolik özellikleriyle inhibitör varlığında büyüme aktivitesini reaktif kartlarla otomatik olarak ölçülmesidir. Geliştirilen koloniler Gram özelliğine göre uygun reaktif kartları seçilir ve bakteri izotonik NaCl solüsyonu içinde kuyucuklara 3 mL olarak aktarılır. Vitek 2 (BioMerieux Vitek 2 sistemleri versiyon 06.01) cihazına konan örnekler 8-24 saat inkübasyon sırasında her 15 dk. bir ölçüm yapılan degerler veri tabanıyla karşılaştırılarak rapor hazırlanır (Çubukçı 2016).

4. Antibiyotiğe direnç testleri

a. Neomisin antibiyotik direnci

LAB bakterilerinin neomisin antibiyotiğine dirençli olup olmadığını anlamak için, steril MRS agar besiyeride ekimi yapılan bakteriler üzerine steril antibiyotik diskleri yerleştirildi. Steril 10 µL neomisin antibiyotiği emdirilen disk 30 °C’de 5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası diskin etrafında oluşan zon cetvelle ölçülerek neomisin antibiyotiğine duyarlılığı değerlendirildi.

b. Tetrasiklin antibiyotik direnci

LAB bakterilerinin neomisin antibiyotiğine dirençli olup olmadığını anlamak için, steril MRS agar besiyeride ekimi yapılan bakteriler üzerine steril antibiyotik diskleri yerleştirildi. Steril 10 µL tetrasiklin antibiyotiği emdirilen disk 30 °C’de 5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası diskin etrafında oluşan zon cetvelle ölçülerek tetrasiklin antibiyotiğine duyarlılığı değerlendirildi.

3.2.4. Genomik DNA izolasyonu ve PCR

Araştırmada kullanılacak olan izolatların DNA ekstraksiyonu Dr. Kunte tarafından (2005) uyarlanan metoda göre gerçekleştirildi.

- Bakteri MRS broth sıvı ortamda 30 °C’de geliştirildi.
- 1.5 ml eppendorflara alınıp, 14 000 rpm’de 10 dk. santrifüj edilerek süpernatant atıldı.

- Daha sonra eppendorfa 1 ml TES tamponu (hücre duvarının parçalanarak DNA'nın serbest kalmasını sağlar) koyularak, vortekslendi.
- 3 dk. 14 000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatantı atıldı.
- 800 µL TES ilave edilerek vortekslendi (bu işlem üst faz berrak olana kadar devam edilir).
- %20'lik 20 µL SDS (proteinler arasındaki disülfid bağlarını parçalar) eklenerek, oda sıcaklığında 30 dk. inkübasyona bırakıldı.
- 300 µL (1:1) fenol:kloroform (fenol, nükleik asitlerden proteinlerin uzaklaşmasını; kloroform ise, proteinleri denatüre ederek sıvı ve organik fazların ayrışmasını sağlar) eklenerek dikkatlice alt-üst edildi.
- 10 dk. 14 000 rpm'de santrifüj edilip üst fazı dikkatlice alınarak yani eppendorflara konuldu.
- Yaklaşık 600 µL sıvı faz alındıktan sonra eşit hacimde 2-izopropanol (DNA'yı bağlayarak iplikçikler halinde çökmesini sağlar), 1/10'u kadar da Na-asetat eklendi ve -20 °C'de 30 dk. inkübasyona bırakıldı.
- 10000 rpm'de DNA çöktürülerek süpernatant atıldı.
- %70'lik 500 µL etanol (DNA'yı yıkamak için kullanılmıştır) eklenerek 10 dk. oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- 14 000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
- 10 dk. 60 °C'de eppendorfun kapağını açarak etanolün uçması sağlandı.
- 50 µL distile su eklenerek ve kısaca vortekslendi ve 70 °C'de 10 dk. inkübe edilerek suyu çöktürüldü.
- DNA viskoz olana kadar pipetlenmiş ve %1'lik agaroz jelde tek parça bant veren örnekler sonraki çalışmalar için +4 °C'de saklandı (Kunte 2005).

Bakteri İzolatlarının 16S rDNA Bölgesinin PCR ile Amplikasyonu ve PCR Şartları

Test izolatlarından elde edilen genomik DNA PCR ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonunda Macrogen primerleri (27F 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'; 1492R 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') kullanıldı. Reaksiyon için gerekli mix **Çizelge: 3.1**'de verilmiştir.

50 µL mix için belli oranlar	
ddH ₂ O	28.9 µL
DMSO	5 µL
Buffer	6 µL
dNTP	1 µL
Mg ₂ Cl	3.6 µL
F-primer	2 µL
R-primer	2 µL
Tag DNAPolimeraz	1 µL
DNA	0.5 µL

Çizelge:3.1 16S rDNA PCR'ı için PCR markır mix oranları

Çoğaltılmak istenen 16S bölgesi PCR reaksiyonu için hazırlanan örnekler, 95 °C'de 5 dk. ön denetürasyon, bunu takiben 36 döngü olacak şekilde 94°C'de 60 s denatürasyon, 54 °C'de 60 s bağlanma ve 72 °C'de 120 s uzama basamakları ve son olarak 72 °C'de 5 dk uzama basamağından oluşacak şekilde programlanan Pcr termal döngü cihazına konuldu. Seçilen programda hedef bölgelerin çoğaltılması yapıldı.

16S rDNA PCR Ürünlerinin Elektroforezi

1 g agaroz üzerine 100 ml 0,5X TBE (%1'lik agaroz jel) tamponu eklenerek karışım mikrodalga fırında tamamen eriyinceye kadar kaynatıldı. 50 °C'ye soğutulurken içerisine ethidium bromür ilave edilerek içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez küvetine kabarcık oluşmadan döküldü. 30-35 dk. sonra tarak dikkatlice çıkarılarak kuyucuklardan ilk başta olana 10 kb DNA markırı (50-10 000 baz) 10 µl olarak yüklendi. Diğer kuyucuklara ise her bir örnek için 3 µl yükleme tamponu ile karıştırılan 10 µl örnek yüklenerek 90 volta

ayarlanan elektroforez cihazında 1.5 saat yürütüldü. Ethidium bromür ile boyanan DNA bantları jel görüntüleme cihazı (Quantum ST4 VILBER LOURMAT) ile bilgisayar ortamında görüntülenerek değerlendirildi.

16s rDNA sekans analizi

Sekans analizi Hollanda'da bulunan Macrogen firmasına gönderilerek hizmet alımı yapıldı (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). 16S rDNA sekans sonucu tanımlanamayan 15 izolatın Vitek biyokimyasal testleri yapılmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Laktik Asit Bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması

Ağrı ili'ni temsilen bölgeden toplanan yöresel yoğurtlar aseptik şartlar altında laboratuvara getirildi. Mikrobiyal yüklerinde artış olmaksızın aynı gün analize alındı. Hazırlanan MRS agara, %0,9'luk fizyolojik suda 10^{-9} - 10^{-10} 'a kadar dilüsyon yapılan yoğurt örneklerinden özeyle ekimler yapıldı. MRS agarda aynı morfolojide görünen koloniler tekrar tekrar ekimler yapılarak tek kültür haline getirildi.

Aynı morfolojiye sahip olan kültürler Abdullah DEMİRCİ (AD) şeklinde kodlanarak, stok çözeltisine alındı. Sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'ye konarak saklandı.

4.2. Laktik Asit Bakterilerine uygulanan testler

İzole edilen bakterilerin morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genomik testler yapılarak tanı ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. İlk olarak elde edilen izolatların ışıklı mikroskop (Primo Star ZEISS) altında Gram boyama, morfoloji ve hareketlilik özellikleri incelendi. Gram boyama testleri sonuçlarına göre tüm izolatlar G (+) olarak belirlendi. Hareket testleri sonucuna göre de izolatların tümünün hareketsiz olduğu gözlemlendi. Mikroskop altında yapılan gözlemlere göre AD16, AD18, AD19, AD24 ve AD30 oval; AD28 kok ve diğerlerinin çubukken AD6, AD7 ve AD15'in diğerlerine göre daha küçük ebatlı, AD31 ve AD32 zincir şeklinde çubuk morfolojik yapıya sahip oldukları belirlendi (**Çizelge 4.1**).

4.2.1. Morfolojik testler

a. Bakterilerin morfolojik yönden incelenmesi

İzolatlar mikroskop altında morfolojik ve hareketlilik açısından incelenmiş kok, çubuk ve oval olarak **Çizelge 4.1**'de gösterilmiştir.

İzolat kodu	Hareketlilik	Morfoloji	İzolat kodu	Gram Özelliği
AD1	-	Çubuk	AD1	-
AD2	-	Çubuk	AD2	-
AD3	-	Çubuk	AD3	-
AD4	-	Çubuk	AD4	-
AD5	-	Çubuk	AD5	-
AD6	-	Çubuk	AD6	-
AD7	-	Çubuk	AD7	-
AD8	-	Çubuk	AD8	-
AD9	-	Çubuk	AD9	-
AD10	-	Çubuk	AD10	-
AD11	-	Çubuk	AD11	-
AD12	-	Çubuk	AD12	-
AD13	-	Çubuk	AD13	-
AD14	-	Çubuk	AD14	-
AD15	-	Çubuk	AD15	-
AD16	-	Oval	AD16	-
AD17	-	Çubuk	AD17	-
AD18	-	Oval	AD18	-
AD19	-	Oval	AD19	-
AD20	-	Çubuk	AD20	-
AD21	-	Çubuk	AD21	-
AD22	-	Çubuk	AD22	-
AD23	-	Çubuk	AD23	-
AD24	-	Oval	AD24	-
AD28	-	kok	AD28	+
AD30	-	Oval	AD30	+
AD31	-	Çubuk	AD31	+
AD32	-	Çubuk	AD32	+

