

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

PROBİYOTİK ÖZELLİKLERE SAHİP *Lactobacillus Plantarum* VE *Pediococcus
Pentosaceus* BAKTERİLERİNİN GIDA KÖKENLİ GRAM-POZİTİF VE GRAM
-NEGATİF PATOJENLERE KARŞI ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Mohammed Bahram Khorsheed ALDAWOODI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2026

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

PROBİYOTİK ÖZELLİKLERE SAHİP *Lactobacillus Plantarum* VE *Pediococcus Pentosaceus* BAKTERİLERİNİN GIDA KÖKENLİ GRAM-POZİTİF VE GRAM - NEGATİF PATOJENLERE KARŞI ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Mohammed Bahram Khorsheed ALDAWOODI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Bu çalışmada esas olarak, *Pediococcus pentosaceus* ve *Lactobacillus plantarum* suşlarının, patojen bakterilerde biyofilm oluşumu ve patojen inhibisyonu üzerindeki etkilerini incelenmiştir. Sonuçlar, bu laktik asit bakterilerinin planktonik ve biyofilm formları yanında süpernatantlarının da, biyofilm oluşumunu ve virülans genlerin ifadesini önemli ölçüde inhibe ettiğini ortaya koymuştur. LAB suşlarının biyofilm oluşturma yetenekleri incelendiğinde, *P. pentosaceus* ve *Lb. plantarum* suşlarında biyofilm oluşumunun inkübasyon süresi ile arttığı, 48 saatte zirveye ulaştığı ve ardından biyofilm yoğunluğunda bir azalma başladığı saptanmıştır. Özellikle, *Lb. plantarum* inkübasyon süresi boyunca sürekli olarak *P. pentosaceus*'tan daha yüksek biyofilm oluşum oranları sergilemiştir. Biyofilm oluşumu ve otoagregasyon oranları, inkübasyon süreleriyle paralel olarak artmış, 37°C'de 24 saatlik inkübasyonda en yüksek otoagregasyon oranı tespit edilmiştir. Koagregasyon testleri, *P. pentosaceus* ve *Lb. plantarum*'ın *E. coli* ve *S. Typhimurium* ile güçlü koagregasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Tarama elektron mikroskobu analizi, iki bakterinin oluşturduğu biyofilmlerde yapısal farklılıklar ortaya koymuştur. *P. pentosaceus*, kompakt ve düzenli biyofilm yapıları oluştururken, *Lb. plantarum* daha heterojen ve düzensiz biyofilm yapıları oluşturmuştur. Her iki bakterinin planktonik formları da, patojen üremesini inhibe etme yeteneğinde bulunmuştur. *Lb. plantarum*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* üzerinde en güçlü inhibisyon etkisini gösterirken, *P. pentosaceus* *S. Typhimurium* üzerinde daha yüksek inhibisyon oranlarına sahip bulunmuştur. Süpernatantların antibakteriyel aktivitesi, nisin ile karşılaştırıldığında önemli antibakteriyel etkiler göstermiştir. Ayrıca, her iki laktik asit bakterisi de, *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumu üzerine etkili olmuş ve biyofilmle ilişkili (*csgD* ve *adrA*) ve virülansla ilişkili (*invA*, *rpoS*, *hilA*, *spi*, *fliF*) genlerin ifadesini önemli ölçüde azaltmıştır.

Nisan 2026, 88 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Lb. plantarum*, *P. pentosaceus*, patojen, planktonik form, biyofilm, inhibisyon, gen ifadesi,qPCR.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION OF THE EFFICACY OF *Lactobacillus plantarum* AND *Pediococcus pentosaceus* BACTERIA WITH PROBIOTIC PROPERTIES AGAINST FOOD ORIGINATED GRAM-POSITIVE AND GRAMN NEGATIVE PATHOGENS

Mohammed Bahram Khorsheed ALDAWOODI

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

In this study, mainly the effects of *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus plantarum* strains on biofilm formation and pathogen inhibition were investigated. The results revealed that planktonic and biofilm forms of these lactic acid bacteria as well as their supernatants significantly inhibited biofilm formation and the expression of virulence genes. When the biofilm forming abilities of LAB strains were examined, it was found that biofilm formation in *P. pentosaceus* and *Lb. plantarum* strains increased with incubation time, reached a peak at 48 h, and then a decrease in biofilm density began. Especially, *Lb. plantarum* exhibited consistently higher biofilm formation rates than *P. pentosaceus* throughout the incubation period. Biofilm formation and autoaggregation rates increased in parallel with incubation times, and the highest autoaggregation rate was detected at 24 h of incubation at 37 °C. Coaggregation tests showed that *P. pentosaceus* and *Lb. plantarum* showed strong coaggregation with *E. coli* and *S. Typhimurium*. Scanning electron microscope analysis revealed structural differences in the biofilms formed by the two bacteria. While *P. pentosaceus* formed compact and regular biofilm structures, *Lb. plantarum* formed more heterogeneous and irregular biofilm structures. Planktonic forms of both bacteria were found to be capable of inhibiting pathogen growth. *Lb. plantarum* showed the strongest inhibitory effect on *E. coli* and *P. aeruginosa*, while *P. pentosaceus* had higher inhibition rates on *S. Typhimurium*. The antibacterial activity of the supernatants showed significant antibacterial effects compared to nisin. In addition, both lactic acid bacteria were effective on biofilm formation in *S. Typhimurium* and significantly decreased the expression of biofilm-related (*csgD* and *adrA*) and virulence-related (*invA*, *rpoS*, *hlyA*, *spi*, *fliF*) genes.

April 2026, 88 pages

Key Words: *Lb. plantarum*, *P. pentosaceus*, pathogen, planktonic form, biofilm, inhibition, gene expression, qPCR.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana her türlü çalışma olanağını sağlayan, çalışmalarımda ilgi ve desteğini eksik etmeyen, engin bilgi, tecrübe ve önerileriyle çalışmalarımda bana yol gösteren değerli danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU'na (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü) en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım süresince bana her anlamda yardımcı olan, laboratuvar imkanlarından yararlanmama izin veren, değerli fikirleri, tecrübesi ve bilgileriyle tez çalışmama önemli katkılarda bulunan Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yardıma her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan ve bana destek veren değerli arkadaşım Asiye Nur KARACA (Doktora Öğrencisi Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) teşekkür ederim, enerjileri ve güler yüzleriyle laboratuvar çalışmalarımı eğlenceli kılan Prokaryot Genetiği Laboratuvarındaki arkadaşlarıma ve adını zikredemediğim tüm dostlarıma.

Sonsuz bir minnetle ve sevgiyle her daim andığım, umudumun tanımı ve yaşam ışığım hayatım boyunca beni her durumda destekleyen, varlıklarıyla ruhumu zenginleştiren, beni bu zamanlara getiren, hayattaki en büyük şansım aileme ve eşime, sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Mohammed Bahram Khorsheed ALDAWOODI
Ankara, Nisan 2026

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Laktik Asit Bakterilerinin Grup Karakteristikleri.....	3
2.2 Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon Kaynakları, Sınıflandırılmaları ve Probiyotik Seçim Kriterleri	4
2.2.1 <i>Lactobacillus Plantarum</i>	6
2.2.2 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	9
2.3 Gıda kaynaklı patojenler	11
2.3.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	12
2.3.2 <i>Escherichia coli</i>	13
2.3.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.3.4 <i>Bacillus subtilis</i>	15
2.3.5 Enterokoklar.....	16
2.3.6 <i>Salmonella Typhimurium</i>	17
2.3.7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.4 Bakteriyel Biyofilmler ve Oluşum Aşamaları	18
2.5 Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) Antimikrobiyal Etkinliği ve Probiyotik Potansiyeli	21
2.6 Caco2 Hücreleri ve Deneysel Model Olarak Önemi	23
2.7 Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) Antimikrobiyal Etkinliği ve Probiyotik Potansiyeli	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1 Materyal	26
3.1.1 Bakteri suşları ve üretme koşulları	26
3.1.2 Besiyerlerin içeriği ve hazırlanma koşulları	27
3.2 Yöntem	32

3.2.1 LAB biyofilm üretimi ve ölçümü	32
3.2.2 Otoagregasyon ve koagregasyon analizleri.....	33
3.2.3 Planktonik LAB formlarının antagonistik aktivitesi	34
3.2.4 LAB biyofilmlerinin antagonistik aktivitesi	36
3.2.5 Hücresiz süpernatantların (CFS) hazırlanması ve antimikrobiyal aktivite değerlendirilmesi.....	37
3.2.6 Patojenik bakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunmasının engellenmesi.....	39
3.2.7 Biyofilm mikroyapısının tarama elektron mikroskopu (SEM) ile incelenmesi.....	40
3.2.8 Kantitatif gerçek zamanlı PZR (qRT-PZR)	40
3.2.8.1 Biyofilmden RNA izolasyonu	40
3.2.8.2 Agaroz jel elektroforezi	41
3.2.8.3 cDNA sentezi.....	42
3.2.8.4 Gen ifade düzeylerinin qRT-PZR ile belirlenmesi.....	43
3.2.9 İstatistiksel analizler	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	47
4.1 LAB Suşlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneği.....	47
4.2 Otoagregasyon Aktivitesi.....	48
4.3 Koagregasyon Aktivitesi.....	49
4.4 LAB Suşlarının Planktonik ve Biyofilm Formlarının Patojenlere Karşı Antagonistik Aktivitesi	50
4.5 <i>Lb. plantarum</i> ve <i>P. pentosaceus</i> Kültür Süpernatantlarının Antibakteriyel Aktivitesi	57
4.6 LAB CFCS'lerinin <i>S. Typhimurium</i> Biyofilminin Oluşumunu Engelleme Kapasitesi.....	60
4.7 LAB Suşlarının, Patojenik Bakterilerin Caco-2 Hücrelerine Tutunmasını Engelleme Kapasitesi	60
4.8 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ile Biyofilm Yapılarının İncelenmesi	64
4.9 <i>S. Typhimurium</i> Doğal Suşuna LAB CFCS'lerinin Uyulanması Sonucu Biyofilm ve Virülansla İlgili Genlerin İfade Düzeylerinde Meydana Gelen Değişmeler	65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	68
KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ.....	88

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Selsius Derecesi
Caco-2	İnsan Kolon Epidermal Adenokarsinom Hücre Hattı
CO ₂	Karbondioksit
Ct	Eşik döngüsü
ddH ₂ O	Çift distile su
dH ₂ O	Distile su
FAO	Tarım ve Gıda Örgütü
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
kb	Kilobaz
L	Litre
log	Logaritma
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Millimeter
NaCl	Sodyum Klorür
NaOCl	Sodyum hipoklorit
NaOH	Sodyum hidroksit
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OD	Optik Yoğunluk
pH	Power of Hydrogen
rpm	Dakikada Devir Sayısı
sn	Saniye
Tm	Sıcaklık
Tris-HCL	Tris(Hidroksimetil)Aminometan Hidroklorür
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometr

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
B.	<i>Bacillus</i>
BHI	Brain Heart Infusion
cDNA	Complementary DNA
CV	Kristal viyole
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
E.	<i>Enterococcus</i>
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik asit
EPS	Ekstrasellüler Polimerik Matriks
FBD	Gıda Kaynaklı Hastalıklar
FDA	Food and Drug Administration(Gıda ve İlaç İdaresi)
GRAS	Generally Regarded As Safe (Genel olarak güvenli kabul edilen)
L.	<i>Listeria</i>
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LB	Luria Broth
Lb.	<i>Lactobacillus</i>
mRNA.	Messenger Ribonükleik Asit
MRS	De Man–Rogosa–Sharpe agar
MSA	Mannitol salts agar
MYP	Mannitol egg Yolk Polymyxin agar
NK	Negatif Kontrol
OD	Optik Dansite
P.	<i>Pediococcus</i>
P.	<i>Pseudomonas</i>
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PBS	Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi
PK	Pozitif Kontrol
QS	Quorum sensing

RNA	Ribon�kleikasit
RT-PZR	Ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
S.	<i>Salmonella</i>
S.	<i>Staphylococcus</i>
SD	Standart sapma
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptone Soy Broth
UV	Ultraviyole
WHO	World Health Organization(Dünya Sağlık �rg�t�)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bakteriyel biyofilm yapılarının genel oluşumu aşamaları	20
Şekil 4.1 LAB'nin zamana bağlı biyofilm oluşturma özellikleri	48
Şekil 4.2 <i>Lb. plantarum</i> ve <i>P. pentosaceus</i> 'un otoagregasyon yetenekleri	49
Şekil 4.3 (A,B) <i>Lb. plantarum</i> ve gıda kaynaklı patojenlerin koagregasyon oranları	50
Şekil 4.4 (A) LAB suşlarının planktonik formlarının patojenik bakterilere karşı gösterdiği antagonistik aktivite.....	54
Şekil 4.4 (B) LAB suşlarının biyofilm formlarının patojenik bakterilere karşı gösterdiği antagonistik aktivite.....	57
Şekil 4.5 Gıda patojenlerine karşı LAB süpernatantlarının inhibisyon zonları	59
Şekil 4.6 LAB süpernatantlarının <i>S. Typhimurium</i> biyofilmine karşı antimikrobiyal aktivitesi	60
Şekil 4.7 Patojenik bakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunmasının engellenmesi	63
Şekil 4.8 <i>Lb. plantarum</i> (A1-A3), <i>P. pentosaceus</i> (B1-B3) ve <i>S. Typhimurium</i> (C1-C3) için taramalı elektron mikroskobu görüntüleri	65
Şekil 4.9 Süpernatant uygulaması sonrası araştırılan genlerin log2 kat değişim grafiği	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri.....	27
Çizelge 3.2 Denatürasyon karışımı	42
Çizelge 3.3 Ters transkripsiyon karışımı	43
Çizelge 3.4 Ters transkripsiyon sıcaklık döngüsü	43
Çizelge 3.5 İfade düzeyleri araştırılan genler ve bu genlere özgü primerler	45
Çizelge 3.6 qRT-PZR için amplifikasyon karışımı.....	45
Çizelge 3.7 LightCycler 480 cihazında kullanılan qRT-PZR programı	46
Çizelge 4.1 Hücreden ari <i>Lb. plantarum</i> kültür filtratlarının patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi.....	58
Çizelge 4.2 Hücreden ari <i>P. pentosaceus</i> kültür filtratlarının patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi.....	59
Çizelge 4.3 Araştırılan genlere ait CT değerleri	66
Çizelge 4.4 Araştırılan genlerin ifade seviyelerinin normalize edilmiş kat farkı ($2^{\Delta\Delta Ct}$ değerleri)	67

1. GİRİŞ

Gıda güvenliği, gıdalarda ciddi sağlık sorunlarına yol açabilecek mikrobiyal ve kimyasal kontaminantların engellenmesi veya giderilmesi yolu ile tüketici sağlığının korunmasını esas alan teorik ve pratik çalışmaları içermektedir. Günümüzde tüm dünyada gıda güvenliğine yönelik yeni tehditler sürekli olarak ortaya çıkmakta ve gıda kaynaklı hastalıklar (FBD) giderek artmaktadır. Özellikle gıda tedarikinin küreselleşmesi, gıda kontaminasyon risklerini artırmakta ve dolayısı ile gıda güvenliğine daha fazla dikkat edilmesini acil bir görev olarak dayatmaktadır. Zira FBD, önemli bir halk sağlığı sorunu olarak her yıl daha fazla hastane yatışlarına ve ölümlere neden olmaktadır. Günümüzde kontamine gıda ve su tüketimi sonucu, yıllık 600 milyondan fazla FBD vakası ve yaklaşık 420.000 ölüm meydana gelmektedir. FBD'nin yaygınlığı, gelir düzeyi düşük ya da orta olan bölgelerde daha fazla gözlemlense de, yüksek gelirli ülkelerde de güvenli olmayan gıdalar ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Neticede gıda güvenliği, toplum sağlığının önemli bir parçası haline gelmiştir ve hükümetler bu alandaki iyileştirmeler için yoğun çabalar sarf etmektedir (Anonymous, 2019).

Gıda güvenliğinin statik bir konu olmadığı ve her geçen gün artan farkındalık ve bilgi birikimi ile, bu alanda büyük ilerlemeler kaydedildiği unutulmamalıdır. Gıda güvenliği güvencesi; işleme, dağıtım ve depolama aşamalarında mikrobiyal ve kimyasal kirleticilerin ortadan kaldırılması veya azaltılmasıyla sağlanır. Gıda kayıplarını minimize etmek ve yüksek kaliteli, güvenli gıda sağlamak için koruyucu malzemelerin kullanımı gıda endüstrisinin önemli bir uygulaması haline gelmiştir. Ancak günümüz tüketicileri, katkı maddelerinin sağlığa etkilerini açıklayamazlar da, genellikle bu maddelerden hoşlanmamakta ve onları sağlıksız olarak değerlendirmektedirler. Bu sebeple, son dönemde yapılan araştırmalar, tüketicilerin taleplerini karşılamak ve gıda kalitesini ile güvenliğini sağlamak için katkı maddelerinin daha az kullanıldığı ya da doğal bileşenlerin tercih edildiği ürünlerin geliştirilmesine odaklanmaktadır. Bu bağlamda, doğal antimikrobiyal maddeler, üreticilerin yapay katkı maddelerini değiştirmelerine, gıda güvenliğini sağlamalarına ve daha sağlıklı ürünler geliştirmelerine olanak tanıyan önemli bir araştırma alanı olmuştur (Valdramidis and Koutsoumanis, 2016).

Gıda güvenliği için en çok üzerinde çalışılan doğal antimikrobiyal maddelerden biri, laktik asit bakterileri (LAB) gibi mikroorganizmalar tarafından üretilen bileşiklerdir. Birçok LAB suşu, sağlık yararları nedeniyle probiyotik olarak kabul edilmektedir. Bu mikroorganizmalar tarafından salgılanan biyoaktif çözünür faktörler ise postbiyotik olarak adlandırılmakta ve bunlar, antimikrobiyal aktiviteler de dahil olmak üzere çeşitli biyoaktiviteler sergileyebilmektedir. Özetle LAB suşları, tanımlı probiyotik ve postbiyotik özellikleriyle tüketicilere sağlık yararları sağlayan önemli mikrobiyal gıda bileşenleridir (Moradi ve ark., 2020).

Bu tezde, *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* suşlarının gıda kaynaklı Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitelerini ve bu probiyotik suşlar tarafından üretilen antimikrobiyal bileşenlerin belirlenmesini ve gıda sistemlerinde biyokontrol ajanları olarak kullanım potansiyellerini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Zira probiyotikler ve patojenler arasındaki etkileşimlerin anlaşılması, doğal, antibiyotik bazlı olmayan koruma yöntemlerinin geliştirilmesinin önünü açabilir. Bu da gıda güvenliğini iyileştirebilir, antibiyotik bağımlılığını azaltabilir ve insan bağırsak sağlığını destekleyebilir.

Bu doğrultuda dizayn edilen deneysel tasarım, probiyotikler ve patojenler arasındaki etkileşimler ve *L. plantarum* ile *P. pentosaceus*'un gıda endüstrisindeki biyokontrol ajanları olarak potansiyel uygulamaları hakkında önemli bilgiler sunacak şekilde hazırlanmıştır. Bu nedenle söz konusu biyoloji denemelerden elde edilecek bulguların, gıda güvenliğini artırmaya yönelik yeni probiyotik temelli stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlaması güçlü bir olasılıktır. Ayrıca, bu tezde, LAB süpernatantlarının *Salmonella* Typhimurium'da biyofilm oluşumunun engellenmesindeki etkinliğini araştırılacaktır. Elde edilen bulgular, gıda sistemlerindeki patojenik biyofilmlerin kontrolüne yönelik potansiyel uygulamaların anlaşılmasına katkıda bulunacaktır. Bu Doktora tezi özetle, gıda mikrobiyolojisi alanındaki bilgi birikimini artırmayı ve gıda güvenliğini geliştirmek için yeni yaklaşımlara temel hazırlamayı hedeflemektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Laktik Asit Bakterilerinin Grup Karakteristikleri

Laktik asit bakterileri (LAB), Gram-pozitif, spor oluşturmayan, kok veya çubuk şeklinde, katalaz-negatif ve düşük pH'a karşı yüksek toleransa sahip mikroorganizmalardır. LAB türleri, gıda fermentasyonlarında ve fermente gıda ürünlerinde tat ve dokunun geliştirilmesinde kullanılan en önemli bakteriler arasında yer almaktadır (Mokoena ve ark., 2017).

LAB'nin gıdalardaki temel metabolik aktiviteleri; glikozdan ana ürün olarak laktik asit üretimi, gıda bozulması etmeni bakterilerin ve patojenlerin çoğalmasını engelleyen bakteriyosinler, hidrojen peroksit, diasetil gibi üremeyi engelleyici maddeler ile karakterize edilmektedir. Bu mikroorganizmaların temel enerji gereksinimleri karbonhidratların fermentasyonu yolu ile sağlanmaktadır. Enerji metabolizmasında son elektron alıcısı olarak oksijen yerine endojen karbon kaynaklarının kullanımı karakteristiktir. Aerotolerant özelliklerinin temel kaynağı, içerdikleri peroksidaz enzimleri sayesinde hidrojen peroksit gibi oksijen yan ürünlerini redükte etme yetenekleri olarak tanımlanmaktadır. LAB üyeleri genellikle flagellar hareket içermemektedir (Alakomi ve ark., 2000).

LAB'nin tanımlanmasında en yaygın olarak fenotipik tanı yöntemleri tercih edilmektedir. Ancak son yıllarda, 16S rDNA dizilimi gibi moleküler teknikler geliştirilmiş ve bu sayede suş seviyesinde daha tutarlı ve doğru bir şekilde sınıflandırmanın yapılması mümkün olmuştur. LAB için optimum üreme pH'ı 5.5-5.8 arasında tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmalar üremeleri için; bulundukları ortamlarda eksojen amino asitler, peptitler, nükleotitler, değişik vitaminler, mineraller, yağ asitleri ve karbonhidratlar gibi kompleks besin maddelerine ihtiyaç duymaktadır (Khalid, 2011).

Fermente karbonhidratların ürünlerine dayalı olarak, LAB suşları homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere iki ana sınıf altında toplanmaktadır. Homofermentatif

LAB üyeleri esas olarak şekerlerden laktik asit üretirken, heterofermentatif LAB üyeleri laktik asit, asetik asit veya alkol ve karbondioksit üretme yeteneği gösterirler (Mokoena ve ark., 2016). Ayrıca, bazı LAB türleri bakteriyosinler olarak bilinen antimikrobiyal peptitler de üretme yeteneğindedir. Şu ana kadar, *Lactobacillus* cinsi altında tanımlanan birçok LAB suşu ve bunların ürettiği bakteriyosinler, gıda muhafazasında ve insan patojenlerinin kontrolünde başarıyla kullanılmıştır (Zhang ve ark., 2020).

2.2 Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyon Kaynakları, Sınıflandırılmaları ve Probiyotik Seçim Kriterleri

Laktik asit bakterileri (LAB), bitki ve meyvelerin çürüten dokularında, süt ürünlerinde, fermente et ve balık ürünlerinde, tahıllarda, pancarda, sebze turşularında, patatesten, ekşi mayada, silajlarda, fermente içeceklerde, meyve sularında, insan ve hayvan boşluklarında yaygın olarak bulunmaktadır (Liu ve ark., 2014). Söz konusu bakteriler, insanlarda özellikle ağız boşluğu, ileum, kolon ve vajina gibi bölgelerde yaygın bir şekilde kolonize olmaktadır (Djadouni ve ark., 2012).

LAB grubu, günümüzde Firmicutes filumu, Bacilli sınıfı ve Lactobacillales takımı altında sınıflandırılmaktadır. LAB, hücresel morfoloji, glikoz fermantasyon tipi, üreme sıcaklığı aralığı ve karbonhidrat metabolizması modellerine göre farklı kategorilere ayrılmaktadır (Quinto ve ark., 2012). LAB cinsleri arasında esas olarak; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* yer almaktadır. Bunların içerisinde yer alan *Lactobacillus* cinsi karbonhidrat bakımından zengin ortamlarda bol miktarda bulunan 100'den fazla türü içeren en büyük cinstir. *Lactobacillus* türlerinin çoğunluğu, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinden, ikinci büyük tür grubu ise sebzelerden ve bunların fermantasyon ürünlerinden izole edilmiştir (Djadouni ve ark., 2012).

Leuconostoc cinsine ait türler, çoğunlukla soğutulmuş etlerden veya klinik kaynaklardan izole edilirken, bitki materyallerinden, fermente süt ürünlerinden ve şaraplardan da elde edilebilmektedir (Goldstein, 2015). *Pediococcus* cinsinin türleri ise fermente içeceklerin,

özellikle de biraların bozulmasıyla ilişkilidir. *Lactococcus* türleri, bitkisel materyallerden izole edilmiş olmalarına rağmen, en çok ekşi süt gibi fermente süt ürünlerinde bulunmaktadır (Parada ve ark., 2007).

Lactobacillus cinsinin türleri, Gram-pozitif, hareketli olmayan ve spor oluşturma yeteneği içermeyen organizmalardır. Bu türler, asidik ortamlara toleranslı fakültatif anaeroblar olup, homofermentatif veya heterofermentatif özellikler gösterebilirler (Alkema ve ark., 2016).

Sağlığa faydaları nedeniyle bazı LAB türleri probiyotik olarak kullanılmaktadır. Probiyotikler, insan veya hayvan sağlığını iyileştiren, gıda takviyelerinde ve yoğurt gibi fermente gıdalarda bulunan, ya da bağırsak mikrobiyotasını dengelemek için kullanılan canlı bakteriler ya da mayalardır (Hati ve ark., 2013).

Bir organizmanın probiyotik olabilmesi için; patojenik olmaması, genellikle güvenli kabul edilmesi (GRAS—Generally Recognized as Safe), düşük pH'a tolerans gösterebilmesi, yüksek konsantrasyonlarda çoğalabilmesi, de-konjuge safra tuzlarına direnç göstermesi, bağışıklık sistemi tarafından tolere edilmesi ve antikor oluşumuna yol açmaması gerekmektedir (Belicova ve ark., 2013). Ayrıca, probiyotik organizmalar, yatay gen transferi (konjugasyon, transformasyon ve ransdüksiyon) yoluyla potansiyel patojenlere antibiyotik direnç genleri aktarmamalıdır. Probiyotik olarak kullanılan LAB suşlarının seçimi için, ciddi biyokimyasal ve genetik analizler ışığında dikkatli bir güvenlik değerlendirmesi yapılması zorunludur. Bu nedenle FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi), söz konusu mikroorganizmalar GRAS statüsünde tanımlanmış olmalarına rağmen, probiyotik olarak kullanılmaları, etiketlenmeleri ve güvenlik denetimleri konusunda düzenleyici bir otorite oluşturmuştur. FDA, ürünün kullanım amacına göre dört düzenleyici kategori belirlemiş ve her bir kategori için farklı gereksinimler ortaya koymuştur. Bu kategoriler (1) ilaçlar veya biyolojik ürünler; (2) besin takviyeleri; (3) gıda veya gıda bileşenleri; ve (4) tıbbi gıdalar olarak sınıflandırılmıştır (Hoffman ve ark., 2008).

Avrupa'da probiyotik gıdalar düzenlemeye tabi değildir. Bununla birlikte, mikrobiyal katkı maddeleri, bu katkı maddelerinin hayvanlarda ve insanlarda kullanımına dair güvenlik değerlendirmeleri talep edilmektedir. Avrupa'da, Hayvan Besleme Bilimsel Komitesi tarafından başlatılan Nitelikli Güvenlik Algısı (QPS) konsepti çerçevesine, yeterli güvenlik verilerine sahip türlerin kapsamlı güvenlik testleri yapılmadan pazarlanmasına izin verilmektedir (EFSA, 2007). Ayrıca, FAO ve WHO, gıdalardaki probiyotikler için kılavuz ilkeler oluşturmak amacıyla işbirliği içinde çalışmalar sürdürmektedir (Pineiro ve ark., 2007).

2.2.1 *Lactobacillus Plantarum*

Lactobacillus plantarum, Gram-pozitif, hareketsiz ve spor oluşturmeyen bir bakteri türüdür. *Lactobacillus* cinsi, genellikle katalaz-negatif özellik gösteren bakteriler olarak tanımlanmakta ve bu cinse ait türler, fermente gıdaların üretiminde ve çeşitli probiyotik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Kim ve ark., 2015). *Lb. plantarum*, gıda endüstrisinde özellikle probiyotik mikroorganizmaların ve mikrobiyal starter kültürlerin temel bileşenlerinden biri olarak önemli bir yer tutmaktadır. Bu bakteri türü, sağlığa katkı veren özellikleri ve gıda güvenliği üzerindeki etkileri nedeniyle, son yıllarda bu yöndeki araştırmaların odağı haline gelmiştir (Parvez ve ark., 2006). *Lb. plantarum*'un, hem geleneksel hem de yeni geliştirilen gıda sistemleri ile üretilen ürünlerin besinsel ve teknolojik özelliklerini iyileştirme potansiyeli oldukça yüksektir. Bu nedenle *Lb. plantarum* suşlarının bu yönde kullanımı yönündeki çalışmalar her geçen gün daha da gelişmekte ve katma değeri yüksek gıdaların tasarımında temel bileşenler olarak kabul edilmektedirler (Gänzle ve ark., 2017; Behera ve ark., 2018).

Özetle *Lb. plantarum*, özellikle fermantasyon süreçlerinde yaygın olarak kullanılan ve gıda üretiminde önemli yer tutan bir bakteridir. Fermente gıdaların üretiminde yüzyıllardır kullanılan bu mikroorganizma, özellikle çevresel stres koşullarına karşı son derece dayanıklı bir yapı sergilemekte ve çeşitli gıda maddelerinde bulunan fermente bileşenlerin üretimine katkı sağlamaktadır (Ouweland ve ark., 2016). Bu bakteri, gıda fermantasyonunun yanı sıra, sağlıklı yaşam için faydalı olabilecek biyokimyasal bileşenlerin sentezini gerçekleştirmektedir. Günümüzde *Lb. plantarum* suşları, farklı

besinsel ve biyoteknolojik özelliklere sahip yeni fonksiyonel gıdaların geliştirilmesinde kullanılmaktadır (Rodrigo ve ark., 2019). Özellikle, probiyotik özellikleriyle dikkat çeken bu tür, gıda endüstrisinde fermentasyon süreçlerinin etkinliğini artırırken, aynı zamanda insan sağlığını destekleyici etkilere de sahip olabilmektedir (De Vries ve ark., 2018; Wang ve ark., 2021).

Lb. plantarum, pek çok geleneksel gıda ürününden izole edilerek sistematik bir şekilde tanımlanmış ve moleküler düzeyde incelenmiştir. Yapılan çalışmalar, bu bakterinin geniş bir enzimatik sistemler yelpazesi sunduğunu ortaya koymuştur. α -amilaz, esteraz, lipaz, α -glukozidaz, β -glukozidaz, enolaz, fosfoketolaz ve laktaz dehidrogenaz gibi birçok enzimi sentezleme kapasitesine sahip olan *Lb. plantarum*, bu özellikleri sayesinde gıda işleme süreçlerinde önemli rol oynamaktadır. Bu enzimler, gıda bileşenlerinin metabolizmasında ve biyodönüşüm süreçlerinde aktif bir şekilde işlev görmektedir ve aynı zamanda besin maddelerinin daha iyi sindirilmesini de sağlamaktadırlar (Figuerola ve ark., 2021). Enzimatik aktivitelerinin yanı sıra, *Lb. plantarum*, bakteriyosinler, dipeptitler ve diğer koruyucu bileşenler gibi biyoaktif bileşikler de üretmektedir (Ruiz ve ark., 2015; Rocchetti ve ark., 2021). Bu bileşikler, hem gıda güvenliği sağlamak hem de gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmak için önemli işlevlere sahip bulunmuştur. Bakteriyosinler, özellikle patojenik mikroorganizmaların üremesini engelleyen doğal antibakteriyel bileşiklerdir ve *Lb. plantarum*, bu tür bileşiklerin üretiminde etkin bir mikroorganizma olarak tanımlanmıştır (Parada ve ark., 2007; Olaizola ve ark., 2017).

