

**BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
EKZOPOLİSAKKARİT (EPS) ÜRETİMİ İLE ANTİBİYOTİK
DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sema AHİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EKİM 2011
ANKARA**

Sema AHİ tarafından hazırlanan, “BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ İLE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih: 20/10/2011

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Sema AHİ

**BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN EKZOPOLİSAKKARİT (EPS)
ÜRETİMİ İLE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)**

Sema AHİ

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
EKİM 2011**

ÖZET

Bu çalışmada, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Leuconostoc* cinslerine ait bazı suşlar kullanılmıştır. Kültürlerden *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 , *L. helveticus* ATCC 15807, *L. bulgaricus* ATCC 11842, *L. bulgaricus* G11, *L. plantarum* DSM 20246, *L. plantarum* (RSKK No:02030), *L. fermentum* ATCC 23271, *L. ruminis* ATCC 25644 ve *L. gasseri* ATCC 19992; *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 14425 ve *S. thermophilus* (RSKK No: 667/01017); *Lactococcus* subsp. *cremoris*; *Enterococcus faecium* DSMZ 20442, *E. faecium* RT 55, *E. faecium* RT 82, *E. faecalis* NCDO 581, *E. faecalis* RT 8 ve *E. faecalis* RT 121; *Pediococcus acidilactici* pedL ve *P. pentosaceus* CHR HANSEN; *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (RSKK No: 06043-DSM 20346) ve *L. mesenteroides* (RSKK No: 1061) türleri kullanılmıştır.

Hücre gelişimleri, laktik asit miktarları ve son pH değerleri tespit edilmiştir. Suşların EPS üretimleri 46,42 mg/l ile 208,88 mg/l arasında bulunmuştur. En yüksek (208,88 mg/l) EPS üretimi *Enterococcus faecalis* RT8 suşunda tespit edilirken, en düşük (46,42 mg/l) EPS miktarı *Enterococcus faecalis* NCDO 581 kültüründe belirlenmiştir. Suşların hücre gelişimleri kültürlerin EPS üretimlerini etkilememiştir. Suşların

otoagregasyon değerleri % 5-35 ile arasında belirlenirken, *Escherichia coli* ATCC 11230 ile koagregasyonları % 4-31 arasında tesbit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan tüm suşların nalidiksik asid, polimiksin B ve kanamisin dışında tüm antibiyotiklere %9 ile % 95 oranında yüksek duyarlılık gosterdikleri tespit edilmiştir.

Bilim Kodu : 203.1.023

Anahtar Kelimeler : Laktik asit bakteri, Probiyotik, Asit üretimi,
Antibiyotik dirençliliği, EPS üretimi, Agregasyon.

Sayfa Adedi : 85

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

**EXOPOLYSACCHARIDE (EPS) PRODUCTION OF SOME LACTIC ACID
BACTERIA WITH INVESTIGATION ANTIBIOTIC RESISTANCE**

(M.Sc. Thesis)

Sema AHi

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
OCTOBER 2011**

ABSTRACT

In this study, some strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, and *Leuconostoc* genus were used in this study. Cultures of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *L. helveticus* ATCC 15807, *L. bulgaricus* ATCC 11842, *L. bulgaricus* G11, *L. plantarum* DSM 20246, *L. plantarum* (RSKK No: 02030), *L. fermentum* ATCC 23271, *L. ruminis* ATCC 25644 and *L. gasseri* ATCC 19992; *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 1442 and *S. thermophilus* (RSKK No. 667/01017), *Lactococcus* subsp. *Cremoris*; *Enterococcus faecium* DSM 20442, *E. faecium* RT 55, *E. faecium* RT 82, *E. faecalis* NCDO 581, *E. faecalis* RT 8 and *E. faecalis* RT 121, *Pediococcus acidilactici* pedL and *P. pentosaceus* CHR HANSEN, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (RSKK No.: 06043-DSM 20346) and *L. mesenteroides* (RSKK No: 1061) types have been used.

