

T.C.
AH EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN KAYNAKLI *Lactobacillus Spp* SUÇLARININ
PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Selçuk ZORAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KIRGELİR 2013

T.C.
AH EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

İNSAN KAYNAKLI *Lactobacillus* Spp. SUŞLARININ
PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Selçuk ZORAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Ergin KARATAŞ

KIRGELİR
EYLÜL 2013

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlü ü'ne

Bu çalı ma jürimiz tarafından B YOLOJ Anabilim Dalında YÜKSEK L SANS
TEZ olarak kabul edilmi tir.

Ba kan: Doç. Dr. Kamil I IK.....

Üye: Doç. Dr. Ergin KAR PTA

Üye: Yrd. Doç. Dr. Belgin ERDEM.....

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen ö retim üyelerine ait oldu unu onaylarım.

.../.../20..

Doç. Dr. Mahmut YILMAZ

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalı mada, Kır ehir Devlet Hastanesine belirli bir ikayetle ba vurmu 25-50 ya arası sindirim sistemi problemi bulunmayan 48 hastanın gaitasından izole edilmi *Lactobacillus* spp. su ları kullanılmı tır. Toplam 25 adet olan bu su ların dü ük pH dirençlerinin belirlenmesi, yüksek safra tuzu (oxgall) konsantrasyonlarına kar ı toleransı ve safra tuzu (kolik asit) hidrolizi, bazı patojen mikroorganizmalara kar ı inhibitör etkileri, antimikrobiyal aktiviteleri ve kolesterol asimilasyonunun belirlenmesi hedeflenmi tir. De i ik pH ko ullarında (2.0, 2.5 ve 3.0) asitli e en dirençli su lar *L. fermentum1* LS-5, *L. fermentum2* LS-15, *L. plantarum1* LS-20 ve *L. fermentum2* LS-25 olarak tespit edilmi tir. Yüksek safra tuzu konsantrasyonlarında (%0.3, %0.5, %1.0 ve %1.5) *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2, *L. plantarum1* LS-11, *L. plantarum1* LS-12, *L. fermentum2* LS-15, *L. fermentum2* LS-16 su ları canlılı ını koruyabilmi tir. Ayrıca safra tuzu (kolik asit) hidrolizi çalı masında genel olarak iyi sonuçlar elde edilmi , en yüksek de erleri ise *L. pentosus* LS-2 su unda gözlemlenmi tir. Bu su ların antimikrobiyal aktivitelerinin tespiti için yapılan çalı mada 13 farklı antibiyogram diski denenmi , su ların genelinin antibiyotiklere kar ı duyarlı oldukları gözlemlenmi tir. *Lactobacillus* su larının patojen mikroorganizmalar üzerine inhibitör etkilerinin tespiti üzerine *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (ATCC 25656), *S. epidermidis* (ATCC 12228) ve *Neisseria* sp. patojenleri ile bir çalı ma yapılmı tır. *Lactobacillus* su ları genel olarak patojenlere kar ı inhibitör etki göstermi lerdir. Ayrıca *Lactobacillus* su larının laktik asit dı nda üretti i antimikrobiyal maddelerin inhibitör etkisinin belirlenmesi üzerine yapılan bir ba ka çalı mada ise pH'sı yükseltildi süpernatantların patojenler üzerine etkisi gözlemlenmemi tir. Kolesterol asimilasyonunun belirlenmesi için yapılan çalı mada ise dü ük asitli e ve yüksek safra tuzuna dayanıklı, safra tuzu aktivitesi yüksek, antagositik etkiye sahip 5 su *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2, *L. plantarum1* LS-11, *L. plantarum1* LS-12 ve *L. fermentum2* LS-15 seçildi ve kolesterol giderimi çalı ıldı tır. Kültürler MRS sıvı besi yerinde 10-22 µg/ml, %0.3'lük yüksek

safra tuzlu MRS sıvı besi yerinde 14-50 $\mu\text{g/ml}$, %0.3'lük kolik asitli MRS sıvı besi yerinde 8-13.5 $\mu\text{g/ml}$ ve %0.3'lük taurocholic asit'li MRS sıvı besi yerinde 15-55 $\mu\text{g/ml}$ kolesterol asimilasyonu yapmı tır.

ABSTRACT

Lactobacillus spp. strains isolated from the stool of 48 patients between the ages of 25 and 50 who resorted to the Kır ehir state hospital with various complaints without having a problem with their digestive system, were used in this study. The aim targeted was the designation of the low pH resistance, the tolerance against concentrations of high bile salt (oxgall) and the hydrolysis of bile salt (cholic acid), the inhibitory affects on some pathogen microorganisms, the designation of antimicrobial activity and cholesterol assimilation of all strains of which there were a total of 25. It has been found that the most resistant strains towards acidity under various pH conditions were *L. fermentum1* LS-5, *L. fermentum2* LS-15, *L. plantarum1* LS-20 and *L. fermentum2* LS-25. Strains *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2, *L. plantarum1* LS-11, *L. plantarum1* LS-12, *L. fermentum2* LS-15, *L. fermentum2* LS-16 were able to maintain their vitality in high concentrations of bile salt. Furthermore pleasing results were obtained from the bile salt hydrolysis study in general and the highest values were observed in the *L. pentosus* LS-2 strain. In the study which was conducted in order to estimate the antimicrobial activity of these strains, 13 different antibiogram disks were tried and it was observed that overall the strains were sensitive to antibiotics. A study was conducted with *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (ATCC 25656) *S. epidermidis* (ATCC 12228) and *Neisseria* sp. pathogens on the estimation of the inhibitory effects of *Lactobacillus* strains on pathogen microorganisms. Overall the *Lactobacillus* strains displayed an inhibitory effect on the pathogens. Furthermore the effect of supernatants with an increased pH on pathogens was observed in a different study concerning the estimation of the inhibitory effects of *Lactobacillus* strains on antimicrobial substances it produces other than lactic acid. And in the study which was conducted in order to estimate the cholesterol assimilation 5 strains *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2, *L. plantarum1* LS-11, *L. plantarum1* LS-12 and *L. fermentum2* LS-15 which have low acidity, are resistant to high bile salt, have a high bile salt activity and have an antagositic effect were chosen and removal of cholesterol was studied. The cultures made cholesterol assimilation of

10-22 $\mu\text{g/ml}$ in the MRS liquid feedlot, of 14-50 $\mu\text{g/ml}$ in the MRS liquid feedlot with 0.3 %, of 8-13.5 $\mu\text{g/ml}$ in the MRS liquid feed lot with 0.3 % cholic acid and of 15-55 $\mu\text{g/ml}$ in the MRS liquid feedlot with 0.3 % taurocholic acid.

TE EKKÜR

Çalı mam boyunca yardımlarını benden esirgemeyen de erli danı man hocam Doç. Dr. Ergin KAR PTA 'a ve de erli hocam Yrd. Doç. Dr. Belgin ERDEM'e, laboratuvar çalı malarımnda bana her zaman yardımcı olan hocam Ar . Gör. Tayfun KAYA ve hocam Dr. ener TULUMO LU'na, örnek toplamamda bana her konuda yardımcı olan Kır ehir Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalı anlarına, her zaman yanımda olan dostluklarını ve yardımlarını benden esirgemeyen arkadaş larıma, hayatım boyunca beni yalnız bırakmayan maddi-manevi destekleyen ve moral veren aileme sonsuz te ekkürlerimi sunarım.

Ç İNDEK İLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TE EK KÜR.....	v
Ç İNDEK İLER	vi
TABLolar D Z N	ix
EK LLER D Z N	x
RES MLER D Z N	xi
S MGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. G R	1
2. TEOR K ALT YAPI.....	4
2.1. PROB YOT KLER	4
2.1.1. Probiyotiklerin Tanımı ve Tarihçesi	4
2.1.2. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar	5
2.1.3. Probiyotik Mikroorganizmalarda Aranan Özellikleri	6
2.1.4. Probiyotiklerin Etki Mekanizması	7
2.1.5. Probiyotiklerin Sa lık Üzerine Etkileri.....	8
2.1.6. Probiyotiklerin Yan Etkileri.....	10
2.1.7. Probiyotik Ürünler ve Ticari Önemleri	11
2.2. PREB YOT KLER ve S NB YOT KLER.....	11
2.2.1. Prebiyotikler.....	11
2.2.2. Sinbiyotikler.....	12
2.3. <i>Lactobacillus</i> C NS NE A T BAKTER LER N ÖZELL KLER	12
2.3.1 <i>Lactobacillus</i> Türlerinin Ürettikleri Antimikrobiyal Maddeler	15
2.3.1.1. Laktik asit.....	15

2.3.1.2. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	17
2.3.1.3. Bakteriosin	17
2.4. BA İRSAK M KROFLORASI.....	18
2.5. ANTAGONOST K ETK DE KULLAN LAN M KROORGAN ZMALAR	19
2.5.1. <i>Escherichia coli</i>	20
2.5.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	20
2.5.3. <i>Neisseria</i> sp.	21
2.5.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21
2.5.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
3. MATERYAL VE METOD.....	23
3.1. MATERYAL.....	23
3.1.1. Materyal Örnekleri	23
3.1.2. Bakterilerin Aktifle tirilmesi ve Geli me Ortamları.....	23
3.1.3. Çalı malarda Kullanılan Besiyerleri	24
3.2.METOD.....	28
3.2.1. zolatların zolasyonu ve dendifikasyonu	28
3.2.2. <i>Lactobacillus</i> spp. Su larının Muhafazası.....	28
3.2.3. Patojen Su ların Aktifle tirilmesi ve Muhafazası	29
3.2.4. Asit Dirençlili inin Belirlenmesi	29
3.2.5. Yüksek Safra Tuzu (Oxgall) Konsantrasyonlarına Dirençlili in Belirlenmesi	29
3.2.6. Safra Tuzu (Kolik Asit) Hidrolizinin Belirlenmesi.....	30
3.2.7. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	30
3.2.8. Bazı Patojen Mikroorganizmalara Kar ı Antagonostik Etkilerin Belirlenmesi	31

3.2.9. <i>Lactobacillus</i> spp. Su ları Tarafından Üretilen Bakteriosin veya Bakteriosin Benzeri Maddelerin İnhibitör Etkisinin Belirlenmesi	31
3.2.10. <i>Lactobacillus</i> spp. Su larının Kolesterol Giderimi	32
4. BULGULAR VE TARTI MA	34
4.1. ZOLATLARIN DEND F KASYONU	34
4.2. <i>Lactobacillus</i> spp. SU LARIN AS T D RENÇL L	37
4.3. <i>Lactobacillus</i> spp. SU LARIN YÜKSEK SAFRA TUZU (OXGALL) KONSANTRASYONLARINDA D RENÇL L	39
4.4 <i>Lactobacillus</i> spp. SU LARININ SAFRA TUZU (KOL K AS T) H DROL Z ..	41
4.5. <i>Lactobacillus</i> spp. SU LARININ ANT M KROB YAL AKT V TELER	44
4.6. <i>Lactobacillus</i> spp. SU LARIN BAZI PATOJEN M KROORGAN ZMALARA KAR I ANTAGON ST K ETK LER	47
4.7. <i>Lactobacillus</i> spp. SU LARI TARAFINDAN ÜRET LEN BAKTER OS N VEYA BAKTER OS N BENZER MADDELER N NH B TÖR ETK LER	50
4.8. <i>Lactobacillus</i> spp. SU LARININ KOLESTEROL G DER M	50
5. SONUÇ VE ÖNER LER	54
6. KAYNAKÇA	60

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Probiyotik olarak bilinen mikroorganizmalar	6
Tablo 2. Gaitadan izole edilerek tanımlanan su ların adları ve kodları	36
Tablo 3. <i>Lactobacillus</i> su larının düşük pH (2.0, 2.5 ve 3.0) derecelerine toleransı. (24 saat sonra).....	37
Tablo 4. <i>Lactobacillus</i> spp. su larının de i ik düzeyde (% 0.3, % 0.5, % 1.0 ve % 1.5) safra tuzu (oxgall) toleransı.....	40
Tablo 5. <i>Lactobacillus</i> spp. su larının safra tuzu hidroliz (kolik asit) aktivitesi.	42
Tablo 6. Gaitadan izole edilen <i>Lactobacillus</i> spp. su larının de i ik antibiyotiklere kar ı duyarlılık sonuçları (mm).....	45
Tablo 7. <i>Lactobacillus</i> spp. su larının de i ik antibiyotiklere kar ı %'de duyarlılık sonuçları.	46
Tablo 8. <i>Lactobacillus</i> spp. su larının de i ik patojen bakterilerine kar ı olu turdukları antagonistik etkileri (mm).	49
Tablo 9: Bazı <i>Lactobacillus</i> su larının MRS sıvı besiyerinde ve de i ik safra tuzu (% 0.3 oxgall, kolik asit ve taurocholic asit) besiyerinde kolesterol giderimi ($\mu\text{g/ml}$).	51

EK LLER D Z N

ekil 1. Gastrointestinal sistemin de i ik kısımlarında yer alan mikroorganizmalar	19
ekil 2. <i>Lactobacillus</i> spp. su larının de i ik antibiyotiklere kar ı %'de duyarlılık oranları	47
ekil 3. <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> LS-1, <i>L. pentosus</i> LS-2, <i>L. plantarum</i> LS-11, <i>L. plantarum</i> LS-12 ve <i>L.fermentum</i> LS-15 su larının kolesterol giderim miktarları ($\mu\text{g/ml}$).	52

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: MRS Agar üzerinde 48 saat inkubasyona bırakılmış <i>L. salivarius</i> LS-22 suyunun Samsung S760 fotoğraf makinesi ile çekilmiş görüntüsü.....	34
Resim 2: <i>L. pentosus</i> LS-2 suyunun Olympus, CH-2 CHT model 1'lik mikroskopunda 100x10 büyütmede görünümü	35
Resim 3: Hidroliz edilmemiş kolik asit kristali. Novax AP-5 50920 binoküler mikroskopunda 20X büyütmedeki görüntüsü.....	43
Resim 4: <i>L. pentosus</i> LS-2 suyunun gerçekleştirdiği safra tuzu (kolik asit) hidrolizi. Kolik asit kristallerinin parçalanmış hali. Novax AP-5 50920 binoküler mikroskopunda 20X büyütmedeki görüntüsü.....	43

S İMGELER VE KISALTMALAR

KISALTMALAR

ATCC	Amerikan Tipi Kùltür Koleksiyonu
BSH	Safta Tuzu hidrolizi
BKZ	Bakınız
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
GDO	Geneti i De i tirilmi Organizmalar
GRAS	Genellikle güvenli olarak tanınan
KOB	Koloni Olu turma Birimi
LAB	Laktik Asit Bakterileri
MRS	Man Ragosa and Sharpe
NCCLS	Klinik Laboratuar Standartları Ulusal Komitesi
RPM	Devir Sayısı
Spp.	Species Plural
Subsp.	Subspecies
WHO	Dünya Sa lık Örgütü

S İMGELER

mm	Milimetre
nm	Nanometre
°C	Santigrad
μ	Mikron
μL	Mikrolitre
ml	Mililitre
w/v	Weight/Volume
μg	Mikrogram
μm	Mikrometre

dl	Desilitre
mg	Miligram
g	Gram
L	Litre

1. G R

Mikroorganizmalara kar ı insanlarda olumsuz bir ön yargı vardır. Genel kanı mikroorganizmaların zararlı oldu u yönündedir. Bu ön yargılı yakla ımla mikroorganizmalardan korkan insanlar günlük ya antılarında mikroorganizmaları 'mikrop' olarak adlandırmakta ve korunmaya çalı maktadırlar.

Bu önyargılı yakla ıma ra men, nsan vücudu, sahip oldu u ısı ve besin maddeleri sayesinde çe itli mikroorganizmalar için son derece elveri li bir ortam olu turmaktadır. Bu ortamda yararlı ve zararlı mikroorganizmalar bir rekabet içindedirler. Genel olarak sa lıklı bir insanda yararlı mikroorganizmalar daha baskın ve vücut hücreleri ile birlikte uyumlu bir ekilde çalı maktadırlar ¹⁻⁴.

Son yıllarda insan vücudunda ya ayan mikroorganizmalar birçok bilim insanının dikkatini çekmi tir. Bu mikroorganizmalar inceleme altına alınmı , yeni projeler ve çalı malar ba latılmı tır. Bu alanda yürütülen projeye 'mikrobiyom projesi' denilmektedir. Henüz yeni bir proje olmasına kar ın ula ılan bilgiler son derece önemlidir ^{5,6}.

Yeni do mu bir bebek steril durumdadır. Do um anından itibaren çevrede bulunan mikroorganizmalar bebe in vücuduna yerle meye ba lar, 1-2 gün içinde bu mikroorganizmaların sayısı 10^9 - 10^{10} 'u bulur. Bebe in vücuduna yerle en mikroorganizmaların tür ve sayısı bebe in bulundu u ortama, beslenme ekline ve do um ekline ba lı olarak de i im gösterir. Bebekte anne sütü kesildi inde, yeti kin floranın olu umu ba lar ⁷⁻¹⁰.

Yeti kin bir insan vücudu yakla ık 10^{13} hücreden olu makla birlikte bunun 10 katı kadarda zararlı ve yararlı, 500 farklı türde mikroorganizmaya ev sahipli i yapmaktadır. Bir ba ka ifade ile vücudun de i ik sistemlerinde, sistemin i levine göre belirli miktarlarda mikroorganizmalar yer alır. Örne in; deride 200 gr, a ız bo lu unda 20 gr, akci erlerde 20' er gr, burunda 10 gr, gözde 1 gr ve gastrointestinal sistemde 1-2 kg mikroorganizma vardır ¹¹⁻¹⁷.

Sindirim sistemi çok geni bir alana sahiptir ve i levsel olarak çok fazla miktarlarda besin maddesi içermektedir. Bu sistemin yüzey alanı yaklaşık 400 m²'den olmaktadır ve bunun 200 m²'de ba ırsak mukozası yer alır. Ya am için gerekli olan enerji ve yapısal madde ta ları dı arıdan beslenerek temin edilir. Dı arıdan alınan bu besinler sindirim sisteminden geçerek i levsel hale getirilir. Bir insanın ömrü boyunca sindirim kanalından ortalama 60 ton yiyece in geçti i hesaplanmı tır. Sa lıklı bir ya am için sindirim sisteminin çok düzenli bir ekilde çalı ması gerekmektedir. Bu sistemin önemini Hipokrat öyle ifade etmi tir. “Bütün hastalıklar ba ırsaktan ba lar. Ba ırsak hasta ise vücudun geri kısmı da hastadır”^{7, 13, 15-20}.

Bu kadar geni yüzeye sahip ve bu kadar i levsel bir sistemin elbette bir yardımcıya ihtiyacı vardır. Gastrointestinal sistemde ya ayan yararlı mikroorganizmalar, içinde bulundu u sistem için çok önemli reaksiyonlar gerçekleştirerek bu sistemin düzenli çalı masına büyük ölçüde katkı sa lamaktadırlar. Bu mikroorganizmalar genel olarak probiyotiklerdir.

