

## KEFİR ÖRNEKLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sevim Feyza Erdoğan<sup>1\*</sup>, Barış Bostancı<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Şuhot Sağlık Hizmetleri MYO, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Afyonkarahisar, Türkiye

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Medikal Biyoloji ve Genetik AbD, Afyonkarahisar, Türkiye

Geliş / Received: 28.07.2019; Kabul / Accepted: 08.12.2019; Online baskı / Published online: 21.01.2020

Erdoğan, S.F., Bostancı, B. (2020). Kefir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve antimikrobiyel etkinliklerinin değerlendirilmesi. GIDA (2019) 45 (1): 72-80 doi: 10.15237/gida.GD19111

Erdoğan, S.F., Bostancı, B. (2020). Isolation and identification of lactic acid bacteria from kefir samples and evaluation of their antimicrobial effects. GIDA (2019) 45 (1): 72-80 doi: 10.15237/gida.GD19111

### ÖZ

Bu çalışmada, Afyonkarahisar İli'nde satışa sunulan markasız, paketsiz kefir örneklerindeki laktik asit bakterilerinin izolasyonu, tanımlanması ve patojen test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyel etkinliği değerlendirilmiştir. 5 farklı kefir örneğinden 6 adet laktik asit bakterisi izole edilmiş ve izolatların moleküler tanımlanması için 16S rDNA PZR analizi yapılmıştır. İzolatların 16S rDNA sekans analiz sonuçlarına göre, izole edilen bakteriler; *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus durans* türleri olarak tanımlanmıştır. Laktik asit bakteri izolatlarının patojen test mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyel aktivitesini belirlemek için agar spot ve agar kuyu difüzyon testi kullanılmıştır. Tüm izolatlar, test edilen patojen mikroorganizmalar üzerinde farklı seviyelerde antimikrobiyel etki göstermiştir. Laktik asit bakteri izolatları, *Klebsiella pneumoniae* NRRLB 4420, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 1911 üzerinde diğer test mikroorganizmalarına (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Bacillus subtilis* NRS-744) göre daha yüksek antimikrobiyel etki göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Antimikrobiyel etki, İzolasyon, İdentifikasyon, Kefir, Laktik asit bakterileri

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM KEFIR SAMPLES AND EVALUATION OF THEIR ANTIMICROBIAL EFFECTS

### ABSTRACT

In this study, lactic acid bacteria were isolated from unmarked, unpacked kefir samples that sold in Afyonkarahisar province, and their antimicrobial activity on pathogen test microorganisms were evaluated. 6 lactic acid bacteria were isolated from 5 different kefir samples and 16S rDNA PCR analysis was performed for molecular identifications of these isolates. According to results of 16S rDNA PCR analysis; isolated bacteria from kefir samples were identified as *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans*. Agar spot and agar-well diffusion assay methods were used to determine the antimicrobial activity of the lactic acid bacteria isolates on pathogen test microorganisms. All of the isolates showed antimicrobial activity at different levels on the tested pathogenic microorganisms. Lactic acid bacteria isolates showed higher antimicrobial activity on *Klebsiella pneumoniae* NRRLB 4420, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 1911 than other test microorganisms (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Bacillus subtilis* NRS-744).

