

**DIŞ ÇÜRÜKLERİNE KARŞI  
PROBİYOTİKLERİN KULLANILMA  
OLANAKLARI**

**Özlem ERTEN**

**Yüksek Lisans Tezi  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**ISPARTA, 2005**

T.C.

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİŞ ÇÜRÜKLERİNE KARŞI PROBİYOTİKLERİN KULLANILMA  
OLANAKLARI

Özlem ERTEN

**Yüksek Lisans Tezi**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**Danışman**

Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN

**ISPARTA, 2005**

**S.D.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**

Bu çalışma jürimiz tarafından GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : .....

Üye : .....

Üye : .....

Üye : .....

**ONAY**

Bu tez .../.../200 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda, yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

.../.../20...

**Prof. Dr. Çiğdem SAVAŞKAN**

**Enstitü Müdürü**

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	3
2.1. Probiyotik bakteriler.....	3
2.2. Ağız boşluğu.....	6
2.2.1. Diş Plağı Mikroorganizmaları.....	7
2.2.2. Dişeti Oluğu Mikroorganizmaları.....	7
2.2.3. Dil Mikroorganizmaları.....	8
2.2.4. Tükürük Mikroorganizmaları.....	8
2.2.5. Diş Çürüğü.....	8
2.2.6. Çürükte Rol Oynayan Mikroorganizmalar.....	9
2.2.7. Plak Oluşumu.....	10
2.3. Probiyotiklerin Diş Çürümelerine Karşı Gösterdikleri Etki Mekanizmaları.....	11
2.3.1. Antimikrobiyal madde üretimi.....	12
2.3.2. Koloni oluşumunun rekabetle önlenmesi.....	13
2.3.3. Yer değiştirme yoluyla.....	14
3. MATERYAL VE METOT.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Örneklerin toplanması.....	20
3.2. Metot.....	20
3.2.1. Örneklerin izolasyon için hazırlanması.....	20
3.2.2. İzolasyon.....	20
3.2.2.1. Preparatların fotoğraflarının çekilmesi.....	21
3.2.2.2. İzolasyonda kullanılan besiyerleri.....	21
3.2.2.3. Saf kültürlerin muhafaza edilmesi.....	23
3.2.3. Laktobasillerin tanısı.....	23
3.2.3.1. Glikozdan gaz oluşturma.....	24
3.2.3.2. Arjininden amonyak oluşturma.....	24
3.2.3.3. 15 °C ve 45 °C’de gelişme.....	25
3.2.3.4. Karbonhidrat fermantasyon testleri.....	25
3.2.4. Kokların tanısı.....	26
3.2.4.1. 10 °C ve 45 °C’de gelişme.....	26
3.2.4.2. pH 9.6’da gelişim.....	26
3.2.4.3. %4 ve %6.5 NaCl’de üreme.....	27
3.2.4.4. Şeker fermantasyon testleri.....	27
3.2.5. Laktobasillerin streptokoklara karşı antagonistik etkilerinin belirlenmesi.....	28
3.2.6. Bakterilerin tutunma özelliklerinin belirlenmesi.....	28
3.2.6.1. Hidroksiapatit Çözeltisinin Hazırlanması.....	29
3.2.6.2. Kuyucukların hidroksiapatit veya kalsitleme çözeltisi kaplanması.....	30
3.2.6.3. Bakterilerin biyotinle işaretlenmesi.....	30

3.2.6.4. Yapay tükürük hazırlanması.....	30
3.2.6.5. PBS (Phosphate Buffered Saline) hazırlanması.....	31
3.2.7. Laktobasil ve streptokokların birbirlerine karşı etkilerinin diş yüzeyinde incelenmesi.....	31
3.2.8. Laktobasillerin plasmid profillerinin belirlenmesi.....	32
3.2.9. Laktobasillerin asit oluşturma yeteneğinin değiştirilmesi .....	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	36
4.1. Anket sonuçları.....	36
4.2. İzolasyon sonuçları.....	37
4.3. Antagonistik etki denemeleri sonuçları.....	46
4.4. Tutunma denemesi sonuçları.....	48
4.4.1. Streptokokların farklı yüzeylere tutunma özelliklerinin belirlenmesi.....	48
4.4.2. Streptokokların laktobasil varlığında HAP yüzeylere tutunma özelliklerinin belirlenmesi.....	50
4.5. <i>S.mutans</i> suşlarının laktobasil varlığında diş yüzeyine tutunma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerin sonuçları.....	51
4.6. Laktobasillerin plazmid profillerinin belirlenmesi.....	54
4.7. Ağız probiyotiği olarak kullanılması önerilen laktobasillerin asit oluşturma yeteneklerinin giderilmesi.....	56
5. SONUÇ.....	57
KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	65
EKLER.....	66
EK 1 Örnek alınan hastalara uygulanan anket formu.....	67
EK 2. Örnek alınan bireylerin beslenme alışkanlıkları ve ağız sağlığını korumaya yönelik tercihleri.....	68
EK 3. Laktobasillerin izolasyon kaynakları, mikroskobik görünümleri ve koloni şekilleri.....	69
EK 4 Süt ve süt ürünleri tüketimine göre izolat sayıları.....	72
EK 5. Laktobasillere ait biyokimyasal tanı testi sonuçları.....	73
EK 6. Laktobasillere ait karbonhidrat fermantasyon testleri sonuçları.....	75
EK 7. Kok ve mayaların izolasyon kaynakları, mikroskobik görünümleri ve koloni şekilleri.....	77
EK 8. Streptokok ve enterokoklara ait biyokimyasal tanı testi sonuçları.....	78
EK 9. Streptokok ve enterokoklara ait fermantasyon testleri sonuçları.....	79
EK 10. Laktobasillerin streptokoklara karşı oluşturdukları zonların çapı (mm).....	80
EK 11 Laktobasillerin ve streptokokların adezyon özelliklerinin kıyaslanması amacıyla laktobasil suşları kullanılarak gerçekleştirilen denemelere ait sonuçlar.....	82

## ÖZET

### DİŞ ÇÜRÜMELERİNE KARŞI PROBİYOTİKLERİN KULLANILMA OLANAKLARI

Bu çalışmada çürük ve sağlıklı dişlerden izole edilen laktik asit bakterilerinin diş sağlığı üzerine etkileri araştırılmış ve diş sağlığının korunmasına katkı sağlayacak probiyotik bakterilerinin seçimi yapılmıştır.

Bu amaçla 10 adedi çürük diş yüzeyinden, 2 adedi çürük diş plağından ve 7 adedi sağlıklı diş plağından olmak üzere toplam 19 adet örnek izolasyon materyali olarak kullanılmıştır. Bu örneklerden izole edilen laktobasil ve streptokokların biyokimyasal testlerle tanısı yapılmıştır. Bu test sonuçlarına göre toplam 48 adet laktobasil suşundan 7 adedinin *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (%14.5), 9 adedinin *Lactobacillus fermentum* (%18.75), 3 adedinin *Lactobacillus reuteri* (%6.25) ve 1 adedinin de *Lactobacillus salivarius* (%2.08) olduğu tespit edilmiştir. Kalan 29 adet izolatın tür düzeyinde tanısı yapılamamakla birlikte, bu bakterilerin *Lactobacillus* sp. (%60.41) olarak tanısı konmuştur. Streptokok izolatlarından ise 4 adedinin oral streptokoklardan *Streptococcus mutans* grubuna ait olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların tür düzeyinde identifikasyonları ancak genetik tanı yöntemiyle yapılabilmektedir. Kalan 16 adet izolattan 13 adedinin enterokok, 3 adedinin ise maya olduğu tespit edilmiştir. Enterokokların biyokimyasal test sonuçlarına göre *Streptococcus avium* veya *Streptococcus gallinarum* olabileceği sonucuna varılmıştır. Tanının kesinleştirilmesi genetik yöntemlerle mümkündür.

Tanı testlerinden sonra laktobasillerin streptokoklar üzerine antagonistik etkileri belirlenmiştir. Daha sonra hidroksiapatit kaplı yüzeylerde laktobasil ve streptokokların tutunma özellikleri tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar antagonistik etki sonuçları ile birlikte değerlendirilmiştir. Tutunma yüzeyleri için rekabet yoluyla diş çürümelerinin önlenmesi açısından en iyi özellik gösteren laktobasil suşları yapay diş yüzeyi ortamının sağlandığı hidroksiapatit ile kaplı yüzeylerde streptokoklara karşı denenmiştir. Denemeler sonucunda *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 1955 ve *Lactobacillus salivarius* 1970 suşlarının *Streptococcus mutans* suşlarının bu yüzeylere tutunmasını önemli ölçüde engelledikleri tespit edilmiştir.

Tutunma denemesi çürüksüz ve sağlıklı diş örnekleri kullanılarak tekrarlanmıştır. Bu denemeler sonucunda laktobasil ve streptokokların yüzeye tutunma miktarları arasında sayıca çok fazla fark olmadığı tespit edilmiştir.

Tutunma denemelerinden sonra *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 1955 ve *Lactobacillus salivarius* 1970'in plazmid profilleri belirlenmeye çalışılmıştır. Laktobasillerin asit üretimlerinin düşürülmesi amacıyla etidyum bromid (50 µg/ml ve 100 µg /ml) uygulaması yapılmıştır. CaCO<sub>3</sub> içeren MRS agar besiyerinde asit üretimi azaltılmış mutantların belirlenmesi yoluna gidilmiştir.

Antagonistik etki ve spektrofotometrik tutunma denemelerinin sonuçları bir arada değerlendirildiğinde *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 1955 ve *Lactobacillus salivarius* 1970'in ağız probiyotiği olarak kullanılması önerilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Probiyotikler, Laktik asit bakterileri, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, *Streptococcus mutans*, Diş çürüğü, Plazmid mutasyonu

## ABSTRACT

### THE USE OF PROBIOTICS AGAINST DENTAL CAVITIES

In this study the effect of lactic acid bacteria isolated from healthy and the teeth with cavity on teeth health was investigated. In addition, the selection of probiotic bacteria which will help to keep teeth healthy was also done.

Total of 19 plaque samples from 12 persons having dental cavity and 7 from healthy persons teeth. Biochemical tests were done for the identification of isolated lactobacilli and streptococci. According to the results, of the 48 lactobacilli, 7 were identified as *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (%14.5), 9 were *Lactobacillus fermentum* (%18.75), 3 were *Lactobacillus reuteri* (%6.25) and 1 were *Lactobacillus salivarius* (%2.08). 29 of the isolate were identified as *Lactobacillus* sp.(60.41), however they were not identified at species level. Four of oral streptococci isolates were identified as *Streptococcus mutans*.

The identification of these strains at species level can only be done by using molecular techniques. 13 strains were identified as enterococci and 3 were identified as yeasts. According to the biochemical test results it was thought that the strains were *Streptococcus avium* or *Streptococcus gallinarum*.

After identification tests, the antagonistic effect of *Lactobacillus* strains on streptococci were determined. After that, adhesion properties of *Lactobacillus* and *Streptococcus* strains on hydroxyapatite coated surfaces were investigated. The results were evaluated together with antagonistic study results. Then *Lactobacillus* strains which were found most promising were tested for their competitiveness against streptococci on hydroxyapatite coated surfaces. The experiments showed that, the strains *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 1955 and *Lactobacillus salivarius* 1970 prevented the adhesion of *Streptococcus mutans* strains on the surfaces significantly.

Adhesion experiments were reported by using healthy teeth also. The results showed that there was no significant difference between the colonization capability of lactobacilli and streptococci.

Following the adhesion experiments plasmid profiles of strains *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 1955 and *Lactobacillus salivarius* 1970 were investigated. In order to decrease the acid production of *Lactobacillus* strains ethidium bromide (50 µg/ml ve 100 µg /ml) was applied. The mutant strains then chosen from the MRS agar plates containing CaCO<sub>3</sub>

When antagonistic effects and adhesion properties of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 1955 and *Lactobacillus salivarius* 1970 were evaluated, these strains were potentially found to be used as mouth probiotics.

**Key Words:** Probiotics, Lactic Acid Bacteria, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, *Streptococcus mutans*, Dental cavity, Plasmid Mutation

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sırasında bilgi ve deneyimlerini paylaşarak bana yol gösteren ve her koşulda yanımda olup bana destek veren Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Aynur Gül KARAHAN'a, engin bilgisi ve önerileriyle her zaman yanımda olan Sayın Hocam Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI'ya,

İzolasyon materyali olarak kullandığım diş örneklerini temin etmemde bana yardımcı olan S. D. Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Yeşim BOZKURT'a, Araş. Gör. Yeşim ERDEK ve Araş. Gör. Gizem KILIÇ'a, çalışmamın son kısımlarında bana laboratuvarlarında çalışma imkanı sağlayan S. D. Ü. Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN'a, Dr. Salih ARIKAN'a,

Çalışmamın bir bölümünde bana destek olarak bilgi ve tecrübesinden yararlanmamı sağlayan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. İbrahim ÇAKIR'a

Çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Zübeyde ÖNER'e, Dr. Hakan KULEAŞAN'a, canım arkadaşlarım Öğr. Gör. Arzu GÜNDOĞDU, Araş. Gör. Gülden BAŞYİĞİT ve Araş. Gör. Hatice ALOĞLU'na, S.D.Ü. Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma Uygulama ve Uygulama Merkezi'ndeki çalışmalarında yardımları olan araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim sevgili aileme, en zor zamanlarımda bana destek vererek asla vazgeçmememi sağlayan sevgili eşime ve küçücük yaşına rağmen anlayışlı davranarak uslu duran canım kızıma en içten dileklerle teşekkür ederim.

**Isparta, Ağustos-2005**

**Özlem ERTEN**



**ŞEKİLLER DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.1. Mayaların mikroskopik görüntüsü.....	43
Şekil 4.2. Streptokokların mikroskopik görüntüsü.....	44
Şekil 4.3 Laktobasillerin mikroskopik görüntüsü.....	45
Şekil 4.4. Enterokokların mikroskopik görüntüsü.....	46
Şekil 4.5. Antagonistik etki denemelerinde kullanılan petri kutularının görünümü.....	48
Şekil 4.6 O’Sullivan ve Klaenhammer (1993)’in yöntemi ile plazmid izolasyonu.....	55
Şekil 4.7. Çakır (2003)’ün yöntemi ile plazmid izolasyonu.....	55

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 4.1. Diş örneklerinin yaş ve cinsiyete göre ayrımı.....	36
Çizelge 4.2. Laktobasillerin fermantatif özelliklerine göre sınıflandırılması.....	40
Çizelge 4.3. <i>S.mutans</i> suşlarının farklı yüzeylere tutunma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemenin sonuçları.....	49
Çizelge 4.4. Streptokokların laktobasil varlığında HAP yüzeylere tutunma özelliklerinin belirlenmesi.....	51
Çizelge 4.5. Bakterilerin tek başlarına tutunma özelliklerinin incelendiği denemelerin sonuçları.....	52
Çizelge 4.6. Bakterilerin aynı ortamda birbirlerine karşı etkilerinin incelendiği denemelere ait sonuçlar.....	52
Çizelge 4.7. Bakterilerin tek başlarına tutunma özelliklerinin incelendiği denemelerin sonuçları.....	53
Çizelge 4.8. Bakterilerin aynı ortamda birbirlerine karşı etkilerinin incelendiği denemelere ait sonuçlar .....	53

## 1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri, fermente ve fermente olmayan gıdalarda ve insan mikroflorasında sıklıkla yer alan bakterilerdir. Bu bakterilerin genellikle güvenli olarak tanımlanmaları ve sağlık açısından yararlı etkileri bulunan probiyotik role sahip olmalarından dolayı, özellikle tüketim için tercih edilmelerini sağlamaktadır.

Probiyotikler, bağırsak mikroflorasının dengelenmesini sağlayan ve sağlık açısından pek çok faydalı etkiye sahip olan, canlı mikrobiyal gıda bileşenleri olarak tanımlanabilmektedir. Probiyotik olarak en yaygın şekilde kullanılan bakteriler laktobasiller ve bifidobakterlerdir. Bifidobakterler de, birçok ortak özelliğe sahip olmaları nedeniyle, laktik asit bakterileri ile beraber anılmaktadırlar.

Laktik asit bakterileri, gıda bozulmalarına ve gıda zehirlenmelerine neden olan mikroorganizmaların inhibisyonunu sağlamaları, geleneksel fermente gıda üretiminde gıdanın kalite ve güvenliğini artırmaları ve probiyotik olarak kullanıldıklarında ise insan gastrointestinal sisteminde bulunan patojen mikroorganizmalara karşı mücadelede rol oynamaları nedeniyle önemle üzerinde durulan bakterilerdendir. Bu bakteriler özellikle antimikrobiyal madde üretimi ile patojenlere karşı savunma mekanizmasına dahil olmaktadır. Düşük pH, organik asit, bakteriyosin, CO<sub>2</sub>, hidrojen peroksit, etanol ve diasetil üretmeleri ile düşük redoks potansiyeline sahip olmaları nedeniyle gıdaların korunmasında rol almaktadırlar.

Diş çevresinde toplanan maddelerle diş hastalığının ilişkisi uzun zamandır bilinmektedir. Mekanik ve kimyasal araçlarla bu maddelerin giderilmesini sağlayan koruyucu tedbirler önerilmektedir. Fırça, mumlu iplik kullanılması, suyun çalkalama etkisi ve diş macunu, ağız banyosu kullanılması alınan tedbirlerdir. Ancak tüm bu tedbirlerin diş çürümelerini engelleyici etkisine yönelik çelişkili bulgulara rastlanmaktadır. Söz konusu nedenlerle, seçilecek “ağız probiyotiği” ile çürüklere karşı yeni bir yaklaşım oluşturulmaktadır. Özellikle ülkemizde her 4 kişiye bir adet

## 2. KAYNAK BİLGİSİ

### 2.1. Probiyotik bakteriler

Probiyotik bakteriler yirmi yılı aşkın bir süredir fermente süt ürünleri gibi gıdalarda kullanılmaktadır . Probiyotik bakteri seçimi güvenilirlik, fonksiyonellik ve teknolojik özelliklerine bağlı olarak yapılmaktadır. Güvenilirlik özellikleri orijinlerine , patojen olmamalarına ve antibiyotik dirençlerine göre tespit edilir. Fonksiyonellik özellikleri canlı kalabilme sürelerine, immunomodülasyon, antagonizm ve antitumör özelliklerine bağlıdır. Teknolojik açıdan en önemli koşul ise endüstriyel şartlarda üretime katılabilme özelliğidir. Ayrıca depolama sürecinde varlıklarını sürdürebilmeli ve aroma değişimlerine neden olmamalıdır.

Probiyotik bakteriler gıdalar ile alınan ve tüketicinin sağlığına faydalı görülen, barsak mikrobiyal dengesinin gelişmesine yardımcı olan canlı mikroorganizmalar ve metabolitleridir. Bunlar Generally Regarded As Safe (GRAS) statüsünde olmaları ve insan sağlığı açısından sağladıkları faydalar nedeniyle probiyotik ürün üretiminde tercih edilmektedirler (Collins vd., 1998). Fonksiyonel gıdalardaki en önemli gelişme barsak florasının gelişmesi yönünde katkı sağlayan, probiyotik içeren gıdalar ile gerçekleşmiştir (Saarela vd., 2000).

Bir probiyotik bakterinin insan sağlığına faydalı olabilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekir:

- Canlılığını ve etkisini kaybetmeden üretimde yer alabilmelidir,
- Üst gastrointestinal sistemden canlı şekilde geçebilmelidir,
- Mide ve çevresi bölgelerde de etkisini sürdürebilmelidir,
- Patojenik olmamalıdır,
- Antitumör, antikarsinogenik ve antagonistik etkiye sahip olmalıdır,
- Güvenli olmalı ve gıdaya istenen duyuşsal özellikleri kazandırmalıdır (Saarela vd., 2000).
- Düşük pH değerlerini tolere edebilmelidir,

diş fırçası düştüğü gözönüne alınır; bu konudaki çalışmaların önemi daha iyi anlatılmış olur.

Laktik asit bakterileri karbohidrat fermentasyonu sonucunda laktik ve asetik asit gibi organik asitler üretebilmekte ve bu asitler ekolojik pH'ı düşürmekte, böylece de aynı ortamda bulunan mikroorganizmalar ile olan etkileşim de değişmektedir. Bu bakterilerin antimikrobiyal aktivitelerinin tanımlanmasında farklı faktörler göze çarpar. Bunlar; düşük pH, organik asit, bakteriyosin, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etanol, diasetil ve düşük redoks potansiyeli oluşturmalarıdır. Laktik asit bakterileri bu özelliklerinden dolayı özellikle bağırsak ve ağız enfeksiyonlarında kontrolü sağlayabilmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu açıdan özellikle laktobasiller önem taşımaktadır.

Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda başta sert peynirler olmak üzere, probiyotik bakteri içeren süt ve süt ürünlerinin diş sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu kesinlik kazanmıştır. Bu tür gıdaların özellikle çocukluk dönemlerinde tüketilmesine bağlı olarak, çocukların ileriki yaşlarda diş sağlığının korunması mümkün olmaktadır. Diş sağlığı üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle bu çalışmada laktobasillerden oluşturulmuş bir probiyotik hazırlanması amaçlanmıştır.

Ağız boşluğunda sürekli olarak bulunan doğal mikroflora beslenme şekli ve bireyin yaşadığı coğrafi bölge ile yakından ilgilidir. Bu nedenle öncelikle sağlıklı ve diş çürümesi olan bireylerden laktobasiller izole edilerek her iki grup arasındaki farklılıkların belirlenmesine çalışılmıştır. Diş yüzeyine tutunma özelliğine sahip laktobasillerin, diş çürümelerinde önem taşıyan asit oluşturma yeteneklerinin zayıflatılması yoluyla ülkemize özgü, güvenilir "ağız probiyotiği preparatının hazırlanması amaçlanmaktadır.

- Safra asitlerinin yüksek konsantrasyonlarına dayanıklı olmalıdır,
- Probiyotik suş bağışıklık sistemi tarafından tolere edilebilmeli ve vücutta probiyotik suşlara karşı antikor oluşmamalıdır,
- Aktarılabılır antibiyotik direnç geni taşımamalıdır,
- Enfektif endokartitis gibi hastalıklarda etken olarak görülmüş olmamalıdır (Collins vd., 1998).

Gıda endüstrisinde kullanılan bakterilerin güvenli olarak tanımlanabilmesi için taksonomik sınıflandırmanın yapılması gerekmektedir. Birçok durumda probiyotikler ait oldukları tür ve cinslere göre veya gıdalarda kullanılan mikroorganizmalar olduklarından güvenli olarak değerlendirilmektedir. Bakteriler metabolik aktivitelerine göre daha kolay sınıflandırılabilir. Gıda matriksindeki ve tüketim sonrası bağırsak sistemindeki metabolik aktiviteleri güvenilirlik kriterleridir.

Bazı bakterilerin enzimleri bağırsaktaki karsinojen ve diğer toksikanların metabolizması için önemlidir. Bu enzimler başlıca redüktazlar ve hidrolazlardır. Ağız florası ise nitrat redüksiyonunda önemli role sahiptir. Nitrit, nitrozamin oluşumu öncesinde midenin asitli ortamında var olmaktadır. Nitrozamin ise karsinojenik bir bileşendir ve laktobasiller ile bifidobakterlerde nitroredüktaz aktivitesi bulunmaktadır (O'brien vd., 1999). Bu enzim ile anaerobik koşullarda nitrat ve nitriti indirgeyerek nitrik oksit oluşumunda katkı sağlamaktadır (O'brien vd., 1999).

Probiyotik kültürler genellikle tek veya birkaç suşun karışımından oluşur. Kültürler kapsül veya tablet şeklindeki formülasyonlarda kullanılabilceği gibi geniş çaplı üretim için de kullanılabilir.