Probiyotikler, a ız yolu ile alındı ında konakçıya belirgin bir yarar sa layan, dü ük pH'da dayanıklı, ba ırsak epiteline tutunabilen, patojen olmayan canlı mikroorganizmalardır. Probiyotik kelime olarak Yunanca ‘pro’ ve ‘biota’ kelimelerinden türetilmi tir. ‘Ya am için’ anlamına gelen probiyotik, antibiyotik kelimesi ile zıt anlamlıdır²¹⁻²⁴.

nsanlar probiyotikleri do al yollarla almaktadırlar. Eski insanların diyetlerine bakıldı ında günümüz insanlarından kat kat daha fazla fermente süt ürünleri tükettikleri görülmektedir. Günümüzde ise insanların diyetlerinde rafine edilmi , i lenmi gıdalar yer almaktadır. Ayrıca hareketsiz ya am, stres, antibiyotik kullanımı, sigara ve alkol kullanımı gibi etkenler sa lıklı bir ya am için olumsuz etkiler olu turmaktadır. Bu durumdan ba ırsak florası da olumsuz etkilenmektedir ve sayıları azalmaktadır. Bu nedenlerden dolayı ba ırsak florasını uygun sayıda tutabilmek için ekstradan probiyotik takviyeleri yapma gere i do mu tur^{4,9,18,25}.

Bu alı manın amacı; Kır ehir Devlet Hastanesine belirli bir ikayetle başvurmu 25-50 ya arası sindirim sistemi problemi bulunmayan 48 hastanın gaitasından izole edilerek tanımlanan *Lactobacillus* türlerinin, düşük pH ve yüksek safra konsantrasyonlarında dayanıklılıklarının, safra tuzu hidrolizinin, antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi, serum kolesterol giderimi ve bazı patojen mikroorganizmalara karşı antagonistik etkilerinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Böylelikle günlük hayatta normal beslenen kişilerin bağırsak florasında probiyotik tür varlığı belirlenmesi olacağı düşünülmüştür.

2. TEORİK ALTYAPI

2.1. PROBYOTİKLER

2.1.1. Probiyotiklerin Tanımı ve Tarihçesi

Probiyotik, Yunanca iki kelime ‘pro’ ve ‘biota’ dan türetilmiştir ve ‘yaşam için’, ‘yaşamı destekleyen’ anlamlarına gelmektedir^{12,26,27}. Antibiyotik kelimesiyle zıt anlamlıdır²⁸. Probiyotik kavram olarak ilk kez 19. yüzyılın sonlarına doğru ortaya çıkmıştır²⁹ ve günümüze değin birçok bilim insanı tarafından tanımlanmaya çalışılmıştır.

Bu kavramı ilk kez 1908 yılında Nobel ödüllü Rus bilim adamı Élie Metchnikoff tanıtmıştır. Yaşam üzerine bir takım çalışmalar yapan Metchnikoff, Kafkas ve Bulgar köylülerinin uzun ömürlü olduklarını fark etmiş ve bu durumu köylülerin çok fazla miktarda fermente süt ürünlerini tüketmelerine bağlamıştır. Metchnikoff fermente süt tüketimi ile bağışıklık sisteminin olumsuz etkilerinin ortadan kaldırılabileceğini ve böylece insanların daha uzun süre yaşayabileceklerini bildirmiştir^{18,30-32}.

Probiyotik terim olarak ise ilk kez 1954 yılında Ferdinand Vergin tarafından kullanılmıştır. Vergin ‘Anti und probiotika’ adlı makalesinde probiyotiklerin antibiyotik ve antimikrobiyal maddelerin tersine yaşam için yararlı olduğunu göstermiştir^{33,34}. Bu çalışmadan 11 yıl sonra Lilly ve Stillwell yaptıkları çalışmaları bir protoza tarafından salgılanan bir maddenin bağışıklık sisteminin gelişimini etkilediğini gözlemlediler ve probiyotikler tarafından üretilen maddelerin diğer mikroorganizmaların gelişimini etkilediğini göstermişlerdir^{33,35}.

Probiyotiklerin günümüzde en çok kabul gören tanımı 1989 yılında Roy Fuller tarafından yapılmıştır. Fuller’e göre Probiyotik, “tüketicinin intestinal florasını koruyup gelişimine yardımcı olan canlı mikrobiyal gıda katkılarıdır.” şeklindedir³⁶.

Avrupa Birli inin giri imleri ile 1995'te Brüksel'de yapılan probiyotik konulu uzmanlar toplantısında probiyotikler için u tanım yapılmı tır; sa lı a koruyucu etki gösteren, sindirim, üreme ve solunum sistemleri üzerinde yararlı etkileri olan, canlı, bir ya da birkaç belirli mikroorganizma tarafından olu an kültürler olarak tanımlanmı tır ³⁷.

2.1.2. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar

Kullanılmasıyla birlikte tüketicinin intestinal florasını düzelterek yararlı bir ekilde etkileyen canlı mikroorganizmalar olan probiyotikler genel olarak LAB (Laktik Asit Bakterileri) grubundadır. Yo urt yapımında kullanılan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* dı ndaki tüm laktik asit bakterileri ba ırsak florası elemanlarıdır. Bununla birlikte bazı küf ve maya türlerinin de probiyotik özelli e sahip oldu u yapılan çalı malarla gösterilmi tir ²³. Tropikal bir meyvenin kabu undan izole edilen *Saccharomyces boulardii*'nin probiyotik özelli inin ke fedilmesi buna bir örnektir ¹².

Probiyotik olarak bilinen mikroorganizmalar tablo 1'de verilmi tir.

Tablo 1. Probiyotik olarak bilinen mikroorganizmalar³⁸⁻⁴¹.

BAKTERLER		KÜF VE MAYALAR	
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>P. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>A. oryzae</i>
<i>L. cellebiosus</i>	<i>B. breve</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. longum</i>	<i>S. cremoris</i>	<i>S. boulardii</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>Candida</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>S. lactis</i>	<i>C. torulopsis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>P. shermanii</i>	<i>S. diacetylactis</i>	
<i>L. casei</i>	<i>P. freudenreichii</i>	<i>Bacillus</i>	
<i>L. curvatus</i>	<i>Bacteriodes</i>	<i>B. subtilis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. capillus</i>	<i>B. pumilus</i>	
<i>L. plantarum</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. lentus</i>	
<i>L. johsonli</i>	<i>B. ruminicola</i>	<i>B. licheniformis</i>	
<i>L. helveticus</i>	<i>B. amylophilus</i>	<i>B. coagulans</i>	
<i>L. salivarius</i>	<i>Leuconostoc</i>		
<i>L. gasse</i>	<i>L. mesenteroides</i>		
<i>L. sporogenes</i>			

2.1.3. Probiyotik Mikroorganizmalarda Aranılan Özellikleri

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak insanlar tarafından kullanılabilmesi için öncelikli olarak deneysel ve klinik çalışmalarla o mikroorganizmanın probiyotik özelliklerinin kanıtlanması gerekmektedir. Bu çalışmaların iki temel amacı vardır. Birinci amaç probiyotik türlerin belirlenmesi ve bu türlerin sahip olduğu özelliklerin gösterilmesidir. Burada gösterilmek istenen probiyotik özelliklerin türe özgü olmasıdır. İkinci amaç ise seçilen probiyotik türlerin etki mekanizmalarının gösterilmesidir⁴².

Probiyotik mikroorganizmalarda aranılan özellikler aşağıda sıralanmıştır^{4, 43-45}.

- Sindirim sırasında meydana gelen olaylardan etkilenmeden canlılıklarının sürdürebilmelidirler,
- Özellikle asit ve safra yoğunluğunda yüksek ortamlarda faaliyet gösterebilmelidirler,

- Ba ırsak epiteline tutunabilme özelli i gösterebilmelidirler,
- Sindirim sistemi mikroflorasının dengede tutulmasını sa lamalı, patojenlerin gelişimini engellemeli, tüketilen gıdaların yararlanma derecesini artırmalıdır,
- Antibakteriyel direnci patojen mikroorganizmalara nakletmemelidirler,
- lave edildi i gıdanın kalitesini dü ürmemelidirler,
- Patojenler üzerine inhibitör etki yapmalıdırlar,
- Metabolik aktiviteyi düzenlemelidirler,
- Gıda allerjilerine ve patojenlere kar ı immun sistemi güçlendirebilmelidirler,
- Konakçının gıdalardan daha fazla yararlanmasını sa lamalıdırlar,
- Patojen ve toksijenik olmamalıdırlar,
- Mikroorganizmanın adaptasyonunu kolayla tırmak için insan orijinli su lar seçilmelidir,
- Depolama ve kullanma süresince canlı kalmalıdırlar.

2.1.4. Probiyotiklerin Etki Mekanizması

Probiyotik mikroorganizmalar, ba ırsak sisteminin mikrobiyal dengesini düzenleyerek yararlı etkiler göstermektedirler. Probiyotiklerin bu yararlı etkileri 3 mekanizma üzerinden gerçekleşmektedir²³.

1. Patojen mikroorganizmaların sayılarını azaltmak

- Antimikrobiyal bile ikler üretmeleri,
- Besin maddeleri için rekabet etmeleri,
- Kolonizasyon bölgeleri için rekabet etmeleri.

2. Mikrobiyal metabolizmayı (enzimatik aktiviteyi) de i tirmek

- Sindirim sistemini düzenleyen enzimlerin üretimi,
- Amonyak, amin veya toksik enzimlerin üretiminin azalması,
- Ba ırsak duvarının fonksiyonlarının iyile tirilmesi.

3. Ba 1 ıklık sistemini iyile tirmek

- Antikor düzeyinin artması,
- Makrofaj aktivitesinin artması.

2.1.5. Probiyotiklerin Sa lık Üzerine Etkileri

Metchnikoff köylülerin daha uzun ve sa lıklı bir ömür sürdüklerini gözlemlemi ve bunu köylülerin fermente süt tüketmeleriyle ili kilendirmi tir. Metchnikoff'a göre insan ya amının kalitesi ile ba ırsak fonksiyonlarının bir ba lantısı vardır ve fermente süt tüketimi de ba ırsaklarda yararlı etki yaparak ba ırsak fonksiyonlarının daha iyi olmasını sa lamaktadır³⁰.

Teknolojik geli melerle birlikte yapılan tıbbi çalı malar bugün göstermektedir ki probiyotiklerin do rudan ve dolaylı olarak vücut için yararlı etkileri vardır. Probiyotiklerin deneysel verilerle kanıtlanmış yararlı etkileri unlardır²³:

Ba ırsak epitelinin koruyucu görevi;

- Epiteller arası direnci arttır,
- Mukus üretimini arttır,
- Epitel glikolizasyonunu yönlendirir,
- Epitel hücre iskeletini ve sıkı ba lantı bütünlü ünü sa lamla tırır,
- Epitel onarımını destekler,
- Epitel hücrelerin ölümünü (apoptoz) önler
- Antioksidan etki gösterir.

Ba 1 ıklık sisteminin yönlendirilmesi;

- Lokal ve toplam IgA üretimini arttırır,
- T hücresi yanıtını azaltır,
- Fagositik etkinli i arttırır,
- Ba 1 ıklık hücrelerinin apoptozunu arttırır,
- Sitokin profillerini de i tirir,

Ba ırsak mikroflorasının do rudan de i imi;

- Patojenin ba ırsak duvarına tutunması ile yarı ır (yarı macı dı lama),
- Bakteriyosin üretimini arttırır,
- Ba ırsak lümeninin pH'ını organik asitlerin üretimi yolu ile dü ürür.

Yapılan alı malarla yararlı etkileri kanıtlanan probiyotik mikroorganizmaların bazı klinik uygulamaları a a ıda sıralanmı tır.

Akut ishal tedavisinde;

Dünyada her 15 saniyede bir ocuk ishal nedeni ile ölmektedir ⁴⁶. Yapılan kontrollü çalı malarda *Lactobacillus rhamnosus* GG verilen çocuklarda akut ishallerinin sürelerinin kısaltıldı ı gözlemlenmi tir. Rotavirüs etkenli akut ishallerde bazı probiyotik türlerin etkinli i gözlemlenmi tir. Bu türlere *L. rhamnosus* GG, *L. reuteri*, *L. casei* ve *Bifidobacterium lactis* örnek verilebilir ^{47, 48}

Antibiyotik kullanımına ba lı ishal tedavisinde;

Antibiyotik kullanılması ile birlikte ba ırsak florası sayı ve tür açısından de i im gösterir. Antibiyotik kullanımı ile kar ıla ılan ishallerde genellikle *Clostridium difficile*'nin sayısal olarak artması sorumludur. Antibiyotik kullanılması ile meydana gelen ishallerin tedavisinde *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* ve *Saccharomyces boulardii* kullanılmaktadır. *S. boulardii*, *C. difficile*'in toksinlerini ba layarak etkili olmaktadır ^{49, 50}.

Helicobacter pylori enfeksiyonunda;

H. pylori gastrit, ülser ve mide kanserine yol açan gram negatif bir patojendir. Yapılan laboratuvar çalı maları bazı *Lactobacillus* türlerinin *H. pylori*'ye kar ı antagonistik etkisinin oldu unu göstermi tir ¹⁸. Ancak bu konuda kullanılacak probiyotik türün tam olarak tespit edilmemesi, uygun miktar ve zamanın belirlenememesi nedeniyle probiyotiklerin tedavi amaçlı kullanımı tavsiye edilmemektedir ^{51,52}.

Kolorektal kanser tedavisinde;

Probiyotiklerin insanlarda, prokarsinojenlerin aktif karsinojenlere dönüümünü engelledikleri, mutajenik bileşikleri bağılayıp inaktive ettikleri, antimutajenik madde salgıladıkları, prokarsinojen bakterileri inhibe ettikleri, mutajenlerin bağırsaklardan emilimini azaltarak immün sistemi güçlendirdikleri bilinmektedir. Probiyotikler bu özellikleri sayesinde kolorektal kanser gelişimini önlediği bildirilmiştir^{45,53}. Ayrıca büyük çapta yapılan araştırmalar da fermente süt ürünlerinin tüketimi ile kolon ve meme kanseri gelişimi arasında ters bir ilişki gözlemlenmiştir⁵⁴.

Serum kolesterol seviyesinin düşürülmesinde;

Probiyotiklerin kan serum düzeyini düşürücü etki gösterdikleri bazı klinik çalışmalarıyla kanıtlanmıştır. Vücutta sentezlenen yağ asitlerinden alınan kolesterol safra asitlerine dönüşmektedir. Bazı probiyotik türler, örneğin; *L. acidophilus*, bu safra asitlerini konjuge edebilme özelliğine sahiptirler. Konjuge edilen safra asitleri lipitlere göre daha kolay emilir. Bu sayede serum kolesterol seviyesinde düşüme meydana gelir. Bu konuda yapılan bir çalışmada hiperlipidemik hastalara 3 ay süreyle *L. sporogenes* verildiğinde serum kolesterol düzeyinin % 32 oranında azaldığı gözlemlenmiştir^{4,55-57}.

2.1.6. Probiyotiklerin Yan Etkileri

Probiyotikler patojen olmayan mikroorganizmalar olsalar da bağırsaklılık sistemi iyice zayıflamış kişiler için tehlikeli olabilmektedirler. Bağırsaklılık sistemi zayıflamış kişilerde probiyotiklerin sistemik enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmiştir. Bunun yanı sıra probiyotiklerin olası diğer yan etkileri metabolizma dengeli ve gen transferidir^{47,58,59}. Probiyotiklerle ilgili olarak insanların bir diyet endişesi de kullanılan preparatların GDO (genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar) olup olmadığı konusudur⁴³.

2.1.7. Probiyotik Ürünler ve Ticari Önemleri

Probiyotik ürünler, vücut için yararlı oldu u kanıtlanmış probiyotik mikroorganizmaların eklenerek tüketicilere sunulan ürünlerdir. Bu ürünlerin en ba nda yo urt, kefir ve peynir gibi fermente süt ürünleri gelmektedir. Gelecekte probiyotik et ürünlerinin de üretilmesi planlanmaktadır ⁶⁰.

Probiyotik mikroorganizmalar belirli bir ara tırma sonucu yararlı oldukları anla ılan canlılardır. Probiyotikler üzerine yapılan çalı malar her ne kadar gün geçtikçe artmış olsa da bazı nedenlerden dolayı sınırlı kalmı tır ⁶¹.

Bu nedenler, çok fazla sayıda probiyotik tür ve su un bulunması, bu canlılara ait özelliklerin tam olarak bilinmemesi, farklı muhafaza ko ullarının bu canlıları nasıl etkileyece inin tam olarak bilinmemesi, tek su un bile bireylerde farklılık göstermesi ve detaylı klinik uygulamaların maliyetinin yüksek olmasıdır ⁶¹.

Probiyotik ürünlere karşı olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Bu durum üreticilerin dikkatini çekmekte ve bu yönde ürün pazarlamaktadırlar. Tüketicilerin bu konuda çok dikkatli olmaları gerekmektedir. Ürün alımında markalı ve patentli ürünleri tercih edilmelidir ^{42, 61}.

2.2. PREBİYOTİKLER ve SİMBİYOTİKLER

2.2.1. Prebiyotikler

Kolon bakterilerinin ço almalarını sa layan, aktivitelerini artıran, kolonize olmalarını kolayla tıran ve fermente olabilen gıda katkılarıdır. Probiyotiklerin ihtiyaç duydukları besin maddeleri olan prebiyotikler sindirilmeyen karbonhidratlardır ⁶²⁻⁶⁴.

Disakkaritlerden olan laktuloz, inülin en çok bilinen prebiyotiklerdir. Bunların dışında oligosakkaritlerden maltoz, ksiloz ve galaktooligosakkaritlerden oligofruktoz, galaktoz diğer prebiyotik besinsel kaynaklardır⁶⁵.

Hindiba ve enginar en fazla prebiyotik içeren besinlerdir. Bunların dışında arpa, buğday, çavdar, soğan, sarımsak, muz, kuru konmaz ve pırasa da prebiyotik ihtiva eden besin kaynaklarıdır⁶⁴.

Bir besin kaynağının prebiyotik olarak kullanılabilmesi için şu özellikleri taşıması beklenir^{62,66}.

- Sindirime dirençli olmalı,
- Kolon mikroflora bakterileri tarafından hidrolize edilmeli,
- Bir veya kısıtlı sayıda olmak üzere daha çok bakterinin çoğalmasını stimüle etmeli,
- Konakçının sağlığı üzerinde olumlu etkileri olmalı

2.2.2. Sinbiyotikler

Sinbiyotikler, probiyotiklerle birlikte prebiyotiklerin karıştırılarak hazırlanmasıyla oluşan besin ve destek amaçlı ürünlerdir. Probiyotiklerin besin maddesi olan prebiyotiklerle birlikte verilmesi ile onların daha uzun süre canlı kalabilecekleri düşünülmektedir. Böylece sinbiyotiklerin sağlığına olumlu etkileri probiyotik ve prebiyotiklerin ayrı ayrı uygulanmalarına göre daha fazla olacaktır^{67,68}. *Lactobacillus* türleri ile Lactitol'un birlikte verilmesi buna bir örnektir¹⁹.

2.3. *Lactobacillus* CİNSİNE AİT BAKTERİLERİN ÖZELLİKLERİ

Lactobacillus cinsi bakteriler *Lactobacillaceae* familyasına ait olup LAB (Laktik Asit Bakterileri) grubundandır. *Lactobacillus* türleri gram pozitif, katalaz

negatif, spor olu turamayan, genelde hareketsiz, fakültatif anaerob veya mikroaerofilik mikroorganizmalardır. Ço u basil olmakla birlikte bazı türler kokobasildir ⁶⁹⁻⁷¹.

Lactobacillus türlerinin geli ebilmeleri için aminoasit, peptit, nükleik asit türevi vitamin, tuz, ya asidi veya ya asidi esterleri ile fermente edebilecekleri besin maddelerine ihtiyaç duyarlar ⁷². Ayrıca geli ebildikleri optimum sıcaklık 30-40°C arasındadır. Bu mikroorganizmalar fermentasyon sonucu laktik asit ürettikleri için ortamı pH'sını 3.2-3.5'e kadar dü ürürler. Bu nedenle de aside dayanıklıdır ⁷³.