Çizelge 4.1 İzolatların morfolojik test sonuçları

-: Gram Negatif

+: Gram Pozitif

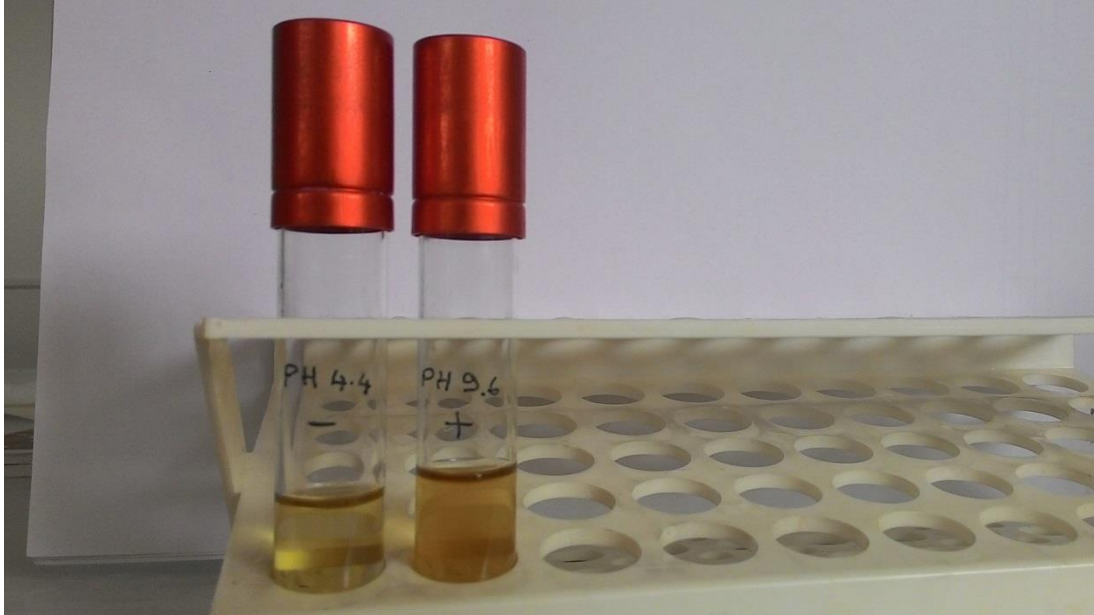
4.2.2. fizyolojik testler

a. Bakterilerin farklı sıcaklıklardaki gelişimi

Kültüre alınan bakteriler MRS agara yayma yöntemiyle çift paralel ekim yapıldı. Ekimi yapılan bakterilerin bir paraleli 10 °C'ye, diğer paraleli 45 °C'ye kondu. 48 saat inkübe edildikten sonra 10 °C'de AD23 ve AD32 izolatlarının gelişme göstermediği diğerlerinin iyi gelişme gösterdiği görüldü. 45 °C'de ise sadece AD30 izolatının gelişme göstermediği AD6, AD12, AD14, AD17, AD28 ve AD32 izolatlarının az geliştiği, diğerlerinin ise iyi şekilde gelişme gösterdiği gözlemlendi(Şekil4.2).

b. Bakterilerin farklı pH'lardaki gelişimi

Farklı pH'larda hazırlanan MRSB'ye (pH 4.4 ve pH 9.6) kültüre alınan bakteriler iğne öze kullanılarak ekildi ve 35-37 °C'de inkübe edildi. 48 saat inkübasyondan sonra **çizelge.4.2'**de görüldüğü gibi bütün izolatların geliştiği gözlemlendi. Bazik ortam olan pH 9.6'da ise AD9 ve AD15 gelişme gösteremezken; AD4, AD5, AD8, AD10, AD11, AD12, AD17, AD20 ve AD24 izolatlarının az gelişme gösterdiği görüldü. Diğerler izolatların da iyi şekilde geliştiği gözlemlendi.



Şekil.4.2. Bakterilerin farklı pH'lardaki gelişimi

c. Bakterilerin farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişimi

Farklı oranlarda NaCl içeren MRSB'e (%6.5, %12 ve %18) kültüre alınan bakteriler iğne öze kullanılarak ekim yapıldı ve 35-37 °C'de 48 saat inkübasyondan sonra **çizelge.4.2'**de

görüldüğü gibi %6.5 oranında tuz içeren besiyerinde sadece AD11 izolatının az gelişme gösterdiği diğerlerinin iyi gelişme göstermediği gözlemlendi. %12 oranında tuz içeren besiyerinde ise sadece AD4 izolatının gelişme göstermediği, AD2, AD5, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12 ve AD17 izolatlarının az gelişme gösterdiği gözlemlendi. %18 oranında tuz içeren ortamda AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD17, AD21 ve AD23 izolatları hiç gelişme gösteremezken diğerleri az gelişme gösterdiği gözlemlendi.



İzolat kodu	Farklı Sıcaklık (°C)		pH aralıkları		Tuz konsantrasyonu (%NaCl)		
	10	45	4.4	9.6	6.5	12	18
AD1	++	++	++	++	++	++	-
AD2	++	++	++	++	++	+	-
AD3	++	++	++	++	++	++	-
AD4	++	++	++	+	++	-	-
AD5	++	++	++	+	++	+	-
AD6	++	+	++	++	++	++	+
AD7	++	++	++	++	++	++	+
AD8	++	++	++	+	++	+	-
AD9	++	++	++	-	++	+	-
AD10	++	++	++	+	++	+	-
AD11	++	++	++	+	+	+	-
AD12	++	+	++	+	++	+	-
AD13	++	++	++	++	++	++	+
AD14	++	+	++	++	++	++	+
AD15	++	++	++	-	++	++	+
AD16	++	++	++	++	++	++	+
AD17	++	+	++	+	++	+	-
AD18	++	++	++	++	++	++	+
AD19	++	++	++	++	++	++	+
AD20	++	++	++	+	++	++	+
AD21	++	++	++	++	++	++	-
AD22	++	++	++	++	++	++	+
AD23	-	++	++	++	++	++	-
AD24	++	++	++	+	++	++	+
AD28	++	+	+	++	++	++	+
AD30	++	-	++	++	++	++	+
AD31	++	+	++	++	++	++	+
AD32	-	+	++	++	++	++	+

Çizelge:4.2. İzolatların fizyolojik test sonuçları

+ +: Gelişme iyi, +: Gelişme az, - :Gelişme yok

4.2.3. Biyokimyasal Testler

Yapılan oksidaz testi sonucunda bütün türlerin oksidaz negatif olduğu sonucuna varılmıştır. Katalaz enzim varlığını test etmek için gerçekleştirilen deneyler sonucu AD14, AD16, AD31 ve AD32 izolatlarında katalaz enzimi yok iken AD30 izolatının daha kuvvetli olmak üzere diğer tüm izolatlarda katalaz enzimi aktivitesi olduğu belirlendi. İzolatların arjininden amonyok (NH₃) oluşturma özelliğine bakmak için gerçekleştirilen deneyler sonucu AD21 izolatının arjininden az miktarda amonyak üretebildiği; AD28, AD30 ve AD32 izolatlarının iyi miktarda amonyak üretebildiği; diğer türlerin ise arjinini kullanamadığı tespit edildi. Eskulin testi sonuçlarına göre AD5, AD6, AD15, AD20, AD21, AD22, AD23 ve AD28 izolatların glikozit bağı parçalayamadığı, diğer türlerin bu bağı kırabildiği test edildi.

a. Vitek Test Sonuçları (BioMerieux Vitek 2 sistemleri versiyon 06.01)

Sekans analizi alınamayna 16 izolatın Vitek yöntemiyle testi yapıldı. Ancak sadece AD24 izolatı 655 b ve %86 benzerlik oranıyla *Cyanobacterium* olarak tanımlandı. Diğerler izolatların biyokimyasal içerikleri **Çizelge 4.7**'de aşağıda verilmiştir.

İzolat kodu	Oksidaz	Katalaz	Arjinin	Eskulin	Glikozdan gaz üretimi
AD1	-	++	-	++	++
AD2	-	++	-	++	++
AD3	-	++	-	++	++
AD4	-	++	-	++	++
AD5	-	++	-	-	++
AD6	-	++	-	-	-
AD7	-	++	-	++	++
AD8	-	++	-	++	-
AD9	-	++	-	++	++
AD10	-	++	-	++	-
AD11	-	++	-	++	++
AD12	-	++	-	++	++
AD13	-	++	-	++	++
AD14	-	-	-	++	++
AD15	-	++	-	-	++
AD16	-	-	-	++	++
AD17	-	++	-	++	-
AD18	-	++	-	++	++
AD19	-	++	-	++	++
AD20	-	++	-	-	++
AD21	-	++	+	-	++
AD22	-	++	-	-	++
AD23	-	++	-	-	-
AD24	-	++	-	++	-
AD28	-	++	++	-	-
AD30	-	+++	++	++	-
AD31	-	-	-	++	-
AD32	-	-	++	++	-

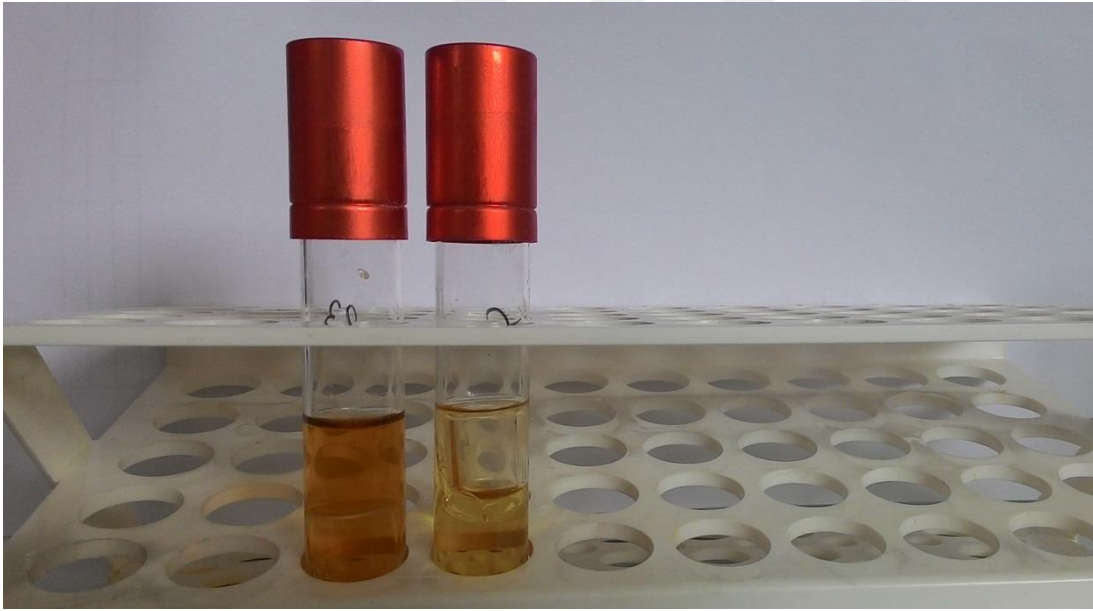
Çizelge:4 .1 İzolatların biyokimyasal test sonuçları

+++ : gelişme çok iyi, ++ : Gelişme iyi, + : Gelişme az, - :Gelişme yok



Şekil:4.3 Eskulin analizinde AD1 (+) ve AD5 (-)'nin karşılaştırılması

Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi AD6, AD8, AD10, AD17, AD23, AD24, AD28, AD30, AD31 ve AD32 izolatlarının glikozdan CO₂ üretmediği, diğer türlerin iyi bir şekilde glikozu parçalayarak heterotrofik özellik gösterdiği tespit edildi.



Şekil:4.4 Glikozdan gaz üretimi

4.2.4. Antibiyotiğe Direnç Testleri

Çalışmalarımız sonucu elde ettiğimiz izolatların neomisin ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı dirençlerinin olup olmadığı test edildi. Sonuç olarak sadece AD28 izolatının (18 mm zon) neomisin antibiyotiğine karşı dirençsiz olduğu diğerlerinin ise dirençli olduğu; yine tm izolatların tetrasiklin antibiyotiğine karşı dirençli olduğu gözlemlendi (**izelge.4.4**).