Probiyotik bakteriler insan orijinli olduklarından dolayı gıda maddelerinde gelişebilmek için bazı teşviklere ihtiyaç duyarlar. Starter mikroorganizmaların ilavesi, glikoz gibi maddelerle enerji kaynağı ilavesi, maya ekstraktı veya protein hidrolizatları gibi maddelerle biyolojik faktör ilavesi, uygun antioksidanların, mineral maddelerin ve vitaminlerin ilavesi ile ortama uyum sağlama kolaylığı oluşturulabilmektedir. Probiyotik bakterilerin fermantasyon sırasında gelişmesi

istenmektedir. Böylece fermente gıdaya uyumu artacak ve beklenen sayıya ulaşacaktır. Bu bakteriler 37°C'de optimum gelişme gösterdikleri için starter mikroorganizma olarak termofil olanlar tercih edilmelidir.

Probiyotikler starter mikroorganizmaların laktik asit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve bakteriyosinler gibi metabolitlerinden etkilenmektedirler. Bu nedenle seçim yaparken oluşan metabolitler açısından da değerlendirme yapılmalıdır.

Fonksiyonel gıda mideye ulaşınca pH düşer ve disosiyeye olmamış laktik asit miktarı artar. İyonize olmamış asit konsantrasyonu probiyotik suşun yaşamını sürdürebilmesi için çok önemli etkiye sahiptir. Probiyotik bakteri, üründeki laktik asit ve gastrik sıvıdaki HCl miktarına bağlı olarak yaşamını devam ettirir (Saarela vd., 2000).

Laktik asit bakterileri, bir dizi biyokimyasal ve ekolojik benzerlik içeren mikroorganizmalardan oluşur. Bunlar *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella*'dır. Bu bakteriler fermente olan veya olmayan gıdalarda mevcut olmakla beraber insan kommensal mikroflorasının da en önemli bileşenlerindedir. Güvenli olduklarının bilinmesi ve özellikle de probiyotik bir rol üstlenmeleri nedeniyle ilgi çekmektedirler.

Kalın bağırsaktaki fermente edilebilir karbonhidratlar önemli büyüme sınırlayıcı faktörlerdir. Bakteriler ulaşılabilir substratları çok hızlı bir şekilde kullanırlar. Basit şekerler ve disakkaritler ince bağırsakta kolayca emildiklerinden kalın bağırsağa ulaşmazlar. Ancak früktooligosakkaritler gibi bazı kompleks karbonhidratlar sindirilemez ve kalın bağırsağa geçerler. Bu gibi maddeler **prebiyotik** olarak bilinirler ve konağın bağırsak dengesini sağlamak üzere sağlığa yararlı bakterilerin aktivasyonunu teşvik eden, yararlı, sindirilemeyen gıda bileşeni olarak tanımlanırlar. Yapılan araştırmalara göre, bir probiyotik suş ile bu maddelerin bir arada bulunması simbiyotik etki yaratmakta ve suşun bağırsak sistemindeki gelişimini teşvik etmektedir. Prebiyotikler, bifidobakterler ve diğer Gram (+) bakterilerin gelişimini artırmasına karşın, kalın bağırsakta yer alan Gram (-) bakteriler tarafından

kullanılamamaktadır. Genelde kullanılan oligosakkaritler; laktuloz, galaktooligosakkarit ve inulindir. Bunlar ısıtılma işlemi gören sütte bulunur ve insan vücudunda metabolize edilemezler, ancak bifidobakterler tarafından sindirilebilmektedirler (Collins vd., 1998).

Probiyotik bakterilerin sindirim sisteminde yararlı etkilerinin bulunması nedeniyle bu konuda pek çok araştırma yapılmıştır. Ayrıca probiyotik bakterilerin ağız ve diş sağlığı üzerinde de yararlı etkilerinin olduğuna dair bulgular yer almaktadır.

Laktobasiller diş çürümelerine neden olmalarından dolayı yoğun araştırmaların konusu olmakla birlikte, son yıllarda bağırsak sistemine özgü probiyotikler olarak kullanılan bazı laktobasil türlerinin diş çürümelerine karşı etkili olabileceğine dair bulgulara da rastlanmaktadır. Bu bakteriler, diş çürümeye neden olan bakterileri inhibe eden antibakteriyel madde üretimleri ve diş yüzeyindeki tutunma bölgeleri için rekabet gibi mekanizmalarla etkili olmaktadır (Forestier vd., 2001; Ahola vd., 2002; Comelli vd., 2002).

Dünyada yaygın olarak bulunan bir hastalık olan diş çürümesi, bazı tedbirler alınarak önlenmeye çalışılmaktadır. Son yıllarda yoğunlaşan araştırmalarda diş çürümelerinin önlenmesinde probiyotik bakterilerin ağız ve diş sağlığı üzerinde de olumlu etkilere sahip olduğu da kesinlik kazanmıştır. Probiyotik bakterilerle ağız ve diş sağlığının korunması, ilginin giderek arttığı yeni bir yaklaşımdır.

## **2.2. Ağız Boşluğu**

Ağız boşluğu, değişik tipteki birçok mikroorganizmanın yerleşmesi için elverişli ortama sahiptir. 35-36°C sıcaklık, bol nem, çeşitli besin içerikleri ve değişik oksijen basıncı ile bilinen hemen her tür mikroorganizmaya açıktır. Ağız içindeki mikroorganizma yerleşimi doğumla başlar ve dişlerin çıkması, beslenme rejimi, dişlerin kaybı, protez kullanımı, kişinin ağız hijyeni ve genel sağlık durumu gibi etkenler ile ağız mikroflorası gelişimi gerçekleşir. Ağız boşluğunda



mikroorganizmalar için beslenme kaynağı olarak diş etrafındaki maddeler, eksudalar, ölü epitel hücreler ve tükürük içeriği bulunmaktadır.

Diş, temelde 3 tabakadan oluşmaktadır. En dışta koruyucu mine tabakası, minenin hemen altında yer alan dentin ve orta kısımda bulunan öz tabakaları dişin yapısını oluşturmaktadır. Ağız boşluğundaki mikroorganizmalar ağız anatomisindeki değişikliklere göre sınıflandırılmaktadır. Bunlar;

- Diş plağı mikroorganizmaları,
- Dişeti oluşu mikroorganizmaları,
- Dil mikroorganizmaları,
- Yanak mikroorganizmaları,
- Tükürük mikroorganizmalarıdır (Nolte, 1990)..

### **2.2.1. Diş Plağı Mikroorganizmaları**

Dişeti üzerindeki diş plağı; diş yüzeyine, dolgu ve protezlere sıkıca yapışan organizma kümesi olarak tanımlanır. Ağız çalkalanınca ya da su sıklması ile yerinden ayrılmaz. Diş, protein yapılı maddeler ile örtülüdür. Burada bakteri üremesi için gerekli olan amino asitler ve peptitler yer alır. Diş yüzeyi *Streptococcus sanguis* (*S.sanguis*) ve *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) yerleşimi açısından çok elverişli bir ortam olarak görülmektedir. Streptokoklar ağız ve diş yüzeyindeki egemen streptokok florasını oluşturmaktadır. Plağın büyüklüğü ve yapışkanlığı daha çok karbonhidratlı diyetdeki sakkaroz etkisiyle ortaya çıkar. Diş plağındaki *Streptococcus sobrinus* (*S.sobrinus*) ise tükürükten geçmiştir (Nolte, 1990).

### **2.2.2. Dişeti Oluşu Mikroorganizmaları**

Dişeti oluşu çökeleği dişeti üstü plağından değişik bir ortamda gelişir. Bu ortamda tükürüğün olmadığı kabul edilir. Dişeti sıvısı, dökülmüş epitel hücreler ve göç eden akyuvarlar gibi besleyici maddelerle fakültatif ve anaerob mikroorganizmalar için uygun bir besi ortamı hazırlar (Nolte, 1990).

### 2.2.3. Dil Mikroorganizmaları

Bu bölgedeki en yaygın bakteri grubu fakültatif streptokoklardır. Bunların %21'ini *Streptococcus salivarius* (*S.salivarius*) oluşturur (Nolte, 1990).

### 2.2.4. Tükürük Mikroorganizmaları

Ağız boşluğu, dişler, dil , yanak gibi çeşitli yerleşme yerlerinden ayrılan mikroorganizmalar tükürük mikroflorasını oluşturur. *S.salivarius* tükürükteki fakültatif streptokokların %47'sini, dildeki streptokokların %21-55'ini ve yanaktaki streptokokların %10'unu oluşturur(Nolte, 1990).

### 2.2.5. Diş Çürüğü

Diş çürüğü, sayısı ve tipi değişebilen, bakteri, maya, virüs ve protozoadan oluşan, karmaşık bir mikrosistemdir (Simonović vd., 2002). Dişin sert dokularının bir hastalığı olan diş çürüğü; diş sisteminin belirli bölgelerinde oluşur. Tükürük, dil ve ağız kaslarının temizleyici etkisinden korunmuş olan bu bölgeler, besinlerin, bakterilerin, tükürük proteinlerinin ve ağızdaki çökeleğin kolayca biriktiği yerlerdir. Bu kirlilik öğeleri diş plağını oluşturur.

Diş sisteminin kendi kendine temizlenemeyen yerlerinde toplanan karbonhidratların bakterilerce parçalanması sonucunda asit oluşumu gerçekleşir ve buna bağlı olarak da diş minesinin erimesi ile çürük veya erozyon başlamış olur (Tucker vd., 1998). Mine yıkılınca mikroorganizmalar mine prizmaları ve minenin prizmalar arası matriksine girebilirler.

Çürük oluşumu için karbonhidratlar diş plağındaki bakterilerce parçalanırken üretilen asidin, devamlı akan tükürük tarafından uzaklaştırılmadan önce mineyi eritebilmesi gerekir. Asit oluşumu, plaktan tükürük geçmesinden hızlı olduğu için plakta asit toplanır ve pH düşer. Ortamda karbonhidratlar bulunduğu sürece pH aynı düzeyde kalır. Ancak karbonhidratlar bakterilerce harcanır ve tükürük tarafından

uzaklaştırıldığı için pH tekrar yükselir. Diyetteki karbonhidrat miktarı artınca tekrar aynı döngü oluşur ve karbonhidrat ağızda ne kadar uzun süre kalırsa pH'nın başlangıç düzeyine dönme süresi o kadar uzar.

Bir dişin yüzeyinde ne kadar sık asit oluşur ve ne kadar uzun süre kalırsa mine o kadar sık ve uzun asit etkisine maruz kalır. Minenin eriyip erimemesi, plakta ve diş yüzeyindeki kalsiyum-fosfatın çözünürlüğüne bağlıdır. Mine ve dentinin inorganik bölümünün hemen tümünü oluşturan tuz olan kalsiyum-fosfat, nötr ve hafif asidik ortamda çözünür, fakat pH 5'in altında olduğunda çözünürlük artar. Diş yüzeyinde plak yoksa ve diş minesi tükürük ile devamlı temasta ise, minenin mineral bölgesinde erime olmaz. Çünkü tükürükte dişin erimesini önleyecek miktardan daha fazla kalsiyum ve fosfat bulunur (Nolte, 1990).

#### **2.2.6. Çürükte Rol Oynayan Mikroorganizmalar**

Diş çürüğü, diş plağında *mutans* streptokoklar, laktobasiller ve aktinomisetler gibi mikroorganizmaların sayıca artması ile oluşur (Chikindas vd., 1997).

Diş çürümesi etkenlerinden en geniş kapsamlı olarak incelenen mikroorganizmalar laktobasiller ve streptokoklardır. Laktobasiller genellikle barsaklarda yer almakla birlikte, diş çürüğü ve tükürükte de az miktarlarda bulunmakta ve plak florasının streptokoklara göre oldukça az bir kısmını oluşturmaktadırlar (Tagg ve Dierksen, 2003).

Laktobasillerin daha çok kök kanallarında baskın olduğu görülmektedir. Patojenik potansiyelleri kesin olarak belirlenmemişse de, veriler bu bakterilerin besin öğelerinin yeterli olmadığı ortamlarda da yaşamlarını sürdürebildiklerini göstermektedir (Chávez de Paz vd., 2003). Mineral kaybı, bu bakterilerin asit oluşturma kapasitelerine göre gelişmektedir (Badet vd., 2003). Laktobasiller ağızda kritik pH için asit oluşumuna katkı verseler de oluşan asidin önemli bölümü streptokoklardan geldiği için diş çürüğü etkeni olarak kabul edilmezler.

Streptokoklardan ise çürük etkeni olarak kabul edilen başlıca mikroorganizmalar; *S.mitis*, *S.salivarius*, *S.mutans* ve *S.sanguis*'tir (Tagg ve Dierksen, 2003).

Mutans streptokokları, daha çok *S.mutans* adıyla bilinmekle beraber, 4 farklı türü kapsamaktadır: *S.mutans*, *S.sobrinus*, *S.oralis*, *S.cricetus*'tur (de Soet vd., 1991). Bu bakteriler karbonhidratları çok hızlı bir şekilde parçalayarak asit oluştururlar. Böylece çürük oluşumunda egemen rol üstlenirler. Ayrıca streptokokların hücre içi ve hücre dışı polisakkarit oluşturma ve plak yapma özellikleri de bulunmaktadır.

### 2.2.7. Plak Oluşumu

Dişin sert ve yumuşak dokularında oluşan bir bakteriyel biyofilm olan diş plağı, çürükler ve periodontal hastalıkların başlıca nedenlerindedir (Bernimoulin, 2003). Diş plağı, tükürük proteinlerinin diş yüzeyine adsorpsiyonu ile oluşmaktadır. Plak, diş ile çevre arasında bağlantıyı ve bakterilerin diş yüzeyine tutunmalarını sağlar. Ayrıca mineral kaybı ve yenilenmesini düzenleyen seçici geçirgenlik özelliği vardır (Carlén vd., 1998).

Diş yüzeyinde tükürük proteinlerinin çökerek bir tabaka oluşturduğu bölgelerde, tükürükteki mikroorganizmalar yapışır ve minedeki çatlak ve bozukluklardaki mikroorganizmalar, yapışan bakterilerle beraber yayılmaya başlarlar. Bu bakterilerin ve tükürükteki diğer bakterilerle tükürük proteinlerinin yerleşmesi sonucunda plağın kitle ve kalınlığı artar. Burada ilk egemen olan mikroorganizmalar streptokoklardır. Diş çürümeleri, dünya çapında en yaygın kronik hastalıklardan biridir. İngiltere'de yapılan bir çalışmada kalıcı dişlerin tamamlanmasından bir yıl sonra birinci azıdişlerinin % 10'unun ve ikinci azıdişlerinin % 45'inin çürüyebildiği, 15 yaşında birinci azı dişlerinin % 92'sinin, ikinci azıdişlerinin % 68'inin etkilenebildiği belirlenmiştir. Son yıllarda alınan tedbirler nedeniyle diş çürümelerinde azalma belirlenmişse de, medeniyetle bağlantılı olan bu hastalığın tamamen önlenmesi mümkün olamamıştır. Diş çürüğü etkeni olan bakterilerin ağız boşluğundan uzaklaştırılmaları diş tedavilerinde ve diş sağlığının korunmasında ilk basamağı oluşturmaktadır (Steinberg vd., 1999). Diş hastalıklarından korunabilmenin bir diğer

yolu da, mutans streptokoklara karşı bağışıklık geliştirmektir. Bu konuda yapılan bir araştırmada; aşılama yolu ile inek kolostrumunda *S. mutans*'a karşı bağışıklık oluşturulmuş ve normal inek kolostrumu ile diş sağılığına olan etkileri açısından karşılaştırılmıştır. Araştırmaya gore; inek sütündeki antikorlar diş sağılığını etkileyen streptokoklara zɡ olup, sayılarını azaltmaktadır. Kolostrumun antikor miktarı normal süte göre 50-100 kat daha fazladır. Bu tür bağışıklığı artırıcı preparatlar gastrointestinal sistem enfeksiyonlarına karşı koruma olarak kullanılabilir. Bu çalışmada ineğe eşit dozlarda aşı ile *S.mutans* ve *S.sobrinus* suşları verilerek bağışıklık kazanması sağlanmıştır. Böylece kolostral immunoglobulinleri içeren geliştirilmiş bir preparat elde edilmiş olur. Karşıt olarak immunize edilmemiş inekten kontrol preparatı hazırlanmıştır. Liyofilize immun preparatı, ekstraselüler polisakarit üretimini teşvik eden streptokok glikoziltransferaz enzimini inhibe etmektedir. Aynı zamanda *S.mutans* hücrelerini de biraraya toplar ve tükürük kaplı hidroksiapatit yüzeyine tutunmalarını önemli ölçüde engeller. Bulgular ışığında, immun preparatı ürünlerinin rk etkeni olan streptokoklar üzerine güçlü etkilerinin bulunduğu ve ağız sağılığını korumada önemli bir yere sahip olduğu söylenebilmektedir (Loimaranta vd., 1999).

İntraoral yzeyele bakterie adezyonu hidrofobik etkileşimlere bağlıdır. Diş yüzeyinin hidrofobisitesi aktif moleküller içeren karışımlarla dişi kaplamak suretiyle değiştirilebilir. Bu kaplama uzun süre dayanabilirse bakterie adezyonu azaltılabilir. Bu aktif moleküllerin seçimi ile antimikrobiyal etkenler kullanılmadan ağız sağılık ürünleri oluşturulabilir. Ağız yıkama zeltelerindeki bazı maddeler anti-adezyon özelliği taşımaktadır (Guan vd., 2001).

### **2.3. Probiyotiklerin Diş rmelerine Karşı Etkileri**

Ağız ve diş sağılığının korunmasında laktobasillerin farklı mekanizmalarla rol oynadığı bilinmektedir. Ağız probiyotiği olarak kullanılacak bakteriler rk oluşturan patojenlere karşı üç şekilde etkili olmaktadır. Bunlar; antimikrobiyal madde retilimi ile etki, Kolni oluşumunun rekabetle önlenmesi yoluyla etki ve yer değiştirme yoluyla etkidir.

### 2.3.1. Antimikrobiyal madde üretimi

Probiyotik bakterilerin patojen mikroorganizmalara karşı etkisi organik asitler, bakteriyosinler ve peptitler gibi bazı antimikrobiyal maddelerin üretilmesi şeklinde olmaktadır (Sullivan ve Nord, 2002). Bu bakterilerin antimikrobiyal etkileri asidik pH'larda alkali pH'lara göre daha fazla olmaktadır (Sookkhee vd., 2001).

Sağlıklı insan dışkılarından izole edilen *Lactobacillus GG* (LGG)'nin çeşitli bakteriler üzerinde inhibitör etkiye sahip olan bir madde ürettiği bilinmektedir. Ayrıca bu madde diğer laktobasiller üzerine etkili olmamaktadır. Bu inhibitör aktivite pH 3-5 arasında gerçekleşmekte ve aktif madde ısıya karşı dayanıklılık göstermektedir. Üretilen bu madde laktik ve asetik asitten farklıdır, düşük molekül ağırlığına sahiptir ve seyreltik aseton çözeltisinde çözünebilmektedir. Ayrıca bu madde ile, antimikrobiyal aktivitenin sağlanabilmesi için, diğer laktik asit bakterilerinin ürettiği antimikrobiyal maddelerden daha az düzeyde bulunması yeterli olmaktadır. Tüm bu özelliklerden dolayı bu madde bakteriyosin olarak değil, daha çok mikrosin olarak tanımlanmaktadır (Silva vd., 1987).

Ağız sağlığı açısından laktobasillerin öneminin incelendiği bir çok araştırmada laktobasillerin sağlıklı bir ağızdaki toplam mikroorganizmaların %1'ini oluşturduğu ve diş çürüğü olan bireylerin ağızlarında sağlıklı bireylerin ağızlarındakine göre daha fazla oranda yer aldıkları bildirilmiştir (Smith vd., 2001).

LGG, laktozu parçalayamamakla birlikte sakkarozu çok yavaş bir şekilde fermente etmekte ve ortam asitliğini yavaş bir şekilde artırmaktadır. Bu nedenle diş çürümelerindeki etkisi azdır. Bu bakteri ürettiği piroglutamik asit ile diş çürüğü etkeni olan bakterilere karşı etkili olabilmektedir (Nase vd., 2001).

### 2.3.2. Koloni oluşumunun rekabetle önlenmesi

Probiyotik suşların aktivite gösterebilmesi için buldukları bölge yüzeyine tutunabilmeleri ve burada koloni oluşturmaları gerekmektedir. Adezyon özelliğine

sahip olmalarından dolayı bu özelliğe sahip olmayan bakterilere göre daha uzun süre varlıklarını koruyabilmektedirler. Buna bağlı olarak da patojen bakterilerin enfeksiyon oluşturma riskini azaltmaktadırlar.

Diş plağı, diş çürümesi ve periodontal hastalıklar açısından çok önemli bir faktördür. Ağız florasında yer alan ve diş çürümesine neden olan bakteriler, spesifik yüzey tutunma proteinlerine sahiptir. Bu bakteriyel adezinler ağızdaki değişik yüzey protein, glikoprotein veya polisakkarit reseptörlerine bağlanabilme özelliği gösterir (Kolenbrander ve London, 1993). Diş çürüğü oluşumunda tutunabilme özelliği, bakteriyel kolonizasyon için önde gelmektedir. Bakterilerin dişlere, mukoza epitel hücrelerine ve diğer bakterilere tutunma ve burada koloni oluşturma mekanizması karmaşık ve tutunmayı teşvik edici özelliktedir (Levesque vd., 2003). Patojenik bakteri adezyonunun engellenmesi, diş çürüğü ve periodontal hastalıkların giderilmesinde yararlı olmaktadır.

Süt mikroorganizmaları pek çok araştırmada, dental biyofilmin bir parçası olabileme yetenekleri ve diş çürüğü etkeni olan mikroorganizmalarla rekabet edebilme özellikleri açısından incelenmiştir. Bu araştırmalardan birinde LGG içeren sütlerin tüketilmesine bağlı olarak *S.mutans*'ın tükürük kaplı hidroksiapatit boncuklarına adezyonu incelenmiş ve sayıca tutunma miktarlarında azalmalar görülmüştür (Sullivan ve Nord, 2002). LGG ağızda kolonize olabileme yeteneğinde olduğundan dişlere tutunmuş, diş çürüğü etkeni olan streptokoklar ile yer değiştirebilmektedir. Yine LGG içeren sütün çocuklardaki diş çürüğü riskini azalttığı bilinmektedir (Loimaranta vd., 2002). Ayrıca LGG'nin patojenlerin adezyonunu, doku reseptörlerine tutunmalarını engelleyerek gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Patojen adezyonu bu bakteri varlığında normal şartlara göre 10 kat daha az olmuştur. *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ve bu türe ait olan bakteriler, biyosurfektan üretimi ile, patojenlerin adezyon özelliğini inhibe etmeleri ve patojeniteyi azaltmalarından dolayı, enfeksiyöz hastalıklardan korunmada en çok yararlanan bakterilerdendir (Forestier vd., 2001).

*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ağız patojenlerinin diş yüzeyine tutunmasını engelleme özelliğine sahip bir bakteridir (Forestier vd., 2001). Guan ve ark. (2001) yapmış olduğu bir araştırmada bu bakteri varlığında ağız patojenlerinin diş yüzeyine adezyon özelliklerini incelemiştir. Bu araştırmada; oral patojen olarak seçilen bakteri NHS-biyotin ile işaretlenmiş ve hidroksiapatit kaplı polistiren disk yüzeylerine tutunan patojen sayısı ile etken madde varlığında bu patojenin tutunma miktarları arasındaki fark belirlenmiştir. Böylece etken maddenin patojenin adezyon özelliğine etkisi tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda; LGG varlığında oral patojenlerin hidroksiapatit kaplı disklere tutunma oranının önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir.