Elektron mikroskopuyla yapılan incelemelerde *Lactobacillus* cinsi bakteriler 5 ana kısımdan olu tu u gösterilmi tir. Bunlar hücre duvarı, sitoplazmik membran, ribozomlar ve nükleer (kromozomlar ve plazmidler) elementlerdir ⁷⁴.

Hücre duvarı; *Lactobacillus* cinsi bakterilerde 20-40 nm kalınlı nda, mineral maddeler (tuz vb.), su ve metabolitleri geçirebilen peptidoglikan (murein) bir tabakaya sahiptirler Peptidoglikan, N-asetilglukozamin ve N-asetilmurminik asit monomerlerinden olu urlar. Hücre çeperinde bu monomerlerin dı nda teikoik asit, ekerler, proteinler ve nötr polisakaritler de bulunur. Teikoik asit hücre duvarının negatif yükünden ve antijenik karakterinden sorumludur. Teikoik asit, ribitol fosfat veya gliserol fosfat polimerlerinden olu urlar. Bakterilerin hücre duvarı, ço alma ve azotlu maddelerin parçalanmasında rol alan proteaz enzimlerine sahiptirler ⁷⁴.

Probiyotiklerin en önemli karakteristik özelliklerinden bir tanesi ba ırsak adhezyon yetene ine sahip olmalarıdır. Bu yetene inde hücre duvarında bulunan teikoik asit ve lektin benzeri maddelerden kaynaklandı ı belirtilmi tir ⁷⁵.

Sitoplazmik membran; Laktik asit bakterilerinin proteinleri kullanabilece i büyüklü e getirilmesi için gerekli olan enzimler burada bulunmaktadır. Aynı zamanda bu reaksiyon sitoplazmik membranda gerçekleşmektedir. Bunun yanında sitoplazmik membranda fosfotransferaz enzimleriyle aktif ta ımada

yapılmaktadır. Peptidoglikanların ekstrasellüler polimerizasyonu için gereken enzimler de sitoplazmik membranda bulunmaktadır⁷⁴.

Ribozomlar: LAB ribozomları 70S tipindedir. 70S, 50S büyük ve 30S küçük olmak üzere iki alt üniteden oluşur. 50S'lik büyük alt birim 5S r-RNA ve 23S r-RNA ile yaklaşık 35 çeşit protein; 30S'lik küçük alt birim ise 16S r-RNA ve 25 farklı protein içerir. Laktik asit bakterilerinin birbirlerinden ayırımında 16S r-RNA'nın özelliklerinden yararlanılmakta ve 16S r-RNA'nın de i en ve de i meyen kısımlar bulunur. De i en kısımlar yakın akrabalıkları, de i meyen kısımlar ise uzak akrabalıkların tespitinde kullanılmaktadır⁷⁴.

Plazmid: Laktik asit bakterilerinin çoğu en az bir adet plazmid içerir. Plazmidler, ekzopolisakarit ve antimikrobiyal madde sentezi gibi koruma görevi üstlenmiştir⁷⁴.

Laktik asit bakterileri, glüközü laktik asit veya bunun yanında diğer ürünlere fermente etme özelliklerine göre homofermantatif ve heterofermantatif laktik asit bakterileri olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Bu ayırım bakterilerin temel yıkım yollarındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır⁷⁶.

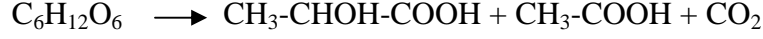
Homofermantatif laktik asit bakterileri glüközü, Fruktöz Di Fosfat (FDP) yolu ile parçalayarak fermentasyon sonucu % 99 oranında laktik asit, % 1 oranında diğer bileşikleri meydana getirirler⁷⁶⁻⁷⁹.

Homofermantatif yol:



Heterofermantatif laktik asit bakterileri, glikozu Hegzos Mono Fosfat (HMF) yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucu % 70 laktik asit üretilir. % 30 oranında da di er bile ikleri, özellikle asetik asit, etil alkol ve karbondioksiti olu tururlar⁷⁷⁻⁷⁹.

Heterofermantatif yol:



Lactobacillus türleri tarafından fermantasyon sonucu üretilen laktik asidin fermente ürünleri koruyucu etki göstermesinden dolayı, bu mikroorganizmalar yıllardır gıda endüstrisinde kullanılmaktadırlar. Ayrıca bakteriosin ve di er antimikrobiyal madde üretimleri ve GRAS (Genellikle güvenli olarak tanınan) statüsünde yer almaları nedeniyle, do al ve teknolojik uygulamalarla üretilen ve bu bakterileri içeren gıdalar insan sa lı nı hiçbir ekilde olumsuz olarak etkilemezler⁷⁰.

2.3.1 *Lactobacillus* Türlerinin Ürettikleri Antimikrobiyal Maddeler

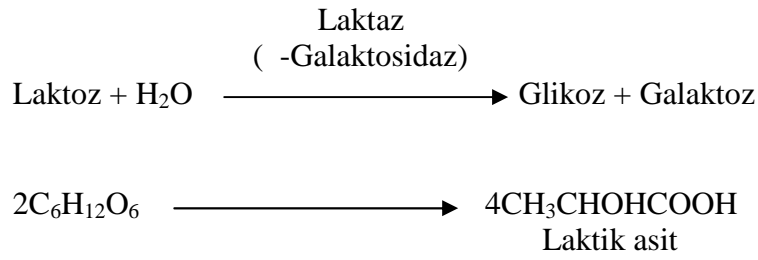
Laktik asit bakterileri, insan sa lı na faydalı olmaları ve fermantasyon yapabilmelerinden dolayı, gıdalarda uzun yıllardan beri güvenli bir ekilde kullanılmaktadırlar. Bu nedenle gıda endüstrisinde büyük öneme sahiptirler. Ayrıca bu bakterilerin gıdaların biyokontrolünde de ayrı bir önemi vardır. Patojen olan bakterilerin birço u Laktik asit bakterileri tarafından son ürün olarak üretilen bazı maddelere kar ı hassastırlar. Laktik asit bakterilerinin antagonistik etki mekanizmaları içerisinde son yıllarda üzerinde en fazla durulan maddeler Laktik asit, Hidrojen peroksit (H₂O₂) ve Bakteriosindir⁸⁰⁻⁸³.

2.3.1.1. Laktik asit

Laktik asitler, laktik asit bakterileri tarafından laktozun yıkımı sonucu olu an maddelerden biridir. Ek i tatta ve kokusuz bir organik asittir. Laktik asit

bakterilerinin inhibisyon etkisinin ço unlukla laktik asitten kaynaklandı ı söylenebilir^{80,81}.

Laktik asit olu umu, iki basamaklı reaksiyon sonucu meydana gelir. İlk olarak laktozun, laktik asit bakterileri tarafından olu turulan laktaz (-galaktosidaz) enziminin etkisiyle, glikoz ve galaktoza parçalanması gerçekte ir. Bunun ardından da glikoz laktik aside dönü ür⁸².



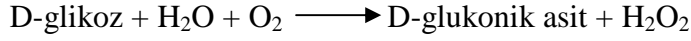
Bu de i im, homofermantatif laktik asit bakterilerinin, Embden-Meyerhof-Parnas'ın belirtti i fruktoz-1,6 difosfat metabolik yolunu izleyerek, glikoz molekülünü, 3C'lu piruvata ve ardından laktik aside dönü türmesiyle gerçekte ir. Ancak ortamda heterofermantatif laktik asit bakterileri varsa bu bakteriler, glikozun yıkımını Embden-Meyerhof-Parnas yolu yerine fosfoketolaz glikolitik yolu kullanılır. Sonuçta laktik asidin yanı sıra asetik asit, etil alkol, ve CO₂ gibi maddelerde aç ı a çıkar⁸².

Laktozun fermantasyonu sonucunda, D (-) ve L (+) laktik asit olmak üzere iki laktik asit izomeri meydana gelir. L (+) laktik asit, insan organizmasında daha hızlı ve kalıntı kalmayacak ekilde metabolize olur. D (-) laktik asit ise çok yava bir ekilde yıkıma u rar. Bu nedenle vücuda fazla miktarda D (-) laktik asidi alınımı istenmez. WHO (Dünya sa lık örgütü) ile FAO (Dünya gıda örgütü) tarafından, günlük D (-) laktik asit alınımı 60 mg/kg vücut a ırlı ı ile sınırlandırılmı tır⁸².

Laktik asit, tabiatta çok yaygın olarak bulunan asitlerden birisidir ve geni ekilde gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Laktik asit insanlar tarafından peynir, tereya ı, bira, ekmek hamuru, süttozu içeren gıdalar, sı ır, koyun ve kanatlı karkaslarında koruyucu olarak kullanılmaktadır⁸³.

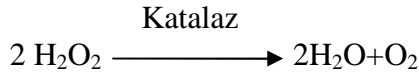
2.3.1.2. Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Bazı laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkileri H₂O₂ üretimlerine dayandırılmaktadır. H₂O₂ laktik asit bakterileri gibi katalaz negatif mikroorganizmalar tarafından aerobik artlarda üretilmektedir. Ksantin oksidaz, glukoz oksidaz, askorbik asit, sulfidril oksidaz, piruvat oksidaz, NADH oksidaz ve -gliserofosfat oksidaz veya laktat oksidaz gibi enzimlerin varlığına rağmen gerçekte en reaksiyonlarda atmosferik oksijenin doğrudan indirgenmesi ile meydana gelmektedir^{83, 84}.



H₂O₂'nin üretimi 5 °C ve 7 °C'de en yüksek seviyeye ulaşmaktadır ki bu durum asit üretimi ile zıtlık göstermektedir⁸⁵.

Hidrojen peroksit termodinamik açıdan kararsız bir bileiktir. Ortama dağıldığında katalaz varlığına su ve oksijene ayrılır⁸⁶.



2.3.1.3. Bakteriosin

Bakteriosinler, çeşitli laktik asit bakterileri tarafından üretilen, protein veya peptid yapıda, hassas hücrelerdeki reseptörlere bağlanabilen antimikrobiyal maddelerdir. Üretimleri büyük oranda plazmid DNA tarafından kodlanmaktadır. Laktik asit bakterilerinin tüm cinslerinde bakteriosin üretimi belirlenmiştir. Özellikle, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* cinslerinde bu metabolitin üretimi oldukça yaygındır. Bu cinsler içerisinde sınıflanan türlerin, bakteriosin üretim sıklıkları da birbirinden farklılık göstermektedir⁸³.

Protein veya peptitlerden oluşan ve diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik etki gösteren bakteriosinlerin proteolitik enzimlerle inhibe edilebileceği açıklanmıştır⁸⁷.

2.4. BA İRSAK MİKROFLORASI

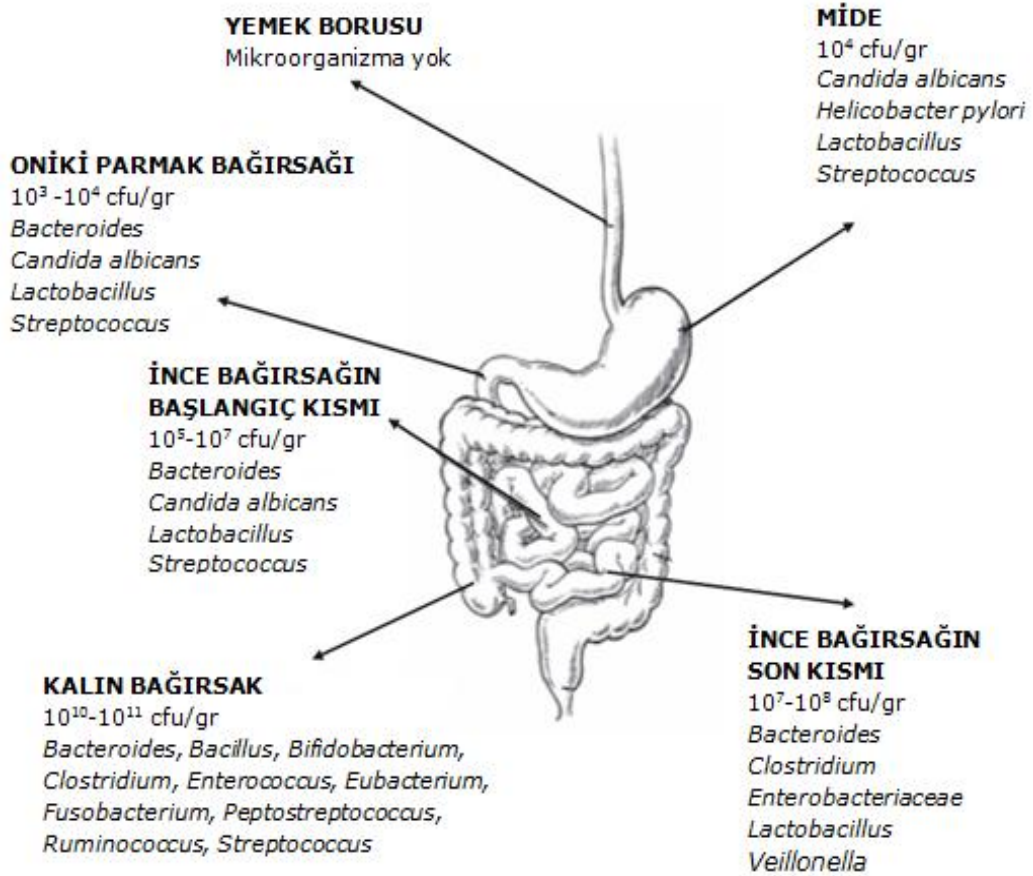
Metchnikoff sağlıklı bir yaşam için bağırsakların çok önemli bir organ olduğunu düşünmekteydi. Yaşamı boyunca bağırsaklarda gerçekleşen olayları çözmeye çalıştı ve bu organın önemini vurgulamıştır. Bu konudaki düşüncelerini hastalandığı sırada arkadaşına şöyle ifade etmiştir. “Otopsimi yapacak mısınız? Bağırsaklarıma dikkatli bak, orada birçok şey olduğunu düşünüyorum³⁰.”

Gastrointestinal sistem insan vücudunda 400m²'lik bir alana sahiptir. Bu sistemin 200m²'sini oluşturan bağırsaklar emici yüzeyi ile gıdaların sindirildiği, bilemlerin absorbe edildiği, posalı kısımların dışkı olarak atıldığı bir organdır. Bunların yanı sıra insan vücudundaki en büyük diffüzyon lenfoid bir doku özelliğinde olan mukozası ile mükemmel bir bağımsızlık sistemi organıdır^{19,88,89}.

Bir insanın yaşamı boyunca yaklaşık 60 ton yiyeceğin gastrointestinal sisteminden geçtiği hesaplanmıştır¹⁹. Bu sistem, çok geniş bir yüzey alanına sahip olması, besin maddelerinin burada sindirilmesi ve insan vücudunun sahip olduğu ısı sayesinde mikroorganizmalar için son derece uygun bir ortam oluşturmaktadır.

Yeni doğmuş bir bebek steril durumdadır. Doğumdan hemen sonra çevresindeki mikroorganizmalarla kontamine olur. İlk olarak *E. coli* ve *Streptococcus* türleri baskındır. Bebek anne sütü ile beslendikçe bu mikroorganizmaların yerini *Bifidobacterium* türleri alır. Anne sütü kesildiğinde yetkin florası oluşmaya başlar. Yetkin bir insanın bağırsaklarında yaklaşık 500 farklı türde mikroorganizma gelişebilir. Bu mikroorganizmalar kütlece 1-2 kg'a kadar ulaşabilmektedirler¹⁸.

Gastrointestinal sistemi oluşturan kısımlar mikroorganizmalar için farklı ortamlar sağlarlar. Bu nedenle her kısımda farklı türde mikroorganizmalara rastlanmaktadır. Gastrointestinal sistemde yer alan mikroorganizmalar ve yerleri ekil 1’de gösterilmiştir.



ekil 1. Gastrointestinal sistemin de i ik kısımlarında yer alan mikroorganizmalar ¹⁸.

2.5. ANTAGONOST K ETK DE KULLANILAN M KROORGAN ZMALAR

Patojen mikroorganizmalara karşı mücadelede kullanılan yöntemler önemli bir konudur. Hem ekonomik açıdan hem de kullanılan ilaçların yan etkisi bakımından en ideal olan seçilmelidir. Probiyotik bakterilerin vücut savunmasına yardımcı olduğu bilinmemektedir. Bu amaçla çalışmamızda kullanılan *Lactobacillus*

su larının günümüzde en yaygın olan patojenlere karşı antogonistik etkileri araştırılmı tır. Çalı mada kullanılan patojen mikroorganizmalar a a ıda verilmi tir

2.5.1. *Escherichia coli*

Sınıflandırmada *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan *E. coli*; gram negatif, çubuk ekinde, fakültatif anaerob, peritrik kirpikli ve kapsüler yapıda olan bir bakteridir. Boyutları 1-2 µm uzunlu unda ve 0.1-0.5 µm çapındadır. *E. coli* laktozu fermente edebilme özelli ine sahiptir^{70,90}.

E. coli bakterilerinin do al ya am ortamları insan ve hayvanların ba ırsaklarıdır. Bu özelliklerinden dolayı su ve besinlerde fekal kirlenmenin göstergesidir. *E. coli* fırsatçı bir patojendir. nsanlarda bakteri enfeksiyonlarında en sık rastlanan etkindir. Aslında ba ırsak mukozasına yerle tiklerinde di er patojenlerle rekabet halindedirler. Ancak normal flora üyesi olarak buldukları yerden ba ka yerlere ula ırlarsa ve burada üremeleri için elveri li ko ullar varsa ba ırsak dı ı enfeksiyonlar neden olmaktadır⁹⁰.

2.5.2. *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis, *Micrococcaceae* familyasından olup gram pozitif ve kok ekinde fakültatif anaerob bir bakteri türüdür. Katalaz pozitif ve koagülaz negatif özelliktedir. Zaman zaman insan ve hayvan cildinin mukoz membranlarında görülür^{90,91}.

S. epidermidis klasik fırsatçı patojenlerdendir. Yabancı cisimlerin yüzeylerinde biyofilm olu turma yetenekleri nedeniyle yabancı cisimlerle ili kili enfeksiyonlara neden olur. Bu açıdan immün sistemi yetersiz çalı an hastalar ve sürekli kateter takılı olan hastalar için büyük bir risktir^{90,91}.

2.5.3. *Neisseria* sp.

Neisseria, gram negatif, aerob, hareketsiz, sporsuz, bazen kapsüllü, oksidaz pozitif, katalaz pozitif, 0.6-1.0 µm çapındadır. Kili kokobasil ve kısa zincirler halinde görülebilir. *Neisseria*'lar genelde kokleklinde olduklarından iki dik boyutta bölünerek diplokok (mikroskopla bakıldığında kahve tanesine benzer bir yapıda) görülebilirler. İnsan vücudunda kısa sürede ölen tipik mukaza parazitleridir^{90,92}.

İnsanlarda patojen olan türler asıl olarak *N. gonorrhoeae* ve *N. meningitidis* olup, *N. flavescens*, *N. subflava*, *N. mucosa*, *N. sicca*, *N. cinerea*, *N. lactamica*, *N. denitrificans*, *N. elongata*, *N. weaveri* patojen özellik göstermeyip nazofarinks mukozasında flora elemanı olarak bulunur⁹⁰.

2.5.4. *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae; hareketsiz, sporsuz, 1-2 µm boyunda ve 0.5-0.8 µm eninde iki erli ya da kısa zincir halinde basillerdir. Gram negatif, polisakkarid yapıda kapsüllü, aerob ve fakültatif anaerob özellik gösterebilen, 37 °C ve pH 7'de iyi üreyen bakterilerdir⁹³.