Lb. plantarum'un fonksiyonel özellikleri, onun sadece gıda üretiminde değil, aynı zamanda probiyotik terapilerde de yaygın olarak kullanılmasına olanak tanımaktadır. Probiyotikler, insanların gastrointestinal sistemlerinde yerleşip sağlık üzerinde faydalı etkiler yaratmakta kullanılan canlı mikroorganizmalardır (Zhang ve ark., 2020; Al-Yami ve ark., 2022). *Lb. plantarum*, probiyotik özellikleri nedeniyle sindirim sistemi sağlığını iyileştirebilen ve bağışıklık sistemini destekleyen bir mikroorganizma olarak kabul edilmektedir (Al-Tawaha ve ark., 2018). Bununla birlikte, *Lb. plantarum* suşlarının hayatta kalma oranı, epitel hücrelerine tutunma yeteneği ve güvenlik kriterleri, bu mikroorganizmanın probiyotik olarak kullanımı için belirleyici faktörlerdir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından belirlenen probiyotik

güvenlik kriterlerine göre, *Lb. plantarum*'un insan ve hayvanlar için güvenli bir mikroorganizma olduğu (GRAS) kanıtlanmıştır (FAO/WHO, 2006). Ayrıca, *Lb. plantarum*'un gastrointestinal sistemdeki patojenik mikroorganizmalara karşı rekabet edebilme yeteneği, bu bakteriyi, özellikle antibiyotiklere karşı dirençli patojenlerle mücadelede potansiyel bir biyokontrol aracı olarak öne çıkarmaktadır (Hammes ve ark., 2012; Lee ve ark., 2024).

Lb. plantarum'un, çeşitli gıda kaynaklarından izole edilip karakterize edilmesi, türün ekolojik çeşitliliğini anlamada önemli ip uçları sunmaktadır. Bu bakteri türü, birçok farklı ortamda, özellikle fermente gıdaların üretiminde, doğal bir mikroorganizma olarak yer almaktadır. *Lb. plantarum*'un gıda endüstrisindeki kullanımı, hem geleneksel gıda işleme yöntemlerini iyileştirilmesi ve hem de yeni nesil fonksiyonel gıdaların geliştirmesi açısından büyük bir önem taşımaktadır (Swain ve ark., 2020; Li ve ark., 2023). Bunun yanında, *Lb. plantarum* suşlarının üstün metabolik özellikleri, onların sadece fermente gıdalarda değil, aynı zamanda içecekler ve diğer biyoteknolojik uygulamalarda da kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Gänzle ve ark., 2019).

Lb. plantarum'un, gastrointestinal sistemdeki patojenlere karşı gösterdiği antimikrobiyal etkinlik, bu bakterinin gıda güvenliğine olan katkılarını daha da pekiştirmektedir (Li ve ark., 2023). *Lb. plantarum*'un ürettiği antimikrobiyal bileşikler, gıda ürünlerinde patojenlerin üremesini inhibe edebilir, bu da gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynar (Xia ve ark., 2017; Rocchetti ve ark., 2021). Bu özellikleri, *Lb. plantarum*'un gıda işleme endüstrisinde biyokontrol ajanı olarak kullanımını teşvik etmektedir. Bunun yanında, bu bakterinin gıda sistemlerinde ve terapide kullanımının sağladığı faydalar sadece gıda güvenliği ile sınırlı değildir. Zira *Lb. plantarum*, bağışıklık sistemini güçlendirici ve sindirim sistemini iyileştirici etkileri sayesinde insan sağlığı için faydalı bir mikroorganizma olarak kabul edilmektedir (Zhao ve ark., 2018; Zare ve ark., 2024).

Sonuç olarak, *Lb. plantarum*, gıda endüstrisinde probiyotik mikroorganizma ve starter kültür olarak çok yönlü bir kullanım alanına sahip olan ve bu alanda en fazla araştırma yapılan bakterilerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Sağlığa olan faydaları, enzimatik

aktiviteleri, biyolojik aktif bileşenleri ve antimikrobiyal etkileri, *Lb. plantarum*'u gıda güvenliği ve sağlığı açısından önemli bir mikroorganizma haline getirmektedir. Gıda üretimi ve biyoteknolojik uygulamalarda *Lb. plantarum*'un potansiyelinin daha da artırılması, gelecekte daha sağlıklı, güvenli ve fonksiyonel gıda ürünlerinin geliştirilmesine olanak tanıyacaktır (Zhang ve ark., 2020).

2.2.2 *Pediococcus pentosaceus*

P. pentosaceus kok morfolojisinde, gram-pozitif, hareket yeteneği içermeyen, fakültatif anaerop ve karbonhidratları homofermentatif yolla fermente edebilen bir LAB türü olarak tanımlanmaktadır. Özellikle geniş bir karbonhidrat fermentasyonu spektrumuna sahip olması, onu gıda fermentasyonları için kritik bir mikroorganizma haline getirmiştir Zamanla (Syakila ve ark., 2019). (1990 ve sonrası), *P. pentosaceus*'un bazı suşlarının probiyotik özellikleri ve hayvan büyümesini destekleyici etkilerinin kanıtlanması (Danielsen ve ark., 2007) bu bakterinin hem gıda ve hem de sağlık alanında önemli bir mikroorganizma olarak ele alınmasını ve üzerinde yoğun bilimsel ve teknolojik çalışmalar yürütülmesini beraberinde getirmiştir.

P. pentosaceus suşları, bakteriyosinler başat olmak üzere bazı farklı antimikrobiyal bileşikler üreterek, patojenik mikroorganizmaların üremesini inhibe edebilme özelliği içermektedir (Syakila ve ark., 2019). Özellikle söz konusu bakterinin ürettiği bakteriyosinlerin, gıda muhafazasında ve sağlık uygulamalarında antimikrobiyal ajan olarak kullanılabileceği kanıtlanmıştır. Zira, bu türün üyelerinin üretmiş olduğu antimikrobiyal bileşiklerin, patojenik bakteriler ve mantarların kontrol altına alınmasında etkili olduğu tespit edilmiştir (Kim ve ark., 2019). Günümüzde *P. pentosaceus* suşları için tanımlanan bu antimikrobiyal özellikler, onların gıda güvenliğinin artırılması ve gıda ürünlerinin raf ömrünün uzatılması amacıyla kullanımı çalışmalarına büyük bir ivme kazandırmıştır.

P. pentosaceus, sağlık üzerinde çok yönlü yararlı etkilere sahip bir bakteri olarak karşımıza çıkmaktadır. Örneğin; söz konusu bakterinin obezite tedavisi yanında anti-enflamasyon, antikanser, antioksidan, antifungal aktiviteleri ve kolesterol düşürücü

etkileri gibi çeşitli sağlık yararları belirlenmiştir (Kim ve ark., 2019). Bu mikroorganizmanın probiyotik özellikleri, sindirim sistemindeki yararlı mikroflora üzerinde düzenleyici etkiler yapmakta, bağışıklık fonksiyonlarını güçlendirmekte ve genel sağlık üzerinde olumlu etkiler yaratmaktadır (Mollestad ve ark., 2007; Qi ve ark., 2021).

P. pentosaceus'un probiyotik özellikleri, onun insan sağlığına faydalı mikroorganizmalar olarak kabul edilmesini sağlamıştır. Bu bakterinin ayrıca, bağışıklık sistemini destekleyerek vücudu hastalıklara karşı daha dirençli hale getirdiğine dair bilimsel veriler de giderek artmaktadır (Shan ve ark., 2021). Zira bu bakterinin kolon kanseri, mide-bağırsak hastalıkları ve sindirim bozukluklarının tedavisinde önemli bir potansiyel gösterdiği tespit edilmiştir (Syakila ve ark., 2019).

P. pentosaceus, gıda endüstrisinde geniş bir uygulama alanına sahiptir. Özellikle fermente gıda ürünlerinin üretiminde ve korunmasında bu bakteri önemli bir yer tutmaktadır. Fermentasyon süreçlerinde laktik asit üretimi, gıda ürünlerinin asidifikasyonunu sağlamak ve bu da söz konusu ürünlerin gıda kökenli hastalık ve gıda bozulması etmenlerinden korunma kapasitelerini artırmaktadır (Danielsen ve ark., 2007). Bunun yanı sıra, bu bakteri, işlenmiş gıda ürünlerinde katkı maddesi olarak da kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Gıda endüstrisinde, *P. pentosaceus*'un sağladığı probiyotik etkiler sayesinde, sindirim sistemi sağlığını destekleyen ve bağışıklık fonksiyonlarını artıran ürünler geliştirilmesi fikri yaygınlık kazanmış ve bu bakterinin fonksiyonel gıda ürünlerinin üretiminde kullanımı, gıda endüstrisinin gelişen trendlerinden biri haline gelmiştir (Sun ve ark., 2019).

P. pentosaceus 'un sağlık üzerindeki etkileri, yalnızca obezite ve sindirim sorunlarıyla sınırlı kalmamaktadır. Bu bakteri aynı zamanda kanser öncesi durumlar ve inflamasyonla mücadele etme potansiyeline de sahip bulunmuştur. Yapılan araştırmalar, *P. pentosaceus* 'un kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe etme ve serum kolesterol seviyelerini düşürme gibi etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, *P. pentosaceus*, güçlü bir antifungal aktiviteye sahip olduğu için mantar enfeksiyonlarının tedavisinde de alternatif bir ajan olarak görülmektedir (Kim ve ark., 2019).

Sonuç olarak, *P. pentosaceus*'un hem gıda endüstrisi hem de sağlık alanındaki potansiyel kullanım alanları oldukça geniştir. Gıda güvenliği, probiyotik destekleyici ürünler ve sağlık terapileri gibi birçok alanda bu türün kullanımı, gelecekte daha fazla araştırma ile geliştirmeye devam edecektir. Zira özellikle gıda güvenliği konusunda *P. pentosaceus* 'un konusunda önemli bir araç olarak kullanımı, gıda işleme süreçlerinde mikrobiyolojik kontrolü sağlamak adına büyük fırsatlar sunmaktadır.

2.3 Gıda kaynaklı patojenler

Gıda kaynaklı patojenler, genellikle gıdalarda bulunan, gıda kökenli enfeksiyonlar ve gıda toksikasyonları gibi ciddi hastalıklara yol açabilen bakteriler, virüsler ve parazitler olarak tanımlanmaktadır. Her yıl, dünya genelinde birçok kişi gıda kaynaklı enfeksiyonlar nedeniyle zarar görmekte ve bu enfeksiyonlar sonucu bazı bireyler hayatını kaybetmektedir. Bu durum, ciddi mali kayıplara yol açmakta ve üretkenliği olumsuz yönde etkilemektedir. Buradan hareketle, sağlıklı gıda tedariki ve güvenliğinin, insan sağlığı için büyük bir önem taşıdığını söylemek mümkündür. Zira sağlıklı beslenme eğiliminin, yalnızca bireysel sağlığı değil, aynı zamanda toplumsal sağlığı da iyileştireceği artık yadsınamaz bir gerçek haline gelmiştir. Bir bölgenin ekonomik kalkınması, gıda güvenliği ilkelerinin etkin bir şekilde uygulanmasına ve sürekli olarak gözden geçirilmesine bağlıdır. Güçlü araştırmalar ve adil yasaların etkin bir şekilde uygulanması, güvenli gıda tedarikinin sağlanması için kritik öneme sahiptir (Bhattacharyya ve Das, 2022).

Gıda kaynaklı hastalıklar, bir patojenin gıda ile birlikte alındığında, insan konakçısında yerleşerek çoğalması ya da toksijenik bir patojenin gıda ürünüde ürettiği toksinlerin insan konakçısı tarafından tüketilmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu tür hastalıklar, (a) gıda kaynaklı enfeksiyonlar ve (b) gıda kaynaklı zehirlenmeler olmak üzere başlıca iki sınıf altında değerlendirilmektedir. Gıda kaynaklı enfeksiyonlar, tipik olarak bir kuluçka dönemi içerdiğinden, semptomların ortaya çıkmasına kadar geçen süre gıda kaynaklı zehirlenmelere göre çok daha uzun olmaktadır. Dünya genelinde gıda kaynaklı hastalıklarla ilişkili en yaygın bakteriler arasında; *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus*

faecium, *Salmonella* Typhimurium ve *Pseudomonas aeruginosa* yer almaktadır (Anderson ve ark., 2016; Rogers ve ark., 2016).

2.3.1 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes, insan ve hayvanlarda hastalığa neden olan bulaşıcı bir gıda kaynaklı patojendir. Bu organizma, çok yaygın bir şekilde doğada bulunan, gram-pozitif, spor oluşturmayan, kapsülsüz (unencapsulated), fakültatif anaerobik ve çubuk şeklinde bir bakteridir. *L. monocytogenes*'in tanımlanmış 13 serotipi bulunmakla birlikte, yalnızca 1/2a, 1/2b, 1/2c ve 4b serotipleri insanlar için sağlık açısından önemli ajanlar olarak kabul edilmektedir. Diğer gıda kaynaklı patojenlerin aksine, *L. monocytogenes* düşük nem içeriğine ve yüksek tuz konsantrasyonuna sahip gıdalarda da üreme yeteneği gösterebilmektedir. Daha da önemlisi, *L. monocytogenes* soğukta muhafaza koşullarında üreyebilen nadir patojenlerden biridir. Gıda ortamında varlığını sürdürme ve çoğalma kapasitesi, bu organizmanın kontrol edilmesini özellikle zorlaştırmaktadır. Söz konusu bakterinin neden olduğu hastalığın genel adı olarak bilinen listeriyoz, genellikle hafif bir hastalık olarak ortaya çıksa da, genç ve yaşlı bireyler, hamile kadınlar ve bağışıklık sistemi baskılanmış kişiler gibi risk altındaki gruplarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Capita ve ark., 2019).

Özellikle hamile kadınlarda, listeriyozun ölüm oranı % 30'a kadar çıkabilmekte ve bu oran, *Salmonella* ve *Clostridium* türlerinin ölüm oranlarını aşmaktadır. En yaygın bulaşma şekli, bu mikroorganizma ile kontamine olmuş gıda veya yemlerin tüketilmesidir. Ayrıca, anneden fetüse dikey bulaşma da olası bir bulaşma yolu olarak önem arz etmektedir (Chen ve ark., 2017). Hayvandan insana (zoonotik), temas yoluyla veya veteriner hekimler arasında deri lezyonları yoluyla bulaşma gibi yaygın bulaş yolları yanında, nozokomiyal bulaşma gibi daha nadir diğer bulaşma yolları da görülmektedir (Pal ve ark., 2017).

Hayvanlarda, *L. monocytogenes*'in enfeksiyonu genellikle meningoensefalit şeklinde ortaya çıkmakta ve bu hastalık silaj hastalığı ya da sirkülasyon hastalığı olarak da adlandırılmaktadır. Hayvanlardaki enfeksiyonlar çoğunlukla subklinik seyirli olsa da,

gebe hayvanlarda yavru atma, gıda zehirlenmesi ve ölüm gibi ciddi sonuçlar doğurabilmektedir. Ayrıca bu bakteri, bazı hayvan türlerinde, özellikle kuşlar, balıklar ve kabuklularda, sepsis ve beyin iltihabı gibi ölümcül hastalıklara yol açabilmektedir (Dhama ve ark., 2015).

2.3.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli bakterisi, ilk kez 1885 yılında Alman çocuk doktoru Theodor Escherich (1857-1911) tarafından bebeklerin dışkılarından izole edilerek tanımlanmıştır (Feng ve ark., 2007). *E. coli*, *Escherichia* cinsine ait, gram-negatif, spor oluşturmeyen ve çubuk şeklinde bir bakteridir. Genellikle üreme ortamlarında tek başına veya çiftler halinde bulunmakta ve hücreleri tipik olarak $1-3 \mu\text{m} \times 0,4-0,7 \mu\text{m}$ boyutlarında olmaktadır. Fakültatif anaerobik olan bu bakteri, çevrede, gıdalarda ve sıcakkanlı hayvanların bağırsak sistemlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. *E. coli* nispeten basit genetik ve metabolik doğası nedeniyle biyoteknoloji ve mikrobiyoloji alanlarında, en sık araştırılan prokaryotik model organizma olarak haline gelmiştir. *E. coli*, dışkı, toprak ve su ortamlarında uzun süre canlılığını sürdürebilmekte ve çoğunlukla doğal çevre yanında yiyecek ve içeceklerde fekal kirliliğin indikatörü olarak kullanılmaktadır. Aerobik koşullar altında taze dışkıda 2-3 gün boyunca hızlı bir şekilde çoğalırken, bu sürenin ardından sayıları giderek azalmaktadır (Brennan ve ark., 2010). Bu bakteri flagellar hareket yapma yeteneğindedir, ancak bazı suşları hareketsizdir. *E. coli*'nin optimum üreme sıcaklığı 37°C olarak tanımlanmıştır (Tominaga ve ark., 1994). Negatif boyama prosedürleri ile yapılan incelemelerde, kapsülleri karanlık bir zemin üzerinde açık bir şekilde görülebilir. İnce bir hücre duvarına sahip olup, yalnızca bir veya iki kat peptidoglikan tabaka içermektedir (Köhler ve ark., 2011).

E. coli, uygun koşullar altında laboratuvar ortamında kolay ve düşük maliyetle üretilen bir bakteridir. Bu bakterinin optimum koşullarda bölünme süresi yaklaşık 20 dakika civarındadır. *E. coli*, en yaygın şekilde çalışılan prokaryotik model organizmalardan biri olup, rekombinant DNA teknolojisi için bir konak organizma olarak, ayrıca DNA manipülasyonu ve protein üretimi için deneysel bir araç olarak biyoteknoloji ve mikrobiyoloji alanlarında önemli bir yere sahiptir (Idalia ve ark., 2017).

Bunun yanı sıra, *E. coli* dünya genelinde insanlarda gastrointestinal enfeksiyonlara yol açmakta, böbrek yetmezliğine ve ciddi vakalarda ölüme neden olabilen gıda kaynaklı bir patojen olarak tanınmaktadır (Ray ve Singh, 2022).

2.3.3 *Staphylococcus aureus*

S. aureus, hareketli olmayan, kapsülsüz ve spor oluşturmeyen bir bakteridir. Bu bakteri, insan ve hayvanların deri ve mukoza zarlarının normal florasında yer alabilmektedir. Mikroskop altında üzüm salkımı şeklinde kümelenmiş olarak gözlemlenen *S. aureus*, kanlı agar plakalarında kültüre edildiğinde tipik olarak hemoliz yapan, büyük, yuvarlak ve altın sarısı koloniler oluşturmaktadır. Fakültatif anaerobik, gram-pozitif bir kok morfolojisinde olan bu bakteri, birçok antibakteriyel antibiyotiğe karşı dirençli suşlar barındırmaktadır (Pal ve ark., 2020).

S. aureus, insan burnu, deri, giysiler ve cansız yüzeyler gibi kuru ve stresli ortamlarda hayatta kalabilen, kuruma ve yüksek ozmotik koşullara toleranslı bir organizmadır. Bu bakteri, 7°C ile 48,5°C arasında geniş bir sıcaklık aralığında (optimum 30-37°C) ve pH 4,2 ile 9,3 arasında (optimum 7-7,5) üreyebilme yeteneğindedir (Chaibenjawong ve Foster, 2011). Üremesi, pH değeri yaklaşık 7 olan gıdalarda kolaylıkla gerçekleşir. Özellikle bu bakteri için riskli gıdalar olarak kabul edilen et, balık, kümes hayvanları, yumurta ve süt gibi hayvansal gıdaların çoğu bu pH değerine sahiptir (Rho, 2007).

S. aureus enfeksiyonları, hafif deri enfeksiyonlarından bakteriyemi, endokardit, nekrotizan pnömoni, toksik şok sendromu ve gıda zehirlenmesi gibi ciddi enfeksiyonlara kadar geniş bir yelpazeye sahiptir (Lin ve Peterson, 2010). *Staphylococcus* enterotoksinleriyle kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi, stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmelerine yol açmaktadır (Argudin ve ark., 2010). Bu bakterinin serolojik olarak beş farklı enterotoksin türü (A, B, C, D ve E) bulunmaktadır ve enterotoksin A, gıda zehirlenmesi salgınlarının en yaygın nedeni olarak kabul edilmektedir (Asperger, 1994).

İnsan nüfusunun %30-80'inin *S. aureus* taşıyıcısı olduğu ve bu taşıyıcıların %50'sinin

gıda zehirlenmesine yol açan varyantları taşıdığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle, sağlıksız gıda işleme yöntemleri, *S. aureus* kontaminasyonunun önemli bir kaynağı olarak kabul edilmektedir (Atanassova ve ark., 2001). Stafilokokal gıda zehirlenmesi, dünya genelinde halk sağlığı programlarında önemli bir endişe kaynağı olma özelliğini sürdürmektedir (Hennekinne ve ark., 2012). Zehirlenme belirtileri genellikle hızlı bir şekilde başlar (30 dakika-8 saat içinde) ve bulantı, şiddetli kusma, karın ağrısı ve kramplar gibi semptomları içerir. Ciddi sıvı kaybı durumunda, dehidrasyon ve hipotansiyon gibi bulgular da görülebilir (Murray, 2005).

S. aureus enfeksiyonları, hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde önemli hastalıklara ve ölümlere yol açmaktadır (Jackson ve ark., 2020). Gıda kaynaklı hastalıkların yaygın bir nedeni olan *S. aureus*, ABD'de her yıl yaklaşık 241.000 hastalığa neden olmaktadır. Ancak, bu enfeksiyonların çoğunda, sınırlı sağlık ekinliği nedeniyle, sağlık tesislerine başvuru oranı düşük olmaktadır (%10). Bu durum da yılda tahmini 6 ila 80 milyon vakanın eksik bildirilmesine yol açmaktadır (Kadariya ve ark., 2014). Gelişmekte olan ülkelerde gıda kaynaklı hastalık izleme sistemlerinin yetersiz olduğu göz önüne alındığında, stafilokok kaynaklı enfeksiyonların görülme sıklığının rapor edilenden çok daha yüksek olduğu düşünülmektedir (Argaw ve Addis, 2015).

2.3.4 *Bacillus subtilis*

B. subtilis, bugüne kadar detaylı bir şekilde karakterize edilen bakterilerden biri olup, gram-pozitif bakteriler için yaygın bir model organizma olarak kullanılmaktadır. Bu bakteri, çubuk şeklinde olup, yüksek çevresel stres koşullarda hayatta kalabilmek için endospor üreme kabiliyeti göstermektedir. Bu endosporlar, çok yüksek sıcaklık ve kuruma gibi zorlu koşullara dirençlidir. *B. subtilis*, doğal ortamı olan toprakta, oksijen gerilimindeki önemli farklılıklar da dahil olmak üzere sürekli değişen çevresel faktörlerle karşılaşmaktadır. Örneğin; yağmur yağışı oksijenin erişilebilirliğini azaltır, çünkü oksijenin sudaki difüzyon hızı, gaz fazındaki hızından yaklaşık 10.000 kat daha düşüktür. Aerobik solunum sırasında oksijen, temel elektron alıcısı olarak işlev gördüğünden, *B. subtilis* anaerobik büyüme için çeşitli alternatif stratejiler geliştirmiştir (Cruz-Ramos ve ark., 2000).

B. subtilis, gıda zehirlenmesi vakalarında ciddi bir rol oynamaktadır. Ancak, önemli miktarda hücre dışı enzim veya enfeksiyona yol açabilecek diğer faktörleri üretme yeteneğinde değildir. Bu sebeple, *B. subtilis* toksijenik bir organizma olarak sınıflandırılmamaktadır. Bununla birlikte, sürekli olarak maruz kalan bireylerde alerjik veya aşırı duyarlılık reaksiyonlarına yol açtığı bildirilen hücre dışı enzimlerden biri olan subtilisin üretmektedir (Logan ve ark., 1988).

2.3.5 Enterokoklar

Enterokoklar, gram-pozitif bakteriler olup, memeli gastrointestinal florasında zararsız üyeler olarak kabul edilmekte iken, son yirmi yıl içinde *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium* türleri, dünya çapındaki hastanelerde idrar yolu enfeksiyonları, cerrahi alan enfeksiyonları, bakteriyemi ve enfektif endokardit gibi hastalıkların etiolojisinde yer alan, çok dirençli fırsatçı patojenler olarak tanımlanmaya başlamıştır (Werner, 2008). Günümüzde enterokoklar, hastane ilişkili enfeksiyonlara neden olan gram-pozitif patojenler arasında üçüncü sırada yer almakta olup (Hidron ve ark., 2008), bu durum, yüksek morbidite, mortalite ve sağlık maliyetlerine yol açmaktadır.

Enterokoklar, yaygın olarak kullanılan üç antimikrobiyal ajan sınıfına- aminoglikozitler, beta-laktamlar ve glikopeptitler- karşı çoklu içsel ve edinilmiş direnç özelliklerine sahip bulunmuşur (Arias ve ark., 2009). Bu güçlü antibiyotik dirençlilik mekanizmaları nedeniyle, enterokok enfeksiyonlarının tedavisi, klinisyenler için giderek daha zor bir hâl almaktadır. Zira söz konusu bakteri yeni kuşak antibiyotiklere karşı da hızlı bir şekilde direnç gelişme yeteneği içermektedir (Lentino ve ark., 2008).

Enterokoklar, sadece hastane ortamında tehdit oluşturmakla kalmayıp, gıda kaynaklı kontaminasyonlarda da önemli bir sorun teşkil etmektedir. Gıdalardaki enterokok varlığı, genellikle kötü hijyen koşullarının bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. *E. faecalis* ve/veya *E. faecium* türleri, özellikle geleneksel ve endüstriyel peynirlerin kontaminasyonuna neden olmaktan sorumlu başlıca kontaminantlar olarak tanımlanmıştır (Fracalanza ve ark., 2007). Ayrıca, tavuk etinin işlenmesi sırasında bu bakterilerle kontamine olması da gıda endüstrisine sıklıkla karşılaşılan bir durum olarak

karşımıza çıkmaktadır (Bortolaia ve ark., 2016). Gelsomino ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan bir çalışmada, *E. faecalis*'in, dökme süt depolama tanklarındaki sütlerden yaygın bir şekilde izole edilmesi (Gelsomino ve ark., 2001) bu sorunun sadece etlerle sınırlı olmadığına işaret etmektedir.

2.3.6 *Salmonella* Typhimurium

Salmonella, Gram-negatif, çubuk şeklinde ve spor oluşturmeyen bir bakteridir. *S. Typhimurium* başta olmak üzere tifoit olmayan *Salmonella* serotiplerinin neden olduğu enfeksiyon genel olarak salmonelloz olarak adlandırılmaktadır. Salmonelloz dünya çapında her yıl on milyonlarca insanda meydana gelen, gıda kaynaklı en yaygın hastalıklardan biri olarak kabul edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, yılda yaklaşık 1 milyon salmonelloz vakası rapor edilmekte olup, bunların 19.000'i hastaneye yatışa neden olmakta ve 380'i ölümle sonlanmaktadır (Scallan ve ark., 2011). *S. Typhimurium*, insanlarda gastroenterit gibi hastalıklara yol açan en yaygın non-tifoidal *Salmonella* (NTS) serotiplerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır.

Gıda ham maddeleri, hem hasat öncesi, hem hasat sırası hem de hasat sonrası dönemde bu patojenle kontamine olabilir. Bakteriyemi ve sepsis gibi ciddi *Salmonella* enfeksiyonları, bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde daha sıklıkla görülmekte olup, genellikle hastaneye yatış ve ölümle sonuçlanmaktadır (Vugia ve ark., 2004). *Salmonella*'nın çevresel streslere karşı gösterdiği direnç ve yaygın bir şekilde biyofilm oluşturma karakteristiği, bu patojenin gıda zincirinden tamamen yok edilmesini neredeyse olanaksız hale getiren faktörlerin başında gelmektedir (Humphrey, 2004).

2.3.7 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa, Pseudomonadaceae familyasına ait aerobik, hareketli, karbonhidratları fermente edemeyen, oksidaz pozitif ve gram-negatif bir bakteridir (Lyczak ve ark., 2000). Bu bakteri çevrede yaygın olarak bulunmakla birlikte, sıklıkla toprak, su, bitkiler ve sağlıklı bireylerin normal florasında yer almaktadır. Söz konusu bakterinin normal

insan florasında, özellikle gastrointestinal sistem, boğaz, burun mukozası, koltuk altı ve perine bölgesi gibi nemli cilt yüzeylerinde kolonize olduğu saptanmıştır. Ancak, konak savunmasının zayıfladığı durumlarda, çeşitli virülans faktörleri aracılığıyla ciddi enfeksiyonlara neden olma potansiyeline sahiptir. Bu virülans faktörleri sayesinde, *P. aeruginosa* endokardit, dermatit, osteokondrit, idrar yolu enfeksiyonları, akut ve kronik akciğer enfeksiyonları gibi çeşitli klinik tablolara yol açabilmektedir (Palleroni ve ark., 2003). Ayrıca, *P. aeruginosa*, gıda kaynaklı bir patojen olarak içme suyu, süt ürünleri, et gibi gıda sistemlerinde ciddi bozulma ve gıda kökenli enfeksiyon kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır (Li ve ark., 2023).

2.4 Bakteriye Biyofilmler ve Oluşum Aşamaları

Bazı mikroorganizmalar, planktonik formda bağımsız hücreler halinde varlık gösterebilecekleri gibi, biyofilm adı verilen, farklı veya aynı türlerden oluşan konsorsiyumlar içinde de yaşamlarını sürdürebilme yeteneğindedirler. Biyofilmler, canlı veya cansız yüzeylerde, mikroorganizmaların birbirlerine tutunarak ürettikleri hücre dışı polimerik madde (EPS) matrisi içinde yaşamlarını sürdüren, planktonik formlarına kıyasla üreme hızları ve gen ifadeleri açısından farklılık gösteren düzenli ve organize bir mikroorganizma topluluklarıdır (Lohse ve ark., 2018). Biyofilm oluşumu, mikroorganizmaların çevresel stres faktörlerine karşı korunmasını sağlayan, yani üreme uyumu ile ilişkili evrimsel bir adaptasyon mekanizması olarak kabul edilmektedir. Özetle biyofilm yapılarını paylaşan mikroorganizmalar; konakçı ile etkileşimlerini etkin hale getirmek, dış çevresel faktörlere karşı direnç kazanmak ve antibiyotikler gibi zararlı bileşenlere karşı korunmak amacıyla kendilerini koruyucu bir yapı ile çevreleme ve çok hücreli formlar benzeri yaşam biçimleri oluşturma yönünde evrimleşmişlerdir (Castiblanco ve Sundin, 2016).

Biyofilm oluşumunun, mikroorganizmaların antibiyotik direncinin gelişmesine ve mikrobiyal enfeksiyonların kalıcı hale gelmesine yol açabilen dirençli hücrelerin oluşumunu teşvik ettiği farklı araştırmacılar tarafından tespit edilmiş bir gerçektir (Pang ve ark., 2018). Biyofilmler; tıbbi implantlar, canlı dokular, su kanalları, borular, hastane yüzeyleri, gıda üretim tesisleri ve diğer biyotik ve abiyotik yüzeyler gibi doğada her yerde

bulunabilmeke ve ciddi patolojik etkiler yaratmaktadır (Donlan, 2002; Donelli ve Vuotto, 2014). Biyofilmle ilişkili mikroorganizmalar, bilinen antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde direnç, metabolik aktivite, üreme hızında azalma ve virülans faktörlerin üretimi ile ilişkili gen ifade değişiklikleri nedeniyle planktonik yapılara nazaran belirgin farklılıklar içermektedirler. (Sharma ve ark., 2015; Gupta ve ark., 2016).

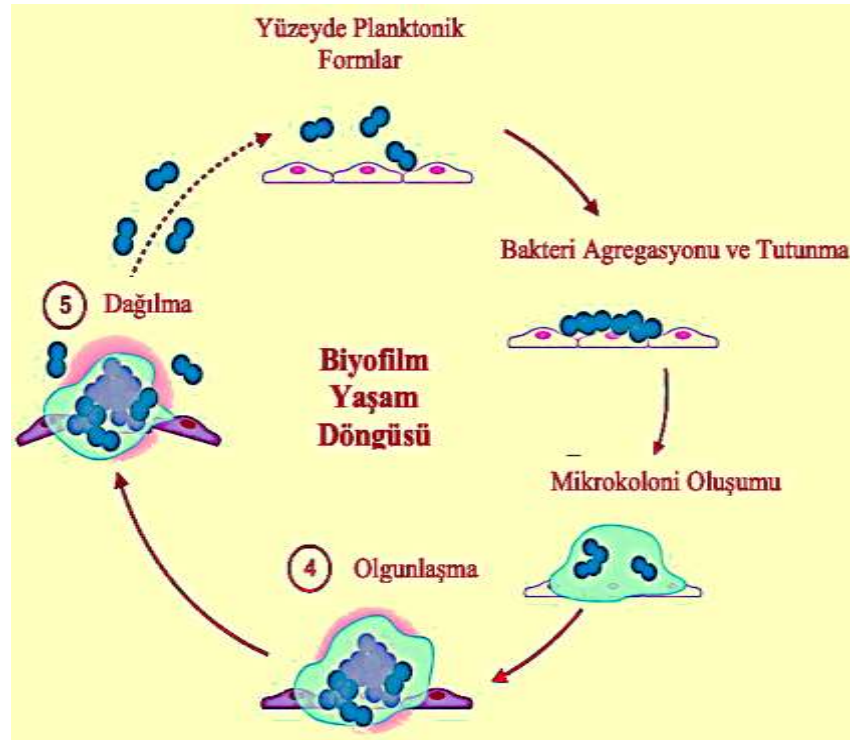
Ulusal Sağlık Enstitüleri'ne (NIH) göre, mikrobik ve kronik enfeksiyonların sırasıyla % 65 ve % 80'i biyofilmlerden kaynaklanmaktadır. Biyofilm formları hem dokuları ve hem de tıbbi cihazları ve yüzeyleri enfekte edebilmektedir. Özellikle tıbbi cihazlar, biyofilm enfeksiyonlarına oldukça duyarlıdır. Bunlar arasında meme implantları, ventriküler şantlar, doku dolgu maddeleri, ventriküler destek cihazları, kontakt lensler, kateterler, eklem protezleri, üriner kateterler, ortopedik implantlar, kalp pilleri, mekanik kalp kapakçıkları,

defibrilatörler, vasküler greftler, endotrakeal tüpler ve ses protezleri yer almaktadır (Jamal ve ark., 2015). Ayrıca, biyofilmlerin neden olduğu doku ilişkili enfeksiyonlar arasında diş eti iltihabı, osteomyelit, akciğer enfeksiyonu, endokardit, diş plağı, kronik bademcik iltihabı, kronik larenjit, kronik yaralar, safra yolları ve idrar yolu enfeksiyonları gibi ciddi sağlık sorunları bulunmaktadır (Rather ve ark., 2021).