Tüketim için marketlerde bulunan pek çok probiyotik ürün çok farklı probiyotik suşlar içerebilmektedir. Hangi suşun kullanılacağı ve bunun nereden izole edileceği önemlidir. Yapılan araştırmalara göre, insan orijinli suşlar insan gastrointestinal sistemine daha kolay tutunabilmekte ve burada kolonize olmaktadır. Bu da kolonizasyon dirençliliğinin ilk adımını oluşturur(O'brien vd., 1999).

### 2.3.3. Yer değiştirme yoluyla etki

Vücut mikrofloramızın çeşitli patojen mikroorganizmalarla etkileşime girerek bunların koloni oluşturmaya karşı mücadelede etken olduğu bilinmektedir. Bu konuda en önemli rolü laktobasiller oluşturmaktadır. Patojenlere karşı mücadele diş çürüklerinin kontrolü söz konusu olduğunda *S.mutans*'a karşı ve streptokoklara bağlı faranjitin kontrolünde ise *S. salivarius*'a karşı yapılmaktadır. Bu olay '**yer değiştirme teorisi**' olarak bilinmektedir. Bu teoriye göre; var olan mikrobiyal ekosistemin dengesini bozmadan potansiyel patojen bakterilerle zararsız bakterilerin yer değiştirmesinin sağlanması ve buna bağlı olarak da konakçı hücrenin zarar görmesinin engellenmesi amaçlanmaktadır. Bu teorinin uygulanmasındaki başarı, etken bakterinin yüzeye tutunabilme ve en az besin ögesini kullanarak diğer bakterilerle yarışa girebilme özelliklerine bağlıdır. Kolonize olan etkin suş, ortamdaki esansiyel besin ögeleri için yarışmaya girerek ve patojenin tutunma bölgelerini bloke ederek adaptasyon sağlar (Hillman, 2002).



Diş çürümelerinin önlenmesinde, özellikle mutans streptokokların gelişiminin inhibe edilmesinde, patojenik olmayan ağız kommensallerinin izolasyonu ve yer değiştirme teorisine göre kullanımı üzerine ilgi büyüktür. Ayrıca var olan patojen bakterilerin asit oluşturma veya yüzeye tutunma özellikleri değiştirilerek de olumlu sonuçlara ulaşılabilmektedir.

Antibiyotiklerin kullanımı koruyucu mikrofloranın zarara uğramasına ve antibiyotiğe dirençli suşların artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle enfeksiyonların kontrolünde patojen olmayan doğal floranın temsilcileri olan bakterilerden yararlanılmaktadır. Orta kulak iltihabı, küçük çocuklarda görülen bakteriyel bir enfeksiyondur. Bu hastalığın tedavisinde antibiyotik kullanımının yanısıra, yer değiştirme teorisi uygulanmasının olumlu sonuçlar getireceği öne sürülmektedir. Kalabalık içinde yaşamının getirisi olarak görülen streptokok faranjiti ise penisilin gibi geniş etkili spektrumlu antibiyotikler kullanılarak tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Burada da yer değiştirme teorisinin uygulanmasının etkili olacağı düşünülmektedir.

Yer değiştirme teorisi özellikle sağlığın korunmasında doğal yöntemlerden yararlanıldığı düşünülürse, tüketici açısından ilgi çekici olmaktadır. Probiyotik bakteriler, yer değiştirme ve doğal mikroflora içinde yeniden kolonize olabilme açısından özellikle süt ve süt ürünlerine eklenerek, kullanımı önerilen bakterilerdir (Tagg ve Dierksen, 2003).

Diş çürükleri ve periodontal hastalıklar, diş plağında veya periodontal ceplerde yer alan, fakültatif ve zorunlu anaerob bakterilerin neden olduğu zararlıdır. Diş çürümesine neden olan mikroorganizmalar vücudun diğer bölgelerinde de bazı hastalıklara neden olabilmektedir.

Probiyotik preparatlarında genellikle *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* ve *Saccharomyces* kullanılmaktadır. Bazı streptokok ve enterokok türleri haricinde laktik asit bakterilerinin patojenik olmadığı görüşü yaygındır. Çoğu vakada enfeksiyöz organizma konakçının kendi mikroflorasından kaynaklanmaktadır.

Fermente gıda veya probiyotik ürün tüketimi sonucu herhangi bir hastalık vakası bildirilmemiştir (Collins vd.,1989).

Laktik asit bakterilerinin sebep olduğu düşünölen hastalıklardan biri enfektif endokartitistir. Bu hastalık kalp kapakçıklarında oluşın mikrobiyal kolonizasyon sonucunda kalp kapakçıklarının hasar görmesi ile meydana gelmektedir. Mikroorganizma kan akışı aracılığı ile kalp üzerine ulaşmaktadır. Enfektif endokartitis oluşumunda laktobasillerin etkisi enterokoklara göre çok daha azdır ve bunların enfeksiyon oluşturabilmesi için teşvik edici bazı faktörlere gereksinim vardır. Laktobasillerin kalp yüzeyine tutunma özellikleri çok azdır. Genellikle ağız mikroorganizmalarının kana karışmasını sağlayan diş tedavileri sonucunda laktobasiller bu hastalığa neden olabilmektedirler (Sullivan ve Nord, 202). Bunun dışında laktobasillerin enfektif endokartitis ve benzeri hastalıklara neden olduğunu gösteren herhangi bir bulguya rastlanmamıştır.

Diş çürüklerinden korunmada süt, peynir ve diğer süt ürünlerinin kanıtlanmış etkisi yüz yıla yakın bir süredir bilinmektedir. Yapılan birçok araştırmada, çeşitli hayvan denemeleri sonucunda, süt ve süt ürünlerinin diş çürüğü oluşumundaki koruyucu etkisi kanıtlanmıştır (Schüpbach vd., 1996). Bu etki çeşitli mekanizmalarla sağlanmaktadır. Kazein miselleri içeren diyetler, klinik ve mikrobiyolojik olarak incelenmiş ve çürümeyi engelleyici etkileri belirlenmiştir. Kazein miseli içeren diyet uygulaması ile plak mikroflorasında değişim meydana geldiği ve diş çürümelerinin önlenebildiği bildirilmektedir. Bu nedenle bazı süt protein fraksiyonları ana protein bileşimini desteklemek amacı ile diş çürümelerine neden olan diyetlerin dengelenmesinde kullanılmaktadır.

Süt proteinlerinin olumlu etkilerinin, diş plağındaki asidi tamponlama ve diş minesindeki hidroksiapatitin çözünmesini azaltma şeklinde ortaya çıktığı düşünölmektedir. Ayrıca *S.mutans* kolonilerinin de  $\alpha_s$ -1,  $\beta$ , k-kazein ve diğer asidik proteinler varlığında hidroksiapatit disklere tutunma özelliklerinin önlendiği de belirtilmiştir (Guggenheim vd., 1999).

Süt ve süt ürünleri yüksek kalsiyum içerikleri nedeniyle diş ve kemik oluşumu ve korunmasında çok önemli yere sahip gıdalardır. Diş dokularının gelişimi kalsiyum ve fosfat alımı ve bunların metabolizmalarına bağlı olarak değişim gösterir. Süt tek başına, diş minesini koruyucu özelliğe sahip olan bir gıda maddesidir. Ayrıca süt ürünlerindeki kalsiyum-laktat da antikaryojenik etki gösteren bir bileşendir. Yapısındaki kalsiyum ve fosfat nedeniyle peynir tüketilmesi sonucunda mineral yenilenmesi artmakta ve diş minesini mineral kaybından korunmuş olmaktadır. Çiğnemeye bağlı olarak artan salya salgısı ve peynirden kalsiyum ve fosfatın ayrılarak tükürüğe karışması, dişlerin korunmasında etkili olan mekanizmalar olarak düşünülmektedir. Diş minesini sertliği plaktaki kalsiyum ve fosfat konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak artabilir. Aynı zamanda peynir, mineral yenilenmesini artıran kazein-fosfopeptidlerini de içermektedir (Ahola vd., 2002).

Sert peynirlerin ve tükürüğün, diş minesinin mineral yenilenmesindeki etkilerinin incelendiği bir araştırmada; peynirin diş minesini sertleştirmede etkili olduğu ancak tükürüğün böyle bir etkisinin gözlenmediği tespit edilmiştir. Peynirin çiğnenmesi sırasında ve sonrasında artan pH, tükürük salgısının artmasına ve plak yüzeyine peynirden gelerek yapışan, potansiyel kalsiyum ve fosfat deposu olan, küçük partiküllere bağlı olarak gelişmektedir. Sert peynirler diş minesini mineral kaybından iki farklı metabolizma ile korumaktadır;

- Diş plağına karşı tampon özelliği oluşturan tükürük salgılamasının artışı,
- Diş plağındaki kalsiyum ve fosfat konsantrasyonlarının artışı. Ayrıca peynirin içerdiği asetat, propiyonat, bütirat ve laktat gibi organik asitler ile çözünür kalsiyum tuzları da tükürükteki mineral bileşenlerin mineral yenilenmesini artırmaktadır (Gedalia vd., 1991).

Süt ve süt ürünlerinin bileşiminin yanı sıra bu ürünlerle birlikte tüketilen laktik asit bakterilerinin de diş çürümelerini engelleyici etkisi olduğu belirlenmiştir. LGG içeren süt tüketiminin çocuklardaki diş çürümelerine karşı gösterdiği etkinin belirlenmesine yönelik olarak yapılan bir araştırmada, bu sütü tüketen çocuklardaki çürük oluşum riskinin, mutans streptokokların sayısının azalmasına bağlı olarak,

normal süt tüketen çocuklardakine göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca LGG içeren süt tüketen çocuklarda orta kulak iltihabının tedavisinde daha düşük dozda antibiyotik kullanımının yeterli olduğu da grlmştir (Nase vd., 2001).

Probiyotik bakteri içeren ürünler içinde en önemli yeri sert peynirler almaktadır. Bu tipteki peynirlerin diğer probiyotik ürünlere göre bazı avantajları bulunmaktadır. Satışa sunulmuş olan fermente süt ve yoğurt gibi ürünlerin birkaç hafta gibi kısa bir sürede tk edilmesi gerekmektedir. Ancak sert peynirlerin olgunlaşması gibi tüketim için önerilen süre de daha uzun olmaktadır. Yoğurt ile karşılaştırıldığında; düşük asitlik nedeniyle probiyotiklerin canlı kalma sürelerinin uzaması ve yüksek yağ içeriğinden dolayı probiyotik bakterilerin gastrointestinal sistemden geçişinde korunması gibi üstünlükleri bulunmaktadır (Stanton vd., 1998).

Konuyla ilgili olarak yapılan bir araştırmada; LGG içeren sert peynirlerin kısa süreli tüketiminin genç insanlardaki ağızdaki rk etkeni floradaki değişimlerin etkisi incelenmiştir. Bu incelemeler peynir tüketimi öncesi ve sonrasında yapılmıştır. Ağız salgısı oranları, tampon kapasitesi, *S.mutans*, maya ve laktobasil sayıları uygulama öncesi, sonrası ve uygulama bitiminden sonraki 3 hafta sonunda belirlenmiştir. Sonuçtaki bulgulara göre; uygulama sonrasında mutans streptokok sayısında belirgin bir fark görülmekle beraber, uygulama sonunu takiben 3 hafta sonra bu sayı kontrol grubuna göre probiyotik grupta önemli lde azalmıştır (Ahola vd., 2002). LGG'nin insan sağlığı üzerinde pek çok olumlu etkisi bulunmakla birlikte, diş rğu etkeni streptokokların da içinde bulunduğu değişik bakteri suşlarına karşı inhibisyon etkisi gösterdiği de bilinmektedir (Silva vd., 1987). Daha önce yapılan araştırmalarda LGG içeren sütlerin uzun süreli tüketiminin çocuklarda rk riskini önemli lde azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca LGG'nin diş rğnde kolonize olabildiği de kanıtlanmış ve 3 hafta süren deneme sonucunda, 74 kişiden %20'sinde *S.mutans* sayısı azalırken, %4'nde sayı artmıştır (Nase vd., 2001).

Yapılan araştırmalarda LGG içeren peynirlerin tükürük salgısı mikrobiyal florasında risk faktörlerini azalttığı tespit edilmiştir. Kısa süreli probiyotik peynir tüketimi sonrasında ağız mikroekolojisindeki değişimler incelenmiş ve LGG'nin ağızda

kolonize olabileceği görölmüştür. Buna bağlı olarak da diş sağlığını bozan etkenleri inhibe eden etkinin peynir tüketimi sonrasında da devam ettiği belirlenmiştir.

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Örneklerin toplanması**

Sağlıklı ve diş çürümesi olan 19 bireyden alınan diş plağı ve çürük içi plağı örnekleri izolasyon materyali olarak kullanılmıştır. Örnekler Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde, Doç. Dr. Yeşim Bozkurt ve ekibi tarafından ve Sağlık, Spor ve Kültür Daire Başkanlığı bünyesinde yer alan Mediko Sosyal Birimi'nde alınmıştır.

Örneklerin alındığı bireylerde son 6 ay içerisinde antibiyotik kullanmama, sigara ve içki gibi kötü alışkanlıkların bulunmaması gibi şartlar aranırken, beslenme alışkanlıkları, diş hekimine gitme sıklıkları, dental hikaye ve diş bakımında kullanılan yöntemler sorgulanmıştır. Yararlanılan anket formu Ek 1'de verilmiştir.

#### **3.2. Metot**

##### **3.2.1. Örneklerin izolasyon için hazırlanması**

Sağlıklı bireylerde diş plağından, çürük dişe sahip bireylerde ise çürük içinden ve dişeti cebinden aseptik şartlarda alınan örnekler 0.5 ml steril peptonlu su (Atlas, 1997) içerisine aktarılarak izolasyon için hazır hale getirilmiştir.

##### **3.2.2. İzolasyon**

Örneklerden  $10^{-4}$ 'e kadar steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ . dilüsyonlardan 0.1'er ml alınarak de Man Rogasa Sharp Agar (MRS, Oxoid), M17 Agar (Oxoid), Glikoz Sakkaroz Potasyum Tellürit Basitrasin Agar (GSTB), Sakkaroz Agar (SA), Mitis Salivarius Bacitracin Agar (MSB), Mitis Salivarius Agar (MS, Difco), Brain Hearth Infusion Agar (BHI,

Merck), Yeast Glikoz Lab Lemko Agar (YGLL) besiyerlerine yayma kültür yöntemi ile ekim yapılmıştır (Emilson ve Bratthall 1976; Tanzer vd., 1984; Karahan 1992; Chung vd., 2004). Ekim yapılan petri kutuları 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda koloni morfolojisi, gram reaksiyonları ve katalaz aktiviteleri incelenmiştir (Erkkilä ve Petäjä, 2000). Sporsuz, Gram pozitif, kok ve çubuk şekilli, katalaz reaksiyonu negatif olan kolonilerin saf kültürleri elde edilmiş ve %20 gliserol içeren eppendorf tüplerinde stoklanmıştır (deMan vd., 1960; Bartthall, 1980; Aslım, 1994; Thornton, 1996; Hartemink vd., 1997; Sönmez vd., 1999; Comelli vd., 2002; Başyigit, 2004).

### **3.2.2.1. Preparatların fotoğraflarının çekilmesi**

Gram boyama sonrasında hazırlanan preparatlardan basil, kok ve mayaların tipik mikroskopik görüntüsüne sahip olanların fotoğrafları S.D.Ü. Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma Merkezi'nde ışık mikroskobu (Nikon, Eclipse 600) kullanılarak çekilmiştir.

### **3.2.2.2. İzolasyonda kullanılan besiyerleri**

Örneklerden laktobasil izolasyonu için MRS Agar, laktobasillerin aktifleştirilmesi için MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. Streptokok izolasyonu için SA, MSB Agar, MS Agar, GSTB Agar, M17Agar, YGLL Agar, BHI Agar, streptokokların aktifleştirilmesi için ise MS sıvı besiyeri, M17 sıvı besiyeri, YGLL sıvı besiyeri, BHI sıvı besiyeri kullanılmıştır.

Yeast Glikoz Lab Lemko Sıvı Besiyeri

Pepton.....	10.0 g
Lab Lemco et ekstraktı.....	10.0 g
D-Glikoz .....	5.0 g
Maya ekstraktı.....	3.0.g
Destile su .....	1000 ml

Besiyeri bileşenleri tartılmış ve destile su ile karıştırılarak pH  $7.0 \pm 0.2$ 'ye ayarlanıp, 5'er ml'lik hacimlerde tüplere dağıtılmıştır. Besiyeri içeren tüpler  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edilmiştir. YGLL sıvı besiyerine %1.5 agar ilave edilerek YGLL Agar hazırlanmıştır (Karahana, 1992).

#### Mitis Salivarius Basitrasin Agar Besiyeri

Litreye 90 g olacak şekilde MS agar tartılır ve sterilizasyondan sonra 0.2 U/ml olacak şekilde steril basitrasin eklenir (Emilson ve Bratthall, 1976).

#### Sakkaroz Sıvı Besiyeri

Kalp infüzyonu.....	500 g
Sakkaroz.....	50 g
Triptoz.....	10 g
Sodyum klorür.....	5 g
Destile su.....	1000 ml

Besiyeri bileşenleri tartıldıktan sonra karıştırılarak pH  $7.2 \pm 0.2$  olacak şekilde ayarlanmış ve  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sakkaroz sıvı besiyerine %1.5 agar ilave edilerek Sakkaroz agar hazırlanmıştır (Atlas, 1997).

#### Glikoz Sakkaroz Potasyum Tellürit Basitrasin Agar

##### A Çözeltisi

Triptik pepton.....	5 g
Maya ekstraktı.....	5 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	5 g
$\text{Na}_2\text{CO}_3$ .....	0.05 g
Agar.....	20 g
Tuz çözeltisi.....	0.5 ml



Destile su.....799.5 ml

Bileşenler tartılarak 799.5 ml destile su ile karıştırılmış ve içine 0.5 ml tuz çözeltisi ilave edildikten sonra pH  $7.2 \pm 0.2$  olacak şekilde ayarlanmıştır.

Tuz çözeltisi

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....1.15 g

MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O.....0.19 g

FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O.....0.68 g

Destile su .....800 ml

B Çözeltisi

Glikoz.....50 g

Destile su.....100 ml

C Çözeltisi

Sakkaroz.....50 g

Destile su.....100 ml

Her bir çözelti 121°C'de 15 dakika ayrı ayrı sterilize edildikten sonra karıştırılmış ve 50-55°C'ye soğutulmuştur. Üzerine steril filtreden geçirilmiş 1 ml %1'lik potasyum tellürit ve 300 U basitrasin eklenmiş ve steril petri kutularına aktarılmıştır (Tanzer vd., 1984).

### 3.2.2.3. Saf kültürlerin muhafaza edilmesi

Saf kültürlerin muhafaza edilmesinde laktobasiller için MRS sıvı besiyeri ve streptokoklar için ise BHI sıvı besiyeri kullanılmıştır. Kültürler MRS ve BHI sıvı besiyeri içine inoküle edilerek 37°C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda %20 steril gliserol içeren steril eppendorf tüpleri içerisine 800-

1000 µl kadar alınarak -80°C'de muhafaza edilmiştir (Çakır, 1996; Manero ve Blanch, 1999).

### **3.2.3. Laktobasillerin tanısı**

İzole edilen tüm laktobasil suşları için tanımlama testleri yapılmıştır. Klasik tanımlamada; glikozdan gaz oluşturma, arjininden amonyak oluşturma, 15°C ve 45°C'de gelişme testleri yapılmıştır. Ayrıca früktoz, galaktoz, laktoz, maltoz, mannitol, mannoz, rafinoz, riboz, sükroz ve trehalozun karbon kaynağı olarak kullanımı testleri uygulanmıştır (deMan vd., 1960; Aslım, 1994; Thornton, 1996; Bogovic ve Rogelj, 1998; Sönmez vd., 1999; Başyiğit, 2004).

#### **3.2.3.1. Glikozdan gaz oluşturma**

İzole edilen laktobasillerin glikozdan gaz oluşturma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Durham tüpleri içeren MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. (Schillinger ve Lücke, 1987). Steril besiyerine aseptik koşullarda taze kültürden %1 oranında inokülasyon yapılmış ve 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda Durham tüpleri içinde gaz oluşumu incelenmiştir (Harrigan ve Mc Cance, 1966; Kandler ve Weiss, 1986; Başyiğit, 2004).

#### **3.2.3.2. Arjininden amonyak oluşturma**

Arjininden amonyak oluşturma yeteneğinin saptanmasında Arjinin MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. MRS sıvı besiyerine %0.3 oranında L-arjinin monohidroklorit ilave edilmiş, 5'er ml besiyeri tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Arjinin MRS sıvı besiyerine aseptik koşullarda aktif kültürden %1 oranında inokülasyon yapıldıktan sonra, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda Nessler reaktifi kullanılarak renk değişimi incelenmiştir.

Nessler Reaktifi (1000 ml)

Potasyum iyodür.....70 g

Civa iyodür.....100 g  
Potasyum hidroksit.....100 g

Arjinin MRS sıvı besiyerinde geliştirilmiş 24 saatlik kültürlerden beyaz bir zemin üzerine bir miktar (1 ml veya 1 öze dolusu) aktarılmıştır. Üzerine aynı miktarda Nessler reaktifi ilave edilmiştir. Renk kırmızı-kavuniçiye dönüşmüşse reaksiyon pozitif, renk limon sarısı olmuşsa reaksiyon negatif olarak değerlendirilmiştir (Harrigan ve McCance, 1966; Kandler ve Weiss, 1986; Karahan, 1992; Çakır, 1996; Sönmez vd., 1999; Başyigit, 2004).

### **3.2.3.3. 15 °C ve 45 °C’de gelişme**

Aktif kültürlerden steril MRS sıvı besiyerine %1 oranında inokülasyon yapılmış ve 15 °C ve 45 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda MRS sıvı besiyerinde bulanıklık oluşumuna göre değerlendirme yapılmıştır. Bulanıklık görülen tüpler pozitif, görülmeyenler ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Harrigan ve McCance, 1966; Kandler ve Weiss, 1986; Çakır, 1996; Sönmez vd., 1999; Başyigit, 2004).

### **3.2.3.4. Karbonhidrat fermantasyon testleri**

MRS sıvı besiyerinden D-Glikoz ve et ekstraktı çıkarılarak temel besiyeri hazırlanmıştır. Besiyeri bileşimine %0.004 oranında klorofenolred indikatörü ilave edilmiş ve besiyeri 5'er ml olacak şekilde tüplere dağıtıldıktan sonra 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Test edilecek karbonhidratların (früktoz, galaktoz, laktoz, maltoz, mannitol, mannoz, rafinoz, sakkaroz ve trehaloz) %10'luk çözeltisi hazırlanmış, tinalizasyondan sonra son konsantrasyon %2 olacak şekilde besiyerine ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyerine aktif kültürlerden %1 oranında inokülasyon yapılmış ve 37 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplerdeki kırmızı-pembe renk sarıya dönüşmüşse karbonhidrat fermantasyonunun meydana geldiği söylenmektedir. Rengin değişmemesi halinde ise fermantasyonun gerçekleşmediği anlaşılmaktadır (Harrigan ve McCance, 1966; Kandler ve Weiss, 1986; Schillinger ve Lücke, 1987; Çakır, 1996; Sönmez vd., 1999; Başyigit, 2004).