E. coli gibi *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan *K. pneumoniae*, sağlıklı insanlarda üst solunum yolu ve dışkı florasının % 5-10'unu oluşturan bir bakteri olduğu için patojenliği uygunsuz koşullar karşısında fırsatçı patojen olarak ortaya çıkar. Bu nedenle hastane enfeksiyonlarından sorumlu bir bakteridir^{93,94}.

K. pneumoniae, pnömoninin yanı sıra idrar yolları enfeksiyonuna, yara enfeksiyonuna ve bakteriyemiye neden olmaktadır⁹³.

2.5.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Gram negatif, zorunlu aerobik, basil veya kokobasil ekinde, 0.5-0.8 µm eninde 1.5-3.0 µm boyunda, sporsuz ve polar flagellası ile hareket edebilen, katalaz pozitif, sitrat pozitif, metil kırmızısı negatif, Voges Proskauer negatif, bir bakteri olan *P. aeruginosa*, insan patojenidir. En iyi 37 °C'de üremekte olup 42 °C'de de üreyebildikleri rapor edilmektedir^{93,95}.

Genç kültürler, üzerinde büyüebildiği ortamlarda genellikle mavi-yeşil bir pigment çıkarır. Aerobik olmaları nedeniyle gıdaların yüzeyinde hızlı gelişebilmeleri sonucu okside ürünler ve mukoz madde oluşurlar⁹³.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Materyal Örnekleri

Bu çalı mada kullanılan 25 adet *Lactobacillus* cinsine ait bakteriler, belirli bir ikayet üzerine Kır ehir Devlet Hastanesine ba vuran 25-50 ya arası 48 hastanın gaitasından izole edilmi tir. Örneklerin alımında hastalarda ba ırsak problemlerinin olmamasına dikkat edilmi tir.

Lactobacillus spp. su larının antagonistik etkilerinin tespiti için kullanılan *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (ATCC 25656) *S. epidermidis* (ATCC 12228) ve *Neisseria* sp. zmir Behçet Uz Çocuk Hastanesi kültür kolleksiyonundan temin edilmi tir.

3.1.2. Bakterilerin Aktifle tirilmesi ve Geli me Ortamları

Çalı mada kullanılan tüm test bakterileri uygun sıvı besiyeri ve sıcaklıkta 24-48 saat inkübe edilerek aktifle tirilmi tir. *Lactobacillus* türleri için MRS (Man Ragoza and Sharpe) broth ve agarı (Merck) kullanılmı tir. Ayrıca *Lactobacillus* su larının antimikrobiyal analizi için sisteinli MRS agar kullanılmı tir. *Lactobacillus* su larını inhibitör etkilerinin tespiti için kullanılan *E. coli* (ATCC 25922), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *Neisseria* sp., *K. pneumoniae* (ATCC 25656) ve *P. aeruginosa* (ATCC 27853), aktifle tirilmesi ve stoklanması için Nutrient sıvı ve katı besiyeri (Merck), inhibitör etki çalı masında ise Muller Hinton katı besiyeri (Merck) kullanılmı tir.

3.1.3. Çalı malarda Kullanılan Besiyerleri

MRS (Man Ragosa and Sharpe) Sıvı Besiyeri

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Pepton	10.0
Beef Ekstrakt	10.0
Yeast Ekstrakt	5.0
Glikoz	20.0
Tween 80	1.08 mL
K ₂ HPO ₄	2.0
Sodyum Asetat.3H ₂ O	5.0
Tri-Amonyum Hidrojen Sitrat	2.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.05

Maddeler 1000 mL distile suya ilave edilmi tir. Besiyerinin pH'sı 0.01 N HCl ve 0.01 N NaOH kullanılarak 6.2 ± 0.2 'ye ayarlanmı tır. Amaca uygun olacak ekilde besiyerine %1.5 oranında agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlanmı tır. Hazırlanan bütün besiyerleri 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmi tir⁹⁶.

Nutrient Sıvı Besiyeri

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Pepton	5.0
Beef Ekstrakt	1.0
Yeast Ekstrakt	2.0
Sodyum Klorür	5.0

Maddeler 1000 mL distile suya ilave edilmi tir. Besiyerinin pH'sı 0.01 N HCl ve 0.01 N NaOH kullanılarak 6.2 ± 0.2 'ye ayarlanmı tır. Amaca uygun olacak ekilde besiyerine % 1.5 oranında agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlanmı tır.

Hazırlanan bütün besiyerleri 121 °C’de 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmi tir

97

Sisteinli MRS Besiyeri

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Pepton	10.0
Beef Ekstrakt	10.0
Yeast Ekstrakt	5.0
Glikoz	20.0
Tween 80	1.08 mL
K ₂ HPO ₄	2.0
Sodyum Asetat.3H ₂ O	5.0
Tri-Amonyum Hidrojen Sitrat	2.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.05
L-Sistein	2.0
Na ₂ HPO ₄	2.0

Maddeler 1000 mL distile suya ilave edilmi tir. Amaca uygun olacak ekilde besiyerine % 1.5 oranında agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlanmı tir. Hazırlanan bütün besiyerleri 121 °C’de 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmi tir⁹⁸.

Muller Hinton Besiyeri

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Meat infusion	2.0
Casein hydrolysate	17.5
Starch	1.5

Maddeler 1000 mL distile suya ilave edilmi tir. Amaca uygun olacak ekilde besiyerine % 1.5 oranında agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlanmı tir. Hazırlanan bütün besiyerleri 121 °C’de 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmi tir⁹⁹.

Dü ük Asitli (pH 2.0, 2.5 ve 3.0) MRS Sıvı Besiyeri

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Pepton	10.0
Beef Ekstrakt	10.0
Yeast Ekstrakt	5.0
Glikoz	20.0
Tween 80	1.08 mL
K ₂ HPO ₄	2.0
Sodyum Asetat.3H ₂ O	5.0
Tri-Amonyum Hidrojen Sitrat	2.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.05

Maddeler 1000 mL distile suya ilave edilmi tir. MRS sıvı besiyeri 3 N HCl ile pH 2.0, 2.5 ve 3.0 ayarlanmı ve 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilizasyon yapılmı tir¹⁰⁰.

Yüksek Konsantrasyonlu Safra Tuzlu (%0.3, %0.5, %1.0 ve %1.5 Ovgall)

MRS Besiyeri

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Pepton	10.0
Beef Ekstrakt	10.0
Yeast Ekstrakt	5.0
Glikoz	20.0
Tween 80	1.08 mL
K ₂ HPO ₄	2.0
Sodyum Asetat.3H ₂ O	5.0
Tri-Amonyum Hidrojen Sitrat	2.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.05

Maddeler 1000 mL distile suya ilave edilmi tir. Sıvı MRS besiyerine % 0.3, % 0.5, % 1.0 ve % 1.5 (w/v) oranlarda safra tuzu (oxgall) ilave edilmi tir. Besiyerleri 121 °C’de 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmi tir ¹⁰¹.

Safra Tuzu Hidroliz Besiyeri

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Pepton	10.0
Beef Ekstrakt	10.0
Yeast Ekstrakt	5.0
Glikoz	20.0
Tween 80	1.08 mL
K ₂ HPO ₄	2.0
Sodyum Asetat.3H ₂ O	5.0
Tri-Amonyum Hidrojen Sitrat	2.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.05

Maddeler 1000 mL distile suya ilave edilmi tir. Safra tuzu,% 0.5 kolik asit, % 0.37g/L CaCl₂ ilave edilmi tir. Hazırlanan besiyeri 121 °C’de 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmi tir ¹⁰².

Antagonistik (% 0.2’lik glikozlu) MRS Sıvı Besiyeri

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Pepton	10.0
Beef Ekstrakt	10.0
Yeast Ekstrakt	5.0
Glikoz	0.20
Tween 80	1.08 mL
K ₂ HPO ₄	2.0
Sodyum Asetat.3H ₂ O	5.0
Tri-Amonyum Hidrojen Sitrat	2.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.05

Maddeler 1000 mL distile suya ilave edilmi tir. Hazırlanan besiyeri 121 °C’de 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmi tir¹⁰³.

3.2.METOD

3.2.1. zolatların zolasyonu ve dendifikasyonu

Kır ehir Devlet hastanesine ba vurmu 25-50 ya arası 48 hastadan alınan gaitalar steril serum fizyolojik ile seyreltilerek MRS agar üzerine çizgi ekim yapılmı , anaerob jarda 24-48 saat inkübasyona bırakılmı tır. nkübasyon sonucunda petrilere olu an kirli beyaz, beyaz ve opak koloniler alınımı , faz-kontrast mikroskopta Gram özelli i incelenerek, Gram pozitif, basil bakteriler seçilerek numaralandırılmı tır¹⁰⁴. Numaralandırılan su ların idendifikasyonu API 50 CHL Medium (Bio Mérieux La Bali Grottes, France) kullanılarak yapılmı tır.

API 50 CH mikroorganizmaların karbonhidrat metabolizmasının çalı masını sa layan 50 biyokimyasal testten olu an bir sistemdir. API 50 CH, *Lactobacillus* ve ilgili türlerin tanımlanması için API 50 CHL Medium ile kullanılır. API 50 CH sribi, karbonhidrat ailesi ve onun türevlerine ait olan substratların fermantasyonunu kullanan 50 mikro tüp içermektedir. Fermantasyon testleri substratları sulandıran API 50 CHL Medium ile eklenir. nkübasyon sırasında, fermantasyon asidin anaerobik üretimi ile ve seçilen besiyerinde bulunan pH indikatörü tarafından saptanan tüpte renk de i imi olarak ortaya çıkar.

3.2.2. *Lactobacillus* spp. Su larının Muhafazası

Eppendorflar, içerisine yakla ık 300 µL gliserol (Merck) da ıtılarak, 121 °C’de 15 dakika süreyle steril edilmi tir. Gaitadan izole edilen su lar MRS broth besiyerinde 37 °C’de 24 saat süreyle anearob ortamda ard arda iki kez aktifle tirilmi , aktif kültürlerden 600 µL alınarak gliserol içeren steril eppendorflara

paralelli olarak aktarılmı tır. Derin dondurucuda -20 °C’de depolanarak muhafaza edilmi tir ⁸¹.

3.2.3. Patojen Su ların Aktifle tirilmesi ve Muhafazası

Lactobacillus su larının patojen mikroorganizmalar üzerine antagonostik etkilerinin tespiti amaçlı kullanılan *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (ATCC 25656) *S. epidermidis* (ATCC 12228) ve *Neisseria* sp. bakterileri Nutrient Broth besiyerinde 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılarak aktifle tirilmi olup yatık Nutrient Agar besi yerinde + 4 °C’de buz dolabında muhafaza edilmi tir ¹⁰⁵.

3.2.4. Asit Dirençlili inin Belirlenmesi

16 saatlik durgun fazdaki aktif *Lactobacillus* spp. su ları, HCl (3.0 M) ile farklı pH de erlerine ayarlanan (2, 2.5 ve 3) taze MRS broth besi yerine inoküle edilmi tir. Daha sonra örnekler 37 °C’de 3 saat inkübasyona bırakılmı tır. inkübasyon sonrası alınan örneklerin ortalama asitli ini nötralize etmek için, hazırlanan PBS (Fosfat solüsyonu) çözeltisinde (0.01M ve pH 6.2 ekinde ayarlanmı) seri dilüsyonlar (10^{-1} 10^{-7}) yapılmı , seyreltilen kültürlerden 100 µL alınarak MRS katı besiyeri üzerine drigalski spatülü yardımı ile yayma ekim yapılmı tır. 37 °C’de 24 saatlik inkübasyon sonrası petri yüzeyindeki canlı mikroorganizma sayısı tespit edilmi tir ¹⁰⁰.

3.2.5. Yüksek Safra Tuzu (Oxgall) Konsantrasyonlarına Dirençlili in Belirlenmesi

zole edilmi türlerin safra tuzu varlı ında canlılı ını koruyabilirli i, Dunne ve ark.(2001) metoduna göre yapılmı tır. çerisine % 0.3, % 0.5, % 1.0 ve % 1.5 (w/v) oranlarda oxgall (sigma) ilave edilmi MRS broth besiyerine, 16 saatlik durgun fazdaki *Lactobacillus* spp. su ları inoküle edilerek, 37 °C’de 3 saat inkübasyona

bırakılmıştır. inkübasyon sonunda her kültürden $5 \log_{10}$ CFU (10^5 CFU) fizyolojik su içerisinde dilüsyon yapılmıştır. Seyreltilen kültürlerden 100 µL alınarak MRS katı besiyeri (pH 6.2) üzerine yayma ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. inkübasyon sonrası plak üzerinde canlı koloni sayımı yapılmıştır^{106, 107}.

3.2.6. Safra Tuzu (Kolik Asit) Hidrolizinin Belirlenmesi

Lactobacillus spp. su larının Safra tuzu (kolik asit) hidrolizinin belirlenmesi amacı ile hazırlanan MRS agar besiyerine % 0.5 kolik asit, % 0.37 g/L CaCl₂ ilave edilmiştir. Hazırlanan bu besiyeri 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası petrilere dökülen besiyerleri soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan besiyeri yerine 16 saatlik taze kültürlerden 10 µL alınarak yayma ekim yapılmıştır. 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılan su ların safra hidroliz aktivitesi, inkübasyon sonrasında opak tanecikli beyaz kolonilerin etraflarında zon oluşumu ve zon oluşumuna özelliklerine göre değerlendirilmiştir^{102, 108}.

3.2.7. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Gaitadan izole edilen *Lactobacillus* spp. su larının ampisilin (10 µg), basitrasin (10 unit), eritromisin (15 µg), gentamisin (10 µg), meropenem (10 µg), penisilin (10 unit), piperasilin (100 µg), rifampin (5 µg), seftazidim (10 µg), teikoplanin (30 µg), tetrasiklin (30 µg), trimetoprim (5 µg), vankomisin (30 µg), antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları test edilmiştir.

İzole edilmiş *Lactobacillus* spp. su ları 37 °C'de ard arda iki kez MRS sıvı besiyerinde aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerden 100 µL alınarak sisteinli MRS katı besiyeri içeren petrilere aktarılmıştır, steril drigalski spatülü ile yayma ekim yapılmıştır. İçerisinde besiyeri ve bakteri içeren bu petrilere üzerine denenecek olan antibiyotik diskler steril bir şekilde yerleştirilmiştir ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. inkübasyon sonucunda antibiyotik disk çevresinde oluşan zonların

çapları kumpas ile milimetrik olarak ölçülmü tür. Sonuçlar NCCLS (Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi) kriterlerine göre de erlendirilmi tir ¹⁰⁹⁻¹¹².

3.2.8. Bazı Patojen Mikroorganizmalara Karşı Antagonistik Etkilerin Belirlenmesi

zole edilen *Lactobacillus* su ları 37 °C’de ard arda iki defa MRS sıvı besi yerinde aktifle tirilmi tir. Aktif kültürler 5000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmi tir. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant steril artlarda alınıp 0.45 µm’lik disposable filtreden geçirilerek mikrofiltrasyon yolu ile steril edilmi tir ¹⁰⁹.

Çalı mada patojen olarak seçilen *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (ATCC 25656) *S. epidermidis* (ATCC 12228) ve *Neisseria* sp. Nutrient sıvı besiyerinde uygun sıcaklıkta inkübe edilerek aktifle tirilmi tir. Aktif kültürlerden 50 µL alınarak içerisinde 50 °C’de 20 mL Muller Hinton (Merck) agar steril besiyeri bulanan petrilere aktarılmı tir. Besiyeri ve bakterilerin homojen bir ekilde karı ımı sa lanmı ve besiyeri donana kadar oda sıcaklı ında beklenmi tir. Besiyeri dondu unda üzerine 8 mm kalınlı ında steril çubukla kuyucuklar açılmı tir ve kuyucukların tabanı steril agarla sıvanmı tir. Ba langıçta *Lactobacillus* su larından elde edilen steril süpernatantlardan 100 µL alınarak, açılan kuyucuklara aktarılmı tir. Petriler 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmı tir. 24 saat sonunda kuyucuk çevresinde olu an zon çapları kumpas yardımı ile milimetrik olarak ölçülmü tür ¹¹³⁻¹¹⁶.

3.2.9. *Lactobacillus* spp. Su ları Tarafından Üretilen Bakteriosin veya Bakteriosin Benzeri Maddelerin nhibitör Etkisinin Belirlenmesi

Lactobacillus su larının bakteriosin üretimleri anaerobik (jar ve CO₂ kiti kullanılarak) artlarda belirlenmi tir. Bu amaçla 16 saatlik aktif kültürlerden alınarak % 0.2 oranında glikoz içeren MRS sıvı besiyerine inokülasyon yapılarak 37 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmı tir. nkübasyon sonunda, laktik asidin inhibisyon etkisini

gidermek için kültürlü MRS Broth'un pH'sı 1 N NaOH ile 6.5' e ayarlanıp 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjle elde edilen süpernatant 0.45 µm'lik membran filtreden geçirilerek mikrofiltrasyon yolu ile steril edilmiştir¹¹⁷.

Patojen bakteriler, Nutrient Broth besiyerinde uygun sıcaklıkta inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerden 50 µL alınarak içerisinde 50 °C'de 20 mL Muller Hinton agar steril besiyeri bulunan petrilere aktarılmıştır. Besiyeri ve bakterilerin homojen bir şekilde karıştırılması ve besiyeri donana kadar oda sıcaklığında beklenmiştir. Besiyeri donduğunda üzerine 8 mm kalınlığında steril çubukla kuyucuklar açılmıştır ve kuyucukların tabanı steril agarla sıvanmıştır. Başlangıçta *Lactobacillus* suşlarından elde edilen ve pH 6.5'e ayarlanmış steril süpernatantlardan 100 µL alınarak, açılan kuyucuklara aktarılmıştır. Petriler 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda kuyucuk çevresinde oluşan zon çapları kumpas yardımı ile milimetrik olarak ölçülmüştür¹¹⁸.

3.2.10. *Lactobacillus* spp. Suşlarının Kolesterol Giderimi

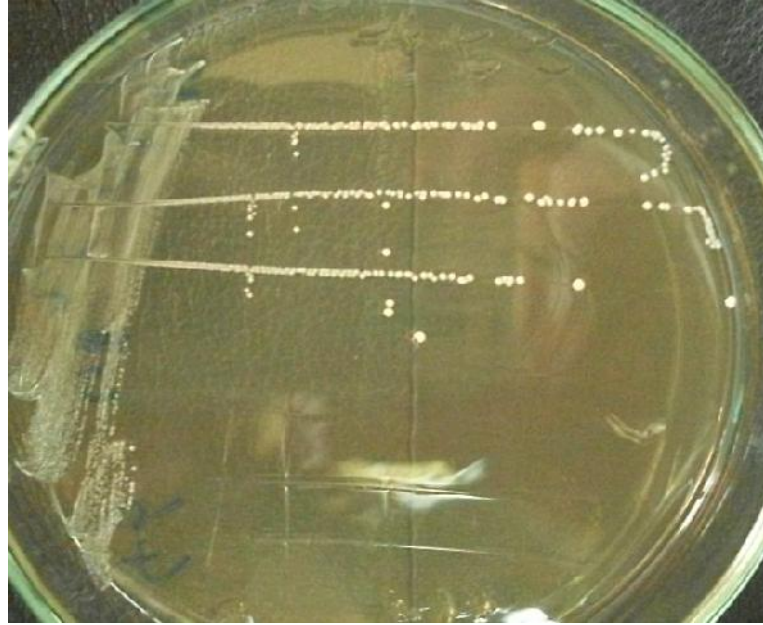
Çalı mada düşük asitli ve yüksek safra tuzuna dayanıklı, safra tuzu aktivitesi yüksek, antagositik etkiye sahip *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2, *L. plantarum*1 LS-11, *L. plantarum*1 LS-12 ve *L. fermentum*2 LS-15 suşları seçilerek kolesterol giderimi çalışılmıştır. Çalışma önceden MRS sıvı besiyeri içersine % 0.3'lük oxgall, kolik asit ve taurocholic asit ilave edilerek 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir. Kolesterolü yüksek olan hastalardan alınan kan (500 mg/dl) 10000 rpm de 10 dakika santrifüj yapılarak üstte kalan sıvı kısımdan (serum) besiyerlerine (1/4 v/w) oranlarında eklenmiştir. Elde edilen karı mından 10'ar mL alınarak steril tüplere dağıtılmıştır. Deneyler bir birinden bağımsız 2'er paralel olarak yürütülmüştür. Daha önce hazırlanan *Lactobacillus* kültürlerinden 5 log₁₀ CFU (10⁵ CFU) dilisyonundan 100 µL alınarak besiyerlerine inoküle edilmiştir ve kültürler 37 °C'de 24 saat süreyle anaerob ortamda inkübasyona bırakılmıştır. inkübasyon sonrasında tüpler 10000 rpm 10 dakika santrifüj edilmiştir, santrifüj sonunda elde edilen süpernatant ile kolesterol miktarı enzimatik yöntemle SYNCHRON® Systems (Beckman Coulter, USA) kiti ile Unicel DxC800 model

otoanalizator (Beckman Coulter, USA) cihazında saptanmı tır. Sonuçlar mg/dl'den $\mu\text{g/ml}$ 'ye evrilmi tir ¹¹⁹.

