



Evaluation of the Antimicrobial Effect of Kefiran Extract against Some Plant Pathogenic Bacteria

Bilgin Taşkın^{1,a,*}

¹Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Van Yüzüncü Yıl University, 65080 Van, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 08/11/2019 Accepted : 24/01/2020</p> <p>Keywords: Kefir Kefiran Plant Pathogenic Bacteria Antibacterial Effect Natural Extract</p>	<p>Kefir; is a fermented milk product which is produced by granules containing a wide variety of microorganisms such as lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeasts. It is traditionally consumed in many countries. It has been shown in many studies that the polysaccharide structure surrounding the granules which is composed mainly of kefiran molecule has antimicrobial effect against various pathogens as well as many health promoting effects. In this study, 24 h fermented kefir was used with two types of kefir granules for production of kefiran extract. One of them is being sold commercially and the other was collected from private households in a different region of Turkey. Kefiran extraction was carried out from matured kefir granules using three different temperatures, 80°C, 90°C and 100°C. Also, the protein contents of the extracted solutions were determined by Bradford method. Protein content of the extract solutions obtained were measured as 0.001 g/ml. The antibacterial effect of 0.05, 0.1, 1 and 2 mg of this extract against several plant pathogenic bacterial strains belonging to genus <i>Pseudomonas</i>, <i>Xanthomonas</i>, <i>Erwinia</i> ve <i>Clavibacter</i> was investigated <i>in vitro</i> for the first time. For this purpose, two methods, disc diffusion method and spreading method were used. The AN and SD kefir supernatants used as the positive controls in the experiments showed an average of 13-17 mm and 10-14 mm inhibition zones on the isolates, respectively, but the antibacterial effect of kefiran extracts was not observed.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(4): 889-894, 2020

Kefiran Ekstraktının Bazı Bitki Patojeni Bakterilerine Karşı Antimikrobiyal Etkisinin Değerlendirilmesi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 08/11/2019 Kabul : 24/01/2020</p> <p>Anahtar Kelimeler: Kefir Kefiran Bitki Patojeni Bakterileri Antibakteriyel Etki Doğal Ekstrakt</p>	<p>Kefir; laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri ve mayalar gibi çok çeşitli mikroorganizmaları barındıran granüller tarafından üretilen, pek çok ülkede geleneksel olarak tüketilen fermente bir süt içeceği. Granülleri çevreleyen ve ağırlıklı olarak kefiran molekülünden oluşan polisakkarit yapının sağlığı teşvik edici birçok etkisinin yanında çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada, biri ticari olarak satılan, diğeri yerel bir satıcıdan temin edilen granüller kullanılarak 24 saatlik fermantasyonla kefir üretimi yapılmıştır. Olgunlaşan kefir tanelerinden kefiran ekstraktı eldesi ve saflaştırılması etanol presipitasyon yöntemi ile 80°C, 90°C ve 100°C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Ayrıca elde edilen ekstrakt solüsyonlarının protein içerikleri Bradford yöntemiyle ile belirlenmiştir. Denemelerde kullanılan ekstrakt solüsyonlarının protein içeriği 0,001 g/mL olarak ölçülmüştür. Oluşturulan stok solüsyonlarından, 0,05, 0,1, 1 ve 2 mg ekstrakt içeren uygulamaların <i>Pseudomonas</i>, <i>Xanthomonas</i>, <i>Erwinia</i> ve <i>Clavibacter</i> cinslerine ait bazı bitki patojeni bakterilere karşı antibakteriyel etkisi <i>in vitro</i> koşullarda ilk defa incelenmiştir. Bu amaçla disk difüzyon metodu ve yayma yöntemi olmak üzere iki metot kullanılmıştır. Denemelerde pozitif kontrol olarak kullanılan AN kefir süpernatantı izolatlar üzerinde ortalama 13-17 mm inhibisyon zonu gösterirken, SD süpernatantı 10-14 mm zon üretmiş ancak kefiran ekstraktlarının antibakteriyel etkisi gözlemlenmemiştir.</p>

^a bilgintaskin@yyu.edu.tr

^{id} <https://orcid.org/0000-0002-9772-7438>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

Giriş

Bakteriler bitkilerde, genellikle aşırı büyüme, solgunluk, yaprak lekeleri ve yanıkları, çürükler, kabuk ve kanserler gibi morfolojik semptomlarla karakterize olan hastalıklara neden olur. Genel olarak, en yaygın ve yıkıcı bitki patojenik bakterileri, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Xylella*, ve *Phytoplasma* cinslerine aittir (Bull ve ark., 2010). Bitkilerde bakteri kaynaklı hastalıklar küresel ölçekte büyük finansal sorunlara neden olmaktadır (Agrios, 2005).