Hastalık Kontrol Merkezleri'nin (CDC) 2007 raporuna göre, ABD'de yaklaşık 1,7 milyon hastane kaynaklı enfeksiyon ve buna bağlı 500.000'den fazla ölüm biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar nedeniyle meydana gelmekte olup, bu enfeksiyonların tedavi maliyeti yaklaşık 11 milyar ABD dolarını bulmaktadır (Brinkman ve ark., 2016). Ayrıca, gıda sektörlerinde de biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ciddi sorunlara yol açabilmektedir. Kümes hayvanları, süt ürünleri, hazır gıda ve su ürünleri yetiştiriciliği gibi alanlarda biyofilmler, gıda bozulmalarına, salgınlara ve ölümlere neden olmaktadır (Giaouris ve Simões, 2018).

Biyofilm oluşumu, bakterilerin serbest yüzen planktonik formdan, biyofilm oluşturan birbirine tutunmuş konsorsiyum formlarına geçişini içeren karmaşık ve çok aşamalı bir süreçtir. Bu sürecin; sıcaklık, pH, yerçekimi kuvvetleri, hidrodinamik kuvvetler, Brown

hareketleri, yüzeylerin doğası, hücresel algılama, ikincil haberciler ve diğer sinyal molekülleri başta olmak üzere birçok hücre içi ve dışı çevresel koşuldan etkilendiği bilinmektedir (Jamal ve ark., 2015; Zhao ve ark., 2017). Şekil (2-1)'de gösterildiği üzere, biyofilm oluşumu beş temel aşamaya ayrılabilir. Bunların ilki, planktonik bakterilerin biyotik ya da abiyotik yüzeylere geri dönüşümlü olarak tutunmasıdır. Bu tutunma, ortamda bulunan besin seviyeleri, ortamın pH'sı ve yüzey sıcaklıkları gibi faktörlerle şekillenen çekici veya itici kuvvetler tarafından gerçekleştirilmektedir. İkinci aşamada, bakterilerin yüzeylere geri dönüşümsüz olarak tutunması gerçekleştirilmektedir. Üçüncü aşamada, çok katmanlı karmaşık biyomoleküllerden oluşan bir dış matriksin meydana gelmesi, mikrokolonilerin oluşumu ve EPS salgılanması karakteristiktir. Bu polisakkarit salgıları, agregasyon, yapışma ve yüzey toleransını artırarak kolonizasyonu kolaylaştırmaktadır. Dördüncü aşama, biyofilmin olgunlaşması ve üç boyutlu bir yapıya ulaşması ile tanımlanmaktadır. Bu yapı, bakterilerin ürettiği hücre dışı matris bileşenleri üzerine inşa edilmektedir. Beşinci ve son aşamada ise, olgun biyofilmden ayrılan bakteriler planktonik hale geçmekte ve yeni çevrelere taşınarak tekrar biyofilm oluşumuna yol açmaktadır (Veerachamy ve ark., 2014) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Bakteriyel biyofilm yapılarının genel oluşumu aşamaları (Sharma ve ark.,2023)

2.5 Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) Antimikrobiyal Etkinliği ve Probiyotik Potansiyeli

Laktik Asit Bakterileri (LAB), gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan ve sağlığa faydalı özellikleriyle bilinen mikroorganizmalardır. Bu bakteriler, endüstriyel anlamda ve sağlık alanında özellikle probiyotik özellikleri ile dikkat çekmektedir. Probiyotikler, en genel tanımını ile tüketici sağlığı üzerinde olumlu etkilere sahip mikroorganizmalar olarak tarif edilmektedir. LAB, tipik olarak gram-pozitif, anaerobik koşullarda üreyebilen ve karbonhidratların fermentasyonu sonucu laktik asit üreten bakterilerdir. Bu bakteriler, genellikle gıda fermentasyon işlemleri sırasında doğal olarak veya endüstriyel uygulamalarda biliçli bir şekilde ham madelere ilave edilmektedirler. LAB'nin antimikrobiyal özellikleri, onların zengin metabolik çeşitliliklerinin bir sonucu olarak ürettikleri farklı bileşiklerin sentezi ile doğrudan ilişkilidir. Bu bileşikler arasında laktik asit, asetik asit, propiyonik asit, sorbik asit, benzoik asit, hidrojen peroksit, diasetil, asetoin, etanol, fenolik bileşikler ve protein yapılı bileşikler yer almaktadır. Bu metabolitlerin her biri, özellikle gıda endüstrisinde, patojenik mikroorganizmaların üremesini engelleme ve gıda güvenliğini sağlama potansiyeline sahiptir (Dalié ve ark., 2010).

Bakteriyosinler, LAB suşları tarafından üretilen ve antimikrobiyal aktivite gösteren, protein yapılı bileşiklerdir. Bu bileşiklerin; esas olarak bakteriyel hücre duvarlarını ya da membranlarını hedef alarak onların üremesini durdurma (bakteriyostatik etki) ya da onları öldürme (bakteriyosidal etki) yeteneği bulunmaktadır. Bu nedenle bakteriyosinler, özellikle gıda üretiminde, patojen mikroorganizmaların kontrolü açısından büyük önem taşımaktadır. Gıda ürünlerinde, spesifik olarak ise fermente gıdalarda bakteriyosinler, gıda güvenliğini artıran önemli bir bileşen olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra, bazı LAB suşları, sadece bakteriyosin değil, aynı zamanda başka antimikrobiyal peptitler de sentezleye bilmektedir. Bu peptitler, mikroorganizmaların hücre duvarlarını tahrip ederek onların çoğalmasını engellemekte ve böylece gıda ürünleri için koruyucular olarak kullanılmaktadır. Bakteriyosinler, hem gram-pozitif ve hem de gram-negatif gıda patojeni bakteriler üzerinde yüksek düzeyde etkinlik göstermektedirler (Settani ve ark., 2005).

Organik asitlerin üretimi, LAB suşlarının gıda kalitesini, organoleptik özelliklerini (tat, koku, renk) ve raf ömrünü uzatmaya yardımcı olan önemli bir özelliktir. Laktik asit, bu bakteriler tarafından en yaygın olarak üretilen asittir. Gıdalara kattığı diğer teknolojik yararlar yanında, gıda ürünlerinde pH seviyesini düşürerek patojenik mikroorganizmaların üremesini engelleme yeteneği, laktik asit üretimini önemli kılan bir başka husustur. Laktik asit bakterileri ayrıca asetik asit, propiyonik asit ve sorbik asit gibi asitler de üreterek gıda ürünlerinde benzer koruyucu etkileri göstermektedir. Ayrıca, hidrojen peroksit gibi oksidan bileşikler de bakteriyel patojenlere karşı etkili olduğu bilinen LAB'nin metabolik ürünleri arasında yer almaktadır. Bu bileşik, bakteriyel hücrelerin oksidatif strese maruz kalmasına ve hücre bütünlüğünün bozulmasına yol açarak patojenler üzerinde etkinlik göstermektedir.

Diasetil, etanol ve fenolik bileşikler gibi diğer organik bileşikler de LAB tarafından üretilen ve kontamine floranın çoğalmasını engelleme kapasitesine sahip olan metabolizma ürünleridir. Bu bileşiklerin, özellikle gıda ürünlerinde antimikrobiyal aktivite göstermesi, gıdaların raf ömrünü uzatmada ve gıda güvenliğini artırmada kritik bir rol oynamaktadır. Diasetil, asetoin ve etanol, aynı zamanda bazı fermente gıdaların karakteristik aroma ve tat bileşikleri olarak tanımlanmıştır.

LAB suşları, geleneksel gıda fermantasyonlarında, (Örneğin; yoğurt, peynir, kefir gibi) starter kültürler olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu starter kültürler sayesinde, hem gıda güvenliği sağlanmakta hem de ürünlerin besin değeri artırılmaktadır. LAB suşları, fermantasyon sırasında gıda maddelerinde pH seviyesini düşürerek gıda patojenlerinin üremesini inhibe ettiği gibi, toksin üretimini de engelledikleri saptanmıştır. Bunun yanı sıra, LAB'nin ürettiği ekzopolisakkaritler (EPS), gıda ürünlerinde doku iyileştirmelerine ve gıda kalitesinin artmasına katkı sağlamaktadır. Bunun yanında EPS, söz konusu mikroorganizmaların biyofilm formasyonu için gerekli bir yapısal bileşen olarak, LAB'nin patojenlere karşı etkinliğinde de kritik bir rol üstlenmektedir.

Probiyotik LAB suşları, bağırsak sağlığının iyileştirilmesinde homeostazın korunmasında önemli roller üstlenmektedir. Probiyotik LAB suşları, bağırsak mikrobiyomunun dengelenmesine yardımcı olarak disbiyozu engelleme kabiliyeti göstermektedirler. Bu

özellikleri, bağırsak sağlığının korunmasına ve bağışıklık sisteminin güçlendirilmesine ciddi katkılar sağlamaktadır. Ayrıca, probiyotik LAB suları, patojen mikroorganizmaların (örneğin *Clostridium difficile*, *E. coli*, *Salmonella*) üremesini baskılama yeteneğindedirler ve bu yolla gastrointestinal hastalıkların önlenmesinde ciddi bir etkinliğe sahiptirler. Probiyotiklerin, antimikrobiyal peptitler üretme potansiyeli, bağırsak sağlığının iyileştirilmesinde önemli bir strateji olarak görülmektedir. Bu peptitler, bakteriyosinler gibi, bağırsak patojenlerinin üremesini engelleyen bileşiklerdir ve bağırsak mukozasını koruyarak bağırsak bariyer fonksiyonlarını desteklerler. LAB'nin antimikrobiyal etkinliği, sadece gıda güvenliğinde değil, aynı zamanda sağlık alanında da geniş bir uygulama alanı bulmaktadır.

LAB'nin probiyotik özellikleri, antimikrobiyal aktiviteleri ve besin kalitesini artırma potansiyelleri, sadece günümüzde değil, gelecekteki yeni gıda güvenliği ve sağlık uygulamaları için de büyük bir önem taşımaktadır. Bununla birlikte, LAB suşlarının biyoteknolojik kullanımlarının optimize edilmesi ve antimikrobiyal potansiyellerinin daha iyi anlaşılması için, bu bakterilerin genetik, biyokimyasal ve metabolik özelliklerinin daha detaylı bir şekilde araştırılması ve aydınlatılması zorunlu bir görev olarak önümüzde durmaktadır. Zira ancak bu yolla gıda endüstrisi, tıbbi uygulamalar ve bağırsak sağlığı gibi alanlarda, LAB'nin potansiyelinden daha fazla faydalanmak mümkün olabilecektir.

2.6 Caco2 Hücreleri ve Deneysel Model Olarak Önemi

Caco-2 hücreleri, insan kolon karsinomundan türetilmiş, epitelyal hücrelere ait bir hücre hattıdır ve bu hücre hatları özellikle farmasötik araştırmalarda, ilaçların emilimi, taşınması ve metabolizması ile ilgili çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hücreler, enterosit olarak bilinen, ince bağırsağın iç yüzeyinde yer alan ve besin maddelerinin emiliminde önemli rol oynayan emici hücrelere benzer özellikler göstermektedirler. Caco-2 hücre hattı; belirli kültür koşulları altında, bağırsak epitelinin taklit eden, sıkı bağlantılara sahip polarize bir tek tabaka yapısı oluşturması nedeni ile, bağırsak bariyerinin işlevinin incelendiği çalışmalarda değerli bir model olarak kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2012).

Bu polarize yapılar, hücreler arasında sıkı bağlantılar ve selektif geçirgenlik özellikleri oluşturarak, intestinal bariyer fonksiyonlarını simüle etmekte ve bu özellikleri, Caco-2 hücrelerini, ilaç emilimi ve taşıma mekanizmaları üzerine yapılan araştırmalar için son derece uygun bir model haline getirmektedir (Fedi ve ark., 2021). Ayrıca, Caco-2 hücreleri, bağırsak bariyerinin patojenlere karşı gösterdiği koruyucu mekanizmaların araştırılmasında da önemli bir model olarak kullanılmaktadır. Caco-2 hücre hatları ile yürütülen deneylerde, probiyotiklerin patojen mikroorganizmalarla rekabet ederek, patojenlerin Caco-2 hücrelerine tutunma kapasitesini azalttığı ve dolayısıyla enfeksiyon riskini engellediği gözlemlenmiştir (Van ve ark., 2020). Probiyotiklerin bu etkileşimleri, bağırsak bariyerinin bütünlüğünün korunmasında ve bağırsak sağlığının iyileştirilmesinde önemli bir strateji olarak öne çıkmaktadır.

2.7 Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) Antimikrobiyal Etkinliği ve Probiyotik Potansiyeli

S. Typhimurium, tüm dünyada gıda kaynaklı hastalıkların en önemli etkenlerinden biri olma özelliğini sürdürmektedir ve biyofilm oluşturma yeteneği, bu patojenin gıda ortamlarında virülansını artırarak kalıcılığını sağlamakta önemli bir rol oynamaktadır. *S. Typhimurium* biyofilmleri de, diğer biyofilm formları gibi, esas olarak farklı çevresel stres faktörlerine ve antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek direnç göstererek, bu patojenin çevresel kalıcılığını güçlendirmekte ve neden olduğu enfeksiyonların engellenmesini ya da eradikasyonunu büyük ölçüde güçleştirmektedir (Chmielewski ve Frank., 2003 ; Harrell ve ark., 2021). Bu bağlamda, *Salmonella* biyofilm oluşumunu engellemeye yönelik stratejiler, gıda güvenliği açısından büyük önem taşımaktadır (Li ve ark., 2017).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, laktik asit bakterilerinin kültür süpernatantlarının, *S. Typhimurium* biyofilm oluşumunu inhibe etmedeki potansiyel etkilerine odaklanmıştır. LAB süpernatantlarının, çeşitli deneysel koşullar altında, *S. Typhimurium*'da biyofilm biyokütlesini ve canlılık seviyesini anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir (Gómez ve ark., 2016). Özellikle belirli LAB suşlarından elde edilen süpernatantların, *S. Typhimurium* biyofilm yapılarının oluşumunun başlangıç aşaması olan yüzeylere tutunma sürecini bozarak biyofilm oluşumunu engellediği rapor edilmiştir. Bu etki, *S.*

Typhimurium'un biyofilm oluşturma yeteneğini sınırlayarak, gıda ortamlarında bu patojenin kalıcılığını belirgin bir şekilde azaltmaktadır (Rossi ve ark., 2019; Giaouris, 2020).

LAB süpernatantlarının söz konusu biyofilmlere karşı gösterdiği inhibitör etkilerinin sadece tutunma aşaması ile sınırlı olmadığı, mikrokolonizasyon ve biyofilm olgunlaşma aşamalarını da etkilediği tespit edilmiştir (Yan ve ark., 2018; Meng ve ark., 2022; Che ve ark.,2024). Örneğin; LAB tarafından üretilen en yaygın bileşiklerden biri olan ve ortamın pH seviyesini düşüren laktik asidin, *S. Typhimurium* biyofilm oluşumunda kritik bir aşama olan mikrokolonizasyonu önemli ölçüde bloke ettiği saptanmıştır (Gänzle, 2015). Asidik ortamın, ayrıca biyofilm başlangıç aşamasında yer alan bakterilerin EPS üretimlerini de olumsuz yönde etkileyerek biyofilm oluşumunu engellediği belirlenmiştir (Stewart ve Franklin, 2008). Ayrıca, LAB tarafından üretilen bakteriyosinlerin, *S. Typhimurium*'un hücre membran yapılarını destabilize ederek ya da bozarak veya protein sentezini inhibe ederek antimikrobiyal etkinlik sergileyebildiği de kanıtlanmıştır (Corsetti ve van der Meer, 2012; Pérez ve ark., 2021). Bu mekanizma sayesinde, *S. Typhimurium*'un. hücresel bütünlüğü bozulmakta, bakteriyel üreme engellenmekte ve neticede biyofilm oluşumunu sınırlanmaktadır (Gänzle ve ark., 2015). Bunun yanı sıra, bazı LAB suşlarının ürettiği hidrojen peroksit, oksidatif stres oluşturarak patojenik bakterilerde canlılık kaybına yol açmaktadır (Vinderola ve ark., 2019). Bu etkiler, *S. Typhimurium* hücrelerinin biyofilm yapısındaki canlılığını ve ürememe potansiyelini azaltarak, bu patojenin gıda sistemlerinde neden olduğu riskleri önemli ölçüde bertaraf etmektedir (Gómez ve ark., 2016).

Sonuç olarak, LAB kültür süpernatantları, *S. Typhimurium*'un biyofilm oluşumunu engelleme potansiyeline sahip önemli bir antimikrobiyal kaynak olarak görölmektedir. Bu antibiyotik dışı stratejiler, gıda sistemlerinde *Salmonella* ve benzeri patojenlerin kontrol edilmesinde, özellikle gıda güvenliği uygulamalarında, umut verici bir yaklaşımlar olarak değerlendirilmektedir (Patel ve ark., 2012; Gómez ve ark., 2016).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri suşları ve üretme koşulları

Çalışmada kullanılan laktik asit bakterileri ve patojenik suşlar, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Prokaryotik Genetik Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Probiyotik özellikleri ile tanınan *Lactobacillus plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* gibi laktik asit bakterileri, bakteriyel üremeyi desteklemek için özel olarak formüle edilmiş De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar ve broth ortamlarında (Merck, Rahway, İtalya) kültüre edilmiştir.

Diğer taraftan, gıda kaynaklı hastalıkların etiyolojisinde önemli rol oynayan *S. Typhimurium* ve *E. coli* gibi patojenik suşlar, genel amaçlı bir besiyeri olan Luria-Bertani (LB) agar ve broth (Oxoid, Milano, İtalya) kullanılarak kültüre edilmiştir. LB besiyeri, geniş bir mikroorganizma spektrumunun büyümesini destekleyen temel bileşenler içerdiği için patojenik bakterilerin çoğalmasını sağlar (low ve ark.,2013).

Bunun yanı sıra, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* ve *P. aeruginosa* gibi diğer patojenik bakteriler, Tryptic Soy Broth (TSB) ve Tryptic Soy Agar (TSA) ortamlarında (Oxoid, Milano, İtalya) kültüre edilmiştir. TSB ve TSA, özellikle çeşitli bakteri türlerinin üremesini destekleyen zengin besin maddeleri içerdiğinden, farklı patojenlerin ve laboratuvar koşullarına adapte olmuş suşların üremesini teşvik etmektedir (Boussif ve ark.,2026).

Bakteri stoklarının uzun süreli korunması amacıyla, üreme ortamlarına %40 oranında steril gliserol eklenmiş ve bu hazırlanan stoklar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Bu yöntem, mikroorganizmaların genetik ve fenotipik özelliklerinin korunmasını sağlamakta ve gelecekteki çalışmalarda kullanılmak üzere stabil bakteri koleksiyonlarının oluşturulmasına olanak tanımaktadır (Dahdouh ve ark., 2020).

3.1.2 Besiyerlerin içeriği ve hazırlanma koşulları

Bu çalışmada kullanılan sıvı besiyerleri ve agar içeren katı besiyerleri çizelge 3.1.'de verilmiştir. Besiyerlerinin hazırlanması, üretici firmaların talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri

Besiyeri ismi	Üretici Firma	Katalog Numarası
de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar	Merck, Germany	1.10660
de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Broth	Fluka, Germany	69966
Eosin Methylene Blue Agar (EMB)	Merck, Germany	1.05222
Brain Heart Infusion Broth (BHI)	Merck, Germany	1.15029
Nutrient Broth	Neogen, USA	7146A
LB Broth	Merck, Germany	1.10285
Tryptic Soy Broth (TSB)	Merck, Germany	1.05459
Agar	Applichem, Germany	A3477
MacConkey agar	Merck, Germany	1002050500
Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD)	Merck, Germany	105287
Mannitol Salt agar (MSA)	Condalab	1062
Mannitol Egg Yolk Polymyxin agar (MYP Agar)	Merck, Germany	105267

MRS Agar	g/L
Pepton	10.0
Et ekstraktı	8.0
Maya ekstraktı	4.0
D(+)-Glikoz	20.0
Dipotasyum hidrojen fosfat	2.0
Sodyum asetat trihidrat	5.0
Triamonyum sitrat	2.0
Magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2
Manganez sülfat tetrahidrat ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0.05
Agar	12.0

*Ekstra Tween 80 (1 mL/L) (Fisher-BP338, USA) eklenir.

MRS Broth	g/L
Pepton	10.0
Et ekstraktı	8.0
Maya ekstraktı	4.0
D(+)-Glikoz	20.0
Dipotasyum hidrojen fosfat	2.0
Sodyum asetat trihidrat	5.0
Triamonyum sitrat	2.0
Magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.2
Manganez sülfat tetrahidrat (MnSO ₄ .4H ₂ O)	0.05

*Ekstra Tween 80 (1 mL/L) (Fisher-BP338, USA) eklenir.

Eosin Methylene Blue Agar (EMB)	g/L
Hayvan Dokusunun Peptik Sindirimi	10.00
Dipotasyum Fosfat	2.00
Laktoz	5.00
Sakkaroz	5.00
Eosin-Y	0.40
Metilen Mavisi	0.065
Agar	13.5

Brain Heart Infusion Broth (BHI)	g/L
Sodyum klorür	5.0
Proteaz pepton	10.0
Kalp özütü	9.7
Disodyum fosfat	2.5
Dekstroz	2.0
Beyin özütü	7.8

Tryptic Soy Broth (TSB)	g/L
Kazein pepton (pankreatik)	17
Dipotasyum hidrojen fosfat	2.5
Glikoz	2.5
Sodyum klorür	5.0
Soya peptonu (papain sindirimi)	3.0

MacConkey agar	g/L
Jelatinin Pankreatik Sindirimi	17
Kazeinden elde edilen pepton	1.5
Kazeinden elde edilen pepton	1.15
Laktoz	10.0
Safra Tuzu	1.5
Sodyum Klorür	5.0
Nötr Kırmızı	0.03
Agar	15.0
Kristal Viyole	0.001

Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD)	g/L
Maya özü	3.0
L- Lizin	5.0
Laktoz	7.5
Sakkaroz	7.5
Ksiloz	3.5
Sodyum klorür	5.0
Sodyum deoksikolat	2.5
Sodyum tiyosülfat	6.8
Ferrik amonyum sitrat	0.8
Fenol kırmızısı	0.08
Agar	15.0

Mannitol Salt agar (MSA)	g/L
Proteaz Pepton	10.00
Sığır Eti Özü	1.00
Sodyum Klorür	75.00
D-Mannitol	10.00
Fenol Kırmızısı	0.025
Agar	15.00

Mannitol Egg Yolk Polymyxin agar (MYP Agar)	g/L
Sığır eti özü	1.00
Pepton	10.00
Mannitol	10.00
NaCl	10.00
Fenol kırmızısı (%95 etanol içinde %1 çözelti)	2.5ml
Agar	15

Nutrient Broth	g/L
Sığır eti ekstrakt	3.0
sodyum klorür	5.0
Pepton	15.0
D(+)-glukoz	1.00

Nutrient Agar	g/L
Sığır eti ekstrakt	3.0
Sodyum klorür	5.0
Pepton	15.0
D(+)-glukoz	1.00
Agar	15.00

Ortam bileşenleri, belirtilen sıralamaya göre distile su içinde çözülmüş ve ardından toplam çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltinin pH değeri, 2 N NaOH çözeltisi eklenerek, (7.3 $\pm$ 0.02) aralığında ayarlanmıştır. pH ayarı, ortamın

mikroorganizmaların üreme koşullarına uygun olmasını sağlamak amacıyla dikkatle yapılmıştır.

Broth ortamları, sterilizasyona hazırlık olarak 10 mL'lik hacimlere, cam tüpler içerisine bölüştürülmüştür. Agar içeren besiyerleri ise sterilizasyon sürecinden sonra, her biri 15 mL olacak şekilde Petri kutularına dökülmüş ve oda sıcaklığında polimerizasyonları sağlanmıştır.

Besiyerlerinin sterilizasyonu, cam muhafazalarda hazırlanan ortamların, 1 atmosferlik buhar basıncı altında, 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlanmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD): Hassas terazide tartılan 56,68 gram agar ortamı, 1000 ml distile suda süspanse edilmiş ve sık sık çalkalanarak ısı uygulamasına tabi tutulmuştur. Bu işlem sırasında otoklav yapılmadan veya aşırı ısıtma uygulanmadan, karışım hemen 50°C'deki bir su banyosuna alınmış ve besiyeri sıcaklığı 50°C civarına düştükten sonra steril Petri plakalarına dökülerek katılaşması beklenmiştir.

1X Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	g/L
Sodyum klorür (NaCl) (Merck-1.06400, Germany)	8.0
Potasyum klorür (KCl) (Merck-1.04936, Germany)	0.2
Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄) (Merck-1.06586, Germany)	1.44
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄) (Merck-1.04873, Germany)	0.24

121°C'de 15 dakika uygulaması ile sterilize edilir.

% 40'lık Gliserol
Gliserol (Fisher-BP229-1, USA)
Distile su

400 mL gliserol distile suyla 1 L'ye tamamlanmıştır.

%0.1 kristal violet	mL
Kristal viyole 0.1 g	100mL

* Manyetik ısıtıcıda çözdürülür ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanır.

%1 Agaroj jel	Miktar
1X TAE (Tris-asetat-EDTA) tampon	100.0 mL
Agaroj (Sigma-A5093, Germany)	1 g

3.2 Yöntem

3.2.1 LAB biyofilm üretimi ve ölçümü

Biyofilm oluşumunu değerlendirmek için steril 96 kuyucuklu polistiren mikrolakalar (TPP, İsviçre) kullanılmış ve her kuyucuğa 200 µL MRS besiyeri eklenmiştir. Bu besiyeri, bakteri üremesi ve biyofilm oluşumu için gerekli besin açısından zengin bir ortam sağlamıştır. Bakteriyel süspansiyonlar, optik yoğunlukları ($A_{600\text{ nm}}$) $0,25 \pm 0,05$ ’e ayarlanarak standart hale getirilmiştir, bu da yaklaşık 10^7 - 10^8 CFU/ml bakteri konsantrasyonuna karşılık gelmektedir. Her bir mikrolaka kuyucuğuna, standart bakteri süspansiyonundan 200 µL’lik miktarlar konulmuş ve üzerine eşit miktarda bakteri aktarımı sağlanmıştır. İnokülasyon sonrası mikrolakalar 30°C sıcaklıkta, aerobik koşullarda 48 saat inkübe edilmiştir. Bu süre, bakterilerin mikrolaka yüzeyine tutunması, biyofilm matrisinin oluşması ve biyofilm yapısının olgunlaşması için yeterli olmuştur. İnkübyasyon süresinin sonunda, tutunmamış ve gevşek biyokütleleri uzaklaştırmak için kuyucuklar 200 µL steril 150 mM NaCl çözeltisiyle üç kez yıkanmıştır. Bu işlem, sadece biyofilm yapısına sıkıca tutunan bakterilerin kalmasını sağlamıştır.

Biyofilm yapısındaki bakteriler, 200 µL metanol ile 15 dakika boyunca sabitlenmiş, bu işlem biyofilm yapısının korunmasına ve boyamanın etkinleştirilmesine yardımcı olmuştur. Sabitleme sonrasında mikrolakalar boşaltılmış ve kalan metanolün uzaklaştırılması için oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Biyofilmler, matriks yapısında bulunan polisakkaritlere bağlanma özelliği nedeniyle % 0,1 kristal viyole ile 45 dakika boyunca boyanmıştır. Fazla boya, mikropilaka akan musluk suyu altında hafifçe yıkanarak uzaklaştırılmış, böylece bağlanmamış boyanın yanlış pozitif sonuçlara yol açması önlenmiştir. Biyofilm biyokütlesine bağlı kristal viyole, 200 µL %33 asetik asit ile çözündürülerek optik yoğunluğu ölçülebilir hale getirilmiştir. Her bir kuyucuğun optik yoğunluğu, biyofilm biyokütlesine bağlı kristal viyole miktarının bir göstergesi olarak 595 nm dalga boyunda bir plaka okuyucu (Bio-Rad, ABD) ile ölçülmüştür. Biyofilm oluşumunu ölçmek için yapılan bu testler, dörtlü tekrarlar gerçekleştirilmiş ve çeşitli zaman noktalarında (24, 48, 72, 96 saat) biyofilm oluşumu değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak inoküle edilmemiş MRS broth içeren bir kuyu kullanılmıştır. Bu biyofilm oluşum testi, Chen ve arkadaşları (2017) tarafından tanımlanan yöntemin modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu protokol, bakteri izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneklerini güvenilir ve tekrarlanabilir bir şekilde ölçmeye olanak tanımaktadır.

3.2.2 Otoagregasyon ve koagregasyon analizleri

Otoagregasyon: Bakteriyel otoagregasyon, Collado ve arkadaşları (2007) tarafından tanımlanan protokolün modifiye edilmiş bir versiyonu kullanılarak saptanmıştır. Kısaca, bakteriyel hücreler gece boyunca inkübe edilen kültürlerden toplanmış ve 15 dakika süreyle $5000 \times g$ hızında santrifüj edilmiş ve bakteriyel kültür ortamı kalıntılarından arındırılmak üzere fosfat tamponu (pH 7.0) ile iki kez yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından kültürler, fosfat tamponu içerisinde yaklaşık 10^7 ila 10^8 CFU/mL olacak şekilde süspanse edilmiştir.

Bakteriyel süspansiyonun optik yoğunluğu (OD_{600}), hücreler süspanse edildikten hemen sonra (A_x) ve 2, 4, 6, 10 ve 24 saat sonrasında ölçülmüştür. Otoagregasyon yüzdesi, her zaman noktasındaki absorbans değerleri kullanılarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\text{Otoagregasyon Yüzdesi} = [(A_x - A_y)/A_x] \times 100$$

Burada “Ay” bir zaman noktasındaki absorbands değeri ifade etmektedir. Bu hesaplama, zaman içerisindeki bakteriyel kümelenme ve çökme oranlarını belirleyerek otoagregasyonun derecesini göstermektedir.

Koagregasyon: Laktik asit bakterileri (LAB) ve patojenik bakteriler arasındaki koagregasyon analizi, Zhou ve arkadaşları (2024) tarafından tarif edilen protokolün modifiye edilmiş bir versiyonuna kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyde, LAB ve patojen bakterilerden hazırlanan süspansiyonlar eşit hacimlerde (2 mL) steril tüplerde karıştırılmış ve karışımın koagregasyonunun gerçekleşebilmesi için çalkalanmadan oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Karıştırılmış süspansiyonun optik yoğunluğu (OD₆₀₀), karışımın hemen ardından (Apro + Apat) ve 2, 4, 6, 10 ve 24 saat sonrasında (Amix) ölçülmüştür. Koagregasyon yüzdesi, her zaman noktası için aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Koagregasyon Yüzdesi} = ((\text{Apro} + \text{Apat} - \text{Amix}) / (\text{Apro} + \text{Apat})) \times 100$$

Bu hesaplama, LAB ve patojen bakteriler arasındaki koagregasyon derecesini zaman içinde takip etmekte ve sürecin gelişimini yansıtmaktadır.