4. BULGULAR VE TARTI MA

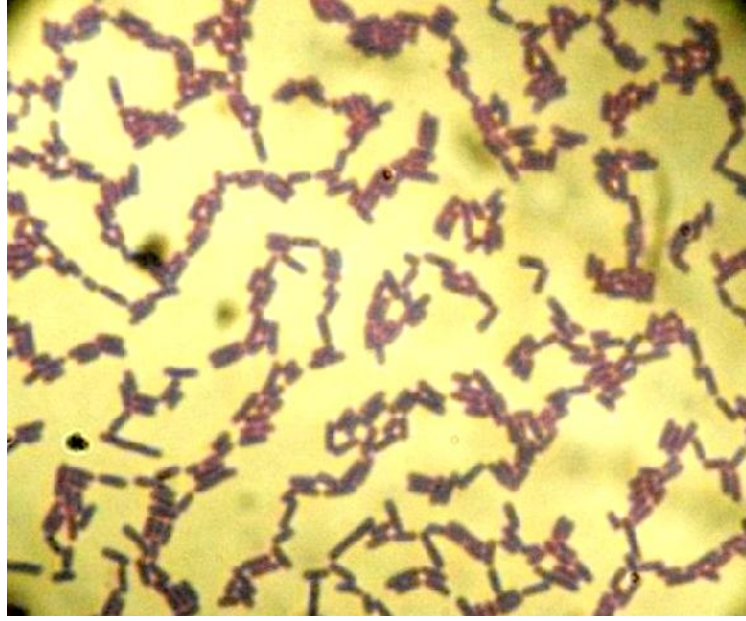
4.1. ZOLATLARIN DEND F KASYONU

Bölüm 3.2.1’de anlatıldı ı gibi gaitalardan elde edilen örnekler inkübe edilmi , inkübasyon sonucunda ilk olarak koloni morfolojilerine göre bir elemine yapılmı tır. Resim. 1’de *L. salivarius* LS-22 su unun 24 saatlik inkübasyon sonrasında petri kabında olu an koloni görünümünün foto rafları verilmi tir.



Resim 1: MRS Agar üzerinde 48 saat inkübasyona bırakılmı *L. salivarius* LS-22 su unun Samsung S760 foto raf makinesi ile çekilmi görüntüsü.

Resim 1’de görüldü ü üzere kirli beyaz, beyaz ve opak koloniler alınmı , faz-contrast mikroskopta gram özelli i incelenerek, gram pozitif, basil bakteriler seçilerek numaralandırılmı tır. Resim 2’de *L. pentosus* LS-2 su unun mikroskop görüntüsü verilmi tir.



Resim 2: *L. pentosus* LS-2 suunun Olympus, CH-2 CHT model 1 ık mikroskobunda 100x10 büyütmde görünümü

Numaralandırılan su ların idendifikasyonu API 50 CHL medium (Bio Mérieux La Bali Grottes, France) kullanılarak yapılmı tır. Yaptı ımız bu çalı mada, 25 adet *Lactobacillus* spp. su u izole edilmi ve 8 farklı *Lactobacillus* spp. tanımlanmı tır. Gaitadan izole edilen su ların türlere göre da ılımı 11 adet *L. plantarum*1 (% 44), 6 adet *L. fermentum*2 (% 20), 3 adet *L. pentosus* (% 12), 1 adet *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (% 4), 1 adet *L. paracasei* subsp. *paracasei* (% 4), 1 adet *L. lactis* subsp *lactis* (% 4), 1 adet *L. curvatus* (% 4) ve 1 adet *L. salivarius* (% 4) olarak tespit edilmi tır. Su ların isim ve numaraları Tablo. 2' de verilmi tır.

Jacobsen ve ark. (1999)¹²⁰ tarafından yapılan bir çalı mada sa lıklı yeti kin ve çocuklardan alınan feçeslerde *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. plantarum*, su ları izole edilmi tır. Moser ve Savage (2001)' nin¹²¹ yaptıkları bir çalı mada yeti kin ve bebek feçeslerinden *L. fermentum*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* su larının izole edildi i bildirilmi tır. Martin ve ark. (2006)¹²² tarafından yapılan ba ka bir çalı mada ise 1 aylık bebek feçeslerinden *L. salivarius* su u izole edilmi tır. Klare ve ark. (2007)¹²³ tarafından yapılan insan kaynaklı *Lactobacillus* spp. su larının izole

edilmeye çalışıldı. 1 bir ara tırmada ise *L. fermentum*, *L. plantarum* ve *L. salivarius* bakterilerinin izole edildiği rapor edilmektedir.

Tablo 2. Gaitadan izole edilerek tanımlanan su ların adları ve kodları

SU ADI	SU NO
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	LS-1
<i>L. pentosus</i>	LS-2
<i>L. pentosus</i>	LS-3
<i>L. plantarum</i> 1	LS-4
<i>L. fermentum</i> 2	LS-5
<i>L. plantarum</i> 1	LS-6
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	LS-7
<i>L. plantarum</i> 1	LS-8
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	LS-9
<i>L. plantarum</i> 1	LS-10
<i>L. plantarum</i> 1	LS-11
<i>L. plantarum</i> 1	LS-12
<i>L. pentosus</i>	LS-13
<i>L. plantarum</i> 1	LS-14
<i>L. fermentum</i> 2	LS-15
<i>L. fermentum</i> 2	LS-16
<i>L. curvatus</i>	LS-17
<i>L. plantarum</i> 1	LS-18
<i>L. fermentum</i> 2	LS-19
<i>L. plantarum</i> 1	LS-20
<i>L. plantarum</i> 1	LS-21
<i>L. salivarius</i>	LS-22
<i>L. plantarum</i> 1	LS-23
<i>L. fermentum</i> 2	LS-24
<i>L. fermentum</i> 2	LS-25

4.2. *Lactobacillus* spp. SU LARIN AS T D RENÇL L

Lactobacillus spp. su larının asit dirençlilikleri Bölüm 3.2.3'te anlatıldı ı ekilde tespit edilmi tir. Sonuçlar Tablo 3'te verilmi tir.

Tablo 3. *Lactobacillus* su larının dü ük pH (2.0, 2.5 ve 3.0) derecelerine toleransı. (24 saat sonra)

zolatlar	Farklı pH de erleri		
	2.0	2.5	3.0
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> LS-1	6x10 ⁷	24x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. pentosus</i> LS-2	6x10 ⁷	18x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. pentosus</i> LS-3	18x10 ⁷	30x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. plantarum</i> 1 LS-4	12x10 ⁷	24x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. fermentum</i> 1 LS-5	24x10 ⁷	24x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. plantarum</i> 1 LS-6	18x10 ⁷	30x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LS-7	12x10 ⁷	30x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. plantarum</i> 1 LS-8	12x10 ⁷	30x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LS-9	12x10 ⁷	30x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. plantarum</i> 1 LS-10	6x10 ⁷	30x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. plantarum</i> 1 LS-11	6x10 ⁷	24x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. plantarum</i> 1 LS-12	18x10 ⁷	24x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. pentosus</i> LS-13	12x10 ⁷	24x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. plantarum</i> 1 LS-14	18x10 ⁷	24x10 ⁷	24x10 ⁷
<i>L. fermentum</i> 2 LS-15	30x10 ⁷	34x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. fermentum</i> 2 LS-16	12x10 ⁷	30x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. curvatus</i> LS-17	12x10 ⁷	18x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. plantarum</i> 1 LS-18	12x10 ⁷	30x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. fermentum</i> 2 LS-19	6x10 ⁷	30x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. plantarum</i> 1 LS-20	30x10 ⁷	30x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. plantarum</i> 1 LS-21	18x10 ⁷	30x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. salivarius</i> LS-22	15x10 ⁷	24x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. plantarum</i> 1 LS-23	6x10 ⁷	24x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. fermentum</i> 2 LS-24	6x10 ⁷	18x10 ⁷	30x10 ⁷
<i>L. fermentum</i> 2 LS-25	30x10 ⁷	18x10 ⁷	30x10 ⁷

Dü ük pH'ya dirençlilik probiyotik mikroorganizmalar için çok önemli bir kriterdir. Probiyotik mikroorganizmaların ince ba ır sa a gelene kadar mide asitli ine yakın pH de erlerine (< 3.0) dayanabilmeleri gerekmektedir ¹²⁴.

Tablo 3'te de görüldü ü gibi pH de eri yükseldikçe hücrelerin canlı kalma sayılarında bir artı gözlenmektedir. Genel olarak pH 3.0 seviyesinde bütün mikroorganizmaların canlılıklarını korudukları gözlenmektedir.

Yaptı ımız çalı mada *Lactobacillus* su larının asit dirençleri ile ilgili elde etti imiz sonuçlara benzer sonuçları Prasad ve ark.'larında (1999) ¹²⁵ bulmu tur. Yapılan bu çalı mada insanlardan, süt ve süt ürünlerinden izole ettikleri *Lactobacillus* su larını pH 3.0'te 3 saat canlılıkları incelenmi tir. Sonuçta bu su ların % 80 oranında canlılıklarını koruduklarını gözlemlemi lerdir. Xanthopoulos ve ark.'nın (2000) ¹²⁶ yapmı oldu u ba ka bir çalı mada ise, bebek feçeslerinden izole edilmi *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, ve *L. rhamnosus* türlerinden olu an 20 su un pH 3.0 de canlılıklarını %0.1-73.3 oranında korudukları belirtilmi tir.

Asit dirençlili i çalı mamızda pH 2.0 de erinde ise canlı kalabilme oranlarında pH 3.0'e göre bir dü ü gözlenmektedir *L. fermentum1* LS-5, *L. fermentum2* LS-15, *L. plantarum1* LS-20 ve *L. fermentum2* LS-25 su larının canlılıklarını di er su lara göre daha iyi korudukları tespit edilmi tir. *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2, *L. plantarum1* LS-10, *L. plantarum1* LS-11, *L. fermentum2* LS-19, *L. plantarum1* LS-23 ve *L. fermentum2* LS-24 su larının ise dü ük pH de erlerine dirençlerinin daha zayıf oldu u tespit edilmi tir.

Pereira ve Gibson (2002) ¹²⁷, insan feçesinden izole ettikleri *L. fermentum* KC5b su unun pH 2'de 2 saat canlılı ını sürdürebilmesi ile aside toleranslı su olarak belirlemi lerdir. Haller ve ark. (2001) ¹²⁸ tarafından yapılan bir çalı mada çe itli kaynaklardan izole edilen *Lactobacillus* su larının pH 2.0 de canlılıkları % 0-93 olarak tespit edilmi tir. Bu çalı maya göre farklı türlerin hatta aynı su a ait türlerin, pH dirençlerinin farklı olmasının sebebi bakterilerin üreme fazındaki farklılıktan kaynaklandı ı belirtilmi tir.

4.3. *Lactobacillus* spp. SU LARIN YÜKSEK SAFRA TUZU (OXGALL) KONSANTRASYONLARINDA D RENÇL L

Probiyotik mikroorganizmalar için bir di er önemli kriter ise safra tuzlarına karşı dirençliliğidir. Çünkü insan sindirim sistemine giren bakteriler midenin asit ortamından geçtikten sonra ba ırsaklarda safra asitleri ve tuzları ile karşılaşır. Bu bakterilerin canlı kalabilmeleri açısından safra tuzu toleranslarının yüksek olması gerekmektedir ¹²⁵.

De ğerli safra konsantrasyonlarında (% 0.3, % 0.5, % 1.0 ve % 1.5) 3 saatlik inkübasyona bırakılan *Lactobacillus* su larının safra tuzu dirençlili ği Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. *Lactobacillus* spp. su larının de i ik düzeyde (% 0.3, % 0.5, % 1.0 ve % 1.5) safra tuzu (oxgall) toleransı

zolatlar	Farklı safra tuzu (oxgall) konsantrasyonları (%)			
	0.3	0.5	1.0	1.5
	Canlı mikroorganizma sayısı (24 saat sonra) (cfu/ml)			
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> LS-1	1320x10 ⁶	420x10 ⁶	240x10 ⁶	120x10 ⁶
<i>L. pentosus</i> LS-2	600x10 ⁶	300x10 ⁶	160x10 ⁶	100x10 ⁶
<i>L. pentosus</i> LS-3	120x10 ⁶	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 1 LS-4	360x10 ⁶	240x10 ⁶	-	-
<i>L. fermentum</i> 1 LS-5	60x10 ⁶	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 1 LS-6	280x10 ⁶	-	-	-
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LS-7	240x10 ⁶	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 1 LS-8	180 x10 ⁶	60 x10 ⁶	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LS-9	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 1 LS-10	120 x10 ⁶	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 1 LS-11	180 x10 ⁶	180 x10 ⁶	120 x10 ⁶	120x10 ⁶
<i>L. plantarum</i> 1 LS-12	180 x10 ⁶	120 x10 ⁶	100 x10 ⁶	60 x10 ⁶
<i>L. pentosus</i> LS-13	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 1 LS-14	-	-	-	-
<i>L. fermentum</i> 2 LS-15	300 x10 ⁶	260 x10 ⁶	200 x10 ⁶	160 x10 ⁶
<i>L. fermentum</i> 2 LS-16	420 x10 ⁶	300 x10 ⁶	60 x10 ⁶	-
<i>L. curvatus</i> LS-17	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 1 LS-18	180 x10 ⁶	-	-	-
<i>L. fermentum</i> 2 LS-19	720 x10 ⁶	240 x10 ⁶	-	-
<i>L. plantarum</i> 1 LS-20	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 1 LS-21	120 x10 ⁶	-	-	-
<i>L. salivarius</i> LS-22	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 1 LS-23	360x10 ⁶	-	-	-
<i>L. fermentum</i> 2 LS-24	120 x10 ⁶	-	-	-
<i>L. fermentum</i> 2 LS-25	180 x10 ⁶	60 x10 ⁶	-	-
Canlı kalma oranı	%76	%40	%24	%20

Tablo 4'te de görüldü ü üzere safra tuzuna dayanıklılık açısından su lar arasında farklılıklar bulunmaktadır. *Lactobacillus* su larının % 0.3 safra tuzu içeren ortamda canlı kalabilme oranı % 76 olmu tur. Bu oran % 0.5 safra tuzu içeren ortamda %40, %1 safra tuzu içeren ortamda % 24 ve % 1.5 safra tuzu içeren ortamda ise %20'ye dü mü tür. Bu çalı mada safra tuzuna kar ı toleransı en iyi olan su lar *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2, *L. plantarum*1 LS-11, *L. plantarum*1 LS-12, *L. fermentum*2 LS-15, *L. fermentum*2 LS-16 oldu u gözlemlenmi tir.

Papamanoli ve ark'nın (2003) ¹²⁹ % 3.0 safra konsantrasyonunun *L. sakei*, *L. curvatus*, ve *L. plantarum* türlerine ait su lar üzerinde inhibe edici etkisini ara tırımı lardır. Çalı manın sonucunda *L. sakei* su ları % 100, *L. curvatus* su ları % 42 ve *L. plantarum* su ları % 0 oranında inhibe edilmi tir. Yapılan bir di er çalı mada ise *L. oris* AS17 ve *L. fermentum* AS83 su larının %3.0 safra tuzu içeren ortamda 4 saat süreyle safra tuzu toleransı incelenmi , bu iki su un % 3.0'lık safra tuzuna konsantrasyonunda canlılıklarını koruyabildikleri belirtilmi tir. Bir ba ka çalı mada ise, Gilliland ve Walker (1990) ¹³⁰ 12 adet *L. acidophilus* bakterisinin safra toleransını incelemi , kültürler arasında safra toleransı bakımından önemli farklılıklar tespit etmi tir. Usman ve Hosono (1999) ¹³¹ yaptıkları çalı mada *L. gasseri* bakterisinin su ları arasında safra tuzları toleransı bakımından farklılıklar oldu unu belirtmi lerdir.

4.4 *Lactobacillus* spp. SU LARININ SAFRA TUZU (KOL K AS T) H DROL Z

Dekonjuge safra asitleri ba ırsak florası ile sekonder safra asitlerine dönü türülmektedir. Böylece serum kolesterol düzeyi dü emektedir. ^{132, 133}.

Bölüm 3.2.5'te safra tuzu hidrolizinin belirlenmesi üzerine yapılan ara tırma sonucu elde edilen veriler Tablo 5'de sunulmu tur.

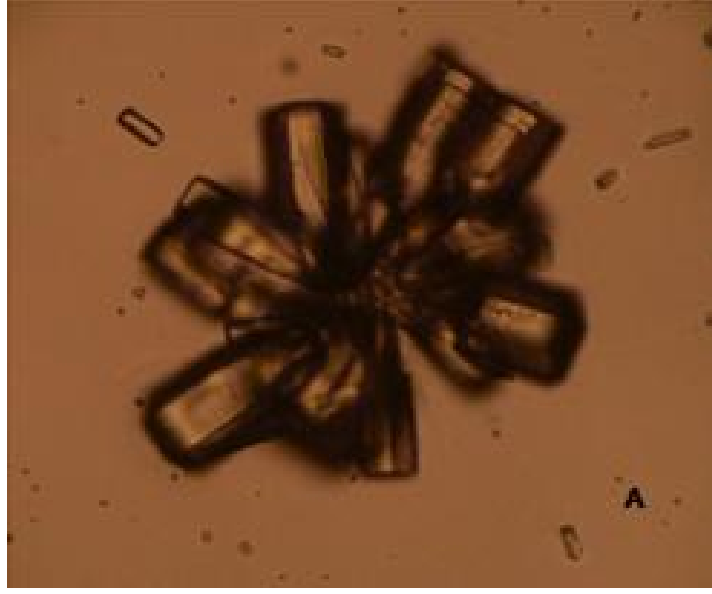
Tablo 5. *Lactobacillus* spp. su larının safra tuzu hidroliz (kolik asit) aktivitesi.