Bitki bakteri hastalıklarını kontrol etmek için birçok yaklaşım vardır, ancak en yaygın kullanılanı kimyasal kontroldür (Kannan ve Bastas, 2015). Bakteriye hastalıkların kimyasal yönetimi büyük ölçüde bakır bileşikleri ve antibiyotiklerin kullanımı ile gerçekleştirilmektedir (Sundin ve ark., 2016). Bununla birlikte, bu bileşiklerin yoğun kullanımı sonucunda, bakteriler, mutasyon, direnç geni ya da genlerinin edinilmesi yoluyla bu bileşiklere karşı direnç geliştirmeye başlamışlardır (Förster ve ark., 2015; Sundin ve Wang, 2018). Ayrıca, antibiyotik kullanımı, insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri ve antibiyotik direncinin klinik patojenlere aktarılması nedeniyle dünyanın birçok ülkesinde ve Avrupa Birliği'nde yasaklanmıştır (Sundin ve ark., 2016; Sundin ve Wang, 2018).

Kefir, temel olarak laktik asit bakterileri (*Lactobacillus*, *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Acetobacter* spp. and *Streptococcus* spp.) ve maya (*Kluyveromyces* spp., *Torula* spp., *Candida* spp. and *Saccharomyces* spp.) içeren fermente bir süt ürünüdür. Kefir tanelerinin mikrobiyal çeşitliliği; tanelerin orijini, kefir tanesinde bulunan mikroorganizmaların düzeyi, fermentasyonda uygulanan inkübasyon sıcaklığı, süresi ve kefir tanelerinin muhafaza süresi gibi birçok faktörden etkilenmektedir. (Güzel-Seydim ve ark., 2005; Güzel-Seydim ve ark., 2011). Kefirin antitümör, antikolestrol, antifungal ve antibakteriyel gibi pek çok fonksiyonel özelliği çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (Liu ve ark., 2006; Liu ve ark., 2005; Guzel-Seydim ve ark., 2006). Kefir taneleri polisakkarit bir yapı olan ve ağırlıklı olarak *Lactobacillus kefiranofaciens* tarafından üretilen bir polisakkarit olan kefiran ile çevrelenmektedir. Kefiran ise zincir boyunca kendini tekrar eden, eşit sayıda glikoz ve galaktoz basit şekerlerinden oluşan bir heksasakkarittir (Furuno ve Nakanishi, 2012). Kuru kefir tane ağırlığının yarısından fazlası kefiran'dan oluşmaktadır (Garrote ve ark., 2001; Moradi ve Kalanpour, 2019).

Kefiran bileşiğinin çeşitli fonksiyonel özellikleri pek çok bilimsel çalışma ile belirlenmiştir. Shiomi ve ark. (1982) kefir tanelerinden izole ettikleri, suda çözünebilir bir polisakkaritin Ehrlich karsinoma ve sarcoma tümörlerinin büyümesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bir diğer çalışmada, hücre kültürü ortamında kefiran varlığında *Bacillus cereus* bakterisinin salgıladığı hücre dışı faktörlerin insan kırmızı kan hücrelerine bağlanarak zarar vermesinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Medrano ve ark., 2008). Kefiranın yüksek kolesterolü diyet uygulanan tavşanlarda damar tıkanıklığını azalttığı gözlemlenmiştir (Uchida ve ark., 2010).

Son yıllarda fonksiyonel özelliklerinin dışında, kefiran'ın ortaya konmuş olan özelliklerinden dolayı farklı alanlarda

çok çeşitli uygulamaları da bildirilmiştir (Moradi ve Kalanpour, 2019). Örneğin gıda uygulamalarında, sahip olduğu doku ve jelleşme özelliklerinden dolayı, kefiranın, biyolojik olarak parçalanabilen bir gıda paketlenme malzemesi olarak, biyopolimer filmlerin hazırlanmasında kullanılabileceğine yönelik bulgular mevcuttur (Motedayen ve ark., 2013). Ayrıca sahip olduğu gözenekli yapısı nedeniyle iyi hücre penetrasyonu ve hücre yayılmasına olanak sağlayabildiğinden, doku mühendisliğinde uygun yapı iskeletleri olarak kefiran kullanımı önerilmiştir (Montesanto ve ark., 2016). Literatürde benzeri çalışmaların sayısını arttırmak mümkündür.