### 3.2.4. Kokların tanısı

Morfolojik olarak tipik kok görünümüne sahip olan ve SA, MSB Agar, MS Agar, M17 Agar ve YGLL Agar'dan elde edilen izolatların tanısı için 10 °C ve 45 °C'de, pH 9.6'da gelişim, %4 ve 6.5 NaCl'de üreme ve şeker fermantasyon testleri yapılmıştır (Cowan ve Steel, 1966; Harrigan ve McCance, 1966; Tunail ve Köşker, 1986; Karahan, 1992; Holt vd., 1994; Salminen vd., 1998; Durlu-Özkaya, 2001).

#### 3.2.4.1. 10 °C ve 45 °C'de gelişme

Aktif kültürlerden steril YGLL sıvı besiyerine %1 oranında inokülasyon yapılmış ve 10 °C ve 45 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda YGLL sıvı besiyerinde bulanıklık oluşumuna göre değerlendirme yapılmıştır. Bulanıklık görülen tüpler pozitif, görülmeyenler ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Sandine vd., 1962; Cowan ve Steel, 1966; Harrigan ve McCance, 1966; Tunail ve Köşker, 1986; Holt vd., 1994; Salminen vd., 1998; Durlu-Özkaya, 2001).

#### 3.2.4.2. pH 9.6'da gelişim

Bu test için Glikoz Fenol Fitaleyn sıvı besiyeri hazırlanmıştır. 5'er ml steril besiyeri içeren tüplere aktif kültürden %1 oranında inokülasyon yapılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Pembe besiyeri renginin açık sarıya dönüşmesi ve oluşan bulanıklığa göre değerlendirme yapılmıştır (Sandine vd., 1962; Cowan ve Steel, 1966; Harrigan ve McCance, 1966; Tunail ve Köşker, 1986; Karahan, 1992; Holt vd., 1994; Salminen ve Wright, 1998; Durlu-Özkaya, 2001).

#### Glikoz Fenol Fitaleyn Besiyeri

Nutrient broth.....	425 ml
%20'lik glikoz çözeltisi.....	25 ml
Glisin tampon çözeltisi.....	50 ml
%0.2'lik fenol fitaleyn çözeltisi.....	25 ml

0.6 g glisin (glikokol) ve 0.35 g NaCl 60 ml suda çözülmüş ve 0.1 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlanarak glisin tampon çözeltisi hazırlanmıştır. %20'lik glikoz çözeltisi dışındaki maddeler ayrı ayrı 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiş, glikoz ise steril filtreden geçirilerek (0.45 µl) sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra glikoz besiyerine ilave edilmiş ve pH 9.6'ya ayarlanmıştır. Daha sonra aseptik koşullarda 10'ar ml olacak şekilde steril tüplere dağıtılmıştır (Sandine vd., 1962; Cowan ve Steel, 1966; Harrigan ve McCance, 1966; Tunail ve Köşker, 1986; Karahan, 1992; Holt vd., 1994; Salminen ve Wright, 1998; Durlu-Özkaya, 2001).

#### **3.2.4.3. %4 ve %6.5 NaCl'de üreme**

%4 ve %6.5 oranında NaCl ilave edilmiş YGLL sıvı besiyeri 5'er ml'lik hacimlerde tüplere aktarılarak, 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiş ve aktif kültürlerden %1 oranında inokülasyon yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda bulanıklığa göre değerlendirme yapılmıştır (Sandine vd., 1962; Cowan ve Steel, 1966; Harrigan ve McCance, 1966; Tunail ve Köşker, 1986; Karahan, 1992; Holt vd., 1994; Salminen ve Wright, 1998; Durlu-Özkaya, 2001).

#### **3.2.4.4. Şeker fermantasyon testleri**

YGLL sıvı besiyerinden D-Glikoz ve et ekstraktı çıkarılarak temel besiyeri hazırlanmıştır. Besiyeri bileşimine %0.004 oranında klorofenolred indikatörü ilave edilmiş ve besiyeri 5'er ml olacak şekilde tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Test edilecek karbonhidratların (laktoz, mannitol, rafinoz, sorbitol ve trehaloz) %10'luk çözeltisi hazırlanmış, tinalizasyondan sonra son konsantrasyon %2 olacak şekilde besiyerine ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyerine aktif kültürlerden %1 oranında inokülasyon yapılmıştır. 37°C'de 24-48 saat inkübasyondan sonra tüplerdeki renk değişimi incelenmiştir. Başlangıçta koyu pembe olan besiyeri rengi sarıya dönüşmüşse pozitif olarak, renk değişimi gerçekleşmemişse negatif olarak değerlendirilmiştir (Harrigan ve McCance, 1966; Kandler ve Weiss, 1986; Schillinger ve Lücke, 1987; Karahan, 1992; Çakır, 1996; Sönmez vd., 1999).

### 3.2.5. Laktobasillerin streptokoklara karşı antagonistik etkilerinin belirlenmesi

Laktobasillerin streptokoklara karşı antagonistik etkilerinin belirlenmesi amacıyla agar difüzyon metodu kullanılmıştır (Schillinger ve Lücke, 1987; ).%1.5 agar içeren MRS Agar besiyeri ve %0.7 agar içeren BHI Agar besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri 13'er ml olacak şekilde tüplere aktarılmış ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra MRS Agar besiyeri steril petri kutularına dökülerek bir gece kurumaya bırakılmıştır. Sonrasında BHI Agar besiyeri içerisine BHI sıvı besiyerinde aktiveleştirilen streptokok kültürlerinden %1 oranında inokülasyon yapılarak karıştırılmış ve kültürle karışan yarı katı besiyeri petrilerdeki MRS Agar besiyerinin üzerine dökülmüştür. Besiyerleri birkaç saat buzdolabında bekletilmiş ve steril mantar tıpası yardımıyla üst tabakada yer alan yarı katı besiyeri üzerinde kuyucuklar açılmıştır. Açılan kuyucuklara MRS sıvı besiyerinde aktif halde bulunan laktobasil kültürlerinden inokülasyon yapılarak kültürlerin alt tabakadaki MRS Agar besiyeri üzerinde gelişmesi amacıyla 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucukların etrafında oluşan zon büyüklüğüne göre değerlendirme yapılmıştır

### 3.2.6. Bakterilerin tutunma özelliklerinin belirlenmesi

Laktobasil ve streptokokların tutunma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla düz tabanlı, 96 kuyucuklu polistren tabakalara HAP ve kalsitleme çözeltisi eklenmiş ve 75°C'de tekrarlanan kurutmalar yapılarak kaplanması sağlanmıştır.

HAP ile kaplanan yüzeyler 250 µl yapay tükürük ile 1 saat, 37°C'de muamele edildikten sonra Fosfat Buffered Saline (PBS) ile 4 kez yıkanmıştır (4x250 µl). Daha sonra kuyucuk içerisine laktobasil içeren süspansiyondan 100 µl aktararak 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar tekrar PBS ile 4 kez yıkanmıştır (4x250 µl). Her kuyucuk içerisine hücre konsantrasyonu 10<sup>8</sup> adet/ml olacak şekilde ayarlanmış ve biyotinlenmiş bakteri süspansiyonundan 100 µl aktararak 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. PBS ile 4 kez yıkamadan sonra (4x250 µl) kuyucuklara 5 mg/ ml sığır serum albümini ve 100 µl'lik avidin alkalın

fosfataz (0.5 µl/ml) ilave edilmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra kuyucuklar tekrar PBS ile 4 kez yıkanmış ve 100 µl para-nitrofenilfosfat (pNPP) ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dakika içinde renk reaksiyonunun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Son olarak, inkübe edilen solüsyon temiz bir kuyucuk içerisine alınarak kuyucukta kalan kısmın absorbanansı 405 nm (Organon Technica, Reader 530)'de okunmuştur (Guan vd., 2001).

### **3.2.6.1. Hidroksiapatit Çözeltisinin Hazırlanması**

Bakterilerin yüzeylere tutunma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kullanılacak olan mikrotitre platelerin polistiren yüzeyleri hidroksiapatit (HAP) solüsyonu ve kalsitleme çözeltisi ile kaplanmıştır (Schilling vd., 1994; Guan vd., 2001). Bu çözeltilerin hazırlanışı aşağıda verilmiştir:

#### **a) HAP solüsyonu**

Hidroksiapatit solüsyonu, 4 farklı partikül büyüklüğüne sahip HAP tozunun 1/10000 oranında destile suya karıştırılması ile hazırlanmıştır. Kullanılan HAP tozlarından ilki (1 nolu HAP) seramik uygulamalarında, ikincisi (2 nolu HAP) ağır metaller ile birlikte kullanılan uygulamalarda çeşitli silahların yapımında, üçüncüsü (3 nolu HAP) diş ve kemik uygulamalarında ve dördüncüsü (4 nolu HAP) de seramik uygulamalarında kullanılabilecek özelliklere sahiptir. Bu materyallerden 3 ve 4 no'lu olanların tıp alanında kullanımı daha yaygındır ve bunların yüzeyleri bakterilerin tutunma miktarlarının artıracak özelliktedir..

#### **b) Kalsitleme çözeltisi**

2.5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>

7.5 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

250.0 mmol/l trietanolamin

Kalsitleme çözeltisi bileşenlerin tartılmasından sonra pH'nın 7.4 ± 0.2'ye ayarlanması ile hazırlanmıştır.

### 3.2.6.2. Kuyucukların hidroksiapatit veya kalsitleme çözeltisi ile kaplanması

Bu işlemde her bir kuyucuk içerisine 250 µl %0.1'lik HAP veya kalsitleme çözeltisi eklenmiş ve 75°C'de tamamen kuruması sağlanmıştır. Aynı işlem 3 kez tekrarlanarak yüzeylerdeki hidroksiapatitin sabitlenmesi mümkün olmuştur (Schilling vd., 1994).

### 3.2.6.3. Bakterilerin biyotinle işaretlenmesi

Bakterilerin biyotinle işaretlenmesi amacıyla laktobasiller MRS sıvı besiyerinde, streptokoklar ise BHI sıvı besiyerinde 37°C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda hücreler 3 kez steril PBS ile yıkanmıştır (8000d/d'da 6 dakika, Santrifugen Universal 32R, Hettrich Zentrifügen). PBS içindeki hücre konsantrasyonunu tespit etmek amacıyla streptokoklar için MS agar besiyerine, laktobasiller için MRS agar besiyerine damla kültür yöntemi ile ekim yapılmıştır. 1 ml dimetil sülfoksit içerisine 20 mg NHS-biyotin tartılarak hazırlanan biyotin çözeltisinden 0.5 ml ve konsantrasyonu 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> adet/ml olacak şekilde ayarlanmış bakteri hücre süspansiyonundan 10 ml karıştırılarak 37°C'de 1.5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Biyotinle birleşen hücreler iki kez PBS ile yıkanmış ve 150 µl'lik kısımlar halinde -70°C'de saklanmıştır (Guan vd., 2001).

### 3.2.6.4. Yapay tükürük hazırlanması

%0.1 et ekstraktı

%0.2 maya ekstraktı

%0.5 proteoz pepton

%0.25 hog gastrik doku

6.0 mmol/l NaCl

1.8 mmol/l CaCl<sub>2</sub>

2.7 mmol/l KCl

121°C'de 20 dakika otoklavlandıktan sonra bu karışımın 100 ml'sine 0.45 µm steril filtreden geçirilerek sterilize edilmiş olan %40'lık üre çözeltisinden 125 µl eklenmiştir (Guan vd., 2001).



### 3.2.6.5. PBS (Phosphate Buffered Saline) hazırlanması

NaCl.....	8 g
KCl.....	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2.4 g

Bileşenler 800 ml destile suda çözülmüş ve pH'sı  $7.4 \pm 0.2$  olacak şekilde ayarlanmıştır. Karışımın hacmi 1000 ml'e tamamlanarak 121°C'de 20 dakika sterilizasyon yapılmıştır (Sambrook vd., 1989).

### 3.2.7. Laktobasil ve streptokokların birbirlerine karşı etkilerinin diş yüzeyinde incelenmesi

Laktobasillerin streptokoklara karşı tutunma yüzeyleri için oluşturduğu rekabetin belirlenmesi için Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalı tarafından sağlanan sağlıklı diş örnekleri kullanılmıştır. Bu amaçla iki farklı yöntemden yararlanılmıştır. Birinci yöntemde Guan vd. (2001)'nin uyguladığı yöntem modifiye edilmiştir. Buna göre diş örnekleri FTS (Fizyolojik tuzlu su) içinde 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiş ve steril yapay tükürük içerisinde 37°C'de 30 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda steril pens ile alınan diş örneklerinin steril kurutma kağıdında suyu giderilmiş ve aseptik şartlarda laktobasil süspansiyonunun içerisine bırakılmıştır. Diş örnekleri 4 saatlik inkübasyon sonunda steril pens ile alınarak streptokok süspansiyonunun içerisine bırakılmıştır. Burada da 4 saatlik inkübasyon tamamlandıktan sonra diş örneklerinin suyu aseptik koşullarda giderilmiş ve 10 ml'lik steril PBS içerisine aktarılmıştır. Diş yüzeyine tutunan hücrelerin PBS içine dağılması için 1 dakika süreyle hızla karıştırılmıştır. Buradan hazırlanan seri dilüsyonlardan laktobasiller için MRS agar besiyerine ve streptokoklar için MS agar besiyerine damla kültür yöntemiyle ekim yapılmıştır (Karahan vd. 2002). 37°C'de 48 saat inkübasyondan sonra sayım yapılarak sayım sonuçları değerlendirilmeye alınmıştır.

İkinci yöntemde ise aktif haldeki laktobasil kültüründen 15 ml.'lik MRS sıvı besiyerine streptokoklardan ise BHI sıvı besiyerine %2 oranında inoküle edilmiş ve 37°C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler 5000d/d'da 5 dakika santrifüj edilerek pelet iki kez steril PBS ile yıkanmıştır. Her yıkamadan sonra santrifüj işlemleri tekrarlanmıştır. Pelet tekrar 5 ml PBS içinde süspansiyon edilerek diş yüzeyinde laktobasilleri streptokoklara karşı etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan denemelerde kullanılmıştır. Diş örnekleri üzerinde 5 mm<sup>2</sup> lik bir alan işaretlenmiş ve çevresi otoklav bandı ile kaplanmıştır. Bu bölgeye başlangıç hücre konsantrasyonu belirlenmiş olan laktobasil süspansiyonundan 10 µl aktarılarak 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İşaretlenmiş bölge tamamen kuruduktan sonra steril FTS ile yıkama yapılmış ve aynı alana başlangıç hücre konsantrasyonu belli olan streptokok süspansiyonundan 10 µl aktarılmıştır. 37°C'de 30 dakika inkübasyondan sonra dişler steril FTS içine alınarak hızlıca karıştırılmış ve seri dilüsyonlar yapılarak laktobasiller için MRS agar besiyerine, streptokoklar için ise MS agar besiyerine damla kültür yöntemiyle ekim yapılmıştır. 37°C'de 48 saat inkübasyondan sonra sayım yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

### **3.2.8. Laktobasillerin plazmid profillerinin belirlenmesi**

Laktobasillerin plazmid profillerinin belirlenmesi amacıyla iki farklı yöntemden yararlanılmıştır. O'Sullivan ve Klaenhammer (1993) tarafından geliştirilen yöntemde 5-10 ml'lik laktobasil kültürü MRS sıvı besiyerinde 37°C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda 5000 d/d'da 5 dakika santrifüj edilerek peletin ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra pelet 200 µl 30 mg/ml lizozim içeren %25'lik sakkaroz çözeltisi ile karıştırılmıştır. Sıvı, eppendorf tüpüne aktarılarak 37°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 400 µl sodyumdodesilsülfat (%3 SDS + 0.2 N NaOH) çözeltisi eklenmiş ve hemen karıştırılarak 7 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Çözelti üzerine 300 µl soğuk 3 M alkali sodyum asetat (pH 4.8) eklenerek karıştırılmış ve +4°C'de 14000 d/d'da 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant temiz bir eppendorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 650 µl isopropanol eklenmiştir. +4°C'de 14000d/d'da 15 dakika santrifüjden sonra üst sıvı faz uzaklaştırılmış ve pelet üzerine sırasıyla 320 µl steril saf su, 200 µl 7.5 M

amonyum asetat (0.5 mg/ml etidyum bromit içeren) çözeltisi ve 350 µl fenol/kloroform karışımı ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 14000 d/d'da 5 dakika santrifüjden sonra üst sıvı faz temiz bir eppendorf tüpüne aktarılarak üzerine 1 ml -20°C'de soğutulmuş etanol eklenmiştir. İyi karıştırıldıktan sonra +4°C'de 14000 d/d'da 15 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz uzaklaştırılmıştır. Pelet oda sıcaklığındaki %70'lik etanol ile yıkanmış ve kurutulduktan sonra 40 µl TE+RNase (TER) eklenerek, 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra Tris asetat tampon (TAE) içinde hazırlanan %0.7'lik agaroz jelde 100 voltta yürütülmüştür.

Diğer bir yöntemde göre MRS sıvı besiyeri içinde 16-18 saat geliştirilen 1.5 ml'lik laktobasil kültürleri 14000d/d'da 5 dakika santrifüj edilerek pelet alınmış ve üzerine 500 µl %0.5 NaCl çözeltisi eklenerek tekrar santrifüj edilmiştir. Sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine 100 µl 20mg/ml lizozim içeren A çözeltisi ilave edilmiştir. 37°C'de 1 saat inkübasyondan sonra üzerine 200 µl 0.2 N NaOH içeren C çözeltisi eklenerek karışımın rengi berraklaşmaya kadar beklenmiştir. Karışım üzerine 50 µl 2 M Tris (pH 7.0) ve 70 µl 5 M NaCl eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra üzerine 450 µl %3 NaCl ile doyurulmuş fenol ilave edilmiştir. Birkaç kez karıştırıldıktan sonra rotary shaker platform üzerinde 30 dakika karışması sağlanmıştır. Süre sonunda 14000d/d'da 15 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı faz temiz bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Sıvı faz üzerine 450 µl kloroform: izoamil alkol (24:1) ilave edilerek 10 dakika rotary shaker platformda karıştırılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda 14000d/d'da 15 dakika santrifüj edilerek üst sıvı faz temiz bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Sıvı faz üzerine 450 µl %95'lik etanol ve 40 µl 2.5 M Sodyum asetat (pH 5.2) eklenerek -20°C'de 2 saat veya -80°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 14000d/d'da 20 dakika santrifüj edilerek etanol uzaklaştırılmış ve üzerine %70'lik etanol ilave edilerek 14000d/d'da 5 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra pelet kurutulmuş ve üzerine 10 µl stok RNase çözeltisinden ilave edilmiştir. 37°C'de 1 saat veya +4°C'de 12-24 saat bekletildikten sonra TAE çözeltisinde hazırlanmış agaroz jelde 100 voltta yürütülerek jeldeki görüntü değerlendirilmiştir (Çakır, 2003).

A çözeltisi (250 ml)

62.5 g sakaroz

12.5 ml 1 M Tris (pH 8)

2.5 ml 0.5 M EDTA (pH 8)

C çözeltisi (250 ml)

2.252 g glikoz

7.5 g SDS

12.5 ml 1 M Tris (pH 8)

2.5 ml 0.5 M EDTA (pH 8)

TER çözeltisi

RNase 10 mg/ ml olacak şekilde Tris-EDTA tampon çözeltisi içinde çözülmüştür. Çözelti 100°C'de 15 dakika kaynatılmış ve oda sıcaklığına soğutularak – 20°C'de saklanmıştır.

%3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisi

100 g fenol tartılarak, üzerine 20 ml destile su ve 3 g NaCl aktarılarak 45°C'lik su banyosunda bekletilmiş ve çözünmesi sağlanmıştır. Ortama 0.1 g hidroksiquinolin ilave edildikten sonra iyice karışması sağlanmış ve karışım oda sıcaklığında tutulmuştur.

TE Tampon Çözeltisi (pH 7.4)

10 mM Tris Cl (pH 7.4)

1 mM EDTA (pH 8.0)

TAE Tampon Çözeltisi

50x 242 g Tris

57.1 ml asetik asit

100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

### 3.2.9. Laktobasillerin asit oluşturma yeteneğinin değiştirilmesi

Laktobasillerin asit üretim yeteneklerinin değiştirilmesi amacıyla etidyum bromit uygulaması yapılmıştır. İki farklı dozda etidyum bromit (50 µg/ml ve 100 µg/ml) steril MRS sıvı besiyerine katılmış ve % 2 oranında bakteri inoküle edilmiştir (Akçelik vd. 1996). 37°C’de 24 saat inkübasyondan sonra hazırlanan seri dilüsyonlardan %0.3 ve %1.5 CaCO<sub>3</sub> içeren MRS agara ekim yapılmıştır. 37°C’de 48 saat süren inkübasyondan sonra MRSA+CaCO<sub>3</sub> ‘da zon oluşturmeyen koloniler seçilerek, MRS sıvı besiyerine aşılanmıştır. 37°C’de 16-18 saat inkübasyondan sonra pH ölçümü yapılarak değerlendirilmiştir.

Uygulanan bir diğer yöntemde ise aktif haldeki laktobasillerden glikoz içermeyen MRS sıvı besiyerine %1 oranında inokülasyon yapılmış ve 37°C’de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem 30 gün süre ile devam ettirilmiştir ve süre sonunda glikoz içeren MRS sıvı besiyerine %1 oranında inokülasyon yapılarak 37°C’de 16-18 saat bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda kùltürün pH’sı ölçülerek başlangıç pH’sı ile karşılaştırma yapılmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Anket sonuçları

Toplanan diş örneklerinde örnek alınan bireylerin yaş ve cinsiyete göre ayrımı ve laktik asit bakterilerinin bulunma sıklığı açısından beslenme alışkanlıkları, ağız sağlığını korumaya yönelik tercihleri incelenmiştir. Çizelge 4.1’de örnek alınan bireylerin yaş ve cinsiyete göre ayrımı ve Ek 2’de ise örnek alınan bireylerin beslenme alışkanlıkları ve ağız sağlığını korumaya yönelik tercihlerine ait sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 4.1. Diş örneklerinin yaş ve cinsiyete göre ayrımı

Diş örnekleri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Hastanın cinsiyeti	K	K	E	E	K	K	E	E	K	K	K	E	K	E	K	K	E	K	K
Hastanın yaşı	27	27	21	21	14	24	23	24	21	24	25	21	42	33	23	21	17	26	21
Çürük diş örneği	+		+									+	+	+	+	+	+		+
Plak örneği		+		+															
Sağlıklı diş örneği					+	+	+	+	+	+								+	

19 örnekten 12 adedi kadın (%63.15’i), 7 adedi erkek (%36.85’i) deneklerden alınmıştır. Bunlardan 17 adedi 15-30 (%89’u) ve 2 adedi ise 30-45 (%11’i) yaş grubu içinde yer almaktadır. Örneklerden 10 adedi çürük diş, 2 adedi diş plağı ve 7 adedi de sağlıklı dişlerden alınmıştır.

Anket sonuçlarına göre deneklerin %94’ünde süt ve süt ürünleri tüketiminin fazla olduğu belirlenmiştir. Bu ürünlerden yoğurt ve peynir tüketiminin içme sütü ve dondurma tüketimine oranla daha yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Ağız sağlığının korunmasında deneklerin diğer mekanik temizleme yöntemlerine göre diş fırçalama yöntemini tercih ettikleri belirlenmiştir. Diş fırçalama sıklığının deneklerin %75’inde günde 2 kez, %10’unda 2 -3 günde bir, %10.5’inde 15 günde bir kez olduğu ve %0.5’inin ise ağız ve diş sağlığını korumada hiçbir yöntemden yararlanmadığı tespit edilmiştir.