**Key words:** Antimicrobial effect, Isolation, İdentification, Kefir, Lactic acid bacteria

\* Yazışmadan sorumlu yazar/Corresponding author

✉: sfeyza@aku.edu.tr

☎: (+90) 505 494 9906

☎: (+90) 272 718 1159

Sevim Feyza Erdoğan; ORCID no: 0000-0002-4319-7558

Barış Bostancı; ORCID no: 0000-0002-5068-1268

### GİRİŞ

Gıdalar, mikroorganizma çeşitliliği bakımından oldukça zengindir. Bunlardan bazıları gıda üretiminde kullanılırken, bazıları ise gıdaların bozulmasına ve gıda kaynaklı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır ancak antibiyotiklere karşı mikroorganizmalarda direnç oluşması tüm dünyada önemli bir problem haline gelmiştir (Blaser, 2011; White, 2011; Cooper ve Shlaes, 2011; Arabestani vd., 2014). Mikroorganizmaların faaliyetleri nedeniyle gıda ürünlerinin bozulmaları, yüksek miktarda ekonomik kayıpların meydana gelmesine sebep olmaktadır. Gıdaları mikroorganizmalara karşı korumak amacıyla kullanılan kimyasal katkı maddeleri ise canlılar üzerinde olumsuz etkiler yaratarak çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, yüksek kalitede, kimyasal koruyucu katkı maddeleri içermeyen, güvenilir ve raf ömürleri uzun ürünler tüketiciler tarafından tercih edilmektedir (Schnurer ve Magnusson, 2005; Abriouel vd., 2007; Dinçer vd., 2010). Son yıllarda bilim adamları, kimyasal koruyucuların yerini alabilecek alternatif doğal koruyucuların araştırılması üzerine yönelmişlerdir. Özellikle antimikrobiyel bileşenler üretebilme yeteneğine sahip, GRAS (genel olarak güvenli) statüsünde yer alan Laktik asit bakterileri (LAB) araştırmacıların ilgi odağı olmuştur (De Martinis vd., 2002; Eijsink vd., 2002; Corr vd., 2007; Nespolo ve Brandelli, 2010; Goh ve Philip, 2015). LAB'leri gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, anaerob veya fakültatif aerob olup karbonhidratları fermente ederek laktik asit gibi fermentasyon ürünleri oluşturmaktadırlar (Zhang vd., 2014; López-Cuellar vd., 2016). Bu bakteriler tarafından üretilen metabolik ürünler, patojen mikroorganizmaların üremelerini engelleyerek, bağışıklık sistemini güçlendirerek enfeksiyonlara karşı direncin artmasını sağlamaktadır (Amirbozorgi vd., 2016). Pek çok çalışmada, gıda güvenliği için antagonistik mikroorganizmaların ve yine onlar tarafından üretilen, protein yapıdaki antimikrobiyel bileşenler olan bakteriyosinlerin kullanımıyla patojenlerin inaktive edilmesinin hedeflendiği biyokontrol yöntemlerinin kullanılması önerilmektedir (Rodriguez vd., 2000;

Deegan vd., 2006; Evren vd., 2006; Moshood ve Tengku, 2013; Gülgör ve Özçelik, 2014; Yang vd., 2014; Kaur 2015; Goh ve Philip, 2015; López-Cuellar vd., 2016). LAB'leri gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların üremesini engellemek ve gıdaların raf ömrünü arttırmak amacı ile kullanılabilme potansiyeline sahiptirler. Bu nedenle yeni LAB suşların izolasyonu ve identifikasyonu için yapılan çalışmalar oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, Afyonkarahisar İli'nde satışa sunulan markasız, paketsiz, doğal yöntemler ile üretilen kefir örneklerinden 6 adet laktik asit bakterisi izole edilerek moleküler identifikasyonları yapılmıştır. Bu laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel bileşik üretme yetenekleri belirlenerek onların patojen mikroorganizmalar üzerine olan antimikrobiyel etkinlikleri değerlendirilmiştir.

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### Kefir Örneklerinin Hazırlanması

Bu çalışmada, Afyonkarahisar İli'nde satışa sunulan markasız, paketsiz, doğal yöntemler ile üretilen beş farklı kefir örneği kullanılmıştır. Kefir örnekleri aseptik koşullar altında toplanıp araştırma laboratuvarına getirilmiş ve steril pipet yardımıyla 10'ar ml alınarak steril 90 ml % 0.1' lik steril peptonlu su çözeltisinde homojenize edilmiştir. Her örnek % 0.1' lik steril peptonlu su içeren tüplerde 1/10 olacak şekilde ardışık olarak seyreltilmiştir.

#### Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Her bir kefir örneği için  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  dilüsyonlarından 0.1 ml alınarak LAB izolasyonu için seçilen besiyerlerine yayma plak yöntemiyle ekim yapılmış, 37 °C'de oksijenli ve oksijensiz koşullarda 48 saat süre boyunca inkübe edilmiştir. Laktokoklar için M17 agar (Liofilchem 610192), Laktobasiller için Man, Rogosa ve Sharpe (MRS) agar (Oxoid CM0361), Enterokoklar için Nutrient agar (NA) (Oxoid CM0003) ve Kanamycin aesculin azide agarlı (Oxoid CM0591) besiyerleri kullanılmıştır. Oksijensiz ortamda inkübasyon için anaerobik kavanoz (Oxoid Anaero Jar) kullanılmıştır (Azadnia ve Nazer, 2009).