Her iki analizde de OD₆₀₀ değerlerinin zamanla azalması, bakteriyel kümelenme ve çökme oranlarının arttığını göstermektedir. Bu da daha yüksek otoagregasyon veya koagregasyon yüzdeleri ile sonuçlanmaktadır. Bu deneyler, LAB suşlarının otoagregasyon ve patojen bakterilerle koagregasyon yeteneklerini değerlendirmek için kullanılmakta olup, LAB'nin tutunma özellikleri ve patojen kolonizasyonunu engelleme potansiyeli hakkında değerli bilgiler sunmaktadır.

3.2.3 Planktonik LAB formlarının antagonistik aktivitesi

Laktik asit bakterilerinin (LAB) patojenik bakterilere karşı gösterdiği antagonistik etkiler, planktonik formdaki patojen suşlarına karşı LAB'nin inhibe edici kapasitesini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, her bir patojenik bakteri suşunun 1,5 ×

10^8 CFU/mL konsantrasyonunda hazırlanmış süspansiyonları, 1 mL Brain Heart Infusion (BHI) broth içinde hazırlanarak 96 kuyucuklu mikropalakalara (microplate) eşit bir şekilde dağılmıştır. Mikropalakalara eklenen LAB suşları, aynı konsantrasyona ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) sahip olacak şekilde, her bir kuyucuğa 1 mL taze MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) broth ile eklenmiştir. Bu karışımlar, her iki bakteri türünün etkileşimlerini gözlemlemek amacıyla 30°C 'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, her bir patojenin üremesi değerlendirilmiştir. Bunun için, inkübasyon sürecinin ardından, her bir mikropalakadan alınan kültür süspansiyonlarının seri on kat dilüsyonları hazırlanmış ve uygun besiyerleri üzerine yayılmıştır. İnkübasyon sonrasında, her bir numune için üç replika plaka kullanılarak bakteri sayımı yapılmıştır. Bakteri sayımında kullanılan yöntem, her bir koloni sayısının mililitre başına log CFU/mL cinsinden ifade edilmesini sağlamıştır.

Patojenik bakterilerden her biri için tespit edilen koloni sayıları, aşağıda belirtilen seçici besiyerleri kullanılarak yapılmıştır:

- *L. monocytogenes* için Oxford-Listeria-Selective-Agar (Base, Merck): Bu besiyeri, *L. monocytogenes*'i diğer mikroorganizmalarla karışmadan seçici bir şekilde izole etmeyi amaçlayan, özel formülasyonlara sahiptir.
- *P. aeruginosa* için MacConkey agar: *P. aeruginosa*'nın seçiminde, bu agar, gram-negatif bakterilerin üremesini teşvik eder ve *P. aeruginosa*'nın kendine özgü özelliklerini (örneğin, pigment üretimi) belirgin hale getirir.
- *E. coli* için Eosin Methylene Blue (EMB) agar: EMB agar, özellikle *E. coli*'yi izole etmek için kullanılan, kolonilerde belirgin renk değişiklikleri yaratan bir besiyeridir.
- *S. Typhimurium* için Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar: XLD agar, özellikle enterik patojenleri izole etmek için kullanılan bir besiyeri olup, *Salmonella* suşlarının tespitine olanak tanır.

Bunun yanı sıra, Nocera ve arkadaşlarının (2021) önerdiği protokole dayanarak, *S. aureus*, *E. faecium* ve *E. faecalis* gibi diğer patojen bakterilerin tespiti için Mannitol Salt

Agar (MSA) kullanılmıştır. Bu besiyeri, özellikle tuza dayanıklı olan bu patojenlerin üremesini seçici bir şekilde sağlar. Ayrıca, *B. subtilis* için, Juneja ve arkadaşlarının (2024) metodolojisini takiben, Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) agar kullanılmıştır. Bu besiyeri, özellikle *Bacillus* türlerinin izole edilmesinde ve tanımlanmasında etkili bir araçtır.

Toplam canlı bakteri sayımları, her bir numunenin mililitre başına log CFU/mL cinsinden hesaplanarak rapor edilmiştir. Bakteri sayımı, hem deneyin doğruluğunu hem de elde edilen sonuçların güvenilirliğini sağlamak amacıyla, her numune için üç paralel plaka kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Böylece, her bir analiz sonucunun tekrarlanabilirliği ve istatistiksel doğruluğu sağlanmıştır.

Bu deneysel tasarım, LAB'nin patojenik bakterilerin planktonik formlarının üremesini engelleyen antagonistik özelliklerini değerlendiren kapsamlı bir yaklaşım sunmaktadır. LAB'nin patojenik bakterilerle etkileşimi, bakteriyel büyüme üzerindeki inhibe edici etkilerin detaylı bir şekilde analiz edilmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca, bu tür çalışmalar, LAB suşlarının potansiyel probiyotik özelliklerini, özellikle patojen kolonizasyonunu engelleme ve mikrobiyal dengeyi sağlama kapasitelerini ortaya koymaktadır.

3.2.4 LAB biyofilmlerinin antagonistik aktivitesi

Laktik asit bakterilerinin biyofilm formunda patojen bakterilere karşı antagonistik etkisini değerlendirmek amacıyla mikropkaya kuyucuklarında LAB biyofilmleri oluşturulmuştur. Biyofilmler oluşturulduktan sonra, her bir kuyucuğa $1,5 \times 10^8$ CFU/mL konsantrasyona sahip patojen bakteri içeren 1 mL taze Beyin Kalp İnfüzyonu (BHI) broth eklenmiştir. Mikropkalar, LAB biyofilmleri ve patojenik suşlar arasındaki etkileşimlerin gelişmesi için 48 saat boyunca 30°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, patojenik bakteri sayıları seçici besiyerlerinde yayılmış plaka yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Bu analiz, LAB biyofilmlerinin varlığında patojenik bakterilerin canlı sayılarının belirlenmesini sağlamıştır. Karşılaştırmalı analiz amacıyla, yalnızca patojenik bakterilerin bulunduğu ve LAB içermeyen kontrol kuyucukları hazırlanmış, böylece LAB biyofilmlerinin inhibitör

etkileri değerlendirilmiştir. Bu deneysel tasarım, Rezaei ve arkadaşları (2021) tarafından açıklanan metodolojiye dayanmakta olup, LAB biyofilmlerinin patojenik bakteriler üzerindeki antagonistik etkilerinin net bir şekilde gözlemlenmesine olanak sağlamıştır. Çalışmada, LAB biyofilmlerinin patojen üremesini sınırlandırma potansiyeli değerlendirilmiş; LAB biyofilmlerinin bulunduğu kuyulardaki patojen seviyeleri ile kontrol kuyularındaki seviyeler karşılaştırılarak LAB'nin gıda güvenliği ve koruma alanındaki potansiyel rolü ortaya konmuştur.

3.2.5 Hücresiz süpernatantların (CFS) hazırlanması ve antimikrobiyal aktivite değerlendirilmesi

LAB kültürlerinden elde edilen hücresiz süpernatantlar (CFS), Hwanhlem ve arkadaşlarının (2017) önerdiği protokole dayanarak hazırlanmıştır. Kısaca, *Lb. plantarum* ve *P. pentosaceus* bakterileri, 5.0 mL'lik tüplerde MRS broth içinde 30 °C'de 24 saat ve 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından, her bir bakteri kültürü, hücresiz süpernatant elde etmek amacıyla 4 °C'de 10 dakika süreyle $11200 \times g$ hızında santrifüjlenmiştir (Hettich 22R, Tuttlingen, Almanya).

Santrifüj işlemi sonrasında hücre kalıntıları uzaklaştırılmış ve elde edilen süpernatantlar, 0,45 µm gözenek çapına sahip membran filtreler kullanılarak tamamen hücrelerden arındırılmıştır. Hücresiz süpernatantların (CFS) içeriğindeki organik asitlerin antimikrobiyal etkinliğini inaktive etmek amacıyla, pH değeri 6,5'e ayarlanmış ve bu işlem için 4M NaOH kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanan CFS, daha sonraki testlerde patojen bakterilere karşı potansiyel antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır.

CFS'nin antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek amacıyla, Drumond ve arkadaşlarının (2023) tarif ettiği agar kuyu difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde, süpernatantların bakteriyel üremeyi inhibe etme kapasitesi, inhibisyon bölgesinin ölçülmesiyle belirlenmiştir.

İlk olarak, hedef patojenik bakteriler (*S. Typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, ve *E.s faecium*), 0,5 McFarland bulanıklık standardına göre standardize edilmiştir. Bakteriyel süspansiyonlar, steril pamuklu çubuklarla besiyeri olan nutrient agar plakalarına eşit bir şekilde yayılmış ve homojen bir bakteri üreme hattı oluşturulmuştur.

Plakalara steril bir cork borer ile dikkatlice kuyular açılmış ve her bir kuyucuğa 100 µL hücresiz süpernatant eklenmiştir. Bu işlem sonrasında, antimikrobiyal ajanların agar üzerinde difüzyonunu sağlamak amacıyla plakalar, 24 saat süreyle 37°C’de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin sonunda, Eji ve arkadaşlarının (2023) önerdiği şekilde, her bir kuyucuk etrafında oluşan inhibisyon bölgeleri bir cetvel kullanılarak ölçülmüştür. İnhibisyon bölgesinin büyüklüğü, hücresiz süpernatantın antimikrobiyal etkinliğini belirlemek için kullanılmıştır. Bu inhibisyon alanı, bakteri üremesinin engellendiği alanı temsil etmektedir ve bu şekilde süpernatantın bakteriyel üremeyi engellemeye yönelik potansiyeli nicel olarak değerlendirilmiştir.

Her bir inhibisyon bölgesi, CFS’nin antimikrobiyal aktivitesinin derecesini belirlemek için kaydedilmiştir. Bu test, farklı patojen suşları üzerinde yapılan antimikrobiyal etki analizinin doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlamak amacıyla üç paralel replika ile tekrarlanmıştır.

S. Typhimurium 'un biyofilm oluşturma kapasitesine karşı LAB (Laktik Asit Bakterisi) hücresiz süpernatantlarının (CFS) inhibitor etkisi değerlendirilirken, ilk aşamada, *S.Typhimurium* kültürü % 1 oranında (1: 100 v/v) steril, tuzsuz Luria Bertani (LB) broth içerisinde 37 °C’de 18 saat boyunca, 200 rpm hızında çalkalama uygulanarak elde edilmiştir (Thermo Electron Joun C 4i). Her bir LAB CFS’den 5 µL mikropalkanın farklı kuyucuklarına eklenmiş; ardından her kuyucuğa sırasıyla 190 µL tuzsuz Luria Bertani Broth (LB) besiyeri ve 5 µL gecelik *S. Typhimirium* kültürü ilave edilmiştir. Bu karışımlar, biyofilm oluşumunu değerlendirmek üzere 20 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol grubunda, LAB CFS içermeyen LB broth ortamında yalnızca patojen

bakteriler kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise yalnızca LB broth ortamı kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda elde edilen biyofilmler kristal viyole ile boyanarak, biyofilm oluşumunun miktarı 600 nm dalga boyunda bir spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür (Tatsaporn al.,2020). Biyofilm inhibisyonu, Melo ve arkadaşları (2016) tarafından geliştirilen formül kullanılarak saptanmıştır.

$$\% \text{ Biyofilm İnhibisyonu} = [\Sigma(\text{Kontrol}) - \Sigma(\text{Patojen+CFS})] / \Sigma(\text{Kontrol}) \times \%100$$

3.2.6 Patojenik bakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunmasının engellenmesi

Caco-2 hücreleri, Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri (DMEM) içinde %10 fetal inek serumu (FBS) ve antibiyotikler eklenerek, anaerobik koşullarda 37°C ve %5 CO₂ ortamına aktarılmış ve çoğaltılmıştır. Hücreler, 24 kuyucuklu plakalar üzerine ekilmiş ve her iki günde bir pasajlanmıştır (Wang ve ark., 2022).

Bu deneyde, iki farklı laktik asit bakterisi (LAB) suşunun, patojenik bakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunma yeteneği üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. İlk olarak, bakteri izolatlarının aktif kültürleri, 8000 × g hızında 5 dakika santrifüjlenerek, süpernatantlardan ayrılmış ve iki kez PBS ile yıkanarak deneye hazır hale getirilmiştir.

Hücre kültürlerinin konsantrasyonu, DMEM besiyeri kullanılarak 2 × 10⁷ CFU/mL'ye ayarlanmış ve steril tüplere aktarılmıştır. Bu aşamada, hem LAB suşları hem de patojenik bakteriler içeren 150 µL hacminde bir karışım hazırlanmış ve bu karışım, Caco-2 hücre tek tabakalarına eş zamanlı inkübasyon için eklenmiştir. Kültürler, etkileşimi kolaylaştırmak amacıyla anaerobik koşullarda ve % 5 CO₂ ile 37°C'de 90 dakika süreyle inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, yapışmamış bakteri hücreleri, steril bir pipet kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Ardından, Caco-2 hücreleri, bağlanmamış bakterileri temizlemek amacıyla iki kez PBS ile yıkanmıştır. Yapışan bakteriler, Caco-2 hücrelerine

bağlı bakterilerin ayrılması için 37°C’de 10 dakika süreyle 300 µL tripsin-EDTA çözeltisi ile muamele edilmiştir.

Ayrılan bakteriler, uygun şekilde seyreltilmiş ve Wang ve arkadaşları (2022) tarafından özetlenen metodolojiye uygun olarak, canlı hücre ile ilişkili bakteri kolonilerini ölçmek amacıyla seçici agar ortamına ekilmiştir. Bu işlem, LAB suşlarının patojenik bakterilerle etkileşimdeki tutunma potansiyelini ve bakteriyel kolonizasyonu engelleme kapasitesini değerlendirmek için kullanılmıştır.

3.2.7 Biyofilm mikroyapısının tarama elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmesi

Biyofilmler 10 mM sodyum kakodilat tamponunda %2,5 glutaraldehit çözeltisi içinde 4°C’de 24 saat boyunca sabitlenmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında hafifçe karıştırılarak aynı tamponda 15 dakika boyunca üç kez yıkanmış ve bir etanol serisinde (%50, %70, %80, %90, %95 ve %100) giderek artan konsantrasyon sırasıyla dehidre edilmiştir. Örnekler ZEISS EVO 40 model SEM tablaları üzerinde kurutulmuş ve fotoğraflanmıştır (Stefania vd., 2017).

3.2.8 Kantitatif gerçek zamanlı PZR (qRT-PZR)

3.2.8.1 Biyofilmden RNA izolasyonu

S. Typhimurium’un biyofilminden toplam RNA izolasyonu, LB broth ortamında %1 oranında inokülasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. Kültürler, 37°C’de çalkalama koşulları altında inkübe edilerek, optik yoğunluk (OD₆₀₀) yaklaşık 0.6’ya ulaşana kadar beklenmiştir. Bu aşamada, aktif olarak üreyen. bakteri kültürlerinden total RNA izolasyonu, High Pure RNA Isolation Kit (Promega) kullanılarak yapılmıştır. RNA izolasyon prosedürü şu şekilde uygulanmıştır:

- Kültürlerin 10 mL’lik kısımları, 1.5 mL’lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve 14.000 g hızında 2 dakika santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve bakteri peleti oda sıcaklığında kurutulmuştur.
- Kurutulan pelet üzerine 3 µL lizozim eklenerek, 5 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Lizozim işleminden sonra, tüplere sırasıyla 75 µL SV RNA Lizis Tamponu (Promega) ve 350 µL RNA Seyreltme Tamponu (Promega) eklenmiş, tüpler ters çevrilerek karıştırılmıştır.
- 200 µL %95 etanol eklenmiş ve çözelti, 3-4 kez pipetlenerek karıştırılmıştır.
- Elde edilen karışım, spin kolon içeren toplama tüplerine aktarılmış ve 14.000 g hızında santrifüjlenmiştir.
- Toplama tüplerinden sıvı alındıktan sonra, spin kolon filtrelerine 50 µL DNaz eklenmiş ve 25 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Kolona 200 µL SV DNase Stop Solüsyonu eklenmiş ve örnekler 4°C’de 1 dakika süreyle 12.000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- Ardından, toplama tüpleri boşaltılarak kolonlara 250 µL yıkama tamponu eklenmiş ve 12.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Son adımda, 30 µL RNaz içermeyen su (Promega) kolonlara eklenmiş ve 4°C’de 1 dakika süreyle 12.000 rpm’de santrifüj edilmeden önce, kolonlar oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.

Elde edilen RNA’nın saflığı ve konsantrasyonu, ND-1000 spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) ile değerlendirilmiş ve örnekler, %2 agaroz jel üzerinde 100 V’da 1 saat süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. RNA jelleri, 0.2 µg/mL EtBr içeren UV ışığı altında görselleştirilmiştir. Moleküler boyut belirlemesi, GeneRuler 1 kb DNA (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.2 Agaroz jel elektroforezi

Elde edilen RNA ürünlerinin moleküler büyüklüklerini belirlemek için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. Bu işlem için, %1 agaroz içeren 100 mL’lik 1X Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu hazırlanmış ve çözünmesi için mikrodalga fırında 2 dakika ısıtılmıştır. Agaroz çözüldükten sonra, yaklaşık 45°C’ye kadar soğutulmuş ve agaroz, jel

plakasına eşit şekilde dökülüp uygun bir tarak yerleştirilmiştir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, tarak çıkarılmış ve elektroforez tankına TAE tamponu eklenerek yüzeyi kaplanmıştır.

Elektroforez için PCR örneklerine yükleme boyası (Fermentas, R0611, USA) eklenmiş ve agaroz jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Markör olarak GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, SM0311, USA) kullanılmıştır. Elektroforez işlemi 100 V'da 50 dakika süreyle gerçekleştirilmiş, ardından jel, bantların daha net görünmesi için 30 dakika boyunca Etidyum Bromür (EtBr) çözeltisinde bekletilmiş, sonrasında 15 dakika boyunca distile su ile yıkanmıştır. Jel, UV ışık altında görüntülenmiş ve fotoğraflar kaydedilmiştir.

3.2.8.3 cDNA sentezi

S. Typhimurium'dan elde edilen RNA örneği ile cDNA sentezi cDNA Synthesis Kit (Roche, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımları ve uygulanan sıcaklık döngüsü, Çizelge 3.2, Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'te sunulmuştur. Elde edilen cDNA'lar, qRT-PCR denemelerine kadar -20°C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.2 Denatürasyon karışımı

İçerik	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Hacim (µL)
RNA	-	1000 ng /µL	-
Random hekzamer primer	600 pmol /µL	60 µM	2
Su (PCR grade)	-	-	Son hacim 13 µL 'ye tamamlanır

Son hacim su ile 13 µL'ye tamamlandıktan sonra, RNA denatürasyonunu sağlamak için tüpler 65 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. Bu süre bitiminde hemen buz üzerine alınarak Çizelge 3.5'de belirtilen miktarlarda ters transkripsiyon karışımı eklenmiştir.

Çizelge 3.3 Ters transkripsiyon karışımı

İçerik	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Hacim (µL)
Ters transkriptaz tamponu	5X	1X (8 mM MgCl ₂)	4
RNaz inhibitörü	40 U/µL	20 U	0,5
dNTP karışımı	Her nükleotid için 10 mM	Her nükleotid için 1 mM	2
Ters transkriptaz	20 U/mL	10 U	0,5
Son Hacim	-	-	20

Çizelge 3.3'te belirtilen içerikler tüpe aktarıldıktan sonra pipet yardımı ile karıştırılmış ve ardından Çizelge 3.4'de belirtilen ters transkripsiyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Son aşamada tüpler buz üzerine yerleştirilerek reaksiyon durdurulmuş ve örnekler qRT-PZR deneylerine kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.4 Ters transkripsiyon sıcaklık döngüsü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)	Döngü Sayısı
Uzama 1	25	10	1
Uzama 2	50	60	1
İnaktivasyon	85	5	1

3.2.8.4 Gen ifade düzeylerinin qRT-PZR ile belirlenmesi

Bu çalışmada gerçekleştirilen qRT-PCR denemelerinde, gen ekspresyonu seviyeleri araştırılan genler ve bu genlere özgü primer dizaynları Çizelge 3.5'te verilmiştir. qRT-PCR analizlerinde kullanılan tüm genler, ilgili primerlerle hedef alınarak ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür.

Tüm qRT-PCR denemeleri, LightCycler 480 (Roche, Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu cihaz, yüksek hassasiyetle gen ekspresyon analizlerini yapabilmek için ideal bir platformdur. Amplifikasyon reaksiyonları için 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix (Solis BioDyne, Estonya) kitinden faydalanılmıştır. Bu kit, yüksek özgüllük ve verimlilik sağlayan bir qPCR reaktifi olup, amplifikasyon verimliliğini optimize etmek için seçilmiştir.

Çizelge 3.6'da belirtilen amplifikasyon karışımı, tüm qRT-PCR deneylerinde kullanılan standart formülasyona sahiptir.

qRT-PCR amplifikasyonları, 96 kuyulu mikrotitre plakaları kullanılarak toplam 10 µL hacminde yapılmıştır. Bu hacim, her bir reaksiyon için ideal bir seviyede olup, gen ekspresyonu ölçümü için yeterli miktarda cDNA içermektedir. Her reaksiyonda, genetik materyali içeren cDNA kalıbı eklenmiştir. Bununla birlikte, negatif kontrol (NK) olarak, cDNA içermeyen ve yalnızca ddH₂O içeren reaksiyon karışımları kullanılmıştır. Bu kontrol, kontaminasyon veya yanlış amplifikasyon sonuçlarını ortadan kaldırmak için gereklidir.

LightCycler 480 cihazında gerçekleştirilen amplifikasyon için kullanılan döngü programı, Çizelge 3.7'de verilen protokole uygun olarak belirli sıcaklık ve sürelerde uygulanmıştır. Bu döngü programı, gen ekspresyonunun doğru ve verimli bir şekilde ölçülmesini sağlayacak şekilde optimize edilmiştir.

Bu qRT-PCR protokolü, Abd-alkader ve arkadaşları (2023) tarafından önerilen metodolojiye dayanarak, gen ekspresyon analizi için kullanılan standart bir yaklaşımı temsil etmektedir.

Çizelge 3.5 İfade düzeyleri araştırılan genler ve bu genlere özgü primerler

Hedef Gen ve Fonksiyonu	Primer
16S, Bakteriyel filogeniyi ve taksonomiye incelemek için	F: CCGTCAATTCTTTGAGTTT R: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
<i>adrA</i> , selülöz üretimi regülatörü	F: CGGCTATTCACTGTCGGAAT R: CTTACCCAGGCGAACAGAAG
<i>csgD</i> , kıvrımlı fimbriya sentezi regülatörü	F: GCGATGAGTGAGTAATGCGG R: GGCCTCAATATTAACGGCGTG
<i>sipC</i> , konak hücre işgali (efektör protein)	F: CTGTGGCTTTCAGTGGTCAG R: TGCTTGTCCGGTAGTATTTC
<i>hilA</i> , virülans regülatör gen	F: GCTGCACCAGGAAAGCATTA R: GCGAAGTCCGGGAATACATC
<i>invA</i> , konak hücre işgali	F: ATGATTAACGGCTAATTGGGTGA R: CGGAAAAGCGAAGAGTGAATTAC
<i>Rpos</i> , hücrelerin genel stres direncine yol açar	F:GTTGGACGCGACTCAGCTTT R:TTACCACCAGACGCAGGTTGAT
<i>fliF</i> , flagellar bazal gövdenin L, P ve M halkaları için ana proteinleri kodlar	F:GAAGCCATTCTGTGCGCCTAT R:TGTAGTGCTCTTTCCGTCTGC
<i>gyrA</i> , DNA giraz alt birimlerini kodlar	F:CCAATACGTTTCATGGCGTAAAG R:GATTATGCGATGTCGGTCATTGT

Çizelge 3.6 qRT-PZR için amplifikasyon karışımı

İçerik	Son Konsantrasyon	Hacim (µL)
EvaGreen qPCR supermix (5X)	1X	2
Forward primer	10 pmol / µL	0,5
Reverse primer	10 pmol / µL	0,5
cDNA (1:10 sulandırılmış)	10 ng /µL	1
ddH ₂ O	-	6
Toplam hacim	-	10

Çizelge 3.7 LightCycler 480 cihazında kullanılan qRT-PZR programı

Basamak	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Artış (°C / s)
İlk Denatürasyon	İlk Denatürasyon	95	15 dk	4.4
Amplifikasyon (40 Döngü)	Denatürasyon	95	15 sn	4.4
	Bağlanma	58*	20 sn	2.2
	Uzama	72	20 sn	4.4
Erime Eğrisi	Denatürasyon	95	30 sn	4.4
	Bağlanma	60	30 sn	2.2
	Uzama	99	30 sn	0,11
Soğuma	Soğuma	40	30 sn	2.2

*Primer bağlanma Sıcaklığı (T_m) tüm genler için 58 °C iken referans gen olan 16S için 55 °C olarak belirlenmiştir.

3.2.9 İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler, R istatistiksel programlama dili kullanılarak yapılmıştır ve özellikle lme4 paketinden faydalanılmıştır. Bu paket, lineer karma etkili modelleri oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Analizin başlıca amacı, farklı ölçüm grupları arasındaki merkezi yönelim (ortalama) farklarını belirlemek ve bu farkların anlamlılık düzeyini test etmektir. Bunun yanı sıra, zamanın bu gruplar üzerindeki etkisi de incelenmiştir.

Bu amaçla, hem sabit etkileri (örneğin, tedavi koşulları, zaman noktaları) hem de rastgele etkileri (örneğin, denekler arası varyasyon, tekrarlanan ölçümler) açıklayan lineer karma etkili modeller oluşturulmuştur. Bu modeller, zamanın ve gruplar arasındaki etkileşimlerin doğru bir şekilde analiz edilmesini sağlamaktadır.

İstatistiksel anlamlılık, uygun post-hoc testleri kullanarak ve p-değeri incelemesi ile belirlenmiştir. $p < 0.05$ eşiği, istatistiksel anlamlılık için kabul edilen sınır değeri olarak kullanılmıştır. Anlamlılık testleri, farklı gruplar arasındaki karşılaştırmaları yapmak ve zamanın etkilerini doğru bir şekilde değerlendirmek için uygulanmıştır.

Tüm analizler, deneysel tasarım dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu tasarım, farklı değişkenler ve zaman faktörleri arasındaki etkileşimleri doğru bir şekilde yansıtmaya yönelik olarak optimize edilmiştir. Bu sayede, deneysel verilerin doğru bir şekilde modellenmesi ve yorumlanması sağlanmıştır.

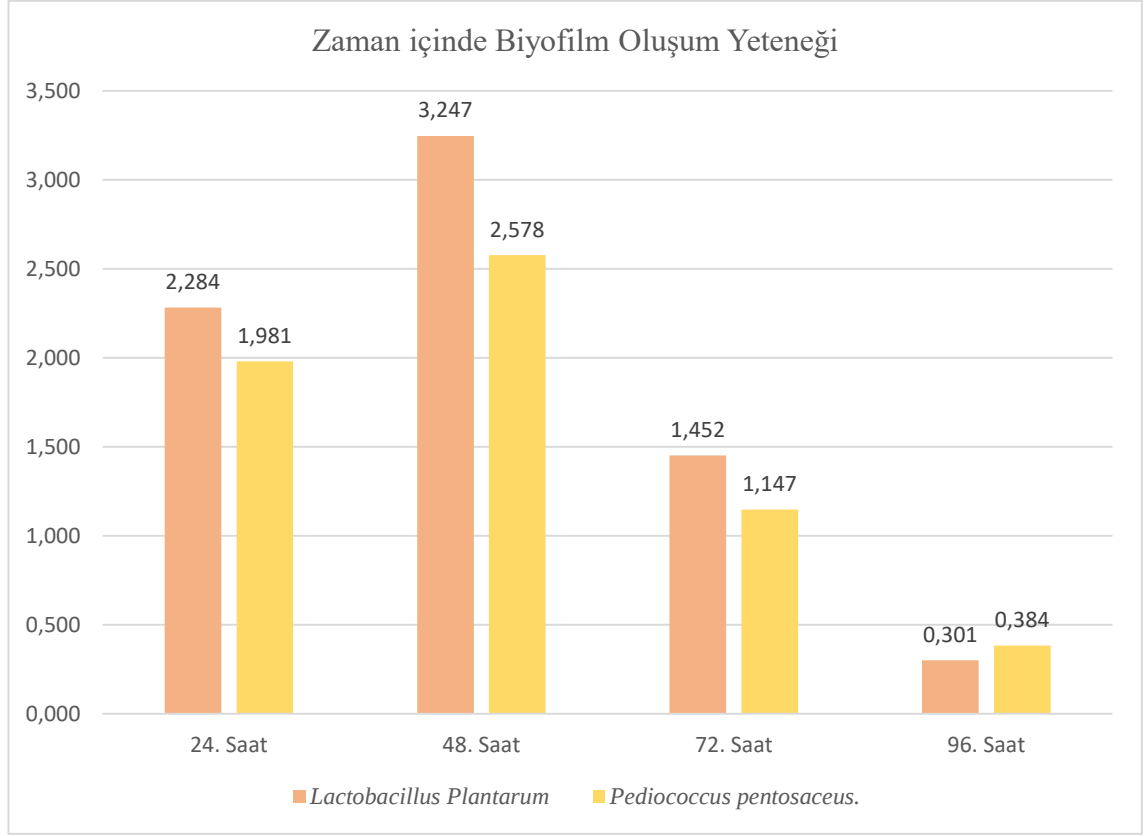
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 LAB Suşlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneği

Bu deneyde, MRS ortamında iki laktik asit bakterisi (LAB) olan *Lb. plantarum* ve *P. pentosaceus*'un biyofilm oluşumu incelenmiştir. OD (optik yoğunluk) ölçümleri, biyofilm üretiminin suşa bağlı farklılıklar gösterdiğine işaret etmiştir. Elde edilen sonuçlar, inkübasyon süresinin biyofilm oluşumunu önemli ölçüde etkilediğini ve zaman içinde farklı biyofilm gelişim modellerinin gözlemlendiğini ortaya koymuştur.

Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, biyofilm oluşumu, inkübasyon süresiyle paralel olarak artmış ve 48 saat sonunda zirveye ulaşmıştır. Bu noktadan sonra biyofilm yoğunluğunda bir azalma gözlemlenmiş ve 72 saat sonunda biyofilm oluşum oranlarında belirgin bir düşüş kaydedilmiştir. Özellikle, *Lb. plantarum*, inkübasyon süresi boyunca *P. pentosaceus*'tan sürekli olarak daha yüksek biyofilm oluşum oranları sergilemiştir.

Biyofilm OD değerlerini analiz etmek için yapılan tekrarlanan ölçümler ANOVA'sı, bakteri türleri ve inkübasyon süresi faktörlerinin dikkate alındığı bir istatistiksel inceleme ile yapılmıştır. Bu analiz, iki suş arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu ve bunun farklı biyofilm oluşturma modellerini işaret ettiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, türler ve zaman arasındaki etkileşimin anlamlı olması, biyofilm oluşumunun sadece bakteri türüne bağlı olmadığını, aynı zamanda inkübasyon süresinden de etkilendiğini göstermektedir.



Şekil 4.1 LAB'nin zamana bağlı biyofilm oluşturma özellikleri

4.2 Otoagregasyon Aktivitesi

Bu deneyde, iki laktik asit bakterisi (LAB) suşunun otoagregasyon kapasitesi değerlendirilmiştir. Şekil 4-2'de gösterildiği gibi, bu bakterilerde otoagregasyon oranları %3.0 ile %38 arasında değişmiştir. En yüksek otoagregasyon oranı, 37°C'de 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda kaydedilmiştir. 2, 4, 6, 10 ve 24 saatlik inkübasyon aralıklarında yapılan ölçümler sonucu, bu zaman içinde kademeli bir artış gözlemlenmiştir. Bu oranlar, OD₆₀₀ absorbans ölçümleri ile hesaplanmıştır.

Otoagregasyon verilerinin istatistiksel analizi, eşleştirilmiş örneklerde t-testi kullanılarak yapılmıştır. Yapılan analiz, farklı zaman noktalarındaki ölçümlerin ortalamalarını karşılaştırarak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir. Hesaplanan p-değeri 0,028 olup, bu değer $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinin altında olduğu için sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu doğrulanmıştır.