## 4.2. İzolasyon sonuçları

Örnekler 3.2.1.'de belirtildiği şekilde izolasyona hazırlanmış ve uygun dilüsyonlardan SA, MSB agar, MS agar, GSTB agar, M17 agar, YGGL agar, BHI agar besiyerlerine ekim yapılmıştır. Aerobik koşullarda 37°C'de 48 saatlik inkübasyon sonucunda sayım yapılmış ve farklı morfolojik özelliklere sahip koloniler daha sonra yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. İzolatların suş numaralarının verilmesinde izolasyon kaynağı dikkate alınmıştır. İlk iki rakam örnek numarasını, sonraki iki rakam ise suş numarasını belirtmektedir.

Yapılan çalışmada MRSA'dan elde edilen izolatların laktobasil, diğer besiyerlerinden elde edilen izolatların ise streptokok ve maya olabileceğinden hareketle ilk ayrımı yapılmıştır.

İzolatların seçiminde MRSA'da laktobasillere özgü krem renkli, mat ve düzgün kenarlı kolonilere öncelik verilmiştir. Diğer besiyerlerinde ise tür ve suş yelpazesini geniş tutabilmek amacıyla değişik görünümlü koloniler izole edilmiştir.

İzolasyon sonucunda 73 adedi MRSA ve 85 adedi diğer besiyerlerinden olmak üzere toplam 158 izolat elde edilmiştir. Saflık kontrolü yapılan izolatların mikroskopik görünümü, Gram reaksiyonu ve katalaz aktiviteleri incelenmiştir. Çeşitli boyutlarda çubuk şekilli, G (+) görünümlü ve katalaz negatif izolatlar laktobasil olarak değerlendirilmiştir. Laktobasillerin izolasyon kaynakları, mikroskopik görünümleri ve koloni şekilleri Ek 3'de verilmiştir.

Laktobasil olduğu düşünülen 73 adet izolattan 1 adedi (%1.36) 1 no'lu çürük diş örneğinden, 1 adedi (%1.36) 8 no'lu sağlıklı diş örneğinden, 1 adedi (%1.36) 9 no'lu sağlıklı diş örneğinden, 3 adedi (%4.1) 3 no'lu çürük diş örneğinden, 40 adedi (%54.8) 14 no'lu çürük örneğinden ve 28 adedi ise (%37.02) 19 no'lu çürük diş örneğinden izole edilmiştir. Bu örneklerin alındığı deneklerde örnek alınmadan önce süt ve süt ürünleri tüketimi belirlenmiştir. Süt ve süt ürünleri tüketimine göre izolat sayıları Ek 4'te verilmiştir. Buna göre en fazla sayıda laktobasil izole edilen 14

örneğin alındığı deneğin örnek alınmadan bir gece önce ve 19. örneğin alındığı bireyin ise örnek alındığı gün süt tükettiği tespit edilmiştir. Her iki örnek de çürük diş plağından alınmıştır. Süt ve süt ürünleri tüketiminin laktobasillerin diş yüzüne tutunmalarını teşvik edici özelliğe sahip olmaları ve bu bakterilerin çürük dişte yerleşimlerinin fazla olması nedeniyle laktobasil izolatlarının çoğu bu iki örnekten elde edilmiştir.

Laktobasil izolatlarının 25 adedi – 80°C’de muhafaza sırasında canlılığını kaybetmiştir. Canlı kalabilen izolatlar için tanı testlerine geçilmiştir. Tanı testleri 3.2.3.’te belirtildiği şekilde yapılmıştır. Laktobasillere ait biyokimyasal tanı testleri sonuçları Ek 5.’te ve karbonhidrat fermantasyon testleri sonuçları da Ek 6 ’da verilmiştir.

Tanı testleri ağız florasını oluşturan türlerin belirlenmesi ve oluşturulması planlanan ağız probiyotiği preparatlarının güvenli olması açısından önem taşımaktadır. Laktobasillerin morfolojik özelliklerini gösteren izolatların 15°C’de ve 45°C’de gelişme, glikozdan gaz ve arjininden amonyak oluşturma durumları incelenmiştir. Hammes ve Vogel, (1995) tarafından yeniden düzenlenen laktobasil taksonomisinde hücre duvarının peptidoglukan yapısı, bazı enzimlerin elektroforetik hareketliliği %G+C oranı, 15°C’de ve 45°C’de gelişme ve arjininden amonyak oluşturma testlerine ait sonuçlar dikkate alınmaktadır. Bu çalışmada gerçekleştirilen testler sonucunda, 15°C’de gelişme ve arjininden amonyak oluşturma testleri dikkate alınarak düzenlenen Çizelge 4.2 incelendiğinde;

1. Genel olarak 15°C’de gelişmeyen ve arjininden amonyak oluşturmayan obligat homofermantatif (Grup 1) özellikte 3 adet,
2. Çoğunlukla 15°C’de gelişip, arjininden amonyak oluşturmayan fakültatif heterofermantatif (Grup 2) özellikte 11 adet,
3. Çoğunlukla her iki teste pozitif reaksiyon veren türleri içeren obligat heterofermantatif (Grup 3) özellikte 28 adet izolat belirlenmiştir.



15°C’de gelişme göstermeyen ancak arjininden amonyak oluşturan 1430, 1450, 1945, 1946, 1958, 1961 ve 1965 suşlarının ise bu özellikleri içeren Grup 1 ve Grup 3’e dahil olabileceği belirlenmiştir. İzolatların tanımlanmasında moleküler düzeyde gerçekleştirilen testlerin uygulanması önem taşımaktadır. Bu nedenle yapılacak çalışmalarla klasik tanı testlerinin modern moleküler tekniklerle desteklenmesi planlanmaktadır.

Bu test sonuçlarına göre toplam 48 adet izolattan 9 adedinin *Lactobacillus fermentum* (%18.75), 7 adedinin *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (%14.5), 3 adedinin *Lactobacillus reuteri* (%6.25) ve 1 adedinin de *Lactobacillus salivarius* (%2.08) olduğu tespit edilmiştir. Kalan 29 adet tür düzeyinde tanısı yapılamamakla birlikte, bu bakterilerin *Lactobacillus* sp. (%60.41) olarak tanısı konmuştur.

1425, 1441, 1442, 1444, 1445, 1447, 1448, 1451, 1943, 1944, 1947, 1948, 1949, 1952, 1954, 1957 no’lu suşlar biyokimyasal tanı testlerine uygunluk göstermekle beraber, bazı karbonhidrat fermantasyon testlerine uymadıkları için kesin tanı yapılamamıştır. Bu izolatlardan 1451, 1949 ve 1954 no’lu suşlar biyokimyasal tanı testine göre *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*’un karakteristik özelliklerini taşımakta, ancak 1451 no’lu suş mannoz negatif ve ksiloza pozitif, 1949 no’lu suş mannitol ve trehaloza negatif ve 1954 no’lu suş mannitol, mannoz ve trehaloza negatif sonuç vermektedir. 1425, 1441, 1442, 1445, 1448, 1947 ve 1957 no’lu suşlar biyokimyasal tanı testlerine göre *Lactobacillus fermentum*’un karakteristik özelliklerini taşımakta, ancak 1425 no’lu suş sakkarozu, 1441, 1442, 1448, 1947 ve 1957 no’lu suşlar ise rafinozu fermente etme özelliği taşımamaktadır. 1445 no’lu suş mannozdan asit oluşturma özelliğine sahip olmasından dolayı *Lactobacillus fermentum* olarak değerlendirilememiştir. 1447 no’lu suş biyokimyasal tanı testlerine göre *Lactobacillus reuteri*’nin karakteristik özelliklerini taşımakta, ancak ksilozu indirgeme özelliğine sahip olması ve rafinozdan asit oluşturma yeteneğinin bulunmaması nedeniyle bu suşların kesin tanısı yapılamamaktadır. 1952 no’lu suş *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*’nin karakteristik özelliklerini taşımakla beraber mannozu kullanabilme özelliğine sahip olmasından dolayı tanı

konamamıştır. Kesin tanının yapılabilmesi ancak genetik yöntemlerle mümkün olabilmektedir.

1422, 1427, 1429, 1432, 1445, 1450, 1454, 1952 no'lu suşlarda biyokimyasal tanı testlerinde uyumsuzluk olduğu için tanı yapılamamıştır. Tanının gerçekleştirilmesinde genetik tanı yöntemlerinden yararlanılması gerekmektedir.

Çizelge 4.2. Laktobasillerin fermantatif özelliklerine göre sınıflandırılması

<b>Grup 1</b>	<b>Grup 2</b>	<b>Grup 3</b>
1444	1420	1421
1952	1424	1422
1970	1433	1423
	1435	1425
	1441	1426
	1451	1427
	1454	1428
	1949	1429
	1950	1431
	1954	1432
	1955	1442
		1443
		1445
		1446
		1447
		1448
		1449
		1459
		1943
		1944
		1947
		1948
		1957
		1960
		1963
		1966
		1967

İzolatlardan çeşitli boyutlarda kok görünümünde, G (+) ve katalaz negatif izolatlar streptokok olarak değerlendirilmiş ve tanı testleri yapılmak üzere ayrılmıştır. İzolatlar arasında yer alan kok ve mayagörünümlü suşların izolasyon kaynakları, mikroskopik görünümleri ve koloni şekilleri Ek 7.'de verilmiştir.

MSBA, MSA, M17 Agar, BHIA, YGLLA ve SA'dan elde edilen 85 izolatın 4 adedinin maya, 81 adedinin ise kok görünümlü olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatlardan 9 adedi 1 no'lu çürük diş örneğinden, 1 adedi 2 no'lu diş plağı örneğinden, 7 adedi 3 no'lu çürük diş örneğinden, 2 adedi 4 no'lu diş plağı örneğinden, 1 adedi 5 no'lu sağlıklı diş örneğinden, 3 adedi 7 no'lu sağlıklı diş örneğinden, 2 adedi 8 no'lu sağlıklı diş örneğinden, 1 adedi 10 no'lu sağlıklı diş örneğinden, 13 adedi 11 no'lu çürük diş örneğinden, 8 adedi 14 no'lu çürük diş örneğinden, 1 adedi 18 no'lu sağlıklı diş örneğinden ve 31 adedi ise 19 no'lu çürük diş örneğinden izole edilmiştir. İzolatların 65 adedi soğukta muhafaza sırasında canlılığını kaybetmiştir. Bunun sebebinin izolasyonda ilk olarak kullanılan besiyerlerinin izolatlara uygun olmaması nedeniyle bakterilerin yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilecekleri ortamı bulamaması olduğu düşünülmektedir. Kullanılan uygun besiyerlerinde canlı kalabilen 17 adet kok izolatu için 3.2.4.'te belirtildiği şekilde tanı testleri yapılmıştır. Streptokok ve enterokoklara ait biyokimyasal tanı testi sonuçları Ek 8.'de ve karbonhidrat fermantasyon testleri sonuçları da Ek 9.'da verilmiştir.

Tanı testleri sonucunda 4 adet izolatın oral streptokoklardan *Streptococcus mutans* grubuna ait olduğu tespit edilmiştir. Bu grupta yer alan bakteriler; *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* ve *Streptococcus sobrinus*'tur. Bu izolatların tür düzeyinde tanıları ancak genetik tanı yöntemiyle yapılabilmektedir. Kalan 16 adet izolattan 13 adedinin enterokok, 3 adedinin ise maya olduğu tespit edilmiştir. Enterokok grubuna dahil olan izolatların biyokimyasal testlerle *Streptococcus avium* veya *Streptococcus gallinarum* olabileceği sonucuna varılmıştır. Tanının kesinleştirilmesinde genetik tanı testlerinden yararlanılması gereklidir. Daha sonra yapılacak çalışmalarla tanının kesinleştirilmesi planlanmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen izolatlar daha önce yapılmış olan bazı araştırmalar ile benzerlik göstermektedir. Twetman vd. (1999) yaptığı bir çalışmada çeşitli diş problemleri olan 108 ilkökul öğrencisinde tedavi öncesi ve sonrasında tükürükte bulunan mutans streptokokların ve laktobasillerin sayıları tespit edilmiştir. Buna göre, mutans streptokokların varlığının yaşa ve kaybedilen diş sayısına bağlı olarak

arttığı tespit edilmiştir. 1-3 yaşları arasındaki çocuklarda mutans streptokok sayısı okul çağındakilere oranla daha düşüktür. Diğer taraftan laktobasiller dişte tutunmalarının kolay olduğu kısımlarında baskın olmakta ve çocukların tükürüğünde bulunmamaktadır. Çocukların yaklaşık %87'sinde mutans streptokok ve %47'sinde laktobasile rastlanmıştır. Mutans streptokokların varlığı çürük dişlerle bağlantılı görülmüş, ancak laktobasiller ile diş çürüğünün herhangi bir bağlantısı olmadığı tespit edilmiştir.

Chávez de Paz vd. (2003) yaptığı bir araştırmada kimyasal ve mekanik tedaviler sonrasında dişin kök kanallarında bulunan bakterilerin tespit edilmesine yönelik incelemelerde bulunulmuştur. Araştırma sonuçlarına göre başta laktobasiller olmak üzere, mutans grubundan olmayan streptokoklar ve enterokoklar baskın haldeki bakteriler olarak belirtilmiştir.

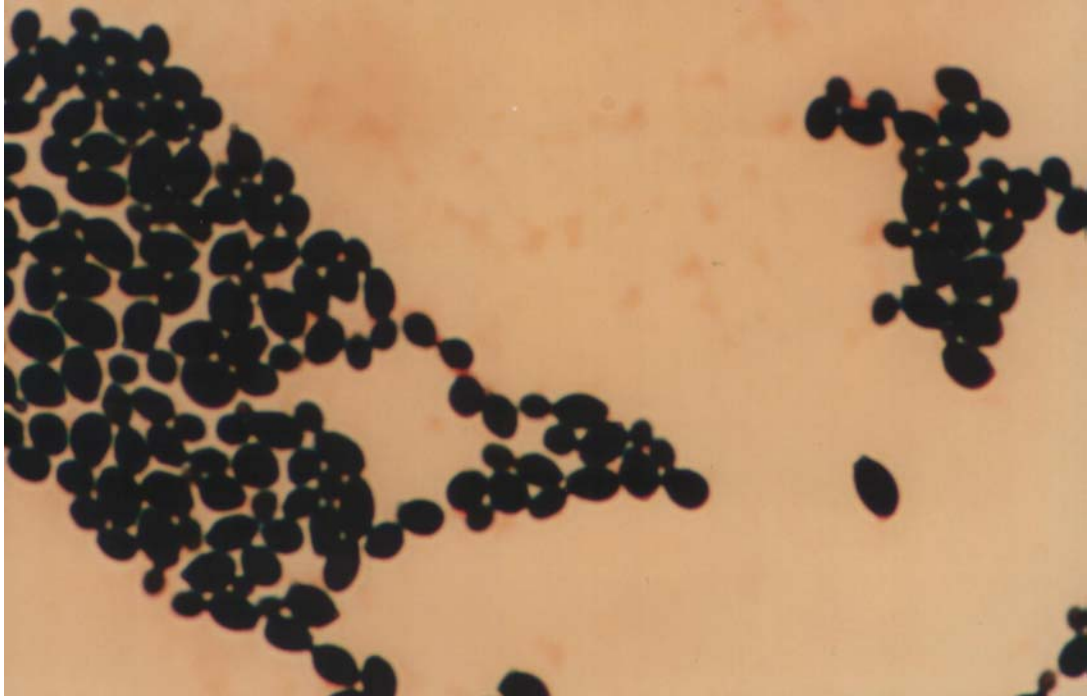
Bir başka araştırmada (Smith vd., 2001), 93 kişiden alınan 98 diş plağı ve 72 tükürük örneği incelenmiş ve bakteri oranları tespit edilmiştir. Örneklerde tükürükten %20.8, plaktan %51.0 oranında laktobasil izole edilmiştir. İzole edilen diğer mikroorganizmalardan *S.mutans* tükürükte %27.8, plakta %10.2, mayalar tükürükte %23.6, plakta %20.4, *Staphylococcus* sp. tükürükte %22.2 ve plakta %12.2 oranında tespit edilmiştir. Toplam 170 örnekten 65 adet *Lactobacillus* sp. İzole edilmiştir. Bunlardan %24.6'sı *Lactobacillus brevis*, % 18.5'i *Lactobacillus fermentum*, %16.9'u *Lactobacillus casei*, %15.4'ü *Lactobacillus delbrueckii*, %9.23'ü *Lactobacillus plantarum*, %7.69'u *Lactobacillus acidophilus*, %4.62'si *Lactobacillus jensenii*, %1.54'ü *Lactobacillus salivarius* ve %1.54'ü *Lactobacillus gasseri* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca bu çalışmada diş çürüğü olan hastalardan alınan plak örneklerinde laktobasil sayılarının daha yüksek olduğu da belirtilmiştir.

Helmerhorst vd. (2004) yaptığı bir başka çalışmada diş yüzeyi biyofilmine ilk kolonize olan bakteriler incelenmiştir. Bu çalışmada periodontal hastalıkların oluşumunda bakteriyel kümeleşmenin ve diş yüzeyine ilk kolonize olan bakterilerin önemi belirtilmiştir. Bu bakteriler kolonize olduktan sonra ortamı diğer bakteriler için elverişli hale getirmekte ve bunların tutunmalarını kolaylaştırmaktadırlar. Tüm

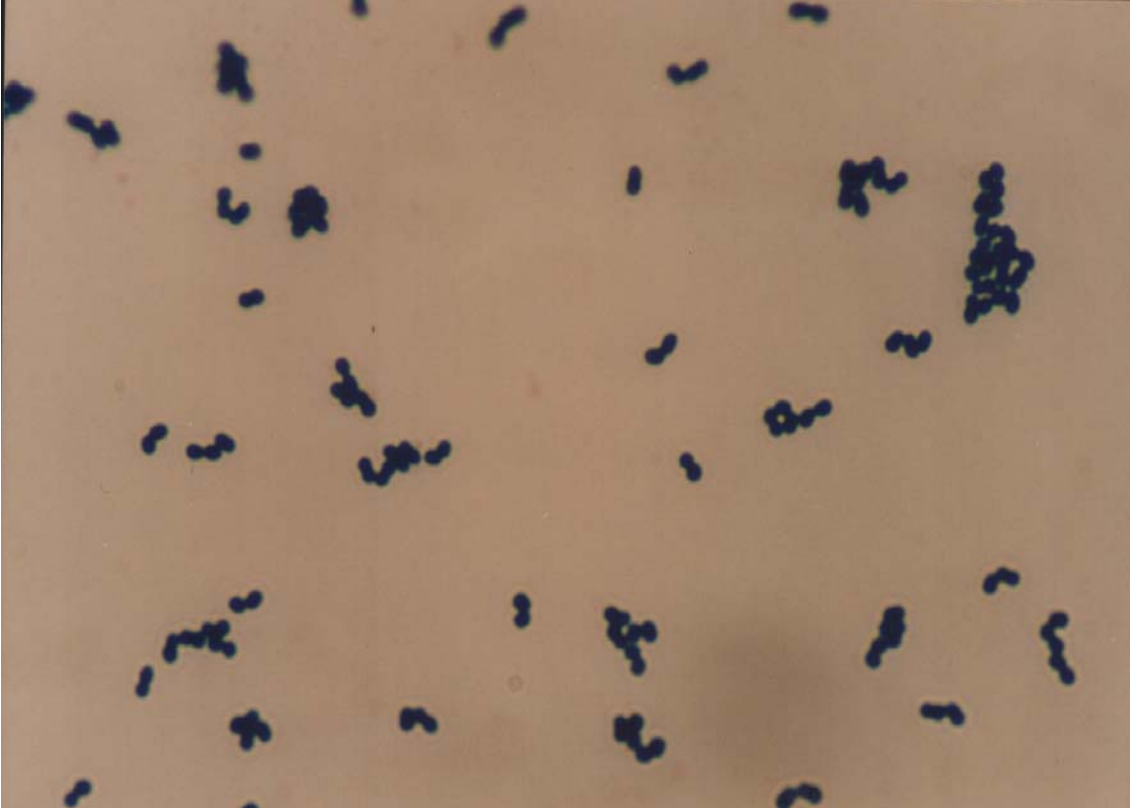
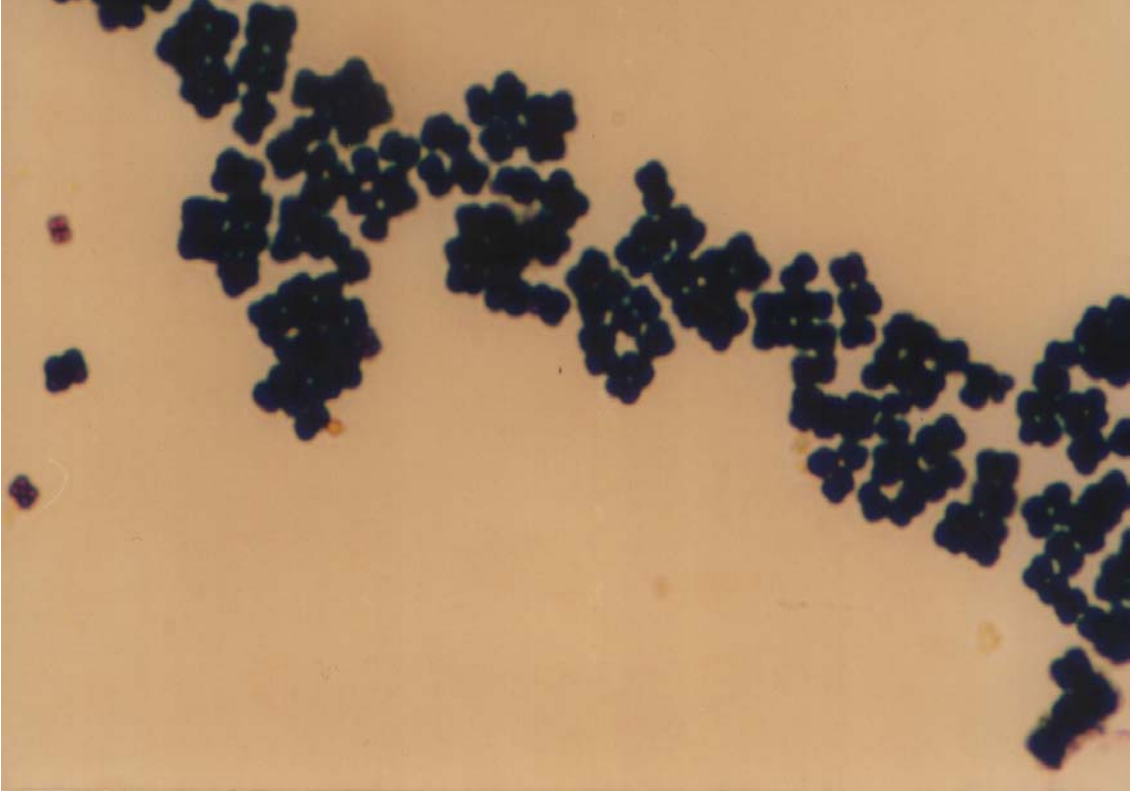
örneklerde tükürükteki *S.mitis* ve *S.mutans* sayıları azken, özellikle ilk 6 saat sonunda diş plağında sayıların arttığı gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada diş plağı oluşum safhalarındaki bakteri popülasyonunun da değişiklik gösterdiği belirtilmiştir.