SU LAR	Sonuç*
<i>L. delbrueckii</i> subsp <i>delbrueckii</i> LS-1	+++
<i>L. pentosus</i> LS-2	+++
<i>L. pentosus</i> LS-3	+++
<i>L. plantarum</i> 1 LS-4	+++
<i>L. fermentum</i> 1 LS-5	+++
<i>L. plantarum</i> 1 LS-6	+++
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LS-7	+++
<i>L. plantarum</i> 1 LS-8	+++
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LS-9	+++
<i>L. plantarum</i> 1 LS-10	+++
<i>L. plantarum</i> 1 LS-11	++
<i>L. plantarum</i> 1 LS-12	-
<i>L. pentosus</i> LS-13	++
<i>L. plantarum</i> 1 LS-14	+++
<i>L. fermentum</i> 2 LS-15	+
<i>L. fermentum</i> 2 LS-16	+++
<i>L. curvatus</i> LS-17	+++
<i>L. plantarum</i> 1 LS-18	+++
<i>L. fermentum</i> 2 LS-19	-
<i>L. plantarum</i> 1 LS-20	-
<i>L. plantarum</i> 1 LS-21	-
<i>L. salivarius</i> LS-22	-
<i>L. plantarum</i> 1 LS-23	-
<i>L. fermentum</i> 2 LS-24	++
<i>L. fermentum</i> 2 LS-25	+

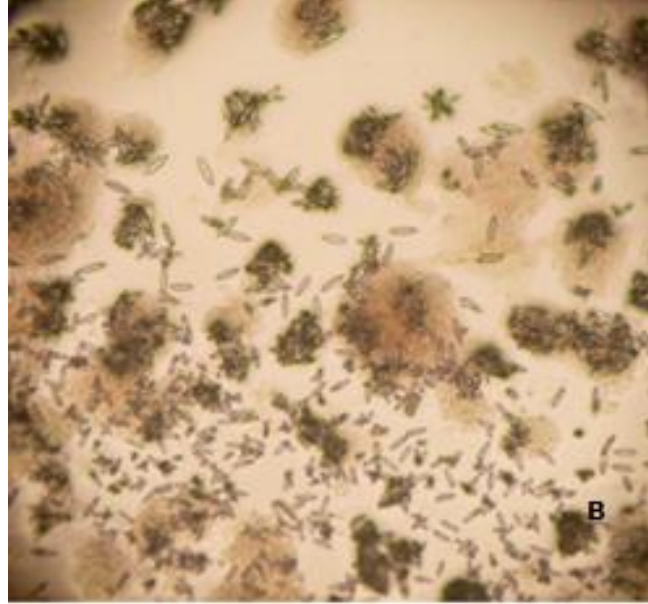
*Safra tuzu hidroliz aktivitesi

**(-): Negatif, (+): Zayıf, (++) : Orta, (+++) : Yüksek.

Tablo 5’de görüldü ü gibi su ların genelinin safra tuzunu dekonjuge edebildi i görülmektedir. Sadece su ların altı tanesi safra tuzunu hidroliz edememi lerdir. *L. fermentum*2 LS-15 ve *L. fermentum*2 LS-25 su ları ise belirli bir miktarda kolik asit hidrolizini gerçekle tirmi lerdir. Resim 3’ de hidroliz edilmemi kolik asit kristali gösterilmi tir. Bu çalı mada en iyi sonuç veren su lardan *L. pentosus* LS-2’nın gerçekle tirmi oldu u kolik asit hidrolizi görüntüsü ise Resim 4’te verilmi tir.



Resim 3: Hidroliz edilmemi kolik asit kristali. Novax AP-5 50920 binoküler mikroskobunda 20X büyütmedeki görüntüsü.



Resim 4: *L. pentosus* LS-2 suunun gerçekle tirdi i safra tuzu (kolik asit) hidrolizi. Kolik asit kristallerinin parçalanmı hali. Novax AP-5 50920 binoküler mikroskobunda 20X büyütmedeki görüntüsü.

Moser ve Savage (2001)¹²¹, 30 tanesi insan kaynaklı, 15 tanesi süt ürünlerinden, 4 tanesi farklı kaynaklardan izole edilmi *Lactobacillus* suunun BSH

(Bile salt hydrolyzed) aktivitelerinin incelendi i bir çalı ma yapmı lardır. Yapılan bu çalı mada su ların % 55.1 pozitif sonuç verirken, di er %44.9 BSH aktivitelerinin negatif oldu u tespit edilmi tir.

4.5. *Lactobacillus* spp. SU LARININ ANT M KROB YAL AKT V TELER

Gaitadan izole edilen *Lactobacillus* spp. su larının ampisilin (10 µg), basitrasin (10 unit), eritromisin (15 µg), gentamisin (10 µg), meropenem (10 µg) penisilin (10 unit), piperasilin (100 µg), rifampin (5 µg), seftazidim (10 µg), teikoplanin (30 µg), tetrasiklin (30 µg), trimetoprim (5 µg), vankomisin (30 µg), antibiyotiklerine kar ı duyarlılıkları NCCLS kriterlerine göre de erlendirilmi tir. Test sonuçları Tablo 6 da verilmi tir. Ayrıca %'de duyarlılık oranları Tablo 7 ve ekil 2'de gsterili tir.

Tablo 6. Gaitadan izole edilen *Lactobacillus* spp. su larının de i ik antibiyotiklere kar ı duyarlılık sonuçları (mm).

Lactobacillus spp.	Antibiyotikler*												
	PIP	B	CAZ	RA	TE	E	AM	TEC	GM	VA	TMP	P	MEM**
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> LS-1	S	R	S	S	S	S	S	R	I	R	R	R	S
<i>L. pentosus</i> LS-2	S	R	S	S	S	S	S	R	I	R	R	R	S
<i>L. pentosus</i> LS-3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>L. plantarum</i> 1 LS-4	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
<i>L. fermentum</i> 1 LS-5	S	R	S	S	I	S	S	S	R	S	R	S	S
<i>L. plantarum</i> 1 LS-6	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LS-7	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S
<i>L. plantarum</i> 1 LS-8	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LS-9	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S
<i>L. plantarum</i> 1 LS-10	S	R	S	S	S	S	S	R	I	R	S	S	S
<i>L. plantarum</i> 1 LS-11	S	R	S	S	S	S	S	R	I	R	S	S	S
<i>L. plantarum</i> 1 LS-12	S	S	S	S	S	S	S	R	I	R	R	S	S
<i>L. pentosus</i> LS-13	S	I	S	I	S	S	S	S	I	S	R	S	S
<i>L. plantarum</i> 1 LS-14	S	R	I	I	S	S	S	S	I	S	R	S	S
<i>L. fermentum</i> 2 LS-15	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	R	S	S
<i>L. fermentum</i> 2 LS-16	S	R	S	S	S	S	S	R	I	R	I	R	S
<i>L. curvatus</i> LS-17	S	I	S	S	I	R	S	S	I	S	R	S	S
<i>L. plantarum</i> 1 LS-18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>L. fermentum</i> 2 LS-19	S	R	S	S	S	S	S	R	I	R	I	R	S
<i>L. plantarum</i> 1 LS-20	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	R	R	R
<i>L. plantarum</i> 1 LS-21	S	S	S	S	S	S	S	R	I	I	R	S	S
<i>L. salivarius</i> LS-22	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S
<i>L. plantarum</i> 1 LS-23	S	S	S	S	S	S	S	R	I	R	R	S	S
<i>L. fermentum</i> 2 LS-24	S	R	S	S	S	S	S	I	I	R	R	I	S
<i>L. fermentum</i> 2 LS-25	S	R	I	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S

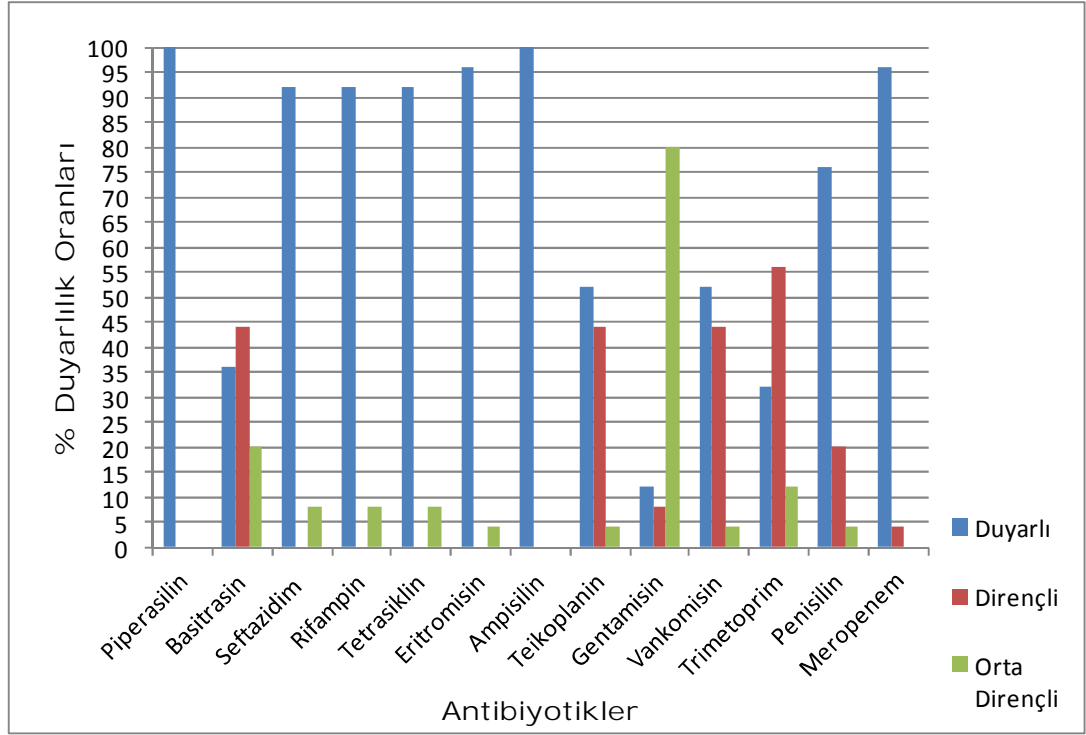
*S=duyarlı R=dirençli I=orta duyarlı

**PIP: ampicilin (10 µg), basitrasin (10 unit), eritromisin (15 µg), gentamisin (10 µg), meropenem (10 µg) penisilin (10 unit), piperasilin (100 µg), rifampin (5 µg), seftazidim (10 µg), teikoplanin (30 µg), tetrasiklin (30 µg), trimetoprim (5 µg), vankomisin (30 µg),

Tablo 7. *Lactobacillus* spp. su larının de i ik antibiyotiklere kar ı % 'de duyarlılık sonuçları.

Antibiyotik	Duyarlı	Dirençli	Orta Duyarlı
Ampisilin	100	-	-
Basitrasin	36	44	20
Eritromisin	96	-	4
Gentamisin	12	8	80
Meropenem	96	4	-
Penisilin	76	20	4
Piperasilin	100	-	-
Rifampin	92	-	8
Seftazidim	92	-	8
Teikoplanin	52	44	4
Tetrasiklin	92	-	8
Trimetoprim	32	56	12
Vankomisin	52	44	4

Bu çalı mada *Lactobacillus* su larının genel olarak antibiyotiklere kar ı duyarlı oldukları gözlenmi tir. Özellikle piperasilin ve ampisilin de tüm su ların duyarlı oldukları tespit edilmi tir. Bununla birlikte yaygın olarak kullanılan gentamisin, trimetoprim ve vankomisin antibiyotiklerine kar ı daha dirençli oldukları görülmü tür. *Lactobacillus* su larından *L. pentosus* LS-3 ve *L. plantarum*1 LS-18 tüm antibiyotiklere duyarlı oldukları tespit edilmi tir. *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2, *L. plantarum*1 LS-11, *L. plantarum*1 LS-12, *L. fermentum*2 LS-16, *L. fermentum*2 LS-24 su larının antibiyotiklere kar ı çalı madaki di er su lardan daha dirençli oldukları gözlemlenmi tir.



ekil 2. *Lactobacillus* spp. su larının de i ik antibiyotiklere kar ı %'de duyarlılık oranları.

Temmerman ve ark. (2003) ¹³⁴ tarafından yapılan bir çalı mada çe itli probiyotik ürünlerden izole edilmi laktik asit bakterilerinin disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıkları test edilmi tir. Ara tırmacılar çalı ma sonucunda su ların tetrasiklin ve eritromisine duyarlı olduklarını tespit etmi lerdir. Arıcı ve ark.'nın (2004) ¹³⁵ probiyotik özelli e sahip 21 *Lactobacillus* su u üzerinde yapı ı çalı mada, su ların tetrasikline kar ı duyarlı oldukları belirtilmi tir.

4.6. *Lactobacillus* spp. SU LARIN BAZI PATOJEN M KROORGAN ZMALAR KARI ANTAGONST K ETK LER

Lactobacillus su larının bu çalı mada kullanılan patojen mikroorganizmalara kar ı genel olarak inhibisyon etkilerinin oldu u gözlemlenmi tir. Elde edilen sonuçlar Tablo 8'de gösterilmi tir. *Lactobacillus* su ları genel olarak patojenlere kar ı inhibitör etki gösterirlerken sadece *L. plantarum*1 LS-18 su unun hiçbir

patojende zon çapı olu turmadı ı tespit edilmi tir. Patojenler kar ı inhibitör etkileri en iyi düzeyde olan su lar ise *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2 *L. plantarum1* LS-10 *L. plantarum1* LS-11 *L. plantarum1* LS-12, *L. fermentum2* LS-15 *L. fermentum2* LS-16, *L. salivarius* LS-22 olarak tespit edilmi tir.

Tablo 8. *Lactobacillus* spp. su larının de i ik patojen bakterilerine kar ı olu turdukları antagonistik etkileri (mm).

<i>Lactobacillus</i> spp.	Patojen mikroorganizmalara kar ı inhibisyon zonları (mm)				
	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Neisseria</i> sp.
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> LS-1	13±0.1	13±0.1	11±0.2	10±0.0	17±0.3
<i>L. pentosus</i> LS-2	16±0.5	19±0.2	12±0.1	12±0.1	17±0.2
<i>L. pentosus</i> LS-3	12±0.2	-	-	12±0.2	-
<i>L. plantarum</i> 1 LS-4	10±0.1	10±0.0	-	-	-
<i>L. fermentum</i> 1 LS-5	13±0.1	12±0.3	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 1 LS-6	19±0.2	20±0.5	15±0.0	16±0.1	22±0.4
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> LS-7	14±0.2	16±0.5	11±0.0	10±0.4	14±0.1
<i>L. plantarum</i> 1 LS-8	18±0.3	16±0.5	11±0.4	15±0.2	17±0.1
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LS-9	12±0.2	22±0.5	11±0.1	16±0.2	16±0.3
<i>L. plantarum</i> 1 LS-10	20±0.3	20±0.2	14±0.0	15±0.2	22±0.5
<i>L. plantarum</i> 1 LS-11	18±0.2	18±0.2	13±0.1	15±0.3	20±0.2
<i>L. plantarum</i> 1 LS-12	18±0.1	19±0.2	-	13±0.4	16±0.4
<i>L. pentosus</i> LS-13	16±0.2	17±0.1	-	11±0.0	17±0.3
<i>L. plantarum</i> 1 LS-14	11±0.1	-	-	-	-
<i>L. fermentum</i> 2 LS-15	18±0.2	19±0.4	13±0.3	12±0.2	17±0.3
<i>L. fermentum</i> 2 LS-16	17±0.4	16±0.1	12±0.4	13±0.1	18±0.2
<i>L. curvatus</i> LS-17	13±0.0	13±0.1	-	-	11±0.0
<i>L. plantarum</i> 1 LS-18	-	-	-	-	-
<i>L. fermentum</i> 2 LS-19	-	12±0.4	-	-	-
<i>L. plantarum</i> 1 LS-20	15±0.0	19±0.2	13±0.1	14±0.0	18±0.0
<i>L. plantarum</i> 1 LS-21	16±0.0	20±0.1	12±0.0	12±0.0	16±0.2
<i>L. salivarius</i> LS-22	20±0.2	19±0.4	13±0.3	14±0.0	16±0.0
<i>L. plantarum</i> 1 LS-23	15±0.0	16±0.1	12±0.0	14±0.1	-
<i>L. fermentum</i> 2 LS-24	11±0.2	16±0.3	12±0.2	-	-
<i>L. fermentum</i> 2 LS-25	-	12±0.0	-	-	-

4.7. *Lactobacillus* spp. SU LARI TARAFINDAN ÜRET LEN BAKTER OS N VEYA BAKTER OS N BENZER MADDELER N NH B TÖR ETK LER

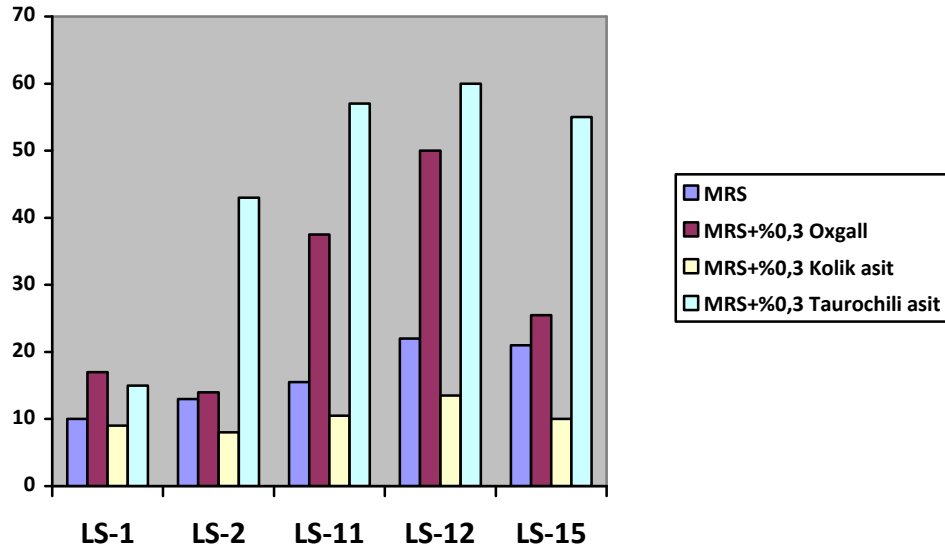
Lactobacillus su larının ürettikleri laktik asit dı ndaki di er metabolitlerinin inhibitör etkilerinin belirlenmesi üzerine Bölüm 3.2.9'da anlatıldı ı gibi yapılmı tır. % 0.2 glikozlu MRS sıvı besiyerinde geli tirilen *Lactobacillus* spp. izolatları patojen bakterilere kar ı hiçbir inhibisyon etki göstermemi tir. Bu durum bize indikatör bakterilere kar ı inhibisyon etkinin laktik asit bakterilerin üretti i organik asitlerden ileri geldi ini göstermektedir.

4.8. *Lactobacillus* spp. SU LARININ KOLESTEROL G DER M

Yüksek kolesterol damarları tı kayıp kalp krizlerine ve ölümlere neden olmaktadır. Laktik asit bakterilerinin kolesterolü asimile ederek serum kolesterol seviyesini dü ürdü ü bilinmektedir. Ara tırmada dü ük asitli e ve yüksek safra tuzuna dayanıklı, safra tuzu aktivitesi yüksek, antagositik etkiye sahip 5 su seçilmi ve kolesterol giderimi çalı ılmı tır. Tablo 9'de ve ekil 3'de *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2, *L. plantarum*1 LS-11, *L. plantarum*1 LS-12 ve *L. fermentum*2 LS-15 su larının insan plazma serumunda kolesterol giderimi görülmektedir. Besiyeri olarak MRS sıvı besi yerinde de i ik safra tuzu (% 0.3 oxgall, kolik asit ve taurocholic asit) ortamlarında çalı ma yapılmı tır. Çalı mamızda kültürler MRS sıvı besi yerinde 10-22 µg/ml, % 0.3'lük oxgall'lı MRS sıvı besi yerinde 14-50 µg/ml, % 0.3'lük kolik asit'li MRS sıvı besi yerinde 8-13.5 µg/ml ve % 0.3'lük taurocholic asit'li MRS sıvı besi yerinde 15-55 µg/ml kolesterol asimilasyonu yapmı tır.