The cell growths, amount of lactic acid and final pH values of the cultures were estimated. EPS production by the strains were found between 46,42 - 208,88 mg/l. The highest (208,88 mg/l) EPS production were detected in the culture of *Enterococcus faecalis* RT8 and the lowest amount (46,42 mg/l) of EPS were estimated in the *Enterococcus faecalis* NCDO 581 culture . The cell growths of the strains were not affected of

EPS production by the cultures. The autoaggregation values of the strains were determined between % 5-35 and the coaggregation of the strains with *E.coli* has been found between % 4-31.

All strains used in this study, have been found to have high sensitivity from %9 to %95 to all antibiotics except nalidixic acid, polymyxin B and kanamycin.

Science Code : 203.1.023

**Key Words : Lactic acid bacteria, Probiotic, Acid production,
Antibiotic resistance, EPS production, Aggregation,**

Page Number : 85

Adviser : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

TEŞEKKÜR

2008-2011 yılları arasında Gazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü'nde Prof. Dr. Yavuz BEYATLI danışmanlığında yürütülen bu çalışma, yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Tez çalışmamın başından sonuna kadar ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarım boyunca değerli katkılarıyla ve bilgileriyle beni yönlendiren Sayın Hocam Prof. Dr. Yavuz BEYATLI'ya, tez çalışmamda tecrübe ve yardımlarından faydalandığım Sayın Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ'a, deneysel çalışmalarım sürecinde yardımlarından faydalandığım Yrd. Doç. Derya ÖNAL DARILMAZA'a, tüm Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına, maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan annem Serap AHİ, babam Erdoğan AHİ ve kardeşim Seda AHİ' ye teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Probiyotikler.....	3
2.1.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.....	4
2.1.2. Probiyotik mikroorganizma seçim kriterleri.....	5
2.1.3. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkisi ve etki mekanizmaları.....	7
2.2. Laktik Asit Bakterileri.....	12
2.2.1. Genel özellikleri.....	12
2.2.2. <i>Lactobacillus</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri	13
2.2.3. <i>Enterococcus</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri	15
2.2.4. <i>Leuconostoc</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri.....	17
2.2.5. <i>Pediococcus</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri.....	18
2.2.6. <i>Streptococcus</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri	18

Sayfa

2.3. Bakteriyel Ekzopolisakkaritler (EPS) ve Probiyotik Önemleri	19
2.3.1. Laktik asit bakterilerinin ürettikleri EPS ve özellikleri.....	20
2.4. Agregasyon.....	23
2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri.....	24
2.5.1. Laktik asit üretimi	24
2.6. Antibiyotikler.....	25
2.6.1. Antibiyotik dirençliliğinin probiyotik önemi	26
2.6.2. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlilikleri üzerine yapılan çalışmalar.....	27
3. MATERYAL VE METOT	30
3.1. Materyaller	30
3.1.1. Materyal örnekleri.....	30
3.1.2. Besiyerleri	31
3.1.3. Bakterilerin muhafazası.....	33
3.1.4. Test bakterisi.....	33
3.2. Metotlar	33
3.2.1. Laktik asit bakterilerinin aktiveştirilmesi.....	33
3.2.2. Laktik asit bakterilerinin hücre gelişiminin ve canlı hücre sayısının belirlenmesi.....	34
3.2.3. Laktik asit bakterilerinin nicel asit üretimlerinin belirlenmesi	34
3.2.4. Laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit (EPS) üretimlerinin belirlenmesi... ..	35
3.2.5. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılıklarının tespiti	36
3.2.6. Laktik asit bakterilerinin agregasyon özelliklerinin tespiti	36