Simonović vd. (2002) yaptığı bir araştırmaya göre diş plağından izole edilen bakteriler streptokoklar, aktinomisetler, Veillonella, Neisseria ve Bacteroides'dir. Streptokoklardan özellikle nonhemolitik viridans grubun yoğun olarak tespit edildiği de belirtilmiştir. Ayrıca diş çürüğünün gelişimine bağlı olarak bazı bakterilerin baskın hale gelirken bazılarının sayıca azaldığından söz edilmiştir. Laktobasiller ve *S.mutans* grubu bakterilerin ise kök kanallarında daha yaygın halde bulunduğu bildirilmiştir.

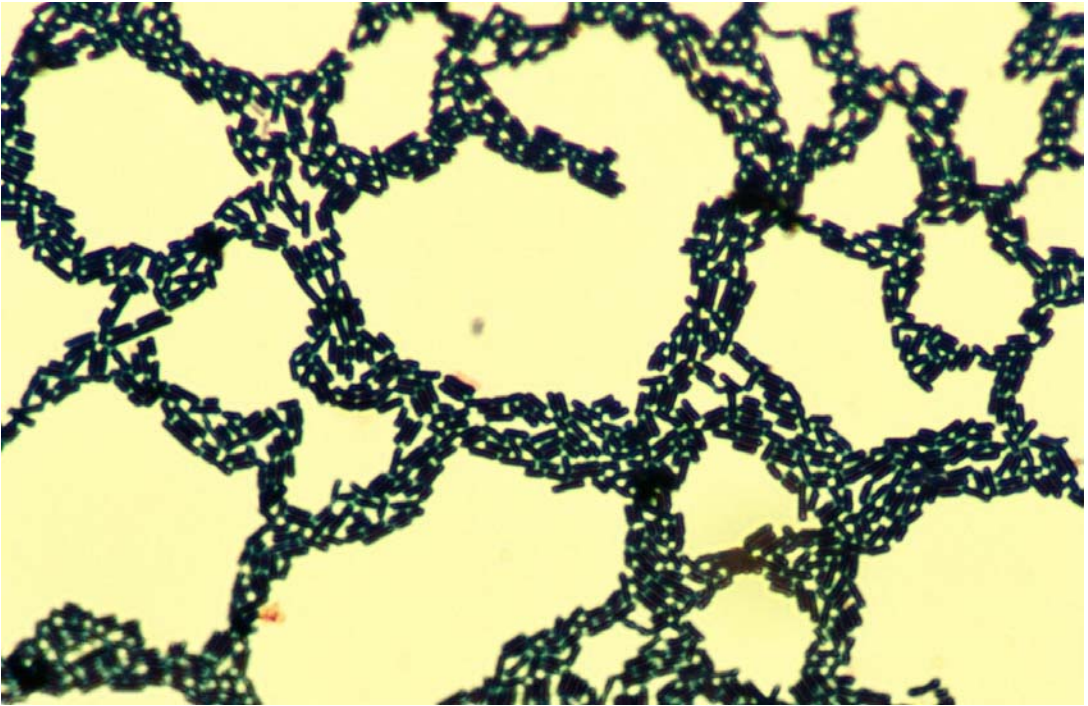
Şekil 4.1'de mayaların mikroskopik görünümü, Şekil 4.2'de streptokokların mikroskopik görünümü, Şekil 4.3'te laktobasillerin mikroskopik görünümü ve Şekil 4.4'te enterokokların mikroskopik görünümü verilmiştir.



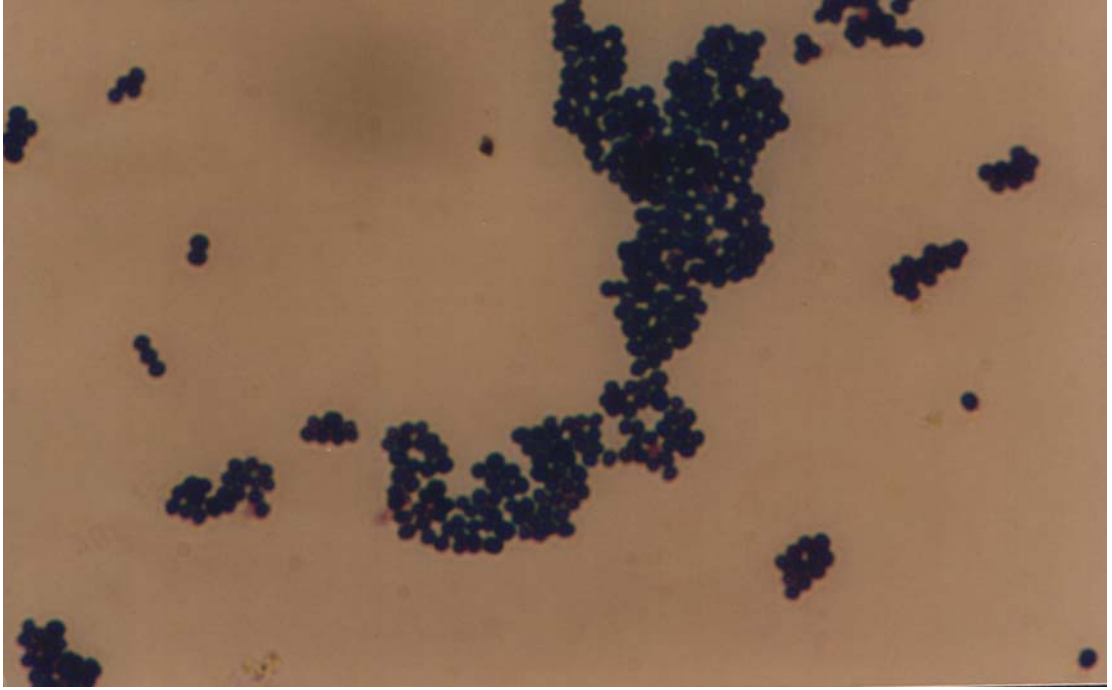
Şekil4.1. Mayaların mikroskopik görüntüsü



Şekil 4.2 Streptokokların mikroskobik görüntüsü



Şekil 4.3 Laktobasillerin mikroskopik görüntüsü



Şekil 4.4 Enterokokların mikroskobik görüntüsü

### 4.3. Antagonistik etki denemeleri sonuçları

Sağlıklı ve çürük dişte bulunan laktobasiller asit üretimleri nedeniyle diş çürümesinde etken olarak düşünülseler dahi, oluşturdukları metabolitlerle diş patojenlerinin inhibisyonunu sağlayabilmektedirler. Bu nedenle ağız probiyotiği seçiminde diş patojenlerine karşı antagonistik etki düzeyi fazla olan laktobasillerin seçimi önem taşımaktadır.

İzolasyonu tamamlanmış olan 48 adet laktobasilin, 4 adet *S.mutans*'a gösterdiği antagonistik etkisi 3.2.5.'deki yöntemle belirlenmiştir. Antagonistik etki deneme sonuçları Ek 10'da verilmiştir.

Antagonistik etki denemelerinin sonuçlarına göre 4 adet laktobasil suşu (*Lactobacillus* sp. 1454, *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus* 1950, *Lactobacillus* sp. 1952, *Lactobacillus salivarius* 1970) tüm streptokok suşlarına, 24 adet laktobasil suşu (*Lactobacillus fermentum* 1421, *Lactobacillus fermentum* 1423, *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus* 1424, *Lactobacillus* sp. 1425, *Lactobacillus* sp. 1427,



*Lactobacillus fermentum* 1428, *Lactobacillus* sp. 1429, *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus* 1433, *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus* 1435, *Lactobacillus* sp. 1442, *Lactobacillus fermentum* 1443, *Lactobacillus* sp. 1445, *Lactobacillus* sp. 1446, *Lactobacillus* sp. 1448, *Lactobacillus* sp. 1450, *Lactobacillus* sp. 1451, *Lactobacillus* sp. 1944, *Lactobacillus* sp. 1947, *Lactobacillus* sp. 1948, *Lactobacillus* sp. 1949, *Lactobacillus* sp. 1954, *Lactobacillus* sp. 1958, *Lactobacillus reuteri* 1960, *Lactobacillus reuteri* 1966) 3 streptokok suşuna, 8 adet laktobasil suşu (*Lactobacillus* sp. 1422, *Lactobacillus* sp. 1430, *Lactobacillus fermentum* 1431, *Lactobacillus* sp. 1447, *Lactobacillus* sp. 1945, *Lactobacillus* sp.1946, *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus* 955, *Lactobacillus fermentum* 1963) 2 streptokok suşuna ve 9 adet laktobasil suşu (*Lactobacillus* sp. 1432, *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus* 1441, *Lactobacillus* sp. 1444, *Lactobacillus reuteri* 1449, *Lactobacillus* sp. 1943, *Lactobacillus* sp. 1957, *Lactobacillus fermentum* 1959, *Lactobacillus* sp. 1961, *Lactobacillus fermentum* 1967) 1 streptokok suşuna karşı etki göstermiştir.

Tüm laktobasil suşları arasında en fazla etkiyi gösteren 14 adet laktobasil suşu (*Lactobacillus fermentum* 1423, *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus* 1424, *Lactobacillus* sp. 1425, *Lactobacillus* sp. 1430, *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus* 1433, *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus* 1435, *Lactobacillus fermentum* 1443, *Lactobacillus* sp. 1454, *Lactobacillus* sp. 1948, *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus* 1950, *Lactobacillus* sp. 1952, *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus* 1955, *Lactobacillus reuteri* 1960, *Lactobacillus salivarius* 1970) daha sonraki tutunma denemelerinde kullanılmak üzere ayrılmıştır. Bu çalışmada laktobasillerin diş yüzeyinde tutunarak diş patojenlerinin etkisini azaltmaları istendiği için diğer laktobasil suşlarında antagonistik etki sonuçları daha iyi olmasına karşın, tutunma miktarı daha fazla olan *Lactobacillus casei* subsp.*rhamnosus* 1955'un ve antagonistik etki denemelerinde tüm streptokoklara karşı etki gösterdiği için *Lactobacillus salivarius* 1970'un denemelerin devamında kullanılmasına karar verilmiştir. Şekil 4 4'te antagonistik etki denemesi sonucunda elde edilen görüntü verilmiştir.



Şeki 4.5. Antagonistik etki denemesi sonucunda petri kutusunda görünümü

#### 4.4. Tutunma denemesi sonuçlar

##### 4.4.1. Streptokokların farklı yüzeylere tutunma özelliklerinin belirlenmesi

Streptokokların adezyon özelliklerinin belirlenmesi amacıyla bir çok araştırmada farklı kaplama materyallerinden yararlanılmıştır. Bu çalışmada, tanısı yapılan streptokokların adezyon özelliklerinin saptanmasında polistiren (PS) yüzey, kalsitleme çözeltisi ile kaplanmış yüzey ve diş minesindeki baskın kristal yapı olmasından dolayı (Guan vd., 2001) 4 farklı HAP materyal ile kaplanmış yüzeylerden yararlanılmıştır. Biotinle işaretlenmiş bakterilerin 6 farklı tipteki yüzeye adezyon özelliğinin belirlenmesinde 3.2.7.'de belirtilen yöntemden yararlanılmıştır 405 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak yapılan ölçümler sonucunda elde edilen absorbanslar Çizelge 4.3'te verilmiştir.

*S.mutans* suşlarının farklı yüzeylere tutunma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemeler sonucunda 3 nolu HAP ile kaplı yüzeylerde tutunmanın daha fazla

olduğu belirlenmiştir. 1 nolu HAP ile kaplanan yüzeylerde *S.mutans* 1904, 1925, 1929 ve 1933 suşlarının yüzeye tutunma denemeleri sonunda 0.097-0.239, 2 nolu HAP ile kaplanan yüzeylerde 0.203-0.252, 3 nolu HAP ile kaplanan yüzeylerde 0.324-0.995 ve 4 nolu HAP ile kaplanan yüzeylerde 0.070-0.374 absorbands tespit edilmiştir. PS yüzeylerde ölçülen absorbands aralığı 0.035-0.046 değerlerinde ve kalsitleme çözeltisi ile kaplanan yüzeylerde belirlenen absorbands aralığı 0.034-0.050 değerlerindedir. Bu değerler ile hiçbir işlem görmemiş kontrol kuyucuklarında ölçülen değerler çok yakın olduğu için bu materyallerde tutunmanın kayda değer veri elde etmede sağlıklı olmayacağı düşünülmüştür.

Çizelge 4.3. *S.mutans* suşlarının farklı yüzeylere tutunma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemenin sonuçları

<b>Kaplama işlemi</b>	<b>1904</b>	<b>1925</b>	<b>1929</b>	<b>1933</b>
<b>1.HAP</b>	0.097	0.152	0.143	0.239
<b>2.HAP</b>	0.230	0.228	0.252	0.203
<b>3.HAP</b>	0.324	0.995	0.952	0.792
<b>4.HAP</b>	0.114	0.269	0.374	0.070
<b>PS</b>	0.041	0.046	0.035	0.035
<b>Kalsitleme Çöz.</b>	0.034	0.046	0.050	0.037
<b>Boş kuyucuk</b>	0.042	0.046	0.047	0.044

Bu sonuçlar HAP yüzeylere tutunma açısından Guan vd. (2001) elde ettiği sonuçlarla benzerlik göstermekle birlikte, kalsitleme çözeltisi ile yüzeylerin kaplanması sonucunda Schilling vd. (1994) daha yüksek absorbandslar bildirmiştir. Bu nedenle de streptokokların yüzeylere tutunma özelliklerinin belirlenmesinde kalsitleme çözeltisinden yararlanmışlardır.

Bu çalışmada absorbands aralığı 3 nolu HAP ile kaplanan yüzeylerde 0.324-0.995 arasında belirlenmiş ve tüm suşlarda en yüksek düzeyde tutunma sağlandığı için çalışmanın devamında kaplama materyali olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Laktobasillerin ve streptokokların adezyon özelliklerinin kıyaslanması amacıyla tanısı yapılan laktobasil suşları kullanılarak gerçekleştirilen denemelere ait sonuçlar Ek 10'da verilmiştir.

Denemelerde kullanılan 48 adet laktobasilin 6 adedinin HAP ile kaplı yüzeylerde vermiş olduğu absorbanlar 1.700'ün üzerindedir. Laktobasillerin streptokoklara karşı ağız probiyotiği olarak kullanılabilmesi amacıyla adezyon özellikleri ve antagonistik etkileri birlikte değerlendirilmiştir. Antagonistik etki denemeleri sonucunda streptokoklara karşı en fazla etki gösteren 14 adet laktobasil suşunun adezyon özellikleri incelenmiş ve *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 1955 ile *Lactobacillus salivarius* 1970'in denemelerin devamında kullanılmasına karar verilmiştir. Daha önce yapılmış çalışmalar arasında laktobasillerin HAP yüzeylere adezyon özelliklerine ait bulgulara rastlanmadığından, bu çalışmada elde edilen sonuçlarla kıyaslanması mümkün olmamıştır.

#### 4.4.2. Streptokokların laktobasil varlığında HAP yüzeylere tutunma özelliklerinin belirlenmesi

Laktobasillerin varlığında streptokokların HAP ile kaplanmış yüzeylere tutunma denemelerinin sonuçları Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

Çizelgede *S.mutans* 1904, 1925, 1929 ve 1933 no'lu suşların tek başlarına HAP kaplı yüzeylere tutunma denemeleri sonuçları ile kontroller kıyaslandığında belirlenen fark 0.305-0.348 değerindedir. *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 1955 varlığında tespit edilen absorban değerleri ile kontrol arasındaki fark 0.064-0.098 olarak belirlenmiştir. *Lactobacillus salivarius* 1970 varlığında ise ölçüm değerleri ile kontrol arasındaki fark 0.470-0.740 arasındadır. Bu sonuçlara göre *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 1955 ile yapılan denemelerde *S.mutans*'ın yüzeye tutunmasının belirgin düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Daha önce yapılmış çalışmalar arasında laktobasillerin HAP yüzeylerde streptokokların sayısını azaltmaya yönelik kullanımına ait bulgulara rastlanmadığından, bu çalışmada elde edilen sonuçlarla kıyaslanması mümkün olmamıştır.

Çizelge 4.4. Streptokokların laktobasil varlığında HAP yüzeylere tutunma özelliklerinin belirlenmesi

Kuyucuklar	Absorbans	Kontrol ile Fark
------------	-----------	------------------

<i>S.mutans</i> 1904 B	1.670	0.331
<i>S.mutans</i> 1925 B	1.644	0.305
<i>S.mutans</i> 1929 B	1.654	0.315
<i>S.mutans</i> 1933 B	1.687	0.348
Boş Kontrol	1.339	
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rahamnosus</i> 1955 + <i>S.mutans</i> 1933 B	0.879	0.098
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rahamnosus</i> 1955 + <i>S.mutans</i> 1933 B	0.845	0.064
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rahamnosus</i> 1955 Kontrol	0.781	
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1970+ <i>S.mutans</i> 1929 B	1.822	0.740
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1970+ <i>S.mutans</i> 1933 B	1.552	0.470
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1970 Kontrol	1.082	

#### 4.5. *S.mutans* suşlarının laktobasil varlığında dış yüzeyine tutunma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerin sonuçları

*S.mutans* suşlarının laktobasil varlığında dış yüzeyine tutunma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemeler 3.2.7.'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.5.'te birinci yöntem kullanılarak yapılan deneme sonucunda bakterilerin tek başlarına tutunma özelliklerinin incelendiği denemelerin sonuçları ve Çizelge 4.6.'da ise bakterilerin aynı ortamda birbirlerine karşı etkilerinin incelendiği denemelere ait sonuçlar verilmiştir. Çizelge 4.7'de ikinci yöntem kullanılarak yapılan deneme sonucunda bakterilerin tek başlarına tutunma özelliklerinin incelendiği denemelerin sonuçları ve Çizelge 4.8.'de ise bakterilerin aynı ortamda birbirlerine karşı etkilerinin incelendiği denemelere ait sonuçlar verilmiştir.

Birinci denemede öncelikle laktobasiller ve streptokokların tek başlarına tutunma miktarları belirlenmiştir. Daha sonra laktobasil suşları tutunma rekabetinin belirlenebilmesi amacıyla streptokoklara karşı denenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre başlangıç hücre konsantrasyonu  $5 \times 10^8$  kob/ml olan *Lactobacillus casei* subsp. *rahamnosus* 1955 suşunun deneme sonundaki hücre konsantrasyonu  $8.3 \times 10^6$ - $6.6 \times 10^7$  kob/ml'ye düşerken, başlangıç hücre konsantrasyonu  $2.5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$  kob/ml olan *Streptococcus mutans* 1904, 1925, 1929 ve 1933 suşlarında hücre son hücre

konsantrasyonu  $1.83 \times 10^6$  -  $7.16 \times 10^7$  arasındadır. Başlangıç hücre konsantrasyonu  $1.2 \times 10^9$  kob/ml olan *Lactobacillus salivarius* 1970'in deneme sonundaki hücre konsantrasyonu  $1.11 \times 10^7$  -  $5 \times 10^7$  kob/ml'ye düşerken, başlangıç hücre konsantrasyonu  $2.5 \times 10^6$  -  $5 \times 10^7$  kob/ml olan *Streptococcus mutans* 1904, 1925, 1929 ve 1933 suşlarında son hücre konsantrasyonu  $2.83 \times 10^7$  -  $7.8 \times 10^7$  arasındadır.

Çizelge 4.5. Bakterilerin tek başlarına tutunma özelliklerinin incelendiği denemelerin sonuçları

Bakteri adı	Başlangıç sayıları (kob/ml)	1. Diş	2. Diş	3. Diş	4. Diş
<i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> 1955 (kob/ml)	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^6$	$2 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1970 (kob/ml)	$1.2 \times 10^9$	$5 \times 10^6$	$1.16 \times 10^7$	$5 \times 10^6$	$7.5 \times 10^6$
<i>S. mutans</i> 1904 (kob/ml)	$1.5 \times 10^7$	$5 \times 10^7$			
<i>S. mutans</i> 1925 (kob/ml)	$0.5 \times 10^7$		$2.5 \times 10^6$		
<i>S. mutans</i> 1929 (kob/ml)	$8.3 \times 10^8$			$1 \times 10^7$	
<i>S. mutans</i> 1933 (kob/ml)	$1.5 \times 10^8$				$1 \times 10^7$

Çizelge 4.6. Bakterilerin aynı ortamda birbirlerine karşı etkilerinin incelendiği denemelere ait sonuçlar

Bakteri Adı	Laktobasil sayısı (kob/ml)	Streptokok sayısı (kob/ml)
<i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> 1955+ <i>S. mutans</i> 1904	$5.6 \times 10^7$	$5.6 \times 10^7$
<i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> 1955+ <i>S. mutans</i> 1925	$8.3 \times 10^6$	$1.83 \times 10^6$
<i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> 1955+ <i>S. mutans</i> 1929	$5.6 \times 10^7$	$5.16 \times 10^7$
<i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i> 1955+ <i>S. mutans</i> 1933	$6.6 \times 10^7$	$7.16 \times 10^7$
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1970+ <i>S. mutans</i> 1904	$1.11 \times 10^7$	$1 \times 10^7$
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1970+ <i>S. mutans</i> 1925	$3.2 \times 10^7$	$2.83 \times 10^7$
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1970+ <i>S. mutans</i> 1929	$4.8 \times 10^7$	$6.5 \times 10^7$
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1970+ <i>S. mutans</i> 1933	$5 \times 10^7$	$7.8 \times 10^7$

Çizelge 4.7. Bakterilerin tek başlarına tutunma özelliklerinin incelendiği denemelerin sonuçları

Bakteri Adı	Başlangıç sayıları
-------------	--------------------

	(kob/ml)
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> 1955 (kob/ml)	8.66x10 <sup>7</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1970 (kob/ml)	2.25x10 <sup>8</sup>
<i>S. mutans</i> 1904 (kob/ml)	2.x10 <sup>7</sup>
<i>S. mutans</i> 1925 (kob/ml)	2.5x10 <sup>7</sup>
<i>S. mutans</i> 1929 (kob/ml)	2.33x10 <sup>7</sup>
<i>S. mutans</i> 1933 (kob/ml)	1.5x10 <sup>7</sup>

Çizelge 4.8. Bakterilerin aynı ortamda birbirlerine karşı etkilerinin incelendiği denemelere ait sonuçlar

Bakteri adı	Laktobasil sayısı (kob/ml)	Streptokok sayısı (kob/ml)
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> 1955+ <i>S. mutans</i> 1904	1.5x10 <sup>6</sup>	2.83x10 <sup>5</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> 1955+ <i>S. mutans</i> 1925	1.66x10 <sup>6</sup>	1.16x10 <sup>5</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> 1955+ <i>S. mutans</i> 1929	1.16x10 <sup>6</sup>	2.5x10 <sup>5</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> 1955+ <i>S. mutans</i> 1933	2x10 <sup>6</sup>	2.16x10 <sup>5</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1970+ <i>S. mutans</i> 1904	3.16x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>6</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1970+ <i>S. mutans</i> 1925	8.3x10 <sup>4</sup>	1.41x10 <sup>6</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1970+ <i>S. mutans</i> 1929	2.66x10 <sup>5</sup>	1.83x10 <sup>6</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1970+ <i>S. mutans</i> 1933	2.66x10 <sup>5</sup>	2.5x10 <sup>6</sup>

Denemenin ikinci kısmında 5 mm<sup>2</sup>lik alanı işaretlenmiş diş yüzeylerinde tutunma miktarları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre başlangıç hücre konsantrasyonu 8.66x10<sup>7</sup> kob/ml olan *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* 1955'in deneme sonundaki hücre konsantrasyonu 1.16x10<sup>6</sup>-2x10<sup>6</sup> (kob/ml)'ya düşerken, başlangıç hücre konsantrasyonu 1.5x10<sup>7</sup>-2.5x10<sup>7</sup> kob/ml olan *Streptococcus mutans* 1904, 1925, 1929 ve 1933 suşlarında hücre son hücre konsantrasyonu 1.16x10<sup>5</sup>-2.83x10<sup>5</sup> arasındadır. Başlangıç hücre konsantrasyonu 2.25x10<sup>8</sup> kob/ml olan *Lactobacillus salivarius* 1970'in deneme sonundaki hücre konsantrasyonu 8.3x10<sup>4</sup>-2.66x10<sup>5</sup> kob/ml'e düşerken, başlangıç hücre konsantrasyonu 1.5x10<sup>7</sup>-2.5x10<sup>7</sup> kob/ml olan *mutans* 1904, 1925, 1929 ve 1933 suşlarında son hücre konsantrasyonu 1x10<sup>6</sup>-2.5x10<sup>6</sup> arasındadır.