Oksijensiz ortamın sağlanabilmesi için Merck Microbiologia Anaerocult A (1.13829.0001) ve ortamın oksijensiz olup olmadığından emin olabilmek için test indikatörü (Merck Microbiology Anaerotest 1.15112.0001) kullanılmıştır. İnkübasyon sonrasında LAB olma olasılığı olan tüm koloniler seçilerek MRS besiyerine ekilerek seri pasajlamalar yapılmış ve saf kültürler elde edilmiştir (Azadnia ve Nazer, 2009). Laktobasil olması beklenen kolonileri seçerken krem renkli, mat düzgün kenarlı koloniler, laktokoklar için beyaz düz kenarlı parlak koloniler tercih edilmiştir. Enterokok olmasından şüphelenilen koloniler için küçük, beyaz ya da açık renkli ve düz kenarlı tipik kolonilere öncelik verilmiştir. Kanamycin Aesculin Azide agar'da ise siyah zon oluşturan Enterokokların seçimleri yapılmıştır. Elde edilen izolatlar, mikroskop altında incelenerek gram reaksiyonu ve katalaz aktiviteleri belirlenmiştir. İzolatların katalaz enzimine sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla ilk izolasyon esnasında saflaştırılan izolatlar temiz bir lam üzerine alınıp %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi damlatılmıştır. Gaz kabarcıklarının oluşumu katalaz testi açısından pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000; Halkman 2005; Özteber 2013).

### Genomik DNA İzolasyonu

LAB'ın genomik DNA'larını izole etmek için Roche, High Pure PCR Template Preparation Kit kullanılmıştır. Her bir izolattan MRS sıvı besiyerine ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kit kullanımı için gerekli hazırlıklar yapılarak prosedüre uygun şekilde DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen genomik DNA'ların bütünlükleri agaroz jel elektroforezinde, saflık kontrolleri ve miktar tayinleri spektrofotometrik olarak Thermo Scientific-Nanodrop 2000c cihazı ile yapılmıştır (Turner vd., 2004). Elde edilen genomik DNA'lar kullanılabildiği kadar -20 °C'de saklanmıştır.

### Laktik Asit Bakterilerinin 16S rDNA PZR Yöntemi ile Tanımlanması

LAB izolatlarının 16S rDNA yöntemiyle tanımlanabilmesi için Taq DNA Polimeraz Kiti (Helix Amp TM, (11796828001)) kullanılmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) için; 20F (5'-

AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ve 1390R (5'- GAC GGG CGG TGT GTA CAA-3') primerleri kullanılarak gen bölgesi PZR (Blue Ray Biotech Turbo Cycler) ile çoğaltılmıştır (Özteber 2013). Baz büyüklüğü tespiti için, markır (Fermentas Gene Ruler TM) kullanılmıştır. PZR tüpüne eklenecek bileşenler ve reaksiyon basamakları kit içeriğine göre düzenlenmiş olup Çizelge 1'de belirtilmiştir. İstenilen gen bölgesini çoğaltabilmek için kullanılan PZR koşulları; 94 °C'de 5 dakika ön denatürasyon, 94 °C'de 30 sn denatürasyon, 55 °C'de 30 sn bağlanma ve 72 °C'de 90 sn uzama oluşan 35 döngümlük amplifikasyon ve 72 °C'de 15 dakika son uzamadan olacak şekilde ayarlanmıştır. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek UV Jel görüntüleme sistemi cihazı (Quantum, France) kullanılarak görüntülenmiş ve DNA fragmentleri DNA markır ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 1. PZR bileşenleri ve miktarları  
Table 1. PCR components and quantities

PZR Bileşenleri	Miktar
<i>PCR Components</i>	<i>Quantity</i>
DNA	5 µL
10X Taq Buffer	5 µL
dNTP	1 µL
Primer – F	1 µL
Primer – R	1 µL
5X Tune Up Buffer	10 µL
Taq Polimeraz	1.25 Unit
Distilled water	50 µL'ye tamamlanır

### Nükleotid Sekans Analizi ve Verilerin Değerlendirilmesi

PZR ürünlerinin nükleotid sekans analizlerinin yapılması için hizmet alımı yapılmıştır. Sekans analizi, Sanger dideoksi sekans metoduna dayalı ABI 3730 XL otomatik sekans analiz cihazı kullanılarak Altigen Bio Firması (İzmir/Türkiye) tarafından yapılmıştır. Örneklerin sekans analizi sonuçları Gen Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov) adresinde yer alan Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) programı kullanılarak karşılaştırılmış ve her bir izolat için gen bankasındaki homolojileri belirlenmiştir.