Kefir tanelerinden elde edilmiş kefiran polisakkariti ekstraktının çeşitli insan patojen bakteri türleri üzerine antimikrobiyal aktivitesinin ortaya konduğu çalışmalar daha sınırlı olmasına rağmen mevcuttur (Rodrigues ve ark., 2005). Ancak yapmış olduğumuz literatür taramalarında kefiran ekstraktının bitki patojeni bakterilere karşı herhangi bir uygulamasına rastlanmamıştır. Farklı olarak gerçekleştirdiğimiz bir başka çalışmada, granüllerden bağımsız, sadece kefir sütünden elde ettiğimiz beş farklı süpernatant ürününün, çeşitli bitki patojeni bakterilere karşı *in vitro* ve *in vivo* antibakteriyel etkileri ilk defa ortaya konmuştu. Çalışmada süpernatantlar hemen hemen tüm izolatlarda *in vitro* koşullarda antibakteriyel etki göstermiş fakat aynı etkiyi *in vivo* koşullarda gösterememişti. Buna karşılık bitki gelişim parametrelerinde artışa sebep olmuştu (Taşkın ve Akköprü, 2020). Bu çalışmada ise, farklı ekstraksiyon sıcaklıkları kullanılarak elde edilen, granüllerin çeperini oluşturan ve ağırlıklı olarak kefiran molekülünü içeren polisakkarit ekstraktının bitki patojeni bakterilere karşı antibakteriyel etkisinin *in vitro* koşullarda incelenmesi hedeflenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Bitki Patojeni Bakteri İzolatları

Çalışma kapsamında kullanılan bakteriler Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bakterioloji laboratuvarı stoklarından temin edilmiştir. Bitki patojenleri; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss), *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymarum* (Psl), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap), *Xanthomonas euvesicatoria* (Xe), *Erwinia amylovora* (Ea), *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (Cmm) bu çalışmada test izolatları olarak kullanılmışlardır. Tüm suşlar, Nutrient Broth (NB) sıvı besiyerinde (Difco, Detroit, MI, ABD) veya NB agar petrilerinde 25°C'de büyütülmüştür.

Kefiran eldesi ve saflaştırılması

Çalışmada, biri Türkiye'nin iç Anadolu bölgesinden (AN), yerel satıcılardan, diğeri ise ticari olarak satılan (SD) kefir kültürleri temin edilerek kefir üretimi gerçekleştirilmiştir. Kefiran eldesi deneylerine başlamadan önce, 15 gün süreyle pastörize, yarım yağlı UHT süt kullanılarak 10-15 gün 25°C de fermente edilerek granüller olgunlaştırılmıştır. Bu süreçte 24 saat aralıklarla granüller steril suyla yıkanarak yeni süt ortamına aktarılmıştır. Kefiran ekstraktı eldesi için, olgunlaşmış canlı kefir taneleri, %10 w/v oranında, pastörize, yarım yağlı süt içine

inoküle edilerek, 24 saat süreyle 25°C'de fermantasyonları gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon işleminin sonunda, granüller ve süt steril plastik filtre (2 mm gözenek boyutu) kullanılarak birbirinden ayrılmıştır. Daha sonra granüller kullanılarak bir sonraki aşama olan kefiran ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Kefiran ekstraksiyonu Micheli ve ark. (1999)'nın bildirmiş olduğu yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, öncesinde tartılarak ağırlığı belirlenmiş olan kefir granüllerinin, üzerlerine 1:10 oranında distile su eklenerek, 1 saat boyunca 100°C de ara ara karıştırılarak çözünmesi sağlanmıştır (Şekil 1a & 1b). Karışım soğumaya bırakılarak, sonrasında 16.000 g hızında 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant temiz bir tüpe alındıktan sonra kalan pelet ile aynı işlem bir kez daha tekrarlanmıştır. Süpernatant içinde çözünmüş olarak bulunan polisakkaritin, süpernatant üzerine aynı hacimde soğuk etanol eklenerek 4°C de gece boyunca çökmesi sağlanmıştır (Şekil 2a ve 2b). Oluşan çökeltiye yaklaşık 1:10 oranında sıcak su eklenerek ve 60-70°C de 1 saat boyunca karıştırılarak tekrar çözünmesi sağlanmıştır. Sonrasında soğuk etanol kullanılarak yapılan çöktürme prosedürü yukarıda anlatıldığı gibi iki kere daha tekrarlanarak ürün saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. En son aşamada oluşan çökelti 50-100 ml distile su içinde çözdürülmüştür. Bu metot, ilk aşamadaki kaynatma sıcaklığı 90°C ve 80°C olacak şekilde değiştirilerek iki farklı sıcaklıkta daha tekrarlanmıştır. Distile su içerisinde çözdürülmüş olan ekstraktlar daha sonra liyofilizatör (ALPHA 2-4 LD plus, Martin Christ, Osterode am Harz, Germany) yardımı ile liyofilize edilmiştir (Şekil 2c). Antibakteriyel aktivite ölçümleri için liyofilize ürünler kullanılarak 10, 20, 50 ve 100 mg/mL derişimlerinde stok solüsyonları hazırlanmıştır.