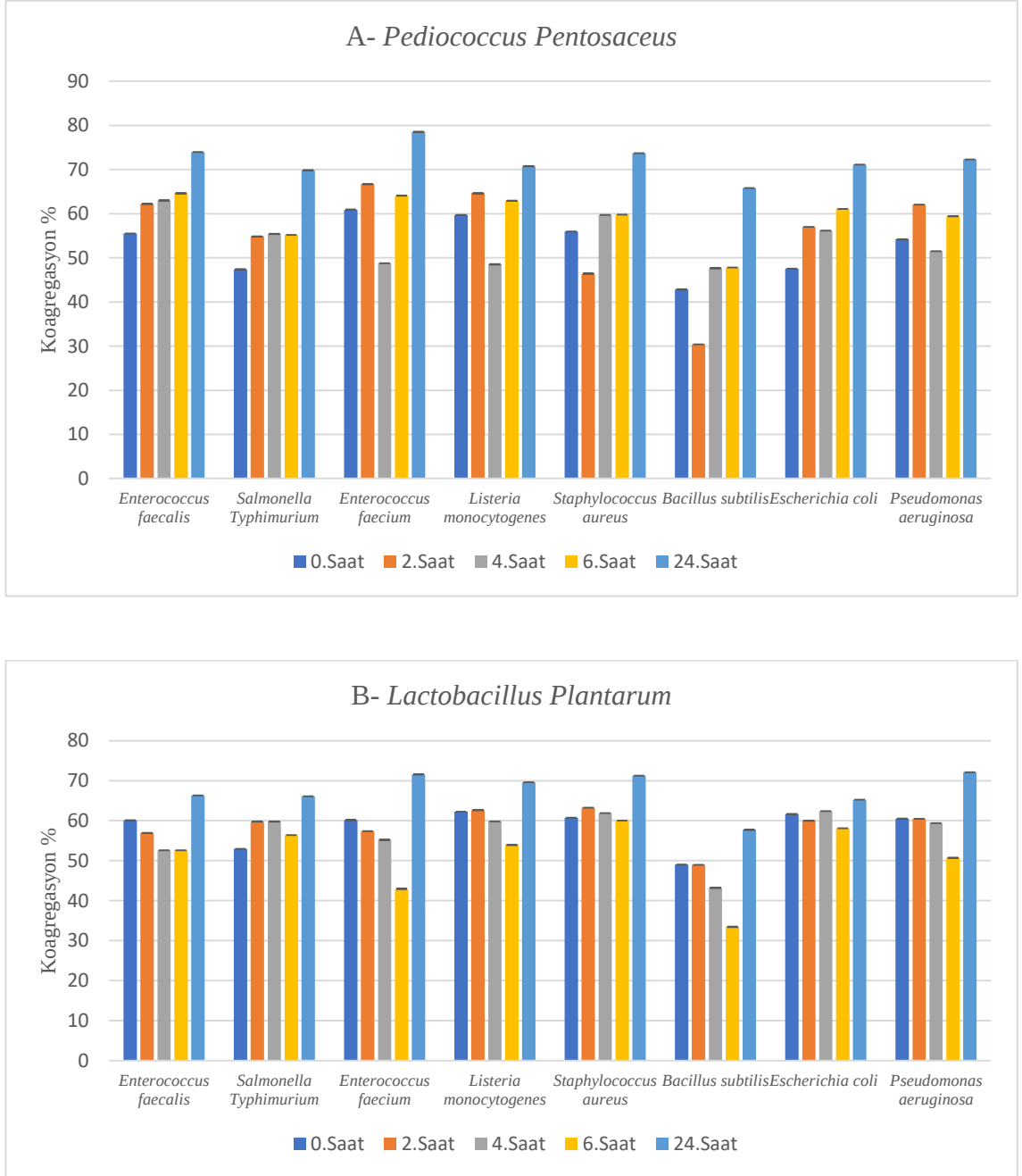
Şekil 4.2 *Lb. plantarum* ve *P. pentosaceus*'un otoagregasyon yetenekleri

4.3 Koagregasyon Aktivitesi

Bu denemede elde edilen sonuçlar, bu probiyotik suşların, farklı patojenik bakterilerle değişen koagregasyon yetenekleri sergilediğini göstermektedir. Koagregasyon derecesi, suşlara özgü ve zamana bağlı olarak değişmekte olup, inkübasyon koşullarından da etkilenmektedir.

Özellikle, *P. pentosaceus*, *Lb. plantarum*'a kıyasla patojenik suşlar üzerinde daha önemli etkiler göstermiştir. Şekil 4.3 A ve B'de gösterildiği gibi, *P. pentosaceus* için en yüksek koagregasyon yüzdeleri, *E. faecium* (%78,53), *E. faecalis* (%73,97), *S. aureus* (%73,69), *P. aeruginosa* (%72,27) ve *E. coli* (%71,11) ile gözlenmiştir. *P. pentosaceus* ile en az koagregasyon gösteren suşlar ise *L. monocytogenes* (%70,76), *S. Typhimurium* (%69,84) ve *B. subtilis* (%65,82) olmuştur.

Diğer taraftan, *Lb. plantarum*, *P. aeruginosa* (%72,13), *E. faecium* (%71,57), *S. aureus* (%71,25), *L. monocytogenes* (%69,59), *E. faecalis* (%66,31) ve *S. Typhimurium* (%66,13) ile en yüksek koagregasyonu göstermiştir. *Lb. plantarum* ile koagregasyon kapasitesi daha düşük olan suşlar arasında ise *E. coli* (%65,23) ve *B. subtilis* (%57,72) yer almıştır.



Şekil 4.3 (A,B) *Lb. plantarum* ve gıda kaynaklı patojenlerin koagregasyon oranları

4.4 LAB Suşlarının Planktonik ve Biyofilm Formlarının Patojenlere Karşı Antagonistik Aktivitesi

Bu çalışmada, LAB suşlarının (*L. plantarum* ve *P. pentosaceus*) planktonik ve biyofilm formlarının çeşitli patojenler üzerindeki antagonistik etkileri detaylı bir şekilde incelenmiştir. Elde edilen bulgular, her iki probiyotik suşun hem planktonik hem de

biyofilm formlarının, farklı patojenlerin üremesini etkili bir şekilde inhibe ettiğini ortaya koymuştur.

Planktonik Formların Etkileri: *L. plantarum*'un planktonik formu, patojenlerin üremesini 0,25 ila 1,17 log CFU/mL arasında değişen oranlarda azaltmıştır. En büyük inhibitör etki, *E. coli* ve *P. aeruginosa* üzerinde gözlemlenmiş ve sırasıyla 1,17 log CFU/mL ve 1,10 log CFU/mL'lik bir azalma meydana gelmiştir. Bu sonuç, *L. plantarum*'un bu patojenler üzerinde çok güçlü bir antagonistik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. *S. Typhimurium* ve *E. faecalis* de *L. plantarum*'un etkili olduğu patojenler arasında yer almış, ancak inhibisyon seviyeleri, diğer patojenlere nazaran daha düşük kalmıştır.

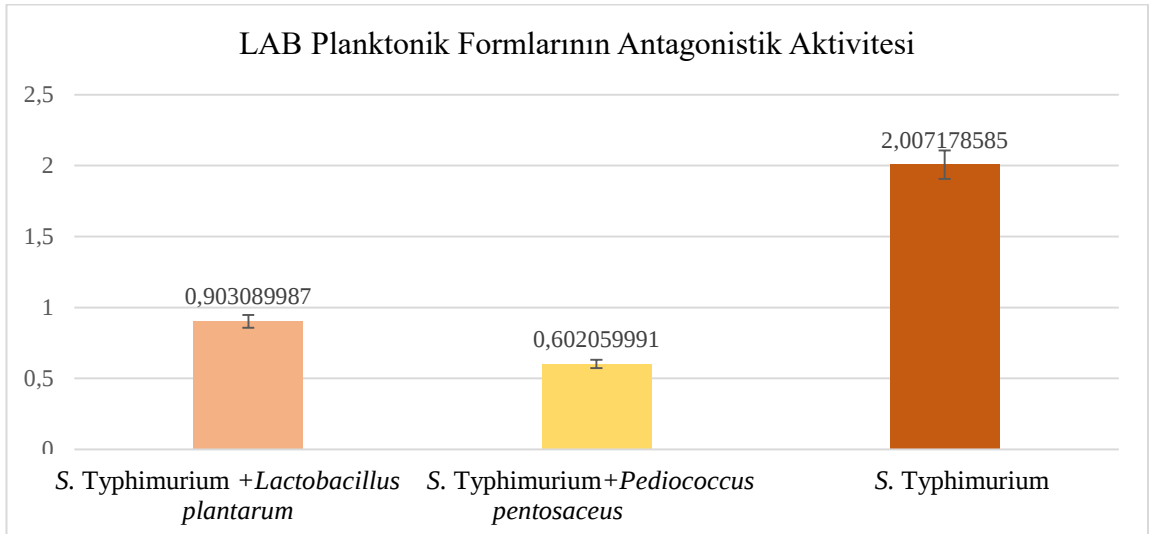
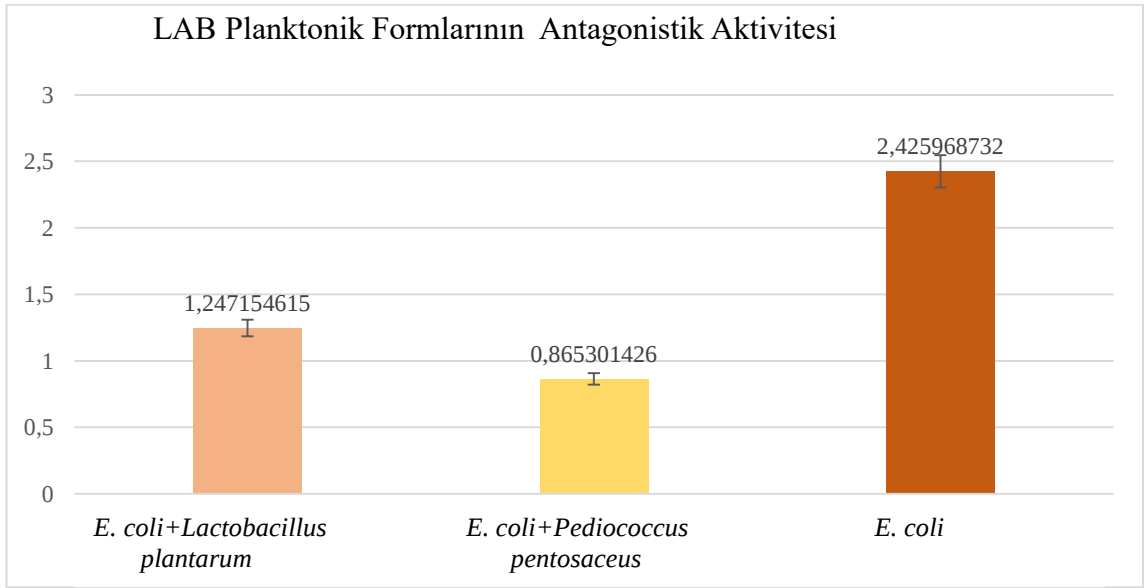
P. pentosaceus'un planktonik formu da benzer şekilde etkili olmuştur, ancak özellikle *E. coli* ve *S. Typhimurium* üzerinde daha büyük inhibisyonu oranları gözlemlenmiştir (sırasıyla 1,56 log CFU/mL ve 1,40 log CFU/mL). Bu, *P. pentosaceus*'un özellikle bu patojenler üzerinde daha güçlü bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *E. faecium* gibi diğer patojenler üzerinde de inhibisyon gözlemlenmiş, ancak bu etki *L. plantarum*'a kıyasla genellikle daha düşük seviyelerde kalmıştır (Şekil 4.4 A).

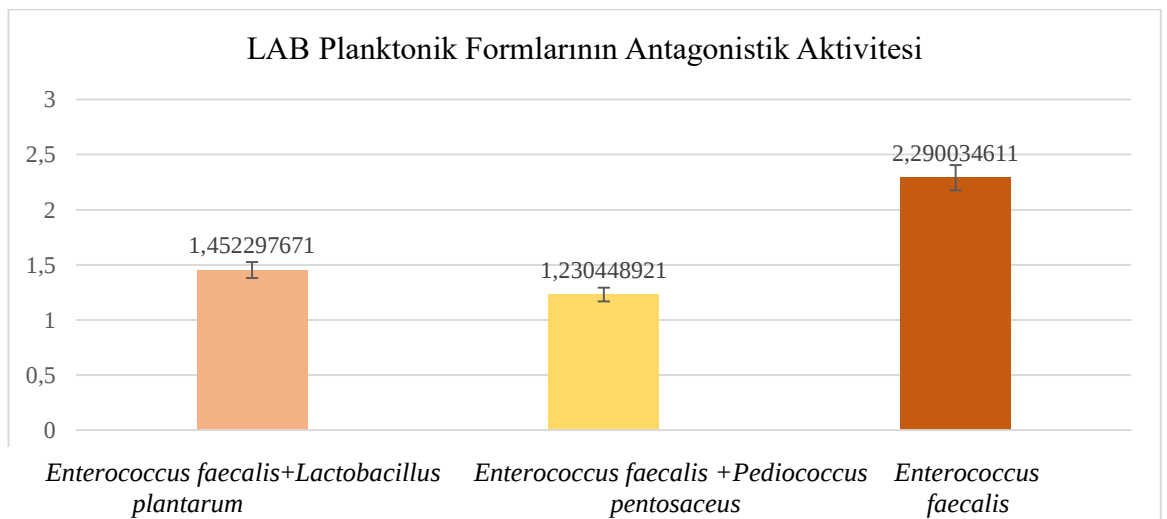
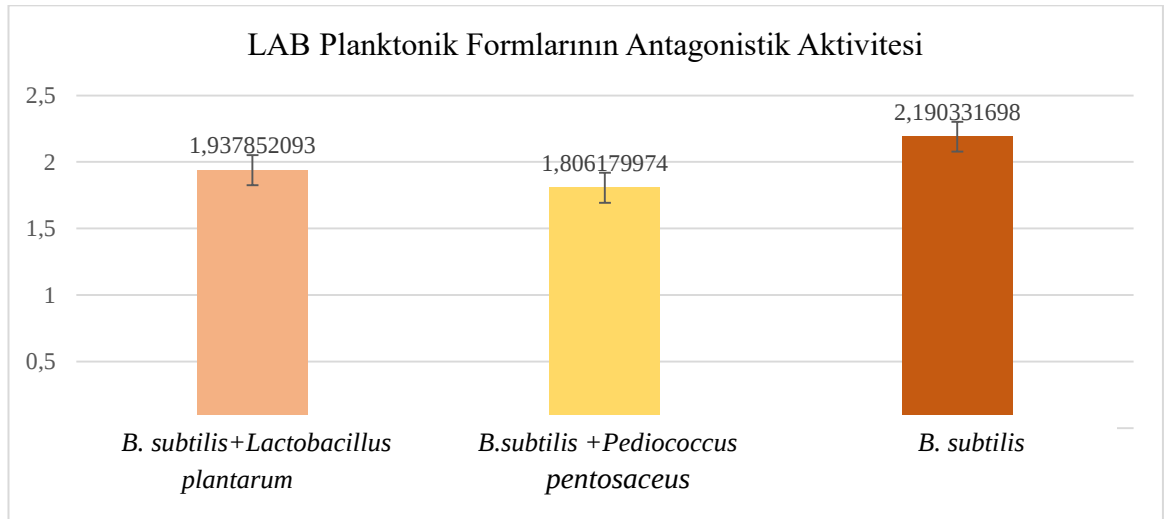
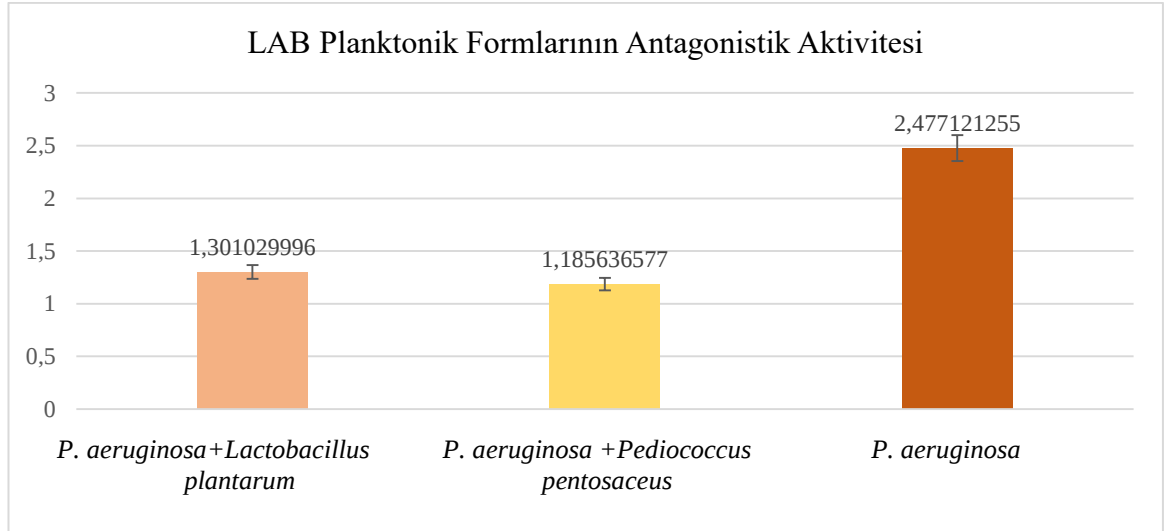
Biyofilm Formlarının Etkileri: Biyofilm formunda ise *L. plantarum*'un antagonistik etkisi daha sınırlı kalmıştır. En yüksek inhibitör etkiler, *S. aureus*, *B. subtilis* ve *L. monocytogenes* üzerinde gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, *E. faecalis*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* gibi patojenler üzerindeki etki, planktonik formdaki etkilere kıyasla daha zayıf kalmıştır. Bu bulgu, biyofilm formunun bazı patojenler üzerinde daha sınırlı bir etki gösterdiğini, ancak özellikle bazı Gram-pozitif patojenlere karşı daha etkili olduğuna işaret etmektedir.

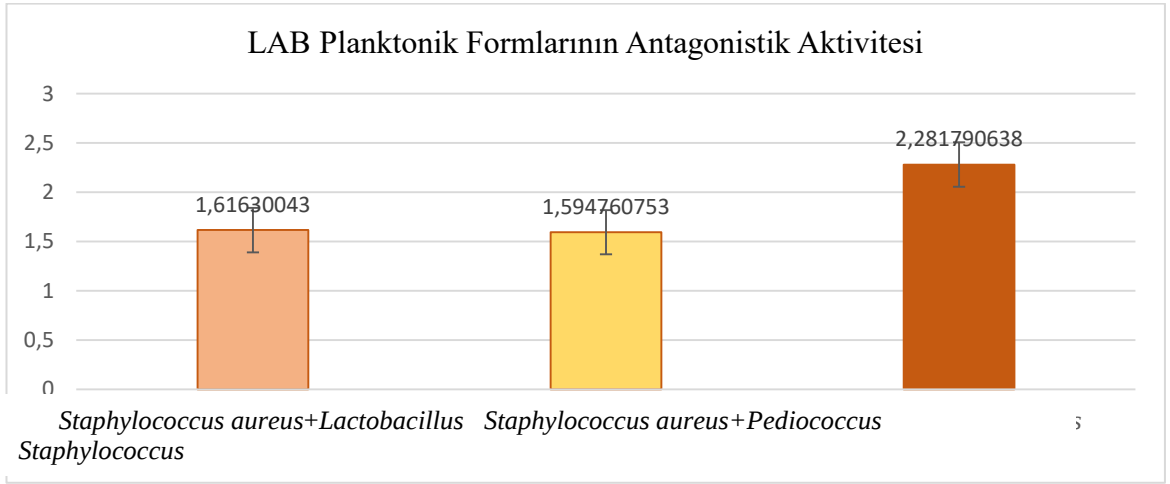
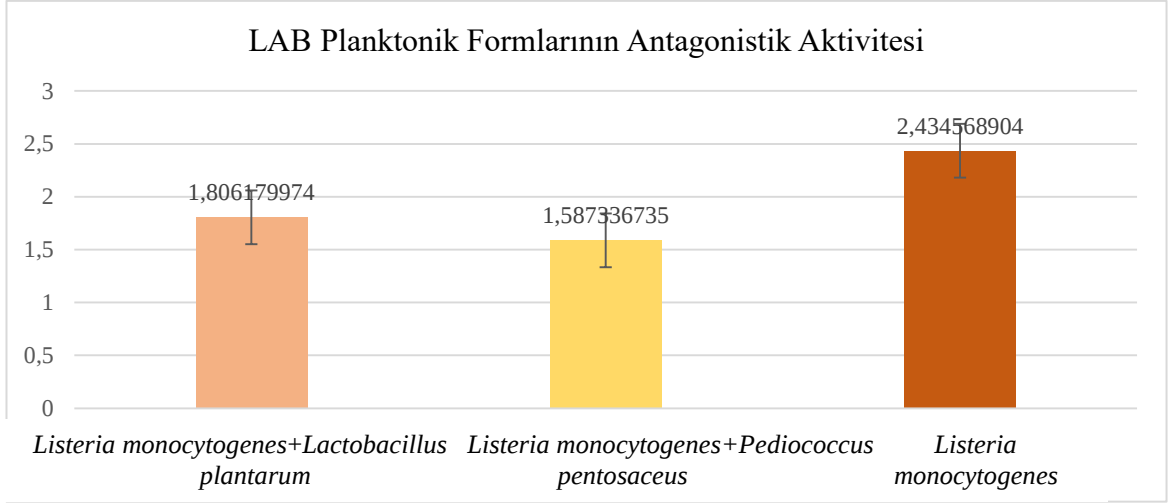
P. pentosaceus'un biyofilm formu ise genel olarak daha güçlü bir inhibisyon etkisi göstermiştir. Özellikle *B. subtilis*, *S. Typhimurium*, *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde belirgin inhibisyonu oranları gözlemlenmiştir. Bu suşun biyofilm formu, planktonik forma kıyasla daha geniş bir patojen yelpazesinde etkili olmuştur. *P. aeruginosa*, *E. faecium*, *E. faecalis*

ve *L. monocytogenes* gibi diğer patojenler üzerindeki inhibisyon da anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

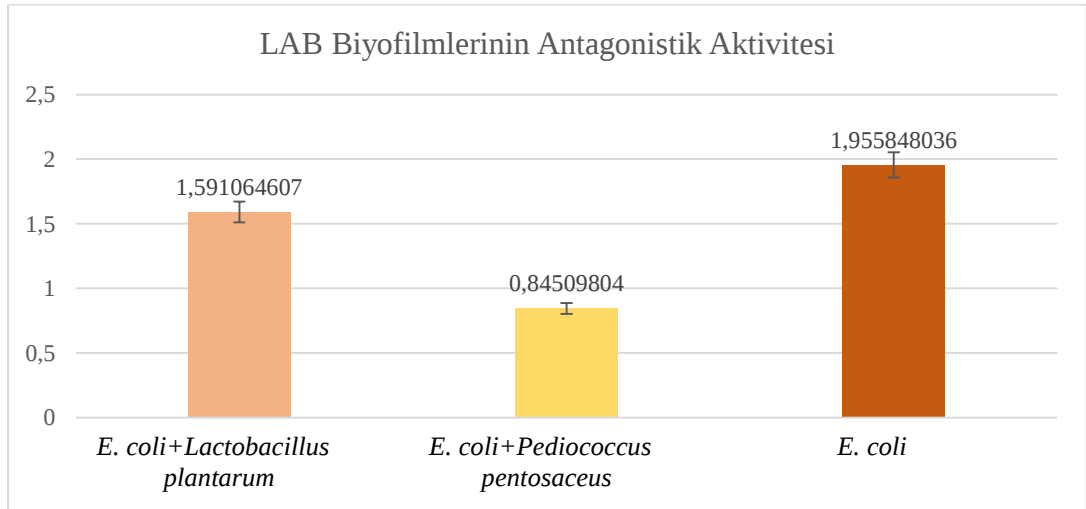
Poisson regresyon analizi, her iki probiyotik suşun patojen inhibisyonundaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ($p < 0,001$) doğrulamıştır. Bu bulgu, planktonik ve biyofilm formlarının her iki suş için patojen inhibisyonunda belirgin farklılıklar oluşturduğuna ve bu farklılıkların tesadüfi olmadığına işaret etmektedir (Şekil 4.4 B).

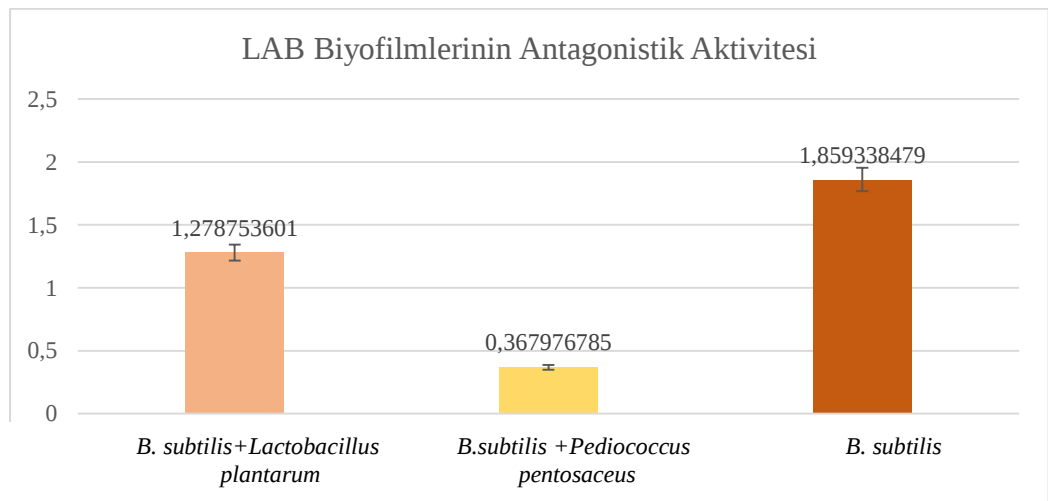
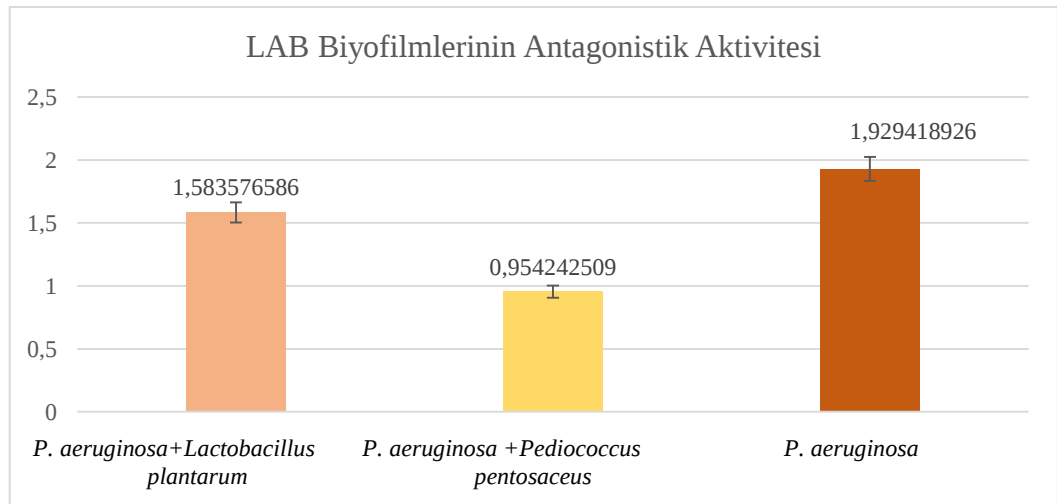
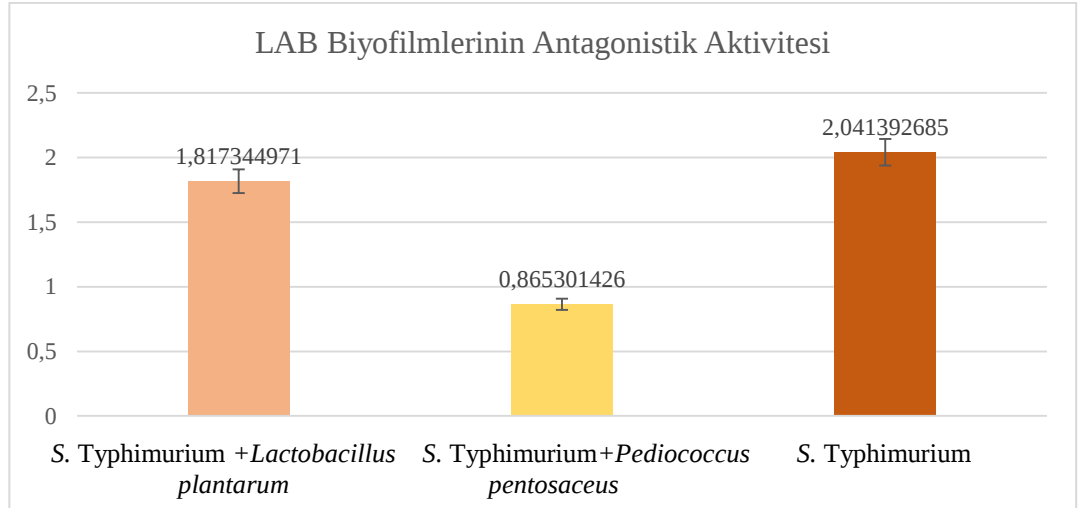


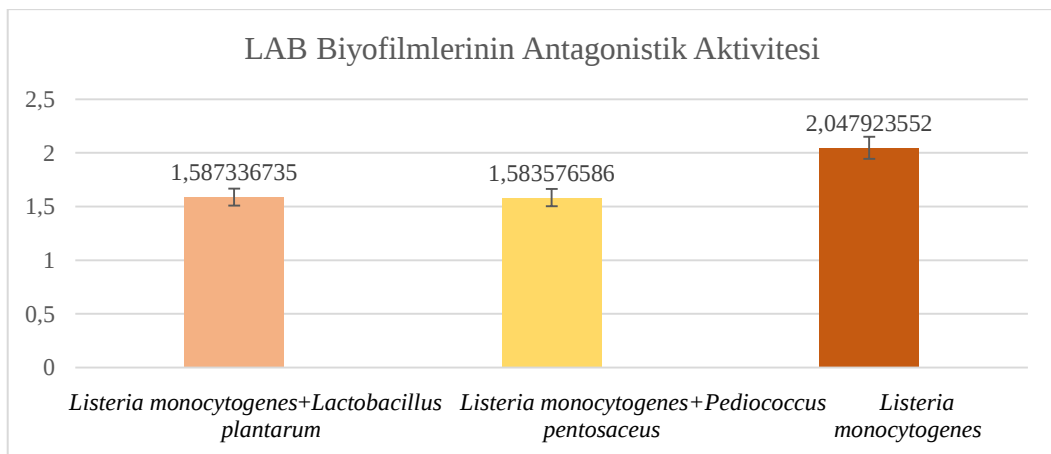
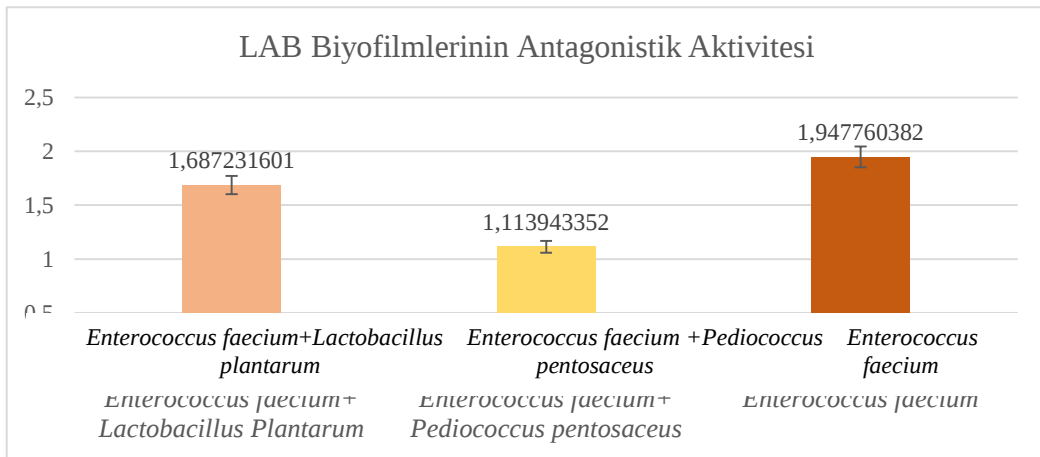
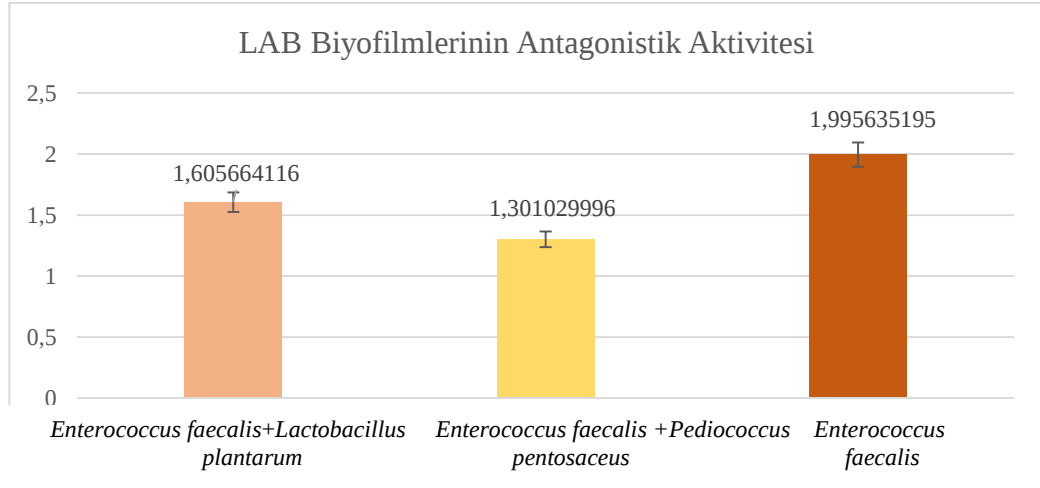