Tablo 9: Bazı *Lactobacillus* su larının MRS sıvı besiyerinde ve de i ik safra tuzu (% 0.3 oxgall, kolik asit ve taurocholic asit) besiyerinde kolesterol giderimi ($\mu\text{g/ml}$).

<i>Lactobacillus</i> spp.	MRS + Kollesterol	MRS+ % 0.3 Ovgall + Kollesterol	MRS + % 0.3 Kolik Asit + Kollesterol	MRS + % 0.3 Taurocholic Asit + Kollesterol
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> LS-1	10	17	9	15
<i>L. pentosus</i> LS-2	13	14	8	43
<i>L. plantarum</i> LS-11	15.5	37.5	10.5	57
<i>L. plantarum</i> LS-12	22	50	13.5	60
<i>L. fermentum</i> LS-15	21	25.5	10	55



ekil 3. *L. delbrueckii ssp. delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2, *L. plantarum* LS-11, *L. plantarum* LS-12 ve *L.fermentum* LS-15 su larının kolesterol giderim miktarları (µg/ml).

Gilliland ve ark. (1985)¹³⁶ çalı malarında *L. acidophilus* su larının % 0.5 oxgall ilaveli MRS sıvı besi yerinde, ortamın plazma serum kolesterolünü 18.8-63.0 µg/ml de erinde asimilasyon yaptı nı saptamı lardır. Buck ve Gilliland (1994)¹³⁷ bir çalı mada insan kaynaklı *L. acidophilus* su larının 20.5-83.3 µg/ml kolesterol asimilasyonu yaptı nı göstermi lerdir. Brashears ve ark.'na (1998)¹³⁸ göre *L. casei* su ları MRS sıvı besi yerinde 16.9-74.3 µg/ml kolesterol asimilasyonu yapmı tır. Loing ve Shah (2005)¹³⁹ alı malarında *Lactobacillus*'ların MRS sıvı besiyerinde 10.00-21.61 µg/ml ve % 0.30 oxgall ilaveli MRS sıvı besi yerinde 12.03-32.25 µg/ml kolesterol asimile etti ini belirlemi ler. 2010 yılında yapılan ba ka bir çalı mada Lye ve arkadaş ları *Lactobacillus* su larının MRS sıvı besi yerinde 14.22-27.89 µg/ml ve % 0.30 oxgall'lı MRS sıvı besi yerinde 11.17-62.42 µg/ml kolesterol asimile ettiklerini belirlemi lerdir¹⁴⁰.

Ara tırmamız da di er çalı malarla paralellik arz etmektedir. *L. plantarum* LS-11 MRS besi yerinde 15.5 µg/ml, % 0.3'lük oxgall MRS besi yerinde da 37.5 µg/ml, % 0.3'lük kolik asit 10.5 µg/ml ve % 0.3'lük taurocholic asit MRS besi

yerinde 57 µg/ml, *L. plantarum* LS-12 su u MRS besi yerinde 22 µg/ml, % 0.3'lük oxgall MRS besi yerinde 50 µg/ml, % 0.3'lük kolik asit 13.5 µg/ml ve % 0.3'lük taurocholic asit MRS besi yerinde 60 µg/ml ve *L. fermentum* LS15 su u MRS besi yerinde 21 µg/ml, % 0.3'lük oxgall MRS besi yerinde de 25.5 µg/ml, % 0.3'lük kolik asit 10 µg/ml ve % 0.3'lük taurocholic asit MRS besi yerinde 55 µg/ml kolesterol giderimi yapmı tır. Yaptı ımız çalı madan da anla ıldı ı gibi MRS sıvı besiyeri ve % 0.3'lük kolik asit katkılı MRS sıvı besi yerinde, bakterilerin kolesterol giderimi % 0.3'lük oxgall ve taurocholic asit MRS sıvı besi yerinden daha yüksek oldu u gözlenmektedir. Bu üç su un kolesterol gideriminde kullanılabilece i belirlenmi tir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsan vücudu milyarlarca mikroorganizmaya konakçılık eden bir ekosistemdir. Bu ekosistemde zararlı ve yararlı mikroorganizmalar bir rekabet halinde olup, sağlıklı insanlarda yararlı mikroorganizmalar baskın mikroflorayı oluşturmaktadır. İnsan vücudunda mikrofloranın en geni olduğu yer ise sindirim sistemidir. Özellikle bağırsaklar yapısı ve içeriği gereği birçok mikroorganizmayı barındırmaktadır. Bağırsakların fonksiyonu insanların uzun ömürlü ve sağlıklı yaşaması için çok önemlidir. Filogenetik süreçte yararlı mikroorganizmalarla insanlar arasında mutualist bir yaşam baskılaması, bu mikroorganizmalar bağırsaklara yerleşerek, bağırsak fonksiyonlarını olumlu yönde etkilemektedirler^{1-4, 15}.

Eski çağlarda yaşamı insanların diyetlerini göz önüne getirdiğimizde günümüz insanına göre çok daha fazla miktarda süt ürünleri ve lifli besin tükettiği görülmektedir. Bu beslenme tarzı sayesinde bağırsak mikroflorasında yararlı türler gelişmekte ve bağırsak fonksiyonları daha düzenli olmaktadır. Dolayısıyla insanlar daha sağlıklı ve daha uzun ömürlüdürler^{4, 9, 18, 25}.

Bu yaşamda günümüz insanının stresli yaşam tarzı, fazla miktarda rafine gıdaların tüketimi ve dengesiz beslenme, düzensiz antibiyotik kullanımı, alkol ve sigara gibi alışkanlıklar insan vücudunu olumsuz etkilediği gibi vücuda yararlı olan mikroorganizmalarında sayısını önemli ölçüde azaltmaktadır. Böylece insanlar hem direkt hem de dolaylı olarak ciddi sağlık sorunlarıyla karşılaşmaktadırlar^{18, 25}. Starchan tarafından ileri sürülen 'Hijyen hipotezi' günümüz insanının yaşamı mikrobiyal problemlere verilebilecek güzel bir örnektir. Starchan'a göre çok steril ortamda yetişen bireylerde alerjik rinit insidansının daha sık görüldüğü tespit edilmiştir. Bu hipoteze göre insanların ağız mikrobiyotik kontrolü, eskiye göre daha az insanlarla temas halinde olması (daha az kardeşi sayısı ve arkadaş sayısı gibi) ve hijyen kontrollerinin iyileştirilmesi gibi etkenler insanların gastrointestinal sisteminde yerleşen yararlı mikroorganizmaların gelişimini engellemektedir¹⁴¹. Bu nedenle gastrointestinal sistemde azalan mikroorganizma sayısını düzenleyebilmek için probiyotik ve prebiyotik takviyeler tavsiye edilmektedir⁹.

Yüz yılı aşkın bir süredir bazı bilim insanlarının ilgisini çeken bağırsak mikrobiyotası üzerine gün geçtikçe yeni araştırmalar yapılmış ve yapılmaktadır. Bu konuyla ilgili olarak en çok araştırma yapılan konu bağırsak probiyotikleridir. Günümüzde doğal ürünlere tekrar dönmeye başlayan insanlarında ilgisini çekmeyi başaran probiyotikler, gastrointestinal sistem üzerinde yaayan ve konakçıya belirgin bir yarar sağlayan mikrobiyolojik canlılardır^{23,30,36}.

Probiyotikler insan ve hayvan sağlığı üzerinde büyük faydalar sağlayan mikroorganizmalardır. Probiyotik bakteriler üzerinde son 30 yılda çok sayıda araştırmalar yapılmakta ve ülkemizde 2000'li yıllardan sonra üzerinde araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Ülkemizde yetiştirilen insanlardan izole edilen *Lactobacillus* bakterileri üzerinde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Aynı zamanda insan plazma serumu ile in vitro olarak kolesterol giderimi çalışması da yapılmamıştır.

Bu çalışmada, yaşları 25-50 arasında değişen sağlıklı insanların intestinal sistemine ait 25 adet *Lactobacillus* spp. suşları üzerinden yürütülmüştür. Suşların düşük asit ve yüksek safra tuzu (oxgall) toleransları, safra tuzu (kolik asit) hidroliz aktiviteleri, antibiyotik dirençleri, antagonistik etkileri, ve bu suşlar tarafından üretilen bakteriosin veya bakteriosin benzeri ürünlerin inhibitör etkileri gibi probiyotik özellikler yönünden değerlendirilmiştir. Ayrıca *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2, *L. Plantarum1* LS-11, *L. Plantarum1* LS-12 ve *L. Fermentum2* LS-15 suşları seçilerek kolesterol giderimlerine bakılmıştır.

Probiyotik mikroorganizmalar bağırsaklarda lokalize olduklarına göre doğal olarak gastrointestinal sistemin artlarına uyum sağlamaları gerekmektedir. Bu nedenle öncelikli olarak yüksek asitli ortamlara dirençli olmaları gerekmektedir. Yapılmış oldu umuz üç de i ik düşük pH çalışmasında; pH 3 de erinde bütün suşlarımızın canlılığını korudukları gözlemlenmiştir. pH 2.0 de erinde ise canlı kalabilme oranlarında pH 3.0'e göre bir düşüş gözlenmektedir *L. fermentum1* LS-5, *L. fermentum2* LS-15, *L. plantarum1* LS-20 ve *L. fermentum2* LS-25 suşlarının canlılıklarını diğer suşlara göre daha iyi korudukları tespit edilmiştir. *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2, *L. plantarum1* LS-10, *L. plantarum1* LS-11, *L. fermentum2* LS-19, *L. plantarum1* LS-23 ve *L. fermentum2* LS-24 suşlarının

ise dü ük pH de erlerine dirençlerinin daha zayıf oldu u tespit edilmi tir (Bkz. Tablo 3).

Gastrointestinal sistemin a ır artlarından, dü ük pH'ın yanı sıra, bir di er faktörde bilindi i üzere yüksek safra tuzu yo unlu udur. Probiyotik mikroorganizmalarda aranan özelliklerden ba lıcalarıdan olan safra tuzu dirençlili i ile ilgili olarak su larımızla yapmı oldu umuz de i ik safra tuzu konsantrasyonlardaki (% 0.3, % 0.5, % 1.0 ve % 1.5) çalı malarımızda, do al olarak tuz yo unlu u yükseldikçe canlı kalma oranlarında azalma oldu u gözlemlenmektedir (% 0.3 safra tuzunda % 76 iken % 1.5 safra tuzunda % 20). Sonuç olarak safra tuzuna kar ı toleransı en iyi olan su lar *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2, *L. plantarum1* LS-11, *L. plantarum1* LS-12, *L. fermentum2* LS-15, *L. fermentum2* LS-16 oldu u gözlemlenmi tir (Bkz. Tablo 4).

Safra tuzu toleransı ile ilgili olarak bir di er çalı mamız olan, safra tuzu hidrolizinde elde etti imiz sonuçlar da ise su larımızın genelinin safra tuzunu dekonjuge edebildi i görülmektedir. Dekonjuge safra asitleri ba ırsak florası ile sekonder safra asitlerine dönü türülmektedir. Böylece serum kolesterol düzeyi dü emektedir. Serum kolesterol seviyesini dü ürme özelli inin bulunması Probiyotiklerin yararları konusunda aranan bir özelliktir. Bu çalı mamızda, sadece altı su umuz safra tuzunun hidrolizini gerçekle tirememi tir. *L. fermentum2* LS-15 ve *L. fermentum2* LS-25 su larımız ise belirli bir miktarda kolik asit hidrolizini gerçekle tirmi lerdir. Çalı mada en iyi sonuç veren su umuz *L. pentosus* LS-2'dir (Bkz. Tablo 5 ve Resim 4).

Probiyotik mikroorganizmalar gastrointestinal sistemin artlarına dirençli olmalarının yanı sıra dı arıdan gelebilecek etkenlere kar ıda dirençli olmaları gerekmektedir. Bu konuyla ilgili olarak yapt ımız antimikrobiyal aktivite çalı masında; su larımızın, ampisilin (10 µg), basitrasin (10 unit), eritromisin (15 µg), gentamisin (10 µg), meropenem (10 µg) penisilin (10 unit), piperasilin (100 µg), rifampin (5 µg), seftazidim (10 µg), teikoplanin (30 µg), tetrasiklin (30 µg), trimetoprim (5 µg), vankomisin (30 µg), antibiyotiklerine kar ı duyarlılıkları ara tırılmı , genel olarak su larımızın bu antibiyotiklere kar ı duyarlı oldukları gözlemlenmi tir. Özellikle piperasilin ve ampisilin de tüm su ların duyarlı oldukları

tespit edilmi tir. Bununla birlikte yaygın olarak kullanılan gentamisin, trimetoprim ve vankomisin antibiyotiklerine kar ı daha dirençli oldukları görülmü tür. Su larımızdan *L. pentosus* LS-3 ve *L. plantarum1* LS-18 tüm antibiyotiklere duyarlı oldukları tespit edilmi tir. *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2, *L. plantarum1* LS-11, *L. plantarum1* LS-12, *L. fermentum2* LS-16, *L. fermentum2* LS-24 su larımız, di er su larımıza göre daha dirençli oldukları gözlemlenmi tir.

Probiyotik mikroorganizmalar gastrointestinal sistemde patojen mikroorganizmalarla rekabet içindedirler. Burada ya ayabilmeleri için patojen mikroorganizmalara kar ı antagonistik etki özelliklerinin olması gerekmektedir. Bu özellikten yola çıkarak su larımız üzerinde yaptı ımız çalı mada, 5 adet patojen mikroorganizma kullanılmı tir. Bunlar: *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (ATCC 25656) *S. epidermidis* (ATCC 12228) ve *Neisseria* sp.'dir. Su larımızın bu çalı mada kullanılan patojen mikroorganizmalara kar ı genel olarak inhibisyon etkilerinin oldu u gözlemlenmi tir. Sadece *L. plantarum1* LS-18 su umuz hiçbir patojende zon çapı olu turmadı ı tespit edilmi tir. Patojenlere kar ı inhibitör etkileri en iyi düzeyde olan su larımız ise *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2 *L. plantarum1* LS-10 *L. plantarum1* LS-11 *L. plantarum1* LS-12, *L. fermentum2* LS-15 *L. fermentum2* LS-16, *L. salivarius* LS-22 olarak tespit edilmi tir.

Bu çalı maya paralel olarak yürüttü ümüz bakteriosin veya bakteriosin benzeri maddelerin inhibitör etkilerinin tespiti amacıyla yaptı ımız çalı mada, su larımızın ürettikleri laktik asit dı ındaki di er metabolitlerinin inhibitör etkilerinin belirlenmesi üzerine % 0.2 glikozlu MRS sıvı besiyerinde geli tirilen su larımızdan elde edilen supernatantlar, patojen bakterilere kar ı hiçbir inhibisyon etki göstermemi tir. Bu durum bize indikatör bakterilere kar ı inhibisyon etkinin laktik asit bakterilerin üretti i organik asitlerden ileri geldi ini göstermektedir.

Yaptı ımız bu çalı maların sonuçlarından yola çıkarak probiyotik özellikleri bakımından iyi sonuç veren dü ük asitli e ve yüksek safra tuzuna dayanıklı, safra tuzu aktivitesi yüksek, antagositik etkiye sahip, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LS-1, *L. pentosus* LS-2, *L. plantarum* LS-11, *L. plantarum* LS-12 ve *L. fermentum* LS-15 su larımız alınarak, kolesterol giderimleri ara tırılmı tir. Daha önceki bölümlerde de

bahsedildi i gibi kolesterol giderimi probiyotikler içinde aranan bir özellik olmu tur. Yüksek kolesterol damarları tıkeyıp kalp krizlerine ve ölümlere neden olmaktadır. Laktik asit bakterilerinin kolesterolü asimile ederek serum kolesterol seviyesini dü ürdü ü bilinmektedir. Besiyeri olarak MRS sıvı besi yerinde de i ik safra tuzu (% 0.3 oxgall, kolik asit ve taurocholic asit) ortamlarında çalı ma yapılmı tır.

En yüksek kolesterol giderimini *L. plantarum* LS-12 su u MRS besi yerinde 22 µg/ml, % 0.3'lük oxgall MRS besi ortamında 50 µg/ml, % 0.3'lük kolik asit 13.5 µg/ml ve % 0.3'lük taurocholic asit MRS besi yerinde 60 µg/ml olarak vermi tir. *L. plantarum* LS-11 MRS besi yerinde 15.5 µg/ml, % 0.3'lük oxgall MRS besi ortamında 37.5 µg/ml, % 0.3'lük kolik asit 10.5 µg/ml ve % 0.3'lük taurocholic asit MRS besi yerinde 57 µg/ml ve *L. fermentum* LS15 su u MRS besi yerinde 21 µg/ml, % 0.3'lük oxgall MRS besi ortamında 25.5 µg/ml, % 0.3'lük kolik asit 10 µg/ml ve % 0.3'lük taurocholic asit MRS besi yerinde 55 µg/ml kolesterol giderimi yapmı tır. Kolesterol giderimi yüksek olan bu üç su un potansiyel probiyotik olabileceklerine karar verilmi tir. Bu su lar ba ka ara tırmalarda kullanılmak üzere muhafazaya alınmı tır.

Sonuç olarak, sa lıklı bir ya am için gastrointestinal sistemin düzenli çalı ması elzemdir. Bu sistemin düzenli bir ekilde çalı abilmesi için probiyotikler en iyi yardımcılarıdır. nsan do umundan itibaren ba ırsak florası olu maya ba lamaktadır. Do umdan sonraki dönem anne sütü kullanımı, bebe in bulundu u ortam gibi etkenler ba ırsak mikroflorasını belirlemektedir. nsanlı ın ba langıcında her ey do aldı ve kendili inden gerçekle mekteydi. Günümüze baktı ımızda insano lunun hemen her eyde müdahalesinin oldu unu görmekteyiz. Örne in do umun sezaryan olması, do umdan sonra anne sütünün kullanılmaması ve bebe in a ırı steril ortamda yeti tirilmesi, bireyin gastrointestinal mikroflorasının daha temelden olumsuz bir ekilde te ekkül etmesine neden olur. Birey büyüdükçe günümüz artlarında var olan dengesiz beslenme, gereksiz antibiyotik kullanımı, sigara ve alkol kullanımı, rafine gıdaların tüketimi ve stresli ya am tarzı, ba langıçta oturmamı olan gastrointestinal florayı daha da olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle günümüzde de ahit oldu umuz bir takım do rudan ve dolaylı birçok hastalıkla muhatap olmaktadır. Bu nedenlerle sa lıklı bir ya am ve hastalıkların tedavisinde

probiyotik mikroorganizmaların yeri tartışılmaz hale gelmektedir. Probiyotiklerle ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında birçok hastalıktan korunmada ve tedavisinde kullanıldığı görülmektedir. Ancak sadece probiyotik takviyesi almak, gastrointestinal sistem için yeterli olmayacaktır. Sağlıklı yaşam için en baştan duyarlı olunması gerekmektedir ve öncelikli olarak bireylerin normal doyumla dünyaya gelmesi ve sonrasında anne sütü kullanımını tercih edilmelidir. Sonrasında bireyler günlük yaşamlarında diyetlerine dikkat etmeli rafine gıdalardan uzak durmalıdırlar. Gereksiz antibiyotik kullanımı ve zararlı alerjenlerden kaçınmalıdırlar. Gastrointestinal floradaki probiyotikler için diyetlerinde mutlaka prebiyotik içeren besinleri tüketmeleri gerekmektedir. Günümüzde bunları yapmak zor olsa da herhangi bir hastalık karşısında harcanan maddi güç ve zaman göz önüne alındığında daha kolay olacaktır.