Laktobasil ve streptokokların başlangıç hücre konsantrasyonları ile deneme sonunda tespit edilen hücre konsantrasyonları arasında önemli düzeyde fark olmadığı

belirlenmiştir. Bu sonuçlarla daha önce yapılmış bazı araştırmaların sonuçları benzerlik göstermektedir. Guan vd. (2001) yaptığı çalışmada streptokok sayısı  $10^6$ 'nın üzerinde olduğu durumlarda tutunan hücre sayısının azaltılmadığı belirtilmiştir. Filoche ve ark.'nın (2004) yaptığı bir çalışmaya göre ise laktobasillerin dış plağında tek başlarına ve diğer türlerin varlığında tutunma miktarları incelenmiştir. Tek başına tutunma miktarlarının, diğer türlerin varlığında tutunmaya göre oldukça düşük düzeyde olduğu bildirilmiştir. Bilgiler ışığında yapılacak ileriki çalışmalarda laktobasil ve streptokok suşlarının bir arada bulunduğu karışık kültür ortamında tutunma miktarlarının belirlenmesi planlanmaktadır.

#### **4.6. Laktobasillerin plazmid profillerinin belirlenmesi**

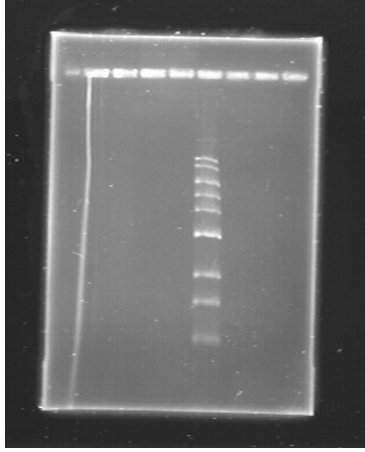
Laktobasillerin plazmid profillerinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemeler 3.2.8'de belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Denemelerde kullanılan plazmid izolasyon yöntemlerinin başarılı sonuç vermediği tespit edilmiştir. Şekil 4.5'te birinci izolasyon yöntemine göre ve Şekil 4.6'da ikinci izolasyon yöntemine göre yapılan plazmid izolasyonları sonucunda agaroz jel elektroforezi sonrasında elde edilen görüntüler verilmektedir.

Bu çalışmada karşılaşılan güçlükler ve alınan sonuçlar daha önce yapılmış olan bazı araştırmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir (Klaenhammer vd. 1993; Çataloluk, 2003). Bu çalışmalarda laktokoklardan ve laktobasillerden plazmid izolasyonu yapılmaya çalışılmış ve laktobasillerden plazmid izole etmenin laktokoklara göre zor olduğu belirtilmiştir. Laktobasillerin hücre duvarının kırılması amacıyla kullanılan lizozim enziminin hücre duvarının kırılmasında yetersiz kaldığını, belli oranlarda ve kısa süreli mutanolisin ile lizozim karışımının birlikte uygulanması gerektiği açıklanmıştır.

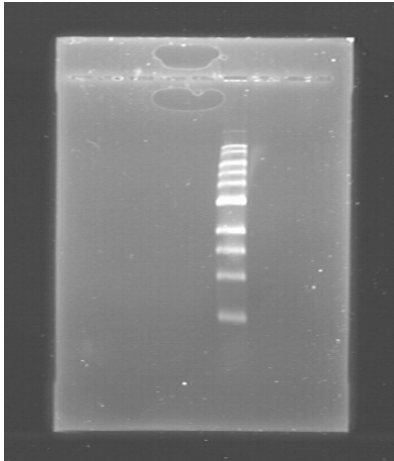
Klaenhammer ve ark. (1993) laktobasillerden plazmid izolasyonuna yönelik olarak yaptıkları çalışmada 25 kb ve üzerinde büyüklüğe sahip olan plazmidlerin izolasyonunda mutanolisin kullanımını önermiştir. Ayrıca bu araştırma sonuçlarına



göre lizozim ile muamele sırasında inkübasyon süresi ve pH'nın uygun olmadığı koşullarda plazmidin kolaylıkla kaybolabileceği de vurgulanmıştır.



Şekil 4.6 O'Sullivan ve Klaenhammer (1993)'ın yöntemi ile plazmid izolasyonu



Şekil 4.7 Çakır (2003)'ün yöntemi ile plazmid izolasyonu

Çataloluk (2003) yaptığı çalışmada daha önceleri laktokoklardan plazmid izolasyonunda Chassy (1976), Klaenhammer vd. (1978), Sullivan ve Klaenhammer (1993) ve Burger ve Leon (1994)'un kullandığı yöntemlerden yararlanarak dıştan izole edilen *Lactobacillus salivarius*'tan plazmid izole etmeye çalışmış, ancak başarılı sonuç alamadığını belirtmiştir. Bunun sebebinin ise laktobasillerin lizozime karşı hassas olmamasına bağlamıştır. Klaenhammer ve ark.'nın (1993) yaptığı

çalışma ile benzerlik göstermekle birlikte lizozim ve mutanolisin uygulamalarında yöntemlerde farklı süreler ile belirtilmiş olan ve yaklaşık 1 saat süren inkübasyonda plazmidin kaybolacağı belirtilmiştir. Ayrıca lizozim ile birlikte uygulanan mutanolisin miktarının 60 U'ten fazla olmaması gerektiği, aksi takdirde plazmidin yok olacağı bildirilmiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında daha sonraki çalışmalarda bu çalışmada izole edilen ve ağız probiyotiği olarak kullanılması önerilen laktobasillerden plazmid izolasyonu yapılması planlanmaktadır.

#### **4.7. Ağız probiyotiği olarak kullanılması önerilen laktobasillerin asit oluşturma yeteneklerinin giderilmesi**

Laktobasillerin asit oluşturma özelliklerinin giderilmesi amacıyla 3.2.9'da anlatılan yöntemlerden yararlanılmıştır. 50 ve 100 µg/ml etidyum bromid içeren MRS sıvı besiyerinde geliştirilen laktobasillerden CaCO<sub>3</sub> içeren MRS agar besiyerine ekim yapıldıktan sonra 48 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiş ve oluşan kolonilerin etrafındaki zon oluşumu değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonunda oluşan tüm kolonilerin etrafında zon oluştuğu tespit edilmiştir. Buna göre kolonilerin asit oluşturdukları ve asit oluşturma özelliklerinin değiştirilemediği sonucuna varılmıştır. Diğer yöntemle yapılan çalışmada laktobasillerin başlangıç pH'ları *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* suşunda 3.91 ve *Lactobacillus salivarius* suşunda 3.85 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar glikoz içermeyen MRS sıvı besiyerinde 30 günlük pasajlama işleminden sonra sırasıyla 6.85 ve 6.78 olarak tespit edilmiştir. Bu kültürler tekrar glikoz içeren MRS sıvı besiyerine alınarak 37°C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmış ve sonrasındaki ölçümlerinde *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 1955'in pH'sı 4.15, *Lactobacillus salivarius* 1970'in pH'sı ise 4.01 olarak belirlenmiştir. Buna göre yapılan pasajlama işleminin laktobasil suşlarının asit üretme özellikleri üzerinde kayda değer bir etki yaratmadığı sonucuna varılmıştır.

## **5. SONUÇ**

Süt ve süt ürünlerini ağız ve diş sağlığının korunmasındaki olumlu etkileri yaygın olarak bilinmekle birlikte laktik asit bakterilerinin ağız ve diş sağlığının korunmasında kullanılmalarına yönelik çalışmalar oldukça yeni ve geliştirilmeye açık bir alanı oluşturmaktadır.

Bu çalışmada, laktik asit bakterileri kullanılarak çürük etkeni mikroorganizmaların ortamdaki uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Çürük dişte yer alan bakterilerden olan laktobasillerin asit oluşumu ile çürük oluşumuna katkı sağladıkları ve bu özelliğin giderilmesiyle çürük oluşumunu önlemede etkili olabileceklerine dair bulgulara rastlanmıştır. Bu bakteriler diş kaynaklı olduklarından fermente ürünler ile alındığında tekrar diş yüzeyine tutunmaları ve diş patojenleri ile rekabet edebilmeleri daha kolay olacaktır.

Yapılan anketlere göre ülkemizde diş çürümelerinin önlenmesi amacıyla mekanik yöntemleri kullanma oranı düşük olmasına karşın fermente süt ve süt ürünleri tüketiminin fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle ağız ve diş sağlığını korumaya katkı sağlayacak suşları içeren ürünlerin tüketiminin ülkemizde yaygın olacağı düşünülmektedir.

Elde edilen suşların güvenilir ve sağlığa faydalı etkilerinin olduğu hayvan deneyleri ile daha sonra ise gönüllü bireylerle çalışılarak belirlenmelidir. Bu özelliklere sahip suşları içeren gıdaların üretimi veya ticari preparatların hazırlanması açısından gerekli çalışmaların yapılması planlanmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Adams, M., R., 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 68, 171-178.
- Ahola, A., J., Ylinuuttila, H., Suomalainen, T., Poussa, T., Ahlström, A., Meurman, J., H., Korpela, R., 2002. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Archives of Oral Biology*, 47, 799-804.
- Akçelik, M., Ayhan, K., Durlu, F., Demircan, S., Tunail, N., 1996. Türkiye’de izole edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşlarında nisin üretim özelliğinin genetik determinantlarının belirlenmesi. *Turkish Journal of Biology*, 20, 9-18.
- Aslım, B., 1994. *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* bakterilerinin metabolik ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine bazı fiziksel ve kimyasal mutajenlerin etkisi. G. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Atlas, R., M., 1997. *Handbook of Microbiological Media*, Second Edition, CRC pres, New York, London, Tokyo.
- Badet, C., Richard, B., Castaing-Debat, M., De Flaujac, P., M., Dorignac, G., 2003. Adaptation of salivary *Lactobacillus* strains to xylitol. *Archives of Oral Biology*.
- Başıyığıt, G., 2004. Bazı laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanılma özellikleri. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi (yayınlanmamış), 96s, Isparta.
- Bernimoulin, J., P., 2003. Recent concepts in plaque formation. *Journal of Clinical Periodontology*, 30, 7-9.
- Blum, S., Reniero, R., Schiffrin, E., J., Crittenden, R., Mattila-Sandholm, T., Ouwehand, A., C., Salminen, S., Von Wright, A., Saarela, M., Saxelin, M., Collins, K., Morelli, L., 1999. Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 405-410.
- Bogovic, M., Rogelj, I., 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Applied Microbial Biotechnology*, 49, 606-612.
- Bratthall, D., 1980. Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. *Odontol. Rev.*, 21, 143-152.

- Burger, H., J., Leon, M., T., D., 1994. Technique for isolating plasmids from exopolysaccharide producing *Lactobacillus* ssp. *Biotech. Tech.*, 8, 769-772.
- Carlén, A., Börjesson, A., C., Nikdel, K., Olsson, J., 1998. Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. *Caries Research*, 32, 447-455.
- Chassy, B., M., 1976. A gentle method for the lysis of oral streptococci. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 68,603-608.
- Chávez de Paz, L., E., Dahlén, G., Molander, A., Möller, A., Bergenholtz, G., 2003. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *International Endodontic Journal*, 36,500-508.
- Chikindas, M., L., Novák, J., Caufield, P., W., Schilling, K., Tagg, J., R., 1997. Microbially-produced peptides having potential application to the prevention of dental caries. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 9,95-105.
- Chung, J., Ha, E., S., Park, H., R., Kim, S., 2004. Isolation and characterisation of *Lactobacillus* species inhibiting the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Oral Microbiology Immunology*, 19,214-216.
- Collins, J., K., Thornton, G., Sullivan, G., O., 1998. Selection of Probiotic Strains for Human Applications. *International Dairy Journal*, 8, 487-490.
- Comelli, E., M., Guggenheim, B., Stingele, F., Neeser, J-R., 2002. Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health . *Eur .J. Oral Sci.*, 110, 218-224.
- Cowan, S.,T., Steel, K., J. (1966). Dorignac, G., Badet, M., C., Richard, B., 2001. An in vitro study of the pH lowering potential of salivary lactobacilli associated with dental caries. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 1015-1018.
- Çakır, İ., 1996. Et tavuklarının körbarsak florasında yer alan laktobasillerin proteolitik aktiviteleri ve organik asit oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi (yayınlanmamış), 58s, Ankara.
- Çakır, İ., 2003. *Lactobasillus* ve *Bifidobakter*lerde bazı probiyotik özelliklerin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi, Doktora Tezi (yayınlanmamış), 84s, Ankara.
- Çakır, İ., 2004. Kişisel Notlar.
- Çataoluk, O., 2003. The development of a modified method for isolating plasmids from exopolysaccharide producing *lactobacillus* species using conventional plasmid isolation methods. *Turk. J. Biol.*, 27, 125-129.
- de Man, J., C., Rogosa, M., Sharpe, M., E., 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Applied Bacteriology*, 23, 130-138.

- de Soet, J., J., Van Loveren, C., Lammens, A., J., Pavičić, M., J., A., M., P., Homburg, C., H., E., ten Cate, J., M., de Graaff, J., 1991. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, 25,116-122.
- Durlu-Özkaya, F., 2001. Salamura beyaz peynirden izole edilen bazı laktokok, enterokok ve laktobasil suşlarının proteolitik aktivite, bakteriyosin etkenliği ve biyojen amin oluşumu açısından karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi Doktora Tezi (yayınlanmamış), 134s, Ankara.
- Emilson, C., G., Bratthall, D., 1976. Growth of *Streptococcus mutans* on various selective media. *Journal of Clinical Microbiology*, 95-98.
- Erkkilä, S., Petäjä, E., 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, 55, 297-300.
- Filoche, S., K., Anderson, S.,A., Sissons, C., H., 2004. Biofilm growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology Immunology*, 19, 322-326.
- Forestier, C., de Champs, C., Vatoux, C., Joly, B., 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research Microbiology*, 152, 167-173 .
- Gedalia, I., Ionat-Bendat, D., Ben-Mosheh, S., 1991. Tooht enamel softening with cola type drink and rehardening with hard cheese or stimulated saliva in situ. *Journal of Oral Science*, 18, 501-506.
- Guan, Y., H., de Graaf, T., Lath, D., L., Humphreys, S., M., Marlow, I., Brook, A., H., 2001. Selection of oral microbial adhesion antagonists using biotinylated *Streptococcus sanguis* and a human mixed oral microflora. *Archives of Oral Biology*, 46, 129-138.
- Guan, Y., H., Lath, D., L., de Graaf, T., Lilley, T., H., Brook, A., H., 2003. Moderation of oral bacterial adhesion on saliva-coated hydroxyapatite by polyaspartate. *Jour. of App.Micr.*, 94, 456-461.
- Guan, Y., H., Lilley, T., H., Lath, D.,L., Marlow, I., Brook, A., H., 2003. Synergy of binary poly(oxypropylene-oxyethylene) copolymers in reducing retention of *Streptococcus sanguis* to hydroxyapatite. *Caries Research*, 37,71-78.
- Guggenheim, B., Schmid, R., Aeschlimann, J., M., Berrocal, R., 1999. Powdered milk micellar casein prevents oral colonization by *Streptococcus sobrinus* and dental caries in rats: A basis for the caries-protective effect of dairy products. *Caries Research*, 33, 446-454.

- Hammes, W., P., Vogel, R., F., 1995. The genus *Lactobacillus*. In: B. J. B. Wood and W. H. Holzapel (editors), *The Lactic Acid Bacteria, The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol.2. Blackie Academic, London, 19-54.
- Harrigan, W., F., McCance, M., E., 1966. *Laboratory Methods in Microbiology*. Academic press, London and New York, 362p.
- Hartemink, R., Domenech, V., R., Rombouts, F., M., 1997. LAMVAB-A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. 29,77-84.
- Hillman, J., D., 2002. Genetically modified *Streptococcus mutans* for the prevention of dental caries. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 361-366.
- Holt, J., G., Krieg, N., R., Sneath, P., H., A., Staley, J., T., Williams, S., T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, 787s.
- Kandler, O., Weiss, N., 1986. Regular, nonsporing Gram-positive rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 (Ed: P. H. A. Sneath). Pp. 1208-1234. Williams and Wilkins. Baltimore.
- Karahan, A., G., 1992. *Streptococcus diacetylactis*'ten yüksek düzeyde diasetil oluşturan mutantların eldesi ve bunların doğal suşa oranla faj duyarlılıklarının belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Bilimi ve Teknolojisi, Doktora Tezi (yayınlanmamış), 118s, Ankara.
- Karahan, A., G., Arıdoğan, B., Çakmakçı, M., L., 2002. *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu*, Isparta.
- Kleanhammer, T., R., McKay, L., L., Baldwin, K., A., 1978. Improved lysis of group N streptococci for isolation and rapid characterisation of plasmid deoxyribonucleic acid. *App. Environ. Microbiol.*, 35,592-600.
- Klein, N., Lortal, S., 1999. Attenuated starters: an efficient means to influence cheese ripening-a review. *International Dairy Journal*, 9, 751-762.
- Kolenbrander, P., E., London, J., 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *Journal of Bacteriology*, 3247-3252.
- Levesque, C., Lamothe, J., Frenette, M., 2003. Coaggregation of *Streptococcus salivarius* with periodontopathogens: evidence for involvement of fimbriae in the interaction with *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiological Immunology*, 18,333-337.
- Li, J., Helmerhorst, J., Leone, W., C., Troxler, R., F., Yaskell, T., Haffajee, A., D., Socransky, S., S., Oppenheim, F., G., 2004. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *Journal of Applied Microbiology*, 97,1311-1318.

- Loimaranta, V., Laine, M., Söderling, E., Vasara, E., Rokka, S., Marnila, P., Korhonen, H., Tossavainen, O., Tenovuo, J., 1999. Effects of bovine immune and non-immune whey preparations on the composition and pH response of human dental plaque. *Eur. J. Oral Sci.*, 107, 244-250.
- Loimaranta, V., Wei, H., Tenovuo, J., Rokka, S., Syvaöja, E-L., Korhonen, H., Joutsjoki, V., Marnila, P., 2002. Stability and activity of specific antibodies against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in bovine milk fermented with *Lactobacillus rhamnosus strain GG* or treated at ultra-high temperature. *Oral Microbiology and Immunology*, 17, 9-15.
- Lucas, V., S., Beighton, D., Roberts, G., J., 2000. Composition of the oral streptococcal flora in healthy children. *Journal of Dentistry*, 28,45-50.
- Manero, A., Blanch, R., A., 1999. Identification of *Enterococcus* spp. With a biochemical key. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No 10, 4425-4430.
- Nase, L., Hatakka, K., Savilahti, E., Saxelin, M., Pönkä, A., Poussa, T., Korpela, R., Meurman, J., H., 2001. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Research* , 35, 412-420.
- Nolte, W., A., 1990. Ağız Mikrobiyolojisi , 17-99, 99-175, 332-359.
- O'brien, J., Crittenden, R., Ouwehand, A., C., Salminen, S., 1999. Safety evaluation of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 418-424.
- O'Sullivan, D., J., Klaenhammer, T., R., 1993. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 2730-2733.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mattö, J., Mattila-Sandholm, T., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 197-215.
- Salminen, S., vonWright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., deVos, W., M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S., E., Mattila-Sandholm, T., 1998. Demonstration of safety of probiotics-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 93-106.
- Sambrook, J., Fritsch, E., F., Maniatis, t., 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Second Edition.
- Sandine, W., E., Elikler, P., R., Hays, H., 1962. Cultural studies on *Streptococcus diacetylactis* and other members of the lactic streptococcus group *Can. J. Microbiol.* 8, 2, 161-174.



- Schilling, K., M., Carson, R., G., Bosko, C., A., Golikeri, G., D., Bruinooge, A., Hoyberg, K., Waller, A., M., Hughes, N., P., 1994. A microassay for bacterial adherence to hydroxyapatite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 3, 31-38.
- Schillinger, U., Lücke, F., K., 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology*, 4, 199, 208.
- Schillinger ve Lücke, 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 1901-1906.
- Schüpbach, P., Neeser, J., R., Golliard, M., Rouvet, M., Guggenheim, B., 1996. Incorporation of caseinoglycomacropptide and caseinophosphopeptide into the salivary pellicle inhibits adherence of mutans streptococci. *Journal of Dentistry Research*, 75(10), 1779-1788.
- Silva, M., Jacobus, N., V., Deneke, C., Gorbach, S., L., 1987. Antimicrobial substance from a human lactobacillus strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1231-1233.
- Simonović, D., D., Kocić, B., Nedeljković, N., S., Gasić, J., Dacić, S., Jovanović, N., 2002. Microbiological status of different areas of tooth. *Medicine and Biology*, 9,3,236-239.
- Sookkhee, S., Chulasiri, M., Prachyabrued, W., 2001. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *The Society for Applied Microbiology*, 90, 172-179.
- Sönmez, N., Çakmakçı, M., L., Karahan, A., G., 1999. Probiyotik kullanımı ve ülke şartlarında geliştirilmesi. Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Müdürlüğü, Araştırma Projesi (yayınlanmamış), Ankara.
- Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P., B., Collins, J., k., Fitzgerald, G., Ross, R., P., 1998. Probiotic Cheese. *Int. Dairy Journal*, 8, 491-496.
- Steinberg, D., Hirschfeld, Z., Tayeb, I., Ben-Yosef, S., David, A., Friedman, M., 1999. The effect of parabens in a mouthwash and incorporated into a sustained release varnish on salivary bacteria. *Journal of Dentistry*, 27,101-106.
- Sullivan O., D., Kleanhammer, T., R., 1993. A rapid mini-prep isolation of high quality plasmid DNA from lactococcus and lactobacillus spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59,2730-2733.
- Sullivan, A., Nord, C., E., 2002. Probiotics in human infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 625-627.

- Tagg, J., R., Dierksen, K., P., 2003. Bacterial replacement therapy : adapting ‘germ warfare’ to infection prevention. *TRENDS in Biotechnology*, 21, 217-223.
- Tanzer, J., M., Börjesson, A., C., Laskowski, L., Kurasz, A., B., Testa, M., 1984. Glucose-sucrose-potassium-tellurite-bacitracin agar, an alternative to mitis-salivarius-bacitracin agar for enumeration of *Streptococcus mutans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 653-659.
- Thornton, G., M., 1996. Probiotik bacteria. Selection of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from healthy human gastrointestinal tract: characterization of novel *Lactobacillus* derived antibacterial protein. PhD thesis, National University of Ireland.
- Tucker, K., Adams, M., Shaw, L., Smith, A., J., 1998. Human enamel as a substrate for in vitro acid dissolution studies: influence of tooth surface and morphology. *Caries Research*, 32,135-140.
- Tunail, N., Köşker, Ö., 1986. Süt mikrobiyolojisi. A. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 966, Ankara.
- Twetman, S., Fritzon, B., Jensen, B., Hallberg, U., Stahl, B., 1999. Pre- and post-treatment levels of salivary mutans streptococci and lactobacilli in pre-school children. *International Journal of Pediatric Dentistry*, 9,93-98.