	Sayfa
4. DENEYSEL BULGULAR.....	38
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Hücre Gelişimi Belirlenmesi	38
4.2. Laktik Asit Bakterilerinin asit üretim yeteneği ve son kültür pH değerlerinin belirlenmesi	41
4.3. Laktik Asit Bakterilerinin EPS üretiminin tespiti	46
4.4. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Duyarlılıklarının belirlenmesi	51
4.5. Laktik Asit Bakterilerinin Agregasyonu	64
4.5.1. Laktik asit bakterilerinin otoagregasyonu	64
4.5.2. Laktik asit bakterilerinin koagregasyonu	65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	66
KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Probiyotik mikroorganizmaların seçim kriterleri	7
Şekil 2.2. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 'un ürettiği EPS' nin moleküler yapısı	21
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin hücre gelişimleri	40
Şekil 4.2. Çalışmada kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin ürettikleri yüzde asit miktarları	43
Şekil 4.3. Çalışmada kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin son kültür pH değerleri ve ürettikleri yüzde asit miktarlarının karşılaştırılması....	45
Şekil 4.4. Çalışmada kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin ürettikleri EPS miktarları	48
Şekil 4.5. Çalışmada kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin hücre gelişimleri ile ürettikleri EPS'lerin grafiği.....	50
Şekil 4.6. Bazı laktik asit bakterilerinin antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları	59

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar	4
Çizelge 2.2. Probiyotiklerin sağlık bakımından önemleri	11
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan suşların temin edildikleri kaynaklar, besiyerleri, inkübasyon dereceleri ve süreleri.....	30
Çizelge 3.2. MRS besiyeri.....	31
Çizelge 3.3. Nutrient sıvı besiyeri.....	32
Çizelge 3.4. Ellikler sıvı besiyeri.....	32
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan suşların son kültür pH değer dağılımları .	41
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin ürettikleri yüzde asit miktarları	42
Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin hücre gelişimleri ile ürettikleri EPS'lerin değerleri	49
Çizelge 4.4. CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi	55
Çizelge 4.5. Bazı laktik asit bakterilerinin antibiyotik disklerine gösterdiği duyarlılık test sonuçları.....	56
Çizelge 4.6. Bazı laktik asit bakterilerinin antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları.....	58
Çizelge 4.7. En yüksek miktarda EPS üreten <i>Enterococcus fecalis</i> RT 8 suşunun antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları.....	61
Çizelge 4.8. Orta derecede EPS üreten <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246 kültürünün antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları	62
Çizelge 4.9. En az miktarda EPS üreten <i>Enterococcus fecalis</i> NCDO 581 suşunun antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları.....	63

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.10. Bazı laktik asit bakterilerinin otoagregasyonları	64
Çizelge 4.11. Bazı laktik asit bakterilerinin <i>E. coli</i> ATCC 11230 ile koagregasyonları.....	65

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ' a ait SEM görüntüsü	14
Resim 2.2. <i>Enterococcus faecalis</i> bakterisinin SEM görüntüsü	16
Resim 2.3. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 'in elektron mikroskop görüntüsü.....	17
Resim2.4. <i>Pediococcus pentasaceus</i> 'un SEM görüntüsü.....	18
Resim 2.5. <i>Streptococcus thermophilus</i> 'un SEM görüntüsü	19
Resim 4.1. <i>Enterococcus faecalis</i> RT8 suşunun nalidiksik asid, polimiksin B ve siprofloksasin antibiyotik disklerine gösterdiği direnç.....	52
Resim 4.2. <i>Enterococcus faecalis</i> RT8 suşunun vankomisin antibiyotik diskine karşı gösterdiği direnç; kloramfenikol antibiyotik diskine karşı duyarlılığı ve oluşturduğu zon	52
Resim 4.3. <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ATCC 14425 kültürünün polimiksin B antibiyotik diskine gösterdiği direnç ve trimetoprim antibiyotik diskine karşı oluşturduğu duyarlılık zonu	53
Resim 4.4. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 kültürünün streptomisin antibiyotik diskine karşı gösterdiği dirençlilik ve gentamisin antibiyotik diskine karşı oluşturduğu zon	53
Resim 4.5. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> (RSKK 06043 – DSM 20346) suşunun kanamisin ve trimetoprim antibiyotik disklerine karşı gösterdiği dirençlilik; penisilin G antibiyotik diskine karşı oluşturduğu zon.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
A	Alfa
B	Beta
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
g	Gram
g/l	Gram/Litre
M	Molar
Mm	Milimolar
mg/ml	Miligram/Mililitre
ml	Mililitre
nm	Nanometre
pH	Asitlik bazlık birimi
rpm	Dakikada devir sayısı
spp	Species (Türleri)
subsp	Subspecies (Alt tür)
U	Unit (Birim)
µg/ml	Mikrogram/Mililitre
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
%	Yüzde