İzolat kodu	Antibiyotik duyarlılığı (mm)	
	Neomisin	Tetrasiklin
AD1	D	D
AD2	D	D
AD3	D	D
AD4	D	D
AD5	D	D
AD6	D	D
AD7	D	D
AD8	D	D
AD9	D	D
AD10	D	D
AD11	D	D
AD12	D	D
AD13	D	D
AD14	D	D
AD15	D	D
AD16	D	D
AD17	D	D
AD18	D	D
AD19	D	D
AD20	D	D
AD21	D	D
AD22	D	D
AD23	D	D
AD24	D	D
AD28	18	D
AD30	D	D
AD31	D	D
AD32	D	D

Çizelge:4. 2 İzolatların antibiyotik direnç test sonuçları

D: Antibiyotiğe dirençli

4.3. İzolatlardan genomik DNA İzolasyonu ve 16S rDNA PCR'ı

Dr. Kunte'nin (2005) geliştirdiği bakteri DNA'larının PCR ile çoğaltılması ve izolasyon protokolüne göre, bütün izolatların DNA izolasyonları yapıldı. Daha sonra 16S rDNA PCR ürünleri elde edildi ve bu ürünlerin işaretili markırla jele yüklenerek boyutuna ve saflığına jel elektroforezde (Quantum ST4 VILBER LOURMAT) bakıldı. Yeterince temiz olanlar sekans analizi için istenen şartlar altında, Macrogen Europe'ya gönderilerek sekans analizleri yapıldı. NCBI Gen Bankası verileri kullanılarak yapılan karşılaştırmalar sonucu 28 izolatın 24 tanesi tanımlandı. Bunların % 64.2'sini ortalama 1022 b ve % 95 benzerlik oranıyla *Sphingomonas sp.*'nin oluşturduğu gözlemlendi (**Çizelge:4.5**).



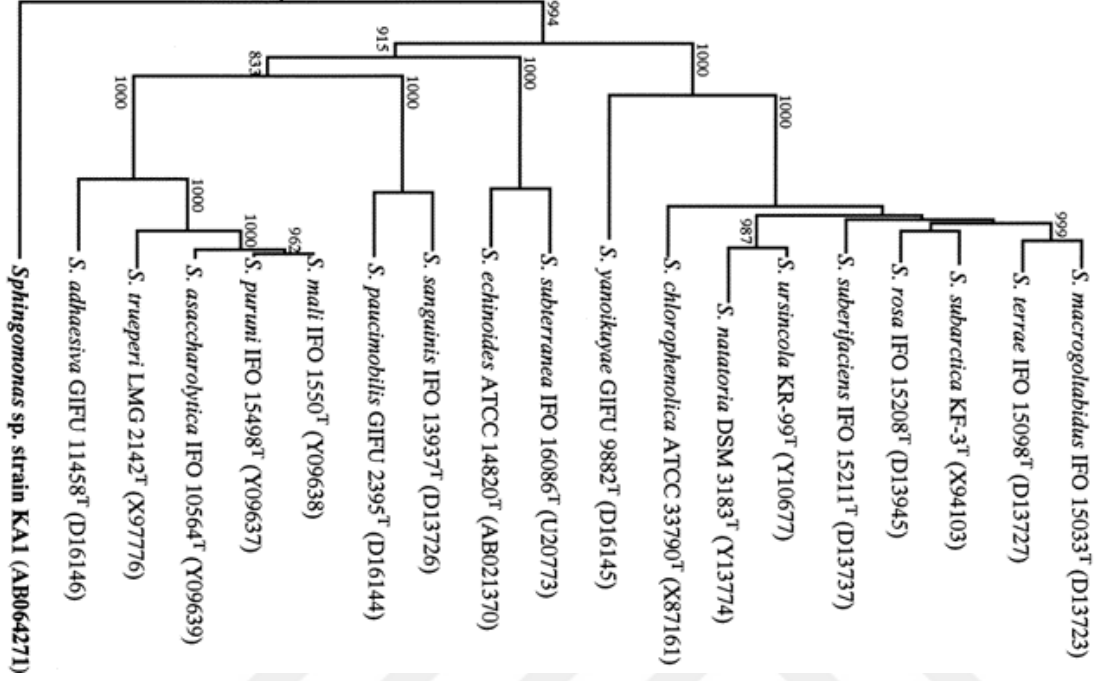
İzolat kodu	Nükleotit Sayısı*	Benzerlik Oranı (%)**	En Yakın Filogenetik Grup
AD1	1108	96	<i>Sphingomonas melonois</i>
AD2	1067	95	<i>Sphingomonas echinoides</i>
AD3	1098	94	<i>Sphingomonas echinoides</i>
AD4	820	98	<i>Sphingomonas sp</i>
AD5	1414	95	<i>Sphingomonas sp</i>
AD6	1083	90	<i>Sphingomonas sp</i>
AD7	1054	88	<i>Sphingomonadaceae bacterium</i>
AD8	1044	93	<i>Sphingomonas rhizogenes</i>
AD9	1094	95	<i>Sphingomonas rhizogenes</i>
AD10	1004	98	<i>Sphingomonas sp.</i>
AD11	858	99	<i>Sphingomonas sp</i>
AD12	941	99	<i>Sphingomonas sp.</i>
AD13	1137	90	<i>Sphingomonas sp.</i>
AD14	802	98	<i>Sphingomonas sp.</i>
AD15	816	99	<i>Sphingomonas sp.</i>
AD16	-	-	Tanımlanamadı
AD17	1262	91	<i>Sphingomonas sp.</i>
AD18	-	-	Tanımlanamadı
AD19	-	-	Tanımlanamadı
AD20	991	99	<i>Sphingomonas sp.</i>
AD21	908	99	<i>Sphingomonas sp.</i>
AD22	921	89	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
AD23	-	-	Tanımlanamadı
AD24	655	86	<i>Cyanobacterium</i>
AD28	1003	99	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
AD30	1101	99	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
AD31	1030	99	<i>Lactobacillus paracasei</i>
AD32	1015	99	<i>Lactobacillus casei</i>

Çizelge:4.5 İzolatların 16S rDNA BLAST sonuçları

* Eşleştirme için kullanılan 16S rRNA nükleotit sayısı

** En yakın filogenetik türün 16S rRNA dizisi ile benzerlik oranı

Sphingomonas spp. bakterileri Yabuuchi ve arkadaşları (1990) tarafından yapılan çalışmalarda şekil:4.5'deki gibi sınıflandırılmıştır.



Şekil.4.5 *Sphingomonas* spp bakterilerinin sınıflandırılması (1990)

15 izolatın biyokimyasal içerik sonuçları aşağıda tablolar halinde gösterilmiştir.

Kuyucuk	Test	Anımsatıcı	Miktar/Kuyucuk
4	D-GALAKTOZ	dGAL	0.3 mg
5	Lösin-ARILAMİDAZ	LeuA	0.023 mg
6	ELLMAN	ELLM	0.03 mg
7	Fenilalanin-ARILAMİDAZ	PheA	0.026 mg
8	L-prolin-ARILAMİDAZ	ProA	0.023 mg
10	L-Prolidonil-ARILAMİDAZ	PyrA	0.018 mg
11	D-SELOBİYOZ	dCEL	0.3 mg
13	Tirosin-ARILAMİDAZ	TyrA	0.0279 mg
15	Ala-Phe-Pro-ARILAMİDAZ	APPA	0.038 mg
18	D-GLİKOZ	dGLU	0.3 mg
20	D-MANNOZ	dMNE	0.3 mg
22	D-MALTOZ	dMAL	0.3 mg
28	SAKKAROZ/SÜKROZ	SAC	0.3 mg
30	ARBUTİN	ARB	0.1875 mg
33	N-ASETİL-D-GLİKOZAMİN	NAG	0.3 mg
34	5-Bromo-4-kloro-3-indoksil-beta-glukozit	BGLUi	0.006 mg
36	ÜREAZ	URE	0.15 mg
37	5-Bromo-4-kloro-3-indoksil-beta-glukoronid	BGURi	0.006 mg
39	BET-GALAKTOPIRANOSİDAZ indoksil	BGALi	0.006 mg
41	ALFA-ARABİNOSİDAZ	AARA	0.0324 mg
42	5-Bromo-4-kloro-3-indoksil-alfa-galaktosid	AGALi	0.006 mg
43	BETA-MANNOZ	BMAN	0.036 mg
44	ARGİNİN GP	ARG	0.15 mg
45	PİRUVAT	PVATE	0.15 mg
51	MALTOTRİOZ	MTE	0.3 mg
53	ESKULİN hidroliz	ESC	0.0225 mg
54	BETA-D-FUKOSİDAZ	BdFUC	0.0342 mg
55	5-Bromo-4-kloro-3-indoksil-beta-N-asetil-glikozamid	BNAGi	0.006 mg
56	5-Bromo-4-kloro-3-indoksil-alfa-mannozid	AMANi	0.006 mg
57	ALFA-FUKOSİDAZ	AIFUC	0.0342 mg
59	FOSFATAZ	PHOS	0.05 mg
60	L-ARABİNOZ	IARA	0.3 mg
61	d-Riboz 2	dRIB2	0.3 mg
62	Fenilfosfonat	OPS	0.024 mg
63	ALFA-L-ARABİNOFURANOSİD	AARAF	0.015 mg
64	D-KSİLOZ	dXYL	0.3 mg

Çizelge:4.7 Vitek 2 biyokimyasal test sonuçları

[illegible][illegible][illegible][illegible]

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Ağrı ilini temsil edecek şekilde belirlenen farklı bölgelerden toplanan yöresel yoğurt örneklerinden alınan LAB'lerinin izolasyonu, tanı ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Toplanan 11 yoğurt örneğinden 28 izolat elde edilmiş ve bunların 23 tanesi 16s rDNA sekans yöntemiyle, 1 tanesi vitek biyokimyasal test yöntemiyle tanımlanırken, 4 tanesi her iki yöntemle de tanımlanamamıştır.

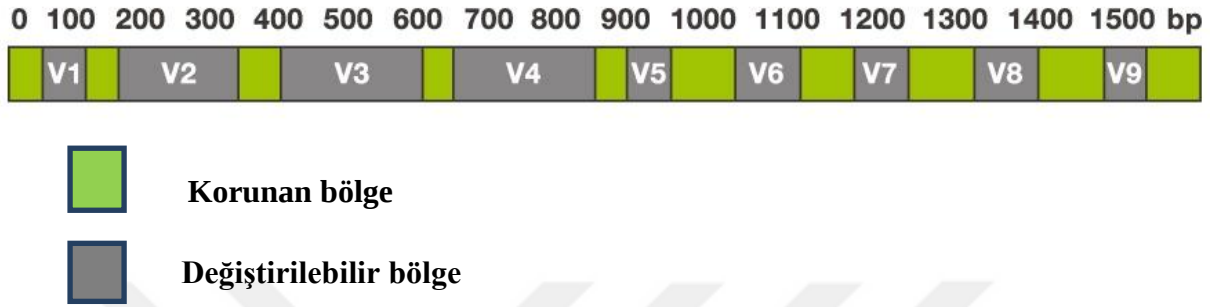
Süt ve süt ürünleri teknolojisinde yoğurdun kendine has yapısal özelliklerinin kazandırılması için sütün, 80-85 °C'de 30-20 dakika veya 90-95 °C'de 10-5 dakika ısıtma işlemine tabi tutulması ve 42-45 °C'ye soğutulduktan sonra starter kültür katılarak 2-2.5 saat inkübasyona bırakılması gerekir. Isıl işlemde en iyi uygulama 90 °C'de 10 dakika olduğu bildirilmiştir (Tekinşen ve Tekinşen 2005).