### Laktik Asit Bakterilerinin Antibakteriyel Etki Spektrumlarının Belirlenmesi

LAB izolatlarının antibakteriyel aktivitesi belirleyebilmek için agar spot test ve kuyu difüzyon yöntemleri kullanılarak test edilmiştir. Agar spot testi için, LAB izolatlarının MRS sıvı besiyerine (Oxoid CM0359) ekimleri yapılarak 37 °C'de bir gün süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir izolattan 2 µl MRS agarlı besiyerine damla şeklinde inoküle edildikten sonra petrilere bir gün süre ile 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kültür koleksiyonumuzda yer alan test mikroorganizmaları (*Listeria monocytogenes* ATCC 1911, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Bacillus subtilis* NRS-744, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* NRRLB 4420, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11778, *Streptococcus faecalis*) Nutrient broth besiyerinde, 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra %0.5 agar ile hazırlanmış 5 ml'lik yumuşak agar içerisine, indikatör test mikroorganizmalarının sıvı kültürlerinden 0.5 ml inoküle edilerek petrilere yüzeyine dökülmüş ve 37 °C'de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Schillinger ve Luke, 1989). Agar spot testi sonuçları; +<0.5 cm, 0.5 cm<+++<1 cm, 1.5 cm<++++<2 olacak şekilde değerlendirilmiştir.

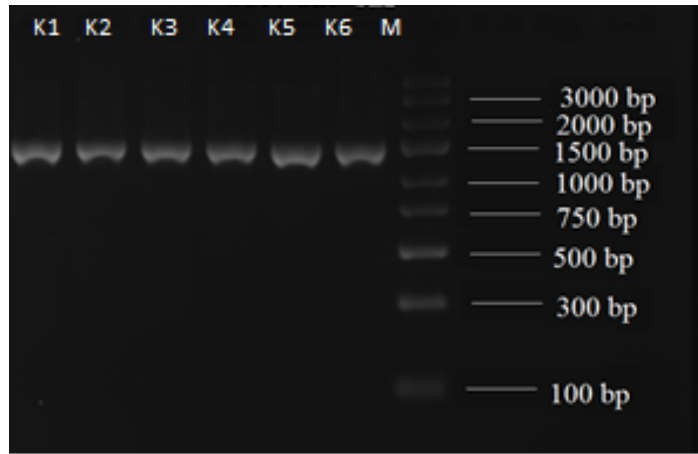
Agar kuyu difüzyon testi için, LAB izolatlarının her birinden 10 ml'lik MRS sıvı besi ortamına ekim yapılarak 37 °C'de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra sıvı kültürler 8000 rpm'de 10 dakika (+4 °C'de) santrifüjlenmiştir (Nüve NF 1200). Santrifüj işlemini takiben kültür üst sıvıları steril, yeni falkon tüplere aktarılmış ve asit inhibisyonunu ekarte edebilmek için 1 M NaOH/HCl kullanılarak pH: 6.0'ya ayarlanmıştır. Elde edilen bu süpernatantlar steril şırıngalarla çekilerek 0.2 µm por çaplı, steril membran filtreden (GUS 7041361) süzülerek steril deney tüplerinde toplanmıştır. Antimikrobiyel etki spektrumlarını belirleyebilmek için kullanılan indikatör test mikroorganizmaları Nutrient broth besiyerine ekilmiş ve 37 °C'de, 24 saat inkübe edilmişlerdir. Bir günlük kültürlerinden steril distile suda 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyonlar hazırlanmıştır. Her bir indikatör bakteri süşunun Nutrient agar besiyerine, steril eküvyon çubuğu kullanılarak ekimleri yapılmıştır. Steril agar delici kullanılarak agarlı besiyer ortamı

içeren petrilere 6 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Hazırlanan kuyucuklara daha önce laktik asit bakteri izolatlarından elde etmiş olduğumuz süpernatantlardan (Cell free supernatant) 100 µl koyulmuştur. Petrilere 37 °C'de, 24 saat inkübe edildikten sonra oluşan zon çapları ölçülmüş ve kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Pringsulaka vd., 2012).