Kısaltmalar**Açıklama**

ATTC	American Type Culture Collection
Cfu	Colony Forming Units
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Dk	Dakika
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
Eş	Eşitlik
HCl	Hidrojen klorür
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kob	Koloni oluşturan birim
Log	Logaritma
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NH₃	Amonyak
OD	Optikal dansite
RSKK	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Kültür Koleksiyonu
Sn	Saniye
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

1. GİRİŞ

İntestinal ekosistemin fizyolojik dengesi hastalık, yaşlılık, stres, antibiyotik veya ilaç kullanımı, diyet alışkanlıklarının değiştirilmesi, iklim koşullarında meydana gelen değişimler ve çevresel toksik maddeler gibi faktörlerden doğrudan veya dolaylı olarak etkilenebilmektedir. Bağırsak sisteminin dengesinde meydana gelen bu düzensizlikler sonucu bağırsak mikroflorasının dengesi bozulur ve faydalı mikroorganizma sayısında azalmalar başlar [1]. İntestinal sistemin dengesinde meydana gelen bu dengesizlikler 'disbiosis' olarak adlandırılmaktadır. Disbiosisin tersi bir durum olarak, intestinal sistemde bulunan faydalı mikroorganizmaların sistemin fizyolojik dengesine olumlu yönde katkıda bulunmasına 'probiosis', bu mikroorganizmalara da 'probiyotik mikroorganizmalar' denilmektedir [2]. Probiyotik adı verilen bu mikroorganizmalar ürettikleri maddeler yardımıyla gıdaların sindirimine, vitamin üretimine ve zararlı mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların önlenmesine yardımcı olarak doğal floranın dengesini korur. Bu özelliklerinden dolayı son yıllarda faydalı bakteriler, yoğurt ve peynir gibi fermente süt ürünlerine ilave edilerek, probiyotik ürün olarak piyasaya sunulmaktadır [3].

Laktik asit bakterileri çoğunlukla bağırsakta mikroorganizma dengesizliklerinin düzenlenmesinde kullanılmıştır. Bağırsak yüzeyine bu bakterilerin yapışması yararlı sağlık etkilerinden dolayı önemli olarak düşünülmüştür. Bakterilerin bağırsaktaki epitel yüzeylere yapışması; kolonizasyon, immün sistemin aktive edilmesi ve patojenlere karşı antogonistik aktivitenin ön şartı olarak dikkate alınmıştır. Bu nedenle de yapışma probiyotik seçiminin asıl kriteridir. Laktik asit bakterilerinin bağırsak epiteline yapışmasında ürettikleri ekzopolisakkaritlerin rolü vardır. EPS'nin bakteriyi koruma özelliği ayrıca antibiyotiklere karşı fiziksel bir koruyuculuk şeklinde de ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmada, bazı laktik asit bakterilerinin ürettikleri ekzopolisakkaritler ile bu mikroorganizmaların antibiyotiklere dirençlilikleri arasındaki ilişkinin saptanması hedeflenmiştir. Ayrıca ilgili bakterilerin diğer bazı probiyotik özelliklerinin (hücre gelişimleri, son kültür pH'ları, yüzde asit miktarlar, agregasyon yetenekleri) incelenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Probiyotikler