Geleneksel yoğurtta ise bu işlemler tamamen kişilerin bilgi, beceri ve tecrübesine bağlı olarak gerçekleşir. Yoğurdun hammaddesi olan süte uygulanması gereken işlemler; temiz sağma, kirlilikten koruma, uygun şartlarda saklama, gerektiği kadar kontrollü bir şekilde ısıtma-soğutma işlemi, önceki yoğurttan ekleme ve uygun şartlarda inkübasyon işlemleri ev ortamında yeterince yapılamaz. Bu sebeplerden dolayı yöresel yoğurtlarda olması gereken mikroorganizmaların dışında bir mikro floraya rastlamak mümkündür.

Sağlıklı ineklerden periyodik olarak alınan çiğ sütün mikroflorası üzerine yapılan çalışmada, bir kültüre bağımlı veya bağımsız olarak yaklaşık 250 tür içerdiği tespit edilmiştir. En çok bulunanlar *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Stenoprophomonas*, *Psychrobacter*, *Bradyrhizobium*, *Corynebacterium*, *Pelomonas*, *Staphylococcus*, *Faecalibacterium* sp., *Lachnospiraceae*, *Propionibacterium* sp., ve *Aeribacillus* sp., türleri olarak bulunmuştur. Sığır sütünün en önemli ve en büyük mikroorganizma grubunu LAB'leri oluşturur. Anaerobik bakteriler olarak *Bacteriodes faecalibacterium* ve *Prevotella* rutin olarak bulunur. Ayrıca sınıflandırılmayan ve bilinmeyen mikroorganizmaların da var olması çiğ sığır sütünün mikrobiyal yükünün düşünülenenden daha çeşitli ve karmaşık olduğunu göstermektedir (Quigley et al. 2013; Kuehn et al. 2013; Oikonomou et al. 2014; Zhang et al. 2015)

Çalışmamızda, LAB'leri olarak yoğurdun doğal mikroflorasında olan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus paracasei* ve *Lactobacillus casei* türleri tanımlanmıştır.

Yeni Zelanda’da olgunlaşmış peynirlerle yapılan bir çalışmada izole edilen *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus rhamnosus*’un **şekil 5.1**’de görüldüğü gibi sadece 6. bölge gen diziliminin (V6) farklı olduğu bulunmuştur (Ward and Timmins 1999).



Şekil :5.1 Gen bölgeleri

Taze süttten izole edilen *Lactococcus* ve *Lactobacillus* suşlarından, *Lactococcus lactis subsp. lactis* ve *Lactobacillus plantarum* düşük pH’ya, yüksek safra tuzu konsanstrasyonuna ve çok kullanılan antibiyotiklere karşı yüksek toleranslı olmaları nedeniyle probiyotik potansiyele sahip oldukları tespit edilmiştir (Haghshenas et al. 2014). *Lactococcus lactis subsp. lactis* suşunun sodyum aljinat ile kapsüllenererek probiyotik özelliğinden yararlanılmıştır (Defoirdt et al. 2005).

Keçi sütünde yapılan bir çalışmada, *Lactococcus lactis subsp. lactis* suşunun bakteriyosin üretimi sayesinde gıda patojeni *Listeria monocytogenes* türü üzerinde belli seviyeye kadar inhibisyon sağlaması gıda güvenliği açısından önemli görülmüştür (Furtado et al. 2014).

Yapılan bir çalışmada fermentasyonla *Lactococcus lactis subsp. lactis* suşunun laktik asit üretimine ek olarak H₂O₂ de ürettiği tespit edilmiştir (Meziane et al. 2011).

Fermente bir ekmekten izole edilen *Lactococcus lactis subsp. lactis*’in gelişme ve olgunlaşma aşamasında G (+) ve G (+) sporlarına karşı koruyucu olan nisin bakteriyosinini ürettiği rapor edilmiştir (Holo and Nes 1989). Benzer şekilde balıklarda *Sterptococcus iniae* neden olduğu bir enfeksiyonun *Lactococcus lactis subsp. lactis*’in bakteriyosin üretimiyle engellendiği rapor edilmiştir (Heo et al. 2013).

Probiyotik özelliğe sahip olan *Lactococcus casei* prebiyotik özellikteki inulin ile desteklenmesi insan plazmasının antioksidan özelliğinin artmasına neden olduğu gösterilmiştir (Kleniewska *et al.* 2016). LAB'lerinin bu özelliklerinden dolayı gıda sanayinde ürünün kalitesi ve güvenliği açısından vazgeçilmez olduğu düşünülebilir.

Çalışmamızda, ana kaynağı yoğurt olmayan ve patojen üyeleri olan bakteriler grubunda değerlendirilen *Sphingomonas sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cyanobacteria* ve *Staphylococcus sp* tanımlanmıştır.

Sphingomonas; genel olarak bitki kök sistemlerinden, farklı toprak ve su habitatlarından, klinik örnekler gibi birçok kaynaktan izole edilmişlerdir. Patojen olarak tanımlanan türü; hastanelerdeki sıvı solüsyonlar, nemlendiriciler, solunum tedavi aletleri, su, hava, su şişeleri ve sıcaklık problemlerinden izole edilmişlerdir. Bunun dışında kan kültürü, vajinal sıvısı, idrar, balgam, burun akıntısı ve omurga sıvısından da izole edilmişlerdir (Balkwill *et al.* 2006). *Sphingomonas* üyeleri olarak tanımlanan türlerin filolojik, ekolojik ve fiziksel olarak çok fazla çeşitlilik göstermelerinden dolayı Takeuchi ve arkadaşları tarafından (2001) *Sphingobium*, *Novosphingobium*, *Sphingopyxis* ve *Sphingomonas* olarak 4 alt gruba ayrılmışlardır.

Buonaurio ve arkadaşları (2002)'de İspanya'da sarı kavunlarda kahverengi lekeler oluşmasına sebep olan bakterinin %99.9 benzerlikle *Sphingomonas melonies* olduğu rapor edilmiştir. Bu tür sekans analizi sonucu %98 *Sphingomonas mali*, *Sphingomonas pruni* ve %97.4 *Sphingomonas asaccharolytica* benzediği görülmüştür.

Kim ve arkadaşlarının 2006'da deniz suyundan izole ettikleri bakterinin 16S rDNA gen bölgesini analiz etmeleriyle bu bakterinin %99.9 oranında *Sphingomonas echinoides*'e benzediğini, bu türe en yakın türün %99.7 benzerlikle *Sphingomonas rhizogenes* ve %96.7 benzerlikle *Sphingomonas mali* olduğunu ispatlamışlardır.

Asker ve arkadaşları 2007'de içme suyundan izole ettikleri bakterinin %99.9 benzerlikle *Sphingomonadaceae bacterium* türü olduğunu rapor etmişlerdir. Bu türe en yakın türün %94.5 benzerlikle *Sphingomonas aerolata* ve %94 benzerlikle *Sphingomonasaurantiaca*, *Sphingomonasmelonies* ve %93.9 benzerlikle *Sphingomonas abaci*, *Sphingomonas asaccharolytica* olduğu rapor edilmiştir.

Brezilya'da pirinç bitkisinin köklerinde azot bağlanması üzerine yapılan çalışmada, topraktaki organik maddeleri parçalayarak bitkinin gerekli azot ihtiyacını gidermesini

sağlayan *Sphingomonas* bakterileri *Sphingomonas azodifigens sp. nov.* olarak bir grup altında toplanmıştır (Cua and Stein 2014).

Tarımsal havzalarda yüzey ve yeraltı suyunun önemli bir kirleticisi olan fenil üre izoproton ve difenil eter grubunun bağlı olduğu herbisit yüksek pH'lı (7.5) ortamlarda *Sphingomonas wittichi* tarafından parçalanabildiği yapılan çalışmalarda bulunmuştur (Ceyhan 2008; Keum *et al.* 2008).

Orman topraklarından izole edilen *Sphingomonas sp*'nin bir pestisit olan poliklorobifenili parçalayabildiği tespit edilmiştir (Mizukami- Murata *et al.* 2016).

Kirli topraklarda polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) *Sphingomonas* ve *Mycobacterium*'un bazı türleri tarafından parçalanarak, bu maddeyi enerji ve besin kaynağı olarak kullanan mikroorganizmalar üzerine inaktif etkiye sahip olduğu ispatlanmıştır. Ancak *Sphingomonas*'ın kendisi için spesifik besin gereksinimi hakkında yeterli bilgi yoktur (Leys *et al.* 2005).

Deniz suyundan izole edilen *Sphingomonas echinoides*'in pH 5.5-7.0 ve sıcaklık 35 °C'de en iyi şekilde enantioseçici epoksi hidrolaz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Kim *et al.* 2006)

Oksijenli ortamda *Sphingomonas xenophaga*'nın enerji ve karbon kaynağı olarak sakkarini parçalamanın yanında sülfat, amonyum ve muhtemelen karbondioksit ürettiği düşünülmektedir. Bakterinin hücresel yapısında sakkarinin parçalanma ürünü olan katekol maddesi tespit edilmiştir (Schleheck and Cook 2003).

Genellikle oligotrofik deniz sularından izole edilen *Sphingomonas alaskensis*'in birçok bakteri için inhibitör olan H₂O₂'ye karşı dirençli olduğu rapor edilmiştir (Ostrowski *et al.* 2001).

Tayland'ın belediye atık sularından izole edilen *Sphingomonas paucimobilis*'in miktarı 25-200 mg/L'ye kadar kadmiyum içeren ortamda hayatta kaldığı fakat gelişemediği saptanmıştır. Bu bakteri biyosorpsiyonla pH 6.0'da %84 oranında ortamdaki kadmiyum giderimini sağlamıştır. Bu çalışma ile canlı hücrelerin kadmiyum giderim kapasitesinin cansızlardan oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir (Tangaromsuk *et al.* 2002).

Çin'de bir atık su kanalında, canlı olmayan *Sphingomonas paucimobilis*'in ortamdaki Cr⁺⁴ ve Cu⁺² iyonlarının azaltılması için yapılan çalışmada, en iyi adsorpsiyonun Cu⁺² için; 20

°C’de ve pH 5.0’te 50.1 mg/g iken, Cr⁺⁴ için; 20 °C’de ve pH 2.0’de 28.5 mg/g ağır metali ortamdan uzaklaştırdığı rapor edilmiştir (Wang *et al.* 2010).

