

## BAZI PROBİYOTİK LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN *Escherichia coli* 0157:H7 ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİ

*Inhibitory effect of Lactic Acid Bacteria on Escherichia coli 0157:H7*

Elçin TAŞ  
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Zerrin ERGİNKAYA  
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

### ÖZET

Bu çalışmada probiyotik özellikteki *Lactobacillus acidophilus* LAB108, *Lactobacillus rhamnosus* LAB101, *Lactobacillus casei* Shirota LAB107 suşlarının *E. coli* 0157:H7 B51 üzerine inhibisyon etkileri araştırılmıştır. İnhibisyon etkinin belirlenmesi için agar kuyu difüzyon ve "Canlı Hücre Sayımı" yöntemleri kullanılmıştır. Test edilen tüm probiyotik laktik asit bakterileri *E.coli* 0157:H7 üzerine inhibisyon etki göstermiştir. En etkili laktik asit bakteri suşu *Lactobacillus acidophilus* LAB108 ve *Lactobacillus rhamnosus* LAB101 olarak belirlenmiş, *Lactobacillus casei* Shirota LAB107 ise zayıf etkili olmuştur. Sıvı besiyerinde (*E.coli* 0157:H7 ve probiyotik laktik asit bakteri süpernatantları ilave edilmiş) *E.coli* 0157:H7 canlı hücre sayısında 24 saatlik inkübasyon sonunda azalma görülürken, kontrolde hücre sayısında herhangi bir azalma gözlenmemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Laktik Asit Bakterileri, *E.coli* O157:H7, İnhibitör etki

\*Yüksek Lisans Tezi-MSc. Thesis

### ABSTRACT

In this study inhibition effects of some lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus* LAB108, *Lactobacillus casei* Shirota LAB107, *Lactobacillus rhamnosus* LAB101) which possessed with probiotic characteristics, on *Escherichia coli* 0157:H7 B51 was investigated. For detection of antibacterial activity, well diffusion assay test and viable cell count assay were used. All of the lactic acid bacteria isolates exhibited antibacterial activity against *E.coli* 0157:H7 B51. The most effective lactic acid bacteria were found *L. acidophilus* LAB108, *Lactobacillus rhamnosus* LAB101 and *Lactobacillus casei* Shirota LAB107 respectively. In broth system (*E.coli* 0157:H7 B51 and supernatants of lactic acid bacteria), pathogen microorganism was killed after 24h incubation, whereas there was no decrease in cell number in control.

**Key Words:** Lactic acid bacteria, *E.coli* O157:H7, Inhibition effect

### Giriş

Mikroorganizmaların neden olduğu gıda kaynaklı hastalıklar büyük önem taşımakta ve gıda güvenliği açısından problem oluşturmaya devam etmektedir. Gıda kaynaklı hastalıkların son 10-20 yıldır artan bir şekilde devam ettiği görülmektedir (Anonym., 2006).

---

\*Yüksek Lisans Tezi-MSc. Thesis

*Escherichia coli* 0157:H7 son yıllarda en tehlikeli gıda patojenleri arasında yer almaktadır. *Escherichia coli* 0157:H7 'nin önemli bir gıda kaynaklı patojen bakteri olarak tanımlanması ilk kez 1982 yılında Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada' da aynı zincire bağlı fast food restoranlarında yeterince pişirilmemiş hamburgerlerin yenmesi sonucu ortaya çıkan iki ishal salgını sonunda gerçekleşmiştir (Öz ve ark., 2002). Dünya çapındaki infeksiyonların çok büyük bir bölümü başta yetersiz pişirilmiş et ve pastörize edilmemiş süt olmak üzere sığır kıyması, beefburger, roastbeef, sandviç, çiğ süt, yoğurt, çiğ süttten üretilen peynir, mayonez, elma suyu gibi gıda maddelerinden kaynaklanmıştır (Halkman ve ark., 2001). Patojenlerin inhibisyonunda kullanılan ısı işlem uygulaması, katkı maddelerinin kullanımı gibi klasik yöntemlerin yanı sıra doğal besin maddelerine dönüşün hızla yaygınlaştığı günümüzde biyolojik dayandırma yönteminin önemi her geçen gün artmaktadır. Bu amaçla kullanılan biyokoruyucular arasında probiotik özellikteki laktik asit bakterileri ve ürettiği metabolitleri de kullanım alanı bulmaktadır.

Laktik asit bakterileri gıdanın bozulmasına neden olan mikroorganizmalar ve insanlarda hastalıklara neden olan patojen mikroorganizmalar üzerinde ürettikleri organik asitler, hidrojen peroksit, laktoperoksidaz, diasetil ve bakteriyosinler gibi maddeler nedeniyle antagonistik etkiye sahiptir. Bu nedenle, bu mikroorganizmaların kullanılarak üretildiği gıdalar insan sağlığı açısından güvenilir gıdalar olarak kabul edilmektedirler (Vescova ve ark., 1997; Hayaloğlu ve Erginkaya, 2001).