Probiyotik kelimesi; Yunanca kökenli olup “yaşam için” anlamına gelmektedir. Probiyotik terimi ilk defa 1965 yılında Lilly ve Stillwell tarafından diğer mikroorganizmaların gelişimini destekleyen maddeleri tanımlamak için kullanılmıştır. Tarihten günümüze kadar birçok anlamda açıklanan bu terim son olarak 1999’da Kneifel tarafından; vücuda alındığında konakçının gastrointestinal mikroflorasına olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmışlardır [4]. Probiyotiklerin en çok kabul gören tanımları Roy Fuller (1989) tarafından ‘tüketici sağlığına, bireylerin bağırsak mikrobiyal dengesini koruyarak veya geliştirerek yararlı olan canlı mikrobiyal gıda katkılarıdır’ şeklinde yapılmıştır [5]. Bu tanım Salminen ve ark., (1998) tarafından ‘insan ve hayvanların sağlığını geliştirmek için tasarlanan gıda, yem ya da besinsel katkılardaki canlı mikrobiyal preparatlar’ olarak değiştirilmiştir [6].

Fermente gıdaların metabolizma üzerindeki faydalı etkileri ilk defa 20. yüzyılın başlarında Nobel ödül sahibi; Rus Bilim adamı Elie Metchnikoff tarafından öne sürülmüştür. Metchnikoff Bulgar çiftçilerin fermente süt ürünleri tüketimi sonucu daha sağlıklı ve uzun ömürlü olduklarını, bunun nedeninin ise bu ürünlerde bulunan çubuk şeklindeki bakterilerin (*Lactobacillus* spp.) bağırsaktaki mikroflorayı olumlu yönde etkilemesi ve toksik mikrobiyal aktiviteyi azaltması olduğunu belirtmiştir. Fermente ürünler üzerinde yapılan çalışmaların başlangıcı çok eskilere dayanmakla birlikte, probiyotikler konusunda yapılan çalışmalar ancak son 10–15 yılda hız kazanmıştır [7].

2.1.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan suşlar ise laktik asit bakterilerinin, enterokoklar, laktobasiller ve bifidobakterileri kapsayan heterojen bir grubundan oluşmaktadır. Özellikle laktobasiller probiyotik olarak kullanılan bakterilerin başında gelmektedir. Ancak, günümüzde diğer mikroorganizmalar da probiyotikler arasına girmiştir [8]. Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar Çizelge 2.1’de gösterilmiştir [8-9].

Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar.

<i>Lactobacillus</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactobacillus delbreckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> • <i>Lactobacillus cellobiosus</i> • <i>Lactobacillus lactis</i> • <i>Lactobacillus acidophilus</i> • <i>Lactobacillus reuteri</i> • <i>Lactobacillus brevis</i> • <i>Lactobacillus casei</i> • <i>Lactobacillus curvatus</i> • <i>Lactobacillus fermentum</i> • <i>Lactobacillus plantarum</i> • <i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>Pediococcus</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pediococcus cerevisiae</i> • <i>Pediococcus acidilactici</i> • <i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus cremoris</i> • <i>Streptococcus thermophilus</i> • <i>Streptococcus intermedius</i> • <i>Streptococcus lactis</i> • <i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>Lactococcus</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> • <i>Lactococcus</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bifidobacterium animalis</i> • <i>Bifidobacterium adolescentis</i> • <i>Bifidobacterium bifidum</i> • <i>Bifidobacterium breve</i> • <i>Bifidobacterium infantis</i> • <i>Bifidobacterium longum</i>
Diğerleri	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus subtilis</i> • <i>Bacteriodes capillous</i> • <i>Leunostoc mesenteroides</i> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Propionobacterium shermanii</i> • <i>Enterococcus faecalis</i> • <i>Enterococcus faecium</i>

Probiyotik terimi yeni olsa bile insanlar ve hayvanlarda sindirim üzerinde belirli mikroorganizmalar uygun etkilerine ilişkin incelemeler, yüzyılın başına kadar uzanır. Son otuz yıldan beri hayvansal üretim koşulları, yetiştirmede olduğu gibi, endüstriyel olarak yapılmaktadır.