Endüstriyel atık sudaki sentetik boyaların varlığı mutajeniteye, sudaki yaşama ve insanlara toksisiteye bağlı olarak ciddi çevre sorunları yaratabilir. Yapılan bir çalışmada endüstriyel atık sudan izole edilen *Sphingomonas paucimobilis* suşunun metilen mavisinde (MM) renk giderme ve bozulması aerobik koşullar altında araştırılmıştır. Ortama 1000mg/L konsantrasyonunda MM ilave edilerek 5 gün sonunda %85 oranında renksizleşme olduğu görülmüştür. Bu durumda bakteri, boyanın hücre içine difüze olmasını engellemek için EPS ürettiği düşünülmektedir. Sonuçlar, *Sphingomonas paucimobilis*’in yüksek konsantrasyonlarda sentetik boyalar içeren endüstriyel atıkların biyolojik arıtımında iyi bir aday olduğunu göstermektedir (Noraini *et al.* 2012).

Sphingomonas sp. tarafından üretilen EPS sıcaklık, tuzluluk ve değişken pH’da oldukça stabil, emülsüfiye bir bileşik olmasından dolayı petrol sondaj sıvısı olarak kullanılabilir. Ayrıca petrolden kükürt giderme işleminde de kullanılabildiği belirtilmiştir (Balkwill *et al.* 2006).

Sera koşullarında yetiştirilen kış buğdaylarında maya ve küfler tarafından yaprakların gelişmemesi ve kafa hastalığı gibi olumsuz durumlar gözlenmektedir. *Sphingonomas* cinsinin süspansiyonuyla *Blumeria graminis fusarium sp. tiritici* tarafından meydana gelen enfeksiyon azaltılarak, buğday tohumunun daha iyi dolması ve yaprak büyüklüğünün normal olması sağlanarak biyolojik mücadelede başarılı olunmuştur (Wachowska *et al.* 2013).

İran’ın güney bölesinde dikenli bir bitki üzerinde, 5-8 mm çapında sarı, düzensiz lekelerin olduğu bölgeden izole edilip, 16S rDNA sekans analizi ile %97 benzerlik gösteren bakterinin *Sphingonomas melonis* olduğu rapor edilmiştir. Fakat bu bakterinin patojenlik özelliği hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır (Deldavleh *et al.* 2013).

Sindirim sisteminde prolin içeren peptitler proteaz enzimi tarafından parçalanamaz iken, *Flavobacterium meningosepticum*, *Myxococcus xanthus* ve *Sphingonomas capsulata* tarafından salgılanan prolin oligopeptidaz enzimi ile parçalanabildiği bulunmuştur. Dolayısıyla bu bakterilerden probiyotik olarak yararlanılabilir (Gass *et al.* 2005; Shan *et al.* 2005).

Balıklerde patojen etkiye sahip olan *Vibrio anguillarum* üzerine yapılan bir çalışmada, balık yemlerine farklı konsantrasyonlarda *Sphingonomas sp.* inoküle edilerek belli bir süre

depolanmış ve sonra balıklara verilmiştir. Önemli derecede patojenitenin azaldığı görülmüştür. Bu durum *Sphingonomas sp.*'in *Vibrio anguillarum* üzerine probiyotik antagonistik etkisinin olduğunu göstermiştir (Chaudhary and Qazi 2014).

Sphingonomas capsulata üzerine yapılan bir çalışmada kültür besiyerinden aminopeptidaz enzimi saflaştırılmıştır (Byun *et al.* 2001).

Sphingonomas sp.'in bazı türleri tarafından farklı pH uygulamasıyla ticari olarak rhansam gam üretilmiştir. Uygulamada ilk 10 saat pH 7.5'te tutularak mikroorganizmanın hücre büyümesi ve glikoz tüketim oranı sabit tutulmuştur. Glikozun kullanımıyla asitlik yükselip pH 7.0 civarına inmiştir. Bu koşullar altında en yüksek gam üretimi 18.6 g/L olarak gerçekleştirilmiştir (Xu *et al.* 2014).

Biyopolimer jellan gamı geniş bir endüstriyel uygulama yelpazesine sahip mikrobiyal ekstraselüler polisakkarittir. *Sphingonomas paucimobilis*, tuzlu bir ortamda fermentasyonla karbon kaynağı olarak nişasta (20 g/L), azot kaynağı olarak da triptofan (%0.5) kullanıldığında optimum şartlar altında 35.7 g/L jellan gamı üretebildiği belirlenmiştir. Ortama etremin (5 g/L) katılması jellan gam üretimini artırmıştır (Nampoothiri *et al.* 2003).

Sphingonomas paucimobilis fermentatif olarak basiyerine karbon kaynağı için 30 g/L glikoz eklenmesi ve 200 rpm'de 8 saat inkübe edilerek, 14,75 g/L jellan gamı ürettiği bulunmuştur (Wang *et al.* 2006,2007).

Sphingonomas paucimobilis tarafından üretilen jellan gamı optimize etmek için iyonik ve noniyonik sürfaktantlar (Twin-40, Twin-80 ve Triton x-100) farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır. En iyi optimize eden maddenin pH 6.0 ve 29.6° C'de 1 g/L kullanımı sonucunda 14.62 g/L üretimiyle Triton x-100 olduğu görülmüştür (Arochiasamy and Banik 2007).

Sphingonomas paucimobilis tarafından üretilen biyofilm birçok endüstriyel ortamda kullanılmasıyla, insan sağlığı ile ilişkili çevresel kirlenme ve kirlilik açısından önemlidir. Biyofilm oluşumunu optimize etmek için ortama farklı oranlarda Ca⁺² ve Mg⁺² iyonları eklenerek, önemli derecede biyofilm üretiminde artış olduğu görülmüştür (Güvensen vd 2012).

Sphingonomas elodea'nın fermentasyonu ile üretilen 2:1:1 oranında D-glikoz, D-glukoronik asit ve α-L-ramnozun tekrar birimleri olan tetrassakarit bir polisakkarittir. Jellan

gam olarak bilinen polisakkarit ticari anlam taşımaktadır. Gıda ve ilaç endüstrisinde; stabilize edici, jelleştirici, film oluşturucu, kapsülleyici ajan ve ilaç ambalajlama aracı olarak kullanılabilmektedir (Ahmad *et al.* 2015).

Patojen olmayan *Sphingonomas elodea* tarafından üretilen jellan gamını optimize etmek için yapılan çalışmalar sonucu daha zor çevre koşullarında yaşayabilen *Vitreoscilla sp.*'nin hemoglobinine ilgili genin aktarılmasıyla jellan gam üretimi normal üretimine göre %20 artış gösterdiği bulunmuştur (Wu *et al.* 2011).

Japonya'da tatlı sulardan izole edilen bazı *Sphingonomas* türleri gama ışınlarına maruz bırakıldığında zeaksantin, nostoksantin ve tanımlanamayan bir karotenoid türünü etkili bir şekilde ürettiği bulunmuştur (Asker *et al.* 2007).

Tütün artıklarından izole edilen *Acinetobacter sp.* ve *Sphingonomas sp.*'nin tütündeki nikotini parçaladığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu bakterilerin tütün bitkisindeki nikotini azalmak için kullanılabileceği öngörülmüştür (Wang *et al.* 2011).

Doğal öldürücü T hücreleri; kemik iliğinde üretilip kan, kemik ve dalakta bulunan, doğal bağışıklığın bir parçasını oluşturan, uyarılmaya ihtiyaç duymayan, mikropları direkt saldırarak öldürmeyip, virüslerle enfekte olmuş vücut ve kanser hücrelerine saldıran büyük görünümlü lenfositlerdir. Bu hücreler fagositoz yapmazlar, saldırdıkları hücrelere basınçla su ve iyon difüzyonunu sağlayarak hücrenin parçalanarak ölmesini sağlarlar. Yapılan bir çalışmada bazı *Sphingonomas sp.*'lerden elde edilen tetrasakkarit ve glikosfingolipitlerin T hücresi üzerine antijenik etkisinin olduğu bulunmuştur (Kinjo *et al.* 2008).

Sphingonomas paucimobilis kaynak olarak; su sistemleri, laboratuvar ortamları, hastane, solunum terapi alet ve ekipmanlarında bulunup nadiren üst solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olduğu bildirilmiştir. İlk defa bir hastada *Sphingonomas paucimobilis*'in enfeksiyonuyla osteomiyelit teşhisi konmuştur (Pascale *et al.* 2013).

Bitkilerde *Pseudomonas syringae* tarafından sebep olunan bakteriyel yaprak hastalığı üzerine yapılan çalışmada *Sphingonomas sp.*'nin bazı türlerinin koruyucu özelliği bulunmuştur (Vogel *et al.* 2012).

Pseudomonas aeruginosa; genel olarak toprakta, sularda, insan ve memeli hayvanların bağırsak florasında ve organik maddelerin bol bulunduğu hastane ortamlarında bulunan bazı

üyeleri patojen olan mikroorganizmadır. Bu bakterinin çalışmamızda bulunması temizliğin ve gerekli ısıt işlemin yetersiz olduğunu göstermektedir (Schönhuber *et al.* 1999).

Cyanobacteria, prokaryot grubunun en yaygın olanlardan biri olup kendi enerjisini yapısında bulundurduğu klorofil sayesinde üreten aynı zamanda mavi- yeşil alg olarak bilinen bir mikroorganizma cinsidir. Kaynak olarak, ıslak ve nemli yerlerde, bataklıklarda, içme sularında, mineralli sularda, gelgit olayının olduğu katmanlarda ve çöl üst tabakada yaygın olarak bulunmaktadır (Schönhuber *et al.* 1999).

Cyanobacteria 'lar bakteriler birçok metabolit oluştururlar. Bazı türleri karatenoid ürünlerini parçalayarak sularda yağimsı kokuya sebep olurken bazı türleri geosmin ve 2-metilsorbanol üreterek suyun toprağımsı ve küflü kokmasına sebep olur (Vincent and Laybourn-Parry 2008).

Cyanobacteria türlerinin kaynak açısından yoğurtla bir ilgisi bulunmamaktadır. Bu da gerek kullanılan malzemelerin, gerekse temizliğin yeterince olmadığını göstermektedir.

Staphylococcus epidermis ve *Staphylococcus caprei*; bu türler doğada çok yaygın olduğu gibi insanlar ve hayvanların derilerinde mukozalarında da bulunur. Hayvanlarda mastitis, botryomycosis, enzootik piyemi ve arthritise sebep olurken insanlarda keçi sütünden izole edilen *Staphylococcus caprae* bakteriyemi ve idrar yolları enfeksiyonuna sebep olduğu bulunmuştur (Vandenesch *et al.* 1995).

Belçika'da geviş getiren hayvan sürülerinden koagulaz negatif (-) *Staphylococcus* ' lar izole edilmiş ve *Staphylococcus caprei* 'nin sadece keçi sütünde bulunduğu inek ve koyun sütünde bulunmadığı rapor edilmiştir (Vandenesch *et al.* 1995; Vanderhaeghan *et al.* 2015).