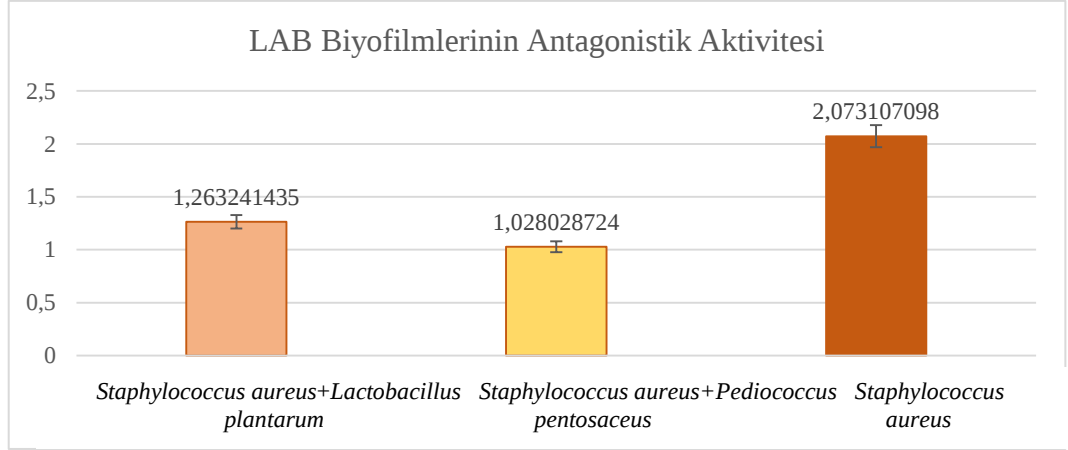


Şekil 4.4 (A) LAB suşlarının planktonik formlarının patojenik bakterilere karşı gösterdiği antagonistik aktivite









Şekil 4.4 (B) LAB suşlarının biyofilm formlarının patojenik bakterilere karşı gösterdiği antagonistik aktivite

4.5 *Lb. plantarum* ve *P. pentosaceus* Kültür Süpernatantlarının Antibakteriyel Aktivitesi

Lb. plantarum'un 24 ve 48 saatlik kültürlerinden elde edilen hücreden arı süpernatantlarının (CFS) antibakteriyel aktivitesinin çeşitli gıda patojenlerine karşı incelenmesi, önemli bulgular ortaya koymuştur. CFS, pozitif kontrol olarak kullanılan Nisin ve negatif kontrol olan MRS broth ile karşılaştırıldığında, Tablo 1'de detaylı bir şekilde sunulduğu üzere, hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakteriler üzerinde belirgin antibakteriyel etkilere sahip olmuştur. Özellikle, 48 saatlik kültürlerden elde edilen süpernatantlarda, 24 saatlik kültürlerle kıyasla daha güçlü bir antibakteriyel etki tespit edilmiştir. Bu farkın, bakteriyel üreme, metabolik aktiviteler ve antibakteriyel bileşiklerin üretim sürelerine bağlı olarak gelişen biyokimyasal farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Lb. plantarum, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde broth kültürlerinde önemli ölçüde patojen inhibisyonuna yol açarak, antibakteriyel etkinliğini net bir şekilde ortaya koymuştur. Özellikle *E. coli* için 24 ve 48 saatlik kültürlerden elde edilen inhibisyon zonları sırasıyla 12 mm ve 18 mm olarak kaydedilmiştir. Diğer taraftan, *E. faecalis* ve *B. subtilis* için inhibisyon zonları her iki zaman diliminde de 13 mm ile sabit kalmıştır. Bununla birlikte, *E. faecium* ve *S. aureus* gibi patojenler için inhibisyon zonları sırasıyla 13 mm ve 15 mm olarak ölçülmüştür. Ayrıca, *P. aeruginosa*'nın inhibisyon zonları 13

mm ile 14 mm arasında değişmiş, *L. monocytogenes* ve *S. Typhimurium* için inhibisyon zonları sırasıyla 12 mm ve 15 mm, 14 mm ve 15 mm olarak kaydedilmiştir.

Diğer yandan *P. pentosaceus*'un, özellikle 48 saatlik kültürlerinden hazırlanan CFS'ler, *S. Typhimurium* hariç diğer tüm patojenlere karşı daha yüksek inhibisyonu etkisi göstermiştir. 24 saatlik kültürlerden hazırlanan CFS'ler de, aynı suşun 48 saatlik CFS'lerine oranla daha düşük inhibisyonu aktivitesi içermekle birlikte, genelde *Lb. plantarum* 'un aynı saat diliminde hazırlanan CFS'lerine karşı kıyaslandığında, daha etkn bulunmuştur (izelge 4.1, izelge 4.2 ve şekil 4.5).

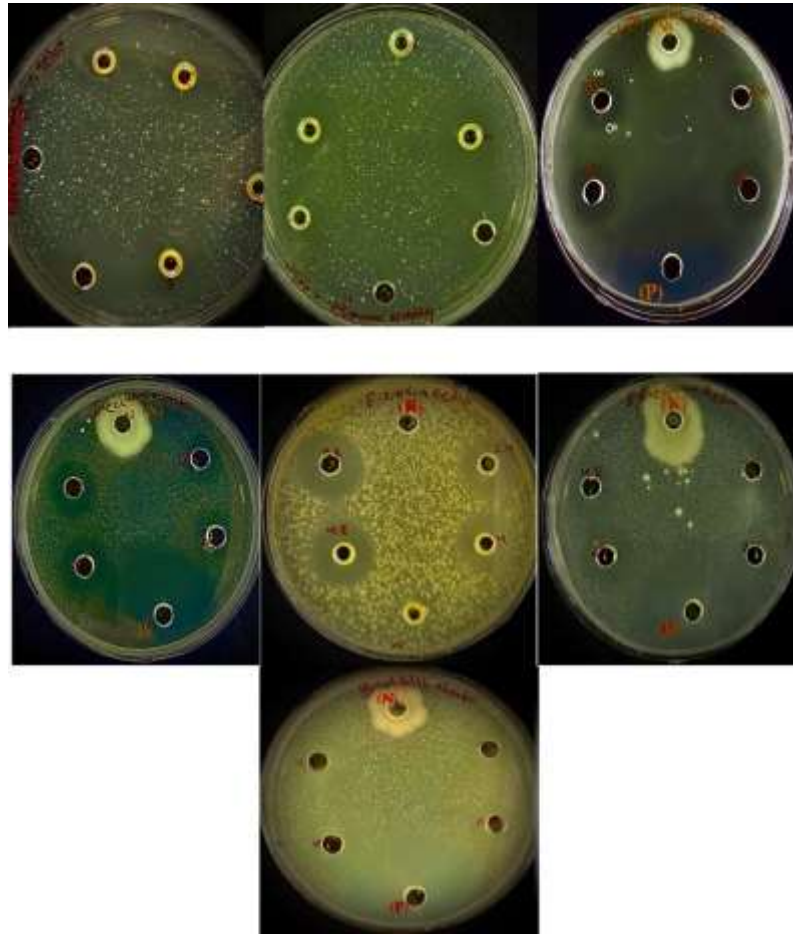
Bu bulgular, LAB kültür süpernatantlarının geniş bir patojen yelpazesi üzerinde antibakteriyel aktivite gösterdiğini ve özellikle 48 saatlik kültürlerin, daha yüksek inhibisyon aktiviteleri sağladığını ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, bu antibakteriyel etkinin mekanizması, antibakteriyel bileşiklerin türü ve konsantrasyonu, kültür süresi ve ortam koşullarına bağlı olarak değişebilir. Dolayısıyla, daha ileri araştırmalar, bu etkiyi daha ayrıntılı şekilde açıklayarak, laktik asit bakterilerinin gıda patojenlerine karşı potansiyel kullanım alanlarını genişletebilir.

izelge 4.1 Hcrenden ari *Lb. plantarum* kltr filtratlarının patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi

Laktik Asit Bakterileri	Antimikrobiyal Aktivite Zonu apları (mm)		
	Patojen	24 Saat	48 Saat
<i>Lb. plantarum</i>	<i>E. coli</i>	13	17
<i>Lb. plantarum</i>	<i>E. faecalis</i>	13	13
<i>Lb. plantarum</i>	<i>E. faecium</i>	13	15
<i>Lb. plantarum</i>	<i>S. aureus</i>	13	15
<i>Lb. plantarum</i>	<i>P. aeruginosa</i>	13	14
<i>Lb. plantarum</i>	<i>B. subtilis</i>	13	13
<i>Lb. plantarum</i>	<i>L. monocytogenes</i>	12	15
<i>Lb. plantarum</i>	<i>S. Typhimurium</i>	14	15

Çizelge 4.2 Hücreden ari *P. pentosaceus* kültür filtratlarının patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitesi

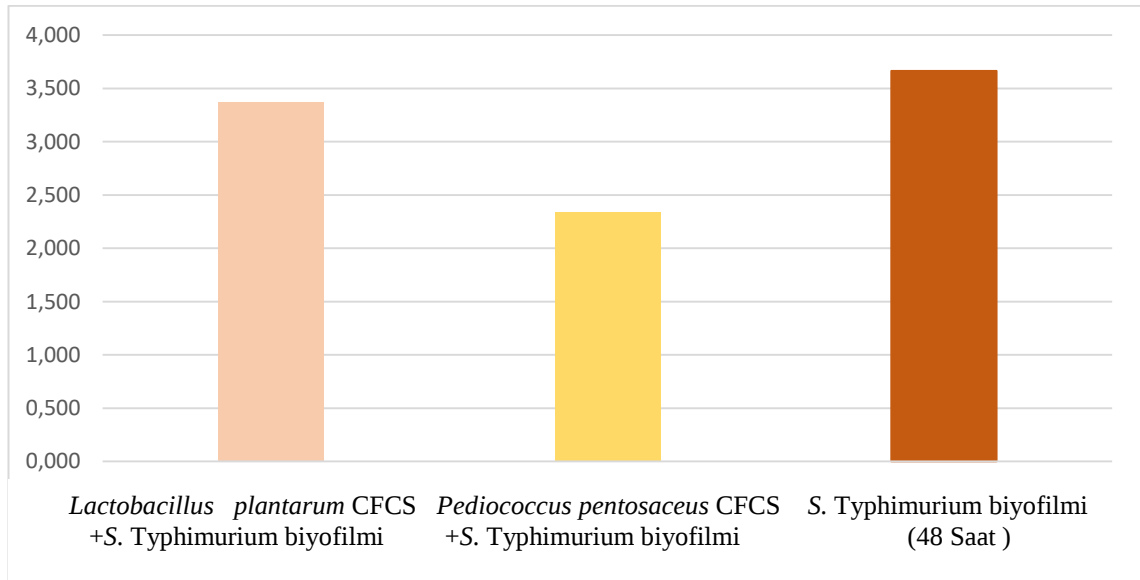
Laktik Asit Bakterileri	Antimikrobiyal Aktivite Zonu Çapları (mm)		
	Patojen	24 Saat	48 Saat
<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. coli</i>	12	18
<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. faecalis</i>	13	15
<i>P. pentosaceus</i>	<i>E. faecium</i>	21	22
<i>P. pentosaceus</i>	<i>S. aureus</i>	13	17
<i>P. pentosaceus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	15	20
<i>P. pentosaceus</i>	<i>B. subtilis</i>	16	19
<i>P. pentosaceus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	13	16
<i>P. pentosaceus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	14	14



Şekil 4.5 Gıda patojenlerine karşı LAB süpernatantlarının inhibisyon zonları

4.6 LAB CFCS'lerinin S. Typhimurium Biyofilminin Oluşumunu Engelleme Kapasitesi

Bu çalışmada, S. Typhimurium'da biyofilm oluşumu üzerine iki LAB suşundan elde edilen CFCS'lerin etkinliğinin vitro olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.6). Elde edilen sonuçlar, *P. pentosaceus*'un S. Typhimurium'da biyofilm oluşumunu % 39,42 oranında inhibe ettiğini, buna karşın *Lb. plantarum*'un biyofilm oluşumunu % 8,15 oranında engellediğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, her iki LAB suşunun da S. Typhimurium'un biyofilm oluşumunu kısmi olarak engelleyebildiğini, ancak etkilerinin farklılık gösterdiğine işaret etmektedir.



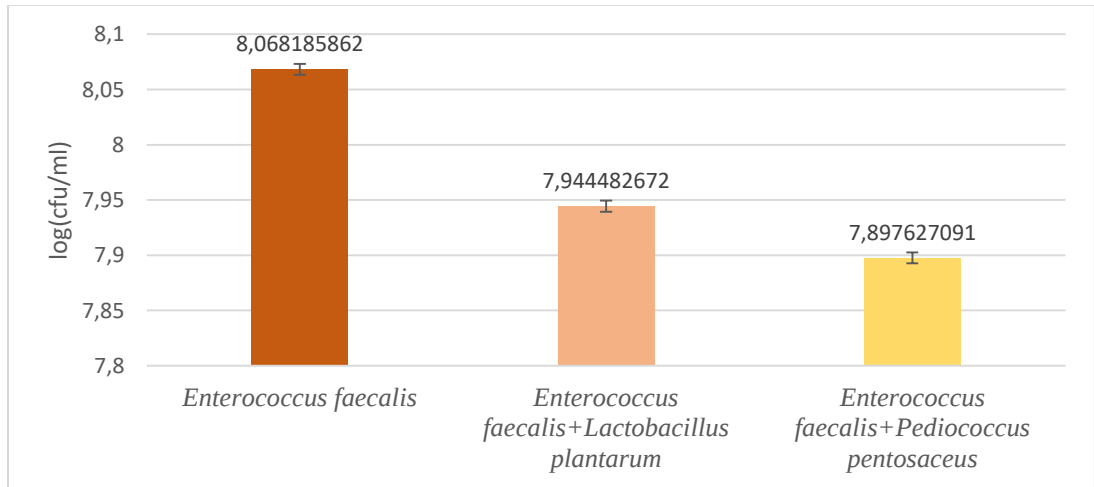
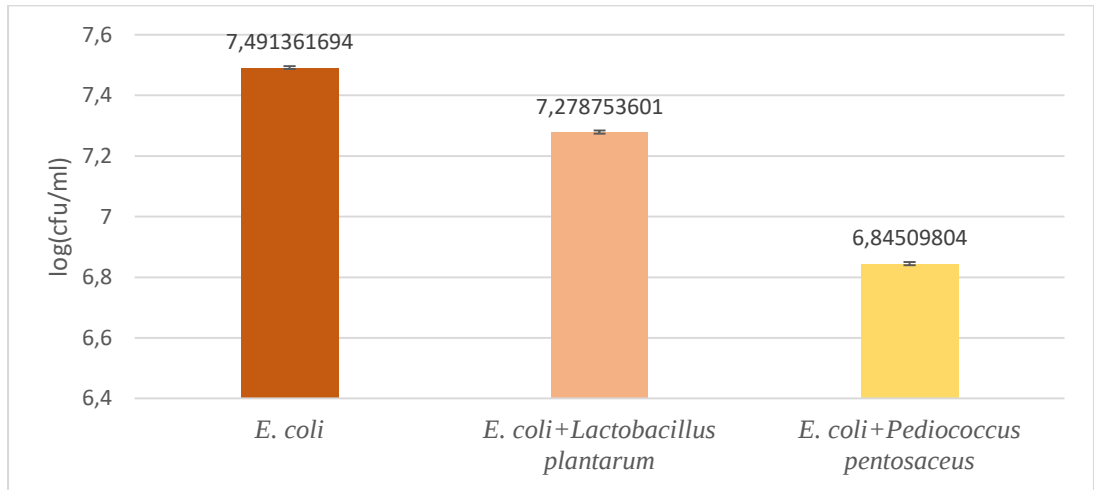
Şekil 4.6 LAB süpernatantlarının S. Typhimurium biyofilmine karşı antimikrobiyal aktivitesi

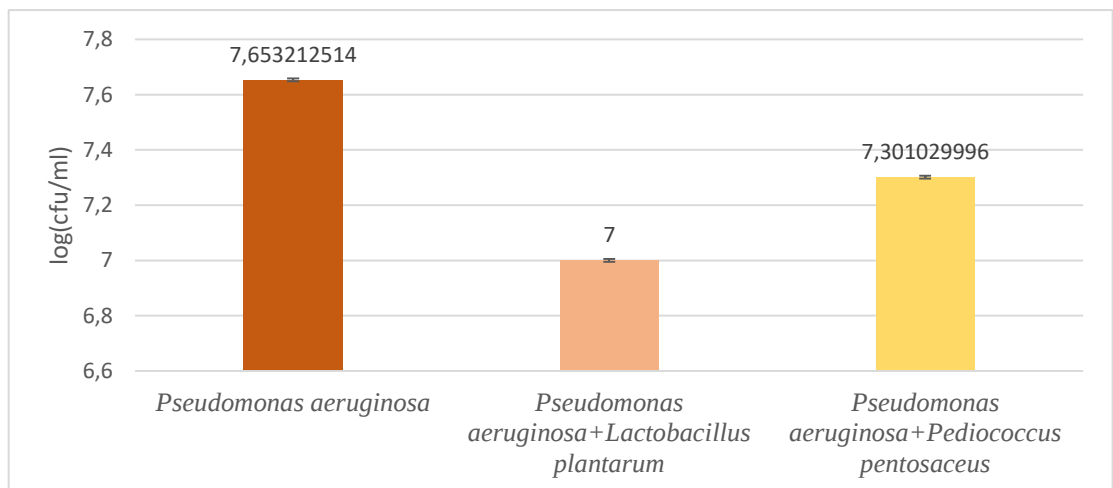
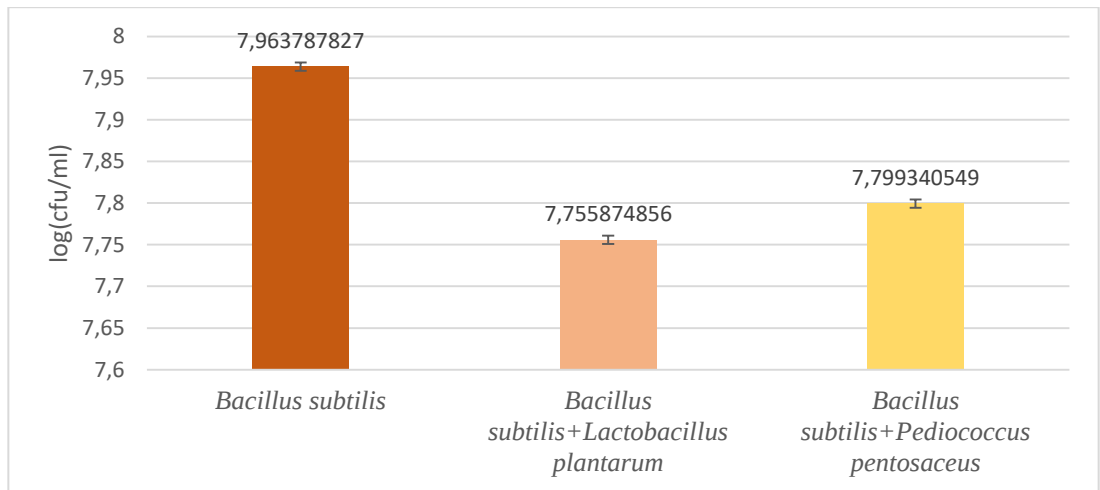
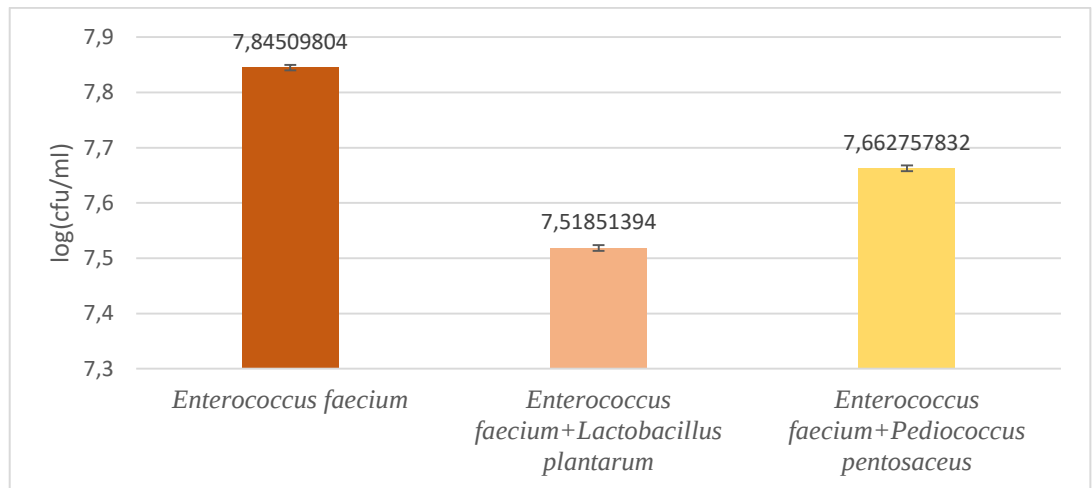
4.7 LAB Suşlarının, Patojenik Bakterilerin Caco-2 Hücrelerine Tutunmasını Engelleme Kapasitesi

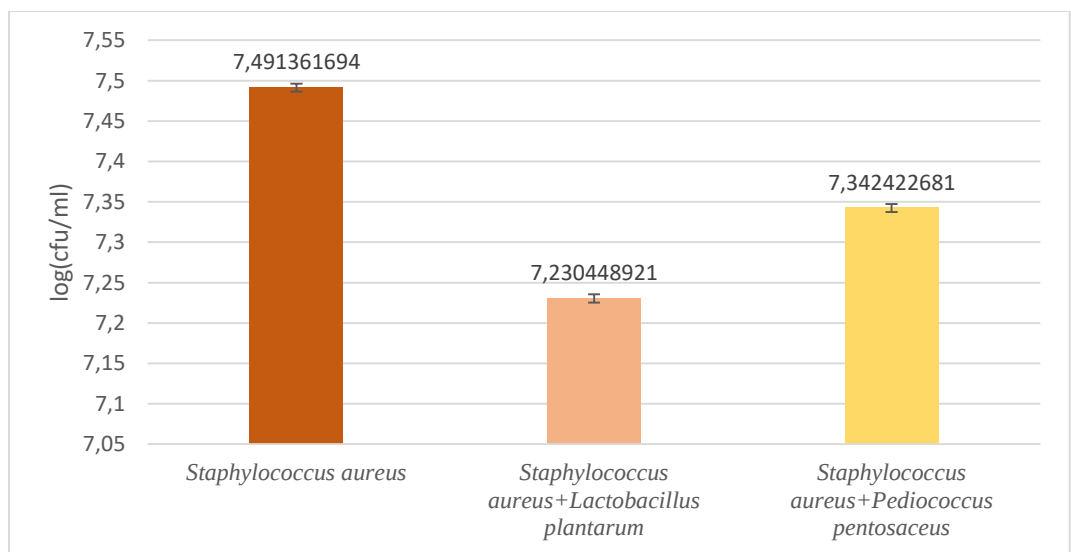
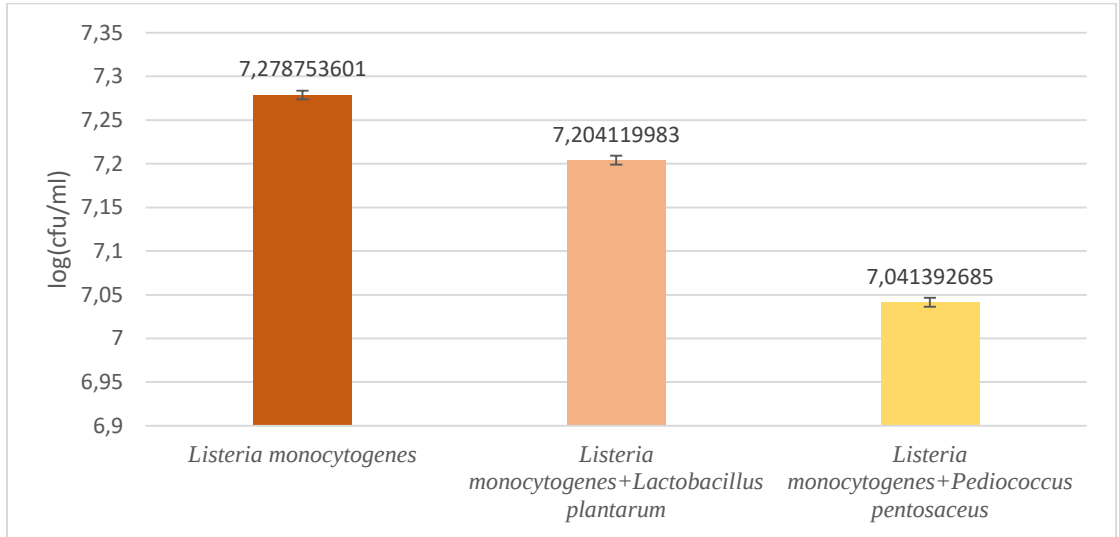
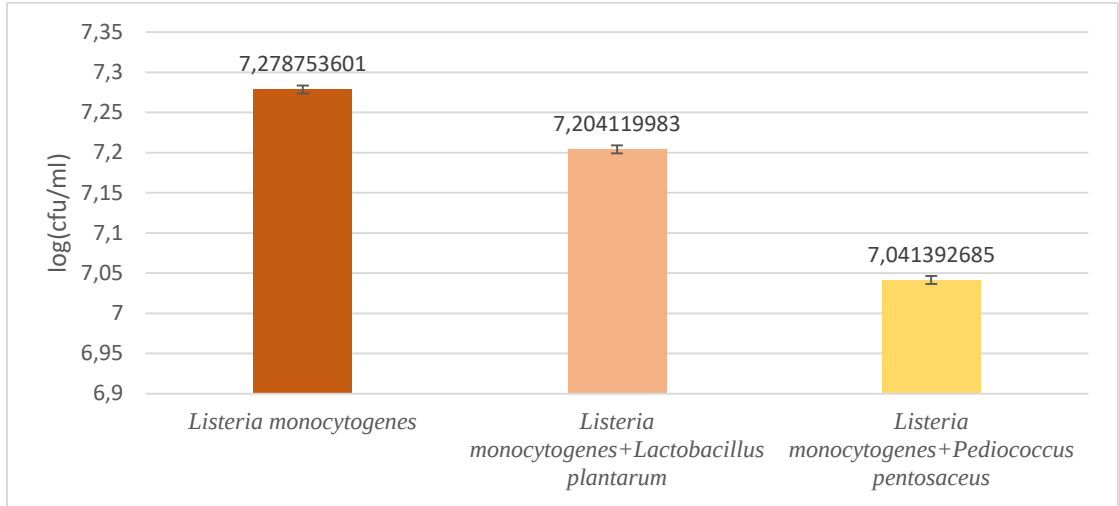
Bu çalışmada, *Lb. plantarum* ve *P. pentosaceus* adlı suşlarının, sekiz gıda kaynaklı patojenin Caco-2 hücrelerine tutunmasına karşı antagonistik etkileri, karşılaştırma amacıyla bir kontrol grubu kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu suşların, epitelyal Caco-2 hücrelerine patojen tutunmasını engelleme kapasitesi kantitatif olarak ölçülmüş ve sonuçlar, her iki suşun belirli patojenlere karşı tutunmayı önleyici etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.7).

L. plantarum ve *P. pentosaceus*'un *E. coli*'nin Caco-2 hücrelerine tutunmasını sırasıyla 0,21 log CFU/mL ve 0,64 log CFU/mL azalttığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde aynı LAB suşları, *S. Typhimurium*'un Caco-2 hücrelerine tutunmasını sırasıyla 0,30 log CFU/mL ve 0,17 log CFU/mL düşürmüştür. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının Caco-2 hücrelerine tutunması üzerinde bu LAB suşlarının gösterdiği etkiler ise, sırasıyla 0,12 log CFU/ml ve 0,17 log CFU/ml, 0,32 log CFU/ml ve 0,18 log CFU/ml'lik azalmalarla daha düşük düzeylerde gerçekleşmiştir. Son olarak *B. subtilis* için bu tutunmayı enelleme oranları sırasıyla 0,20 log CFU/mL ve 0,16 log CFU/mL düzeylerinde tanımlanmıştır.

Özellikle, tutunmada en yüksek azalma 0,65 log CFU/mL ve 0,35 log CFU/mL'lik düşüşlerle *P. aeruginosa*'da gözlenirken, en az etki *L. monocytogenes* üzerinde sırasıyla 0,07 log CFU/ml ve 0,23 log CFU/ml ile kaydedilmiştir. *S. aureus* üzerindeki etki ise her iki suş için sırasıyla 0,26 log CFU/mL ve 0,14 log CFU/mL olmuştur.







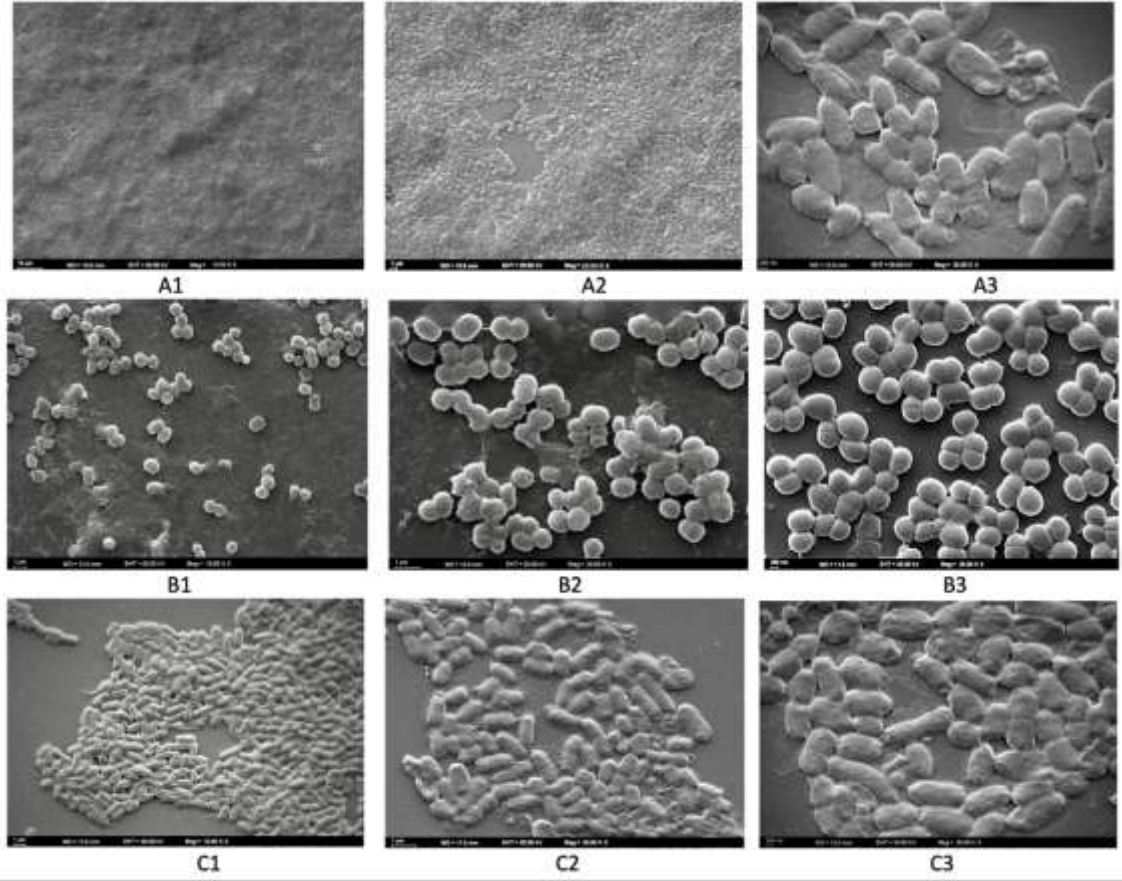
Şekil 4.7 Patojenik bakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunmasının engellenmesi

4.8 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ile Biyofilm Yapılarının İncelenmesi

İncelemeler, taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak çeşitli büyütme oranlarında (10KX, 20KX ve 30KX) gerçekleştirilmiş ve Şekil 4-8’de gösterilen detaylı görüntüler elde edilmiştir. Bu çalışma, biyofilm oluşumunda *P. pentosaceus* ve *Lb. plantarum* tarafından kullanılan farklı mimari stratejilerin altını çizmektedir.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), biyofilm oluşturma yetenekleriyle bilinen iki laktik asit bakterisi olan *P. pentosaceus* ve *Lb. plantarum* tarafından oluşturulan biyofilmlerdeki yapısal farklılıkları ayrıntılı bir şekilde görselleştirmiştir. *P. pentosaceus* biyofilmleri, yoğun hücre agregatlarından oluşan kompakt ve çok katmanlı yapılarla karakterize edilmiştir. Küresel ila oval şekilli hücreler, hücreler arası güçlü tutunmanın bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Bu organizasyon, kalın ve tekdüze bir matris oluşturarak pürüzsüz ve sürekli bir biyofilm yüzeyi meydana getirmiştir. Minimum boşluklar ve boşlukların gözlemlenmesi, biyofilmin yüksek yapısal bütünlüğünü yansıtmaktadır (Şekil 4.8).