Yapılacak olan bu çalışmada probiotik özelliğe sahip bazı laktik asit bakterilerinin (*Lactobacillus acidophilus* LAB108, *Lactobacillus rhamnosus* LAB101, *Lactobacillus casei* Shirota LAB107) gıda patojeni olarak bilinen *Escherichia coli* 0157:H7 B51 üzerine inhibisyon etkileri araştırılarak, gıda güvenliği açısından değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

## **Materyal ve Metot**

### **Materyal**

#### **Bakteri Kültürleri**

Araştırmada patojen bakteri kültürü *E. coli* 0157:H7 B51 ve laktik asit bakteri kültürleri olarak *Lactobacillus acidophilus* LAB108, *Lactobacillus casei* Shirota LAB107, *Lactobacillus rhamnosus* LAB101 Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir.

#### **LAB Süpernatantlarının Hazırlanması**

MRS Broth' ta çoğaltılan laktik asit kültürleri 5000devir/d 10 dakika santrüfjü edilerek elde edilen süpernatant 0.22µm'lik membran filtrede süzölmüştür (Nieto-Lozano ve ark., 2002).

### **Metot**

#### **Agar Kuyu Difüzyon Yöntemi**

Agar Kuyu Difüzyon yöntemi ile LAB süpernatantın inhibisyon etkilerinin belirlenmesinde; patojen bakteri süspansiyonundan bir petriye 1ml dökme ekim yöntemiyle ekim yapılarak, daha sonra katılaştıran besiyerinin belirli yerlerinde 3mm

çapında kuyucuklar açılmıştır, bu kuyucuklara 100µl süpernatant ilave edilerek zon oluşumu değerlendirilmiştir( Bonade ve ark., 2001).

### Sıvı Besiyerinde İnhibisyon Etkinin Belirlenmesi

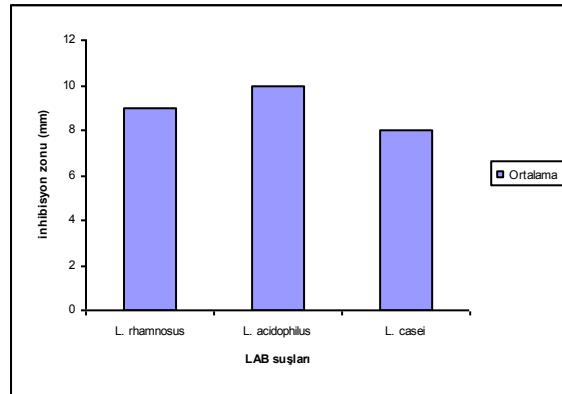
İn vitro ortamda yaklaşık olarak  $10^7$  hücre/ml patojen bakteri 9ml BHI Broth'a ekilerek 1ml laktik asit bakteri süpernatantı ilave edilmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyon süresi sonunda peptonlu suda uygun dilisyon yapılarak yayma ekim yapılmıştır. 37°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra koloni sayımı gerçekleştirilmiştir (Modified Nieto-Lozano ve ark, 2002).

### Araştırma Bulguları ve Tartışma

Laktik asit bakterilerinin *E. coli* O157:H7 üzerine antibakteriyel etkilerini belirlemek için kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan tüm laktik asit bakteri suşları *E.coli* O157:H7 üzerine antibakteriyel etki göstermiştir. *Escherichia coli* O157:H7 B51 üzerine laktik asit bakterilerden en fazla inhibisyon etkiyi *L. acidophilus* LAB108, en zayıf inhibisyon etkiyi ise *L. casei* Shirota LAB107 göstermiştir (Çizelge 1, Şekil 1).

Çizelge 1. Laktik asit bakterileri süpernatantının *E. coli* O157:H7 B51 üzerine inhibisyon etkisi

	Zon çapı (mm)			Ortalama
	I. Deneme	II. Deneme	III. Deneme	
<i>L. rhamnosus</i> LAB101	9	9	9	9
<i>L. acidophilus</i> LAB108	11	9	10	10
<i>L. casei</i> Shirota LAB107	9	8	8	8,3



Şekil 1: *E.coli* O157:H7 inhibisyon zonları (mm)

Probiyotik laktik asit bakterilerinin sıvı besiyerinde *E. coli* O157:H7 üzerine inhibisyon etkisine bakıldığında, kontrollerde patojen bakteri sayısının arttığı gözlenirken laktik asit bakteri süpernatantlarının ilave edildiği örneklerde azalma belirlenmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Sıvı besiyerinde laktik asit bakterileri süpernatantının *E. coli* O157:H7 B51 üzerine inhibisyon etkisi

	<i>E. coli</i> O157:H7 B51		
	Başlangıç (kob/mL)	24. saat (Kontrol)	24. Saat (kob/mL)
<i>L. rhamnosus</i> LAB101	$2,3 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$1,4 \times 10^8$
<i>L. acidophilus</i> LAB108	$2,7 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
<i>L. casei</i> Shirota LAB107	$2,2 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$	$9,0 \times 10^7$

LAB suşlarının gösterdiği antibakteriyel etki bir çok faktöre bağlı olabilir. Bu faktörler; pH' nın azalması, substrat rekabeti, bakteriyosinler gibi üretilen metabolik maddeler olabilir.