Protein Tayini

Elde edilen ekstraktın protein derişimi Bradford yöntemiyle tayin edilmiştir (Bradford 1976). Her ölçümde eş zamanlı olarak hazırlanan kalibrasyon grafikleri protein miktarının hesaplanmasında kullanılmıştır. Protein kalibrasyon grafikleri için, Bovine Serum Albumin (BSA) standart olarak kullanılmıştır. Kısaca; protein miktarları belirli konsantrasyonlarda Bovine Serum Albumin (BSA) ile hazırlanmış kalibrasyon grafikleri kullanılarak belirlenmiştir.

Antibakteriyel Aktivitenin Ölçülmesi

Bakteri stok kültürleri NB sıvı besiyerinde 25°C de orbital çalkalamalı inkübatörde 24-48 saat boyunca büyütülmüşlerdir. Bu sürenin sonunda kültür içindeki bakteri hücre sayısı spektrofotometrik yöntem ile 10^6 cfu/mL yoğunluğa ayarlanmıştır. Kefiran ekstraktının antibakteriyel etkisi iki yöntemle sınanmıştır. İlk olarak, Klinik Laboratuvar Standartları'na göre yürütülen disk difüzyon metodudur (NCCLS 2002). Bu amaçla, Steril olan kâğıt disklerine (5 mm), yukarıda belirtilen derişimlerde hazırlanmış kefiran ekstraktı stoklarından, 0,05, 0,1, 1 ve 2 mg ekstrakt içerecek şekilde 20 µL emdirilmiştir. Daha sonra bu kâğıt diskler, öncesinde 100 µL bakteri süspansiyonları yayılarak inoküle edilmiş 20 ml NB Agar içeren petrilere birbirine eşit mesafede yerleştirilmiştir. Petrilere 25°C de 48 saat inkübe edildikten

sonra inhibisyon çapları için incelenmişlerdir (Şekil 3). Ayrıca çalışmada kullanılan AN ve SD kefirlerinin süpernatantları kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bu amaçla 48 saat fermente edilerek elde edilmiş ve 0,45 µm gözenek boyutuna sahip şırınga filtresi (Millipore Co., ABD) kullanılarak steril edilen kefir süpernatantından disklere 20 µL emdirilmiştir (Taşkın ve Akköprü, 2020). Tüm deneyler dokuz tekrarlı olarak yapılmıştır. Disklerin etrafındaki, koloni büyümesinin olmadığı, açık bölgenin varlığı inhibisyon olarak kabul edilmiştir.

İkinci test metodunda kefiran ekstraktının antibakteriyel etkisi yayma yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bu yöntemde göre, yukarıda belirtilen final derişimleri elde etmek için belirli miktarda kefiran ekstraktı, 50°C ye kadar soğutulmuş, henüz katılaşmamış NB agar besiyerine doğrudan karıştırılarak petri kaplarına dökülmüştür. Sonrasında 10^2 - 10^3 cfu/mL yoğunluğundaki 100 µL bakteri süspansiyonu petrilere yayılarak ekilmiştir. Petrilere 25°C de 48 saat inkübe edilmiş ve aynı sayıda bakteri inokülasyonu yapılmış, ekstrakt içermeyen kontrol grupları ile karşılaştırılmışlardır. Bu testler, her bir bakteri suşu ve ekstrakt konsantrasyonu için üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