2.1.2. Probiyotik mikroorganizma seçim kriterleri

Probiyotikler, sindirim sisteminde belli sayılarda bulunan ve konakçıda yararlı etkiler oluşturan canlı mikroorganizmalardır. Probiyotik bakterilerle kolonizasyonun arttırılmasının, sağlığı olumlu yönde etkilediğini gösteren çalışmalar giderek artmaktadır. Probiyotik olarak seçilen bakterilerin, işlem sürecinde ve depolama süresince canlılığını koruması ve aktif olduğu bölgede çoğalabilmesi taşıması gereken en önemli özelliklerdendir. Bunun yanı sıra probiyotik bakteriler patojen olmamalı, toksik metabolitler üretmemeli, genetik açıdan stabil olmalı ve sağlık üzerinde olumlu etki yaptığı düşünülen ürünlerde değişim meydana gelmemelidir. Probiyotik mikroorganizmaların seçim kriterleri Şekil 2.1.'de verilmiştir.

İnsan beslenmesinde kullanılan mikroorganizmalarda aranması gereken temel özellikler [9-10] aşağıda belirtildiği gibi sıralanır;

- Probiyotikler gelişme faktörlerinden olmalıdır.
- Glikozinatlar gibi beslenmede zararlı olan faktörlerin besinlerde sindirilebilirliğini arttırmalıdır.
- Bağırsak düzensizlikleri üzerinde koruyucu bir etki sağlamalıdır.
- Sindirim sistemi mikroflorasının dengede tutulmasını kolaylaştırarak iyi bir sindirim hijyenini garantilemelidir
- Sağlığın genel durumunu iyileştirmelidir.
- Güvenilir olmalıdır. Kullanım sonucu insan veya hayvanlarda yan etkisi olmamalıdır.
- Stabil olmalıdır.

- Düşük pH ve safra tuzlarına karşı dayanıklı olmalıdır. Mide ve bağırsak kanalından geçişleri sırasında canlı kalabilmelidirler.
- Epitel yüzeylere tutunmayı sağlayan maddeler (Ekzopolisakkarit, lektin vb.) bulundurmalıdır.
- *Helicobacter pylori*'nin gelişimini engelleyebilmelidir.
- Agregasyon ve koagregasyon yeteneğine sahip olmalıdır.
- Bağırsak hücrelerine tutunabilmeli, kolonize ve metabolize olabilmelidir.
- Patojen bakterilere karşı antagonistik etkileri olmalıdır. Bakteriyosin, hidrojen peroksit, laktik asit ve propiyonik asit gibi organik asitler sentezleyebilmelidir.
- Antikarsinojenik aktivite gösterebilmelidir.
- Kan basıncı ve serumda kolesterol konsantrasyonunu düşürebilmelidir.
- İnsan ve hayvan sağlığında çeşitli nedenlerden dolayı kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli olmalıdır.
- Konakçı hücrelerde fazla sayıda bulunabilmelidir.
- Bakterilerin üretim ve depolama aşamalarında canlılığını ve aktivitelerini koruyabilmelidir.
- Patojenik olmamalı ve toksik madde üretmemelidir.



Şekil 2.1. Probiyotik mikroorganizmaların seçim kriterleri [11].

2.1.3. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkisi ve etki mekanizmaları

Probiyotiklerin etki mekanizmasına yönelik çalışmalar, bağırsak florasının düzensizliğiyle ortaya çıkan mide-bağırsak sistemindeki bozukluklara dayanarak yapılmaya başlamıştır [12]. Probiyotik bakteriler, patojen bakterilerin üremesini engelleyen inhibitör antimikrobiyal peptid (mikrosin, bakteriyosin) üretirler. Yapılan çalışmalarda, *Saccharomyces boulardii*'nin, *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Shigella* ve *E. coli*'nin üremesini baskıladığı gösterilmiştir. Patojenlerin adezyonunu önlerler; sayı ve hacim avantajları ile bağırsak ve ürogenital sistem epitel hücrelerinde, patojenlerin girmesini zorlaştırırlar. Epitelyal bariyeri güçlendirerek, patojenlerin translokasyonunu önlerler. Patojenlerin üremek için gereksinim duydukları besin maddelerini tüketerek, üremelerini inhibe ederler; *S. boulardii*, *Clostridium difficile*'nin gereksinim duyduğu monosakkaridleri tüketerek bu bakterinin üremesini önler [12,13].