### BULGULAR

M17, MRS, Nutrient ve Kanamycin aesculin azide agarlı besiyerlerinde üreyen kültürlerden farklı koloniler seçilerek MRS besiyeri kullanılarak saf kültürler elde edilmiştir. 27 adet izolat elde edilmiş ve bunların gram boyaması ve katalaz testleri yapılmıştır. Bu izolatlardan sadece 6 adeti gram (+) ve katalaz (-) olarak belirlenmiştir. Bu altı izolat arasında yer alan K1 ve K4'ün mikroskop altında görünümü çubuk, diğerleri ise yuvarlak (ikili yuvarlak veya zincir şeklinde) olarak gözlenmiştir. LAB'lar katalaz negatif oldukları için bu izolatların moleküler identifikasyonları, 16S rDNA PZR yöntemi kullanılarak yapılmıştır. PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 1'de gösterilmiştir. PZR ürünlerin nükleotid sekans analizi sonuçları Gen Bank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) adresinde yer alan Nucleotide-nucleotide BLAST programı kullanılarak karşılaştırılmış ve her bir izolat için gen bankasındaki homolojileri belirlenmiştir. Karşılaştırma sonucunda, izolatlar ile veri tabanında bulunan diğer türler arasındaki homolojiler yüzde olarak Çizelge 2'de gösterilmiştir. Enterococcus cinsine ait izolatlar, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca *Lactobacillus fermentum* izolatları tanımlanmıştır.

Laktik asit bakteri izolatlarının antibakteriyel etki spektrumları için agar spot test ve agar kuyu difüzyon testi kullanılmıştır. Agar spot testi sonucunda Çizelge 3'de verildiği gibi örneklerin hepsinin çalışmada kullanılan tüm patojen mikroorganizmalara karşı zon oluşturduğu görülmüştür. İnhibisyon zonlarının çapları +<0.5 cm, 0.5 cm<+++<1 cm, 1.5 cm<++++<2 olarak kontrol grubuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1. PZR ürünlerinin agaroz jel fotoğrafı [İzolatlar (K1-6), Markır (M)]  
Figure 1. Agarose gel photo of PCR products

Çizelge 2. LAB izolatlarının 16S rRNA analiz sonuçları  
Table 2. 16S rRNA analysis results of LAB isolates

İzolatlar Isolates	16S rRNA Analiz Sonucu Analysis of 16S rRNA	Karşılaştırılan baz sayısı Compared base number	(%) Benzerlik Smilarity
K1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341(Sequence ID: MF354239.1)	1402	%98
K2	<i>Enterococcus durans</i> strain CAU6145 (Sequence ID: MF424830.1)	1407	%99
K3	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL6-4 (Sequence ID: MF784205.1)	1330	%99
K4	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341 (Sequence ID: MF354239.1)	1402	%98
K5	<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU10244 (Sequence ID: MF429017.1)	1377	%99
K6	<i>Enterococcus faecium</i> strain L030(LBF2)D03 (Sequence ID: KM269699.1)	1098	%99

Agar spot test sonuçlarına göre; LAB izolatları deney aşamasında kullanılan patojen test mikroorganizmalarına karşı orta ve\veya yüksek düzeyde antimikrobiyel etkinlik göstermiştir. LAB izolatları en çok, *K. pneumoniae* NRRLB 4420, *S. aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11778, *L. monocytogenes* ATCC 1911, mikroorganizmaları üzerinde etkili olmuştur. İzolatların antimikrobiyel etki spektrumlarını belirleyebilmek için ayrıca agar kuyu difüzyon testi

uygulanmıştır. Laktik asit bakteri izolatlarının indikatör bakteriler üzerine olan antimikrobiyel etkilerinin sonuçları ise Çizelge 4'de gösterilmiştir. İzolatlar tüm patojen test mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyel etki göstermişlerdir. Özellikle *K. pneumoniae* NRRLB 4420, *P. aeruginosa* ATCC 11778, *L. monocytogenes* ATCC 1911 karşı yüksek antimikrobiyel aktivite belirlenmiştir. Elde edilen zon çapları kontrol grubuna oldukça yakın değerler göstermiştir.

Laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve antimikrobiyel etkileri

Çizelge 3. LAB izolatlarının indikatör test bakterileri üzerine olan inhibisyon etkisi  
Table 3. The inhibitory effect of LAB isolates on indicator test bacteria

İzolatlar Isolates		<i>L. monocytogenes</i> ATCC 1911	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>B. subtilis</i> NRS-744	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>K. pneumoniae</i> NRRLB 4420	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 11778	<i>S. faecalis</i>
K1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
K2	<i>Enterococcus durans</i> strain CAU6145	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
K3	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL6-4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
K4	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
K5	<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU10244	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
K6	<i>Enterococcus faecium</i> strain L030(LBF2)D03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kontrol Control	10 µg amikasin	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+<0.5 cm, 0.5 cm<++<1 cm, 1.5 cm<+++<2

Çizelge 4. LAB izolatlarının indikatör bakteriler üzerine olan antimikrobiyel etkilerinin agar kuyu difüzyon testi sonuçları (cm)

Table 4. Agar well diffusion test results of antimicrobial effects of LAB isolates on indicator bacteria (cm)

İzolatlar Isolates		<i>L. monocytogenes</i> ATCC 1911	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>B. subtilis</i> NRS-744	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>K. pneumoniae</i> NRRLB 4420	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 11778	<i>S. faecalis</i>
K1	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341	17	9	10	12	21	18	15
K2	<i>Enterococcus durans</i> strain CAU6145	18	16	13	18	17	23	12
K3	<i>Enterococcus faecium</i> strain BL6-4	18	14	9	14	22	19	16
K4	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CAU:3341	19	9	11	12	20	18	15
K5	<i>Enterococcus faecium</i> strain CAU10244	18	14	10	15	22	19	16
K6	<i>Enterococcus faecium</i> strain L030 (LBF2)D03	18	14	10	14	22	19	16
Kontrol Control	10 µg amikasin	20	21	22	20	24	20	20

## TARTIŞMA

Son yıllarda gıda ve ilaç güvenliğinin geliştirilmesi konusunda giderek artan bir eğilimin olması, araştırmacıları yeni antimikrobiyel alternatifler bulmaya teşvik etmektedir. Bazı mikroorganizmalar antimikrobiyel bileşenler üretebilme yeteneğine sahiptirler (Goh ve Philip, 2015). Bu mikroorganizmalar arasında yer alan laktik asit bakterileri, antimikrobiyel özellikte bakteriyosin üretebilen, gıdalarda uzun yıllardan beri güvenli bir şekilde kullanılan en önemli mikroorganizmalardır (Nespolo ve Brandelli, 2010; Lopez-Cuellar vd., 2016). Bakteriyosinler, üretici hücreler üzerine öldürücü etki göstermeyen, sınırlı sayıda bakterilere etkili olan antagonistik maddeler olduklarından antibiyotikler için alternatif rol oynayabilirler (Evren vd., 2006). Bugüne kadar yapılan pek çok çalışmada; çeşitli gıda ürünlerinden LAB izole edilerek, antimikrobiyel etkinlikleri değerlendirilmiş ve çeşitli bakteriyosinler izole edilerek tanımlanmıştır (Erdoğan vd., 2002; Yang vd., 2014; Wassie ve Wassie, 2016; Masalam vd., 2018). Literatür taramaları sonucunda kefir örneklerinden LAB izolasyonu ve onların antimikrobiyel etkinliklerine dair sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır (Simova 2002). Bu nedenle, LAB bakımından zengin olması beklenen kefir örneklerinin çalışma kapsamında kullanılması tercih edilmiştir.

Bu çalışmada, LAB'ları izole etmek amacıyla Afyonkarahisar İli'nde satışa sunulan paketsiz 5 farklı kefir örneğinden 6 adet LAB izole edilmiştir. Kefir örneklerinden izole edilen LAB'lar 16S rDNA sekans analiz sonuçlarına göre, *Lactobacillus fermentum* (2), *Enterococcus faecium* (3), *Enterococcus durans* (1) türleri olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular daha önce yapılmış olan bazı çalışmalarla oldukça benzerlik göstermektedir (Simova 2002; Chen vd., 2008; Bennani vd., 2017, Masalam vd., 2018).