Buna karşın, *Lb. plantarum* oldukça heterojen bir yapıya sahip biyofilmler üretmiştir. *Lb. plantarum*’un çubuk şeklindeki hücreleri paralel zincirler halinde sıralanmış veya gevşek kümeler oluşturarak, *P. pentosaceus*’a kıyasla daha açık ve daha az yoğun bir biyofilm yapısı oluşturmuştur. Proteinler ve şekerler bakımından zengin olan hücre dışı matriks, sıkı paketlenmeyi desteklemediğinden biyofilm yapıları daha pürüzlü ve daha düzensiz bir yüzey görüntüsüne sahiptir. Ayrıca, *S. Typhimurium* biyofilminin SEM analizi, yükselteler ve alt kümeler ile karakterize, belirgin bir şekilde pürüzlü ve düzensiz bir yüzey dokusu olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 *Lb. plantarum* (A1-A3), *P. pentosaceus* (B1-B3) ve *S. Typhimurium* (C1-C3) için taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

4.9 *S. Typhimurium* Doğal Suşuna LAB CFCS'lerinin Uyulanması Sonucu Biyofilm ve Virülansla İlgili Genlerin İfade Düzeylerinde Meydana Gelen Değişmeler

LAB CFCS'leri uygulanan ve uygulanmayan (kontrol) *S. Typhimurium* suşlarından elde edilen RNA örneklerinin saflık kontrolleri gerçekleştirildikten sonra, cDNA sentez aşamasına geçilmiştir. Sentezlenen bu cDNA numuneleri kullanılarak gerçek zamanlı kantitatif ger zincir reaksiyonları (qRT-PZR) tesis edilmiştir. Burada, doğal tip *S. Typhimurium* kültürlerinden haeketle sentezi gerçekleştirilen cDNA örneklerinden yapılan dilüsyon serileri kullanılmak suretiyle her primer çifti için elde edilen Ct değerleri (Çizelge 4.3) denemelerde elde edilen sonuçların kalibrasyonunda kullanılmıştır. qRT-PZR denemelerinde kontrol gen olarak, bir merkezi metabolizma

geni olan *gyrA* geninin transkripsiyon seviyelerine dair ölçülen verilerden yararlanılmıştır (Şekil 4.9).

Çizelge 4.3 Araştırılan genlere ait CT değerleri

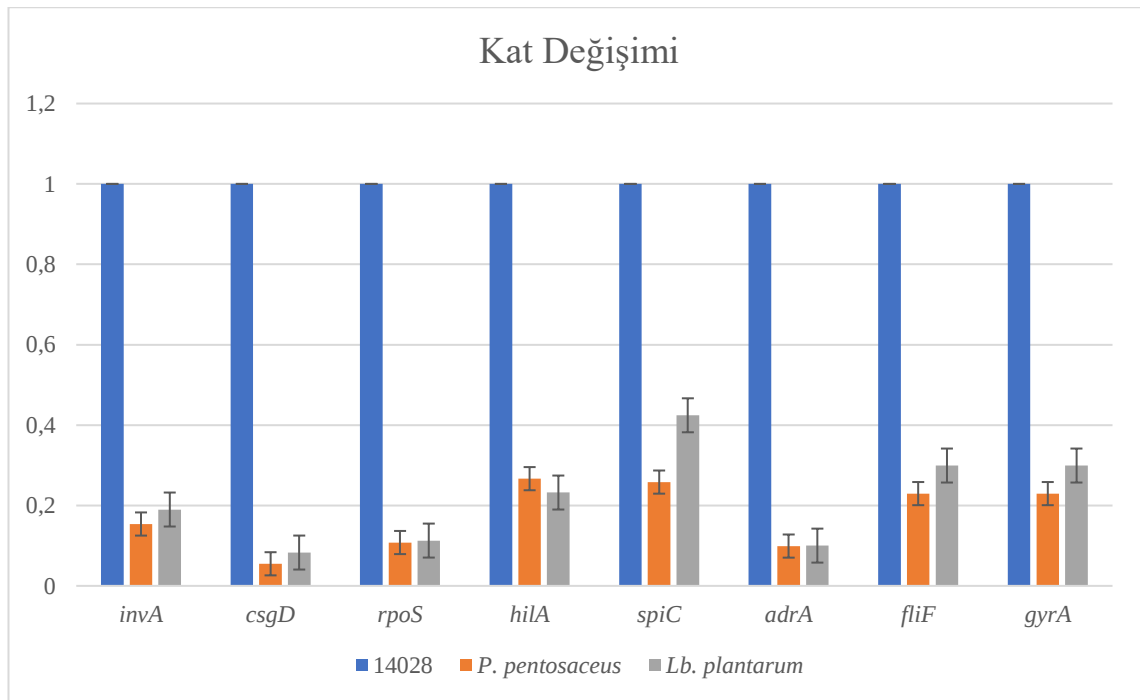
		CT1	CT2	CT3
<i>invA</i>	<i>S. Typhimurium</i> 14028	27,46	26,37	26,07
	14208 + <i>P. pentosaceus</i> süpernatantı	23,07	25,1	26,1
	14028 + <i>Lb. plantarum</i> süpernatantı	24,57	25,03	24,97
<i>csgD</i>	<i>S. Typhimurium</i> 14028	22,07	22,59	22,28
	14208 + <i>P. pentosaceus</i> süpernatantı	22,04	22,51	22,22
	14028 + <i>Lb. plantarum</i> süpernatantı	21,94	21,3	21,96
<i>rpoS</i>	<i>S. Typhimurium</i> 14028	34,25	34,83	34,12
	14208 + <i>P. pentosaceus</i> süpernatantı	33,06	32,45	33,6
	14028 + <i>Lb. plantarum</i> süpernatantı	33,1	33,56	33,47
<i>hlyA</i>	<i>S. Typhimurium</i> 14028	27,27	28,57	28,32
	14208 + <i>P. pentosaceus</i> süpernatantı	25,16	25,35	25,64
	14028 + <i>Lb. plantarum</i> süpernatantı	26,3	25,71	25,95
<i>spiC</i>	<i>S. Typhimurium</i> 14028	28,35	28,16	28,38
	14208 + <i>P. pentosaceus</i> süpernatantı	24,99	25,59	26,44
	14028 + <i>Lb. plantarum</i> süpernatantı	25,44	25,12	25,52
<i>adrA</i>	<i>S. Typhimurium</i> 14028	24,28	24,99	24,68
	14208 + <i>P. pentosaceus</i> süpernatantı	22,54	23,91	23,78
	14028 + <i>Lb. plantarum</i> süpernatantı	24,24	23,31	23,84
<i>fliF</i>	<i>S. Typhimurium</i> 14028	28,32	28,8	28,1
	14208 + <i>P. pentosaceus</i> süpernatantı	26,06	25,67	26,13
	14028 + <i>Lb. plantarum</i> süpernatantı	25,92	25,97	26,03
<i>gyrA</i>	<i>S. Typhimurium</i> 14028	26,99	26,78	27,26
	14208 + <i>P. pentosaceus</i> süpernatantı	25,71	25,24	25,56
	14028 + <i>Lb. plantarum</i> süpernatantı	25,49	25,24	25,19

Gerçekleştirilen qRT-PZR reaksiyonları sonucunda, biyofilm ortamında süpernatant uygulaması ardından araştırılan genlerin ifade seviyeleri Livak metodu kullanılarak 16S rDNA genine göre normalize edildi. Ardından ifade seviyelerinin herhangi uygulama yapılmamış *S. Typhimurium* 14028'e göre kat farkı hesaplandı. Elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri çizelgede verilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Araştırılan genlerin ifade seviyelerinin normalize edilmiş kat farkı ($2^{\Delta\Delta Ct}$ değerleri)

	<i>invA</i>	<i>csgD</i>	<i>rpoS</i>	<i>hilA</i>	<i>spiC</i>	<i>adrA</i>	<i>fliF</i>	<i>gyrA</i>
14028	1	1	1	1	1	1	1	1
+ <i>P. pentosaceus</i>	0,1538 93052	0,0549 14591	0,1078 17754	0,2667 08061	0,2582 18929	0,0989 83601	0,2295 16005	0,2295 16005
+ <i>Lb. plantarum</i>	0,1899 02833	0,0828 51215	0,1126 56308	0,2321 82853	0,4243 51986	0,1001 33735	0,2993 69676	0,2993 69676

S. Typhimurium biyofilmine *P. pentosaceus* ve *L. plantarum* süpernantlarının uygulanması sonucu biyofilm (*csgD* ve *adrA*)ve virölansla (*invA*, *rpoS*, *hilA*,*spi* ve *fliF*) ilişkili genlerin ifadesinde istatistiki olarak anlamlı ($p \leq 0.05$) ölçüde düşüş tespit edilmiştir Şekil (4.9).



Şekil 4.9 Süpernant uygulaması sonrası araştırılan genlerin log2 kat değişim grafiği

Hata çubukları, ortalamanın standart hatasını (SEM) gösterir. Ct değerlerini arasındaki istatistiksel anlamlılığı belirtmek üzere * ($p \leq 0.05$) sembolü kullanıldı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

LAB suşlarının biyofilm üretme yetenekleri üzerine yürütülen deneylerden elde edilen sonuçlar, laktik asit bakterilerinin biyofilm oluşumunun, bakteri türüne ve inkübasyon süresine bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. *L. plantarum*'un, inkübasyon süresi boyunca *P. pentosaceus*'tan daha yüksek biyofilm oluşum kapasitesine sahip olması, bu bakterinin biyofilm oluşturma yeteneğinin daha güçlü ve stabil olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgu, LAB'nin biyofilm oluşum kapasitelerinin türden türe farklılık gösterdiğini ve bu farklılıkların potansiyel biyoteknolojik uygulamalarda önemli bir faktör olabileceğini göstermektedir.

Diğer yandan, biyofilm oluşumunun zaman içinde değişmesi, biyofilm gelişiminin dinamik doğasını vurgulamaktadır. Özellikle, biyofilm oluşumunun 48 saat sonra zirveye ulaşması ve bu aşamadan itibaren azalma göstermesi, biyofilm yapılaşmasının zamanla evrimleşen bir süreç olduğunu ve biyofilm olgunlaştıkça mikroorganizma popülasyonunun farklı aşamalara geçebileceğine işaret etmektedir. Bu, biyofilm oluşum evrelerinde suşa özgü faktörler ve zamanın etkisi üzerinde daha fazla araştırma yapılması gerektiğini düşündürmektedir. Biyofilm oluşumu, bakterilerin çeşitli yüzeylerde yerleşim yaparak çevresel strese karşı korunmalarına yardımcı olan önemli bir özelliktir (Costerton W ve ark., 1999). Çalışmamızda, *Lb. plantarum* ve *P. pentosaceus* arasındaki biyofilm oluşum kapasitesindeki farklar, her iki türün biyolojik farklılıkları ve çevresel koşullara verdiği tepkilerle açıklanabilir. Bu çalışmada kullanılan her iki LAB suşunun da biyofilm oluşum kapasitelerinin zamana bağlı dinamikleri, literatürde tanımlanan biyofilm olgunlaşma evreleriyle uyumludur. Birçok araştırmada biyofilm oluşumunun zamana bağlı bir gelişme gösterdiği ve olgunlaşma sürecinde bakterilerin daha sıkı bir yapıya büründüğü saptanmıştır (Li ve ark; Pannella ve ark., 2020; Todhanakasem ve ark., 2021). Biofilm oluşum aşamalarının zamana bağlı tanısı, LAB'nin patojenlere karşı koruyucu bariyerler oluşturma potansiyelinin yanı sıra, biyofilm oluşum süreçlerinin gıda sanayi, probiyotik terapiler ve bağırsak sağlığı gibi alanlarda nasıl kullanılabileceği konusunda daha derin bir anlayış geliştirmeye yardımcı olmaktadır. Zira bakteri türü ve inkübasyon süresi gibi faktörler biyofilm kontrolünde kritik parametreler olarak öne çıkmaktadır.

Otoagregasyon biyodenemelerinden elde edilen veriler, *Lb. plantarum* ve *P. pentosaceus* gibi laktik asit bakterilerinin otoagregasyon kapasitelerinin zamanla arttığını ve en yüksek otoagregasyon oranına 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda ulaştığını göstermektedir. Bu bulgular, LAB'nin hücre-hücre etkileşimlerinin zaman içinde güçlendiğine ve bu bakterilerin koloni oluşturma yeteneklerinin arttığına işaret etmektedir. Otoagregasyon, bakteri hücrelerinin birbirine tutunma yeteneği olup, biyofilm oluşumunun başlangıç aşamalarında önemli bir rol oynamaktadır. Bu bağlamda, otoagregasyon oranındaki artış, biyofilm oluşum sürecine zemin hazırlayan bir mekanizma olarak kabul edilmektedir (Vinderola ve ark., 2000; Wang ve ark., 2000). Diğer yandan, Gänzle ve arkadaşları (2016), otoagregasyonun probiyotik bakterilerin bağışıklık sistemiyle etkileşimlerinde ve patojenlerin inhibisyonunda da rol oynadığını belirtmişlerdir. Otoagregasyon denemelerinden elde edilen istatistiksel analizlerin sonuçları da, inkübasyon süresi ile otoagregasyon oranları arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ve zaman ilerledikçe otoagregasyon kapasitesinin arttığını doğrulamaktadır. Bu, laktik asit bakterilerinin geliştirdiği biyolojik ve ekolojik stratejiler açısından önemli bir bulgudur, çünkü otoagregasyon, bakterilerin yüzeylere tutunma ve çevrelerinde sağlam yapılar oluşturma kapasiteleriyle doğrudan ilişkilidir. Gelecekte yapılacak çalışmalarda, otoagregasyon oranlarını etkileyen ortam faktörlerini (pH, besin kaynakları, sıcaklık gibi) daha ayrıntılı inceleyerek, bu bakterilerin biyoteknolojik uygulamalardaki potansiyelini daha iyi anlayabiliriz. Bu bulgular, özellikle gıda sanayinde ve probiyotik terapilerde kullanılacak LAB suşlarının seçilmesinde referans olacaktır.

LAB suşlarının patojenlerle gerçekleştirdiği koagregasyon bulguları, *P. pentosaceus* ve *Lb. plantarum* suşlarının, patojenik bakterilerle koagregasyon yeteneklerinin önemli derecede farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. *P. pentosaceus*, özellikle *E. faecium* ve *E. faecalis* gibi enterokok türleriyle yüksek koagregasyon oranları sergileyerek, bu bakterilerin patojenlere karşı etkileşimde bulunma potansiyeline işaret etmektedir. Öte yandan, *Lb. plantarum* da bir dizi patojenle koagregasyon gösterse de, *P. pentosaceus* kadar güçlü bir etkiye ulaşamamaktadır. Koagregasyon, probiyotiklerin patojenleri baskılama ve koruyucu etkiler sağlama kapasitesini ortaya koyan önemli bir biyolojik özelliktir. Özellikle *Enterococcus* ve *S. aureus* gibi patojenlerle yapılan koagregasyon testlerinde saptanan yüksek yüzdeler, bu bakterilerin probiyotik

karakterlerine ve konak bağışıklık sistemi üzerinde faydalı etkiler yaratabileceğine dikkat çekmektedir. Bu tür etkileşimlerin, probiyotik tedaviler ve gıda ürünlerinde kullanılan probiyotik suşların seçilmesi açısından önemli olduğu aşıkardır (Jiang ve ark., 2021). *P. pentosaceus*'un daha geniş bir patojen spektrumuna karşı daha güçlü koagregasyon kapasitesine sahip olması, bu suşun probiyotik ürünlerde daha etkili bir bakteri kontrolü sağlama potansiyeline sahip olduğunu vurgulamaktadır.

Çalışmamızda elde edilen, LAB planktonik ve biyofilm formlarının patojenlere karşı gösterdiği antagonistik aktivite bulguları, *L. plantarum* ve *P. pentosaceus*'un hem planktonik hem de biyofilm formlarının patojen inhibisyonundaki potansiyelini ortaya koymaktadır. Gänzle ve arkadaşları (2016), probiyotiklerin gıda matrislerinde patojen çoğalmasını inhibe etme yeteneklerini araştırmış ve *Pediococcus* cinsine ait biyofilm oluşturma yeteneğindeki türlerin bu alanda güçlü inhibisyon etkinlikleri gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca, *Lactobacillus* türlerinin patojen inhibisyonu için çeşitli mekanizmalar geliştirdiği, özellikle bu bakterilerin biyofilm formlarının antibiyotik dirençli patojenlere karşı etkinliklerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (Liu ve ark., 2020; Mgomi ve ark., 2023). Çalışmamızda elde edilen ve LAB biyofilm formlarının patojen inhibisyonunda planktonik formlardan daha etkin olduğuna dair veriler yukarıda özetlenen literatür verileri ile paralellik göstermektedir. Bu etki farklılığının esası, büyük bir olasılıkla biyofilm formundaki LAB suşlarında meydana gelen ve planktonik formlardan oldukça farklı olduğu bilinen gen ifade profili değişimleridir. Gelecek çalışmalarda, bu LAB suşlarının biyofilm formlarının patojen inhibisyonu üzerindeki mekanizmaları, özellikle biyofilm formlarında meydana gelen gen ifade farklanmaları dikkate alınarak, daha derinlemesine incelenmeli ve bu farklanmaların arzu edilen doğrultuda modülasyonunun yapılıp yapılamayacağı belirlenmelidir. Bu sayede söz konusu suşların özellikle gıda endüstrisinde kullanım olanaklarının geliştirilmesi ve etkin probiyotik preparatlarının hazırlanması mümkün olabilir.

LAB CFCS'lerinin patojen inhibisyonu aktivitelerine dair sonuçlar, *Lb. plantarum* ve *P. pentosaceus* gibi laktik asit bakterilerinin antibakteriyel potansiyelini doğrulayan güçlü bulgular sunmaktadır. Özellikle 48 saatlik kültürlerden elde edilen CFS'lerin daha güçlü antibakteriyel etkinlik göstermesi, kültür süresiyle birlikte antibakteriyel bileşiklerin

üretiminde zamanla artan bir aktiviteye işaret etmektedir. Bu sonuç, uzun süreli inkübasyonların, daha fazla antibakteriyel bileşik üretimine neden olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, gram-pozitif ve gram-negatif patojenler üzerindeki etki farklılıkları, bu bakterilerin hücresel yapıları ve antibakteriyel bileşiklere karşı gösterdikleri dirençten kaynaklanıyor olabilir. Örneğin; gram-negatif bakterilerin dış zar yapıları, bu patojenlerin antibakteriyel bileşiklere karşı daha dirençli olmalarına yol açmaktadır. Bu bulgular, çalışma materyalimiz olan laktik asit bakterilerinin gıda koruma alanında ve tıbbi uygulamalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak, antibakteriyel bileşiklerin türü ve üretim koşulları hakkında daha fazla bilgi edinmek, bu mikroorganizmaların etkinliğini optimize etmek için gereklidir. Bu nedenle, söz konusu laktik asit bakterilerinin potansiyel uygulamaları için daha ileri araştırmalar önerilmektedir.

Biyofilm oluşumu, patojenlerin çevresel stres koşullarına karşı daha dirençli hale gelmesini sağlayan ve enfeksiyon süreçlerinde önemli roller üstlenen bir mekanizmadır. Bu bağlamda, biyofilm inhibisyonu, gıda güvenliği ve tıbbi tedavi stratejileri açısından büyük önem taşımaktadır. LAB CFC'leri ile yürütülen denemelerde *P. pentosaceus* CFC'sinin *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumunu %39,42 oranında inhibe etmesi, bu suşun antibiyofilm aktivitelerinin oldukça güçlü olduğunu düşündürmektedir. Diğer taraftan, *Lb. plantarum*'un daha düşük bir etki göstermesi, her iki LAB suşunun CFC'lerinin biyofilm inhibisyon mekanizmalarının farklı olabileceğini ve *P. pentosaceus*'un biyofilm oluşumuna karşı daha etkin bir strateji geliştirdiğini ortaya koymaktadır. Bu antibiyofilm etkisinin mekanizması, LAB suşlarının ürettiği bileşikler (örneğin, laktik asit, hidrojen peroksit ve bakteriosinler) aracılığıyla gerçekleşmiş olabilir. Bununla birlikte, *Lb. plantarum*'un daha düşük etki göstermesi, bu suşun biyofilm inhibisyonu için gerekli bileşenleri yeterince üretmemiş olabileceğini veya ortam koşullarının bu etkiyi sınırlamış olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, bu çalışma, LAB suşlarının biyofilm oluşumunu inhibe etme potansiyelini ortaya koyarak, gıda patojenlerinin biyofilm oluşumuna karşı biyolojik kontrol stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemli bir temel sağlamaktadır. Ancak, farklı LAB suşlarının biyofilm inhibisyonundaki etkinliklerinin daha ayrıntılı incelenmesi, bu bakterilerin biyofilm yapılarına karşı terapötik kullanımlarını daha etkili hale getirebilir.

Lactobacillus türlerinin, biyofilm inhibisyonu sağlamak için laktik asit, hidrojen peroksit ve bakteriosinler gibi bileşikler ürettiği belirlenmiştir (Gänzle ve ark., 2016). Bu bağlamda, *P. pentosaceus*'un biyofilm inhibisyonunda gösterdiği etkinlik, probiyotiklerin potansiyel koruyucu özelliklerinin altını çizmektedir. Özellikle, *P. pentosaceus*'un daha düzenli ve kompakt biyofilm yapısı, çevresel streslere karşı daha dayanıklı olmasının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Lee ve ark., 2016).

LAB suşlarının patojenlere karşı yarışma yetenekleri, Caco-2 hücrelerine beraber tutunma testleri yapılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, *L. plantarum* ve *P. pentosaceus* suşlarının gıda kaynaklı patojenlerin Caco-2 hücrelerine tutunmalarını engelleme konusunda farklı derecelerde etkinlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Özellikle *P. pentosaceus*, birçok patojen üzerinde daha güçlü bir tutunmayı engelleyici etki gösterirken, *L. plantarum*'un etkisi daha sınırlı kalmıştır.

P. pentosaceus'un *P. aeruginosa*'nın Caco-2 hücrelerine tutunmasını daha yüksek düzeyde inhibe etme kabiliyeti, bu suşun söz konusu patojenin hücre yüzeyine bağlanmasında kullandığı reseptörleri tanıdığına işaret etmektedir. Diğer taraftan, *L. monocytogenes* gibi patojenlerdeki düşük etki, bu bakterilerin hücre yüzey yapılarının veya bağlanma stratejilerinin LAB suşlarının etkilerine daha dirençli olduğunu göstermektedir. Bu durum, LAB suşlarının farklı patojenlere karşı gösterdiği etkililiği daha ayrıntılı inceleyen çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır. Özetle, *Lb. plantarum* ve *P. pentosaceus* gibi LAB suşları, gıda kaynaklı patojenlerin hücrelere tutunmalarını engelleme açısından potansiyel bir biyolojik kontrol stratejisi olarak değerlendirilebilir. LAB suşlarının, patojenlerin epitelyal hücrelere tutunmasını engelleme yeteneği, birçok çalışmada da vurgulanmıştır. Örneğin, *Lb. plantarum* ve *P. pentosaceus* gibi LAB suşları, *E.coli* ve *S. enterica* gibi gıda kaynaklı patojenlerin Caco-2 hücrelerine tutunmalarını engellemektedir (Asmla ve ark., 2015). Bu etki, bakteriyel hücrelerin yüzey özelliklerine ve LAB suşlarının sekrete ettikleri bileşenlerin çeşitliliğine dayandırılmaktadır. Yapılan araştırmalarda, *Lb. plantarum*'un probiyotik özellikleri nedeniyle, hem patojenlerin bağlanmasını engellemede rol oynadığı ve hem de inflamasyonu modüle ettiği belirtilmiştir (Anjana ve ark., 2022). *P. pentosaceus*'un ise, özellikle enterokok türleri ile koagregasyon yeteneği gösterdiği gibi, birçok çalışmada

antimikrobiyal etkilerinin de daha belirgin olduğu açık bir şekilde tanımlanmıştır. *P. pentosaceus*'un, *P.aeruginosa* gibi biofilm oluşturan patojenlerin hücrelere tutunmasını inhibe etme yeteneği, bu bakterinin antibiyotiklere karşı daha dirençli patojenlerle mücadelede etkili bir strateji geliştirdiğini göstermektedir. Bu tür mikroorganizmaların, çevresel stres faktörlerine karşı direnci artırarak, biyofilm oluşumunu engellediği ve antibiyotik direncini sınırladığı öne sürölmektedir (Mgomi ve ark., 2023). Diğer taraftan, *L. monocytogenes* gibi bazı patojenlerde gözlemlenen düşük etki, bu bakterilerin yüzey yapılarının veya bağlanma mekanizmalarının LAB suşlarının etkilerine karşı dirençli olabileceğini düşöndürmektedir. *L. monocytogenes*'in, hücre yüzeyindeki internalizasyon mekanizmaları ve virölans faktörlerinin, LAB suşlarının inhibisyon stratejilerine karşı koyma potansiyeli taşıdığı kanıtlanmıştır (Meireles ve ark., 2020). Bu nedenle, bazı patojenlerin LAB etkileşimlerine karşı gösterdikleri direnç, türler arası farklılıkları yansıtan önemli bir bulgu olarak değeriendirilmiştir. Özellikle *P. pentosaceus* ve *L. plantarum* gibi LAB suşları, yalnızca patojenlerin doğrudan yüzeylere tutunmalarını engellemekle kalmaz, aynı zamanda bu patojenlerin biyofilm oluşumunu inhibe edebilir. Bu, gıda endüstrisi ve tıbbi terapilerde önemli etkiler yaratan kritik bir özelliktir. *Lactobacillus* türlerinin biyofilm inhibisyonu etkileri üzerine yapılan birçok çalışmada, bu bakterilerin biyolojik bariyerler oluşturma kapasitesinin, patojenlerle rekabetin artırılmasında etkili olduğu belirtilmiştir (Tatsaporn ve ark., 2020). Bu veriler ve tespitler, çalışmamızda kullanılan LAB suşlarının, gıda kaynaklı patojenler üzerinde biyolojik kontrol sağlama potansiyelini açık bir şekilde ortaya koymaktadır.

Biyofilm yapılarının taramalı elektron mikroskopisi tekniği ile alınan görüntöleri *P. pentosaceus* ve *Lb. plantarum* suşlarının biyofilm yapısındaki farklılıkları net bir şekilde ortaya koymaktadır. *P. pentosaceus* tarafından oluşturulan biyofilm yapısının daha kompakt ve düzenli olması, bu bakterinin biyofilm stabilitesini artıran bir organizasyon stratejisi geliştirdiğini göstermektedir. Hücreler arası sıkı tutunma karakteristiği olan minimal boşluklar, *P. pentosaceus*'un çevresel streslere karşı daha dayanıklı olabileceğini düşöndürmektedir. Diğer taraftan, *Lb. plantarum*'un biyofilm yapısı; daha heterojen bir organizasyon, daha az yoğun ve düzensiz bir yapı mimarisi sergilemiştir. Bu tür yapılar, hücre dışı matriksin daha az sıkı paketleniği ve biyofilm yüzeyinin daha pürüzlü olduğu anlamına gelmektedir (Schleifer ve ark., 2003; Bajpai ve ark., 2016, Rani ve ark., 2007).

Bu durum, *Lb. plantarum*'un biyofilm oluşumunda daha esnek bir strateji izlediğini ve patojenlerin hücrelere tutunma yeteneğini engellemeye yönelik daha farklı bir yaklaşım tercih ettiğini göstermektedir. Bu tür biyofilm yapıları, farklı koşullara adapte olabilen bakteriler için yaygın bir özellik olup, zaman içinde değişkenlik gösterebilmektedir (Todorov ve Russo., 2014; Bajpai ve ark., 2016). Biyofilm yapılarındaki bu mimari farklılıklar, bakteriyel etkileşimlerin ve antibiyotiklere karşı direnç geliştirme stratejilerinin de farklı olabileceğini düşündürmektedir. Bu farklı biyofilm yapılarının, *P. pentosaceus* ve *Lb. plantarum*'un antibiyotik direnci, patojen inhibisyonu ve diğer biyoteknolojik uygulamalardaki kullanım potansiyellerini nasıl etkileyebileceği üzerine daha fazla araştırma yapılması gereklidir.

S. Typhimurium biyofilmine *P. pentosaceus* ve *L. plantarum* süpernantlarının uygulanması sonucu, biyofilm ile ilişkili *csgD* ve *adrA* genleri ile virülansla ilişkili *invA*, *rpoS*, *hilA*, *spi* ve *fliF* genlerinin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı düşüşler gözlemlenmiştir. Bu bulgular, biyofilm oluşumunun ve virülans genlerinin ifade düzeylerinin *P. pentosaceus* ve *Lb. plantarum* gibi laktik asit bakterileri tarafından inhibe edilebileceğini göstermektedir. Biyofilm oluşumu, birçok patojenin hayatta kalma ve enfeksiyon kapasitesini artıran önemli bir stratejidir. *csgD* ve *adrA*, biyofilm oluşumu ve düzenlemesinde önemli rol oynayan temel genler olarak tanımlanmıştır (Wang ve ark. 2018; Zhao ve Liu 2019; Dawwam ve ark., 2022). *csgD* geninin, biyofilm formasyonunun ana düzenleyicisi olduğu ve biyofilm matrisini oluşturan yapısal bileşenlerin üretimini teşvik ettiği bilinmektedir. *adrA*, biyofilm matrisinin stabilitesini sağlayan bir diğer önemli bir gen olarak işlev görmektedir. Bu genlerin baskılanması, biyofilm oluşumunun engellenmesine ve patojenlerin çevresel etkilere karşı daha az dirençli hale gelmesine neden olmaktadır. Yadav ve ark. (2018), laktik asit bakterilerinin, özellikle *Lb. plantarum* ve *P. pentosaceus* gibi türlerin hücresel formlarının, *E. coli* ve *S. aureus* gibi patojenlerin biyofilm oluşturmalarını inhibe ettiğini bildirmiştir. Ayrıca Choi ve ark. (2020), biyofilm oluşumunu engelleyen ve bakteriyel virülansı baskılayan antibakteriyel özelliklere sahip olan bazı doğal bileşiklerin etkisini araştırmış ve laktik asit bakterilerinin ürettiği bu metabolitlerin de benzer etkilere sahip olduğunu belirlemiştir. Bizim çalışmamız bu inhibisyonu etkinliğinin *S. Typhimurium* biyofilm yapıları için de geçerli olduğu kanıtlamıştır. Virülans genler, patojenlerin konak hücrelere invazyonunu, konak

başıklık yanıtlarından kaçmalarını ve çevresel adaptasyonlarını düzenleyen genler olarak tanımlanmaktadır. Bu genlerin baskılanması, patojenlerin virülanslığını azaltmada kullanılan önemli bir stratejidir. Çalışmamızda kullandığımız *invA*, *S. Typhimurium* gibi *Salmonella* türlerinde, invazyon sürecini başlatan ve patojenin bağırsak hücrelerine girmesini sağlayan bir invazyon proteinini kodlamaktadır (Gunn ve Tsois 2017). *rpoS*, bakterilerin stres koşullarında hayatta kalmasına yardımcı olan bir stres yanıt geni olarak tanımlanmıştır (Hengge-Aronis, 2002). *hilA*, *Salmonella*'nın invazyon kapasitesini düzenleyen (Fahlen, ve Hinton, 2001) *spiC*, *Salmonella*'nın immün sistemden kaçış stratejilerini etkileyen (Galán ve Wolf-Watz 2006) ve son olarak *fliF* *Salmonella*'nın hareketliliğinde (Mancab 2004) rol oynayan genler olarak karakterize edilmiştir. Wang ve ark. (2020), *Lb. plantarum* ve *P. pentosaceus*'un *Salmonella*'nın virülans genlerinin ifadesini inhibe ettiğini ve patojenin bağırsaklık sisteminden kaçışını engellediğini göstermiştir. Bu çalışma, biyofilm inhibisyonunun yanı sıra virülans genlerinin baskılanmasının önemini de vurgulamaktadır. Zhao ve ark. (2021), probiyotiklerin, özellikle *Lb. plantarum* ve *P. pentosaceus* gibi türlerin, *Salmonella* gibi patojenlerin virülansının inhibisyonunda kritik etkiler gösterdiğini tespit etmiştir. Ancak bu çalışmalarda LAB'nin doğrudan canlı hücreleri kullanılmıştır. Bizim çalışmamızdaki temel farklılık söz konusu etkilerin LAB CFCS'leri ile de gerçekleşebileceğinin belirlenmesidir. Özetle bu çalışmada LAB'nin antibiyofilm ve antivirülans kapasitelerinin esas olarak hücre dışına salgıladıkları aktif bileşikler ile gerçekleştirildiği kanıtlanmıştır. Gelecekte yürütülecek araştırmalarda, bu bakterilerin antivirülans ve antibiyofilm eki mekanizmaları daha ayrıntılı bir şekilde incelenerek, bu etkinin hücresel esaslı detaylı bir şekilde tanımlanmalıdır. Ayrıca, farklı çevresel koşullar altında ve farklı patojenlere karşı söz konusu etkilerdeki değişimlerin kullanılan LAB suşlarına bağlı olarak değişimleri değerlendirilmeli ve uzun süreli klinik denemeler yürütülerek, bu etkinliklerin doğası net bir şekilde aydınlatılmalıdır. Bu sayede daha etkin mücadele preparatlarının geliştirilmesi mümkün olacaktır. Zira laktik asit bakterileri, özellikle gıda güvenliği, farmasötik ve veterinerlik alanlarında kullanım açısından büyük bir potansiyele sahiptir.