Son yıllarda özellikle probiyotiklerin etki mekanizmaları ve üstlendikleri görevler üzerine pek çok araştırma yapılmıştır. Bu mekanizmalar ve sağlık açısından yararları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

Diyareye etkileri: Çevre koşullarının genellikle yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde bebek ve çocuklarda diyare ataklarına rastlanır. Diyare ile seyreden hastalıkların büyük çoğunluğundan enterotoksijenik *E. coli* ve *Rotavirüs* birlikte sorumludur. Endüstrileşmiş ülkelerde ise bebekler ve çocuklarda diyare ataklarına daha az rastlanmaktadır. Ancak en sık görülen sorumlu etken *Rotavirüs*'dür. Fermente süt ürünlerin *Rotavirüs* diyareli çocuklarda diyarenin süresini yarı yarıya azalttığı bir çok araştırmada gösterilmiştir [14-15].

Helicobacter pylori enfeksiyonları: *Helicobacter pylori*, insan ve diğer primatların midesine yerleşen spiral şeklinde, gram-negatif, mikroaerofilik bir bakteridir. Günümüzde insanlarda ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, *H. pylori*'nin lokal inflamasyona ve sistemik olarak da humoral bağışık yanıtı neden olduğunu göstermiştir. Bu bakteri insanlarda kronik gastrit ve peptik ülser hastalıklarının nedenidir [16]. Bazı laktik asit bakterileri, özellikle mandıra starter kültürleri ile fermente edilen süt, *H. pylori* üzerinde antibakteriyel etkiye sahiptir. Laktik asit bakterileri genellikle organik asitler, hidrojen peroksit ve peptit gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşikler içeren birkaç antimikrobiyal bileşik üretir. Yapılan bir çalışma sonucunda, *Lactobacillus salivarius*' un, *H. pylori*' ye karşı potansiyel etkili probiyotik olduğu gösterilmiştir [17].

Laktoz intoleransı: Laktoz direk olarak bağırsaktan absorbe edilemediğinden, glukoz ve galaktoz gibi basit şekerlere hidrolize olması gerekmektedir. Enerji üretiminde ya da vücudun temel taşlarının yapımında kullanılan bu monosakkaritlerin arzu edilen faydayı sağlayabilmesi için gerekli olan hidroliz, ince bağırsak kanalında iç yüzeyinde bulunan β -galaktosidaz enzimiyle

sağlanır. İnsanlarda laktaz enzimiyle ilgili olarak ortaya çıkan problemler, bu enzimin salgılanmamasından veya doğumdan itibaren ince bağırsakta yetersiz miktarda bulunmasından kaynaklanmaktadır. Alınan laktoz ince bağırsakta parçalanmadan kalın bağırsağa (kolon) geçer. Burada laktoz yoğunluğu artar ve bunun sonucu olarak ozmotik basınç yükseldiği için bağırsak lümenine hızlı bir şekilde su gelir. Laktoz daha sonra kalın bağırsakta bulunan bakterilerin sentezledikleri enzimle parçalanır. Fermentasyona uğrar ve bu fermentasyon sonucu kısa zincirli yağ asitleri, hidrojen, karbondioksit ve çeşitli asitler oluşur. Bu olayların sonunda kişilerin bağırsağında gaz toplanır ve bunlarda şişkinlik, karın ağrısı, kramplar ve diyare gibi rahatsızlıklar oluşturarak, buna “laktoz intoleransı” denilir. Laktoz intoleransı olan kişiler yoğurt ve ayranı daha rahat tüketebildikleri gibi probiyotik mikroorganizma içeren süt ürünlerini de kullanabilirler. *Lactobacillus acidophilus* içeren sütle beslenmenin laktozun sindirilmesinde etkili olduğu ve bununda *L. acidophilus*' un bağırsaktaki işlevinden kaynaklandığı bildirilmiştir [18].