**ÖZGEÇMİŞ**

Adı Soyadı : Özlem ERTEN.....

Doğum Yeri : Ankara.....

Doğum Yılı : 1976.....

Medeni Hali : Evli.....

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise 1991 – 1994.. ..

Lisans 1994 – 1999.. ..

Yabancı Dil : İngilizce.....

**EKLER**

## EK 1 Örnek alınan hastalara uygulanan anket formu

Adı Soyadı :				
Cinsiyeti				
Yaşı:				
Öğrenim durumu:				
Mesleği:				
Son altı ay içinde herhangi bir tedavi gördü mü?				
Son üç ay içinde kullandığı ilaçlar (özellikle antibiyotikler)				
Dental Hikaye				
<ul style="list-style-type: none"> <li>En son ne zaman , ne için diş hekimine gitti?</li> <li>Diş fırçalama alışkanlığı var mı?</li> <li>Diş fırçalama sıklığı nedir?</li> <li>Diğer dental hijyen araçlarından herhangi birini kullanıyor mu?</li> </ul>				
<b>a.</b> Diş ipi <b>b.</b> Arayüz fırçası <b>c.</b> Köprüaltı ipi <b>d.</b> Ağız çalkalama solüsyonları <b>e.</b> Diğer				
<ul style="list-style-type: none"> <li>Xylitol içeren ürünleri kullanıyor mu?</li> <li>Kötü alışkanlıkları var mı?</li> </ul>				
<b>a.</b> Alkol <b>b.</b> Sigara <b>c.</b> Diğer				
Dental Muayene				
Et ve ürünleri	Tüketmiyor	Az Tüketiyor	Normal	Çok
Hamur işi ve tatlılar				
Meyve ve sebze				
İçme sütü				
Peynir				
Yoğurt				
Dondurma ve diğer süt ürünleri				
En son tüketilen süt ürünü ve miktarı:				
Adres ve Tel. no:				

EK 2. Örnek alınan bireylerin beslenme alışkanlıkları ve ağız sağlığını korumaya yönelik tercihleri

Örnek	Süt	Yoğurt	Peynir	Dond.	En Son Tüketilen Sütlü Gıdalar	Diş fırçalama sıklığı
1	N	N	N	A	1 hafta önce 1 kase yoğurt	15 günde bir
2	N	N	N	A	1 hafta önce 1 kase yoğurt	15 günde bir
3	A	N	N	-	Önceki gün 1 bardak süt	Günde iki kez
4	A	N	N	-	Önceki gün 1 bardak süt	Günde iki kez
5	-	A	-	N	3 gün önce 2 bardak süt	Günde iki kez
6	-	N	A	Ç	Önceki gün dondurma	Günde iki kez
7	A	A	N	Ç	Önceki gün dondurma	Günde iki kez
8	A	N	Ç	A	Önceki gün 1 kibrit kutusu kadar peynir	-
9	A	N	N	N	1 bardak ayran	Günde iki kez
10	Ç	Ç	N	Ç	Bir gece önce 1 bardak süt	Günde üç kez
11	-	-	A	N	-	İki günde bir
12	A	N	N	N	Önceki gün 1 kase yoğurt	3-4 günde bir
13	-	N	N	A	Önceki gün 1 kibrit kutusu kadar peynir	Günde iki kez
14	N	N	N	A	Önceki akşam 2 bardak süt	Düzensiz
15	A	A	N	N	Önceki gün yoğurt	Günde bir kez
16	A	A	A	-	3 gün önce 1 bardak süt	Günde iki kez
17	A	A	A	-	Sabah 1 kibrit kutusu kadar peynir	Günde iki kez
18	-	Ç	N	N	Sabah 1 kibrit kutusu kadar peynir	-
19	Ç	A	Ç	A	Sabah 1 su bardağı süt	İki günde bir

EK 3. Laktobasillerin izolasyon kaynakları, mikroskopik görünümleri ve koloni şekilleri

<b>Suş No</b>	<b>Koloni Şekli</b>	<b>Mikroskopta Görünüm</b>	<b>Besiyeri/ Örnek No</b>
1420	Küçük, beyaz, parlak, yuvarlak	Kısa, kalın yapıda basil zincirleri	MRSA / 14
1421	Büyük, beyaz, yuvarlak	Kısa basil	MRSA / 14
1422	Büyük, beyaz, yuvarlak	Kısa, kalın yapıda basil	MRSA / 14
1423	Büyük, beyaz, yuvarlak	Kısa basil	MRSA / 14
1424	Büyük, beyaz, yuvarlak	Zincir şekilli kısa basil	MRSA /14
1425	Küçük, beyaz, parlak, yuvarlak	Kısa basil	MRSA / 14
1426	Küçük, beyaz, parlak, yuvarlak	Kısa basil	MRSA / 14
1427	Küçük, beyaz, parlak, yuvarlak	Kısa basil	MRSA / 14
1428	Büyük, beyaz, parlak, yuvarlak	Kısa basil	MRSA / 14
1429	Büyük, beyaz, parlak, yuvarlak	Kısa basil	MRSA / 14
1430	Küçük, açık renkli, yuvarlak	Kısa, kalın basil	MRSA / 14
1431	Küçük, açık renkli, yuvarlak	Kısa basil	MRSA / 14
1432	Küçük, açık renkli, yuvarlak	Kısa, kalın yapıda basil zincirleri	MRSA / 14
1433	Büyük, beyaz, yuvarlak	Diploid yapıda basil zincirleri	MRSA / 14
1435	Büyük, beyaz, yuvarlak	Diploid yapıda basil zincirleri	MRSA / 14
1441	Küçük, beyaz, parlak, yuvarlak	Karışık zincir şeklinde, kısa basil	MRSA / 14
1442	Büyük, beyaz, yuvarlak	Kısa basil	MRSA / 14
1443	Büyük, beyaz, yuvarlak	Kısa basil	MRSA /14
1444	Büyük, beyaz, yuvarlak	Kısa basil	MRSA / 14
1445	Büyük, beyaz, yuvarlak	Kısa basil	MRSA / 14
1446	Büyük, beyaz, yuvarlak	Kısa basil	MRSA /14
1447	Büyük, beyaz, yuvarlak	Kısa basil	MRSA /
1448	Büyük, beyaz, yuvarlak	Çok kısa, kalın basil ve uzun, düz yapılar	MRSA / 14

<b>Suş No</b>	<b>Koloni Şekli</b>	<b>Mikroskopta Görünüm</b>	<b>Besiyeri/ Örnek No</b>
1449	Büyük, beyaz, yuvarlak	Çok kısa basil ve uzun yapılar	MRSA / 14
1450	Büyük, beyaz, yuvarlak	Kısa kalın basil ve uzun, düz yapılar	MRSA / 14
1451	Büyük, beyaz, yuvarlak	Kısa basil	MRSA / 14
1454	Büyük, beyaz, parlak, yuvarlak	Zincir şekilli kısa basil	SA / 14
1943	Açık renk, yuvarlak	Uzun, ince zincir şeklinde basil	MRSA / 19
1944	Beyaz, opak, yuvarlak	Uzun yapıda basil zincirleri	MRSA / 19
1945	Beyaz, opak, yuvarlak, büyük	Çok kısa basil	MRSA / 19
1946	Açık renk, yuvarlak, küçük, mat	Kısa, kalın yapıda basil	MRSA / 19
1947	Beyaz, opak, yuvarlak, büyük	Kısa basil ve aralarda uzun, düz yapılar	MRSA / 19
1948	Beyaz, opak, yuvarlak	Uzun yapıda basil zincirleri	MRSA / 19
1949	Beyaz, opak, yuvarlak	Çok kısa basil	MRSA / 19
1950	Açık renk, yuvarlak, küçük, beyaz	Zincir şekilli kısa basil	MRSA / 19
1952	Açık renk, yuvarlak, küçük	Kısa basil	MRSA / 19
1954	Açık renk, yuvarlak, küçük	Kısa basil ve aralarda uzun düz yapılar	MRSA / 19
1955	Beyaz, mat, yuvarlak, büyük	Kısa basil	MRSA / 19
1957	Beyaz, mat, yuvarlak, büyük	Kısa basil ve aralarda uzun, düz yapılar	MRSA / 19
1958	Beyaz, mat, yuvarlak, büyük	Çok kısa ve kalın yapıda basil	MRSA / 19
1959	Beyaz, mat, yuvarlak, küçük	Çok kısa basil ve uzun, düz yapılar	MRSA / 19
1960	Beyaz, mat, yuvarlak, büyük	Kısa basil	MRSA / 19
1961	Beyaz, mat, yuvarlak, küçük	Kısa basil ve aralarda uzun düz yapılar	MRSA / 19
1963	Beyaz, mat, yuvarlak, küçük	Diploid yapıda basil zincirleri	MRSA / 19
1965	Beyaz, mat, yuvarlak, büyük	Kısa basil	MRSA / 19
1966	Beyaz, mat, yuvarlak, küçük	Kısa basil	MRSA / 19
1967	Beyaz, mat, yuvarlak, büyük	Çok kısa basil ve uzun, düz yapılar	MRSA / 19



<b>Suş No</b>	<b>Koloni Şekli</b>	<b>Mikroskopta Görünüm</b>	<b>Besiyeri/ rnek No</b>
1970	Beyaz, mat, yuvarlak, büyük	Diploid yapıda basil zincirleri	MRSA / 19

Ek 4. Süt ve süt ürünleri tüketimine göre izolat sayıları

Örnek No	Çürük	Plak	Sağlıklı	Laktobasil	Diğer m.o.	Süt ve Ürünleri Tüketimi
1	+			1	9	1 hafta önce 1 kase yoğurt
2		+		-	1	1 hafta önce 1 kase yoğurt
3	+			3	7	Önceki gün 1 bardak süt
4		+		-	2	Önceki gün 1 bardak süt
5			+	-	1	3 gün önce 2 bardak süt
7			+	-	3	Önceki gün dondurma
8			+	1	2	Önceki gün 1 kibrit kutusu kadar peynir
9			+	1		1 bardak ayran
10			+	-	1	Bir gece önce 1 bardak süt
11	+			-	13	-
14	+			40	8	Önceki akşam 2 bardak süt
18			+	-	1	Sabah 1 kibrit kutusu kadar peynir
19	+			28	31	Sabah 1 su bardağı süt

## EK 5. Laktobasillere ait biyokimyasal tanı testi sonuçları

Suş No	Katalaz	Gram	15°C'de gelişim	45°C'de gelişim	Glikozdan gaz oluşturma	%6.5 NaCl'de gelişim	Arjininden amonyak oluşturma
1420	-	+	+	+	-	+	-
1421	-	+	*	+	+	+	+
1422	-	+	*	+	+	+	+
1423	-	+	*	+	+	+	+
1424	-	+	+	+	-	+	-
1425	-	+	+	+	-	+	+
1426	-	+	+	+	+	+	+
1427	-	+	+	+	-	+	+
1428	-	+	+	+	+	+	+
1429	-	+	*	+	+	+	+
1430	-	+	-	+	+	+	+
1431	-	+	*	+	+	+	+
1432	-	+	+	+	-	+	+
1433	-	+	+	+	-	+	-
1435	-	+	+	+	+	+	-
1441	-	+	*	+	-	+	-
1442	-	+	+	+	+	+	+
1443	-	+	*	+	+	+	+
1444	-	+	-	+	+	+	-
1445	-	+	+	+	+	+	+
1446	-	+	*	+	+	+	+
1447	-	+	*	+	+	+	+
1448	-	+	*	+	+	+	+
1449	-	+	+	+	+	+	+
1450	-	+	*	+	+	+	+
1451	-	+	*	+	+	+	-
1454	-	+	+	+	-	+	-
1943	-	+	az +	+	-	az +	+

Suş No	Katalaz	Gram	15°C'de gelişim	45°C'de gelişim	Glikozdan gaz oluşturma	%6.5 NaCl'de gelişim	Arjininden amonyak oluşturma
1944	-	+	+	+	-	+	+
1945	-	+	-	+	+	+	+
1946	-	+	-	+	+	+	+
1947	-	+	*	+	+	+	+
1948	-	+	+	+	-	+	+
1949	-	+	+	+	+	+	-
1950	-	+	+	+	-	+	+
1952	-	+	-	+	+	+	-
1954	-	+	+	+	+	+	-
1955	-	+	+	+	-	+	-
1957	-	+	*	+	+	+	+
1958	-	+	-	+	-	+	+
1959	-	+	+	+	+	+	+
1960	-	+	+	+	+	+	+
1961	-	+	-	+	+	+	+
1963	-	+	+	*	+	+	+
1965	-	+	-	+	-	+	+
1966	-	+	+	+	+	+	+
1967	-	+	+	+	+	+	+
1970	-	+	-	+	-	+	-

## EK 6. Laktobasillere ait karbonhidrat fermantasyon testleri sonuçları

Laktobasil adı	L	T	M	R	S	G	Ma	K	Mal	F
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1420	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1421	+	-	*	+	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1422	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1423	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1424	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus</i> .1425	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1426	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1427	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1428	+	-	*	+	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1429	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1430	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1431	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1432	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1433	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1435	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1441	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1442	+	*	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1443	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1444	+	-	*	-	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1445	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1446	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1447	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1448	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1449	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1450	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1451	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1454	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp. 1943	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1944	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp. 1945	-	+	-	+	+	-	-	+	+	
<i>Lactobacillus</i> sp. 1946	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp. 1947	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp. 1948	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>Lactobacillus</i> sp. 1949	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1950	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1952	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1954	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1955	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1957	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+

<i>Lactobacillus</i> sp.1958	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1959	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1960	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1961	+	+	*	-	+	+	-	-	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1963	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.1965	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1966	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1967	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1970	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+

L: Laktoz, T: Trehaloz, M: Mannoz, R: Rafinoz, S: Sakaroz, G: Galaktoz,  
Ma: Mannitol, K: Ksiloz, Mal: Maltoz, F: Fruktoz

EK 7. Kok ve mayaların izolasyon kaynakları, mikroskopik görünümleri ve koloni şekilleri

<b>Suş No</b>	<b>Koloni Şekli</b>	<b>Mikroskopta Görünüm</b>	<b>Besiyeri/ Örnek No</b>
207	Büyük, yuvarlak, mukoid, beyaz	Zincir şekilli iri kok	M17Agar / 2
210	Pamuksu, beyaz, iri, yuvarlak, mukoid	Maya	M17Agar / 2
211	Büyük, yuvarlak, mukoid, beyaz	Diploid, iri kok	M17Agar / 2
605	Sarı, büyük, parlak, yapışkan, kubbe	Zincir şekilli üzüm görünümünde kok	SA / 6
1401	Beyaz, yuvarlak, yassı, parlak	İri kok kümeleri	SA / 14
1402	Küçük, beyaz, yuvarlak, düzenli	Üzüm şekilli kok zincirleri	M17Agar/14
1406	Küçük, beyaz, yuvarlak, düzenli	İri kok	MSA / 14
1407	Parlak, beyaz, iri, yuvarlak, mukoid	Maya	M17Agar/14
1410	Pamuksu, beyaz, yuvarlak	Maya	M17Agar/14
1415	Yuvarlak, ortası koyu, kenarları açık renk	Zincir görünümünde kok	SA / 14
1416	Sarı, şekilsiz, yaygın	Zincir şekilli kok	SA / 14
1904	Küçük, beyaz, yuvarlak, düzenli	Uçları uzunyapıda kok zincirleri	MSBA / 19
1918	Küçük, beyaz, yuvarlak, düzenli	Üzüm şekilli kok zincirleri	M17Agar/19
1922	Küçük, beyaz, yuvarlak, düzenli	Uzun yapıda diploid basil ?	M17Agar/19
1923	Beyaz, yuvarlak, küçük	Zincir şekilli kok	M17Agar/19
1925	Küçük ve mat	Üzüm şekilli kok zincirleri	M17Agar/19
1929	Küçük, beyaz, yuvarlak, düzenli	Üzüm şekilli kok zincirleri	MSBA / 19
1933	Küçük, beyaz, yuvarlak, düzenli	Uçları uzun yapıda kok zincirleri	MSA / 19
1936	Küçük, beyaz, yuvarlak	Tetrakok	MSA / 19
1969	Büyük, beyaz, mat	Uzunca yapılı kok	MRSA / 19

## EK 8. Streptokok ve enterokoklara ait biyokimyasal tanı testi sonuçları

Suş No	Katalaz	Gram	10oC'de gelişim	45oC'de gelişim	4% NaCl	%6.5 NaCl	Arjininden amonyak oluşturma	pH 9.6'da gelişim
207	-	+	+	+	+	+	-	+
211	-	+	+	+	+	+	-	-
605	-	+	+	+	+	+	-	+
1401	-	+	+	+	+	+	-	-
1402	-	+	+	+	+	+	-	+
1406	-	+	+	+	+	-	-	-
1415	-	+	+	+	+	+	-	+
1416	-	+	+	+	+	+	-	+
1904	-	+	-	+	-	-	-	-
1918	-	+	+	+	+	+	-	-
1922	-	+	+	+	+	+	-	-
1923	-	+	+	+	+	+	-	+
1925	-	+	-	-	-	-	-	-
1929	-	+	-	+	-	-	-	-
1933	-	+	-	+	-	-	-	-
1936	-	+	+	+	+	+	-	+
1969	-	+	+	+	+	+	-	+



## EK 9. Streptokok ve enterokoklara ait karbonhidrat fermantasyon testleri sonuçları

Suş No	Maltoz	Sakkaroz	Rafinoz	Laktoz	Trehaloz
<i>S.avium, S.gallinarum</i> 207	*	*	+	+	+
<i>S.avium, S.gallinarum</i> 211	+	-	-	+	+
<i>S.avium, S.gallinarum</i> 605	+	-	-	+	+
<i>S.avium, S.gallinarum</i> 1401	+	-	-	+	+
<i>S.avium, S.gallinarum</i> 1402	+	-	-	+	+
<i>S.avium, S.gallinarum</i> 1406	+	-	-	+	+
<i>S.avium, S.gallinarum</i> 1415	+	-	-	+	+
<i>S.avium, S.gallinarum</i> 1416	+	-	-	+	+
<i>S.mutans</i> 1904	+	+	+	+	+
<i>S.avium, S.gallinarum</i> 1918	+	+	*	+	+
<i>S.avium, S.gallinarum</i> 1922	+	+	*	+	+
<i>S.avium, S.gallinarum</i> 1923	+	-	-	+	+
<i>S.mutans</i> 1925	+	+	+	+	+
<i>S.mutans</i> 1929	+	+	+	+	+
<i>S.mutans</i> 1933	+	+	+	+	+
<i>S.avium, S.gallinarum</i> 1936	*	*	*	+	+
<i>S.avium, S.gallinarum</i> 1969	+	-	*	+	+

EK 10. Laktobasillerin streptokoklara karşı oluşturdukları zonların çapı (mm)

<b>Bakteri Adı</b>	<b><i>S.mutans</i> 1904</b>	<b><i>S.mutans</i> 1925</b>	<b><i>S.mutans</i> 1929</b>	<b><i>S.mutans</i> 1933</b>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1420	-	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1421	16	14	-	14
<i>Lactobacillus</i> sp.1422	11	13	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1423	18	12	-	16
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1424	15	16	-	17
<i>Lactobacillus</i> .1425	13	17	-	15
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1426	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp.1427	13	16	-	11
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1428	12	13	-	14
<i>Lactobacillus</i> sp.1429	13	15	-	13
<i>Lactobacillus</i> sp.1430	16	-	18	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1431	17	12	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp.1432	16	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1433	14	16	-	18
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1435	15	13	-	17
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1441	-	14	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp.1442	11	14	15	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1443	16	19	-	11
<i>Lactobacillus</i> sp.1444	-	11	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp.1445	12	13	-	13
<i>Lactobacillus</i> sp.1446	14	12	-	16
<i>Lactobacillus</i> sp.1447	17	13	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp.1448	14	12	15	-
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1449	12	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp.1450	12	16	-	15
<i>Lactobacillus</i> sp.1451	12	11	-	17
<i>Lactobacillus</i> sp.1454	<b>19</b>	<b>14</b>	<b>11</b>	<b>15</b>
<i>Lactobacillus</i> sp. 1943	13	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp.1944	15	13	-	17
<i>Lactobacillus</i> sp. 1945	10	12	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp. 1946	10	14	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp. 1947	12	12	-	17
<i>Lactobacillus</i> sp. 1948	19	16	-	17
<i>Lactobacillus</i> sp. 1949	15	11.	-	13
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1950	<b>19</b>	<b>17</b>	<b>12</b>	<b>17</b>
<i>Lactobacillus</i> sp.1952	<b>19.5</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>13</b>
<i>Lactobacillus</i> sp.1954	12	13	-	16

<b>Bakteri Adı</b>	<b><i>S.mutans</i> 1904</b>	<b><i>S.mutans</i> 1925</b>	<b><i>S.mutans</i> 1929</b>	<b><i>S.mutans</i> 1933</b>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1955	18	13	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp.1957	13	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp.1958	13	13	-	10
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1959	16	-	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1960	15	18	-	13
<i>Lactobacillus</i> sp.1961	15	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1963	12	11	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp.1965	-	12	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1966	14	11	11	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1967	-	12	-	-
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1970	<b>18</b>	<b>16</b>	<b>10</b>	<b>18</b>

EK 11 Laktobasillerin ve streptokokların adezyon özelliklerinin kıyaslanması amacıyla laktobasil suşları kullanılarak gerçekleştirilen denemelere ait sonuçlar

<b>Laktobasil adı</b>	<b>Absorbans</b>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> 1420	1.685
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1421	1.695
<i>Lactobacillus</i> sp.1422	1.685
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1423	1.716
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> 1424	1.682
<i>Lactobacillus</i> .1425	1.684
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1426	1.708
<i>Lactobacillus</i> sp.1427	1.703
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1428	1.671
<i>Lactobacillus</i> sp.1429	1.679
<i>Lactobacillus</i> sp.1430	1.679
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1431	1.642
<i>Lactobacillus</i> sp.1432	1.692
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> 1433	0.841
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> 1435	1.679
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> 1441	1.676
<i>Lactobacillus</i> sp.1442	1.714
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1443	1.699
<i>Lactobacillus</i> sp.1444	1.598
<i>Lactobacillus</i> sp.1445	0.936
<i>Lactobacillus</i> sp.1446	1.699
<i>Lactobacillus</i> sp.1447	1.679
<i>Lactobacillus</i> sp.1448	1.685
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1449	1.700
<i>Lactobacillus</i> sp.1450	1.679
<i>Lactobacillus</i> sp.1451	1.679
<i>Lactobacillus</i> sp.1454	1.690
<i>Lactobacillus</i> sp. 1943	1.601
<i>Lactobacillus</i> sp.1944	1.523
<i>Lactobacillus</i> sp. 1945	1.713
<i>Lactobacillus</i> sp. 1946	1.683
<i>Lactobacillus</i> sp. 1947	1.721
<i>Lactobacillus</i> sp. 1948	1.505

<b>Laktobasil adi</b>	<b>Absorbans</b>
<i>Lactobacillus</i> sp. 1949	1.616
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1950	0.939
<i>Lactobacillus</i> sp.1952	1.670
<i>Lactobacillus</i> sp.1954	1.101
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1955	1.725
<i>Lactobacillus</i> sp.1957	1.570
<i>Lactobacillus</i> sp.1958	1.671
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1959	1.679
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1960	1.711
<i>Lactobacillus</i> sp.1961	1.707
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1963	1.700
<i>Lactobacillus</i> sp.1965	1.664
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1966	1.625
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1967	1.687
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1970	1.641
Kontrol	1.339