Vankamisin antibiyotiği verilen bir hayvan *Staphylococcus epidermis* izole edilmiş ve bu bakterinin antibiyotiğe karşı biyofilm oluşturduğu görülmüştür (Gazzola and Cocconcelli 2008).

Japonya'da yapılan bir çalışmada, insanlarda *Staphylococcus epidermis* 'in teşhisi Kikuchi-fujimota hastalığının habercisi olabildiği görülmüştür (Kalambokis *et al.* 2008).

Bu çalışma yöresel yoğurt örneklerimiz için süt alınan hayvanda *Staphylococcus epidermis* (mastitis) olduğu veya süte bu mikroorganizmanın dış kaynaklardan bulaştığı ihtimali düşünülmektedir.

Patojen bakteriler olarak adlandırdığımız grup yüksek sıcaklıkta iyi gelişemez iken, LAB'leri sıcaklığa (45 °C) daha dirençlidir. Bu durum süte gerekli ısıl işlemin uygulanmadığını gösterir.

Bu çalışma sonucuna göre yöresel yoğurtta LAB'lerinin yanında patojenlerin de bulunması; süütün yeterince ısıl işlem görmediğini, ana kaynağı yoğurt olamayan patojenlerin buluşmuş olabileceğini, sağım yapılan hayvanların hastalıklı (mastitis) olabileceğini, sağım yapan insanda hastalık olabileceğini ve kullanılan alet- ekipmanın yeterince temiz olmadığı düşünülmektedir.

Ayrıca LAB'lerinin birçok patojen bakteri üzerine, ürettiği metabolitlerle inaktif etki yaptığı bilinmektedir. Bu çalışmada tanımladığımız *Lactococcus lactis subsp. lactis* türünün önceki çalışmalarda nisin (bakteriyosin) ürettiği belirtilmiştir. Fakat mevcut patojenler üzerine etki etmediği düşünülebilir ya da bununla ilgili tekrar çalışılabilir.

Çalışma bulgularımızın önemli bir kısmını oluşturan *Sphingonomas sp.*'in bazı suşları üzerinde; ekstraselüler üretimi, başka bakteriler üzerine inhibitör veya aktivatör özelliği, bulundukları kaynaklar, insan ve çevre üzerine etkileri gibi çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Benzer çalışmalar bizim tanımladığımız bakteriler için de çalışılabilir.

Bu tez kapsamında yaptığımız çalışma Ağrı ili sınırları içindeki bazı yöresel yoğurt örneklerinden bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve tanısı amacıyla yapılmış ilk çalışma olması sebebiyle büyük bir öneme sahiptir. Laktik asit bakterilerinin insan sağlığı üzerine etkileri göz önüne alındığında çalışmamızda elde ettiğimiz bakterilerin vazgeçilmez bir gıda olan yoğurttaki yararlı ve patojen bakterilerin hangileri olabileceği, patojen olarak değerlendirilen bakterilerin bu gıda ürününden bertarafı için bazı önlemlerin alınması gerektiğini göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada izole edilen ve literatür'e göre yararlı oldukları rapor edilen bakterilerin söz konusu özelliklerinin sonraki çalışmalarda araştırılarak gıda ve sağlık alanlarına kazandırılması bakımından da son derece önemlidir. Söz konusu yararlı bakterilerde probitoyotik özelliğin olması için; asit ve safra tuzlarına toleranslı, mukoza ve epitel yüzeye tutunabilme, patojen bakterilere karşı antimikrobiyal madde üretebilme ve safra tuzlarını parçalayabilme yeteneğine sahip olması gerektiği belirtilmiştir (Goudarzi et al. 2014). Bu bilgiler ışığında tanımladığımız bakterilerin probiyotik özelliklerinin olup olmadığı ilerleyen süreçte çalışılması düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmad, N. H., Ahmed, J., Hashim, D. M., Manap, Y. A., and Mustafa, S. 2015. Oscillatory and steady shear rheology of gellan/dextran blends. *Journal of food science and technology*, 52(5), 2902-2909.
- Arockiasamy, S., and Banik, R. M. 2008. Optimization of gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 with nonionic surfactants using central composite design. *Journal of bioscience and bioengineering*, 105(3), 204-210.
- Asker, D., Beppu, T., and Ueda, K. 2007. Unique diversity of carotenoid-producing bacteria isolated from Misasa, a radioactive site in Japan. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(2), 383-392.
- Ateş, G., and Patır, B. 2001. Starter Kültürlü Tulum Peynirinin olgunlaşması sırasında duyuşal, kimyasal ve mikrobiyolojik niteliklerinde meydana gelen değişimler üzerine araştırmalar. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bil. Dergisi*, 15(1), 45-56.
- Atabey, C. 2011. Piyasada satıőa sunulan peynirlerden elde edilen jenerik *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik dirençliliklerinin belirlenerek, mastitis kontrol ve tedavi programlarında kullanılan antibiyotiklerle ilişkisinin belirlenmesi.
- Asker, D., Beppu, T., and Ueda, K. 2007. *Sphingomonas jaspis* sp. nov., a novel carotenoid-producing bacterium isolated from Misasa, Tottori, Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(7), 1435-1441.
- Balkwill, D. L., Fredrickson, J. K., and Romine, M. F. 2006. *Sphingomonas* and related genera. In *The prokaryotes* (pp. 605-629). Springer New York.
- Batdorj, B., Dalgarrondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Metro, F., Prevost, H., and Haertle, T. 2006. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), 837-848.
- Buonaurio, R., Stravato, V. M., Kosako, Y., Fujiwara, N., Naka, T., Kobayashi, K., and Yabuuchi, E. 2002. *Sphingomonas melonis* sp. nov., a novel pathogen that causes

- brown spots on yellow Spanish melon fruits. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(6), 2081-2087.
- Byun, T., Tang, M., Sloma, A., Brown, K. M., Marumoto, C., Fujii, M., & Blinkovsky, A. M. 2001. Aminopeptidase from *Sphingomonas capsulata*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 17902-17907.
- Canan E., Bige, Neslihan Ö., Utku Tamer C.E., Karaman B., Aydoğan N., and Çopur Ö.U., 2004, Bazı geleneksel fermente gıdalarımız ve sağlık üzerindeki etkileri. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 23-24 Eylül, Van.
- Ceyhan, N. 2008. *Çeşitli sistemlerde sorun oluşturan hücre dışı polisakkarit üreten mikroorganizmaların polisakkaritlerinin biyoparçalanması ve parçalanma etkinliğinin saptanması* (Doctoral dissertation, Ege Üniversitesi).
- Chuard, C., and Reller, L. B. 1998. Bile-esculin test for presumptive identification of enterococci and streptococci: effects of bile concentration, inoculation technique, and incubation time. *Journal of clinical microbiology*, 36(4), 1135-1136.
- Chaudhary, A., and Qazi, J. I. 2014. Probiotic Antagonism of *Sphingomonas* sp. against *Vibrio anguillarum* Exposed *Labeo rohita* Fingerlings. *Advances in Life Sciences*, 4(3), 156-165.
- COEURET, V., DUBERNET, S., BERNARDEAU, M., GUEGUEN, M. and VERNOUX, J. P., 2003. Isolation, Characterisation and Identification of *Lactobacilli* Focusing Mainly on Cheeses and Other Dairy Products, *Lait*, 83:269-306.
- Contreras, A., Corrales, J. C., Sierra, D., and Marco, J. 1995. Prevalence and aetiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goats. *Small Ruminant Research*, 17(1), 71-78.
- Cua, L. S., and Stein, L. Y. 2014. Characterization of denitrifying activity by the alphaproteobacterium, *Sphingomonas wittichii* RW1. *Frontiers in microbiology*, 5.
- COŞAR, M., TUNCER, İ., ve ARSLAN, U. 2009. KAN KÜLTÜRLERİNDE ÜREYEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA SUŞLARININ ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLİ.

- Çaklı, Ş., ve Kışla, D. 2003. Su Ürünlerinde Mikrobiyal Kökenli Bozulmalar ve Önleme Yöntemleri. *Su Ürünleri Dergisi*, 20(1).
- ÇON, A. H., ve GÖKALP, H. Y. 2002. Afyon'da Büyük Kapasiteli Etçifli işletmelerinde Üretilen Sucuk Örneklerinin Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin Periyodik Olarak Belirlenmesi. *Turk J Vet Anim Sci*, 26, 11-16.
- Çubukçu, S., Erzurum piyasasında tüketime sunulan dondurmaların mikrobiyolojik kalitesi. Yüksek lisans tezi. Microbial quality of ice cream sold by retail outlets in Erzurum. 2016.
- Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. 2005. The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. *Environmental microbiology*, 7(8), 1239-1247.
- Deldavleh, M., Bahmani, K., and Harighi, B. 2013. Bacterial leaf blight of Christ's thorn in Iran: a new disease caused by *Sphingomonas* sp. *Journal of Plant Pathology*, 75-78.
- Devriese, L. A., Poutrel, B., Kilpper-Bälz, R., and Schleifer, K. H. 1983. *Staphylococcus gallinarum* and *Staphylococcus caprae*, two new species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 33(3), 480-486.
- Dinçer, E., Kıvanç, M., ve Karaca, H. 2010. Biyokoruyucu Olarak Laktik Asit Bakterileri. *Gıda Dergisi*, 35(1).
- Duboc, P., ve Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11(9), 759-768.
- Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., and Litopoulou-Tzanetaki, E. 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), 861-870.
- Dündar, H., 2006. Characterization and purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Middle East Technical University, Department of Biotechnology, Ph.D. Thesis, Ankara, 195.

- DÜNDAR, D., & TAMER, G. S., 2009. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal direnci: Üç yıllık değerlendirme. *ANKEM Derg*, 23(1), 17-21.
- Eschrich, S., Yang, I., Bloom, G., Kwong, K. Y., Boulware, D., Cantor, A., and Quackenbush, J. 2005. Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 23(15), 3526-3535.
- Evren, M., Albayram, C., ve Apan, M. 2006. Laktik Asit Bakterilerinin Oluşturduğu Antimikrobiyal Maddeler. *Türkiye*, 9, 24-26.
- FAN, J., MA, C., WU, C., WANG, Y. Q., ZHENG, Y., & CHANG, H. J. 2013. Optimization of Productive Technology of Complex Functional Yoghurt with Peanut and Corn. *Journal of Chongqing Technology and Business University (Natural Science Edition)*, 5, 015.
- Farnworth, E. R. T. (Ed.), 2008. *Handbook of fermented functional foods*. CRC press.
- Fortina, M. G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A., and Manachini, P. L. 2003. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiology*, 20(4), 397-404.
- Franz, D. R., Jahrling, P. B., Friedlander, A. M., McClain, D. J., Hoover, D. L., Bryne, W. R., and Eitzen, E. M. 1997. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *Jama*, 278(5), 399-411.
- Freeman, V. 2015. *Pseudomonas aeruginosa* Identification.
- Furtado, D. N., Todorov, S. D., Landgraf, M., Destro, M. T., and Franco, B. D. 2014. Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp: *lactis* DF04Mi isolated from goat milk: Evaluation of the probiotic potential. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), 1047-1054.
- Gass, J., Ehren, J., Strohmeier, G., Isaacs, I., and Khosla, C. 2005. Fermentation, purification, formulation, and pharmacological evaluation of a prolyl endopeptidase from *Myxococcus xanthus*: implications for Celiac Sprue therapy. *Biotechnology and bioengineering*, 92(6), 674-684.