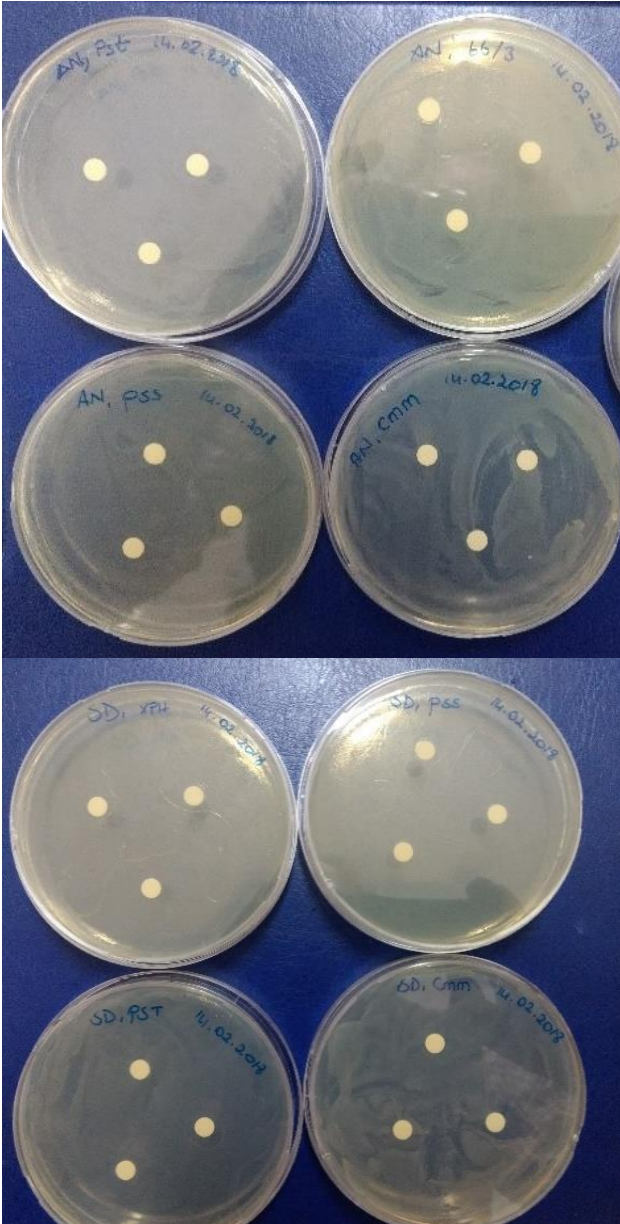


Şekil 1. 25°C de, yarım yağlı UHT süt kullanılarak fermentasyonu yapılarak üretilen kefir granülleri (a). Distile su eklenerek, 1 saat boyunca ara ara karıştırılarak kaynatılan, parçalanmış kefir granülleri (b).

Figure 1. Kefir granules produced by fermentation using half-fat UHT milk at 25°C (a). Decomposed kefir granules boiled under stirring for 1 hour by adding distilled water (b).



Şekil 2. Santrifüj sonucunda elde edilen süpernatant içinde, çözünmüş olarak bulunan toplam polisakkaritin, süpernatant üzerine aynı hacimde soğuk etanol eklenerek çöktürülmesi (a). Eşit hacimde etanol eklenerek ve 4°C de gece boyunca inkübe edilerek çöken kefiran ekstraktı (b). Steril distile su içerisinde çözünmüş ve liyofilizasyonu tamamlanmış ekstrakt (c).
Figure 2. Precipitation of total dissolved polysaccharide in the supernatant obtained by centrifugation by adding the same volume of cold ethanol on the supernatant (a). The kefiran extract precipitated by adding an equal volume of ethanol and incubating overnight at 4°C, (b) Lyophilized extract which was dissolved in sterile distilled water in previous step (c).



Şekil 3. AN (sol) ve SD (sağ) kefir granüllerinden elde edilmiş 2 mg ekstrakt içeren çözeltinin bazı bitki patojeni bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkisinin disk difüzyon yöntemi ile incelenmesini gösteren örnek petri fotoğrafları.

Figure 3. A few sample plate photos investigating the antibacterial effect of 2 mg of the extracts obtained from AN (left) and SD (right) kefir granules by disc diffusion method on some plant pathogenic bacteria

Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada, iki farklı kefir granülünden, soğuk etanol çöktürmesi yoluyla elde ettiğimiz ekstraktın, yedi bitki patojeni bakteri izolatu üzerindeki antimikrobiyal etkileri *in vitro* koşullarda araştırılmıştır. Kefiran ekstraktı eldesin de takip ettiğimiz yöntem, Micheli ve ark. (1999), Rodrigues ve ark. (2005), Piermaria ve ark. (2009) gibi pek çok çalışmada da kullanılmış ve denenmiş bir yöntem olmasına rağmen, protokolda bazı modifikasyonlar ile yöntem ayrıca geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu modifikasyonlardan bir tanesi, kullandığımız yöntemin ilk aşaması olan, kefir granüllerinin distile su içinde 1 saat boyunca ara ara karıştırılarak kaynatılması yerine, 90°C'de ve 80°C'de aynı süre zarfında karıştırılmasıdır. Böylece, su içerisinde