6. KAYNAKÇA

1. Klaenhammer, R. T. ; Kullen, J.M. *Int. J. of Food Microbiol*, **1999**, 50, 45-57.
2. Rolfe, R. D. *J. of Nutrition*, **2000**, 130, 3965-4025.
3. Çakır, . *Lactobacillus Ve Bifidobacterlerde Bazı Probiyotik Özelliklerin ncelenmesi*, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, 2003.
4. Can, Ö. P. *Do u Anadolu Bölgesi Ara tırmaları*, **2007**, 107-110.
5. Karaçay, B. *Bilim Ve Teknik Dergisi*, **2010**, 514, 36-43.
6. Peter, J. T. ; Ruth, E. L. ; Michael, A. M. ; Vincent, M. ; Elaine, R. M. ; Jeffrey, I. G. *Nature Publishing Group*, **2006**, 1027-1031.
7. Young, R. J. ; Huffman, S. J. *Pediatr Health Care*, **2003**, 17, 277-283.
8. Guarner, F. ; Malagelada J. R. *Lancet*, **2003**, 360, 512-519.
9. nanç, N. ; ahin, H. ; Çiçek, B. *Erciyes Tıp Dergisi*, **2005**, 27 (3), 122-127.
10. Morelli, L. J. *Nutr.* 2008, 138,1791-1795.
11. Caicedo, R. A. ; Schanler, R.J. ; Li, N. ; Neu, J. *Pediatr Res*, **2005**, 58, 625–628.
12. Gültekin, M. *Ankem Dergisi*, **2004**, 18 (Ek 2), 87-89.
13. Yan, F. ; Polk, D. B. *Curr Opin Gastroenterol*, **2004**, 20, 565–571.
14. Gill, H. S. ; Guarner, F. *Postgrad Med J*, **2004**, 80, 516–526.
15. Co kun T. *Çocuk Sa lı ı ve Hastalıkları Dergisi*, **2006**, 49, 128-148.
16. Quigley, E. M. M. *Pharmacological Research*, **2010**, 61, 213-218.
17. Thomas, D. W. ; Greer, F. R. *Pediadrics*, 2010, 126, 1217-1231.
18. Özden, A. *Güncel Gastroloji*, **2005**, 9/3, 124-133.
19. Maukonen, J. ; Mattö, J. ; Suihko M-L. ; Saarela, M. *Journal of Medical Microbiology*, **2008**, 57, 1560–1568.
20. Gibson, G. R. ; Roberfroid, M. B. *J Nutr*, **1995**, 125, 1401-1412.
21. Can, Ö. P. *Do u Anadolu Bölgesi Ara tırmaları*, **2007**, 194-196.
22. Ya ar, B. ; Kurda , O. Ö. *Güncel Gastroloji*, **2009**, 13/1, 23-28.
23. Gürsoy, O. ; Kınık, Ö. *Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **2006**, 12, 105-116.
24. Bengmark, S. *Gastroenterol Clin North Am*, **2005**, 34, 413-436.

25. Parracho, H. ; McCartney, A. L. ; Gibson, G. R. *Proceedings of the Nutrition Society*, **2007**, 66, 405–411.
26. Sinkiewicz, G. *Lactobacillus reuteri in health and disease*, Doktora Tezi, Malmö University Faculty of Health and Society Department of Biomedical Laboratory Sciences, Holmbergs, Malmö, 2010.
27. Soccol, C. R. ; Vandenberghe, S. L. P. ; Spier, M. R. ; Medeiros, A. B. P. ; Yamaguishi, C. T. ; Lindner, J. D. ; Pandey, A. ; Soccol, V. T. *Food Technol. Biotechnol*, **2010**. 48 (4) 413–434.
28. Rosenberg, I. Z. ; Rosenberg, E. J. *Microbial Biochem Technol*, **2011**, S1.
29. Özden, A. *Güncel Gastroenteroloji*, **2006**, 10/3, 273-278.
30. Sullivan A. ; Nord, C. E. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2002**, 50, 625–627.
31. Probiotics: Review and Outlook, 3rd International Convention, Paris, 2nd and 3rd December 2004.
32. Özen, M. Probiyotikler: anlatılmayan Tarihçe Nobel tıp kitap evleri, 2011, 1-15
33. Gürsoy, O. ; Kınık, Ö. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, **2006**, 43(1), 181-188.
34. Rusch, V. Probiotics: Bacteria And Bacterial Fragments As Immunomodulatory Agents, 2001 Old Herborn University Seminar No. 15, 2002.
35. Fuller, R. *Journal of Applied Bacteriology*, **1989**, 66, 365-378.
36. Gürbüz, H. *nsan Kaynaklı Lactobacillus spp. Su larında Agregasyonun Probiyotik Önemi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2004.
37. Kopp-Hoolihan, L. *J Am Diet Assoc*, **2001**; 101: 229-238.
38. Doron, S. ; Snyderman, D. R. ; Gorbach, S. L. *Gastroenterol Clin North Am*, **2005**, 34: 483-498.
39. Gionchetti, P. ; Lammers, K. M. ; Rizzello, F. ; Campieri, M. *Gastroenterol Clin North Am*, **2005**, 34: 499-513.
40. Çelen, E. ; Hız, I. ; Vural, T. *Güncel Gastroloji Dergisi*, **1999**; 403-405.
41. Önal, D. *Bazı laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin araştırılması*. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2005.
42. Gülmez, M. ; Güven, A. *Kafkas üniv. Vet. Fak. Derg.*, **2002**, 8(1): 83-89.

43. Donnet-Hughes, A. ; Rochat, F. ; Serrant, P. ; Aeschlimann, J. M. ; Schiffrin, J. *J Dairy Sci*, **1999**, 82, 863–869.
44. Gibson, G. R. ; Fuller, R. *American Society for Nutritional Sciences*, **2000**, 391-395.
45. Uncello, M. ;Malaguarena G, Basile. F. , *BMC Surg.* **2012**, 12 1, 35.
46. Senok, A. C. ; Ismaeel, A. Y. ; Botta, G. A. *Clin Microbiol Infect*, **2005**, 11, 958-966.
47. Hill, H. S. ; Guarner, F. *Postgrad Med J*, **2004**, 80, 516-526.
48. Penner, R. ; Fedorak, R. N. ; Madsen, K. L. *Curr Opin Pharmacol*, **2005**, 5, 1-8.
49. Hoyos, A. B. *Int. J. Infect Dis.*, **1999**, 3, 197-202.
50. Erdeve, O. ; Tiras, U. ; Dallar, Y. ; Sava , S. *Aliment Pharmacol Ther*, **2005**, 21, 1508-1509.
51. Felley, C. ; Michetti, P. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **2003**, 17, 785-91.
52. Hamilton-Miller, J. M. *Int J. Antimicrob Agents*, **2003**, 22, 360-366.
53. Commane, D. ; Hughes, R. ; Shortt, C. ; Rowland, I. *Mutation Res.*, **2005**, 591, 276-289.
54. Kampman, E. ; Goldbohm, R. A. ; Van Den Brandt, P. A. *Cancer Res.*, **1994**, 54, 3186-3190.
55. Mohan, J. C. ; Arora, R. ; Khalilullah, M. *Indian Heart J.* **1990**, 42, 361-364.
56. Belviso, S. ; Giordano, M. ; Dolci, P. ; Zeppa, G. *Dairy Sci. Technol.*, **2009**, 89, 169–176.
57. Isolauri, E. et al *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, 73 (suppl), 444-450.
58. Vanderhoof, J. A. ; Young, R. J. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **2004**, 93, (Suppl 3), 33-37.
59. Penra, F. J. ; Filho, L. A. ; Calsada, A. C. ; Junior, H. ; Nicloi, J. R. *J. Pediatr*, **2000**, 76, (Suppl 2), 209.
60. Roberfroid, M. B. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2000**, 71, (supp 1), 1682–1687.
61. Klaenhammer, R. T. *J. Nutr.*, **2000**, 130, 415-416.
62. Gibson, G. R. *Clin Nutr.*, **2004**, 1, (Supp 1), 25-31.
63. Langlands, S. J. ; Hopkins, M. J. ; Coleman, N. ; Cummings, J. H. *Gut*, **2004**, 53, 1610-1616.

64. Brannon, C. Prebiotics: feeding friendly bacteria. Today's Dietitian September 2003.
65. Ya cı, R. *Çocuk Sa lı ı ve Hastalıkları Dergisi*, **2002**, 45(4), 337-344.
66. Manning, T. S. ; Gibson, G. R. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol*, **2004**, 18, 287-298.
67. Rastall, R. A. ; Maitin, V. *Curr Opin Biotechnol*, **2002**, 13, 490-496.
68. Peitsudou, K. ; karantanos, T. ; Theodoropoulos, G.E. *Dig Sung*. 2012, 29(5), 426-428.
69. Daeschel, M. A. *Food Technol.*, **1989**, 164-167.
70. Tunail, N. *Mikrobiyoloji*, Pelin ofset, Ankara, 2009.
71. Tunail, N. ; Kö ker, Ö. *Süt Mikrobiyolojisi*, A. Ü. Ziraat Fak., Ankara, 1989.
72. Yeti meyen, A. *Süt Teknolojisi*, A. Ü. Ziraat Fak., Ankara, 1995.
73. Arda, M. *Genel Bakteriyoloji*, A. Ü. Vet. Fak., Ankara, 1985.
74. Sneath, P. H. A. ; Mair, N. S. ; Sharpe, M. E. ; Holt, J.G. *Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology*, Williams&Wilkins, London, 1986.
75. Ambrosini, V. M. ; Gonzales, S. ; Holgado, A. P. R. ; Oliver, G. J. *Food Prot.*, **1998**, 61 (5), 557-562.
76. Drinan, D. F. ; Tobin, S. ; Cogan, T. M. *Applied And Environmental Microbiology*, **1976**, 481-486.
77. Prescott, C. S. ; Dunn, G. C., *Industrial Microbiology, Published on Distributors*, Delhi, India, 1987.
78. Tekin en, O. C. ; Atasever, M. *Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür*, Selçuk Ü. Vet. Fak. Yayınları, Konya, 1994.
79. Halkman, K. *Tarım Mikrobiyolojisi*, A. Ü. Ziraat Fak., Ankara, 1991.
80. Aslım, B. ; Beyatlı, Y. ; Halkman, K. *Türk J. Biol.*, **2000**, 24, 65-78.
81. Çetin, E. T. *Endüstriyel Mikrobiyoloji*, . Tıp Fak. Yayınları, stanbul, 1983.
82. Üçüncü, M. *Süt Ve Mamulleri Teknolojisi*, zmir, 2005.
83. Con, A. ; Gökalp, H.Y., *Türk Mikrobiyol. Cem Derg.*, **2000**, 30, 180-190.
84. Evren, M. ; Albayram, C. ; Apan, M. *Laktik Asit Bakterilerinin Olu turdu u Antimikrobiyel Maddeler*, Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006, Bolu, 977-980.
85. Dahiya, R. S. ; Speck, M. L. *J. Dairy Sci.* **1968**, (51), 1568.

86. Juven, B. J. ; Schved, F. ; Lindner, P. *Journal of Food Protection*, **1992**, 55, (3), 157-161.
87. Carminati, D. ; Giraffa, G. ; Bossi, M. G. *J. Food Protect*, **1988**, 52, (9), 614-617.
88. Kognoff, M. F. *Gastroenterology*, **1993**, (105), 1275.
89. Rautava, S. ;Walker, W. A. *Curr. Gastroenterol rep.*, 2007, 9, 385-392.
90. Kayser, F. H. ; Bienz, K. A. ; Eckert, J. ; Zinkernagel, R. M. *Tıbbi Mikrobiyoloji*, Nobel Tıp Kitap Evi, 2002.
91. Erkmen, O. *Gıda Mikrobiyolojisi*, Efil Yayın Evi, Ankara, 2010.
92. Demirba , Z. *Genel Mikrobiyoloji*, Karadeniz Tek. Üni. Fen Edb. Fak. Biyoloji Bölümü, Trabzon, 2006.
93. Ustaçelebi, . *Temel Ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güne Kitap Evi. 1999.
94. Özden, S. *Klinik Örneklerden zole Edilen Klebsiella Pneumoniae Türlerinde Geni letilmi Spektrumlu Beta-Laktamaz Varlı unun Moleküler Tekniklerle Ara tırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007.
95. Kulacao lu, N. *Klinik Örneklerden zole Edilen Pseudomonas Aeruginosa Su larında Hücre Yo unlu unun Farklı Yüzeylere Tutunmadaki Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006.
96. Man, J. C. ; Ragosa, M. ; Sharpe, M. E. A. *J. Appl. Bact.*, **1960**, 23, 130-138.
97. Cruikshank, R. *Med. Microbiol*, 11th Edition Livingstone, London, 1972.
98. Ronald, M. ; Lawrence, A. ; Park, C. *Handbook of Microbiology*, 2th Edition, CRC Press, New York, 1997.
99. Swenson, J. M. ; Facklam, R. R. ; Thornsberry, C. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **1990**, 543-549.
100. Hyronimus, B. ; Le Marrec, C. ; Sassi A. H. ; Deschamps, A. *International Journal of Food Microbiology*, **2000**, (61), 193–197.
101. Iyer, C. ; Kailasapathy, K. *Journal of Food Science*, 2005, 70, (1), 18-23.
102. Begley, M. ; Hill, C. ; Gahan, C. G. M. *Applied And Environmental Microbiology*, **2006**, 1729–1738.
103. Felten, A. ; Bateau, C. ; Bizet, C. ; Lagrange, P. H. ; Philippon A. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, 37, 729-733.

104. Yun, J. H. ; Yim, D. S. ; Kang, J.Y. ; Kang, B. Y. ; Shin, E. A. ; Chung, M. J. ; Kim, S. D. ; Baek, D. H. ; Kim, K. ; Ha, N. J. *Arch Pharm Res.*, **2005**, 28(6), 660-666.
105. Moroni, O. ; Kheadr, E. ; Boutin, Y. ; Lacroix, C. ; Fliss, I. *Appl. Environ. Microb.*, **2006**, 72, 6894-6901.
106. Chou, L. ; Weimer, B. *J. Dairy Sci.*, **1999**, 82, 23-31.
107. Liong, M. T. ; Shah, N. P. *J. Dairy Sci.*, **2005**, 88, 55-66.
108. Pereira, D. I. A. ; Mccartney, A. L. ; Gibson, G. R. *Applied And Environmental Microbiology*, **2003**, 4743-4752.
109. im ek, Ö. ; Çon, A. H. ; Tulumolu, . *Food Control*, **2006**, 17, 263-270.
110. Salminen, M. K. ; Rautelin, H. ; Tynkkynen, S. ; Poussa, T. ; Saxelin, M. ; Valtonen V. ; Järvinen, A. *Clin. Infect. Dis.*, **2006**, 42:35-44.
111. Charteris, W. P. ; Kelly, P. M. ; Morelli, L. ; Collins, J. K.. *J. Food Protect*, **1998**, 61, 1636-1643.
112. Avonts, L. ; De-Vuyst, L. *Gent.*, **2001**, 66, 543-545.
113. Ashraf, M. ; Arshad, M. ; Siddique M. ; Muhammad, G. *Pakistan Vet. J.*, 2009, 29, (4), 186-190.
114. Harris, C. J. ; Deschell, M. A. ; Stiles, M. E. ; Klaenhammer, T. R. *J. Food. Protect.*, **1989**, 52: 384-387.
115. Forestier, C. ; De Champs, C. ; Vatoux, C ; Joly, B. *Res. Microbiol.*, **2001**, 152, 167-173.
116. Kaur, I. P. ; Chopra, K. ; Saini, A. *Eur. J. Pharma Sci.*, **2002**, 15, 1-9.
117. Stewart, L. ; Pellegrini, C. A. ; Way, L.W. *Surg. Forum*, **1986**, 37, 157-159.
118. Klayraung, S. ; Okonogi, S. *Brazilian Journal of Microbiology*, **2009**, 40, 757-766.
119. Ziarno, M. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, **2007**, 6(2), 29-40.
120. Jacobsen, C. N. ; Nielsen V. R. ; Hayford, A. E. ; Moller, P. L. ; Michaelsen, K. F. ; Pærregaard, A. ; Sandström, B. ; Tvede, M. ; Jakobsen, M. *Applied And Environmental Microbiology*, **1999**, 4949-4956.
121. Moser, S. A. ; Savage, D. C. *Applied And Environmental Microbiology*, **2001**, 3476-3480.

122. Martín, R. ; Jiménez, E. ; Olivares, M. ; Marín, M. L. ; Fernández, L. ; Xaus, J. ; Rodríguez, J. M. *International Journal of Food Microbiology*, **2006**, 112, 35-43.
123. Klare, I. ; Konstabel, C. ; Werner, G. ; Huys, G. ; Vankerckhoven, V. ; Kahlmeter, G. ; Hildebrandt, B. ; Müller-Bertling, S. ; Witte, W. ; Goossens, H. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2007**, 59, 900–912.
124. Tuomola, E. ; Crittenden, R. ; Playne, M. ; Erika, I. ; Salminen, S. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2001**, 73, 393–39S.
125. Prasad, J. ; Gill, H. ; Smart, J. ; Gopal, P. K. *nt. Dairy Journal*, **1998**, 993–1002.
126. Xanthopoulos, V. ; Petridis D. ; Tzanetakis, *Food Microbiology and Safety*, **2001**, 66(5), 747-752.
127. Pereira, D. I. A. ; Gibson, G. R. *Applied And Environmental Microbiology*, **2002**, 4689–4693.
128. Haller, D. ; Colbus, H. ; Gänzle, M. G. ; Scherenbacher, P. ; Bode, C. ; Hammes W. P. *Systematic and Applied Microbiology*, **2001**, 218–226.
129. Papamanoli, E. ; Tzanetakis, N. ; Litopoulou-Tzanetaki, E. ; Kotzekidou, P. *Meat Science*, 2003, 859–867.
130. Gilliland, S. E. ; Walker, D. K. *Journal of Dairy Science*, **1990**, 905–911.
131. Usman, U. ; Hosono A. *J. Dairy Sci.*, **1999**, 82, 243–248.
132. Sanders, M. E. *Journal of Nutrition*, **2000**, 130, 384–390.
133. Bongaerts, G. ; Bakkeren, J. ; Severijnen, R. ; Sperl, W. ; Willems, H. ; Naber, T. ; Wevers, R. ; Van Meurs, A. ; Tolboom, J. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.*, **2000**, 30(3), 288-93.
134. Temmerman, R. ; Scheirlinck, I. ; Huys, G. ; Swings, J. *Applied And Environmental Microbiology*, **2003**, 220–226.
135. Arıcı, M. ; Bilgin, B. ; Sa dıç, O. ; Özdemir, C. *Food Microbiology*, 2004, 21, 19-24.
136. Gilliland, S. E. ; Nelson, C. R. ; Maxwell, C. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1985**, 49, 377-381.
137. Buck, L. M. ; Gilliland, S. E. *Journal of Dairy Science*, **1994**, 77 (10) 2925-2933.

- 138.**Brashears, M. M. ; Gilliland, S. E. ; Buck, L. M. *Journal of Dairy Science*, **1998**, 81(8), 2103-2110.
- 139.**Liong, M. T. ; Shah, N. P. *J. Dairy Sci.*, **2005**, 88, 55-66.
- 140.**Lye, H. S. ; Ali, G. R. R. ; Liong, M. T. *International Dairy Journal*, **2010**, 20, 169-175.
- 141.**Starchan, D.P. *Thorax* 2000 55(1), 2-10.