- Galvez, A., Abriouel, H., López, R. L., and Omar, N. B. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International journal of food microbiology*, 120(1), 51-70.
- Gazzola, S., and Cocconcelli, P. S. 2008. Vancomycin heteroresistance and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from food. *Microbiology*, 154(10), 3224-3231.
- GIRAFFA, G., LAZZI, C., GATTI, M., ROSSETTI, L., MORA, D., NEVIANI E., 2003. Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes. *International Journal of Food Microbiology*. 82: 163- 172.
- Giraffa, G., Lazzi, C., Gatti, M., Rossetti, L., Mora, D., and Neviani, E., 2003. Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes. *International journal of food microbiology*, 82(2), 163-172.
- Goudarzi, M., Goudarzi, H., and Rashidan, M. 2014. Probiotics: an update on mechanisms of action and clinical applications. *Novelty in Biomedicine*, 2(1), 22-30.
- Gözde, O. K. C. U., ALTUNTAŞ, E. G., & AYHAN, K., 2011. Laktik Asit Fermentasyonunda Fenolik Bileşikler ve Önemi. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 1(1), 51-64.
- Guvensen, N. C., Demir, S., ve Ozdemir, G. 2012. Effects of magnesium and calcium cations on biofilm formation by *Sphingomonas Paucimobilis* from an industrial environment. *Fresenius Environ. Bull*, 21, 3685-3692.
- Gürsoy, A., Durlu-Özkaya, F., Yildiz, F., ve Aslim, B. (2010). Set type yoghurt production by exopolysaccharide producing turkish origin domestic strains of *Streptococcus thermophilus* (W22) and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (B3). *Kafkas Üniversitesi Veteriner Facultesi Dergisi*, 16, S81-S86.
- Halkman, A. K., 2005. Merck gıda mikrobiyolojisi uygulamaları. Ed. AK Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara.
- Haghshenas, B., Abdullah, N., Nami, Y., Radiah, D., Rosli, R., and Khosroushahi, A. Y. 2014. Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. *Anaerobe*, 30, 51-59.

- Hansen, E. B., 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International journal of food microbiology*, 78(1), 119-131.
- Harley, J. P., and Prescott, L. M. 2002. Bacterial Morphology and Staining. *Laboratory Exercises in Microbiology, 5th Edition, The McGraw-Hill Companies, New York*, 31-36.
- Hassan, A. N., Ipsen, R., Janzen, T. and Qvist, K. B. 2003. Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1632-1638.
- Hayaloğlu, A. A., & Erginkaya, Z., 2001. Gıda endüstrisinde kullanılan laktik asit bakterileri. *Gıda Teknolojileri Derneği Yayın*, (23).
- Haynes, W. C. 1951. *Pseudomonas aeruginosa*---its Characterization and Identification. *Microbiology*, 5(5), 939-950.
- Heilmann, C., Thumm, G., Chhatwal, G. S., Hartleib, J., Uekötter, A., and Peters, G. 2003. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 149(10), 2769-2778.
- Heo, W. S., Kim, Y. R., Kim, E. Y., Bai, S. C., and Kong, I. S. 2013. Effects of dietary probiotic, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 376, 20-24.
- Holo, H., and Nes, I. F. 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(12), 3119-3123.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., ve Yıldırım, M., 2008. Yöresel peynirden antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı.
- Jeyaram, K., Singh, T. A., Romi, W., Devi, A. R., Singh, W. M., Dayanidhi, H., and Tamang, J. P. 2009. Traditional fermented foods of Manipur. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 8(1), 115-121.
- John, R. P., Nampoothiri, K. M., and Pandey, A., 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(3), 524-534.

- Kaban, G. (2007). Geleneksel Olarak Üretilen Sucuklardan Laktik Asit Bakterileri ile Katalaz Pozitif Kokların İzolasyonu-İdentifikasyonu, Üretimde Kullanılabilme İmkanları ve Uçucu Bileşikler Üzerine Etkileri. Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği. *Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi Erzurum.*
- Kalambokis, G., Economou, G., Nikas, S., Bai, M., Lampri, E., Kosta, P., and Tsianos, E. V. 2008. Concurrent development of spontaneous pyomyositis due to *Staphylococcus epidermidis* and Kikuchi-Fujimoto disease. *Internal Medicine*, 47(24), 2139-2143.
- KAYA, M., ve GÖKALP, H. Y. 2005. The behavior of *Listeria monocytogenes* in sucuks produced with different lactic starter cultures. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(6), 1113-1120.
- Keum, Y. S., Lee, Y. J., and Kim, J. H. 2008. Metabolism of nitrodiphenyl ether herbicides by dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas wittichii* RW1. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(19), 9146-9151.
- Kılıç, N. K., Stensballe, A., Otzen, D. E. and Dönmez, G. 2010. Proteomic changes in response to chromium (VI) toxicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource technology*, 101(7), 2134-2140.
- Kılıç, S., 2008. Süt endüstrisinde laktik asit bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi.
- Kırzioğlu, Z., ve Önel, S. Ö. 2014. DIŞ ÇÜRÜKLERİNİ ÖNLEMEDE KULLANILAN ALTERNATİF MATERYALLER. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 9(9).
- Kim, H. S., Lee, O. K., Lee, S. J., Hwang, S., Kim, S. J., Yang, S. H., and Lee, E. Y. 2006. Enantioselective epoxide hydrolase activity of a newly isolated microorganism, *Sphingomonas echinoides* EH-983, from seawater. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41(3), 130-135.
- Kim, H. S., Lee, O. K., Lee, S. J., Hwang, S., Kim, S. J., Yang, S. H., ... and Lee, E. Y. 2006. Enantioselective epoxide hydrolase activity of a newly isolated microorganism, *Sphingomonas echinoides* EH-983, from seawater. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41(3), 130-135.

- Kinjo, Y., Pei, B., Bufali, S., Raju, R., Richardson, S. K., Imamura, M., and Wong, C. H. 2008. Natural Sphingomonas glycolipids vary greatly in their ability to activate natural killer T cells. *Chemistry & biology*, 15(7), 654-664.
- Kiviharju, K., Leisola, M., and Eerikäinen, T. 2005. Optimization of a Bifidobacterium longum production process. *Journal of biotechnology*, 117(3), 299-308.
- KLEIN, G., PACK, A., BONAPARTE, C., and REUTER, G., 1998. Taxonomy and Physiology of Probiotic Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 103-125.
- Kleniewska, P., Hoffmann, A., Pniewska, E., and Pawliczak, R. 2016. The Influence of Probiotic Lactobacillus casei in Combination with Prebiotic Inulin on the Antioxidant Capacity of Human Plasma. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Kloos, W. E., and Wolfshohl, J. F. 1982. Identification of Staphylococcus species with the API STAPH-IDENT system. *Journal of Clinical Microbiology*, 16(3), 509-516.
- Kuehn, T., Bauerfeind, I., Fehm, T., Fleige, B., Hausschild, M., Helms, G., .and Schmatloch, S. 2013. Sentinel-lymph-node biopsy in patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy (SENTINA): a prospective, multicentre cohort study. *The lancet oncology*, 14(7), 609-618.
- Kunte, H. J., 2005. K⁺ transport and its role for osmoregulation in a halophilic member of the Bacteria domain: characterization of the K⁺ uptake systems from Halomonas elongata. In *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya* (pp. 287-300). Springer Netherlands.
- Kwak H.S., Park S.K. and Kim D.S., 1996. Biostabilization of kefir with a nonlactose-fermenting yeast, *J. Dairy Scien.*, 79(6), 937-942.
- LEROY, F., DE VUYST, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 67- 68.
- Leys, N. M., Bastiaens, L., Verstraete, W., and Springael, D. 2005. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by Mycobacterium and Sphingomonas in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(6), 726-736.

- Li, Z., Kosorok, M. R., Farrell, P. M., Laxova, A., West, S. E., Green, C. G., and Splaingard, M. L. 2005. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *Jama*, 293(5), 581-588.
- Mack, D., Davies, A. P., Harris, L. G., Jeeves, R., Pascoe, B., Knobloch, J. K. M., and Wilkinson, T. S., 2013. *Staphylococcus epidermidis* in biomaterial-associated infections. In *Biomaterials Associated Infection* (pp. 25-56). Springer New York.
- Marti-Mestres, G., and Nielloud, F. 2002. Emulsions in health care applications—an overview. *Journal of dispersion science and technology*, 23(1-3), 419-439.
- Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M., and Bergeron, M. G. 1996. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(12), 2888-2893.
- MCKINLEY, M., 2005. The nutrition and health benefits of yoghurt. *Int. Journal of Dairy Technology*. 58: 1- 12.
- Meziane, M., El Hameur, H., Boukrabouza, S., and Bensehaila, S. 2011. Lactic acid and hydrogen peroxide production by free and immobilization cells of two *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in a sugar molasses medium. *African Journal of Biotechnology*, 10(74), 16953.
- Milci, S., ve Yaygın, H. 2005. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler ve süt ürünlerindeki fonksiyonları. *GIDA/THE JOURNAL OF FOOD*, 30(2).
- Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., and Radbruch, A., 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11(2), 231-238.
- Mizukami-Murata, S., Sakakibara, F., Fujita, K., Fukuda, M., Kuramata, M., and Takagi, K. 2016. Detoxification of hydroxylated polychlorobiphenyls by *Sphingomonas* sp. strain N-9 isolated from forest soil. *Chemosphere*, 165, 173-182.
- Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S.,
Marotta, F., Singh, V., Parkash, O. and Yadav, H., 2008. Molecular
approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria,
Journal of Digestive Diseases, 9: 190 – 198p.

- Moreno, M. F., Rea, M. C., Cogan, T. M., and De Vuyst, L. 2003. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology*, 81(1), 73-84.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., and Pfaller, M. A., 2015. *Medical microbiology*. Elsevier Health Sciences.
- Murphy, T. F., Brauer, A. L., Eschberger, K., Lobbins, P., Grove, L., Cai, X., and Sethi, S. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 177(8), 853-860.
- Nampoothiri, K. M., Singhanian, R. R., Sabarinath, C., and Pandey, A. 2003. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. *Process Biochemistry*, 38(11), 1513-1519.
- Namvar, A. E., Bastarahang, S., Abbasi, N., Ghehi, G. S., Farhadbakhtiarian, S., Arezi, P., and Chermahin, S. G. 2014. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS hygiene and infection control*, 9(3).
- Noraini, C. H. C., Morad, N., Norli, I., Teng, T. T., and Ogugbue, C. J. 2012. Methylene blue degradation by *Sphingomonas paucimobilis* under aerobic conditions. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(8), 5131-5142.
- Oikonomou, G., Bicalho, M. L., Meira, E., Rossi, R. E., Foditsch, C., Machado, V. S., and Bicalho, R. C. 2014. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. *PloS one*, 9(1), e85904.
- Ostrowski, M., Cavicchioli, R., Blaauw, M., and Gottschal, J. C. 2001. Specific Growth Rate Plays a Critical Role in Hydrogen Peroxide Resistance of the Marine Oligotrophic Ultramicrobacterium *Sphingomonas alaskensis* Strain RB2256. *Applied and environmental microbiology*, 67(3), 1292-1299.
- Otto, M. 2009. *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(8), 555-567.
- Özdemir, H. 1999. Türk fermente sucuğunun florasındaki dominant *Laktobasil* türlerinin sucuğun organoleptik nitelikleri ile ilişkisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 46(2-3), 189-198.

- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., and Kotzekidou, P., 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat science*, 65(2), 859-867.
- Pascale, R., Russo, E., Esposito, I., Leone, S., and Esposito, S. 2013. *Sphingomonas paucimobilis* osteomyelitis in an immunocompetent patient. A rare case report and literature review. *New Microbiol*, 36(4), 423-26.
- Petit, C., Levilliers, J. and Hardelin, J. P., 2001. Molecular genetics of hearing loss. *Annual review of genetics*, 35(1), 589-645.
- Pourahmad, R., and ASSADI, M., 2007. Use of isolated autochthonous starter cultures in yogurt production. *International journal of dairy technology*, 60(4), 259-262.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and Cotter, P. D. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 664-698.
- Rasic, J. L., and Kurmann, J. A., 1978. Yoghurt: Scientific Grounds. *Technology, Manufacture and Preparations*, 194.
- Schleheck, D., and Cook, A. M. 2003. Saccharin as a sole source of carbon and energy for *Sphingomonas xenophaga* SKN. *Archives of microbiology*, 179(3), 191-196.
- Schönhuber, W., Zarda, B., Eix, S., Rippka, R., Herdman, M., Ludwig, W., and Amann, R., 1999. In situ identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and environmental microbiology*, 65(3), 1259-1267.
- Seçkin, A. K., GURSOY, O., KINIK, O., ve AKBULUT, N., 2005. Conjugated linoleic acid (CLA) concentration, fatty acid composition and cholesterol content of some Turkish dairy products. *LWT-Food Science and Technology*, 38(8), 909-915.
- SERRA, M., TRUJILLO, A. J., GUAMIS, B., and FERRAGUT, V., 2009. Flavour profiles and survival of starter cultures of yoghurt produced from high-pressure homogenized milk. *International Dairy Journal* 19: 100– 106.
- Sezer, G., ve Güven, A. 2009. Investigation of bacteriocin production capability of lactic acid bacteria isolated from foods. *Lafkas Univ Vet Fak Derg*, 15, 45-50.

Stiles, M. E., and Holzapfel, W. H. 1997.

Shan, L., Mathews, I. I., and Khosla, C. 2005. Structural and mechanistic analysis of two prolyl endopeptidases: role of interdomain dynamics in catalysis and specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(10), 3599-3604.

Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36(1), 1-29.

Takeuchi, M., Hamana, K., and Hiraishi, A. 2001. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(4), 1405-1417.

TAMIME, A. Y., DEETH, B. C., 1980. Yoghurt: Technology and Biochemistry. *Journal of Food Protection*. 43: 939- 977.

Tamime, A. Y., and Robinson, R. K., 1988. Fermented milks and their future trends. Part II. Technological aspects. *Journal of Dairy Research*, 55(02), 281-307.

Tamime, A. Y., and Robinson, R. K., 2007. *Tamime and Robinson's yoghurt: science and technology*. Elsevier.

Tangaromsuk, J., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., and Upatham, E. S. 2002. Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass. *Bioresource Technology*, 85(1), 103-105.

Tokatlı, M., Dursun, D., Arslankoz, N., Şanlıbaba, P., & Özçelik, F. 2012. Turşu Üretiminde Laktik Asit Bakterilerinin Önemi. *Academic Food Journal/Akademik GID*

Tuncer, Y., Özden, B., ve Avşaroğlu, M. D. 2008. Bozanın Bazı Mikrobiyolojik Özelliklerinin ve Laktik Asit Bakterisi İzolatlarının Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi. *SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(1).

Turantaş, F., 1999. Fermantasyonda rol oynayan mikroorganizmalar. *Gıda*

Mikrobiyolojisi, 2. Baskı, Ed: A. Ünlütürk ve F. Turantaş. Mengi Tan Basımevi,

Çınarlı, İzmir, 425-445.

- Temmerman, R., Huys, G. and Swings, J., 2004, Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods, *Trends in Food Science & Technology*, 15: 348–359p.
- Trias, R., Bañeras, L., Seguí, E. M., and Romanyó, E. B., 2008. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International microbiology: official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 11(4), 231-236.
- Tunail, N. 2009. *Mikrobiyoloji*. Danone Enstitüsü Derneği.
- UYLAŞER, V., YÖNEL, S. P., ve SAVAŞ, E. 2008 DOĞAL ANTİMİKROBİYAL BİR BİLEŞİK: BAKTERİYOSİN. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, (10).
- Xu, X. Y., Zhu, P., Li, S., Chen, X. Y., Jiang, X. H., and Xu, H. 2014. Rhamsan gum production by *Sphingomonas* sp. CGMCC 6833 using a two-stage agitation speed control strategy. *Biotechnology and applied biochemistry*, 61(4), 453-458.
- Vandenesch, F., Eykyn, S. J., Bes, M., Meugnier, H., Fleurette, J., and Etienne, J., 1995. Identification and ribotypes of *Staphylococcus caprae* isolates isolated as human pathogens and from goat milk. *Journal of clinical microbiology*, 33(4), 888-892.
- Vanderhaeghen, W., Piepers, S., Leroy, F., Van Coillie, E., Haesebrouck, F., and De Vliegher, S. 2015. Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. *The Veterinary Journal*, 203(1), 44-51.
- Vincent, W. F., and Laybourn-Parry, J., 2008. *Polar lakes and rivers: limnology of Arctic and Antarctic aquatic ecosystems*. Oxford university press.
- Vogel, C., Innerebner, G., Zingg, J., Guder, J., and Vorholt, J. A. 2012. Forward genetic in planta screen for identification of plant-protective traits of *Sphingomonas* sp. strain Fr1 against *Pseudomonas syringae* DC3000. *Applied and environmental microbiology*, 78(16), 5529-5535.
- Wachowska, U., Irzykowski, W., Jędrzycka, M., Stasiulewicz-Paluch, A. D., & Głowacka, K. 2013. Biological control of winter wheat pathogens with the use of antagonistic

- Sphingomonas bacteria under greenhouse conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 23(10), 1110-1122.
- Wang, X., Xu, P., Yuan, Y., Liu, C., Zhang, D., Yang, Z., and Ma, C. 2006. Modeling for gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 in a simplified medium. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3367-3374.
- Wang, X., Yuan, Y., Wang, K., Zhang, D., Yang, Z., and Xu, P. 2007. Deproteinization of gellan gum produced by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. *Journal of biotechnology*, 128(2), 403-407.
- Wang, X. S., Huang, L. P., Li, Y., and Chen, J. 2010. Removal of copper (II) ions from aqueous solution using *Sphingomonas paucimobilis* biomass. *Adsorption Science & Technology*, 28(2), 137-147.
- Wang, M., Yang, G., Wang, X., Yao, Y., Min, H., and Lu, Z. 2011. Nicotine degradation by two novel bacterial isolates of *Acinetobacter* sp. TW and *Sphingomonas* sp. TY and their responses in the presence of neonicotinoid insecticides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(7), 1633-1640.
- Ward, L. J. H., and Timmins, M. J. 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in*
- Weinrichter, B., Sollberger, H., Ginzinger, W., Jaros, D., and Rohm, H., 2004. Adjunct starter properties affect characteristic features of Swiss-type cheeses. *Food/Nahrung*, 48(1), 73-79.
- Witthuhn, R. C., Schoeman, T., and Britz, T. J., 2005. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, 15(4), 383-389.
- Whittenbury, R., 1964. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid
- Wu, X. C., Chen, Y. M., Li, Y. D., Li, O., Zhu, L., Qian, C. D., and Teng, Y. 2011. Constitutive expression of *Vitreoscilla* haemoglobin in *Sphingomonas elodea* to improve gellan gum production. *Journal of applied microbiology*, 110(2), 422-430.
- Yabuuchi, E., Yano, I., Oyaizu, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., and Yamamoto, H. 1990. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas*

parapaucimobilis sp. nov., Sphingomonas yanoikuyae sp. nov., Sphingomonas adhaesiva sp. nov., Sphingomonas capsulata comb. nov., and two genospecies of the genus Sphingomonas. *Microbiology and immunology*, 34(2), 99-119.

Yıldırım, Z., ve Yıldırım, M. 2000. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinlerin genel karakteristikleri. *Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri, VI. Süt ve Süt Ürünleri Tebliğler Kitabı*, 247-253.

YÖRÜK, G. N., ve GÜNER, A. 2011. Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve Weissella türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2).

Yusuf, A. L. A. N., ve DIĞRAK, M., 2012. Doğal turşulardan izole edilen Lactobacillus plantarum suşlarının izolasyonu ve tanımlanması. *Kahramanmaraş Sutcu Imam University Journal Of Natural Sciences*, 15(2), 46-49.

Yüksekdağ, Z. N., ve Beyatlı, Y. 2009. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Fizyolojik, Biyokimyasal, Plazmit DNA ve Protein Profil Özelliklerinin İncelenmesi. *Gıda Dergisi*, 34(2).

Zhang, R., Huo, W., Zhu, W., and Mao, S. 2015. Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), 1072-1079.

Zübeyde, Ö. N. E. R. 2012. Listeria monocytogenes' in İnaktivasyonu Üzerine Isıl Olmayan İşlemlerin Etkisi. *Electronic Journal of Food Technologies*, 7(1), 12-20.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	ABDULLAH DEMİRCİ
Doğum Yeri ve Tarihi	AKKUŞ/ORDU 20.02.1987
Eğitim Durumu	
Lisans Öğrenimi	GIDA MÜHENDİSLİĞİ
Yüksek Lisans Öğrenimi	KİMYA ANABİLİMDALI BİYOKİMYA BİLİMDALI (alan dışı)
Bildiği Yabancı Diller	İNGİLİZCE
Bilimsel Faaliyetler	-
İş Deneyimi	
Stajlar	AYBEK GIDA KONTROL LAB./İZMİR
Projeler	-
Çalıştığı Kurumlar	SOYKAN A.Ş./ ANKARA
İletişim	
E-posta Adresi	gm_abdullah@hotmail.com/gmabdullahdemirci@gmail.com
Mezuniyet Tarihileri	
12.06.2009 LİSANS	
14.03.2017 YÜKSEK LİSANS	