Kullanılan tüm laktik asit bakteri suşları *E. coli* O157:H7 üzerine antibakteriyel etki göstermiştir. *L. rhamnosus* ve *L. casei* 'nin *E. coli* üzerine inhibisyon etkisinin belirlendiği çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Sameshima ve ark., 1998; Çon ve Gökalp, 2000; Chuayana ve ark., 2003). İbrahim ve ark., (2003), *Bifidobacterium longum* NCFB 2259'un *E. coli* O157:H7 üzerine güçlü inhibitör etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Antibakteriyel etkiye sahip olduklarını bilinen probiyotiklerin bu etkileri asetik asit ve laktik asit üretimine bağlı olarak pH' nın azalmasından (Bezkorovainy, A., 2001), laktik asit bakterilerinin ürettiği hidrojen peroksit ve bakteriyosin gibi metabolitlerden kaynaklanmış olabilir (Wolfson, D., 1999).

### Sonuç ve Öneriler

Yapılan bu çalışma ile probiyotik özelliğe sahip LAB kültürlerinin gıdalarda oldukça sık karşılaşılan *E. coli* O157:H7 üzerine inhibisyon etkileri in vitro olarak belirlenmiştir. Araştırmanın genişletilerek gıdalarda patojen olarak bilinen diğer Gr (+) ve Gr (-) bakterilerle de tekrarlanması, gıdalarda sorun yaratan funguslar ve mayalar üzerinde de denenerek inhibisyon etki gösterip göstermediğinin araştırılması gerekmektedir. İnhibisyon etkiye sahip probiyotik laktik asit bakterilerinin et ve et ürünlerinde kullanım olanakları ileriki çalışmalarda araştırılmalıdır.

### Kaynaklar

- ANONYMOUS, 2006a., <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/051nihatakin>
- BEZKOROVAINY, A., 2001. Probiotics: Determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin. Nutr.*,73,399-405.
- BONADE, A., MURELLI, F., VESCOVO, M., SCOLARI, G., 2001. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. *Letters in Applied Microbiol.*, 33, 153-158.
- CHUAYANA JR., E.L., PONCE, C.V., RIVERA, M.R.B., CABRERA, E.C., 2003. Antimicrobial activity of probiotics from milk products. *Phil. J. Microbiol. Dis.*, 32(2); 71-74.
- ÇON, A.H., GÖKALP, H.Y., 2000. Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples. *Meat Science*, 55, 89-96.
- HALKMAN, A.K., NOVİR, M.R., DOĞAN H.B., 2001. *Escherichia coli* 0157:H7 serotipi. Sim Matbaacılık Ltd. Şti., ANKARA
- HAYALOĞLU, A.A., ERGİNKAYA, Z., 2001. Gıda endüstrisinde kullanılan laktik asit bakterileri. Gıda Teknolojileri Derneği Yayın No:23
- IBRAHİM, S.A., DHARMAVARAM, S.R., SEO, C.W., SHAHBAZI, G., 2003. Antimicrobial activity of *Bifidobacterium longum* (NCFB 2259) as influenced by spices. *Internet J. Food Safety*. 2, 6-8.
- NIETO-LOZANO, J.C., RAGUERA-USEROS, J.I., PELAEZ-MARTINEZ, M.C., DE LA TORRE, A.H., 2002. Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. *Meat Science*, 62, 237-243
- ÖZ, F., KAYA, M., AKSU, M.İ., 2002. Sucuk üretiminde farklı nitrit dozlarının ve starter kültür kullanımının *Escherichia coli* 0157:H7 'nin gelişimi üzerine etkisi. *Türk J Vet. Anim. Sci.*, 26, 651-657.
- SAMESHIMA, T., MAGOME, C., TAKESHITA, K., ARIHARA, K., ITOH, M., KONDO, Y., 1998. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausages. *Int. Journal of Food Microbiol.*, 41,1-7
- VESCOVO, M., TORRIANI, S., ORSI, C., MACCHIAROLO, F., SCOLARI, G., 1997. Application of antimicrobial-producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 113-119.
- WOLFSON, D.,1999. A probiotics primer. *Nutrition Science News*. At [http://www.healthwellexchange.com/nutritionsciencenews/nsn\\_backs/](http://www.healthwellexchange.com/nutritionsciencenews/nsn_backs/) Jun 99/nat remedies.cfm

### Teşekkür

Bu çalışma ZF2007YL33 nolu BAP tarafından desteklenmiştir. Ayrıca *E.coli* 0157:H7 temin edilmesinde yardımcı olan Erzurum Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Prof. Dr. Mukerrem Kaya'ya teşekkür ederiz.