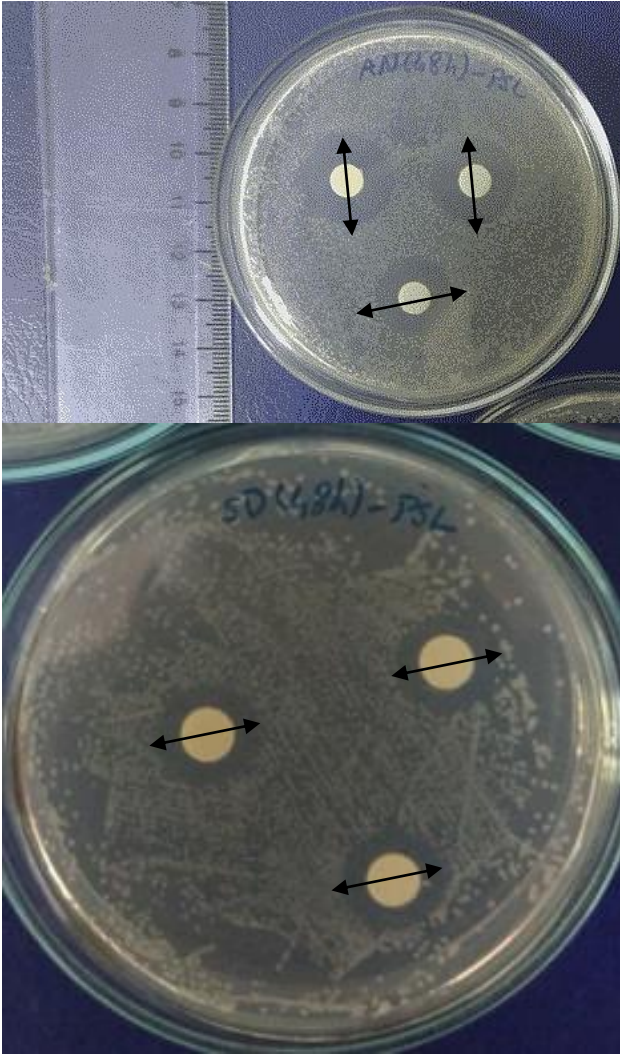
çözünme aşamasında, yüksek sıcaklığın granül çeperlerindeki kefiran polisakkaritinin moleküler yapısına zarar verme ihtimalini düşürmek amaçlanmıştır. Ancak, 80°C, 90°C ve kaynama sıcaklıklarında gerçekleştirilmiş 3 farklı ekstraksiyon protokülü ile elde edilmiş ekstraktın, farklı konsantrasyonları da bakteriler üzerinde inhibisyon etkisi gösterememiştir. Ayrıca suda çözülmüş olarak bulunan polisakkaritin çökme aşamasını daha etkili kılabilmek için, soğuk etanol eklendikten sonra inkübasyon, gece boyunca 4°C den farklı olarak -20°C'de de denenmiştir. Ancak bu modifikasyonun da etkisi gözlemlenmemiştir. Ekstraktın protein içeriği Bradford yöntemi ile ortaya konmuştur. Yapılan testler stok solüsyonlarımızın 0,001 g/mL den fazla protein içermediğini göstermiştir. Bu değer Piermaria ve ark. (2009)'nın bulmuş olduğu 0,0001 g/mL değerinden fazla fakat Pop ve ark. (2016)'nın belirttiği 0,0056 g/mL miktarından düşüktür. Bu değer uygulanan yöntemin granül çeperlerindeki proteini uzaklaştırmada oldukça başarılı olduğunu göstermektedir.

Kefir granüllerini çevreleyen, ağırlıklı olarak kefirandan oluşan ekzopolisakkarit yapının antimikrobiyal özelliklerini ortaya koyan çalışmalar literatürde bildirilmiştir. Örneğin Rodrigues ve ark. (2005), kefir tanelerinden soğuk etanol çöktürmesi yoluyla elde ettikleri kefiran ekstraktının çeşitli insan patojen bakteri türleri üzerinde *in vitro* koşullarda gösterdiği inhibisyon aktivitesini rapor etmişlerdir. Denemelerinde, çalışmamızda kullandığımız yöntem ile hazırladıkları, 50 µg kefiran ekstraktının *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* gibi önemli insan patojenlerinin *in vitro* gelişimlerini önemli düzeyde engellediği belirtilmiştir. Benzer şekilde, çalışmalar kefiran'ın birkaç filamentli mantar türüne karşı antifungal aktivitesini göstermiştir. Kefiranın *Fusarium graminearum* CZ1 ve *Streptococcus faecalis* KR6'ya karşı antimikrobiyal fonksiyonu bildirilmiştir. Ayrıca, kefiranın antifungal aktivitesi nedeniyle, *Aspergillus flavus* AH3 suşunun aflatoksin B1 üretimini önlediği bildirilmiştir. (Ismail ve ark., 2011; Vijayendra ve Shamala, 2014).

Ancak ne kefirin ne de yukarıda belirtilen yolla eldesi yapılan bu polisakkarit ekstraktının bitki patojen bakterilerine karşı herhangi bir uygulaması şimdiye kadar bildirilmemiştir. Başka bir çalışmamızda, 24 ve 48 saat süreyle fermentasyonu yapılmış, beş çeşit kefir süpernatantının yedi farklı bitki patojeni bakteri ve bir biyokontrol ajanına karşı antimikrobiyal etkileri ilk kez *in vitro* ve *in vivo* koşullarda incelenmiş ve kayda değer sonuçlar alınmıştır (Taşkın ve Akköprü, 2020). Bahsi geçen çalışmamızda granüllerden bağımsız olarak, beş farklı kefir sütünden elde ettiğimiz süpernatant ürününün bu bakterilerin *in vitro* ortamda gelişimini önemli ölçüde engellediği ve bu etkinin kefir tipine ve fermentasyon süresine göre değişiklik gösterdiği ortaya konmuştu. Bu çalışmada ise, iki farklı kefir granülünden, soğuk etanol çöktürmesi yoluyla elde ettiğimiz ekstraktın, yedi bitki patojeni bakteri suşları üzerindeki antimikrobiyal etkilerini *in vitro* koşullarda araştırılmıştır. Disk difüzyon metodu ve yayma yöntemi ile gerçekleştirdiğimiz denemelerde, ekstraktın 2 mg maksimum uygulama konsantrasyonu da dahil olmak üzere, farklı konsantrasyonlarda hazırladığımız ekstrakt solüsyonlarının bakteriler üzerinde herhangi bir

inhibisyon etkisi gözlemlenmemiştir. Buna karşılık kontrol olarak kullanılan AN kefir süpernatantı izolatlar üzerinde ortalama 13-17 mm inhibisyon zonu gösterirken, SD süpernatantı 10-14 mm zon üretmiştir (Şekil 4).