Çalışmamızda, LAB izolatlarının antimikrobiyel aktivitelerini belirleyebilmek için agar spot testi ve agar kuyu difüzyon testi yapılmıştır. Agar spot test sonuçlarına göre; elde edilen LAB izolatları, en çok *K. pneumoniae* NRRLB 4420, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 11778, *L. monocytogenes*

ATCC 1911 üzerinde antimikrobiyel etki göstermiştir. Simova vd. (2002); kefir ve kefir tanelerinden LAB izole etmişlerdir. Elde ettikleri izolatları; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudopantarum* ve *Lactobacillus brevis* olarak tanımlamışlardır. Başka bir çalışmada Chen vd. (2008); kefir tanelerindeki LAB'lar üzerine mikrobiyolojik bir çalışma yapmıştır. Çalışma sonucunda, kefir tanelerinde, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* türlerinin bulunduğu belirlenmiştir. İşleroğlu vd. (2008), yöresel peynir örneğinden antimikrobiyel aktiviteye sahip bakteri izole etmişlerdir. Karbonhidrat fermantasyonu ile yağ asidi profili testleri sonucunda bakterinin *Enterococcus faecalis* olduğunu saptamışlardır. Bu bakteri tarafından üretilen antimikrobiyel maddenin *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* ve *Listeria monocytogenes*'e karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu, ancak *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*'a karşı etkili olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışmaya benzer olarak bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerde en yüksek antimikrobiyel etki *K. pneumoniae* NRRLB 4420, *P. aeruginosa* ATCC 11778, *L. monocytogenes* ATCC 1911 karşı tespit edilirken *E. coli* ATCC 35218 ve *B. subtilis* NRS-744 üzerinde daha düşük etki tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada ise Bayram ve Yıldırım (2016), yöresel bir peynir çeşidinden izole edilen bakteri ve bu bakterinin ürettiği antimikrobiyel bileşikler karakterize etmişlerdir. İzole edilen bakteri, genel mikrobiyolojik analizler, karbonhidrat fermantasyonu ve yağ asidi profili testleri sonucunda *Enterococcus faecium* BP olarak tanımlanmıştır. Antimikrobiyel bileşiğin antimikrobiyel spektrumu belirlenmiş ve inhibitör aktivitesi üzerine bazı enzimlerin, organik çözücülerin, ısıl işlemin, depolama koşullarının ve üretici bakterinin gelişim fazının etkileri araştırılmıştır. Antimikrobiyel bileşiğin bir bakteriyosin olduğunu ortaya koymuşlardır. Antimikrobiyel bileşiğin, test edilen bazı *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Campylobacter* ve *Citrobacter* cinslerine karşı inhibitör etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

Bu çalışmanın sonucunda; kefir örneklerinden izole edilen LAB'ların antimikrobiyel etkili madde\maddeler üretebildikleri ve patojen test mikroorganizmaları üzerinde yüksek antimikrobiyel etkinlikleri olduğu belirlenmiştir. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalar ile izole edilen LAB'ların ürettiği bakteriyosin ve\veya bakteriyosin benzeri maddelerin saflaştırılması ve karakterizasyonu hedeflenmelidir. Böylece LAB'lar tarafından üretilen bu antimikrobiyel bileşiklerin hem gıda hem de sağlık sektöründe, biyoteknolojik çalışmalarda potansiyel olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

### TEŞEKKÜR

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

### KAYNAKLAR

Abriouel, H., Gálvez, A., López, R.L., Omar, N.B. (2007). Bacteriocin based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol*, 120: 51-70.

Amirbozorgi, G., Samadlouie, H., Shahidi, S.A. (2016). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Iranian traditional dairy products. *IBBJ Winter*, 2 (1): 47-52.

Arabestani, M.R., Mousavi, S.M., Alikhani, M.Y. (2014). Bacteriocins as the alternatives to antibiotics. *Avicenna J Clin Microbiol Infect*, doi: 10.17795/ajcmi-21086.

Bayram, M., Yıldırım, Z. (2016). Beyaz peynirden bakteriyosin üreten bakterinin (*Enterococcus faecium*) izolasyonu ve bakteriyosinin karakterizasyonu. *Gaziosmanpaşa Bil Araş Derg*, 13:103-115.

Bennani, S, Mchiouer, K., Rokni, Y., Meziane, M. (2017). Characterisation and identification of lactic acid bacteria isolated from Moroccan raw cow's milk. *J Mater Environ Sci*, 8(S), 4934-4944.

Blaser, M. (2011). Antibiotic overuse: stop the killing of beneficial bacteria. *Nature*, 476 (7361): 393-394.

Chen, C.C., Wang, S.Y., Chen, M.J. (2008)., Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiol*, 25 (3): 492-501.

Cooper, M.A., Shlaes, D. (2011). Fix the antibiotics pipeline. *Nature*, 472 (7341): 32. doi: 10.1038/472032a.

Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C., Gahan, C.G. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceed Nat Acad Sci*, 104: 7617-7621.

De Martinis, E.C.P., Alves, V.F., Franco, B.D.G.M. (2002). Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat. *Food Rev Int*, 18 (2): 191-208.

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Colin, H., Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int Dairy J*, 16: 1058-1071.

Diñçer, E., Kıvanç, M., Karaca, H. (2010). Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri. *Gıda*, 35(1): 1-8.

Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Holo, H., Nes, I.F. (2002). Production of class II bacteriocins by LAB; an example of biological warfare and communication. *Antonie Leeuwenhoek*, 81: 639-654.

Erdoğan, Ö.Z., Çetin, Ö., Ergün, Ö. (2002). Fermente sucuklardan izole edilen *Pediococcus pentosaceus* suşlarının bazı metabolik ve antimikrobiyel aktiviteleri üzerine çalışmalar. *İstanbul Üni Vet Fak Derg*, 28 (1): 249-254.

Evren, M., Albayram, C., Apan, M. (2006), Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu antimikrobiyel maddeler. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Mayıs 24-26, Bolu, Türkiye, 977-980.

Goh, H.F., Philip, K. (2015). Purification and characterization of bacteriocin produced by *Weissella confusa* A3 of dairy origin. *PLOS ONE*, | doi:10.1371/journal.pone.0140434.



- Gülgör, G., Özçelik, F. (2014), Bakteriyosin üreten laktik asit bakterilerinin probiyotik amaçlı kullanımı. *Akademik Gıda*, 12(1): 63-68.
- İşleroglu, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M. (2008). Yöresel peynirden antimikrobiyel aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı. *Gazî Osmanpaşa Üni Ziraat Fak Derg*, 25 (1): 1-6.
- Kaur, S. (2015). Bacteriocins as potential anticancer agents. *Front Pharmacol*. 6: 272, doi: 10.3389/fphar.2015.00272.
- López-Cuellar, R., Rodríguez-Hernández, A.I., Chavarría-Hernández, N. (2016). LAB bacteriocin applications in the last decade. *Biotechnol Biotech Equip*, 30(6): 1039-1050.
- Masalam, M. S, Bahieldin A., Alharbi M.G., Al-Masaudi, S., Al-Jaouni S.K., Harakeh, S.M., Al-Hindi R. (2018). Isolation, molecular characterization and probiotic potential of lactic acid bacteria in Saudi raw and fermented milk. *Evid Based Complement Alternat Med*, doi.org/10.1155/2018/7970463.
- Moshood, A.Y., Tengku, H.A. (2013). Lactic acid bacteria: Bacteriocin producer. *IOSR J Pharmacy*, 3(4): 44-50.
- Nespolo, C.R., Brandelli, A. (2010). Production of bacteriocin-like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese. *Brazilian J Microbiol*, 41(4): 1009-1018.
- Özteber, M. (2013). Fermente süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliklerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Pringsulaka, O., Thongngam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., Rangsiroji, A. (2012). Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from thai fermented meat and fish. *Food Control*, 23: 547-551.
- Rodriguez, E.G.B., Gaya, P., Nanez, M., Medina, M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int Dairy J*, 10: 7-15.
- Schnurer, J., Magnusson, J. (2005), Antifungal activity against *Aspergillus parasiticus* of supernatants from whey permeates fermented with kefir grains, antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trend Food Sci Technol*, 16: 70-78.
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., Spasov, Z. (2002), Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 28(1):1-6.
- Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D., White, M.R.H. (2004). Moleküler Biyoloji Önemli Notlar, Konuk, M. (Eds) Nobel Yayın, 613: 346 s.
- Wassie, M., Wassie T. (2016). Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk. *Int J Adv Res Biol Sci*, 3(8): 44-49.
- White, A.R. (2011). Bsac working party on the urgent need: Regenerating antibacterial drug discovery, development. effective antibacterials: at what cost? the economics of antibacterial resistance and its control. *J Antimicrob Chemother*, 66(9):1948–1953.
- Yang, S.C., Lin, C.H., Sung, C.T., Fang, J.Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol*, doi: 10.3389/fmicb.2014.00241, 2014.
- Zhang, Z., Vriesekoop, F., Yuan, Q., Liang, H. (2014). Effects of nisin on the antimicrobial activity of d-limonene and its nanoemulsion. *Food Chem*, 150:307-312.