KAYNAKLAR

- Abd-alkader, N. N., & Al-Draghi, W. A. (2023). Gene Expression of Biofilm Formation lasB and rhlB Genes of *Acinetobacter baumannii* Isolated from Wounds, Burns and Environmental Samples. *Iraqi journal of biotechnology*, 22(1).
- Al-Tawaha, R., & Meng, C. (2018). Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review. *Adv. Environ. Biol*, 12, 16-27.
- Al-Yami, A. M., Al-Mousa, A. T., Al-Otaibi, S. A., & Khalifa, A. Y. (2022). *Lactobacillus* species as probiotics: isolation sources and health benefits. *J. Pure Appl. Microbiol*, 16(4), 1761-1770.
- Alakomi, H. L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and environmental microbiology*, 66(5), 2001-2005.
- Alkema, W.; Boekhorst, J.; Wels, M.; van Hijum, S.A.F.T. Microbial bioinformatics for food safety and production. *Brief. Bioinform.* 2016, 17, 283–292.
- Anderson, A. C., Jonas, D., Huber, I., Karygianni, L., Wölber, J., Hellwig, E., Arweiler, N., Vach, K., Wittmer, A., & Al-Ahmad, A. (2016). *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Frontiers in microbiology*, 6, 1534. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01534>
- Anjana, A., & Tiwari, S. K. (2022). Bacteriocin-producing probiotic lactic acid bacteria in controlling dysbiosis of the gut microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 851140.
- Anonymous. (2019). Food safety really is everyone's business. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 4(8), 571. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30202-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30202-X).
- Argaw S, Addis M. (2015). A review on staphylococcal food poisoning. *Food Science and Quality Management*. 40;5971.
- Argudin M, Mendoza M, Rodico R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. 2; 1751-1773.
- Arias, C.A. and Murray, B.E. (2009) Antibiotic-resistant bugs in the 21st century – a clinical super-challenge. *N. Engl. J. Med.* 360, 439–443
- Asmla, A. A., Invernizzi, G., Bontempo, V., & Savoini, G. (2015). The beneficial role of probiotics in monogastric animal nutrition and health. *J Dairy Vet Anim Res*, 2(4), 00041.
- Atanassova V, Meindl A, Ring C. (2001). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham-a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 68; 105-113.

- Bajpai, V. K., Han, J. H., Rather, I. A., Park, C., Lim, J., Paek, W. K., ... & Park, Y. H. (2016). Characterization and antibacterial potential of lactic acid bacterium *Pediococcus pentosaceus* 4I1 isolated from freshwater fish *Zacco koreanus*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2037.
- Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolet, N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed research international*, 2018(1), 9361614.
- Belicova, A.; Mikulasova, M.; Dusinsky, R. Probiotic potential and safety properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak bryndza cheese. *BioMed Res. Int.* 2013. [CrossRef] [PubMed]
- Bhattacharyya, S., & Das, C. (2022). Foodborne infections and food safety. *Eastern journal of medical sciences*, 7(3), 60-63.
- Bortolaia, V.; Espinosa-Gongora, C.; Guardabassi, L. Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat. *Clin. Microbiol. Infect.* 2016, 22, 130–140. [CrossRef]
- Boussif K, Elidrissi A, Elmoslih A, Ezzaky Y, Zanzan M, Achemchem F. Lactic Acid Bacteria from Traditional Fermented Milk: Antimicrobial Potential Against Foodborne Pathogens. *Applied Microbiology*. 2026; 6(1):14. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol6010014>
- Brinkman CL, Schmidt-Malan SM, Karau MJ, Greenwood-Quaintance K, Hassett DJ, Mandrekar JN, Patel R (2016) Exposure of bacterial biofilms to electrical current leads to cell death mediated in part by reactive oxygen species. *PLoS ONE* 11(12):e0168595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168595>
- Capita, R., Felices-Mercado, A., García-Fernández, C., & Alonso-Calleja, C. (2019). Characterization of *Listeria monocytogenes* originating from the Spanish meat-processing chain. *Foods*, 8(11), 542.
- Castiblanco LF, Sundin GW (2016) New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. *J Integr Plant Biol* 58:362–372. <https://doi.org/10.1111/jipb.12428>
- Chaibenjawong P, Foster J. (2011). Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Archive of Microbiology*. 193; 125-135.
- Chen, J. Q., Regan, P., Laksanalamai, P., Healey, S., & Hu, Z. (2017). Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness*, 6(3), 97-120.
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(1), 22-32.
- Choi, Y. H., Kim, Y. M., & Park, Y. H. (2020). "Antibacterial and anti-biofilm activities of lactic acid bacteria against *Salmonella Typhimurium*." *Food Control*, 108, 106832.

- Collado MC, Greskowiak L, Salminen S (2007) Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Curr Microbiol* 55:260-5. doi:10.1007/00284-007-0144-8
- Corsetti, A., & van der Meer, J. R. (2012). Lactic acid bacteria in fermented food. *Microorganisms*, 9(3), 228-237.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *science*, 284(5418), 1318-1322.
- Cruz Ramos, H., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., ... & Jahn, D. (2000). Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *Journal of bacteriology*, 182(11), 3072-3080.
- Dahdouh, B., Basha, O., Haggag, Y., Khalil, S., & Tanekhy, M. (2020). Antibacterial effects of nano-silver suspension against some fish pathogens (in vitro).
- Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., & Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria– Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food control*, 21(4), 370-380.
- Danielsen M, Simpson PJ, O'Connor EB, Ross RP, Stanton C. Suscep- tibility of *Pediococcus* spp.. to antimicrobial agents. *J Appl Microbiol*. 2007;102:384–9.
- Dawwam, G. E., Saber, I. I., Yassin, M. H., & Ibrahim, H. F. (2022). Activity and Downregulate Biofilm Genes of Uropathogenic *E. coli*. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 16(3).
- De Vries, W., Soedarmo, M., & Zhai, D. (2018). Safety evaluation of probiotic *Lactobacillus* strains in food products. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(1), 35-46. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9275-3>
- Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Shabbir, M. Z., Barbuddhe, S., Malik, S. V. S., & Singh, R. K. (2015). Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 35(4), 211-235.
- Djadouni, F.; Kihal, M. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. *Braz. Arch. Biol. Technol*. 2012, 55, 435–443. [CrossRef]
- Donelli G, Vuotto C (2014) Biofilm-based infections in long-term care facilities. *Future Microbiol* 9:175–188. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.149>
- Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg- ing Infect Dis* 8:881. <https://doi.org/10.3201/2Feid0809.020063>
- Drumond, M. M., Tapia-Costa, A. P., Neumann, E., Nunes, Á. C., Barbosa, J. W., Kassuha, D. E., & Mancha-Agresti, P. (2023). Cell-free supernatant of probiotic bacteria exerted antibiofilm and antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa*: A novel biotic therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1152588.
- EFSA. Opinion of the scientific committee on introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J*. 2007, 587, 1–16.

- EJI, Cyril Arinze, et al. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented food against food pathogen. *GSC Advanced Research and Reviews*, 2023, 15.2: 020-031.
- Fahlen, T., & Hinton, J. C. D. (2001). "Regulation of Salmonella virulence by hilA." *Microbial Pathogenesis*, 31(4), 157-164.
- Fedi, A., Vitale, C., Ponschin, G., Ayehunie, S., Fato, M., & Scaglione, S. (2021). In vitro models replicating the human intestinal epithelium for absorption and metabolism studies: A systematic review. *Journal of Controlled Release*, 335, 247-268.
- Feng P, Weagant S, Grant M. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. USA: FDA/ Center for Food Safety & Applied Nutrition; 2007.
- Figueroa, L. M., Ramírez-Jiménez, A. K., Senés-Guerrero, C., Santacruz, A., Pacheco, A., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2021). Assessment of the bacterial diversity of agave sap concentrate, resistance to in vitro gastrointestinal conditions and short-chain fatty acids production. *Food Research International*, 140, 109862.
- Fracalanza, S.A.P.; Scheidegger, E.M.D.; Dos Santos, P.F.; Leite, P.C.; Teixeira, L.M. Antimicrobial resistance profiles of *enterococci* isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2007, 102, 853–859. [CrossRef]
- Galán, J. E., & Wolf-Watz, H. (2006). "The interaction of *Salmonella* with host cells." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(8), 513-520.
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117.
- Gänzle, M. G., & Hammes, W. P. (2017). Lactic acid bacteria in the food industry: Recent advances. In *Microbial Food Safety and Preservation* (pp. 99-120). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55298-0_6
- Gänzle, M. G., & Zheng, J. (2019). Lifestyles of sourdough lactobacilli—Do they matter for microbial ecology and bread quality?. *International Journal of Food Microbiology*, 302, 15-23.
- Gänzle, M. G., et al. (2016). "Lactic acid bacteria in food production and preservation." *Food Research International*, 89, 133-144.
- Gelsomino, R.; Vancanneyt, M.; Condon, S.; Swings, J.; Cogan, T.M. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, 71, 177–188.
- Giaouris E. Application of lactic acid bacteria and their metabolites against foodborne pathogenic bacterial biofilms. In: Recent trends in biofilm science and technology. Elsevier Inc; 2020. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819497-3.00009-x>
- Giaouris EE, Simões MV (2018) Pathogenic biofilm formation in the food industry and alternative control strategies. *Foodborne Diseases*. Elsevier, pp. 309–377. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811444-5.00011-7>.

- Goldstein, E.J.C.; Tyrrell, K.L.; Citron, D.M. *Lactobacillus* species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clin. Infect. Dis.* 2015, 60, S98–S107. [CrossRef] [PubMed]
- Gómez, N. C., Ramiro, J. M., Quecan, B. X., & de Melo Franco, B. D. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in microbiology*, 7, 863.
- Gunn, J. S., & Tsolis, R. M. (2017). "The *invA* gene and its role in *Salmonella* pathogenicity." *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), 583-592.
- Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P (2016) Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol* 198:1–15. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>
- Hammes, W. P., Hertel, C., & Gänzle, M. G. (2012). Lactic acid bacteria in food systems: Probiotics and functional foods. Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-33918-2>
- Harrell, J. E., Hahn, M. M., D'Souza, S. J., Vasicek, E. M., Sandala, J. L., Gunn, J. S., & McLachlan, J. B. (2021). *Salmonella* Biofilm Formation, Chronic Infection, and Immunity Within the Intestine and Hepatobiliary Tract. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 624622. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.624622>
- Hati, S.; Mandal, S.; Prajapati, J.B. Novel starters for value added fermented dairy products. *Curr. Res. Nutr. Food Sci.* 2013, 1, 83–91. [CrossRef]
- Hengge-Aronis, R. (2002). "The general stress response in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*." *Annual Review of Microbiology*, 56, 147-172.
- Hennekinne J A, De Buyser M, Dragacci S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*. 36; 815-836.
- Hidron, A.I. et al. (2008) NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006– 2007. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 29, 996–1011
- Hoffman, F.A.; Heimbach, J.T.; Sanders, M.E.; Hibberd, P.L. Executive Summary: Scientific and Regulatory Challenges of Development of Probiotics as Foods and Drugs. *Clin. Inf. Dis.* 2008, 46, 53–57. [CrossRef] [PubMed]
- Humphrey T (2004) *Salmonella*, stress responses and food safety. *Nat Rev Microbiol* 2:504–509
- Hwanhlem N, Ivanova T, Haertlé T, Jaffrès E & Dousset X. (2017). Inhibition of food-spoilage and foodborne pathogenic bacteria by a nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp *lactis* KT2W2L. *Lwt-Food Science and Technology*, 82, 170- 175
- Idalia VN, Bernardo F. *Escherichia coli* as a model organism and its application in biotechnology. In: Samie A, editor. *Escherichia coli*. Recent advances on physiology, pathogenesis and biotechnological applications. London: Intech Open; 2017. DOI: 10.5772/67306

- Jackson K, Gokhale R, Nadle J, Ray S, Dumyati G, Schaffner W, See I. (2020). Public health importance of invasive methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* infections: Surveillance in 8 US Counties. *Clinical Infectious Diseases*. 70;1021-1028.
- Jamal M, Tasneem U, Hussain T, Saadia Andleeb S (2015) Bacterial biofilm: its composition, formation and role in human infections. *Res Rev J Microbiol Biotechnol* 4:1–15
- Jiang, S., Cai, L., Lv, L., & Li, L. (2021). *Pediococcus pentosaceus*, a future additive or probiotic candidate. *Microbial Cell Factories*, 20, 1-14.
- Juneja, V. K., Osoria, M., Altuntas, E. G., Taneja, N. K., Thakur, S., Kumar, G. D., & Setlow, P. (2024). Effects of spore purity on the wet heat resistance of *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* spores. *Food Research International*, 177, 113904.
- Kadariya J, Smith T, Thapaliya D. (2014). *Staphylococcus aureus* and *staphylococcal* food-borne disease: An ongoing challenge in public health. *BioMedical Reserach International* 2014: 82-89.
- Khalid, K. An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci.* 2011, 1, 1–13.
- Kim JS, Kim JH, Palaniyandi SA et al (2019) Yak-Kong Soybean (*Glycine max*) Fermented by a novel *Pediococcus pentosaceus* inhibits the oxidative stress-induced monocyte- endothelial cell adhesion. *Nutrients* 11(6):1380. [https://doi.org/ 10.3390/nu11061380](https://doi.org/10.3390/nu11061380)
- Kim, J.-E., C. S. Chae, G.-C. Kim, W. Hwang, J.-S. Hwang, and S.- M. Hwang. 2015. *Lactobacillus helveticus* suppresses experimental rheumatoid arthritis by reducing inflammatory T cell responses. *J. Funct. Foods* 13:350–362.
- Köhler CD, Dobrindt U. What defines extra intestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology*. 2011;301:642-664
- Lee, J. H., et al. (2016). "Characterization of biofilm formation by *Lactobacillus* species in various environments." *Journal of Applied Microbiology*, 120(4), 1044-1052.
- Lee, J., Jo, J., Wan, J., Seo, H., Han, S. W., Shin, Y. J., & Kim, D. H. (2024). In vitro evaluation of probiotic properties and anti-pathogenic effects of *Lactobacillus* and *bifidobacterium* strains as potential probiotics. *Foods*, 13(14), 230.
- Lentino, J.R. et al. (2008) New antimicrobial agents as therapy for resistant gram positive cocci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 3–15
- Li, H., Zhu, J., Xiao, Y., Zhang, S., Sun, Y., Liu, Z., ... & Yi, J. (2023). Biodiversity of lactic acid bacteria in traditional fermented foods in yunnan province, china, and comparative genomics of *Lactobacillus plantarum*. *Fermentation*, 9(4), 402.
- Li, J., et al. (2014). "Biofilm formation and resistance of *Lactobacillus* species under different environmental stress conditions." *International Journal of Food Microbiology*, 174, 74-81.
- Li, W., Li, Y., Liu, Y., Shi, X., Jiang, M., Lin, Y., ... & Hu, Q. (2017). Clonal expansion of biofilm-forming *Salmonella* Typhimurium ST34 with multidrug-resistance

- phenotype in the Southern Coastal Region of China. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2090.
- Li, X., Gu, N., Huang, T. Y., Zhong, F., and Peng, G. (2023a). *Pseudomonas aeruginosa*: a typical biofilm forming pathogen and an emerging but underestimated pathogen in food processing. *Front. Microbiol.* 13:1114199. doi: 10.3389/fmicb.2022.1114199.
- Lin Y, Peterson M. (2010). New insights into the prevention of *staphylococcal* infections and toxic shock syndrome. *Experimental Review on Clinical Pharmacology*. 3:753-767.
- Liu, W.; Pang, H.; Zhang, H.; Cai, Y. Biodiversity of lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria*; Zhang, Y., Cai, Y., Eds.; Springer Science + Business Media: Dordrecht, The Netherlands, 2014.
- Logan, N.A. 1988. *Bacillus* species of medical and veterinary importance. *J. Med. Microbiol.* 25:157-165.
- Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ (2018) Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol* 16:19. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107>
- Low SX, Aw ZQ, Loo BZ, Lee KC, Oon JS, Lee CH, Ling MH. Viability of *Escherichia coli* ATCC 8739 in Nutrient Broth, Luria-Bertani Broth and Brain Heart Infusion over 11 Weeks. *Electron Physician*. 2013 Feb 1;5(1):576-81. doi: 10.14661/2013.576-581. PMID: 26120385; PMCID: PMC4477771
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., and Pier, G. B., "Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist", *Microbes And Infection*, 2 (9): 1051–1060 (2000).
- Macnab, R. M. (2004). "Type III flagellar synthesis and bacterial motility." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(1), 1-19.
- Meireles, D., Pombinho, R., Carvalho, F., Sousa, S., & Cabanes, D. (2020). *Listeria monocytogenes* wall teichoic acid glycosylation promotes surface anchoring of virulence factors.
- Melo, T.A., dos Santos, T.F., de Almeida, M.E. (2016). Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. *BMC Microbiol.*16: 250.
- Meng, F.; Zhao, M.; Lu, Z. The LuxS/AI-2 system regulates the probiotic activities of lactic acid bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* 2022, 127, 272–279.
- Mgomi, F. C., Yang, Y. R., Cheng, G., & Yang, Z. Q. (2023). Lactic acid bacteria biofilms and their antimicrobial potential against pathogenic microorganisms. *Biofilm*, 5, 100118.
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255.

- Mokoena, M.P.; Mutanda, T.; Olaniran, A.O. Perspectives on the probiotic potential of lactic acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages. *Food Nutr. Res.* 2016, 60. [CrossRef] [PubMed]
- Mollestad, H. H., et al. (2007). Characterization of probiotic properties of *Pediococcus pentosaceus* for its potential health benefits. *International Journal of Food Science & Technology*, 42(3), 234-242. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01537.x>
- Moradi, M., Kousheh, S. A., Almasi, H., Alizadeh, A., Guimarães, J. T., Yılmaz, N., & Lotfi, A. (2020). Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19(6), 3390-3415.
- Murray R. (2005). Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. *International Medical Journal*. 35; 106-119.
- Nocera, F. P., Ferrara, G., Scandura, E., Ambrosio, M., Fiorito, F., & De Martino, L. (2021). A Preliminary Study on Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus* spp. and *Enterococcus* spp. Grown on Mannitol Salt Agar in European Wild Boar (*Sus scrofa*) Hunted in Campania Region—Italy. *Animals*, 12(1), 85.
- Olaizola, P., Castellano, J., & Izquierdo, J. (2017). Lactic acid bacteria in food production and preservation: An update. *Journal of Food Protection*, 80(10), 1742-1752. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-086>
- Ouwehand, A. C., Forssten, S., Hibberd, A. A., Lyra, A., & Stahl, B. (2016). Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Annals of medicine*, 48(4), 246–255. <https://doi.org/10.3109/07853890.2016.1161232>
- Pal M, Kerosa G B, Marami L M, Kandi R. (2020). Epidemiology, pathogenesis, animal infections, antibiotic resistance, public health significance, and economic impact of *Staphylococcus aureus*: A comprehensive review. *American Journal of Public Health Research*. 8; 14-21.
- Pal, M., Mulu, S., Zenebe, N., Girmay, G., Savalia, C. V., & Gobu, B. (2017). *Listeria monocytogenes* as an emerging global food-borne zoonotic bacterial pathogen. *Beverage World Food*, 44, 29-32.
- Palleroni, N. J., "Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view", *Microbiology (Reading, England)*, 149 (Pt 1): 1–7 (2003).
- Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z (2018) Anti-biotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv* 37:177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Pannella, G., Lombardi, S. J., Coppola, F., Vergalito, F., Iorizzo, M., Succi, M., ... & Coppola, R. (2020). Effect of biofilm formation by *Lactobacillus plantarum* on the malolactic fermentation in model wine. *Foods*, 9(6), 797.
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 50, 512-542.

- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of applied microbiology*, 100(6), 1171-1185.
- Patel, K., Soni, S., & Puri, S. (2012). Lactic acid bacteria as biocontrol agents in food safety. *Food Research International*, 49(1), 27-33.
- Pérez-Ramos, A., Madi-Moussa, D., Coucheney, F., & Drider, D. (2021). *Current knowledge of the mode of action and immunity mechanisms of LAB-bacteriocins. Microorganisms* 9 (10): 2107.
- Pineiro, M.; Stanton, C. Probiotic bacteria: Legislative framework-requirements to evidence basis. *J. Nutr.* 2007, 137, 850S–853S. [PubMed]
- Qi, Y., Huang, L., Zeng, Y., Li, W., Zhou, D., Xie, J., ... & Yin, J. (2021). *Pediococcus pentosaceus*: screening and application as probiotics in food processing. *Frontiers in Microbiology*, 12, 762467.
- Quinto, E.J.; Jiménez, P.; Caro, I.; Tejero, J.; Mateo, J.; Gírbés, T. Probiotic lactic acid bacteria: A review. *Food Nutr. Sci.* 2014, 5, 1765–1775.
- Rani, S. A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R. A., Lewandowski, Z., Davison, W. M., ... & Stewart, P. S. (2007). Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *Journal of bacteriology*, 189(11), 4223-4233.
- Rather MA, Gupta K, Bardhan P, Borah M, Sarkar A, Eldiehy KS et al (2021) Microbial biofilm: a matter of grave concern for human health and food industry. *J Basic Microbiol* 61:380–395. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000678>
- Ray, R., & Singh, P. (2022). Prevalence and implications of shiga toxin-producing *E. coli* in farm and wild ruminants. *Pathogens*, 11(11), 1332
- Rezaei, Z., Khanzadi, S., & Salari, A. (2021). Biofilm formation and antagonistic activity of *Lactocaseibacillus rhamnosus* (PTCC1712) and *Lactiplantibacillus plantarum* (PTCC1745). *Amb Express*, 11, 1-7.
- Rho M, Schaffner D. (2007). Microbial risk assessment of *staphylococcal* food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*. 116; 332-338.
- Rocchetti, M. T., Russo, P., Capozzi, V., Drider, D., Spano, G., & Fiocco, D. (2021). Bioprospecting antimicrobials from *Lactiplantibacillus plantarum*: Key factors underlying its probiotic action. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 12076.
- Rodrigo-Torres, L., Yépez, A., Aznar, R., & Arahál, D. R. (2019). Genomic insights into five strains of *Lactobacillus plantarum* with biotechnological potential isolated from chicha, a traditional maize-based fermented beverage from Northwestern Argentina. *Frontiers in microbiology*, 10, 2232.
- Rogers, L., et al. "*Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae: occurrence and detection." *Encyclopedia of food and health*. Elsevier Inc., 2016. 545-551.
- Rossi, G., Pasquale, A., & Lee, H. (2019). The role of LAB in inhibiting bacterial biofilm formation. *Food Research International*, 114, 58-67.

- Ruiz, L., et al. (2015). Bioactive compounds from *Lactobacillus plantarum*: Antimicrobial activity and therapeutic potential. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(2), 100-110. <https://doi.org/10.1007/s12602-015-9225-x>
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., et al. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 7–15. doi: 10.3201/eid1701.P11101
- Schleifer, K. H., et al. (2003). "The genus *Lactobacillus*." *Lactobacillus: Medical and Clinical Applications*, 24, 133-146.
- Settani, L., Massitti, O., Van Sinderen, D., & Corsetti, A. (2005). In situ activity of a bacteriocin e producing *Lactococcus lactis* strain. Influence on the interactions between lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 670e681.
- Shan, C., Li, M., Liu, Z., Xu, R., Qiao, F., Du, Z. Y., & Zhang, M. L. (2021). *Pediococcus pentosaceus* Enhances Host Resistance Against Pathogen by Increasing IL-1 β Production: Understanding Probiotic Effectiveness and Administration Duration. *Frontiers in immunology*, 12, 766401. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.766401>
- Sharma BK, Saha A, Rahaman L, Bhattacharjee S, Tribedi P (2015) Silver inhibits the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv Appl Microbiol* 5:677–685. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.510070>
- Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S. D., Schwartz, S. A., Bruggemann, L., & Aalinkel, R. (2023). Microbial biofilm: a review on formation, infection, antibiotic resistance, control measures, and innovative treatment. *Microorganisms*, 11(6), 1614.
- Stefania D, Miranda P, Diana M, Claudia Z, Rita P, Donatella P (2017) Antibiofilm and antiadhesive activities of different synbiotics. *J Probiot Health* 5(3):182-191. doi: 10.4172/2329-8901.1000182.
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 199-210.
- Sun, Z., Zeng, Y., & Zhang, Y. (2019). Functional properties of *Lactobacillus plantarum* in food applications. *Food Research International*, 119, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.050>
- Swain, M. R., & Pandya, P. (2020). Microbiological properties and applications of *Lactobacillus plantarum* in the food industry. *Food Research International*, 106, 431-440. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.049>
- Syakila RN, Lim SM, Agatonovic-Kustrin S, Lim FT, Ramasamy K. In vitro assessment of *pediococci*- and *lactobacilli*-induced cholesterol-lowering effect using digitally enhanced high-performance thin-layer chromatography and confocal microscopy. *Anal Bioanal Chem* 2019;411:1181–92.
- Tatsaporn, T., & Kornkanok, K. (2020). Using potential lactic acid bacteria biofilms and their compounds to control biofilms of foodborne pathogens. *Biotechnology Reports*, 26, e00477.

- Todhanakasem, T., Triwattana, K., Pom, J., Havanapan, P. O., Koombhongse, P., & Thitisak, P. (2021). Physiological studies of the *Pediococcus pentosaceus* biofilm. *Letters in Applied Microbiology*, 72(2), 178-186.
- Todorov, S. D., & Russo, P. (2014). "Probiotic microorganisms in fermented foods and their role in the gut microbiota." *Journal of Functional Foods*, 6, 163-177.
- Tominaga, A., M. A. H. Mahmoud, T. Mukaiara, and M. Enomoto. 1994. Molecular characterization of intact but cryptic, flagellin genes in the genus *Shigella*. *Mol. Microbiol.* 12:277-285. [DOI] [PubMed] [Google Scholar].
- Valdramidis, V. P., & Koutsoumanis, K. P. (2016). Challenges and perspectives of advanced technologies in processing, distribution and storage for improving food safety. *Current Opinion in Food Science*, 12, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.08.008>.
- Van Zyl, W.F.; Deane, S.M.; Dicks, L.M.T. Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. *Gut Microbes* 2020, 12, 1831339. [CrossRef]
- Veerachamy, S.; Yarlagadda, T.; Manivasagam, G.; Yarlagadda, P.K. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review. *Proc. Inst. Mech. Eng. H* 2014, 228, 1083–1099. [CrossRef] [PubMed]
- Vinderola, G., et al. (2000). "Aggregation and biofilm formation in *Lactobacillus* species." *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 5110-5117.
- Vinderola, G., Ouwehand, A., Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.). (2019). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. Crc Press.
- Vugia DJ, Samuel M, Farley MM, Marcus R, Shiferaw B, Shallow S, Smith K, Angulo FJ, Group EIPFW (2004) Invasive Salmonella infections in the United States, FoodNet, 1996–1999: incidence, serotype distribution, and outcome. *Clin Infect Dis* 38:S149–S156
- Wang, A., Liu, H., Liu, D., & Jiang, H. (2012). Butyrate activates the cAMP-protein kinase A-cAMP response element-binding protein signaling pathway in Caco-2 cells. *The Journal of nutrition*, 142(1), 1-6.
- Wang, L., Wu, S., & Zhang, L. (2018). "Regulation of biofilm formation in Salmonella by the csgD gene." *Microbial Pathogenesis*, 118, 135-142.
- Wang, P., Chen, S., Liao, C., Jia, Y., Li, J., Shang, K., ... & Ding, K. (2022). Probiotic properties of chicken-derived highly adherent lactic acid bacteria and inhibition of enteropathogenic bacteria in Caco-2 cells. *Microorganisms*, 10(12), 2515.
- Wang, S., Li, L., Yu, L., Tian, F., Zhao, J., Zhai, Q., & Chen, W. (2024). Natural Aggregation of *Lactobacillus*: Mechanisms and Influencing Factors. *Food Bioscience*, 105007.
- Wang, X., & Yang, H. (2020). "Probiotic lactic acid bacteria as potential inhibitors of pathogenic bacteria: A review." *Food Science and Biotechnology*, 29(5), 739-749.
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the

- Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Werner, G. et al. (2008) Emergence and spread of vancomycin resistance among *enterococci* in Europe. *Euro Surveill.* 13 (47). Pii: 19046
- Xia, S., et al. (2017). Antimicrobial metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* and their role in food safety. *Food Control*, 77, 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.026>
- Yadav, S., & Gupta, P. (2018). "Inhibition of biofilm formation by lactic acid bacteria and their potential as biocontrol agents against foodborne pathogens." *Journal of Applied Microbiology*, 124(5), 1165-1174.
- Yan, M., Liu, S., & Zhang, L. (2018). Inhibition of biofilm formation in *Salmonella* by lactic acid bacteria: Mechanisms and implications. *Food Control*, 91, 191-198.
- Zare, D., Aryaee, H., Mirdamadi, S., & Shirkhan, F. (2024). The Benefits and Applications of *Lactobacillus plantarum* in Food and Health: A Narrative Review. *Iranian Journal of Public Health*, 53(10), 2201.
- Zhang, H., & Zhao, W. (2020). Exploring the use of *Lactobacillus plantarum* as a functional food microorganism. *Journal of Functional Foods*, 67, 103-115. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103643>
- Zhang, Z., Niu, H., Qu, Q., Guo, D., Wan, X., Yang, Q., ... & Liu, Z. (2024). Advancements in *Lactiplantibacillus plantarum*: probiotic characteristics, gene editing technologies and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-22.
- Zhao X, Zhao F, Wang J, Zhong N (2017) Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Adv* 7:36670–36683. <https://doi.org/10.1039/C7RA02497E>
- Zhao, H., Zhang, L., & Tian, J. (2018). Health benefits and applications of *Lactobacillus plantarum* in food systems and probiotics. *Food Research International*, 109, 559-567. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.041>
- Zhao, X., Zhang, Y., & Li, Y. (2021). "Lactic acid bacteria as a promising tool for controlling pathogenic bacteria in food systems." *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108844.
- Zhao, Z., & Liu, F. (2019). "Characterization of *adrA* and its role in biofilm formation in *Salmonella enterica*." *Frontiers in Microbiology*, 10, 852.
- Zhou, J., Yuan, Z., Yang, R., Liu, T., Lu, X., Huang, W., & Guo, L. (2024). Coaggregated *E. faecalis* with *F. nucleatum* regulated environmental stress responses and inflammatory effects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 1-21.