Şimdiye kadar bitki bakteriyel hastalıklarının kontrolü için bakterisit olarak birçok farklı ticari bakır karışımı ve antibiyotik kullanılmıştır. Kimyasal pestisitlerle ilgili çevresel ve sağlık riski sorunlarına yönelik artan farkındalık, bu bitki hastalıklarının yönetimi için biyolojik kökenli geleneksel olmayan kimyasalların araştırılmasına yol açmıştır. Örneğin Basim ve ark., (2004) polen ve propolis ekstraktlarının *in vitro* antibakteriyel aktivitelerini, 13 farklı tarımsal bakteriyel patojene karşı araştırmışlardır. Çalışmalarında bu ekstraktların antibakteriyel etkilerinin konsantrasyona ve patojen türlerine göre çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymuşlardır.



Şekil 4. Kefir AN (sol) ve SD (sağ) granülleri kullanılarak 48 saat fermentasyonu yapılarak elde edilmiş ve filtrasyon yöntemi ile sterilize edilmiş kefir süpernatantının, pozitif kontrol olarak *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Psl) üzerindeki antibakteriyel etkisini gösteren örnek fotoğraflar

Figure 4. The sample photos indicating antibacterial effect of filter sterilized kefir supernatant as the positive control obtained by 48h fermentation of kefir AN (left) and SD (right) granules against *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Psl) bacterial strain

Bir başka çalışmada, beş farklı bitkiden elde edilen ekstraktların antibakteriyel etkileri, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* ve *Erwinia* cinslerine ait beş farklı bitki patojeni bakteri türüne karşı incelenmiştir. Sonuçlar ekstrakt ve bakteri türüne karşı farklılıklar göstermiştir (Bhagwat ve Datar, 2014). Özellikle bitki ekstraktlarını içeren benzeri çalışmaların sayısını arttırmak mümkündür. Bu çalışmaların ortak noktası, antimikrobiyal etkisi değerlendirilen doğal maddelerin genelde pek çok biyoaktif bileşiği bir arada içermeleridir. Örneğin propolis flavonoidler, pinocembrin, galangin, pinobanksin ve kafeik asit gibi pek çok biyoaktif bileşik içermektedir (Basim ve ark., 2004). Çalışmamızın bu çalışmalardan farkı, antibakteriyel etkisini değerlendirdiğimiz ekstraktın nispeten çok daha saf bir içerik olan kefiran polisakkaritini içermesidir.

Kefiranın antimikrobiyal etki mekanizmasını ortaya koyan çalışma neredeyse yok denecek kadar azdır ve hala aydınlatılmaya muhtaçtır. Bu konu üzerine literatürde bulabildiğimiz tek çalışma Barbosa ve ark. (2011) tarafından yapılmış olan çalışmadır. Yaptıkları bu çalışmada kefiranın hücre zarında gözenek oluşumuna neden olarak hücre bütünlüğünü bozabileceği, molekülün olası etki mekanizması olarak bildirilmiştir. Her bakteri suşunun farklı genetik, dolayısıyla farklı metabolik yapıya sahip olabileceği bir gerçektir. Bitki patojen bakteriler ile yapılan bu denemenin, daha önce benzer yöntemler kullanılarak insan ve gıda patojenleri ile yapılan denemelerden farklı sonuç vermesi şüphesiz doğal karşılanabilir. Bu konuda ileride yapılacak daha ayrıntılı çalışmalar sonucunda daha iddialı hipotezlerin oluşturulabileceği bir gerçektir.

Teşekkür

Bu çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimleri tarafından desteklenmiştir (Proje No: FYL-2017-6263). Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Akköprü'ye yardımlarından ötürü teşekkürü ayrıca bir borç bilirim.

Kaynaklar

- Agrios G. 2005. Plant Pathology. Fifty Ed. Ed.s.l.: Elsevier Academic Pres, 922p.
- Barbosa AF, Santos PG, Lucho AMS, Schneedorf JM. 2011. Kefiran can disrupt the cell membrane through induced pore formation. J. Electroanal. Chem. 653(1-2): 61-66.
- Basim E, Basim H, Özcan M. 2006. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. J. Food Eng. 77(4): 992-996.
- Bhagwat MK, Datar AG. 2014. Antibacterial activity of herbal extracts against five plant pathogenic bacteria. Arch Phytopathology Plant Protect, 47(7): 892-899.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72(1-2): 248-254.
- Bull CT, De Boer SH, Denny TP, Firrao G, Saux MFL, Saddler GS, Scortichini M, Stead DE, Takikawa, Y. 2010. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. J Plant Pathol. 551-592.
- Förster H, McGhee GC, Sundin GW, Adaskaveg JE. 2015. Characterization of streptomycin resistance in isolates of *Erwinia amylovora* from California. Phytopathology 105, 1302-1310.

- Furuno T, Nakanishi M. 2012. Kefiran Suppresses Antigen-Induced Mast Cell Activation. *Biol. Pharm. Bull.* 35(2): 178-183.
- Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. 2001. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *J Dairy Res.* 68(4): 639-652.
- Güzel-Seydim Z, Wyffels JT, Seydim AC, Greene AK. 2005. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. *Int. J. Dairy Techn.* 58(1): 25-29.
- Guzel-Seydim ZB, Kok-Tas T, Greene AK, Seydim AC. 2011. Review: functional properties of kefir. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 51(3): 261-8.
- Guzel-Seydim ZB, Seydim AC, Greene AK, Tas T. 2006. Determination of antimutagenic properties of some fermented milks including changes in the total fatty acid profiles including CLA. *Int J Dairy Technol.* 59: 209-215.
- Ismail AA, Ghaly MF, El-Naggar AK. 2011. Milk kefir: ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. *Curr Microbiol.* 62(5): 602-1609.
- Kannan V, Bastas K. 2015. Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria. ISBN 9780367377441. Boca Raton, Taylor & Francis Ltd. CRC Press.
- Liu JR, Chen MJ, Lin CW. 2005. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *J Agric Food Chem.* 53: 2467-2474.
- Liu JR, Wang SY, Chen MJ, Chen HL, Yueh PY, Lin CW. 2006. Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir vs soymilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *Br J Nutr.* 95: 939-946.
- Medrano M, Pérez PF, Abraham AG. 2008. Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *Int. J. Food Microbiol.* 122: 1-2.
- Micheli L, Uccelletti D, Palleschi C, Crescenzi V. 1999. Isolation and characterisation of a roopy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 69-74.
- Montesanto S, Calò G, Cruciata M, Settanni L, Brucato V, La Carrubba V. 2016. Optimization of environmental conditions for kefir production by Kefir grain as scaffold for tissue engineering. *Chem. Eng. Trans.* 49: 607-612.
- Moradi Z, Kalanpour N. 2019. Kefiran, a branched polysaccharide: Preparation, properties and applications: A review. *Carbohydr. Polym.* 115100.
- Motedayen AA, Khodaiyan F, Salehi EA. 2013. Development and characterisation of composite films made of kefir and starch. *Food Chem.* 136(3-4): 1231-1238.
- NCCLS. 2002. National Committee of Clinical Laboratory Standards, approved standard M2-A6. 6thed. Wayne, PA: National Committee for Clinical Lab. Standards. 2002.
- Piermaria JA, Pinotti A, Garcia MA, Abraham AG. 2009. Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food Hydrocoll.* 23(3): 684-690.
- Pop CR, Salanta L, Rotar AM, Semeniuc CA, Socaciu C, Sindic M. 2016. Influence of extraction conditions on characteristics of microbial polysaccharide kefiran isolated from kefir grains biomass. *J Food Nutr Res.* 55(2).
- Rodrigues KL, Caputo LRG, Carvalho JC, Evangelista J, Schneedorf JM. 2005. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 25: 404-408.
- Shiomi M, Sasaki K, Murofushi M, Aibara K. 1982. Antitumor activity in mice orally administered polysaccharide from kefir grain. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 35: 75-80.
- Sundin GW, Wang N. 2018. Antibiotic Resistance in Plant-Pathogenic Bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 56: 161-180.
- Sundin GW, Castiblanco LF, Yuan X, Zeng Q, Yang CH. 2016. Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects: challenges in bacterial molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* 17(9): 1506-1518.
- Taşkın B, Akköprü A. 2020. Antibacterial Activity of Different Kefir Types Against Various Plant Pathogenic Bacteria. *Journal of Agricultural Sciences.* In Press.
- Uchida M, Ishii I, Inoue C, Akisato Y, Watanabe K, Hosoyama S, Toida T, Ariyoshi N, Kitada M. 2010. Kefiran reduces atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet. *J. Atheroscler. Thromb.* 17: 980-988.
- Vijayendra SVN, Shamala TR. 2014. Film forming microbial biopolymers for commercial applications—A review. *Crit Rev Biotechnol.* 34(4): 338-357.