Serum kolestrolünün düşürülmesi: Bazı kan lipidlerinin yüksek düzeye varması kalp damar hastalıkları açısından risk faktörü oluşturabilir. Araştırmalar, kültürlü fermente süt ürünleri tüketiminin, serum kolestrol değerinin düşmesine yardımcı olduğunu göstermiştir [1]. Hiperkolestemik insanların 10^9 /g oranında probiyotik bakteri içeren fermente süt ürünleriyle beslenmesi sonucunda, kolestrol değerinin 3,0 g/l' den 1,5 g/l' ye düştüğü belirlenmiştir [19].

Hipertansiyon: Yaşlı hipertansif bireyler üzerinde yapılan çalışmalarda 8 hafta süreyle fermente edilmiş süt tüketiminin sistolik ve diastolik kan basıncını önemli derecede azalttığı bildirilmiştir. Bu ve benzeri çalışmalar sonucu probiyotik bakterilerin hipertansiyonu düşürmek için alternatif bir yaklaşım olabileceği belirlenmiştir [1].

İmmün sistemin düzenlenmesi: Probiyotik bakterilerin endojen savunma mekanizmasının arttırdığı ileri sürülmektedir. Probiyotiklerin bağırsaklarda özgül olmayan savunma bariyerini uyarıcı etkisi, artan intestinal permeabiliteyi normale dönüştürmesi ve bağırsak mikroflorasını değiştirmesi ile açıklanmaktadır. Probiyotiklerin bu etkinliklerini fagositik aktivite, sitokin salınımı, doğal öldürücü hücre aktivitesi, immünoglobulin aktivitesi (Ig A, IgG, IgM), T ve B hücre fonksiyonunu arttırarak gösterdiği ileri sürülmektedir [1]. Probiyotiklerin bağırsak fizyolojisi üzerine dolaylı veya doğrudan etkide bulunarak immün sistemi uyardığı, bu çerçevede konakçının ağız ve sindirim sistemi dâhil, üst solunum yolu ve ürogenital sistem mukozal yüzeyini etkileyerek iyi hal ve sağlığı geliştirici, hastalık riskini azaltıcı potansiyel etkiye sahip olduğu bilinmektedir [20].

Probiyotiklerin hastalık durumunda kullanımları ve durumlar 'Sanders (1999)' tarafından Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Probiyotiklerin sağlık bakımından önemleri [7].

Kullanıldığı durumlar	Mekanizma
Laktoz sindirimi	Bakterial laktozun laktoza hidrolizi
Enterik patojenlere karşı direnç oluşumu	<ul style="list-style-type: none"> • Patojenler için uygun olmayan ortam oluşturma (bakteriyosin üretimi, ortam pH'sını düşürme ve kısa zincirli yağ asitleri oluşturma), • Kolonizasyona karşı direnç oluşturma, • Gut florasına etki gösterme.
Anti kolon kanser etkisi	<ul style="list-style-type: none"> • Kolonik mikropların karsinojen etkili enzimlerinin inhibisyonu, • Karsinojen deaktivasyon, • İmmün cevap oluşturma.
İmmün sistemin düzenlenmesi	<ul style="list-style-type: none"> • İnfeksiyon ve tümörlere karşı oluşan spesifik olmayan savunmanın güçlendirilmesi, • Antijene spesifik immün cevabın desteklenmesi, • IgA üretimini artırma.
Alerji	Antijen translokasyonun kana karışmasını önleme.
Kalp hastalıkları	<ul style="list-style-type: none"> • Bakteri hücreleri aracılığıyla kolesterolün asimilasyonu, • Antioksidatif etki.
Yüksek tansiyon üzerine etki	Hücre duvarı bileşenlerinin anjiyotensin olarak görev üstlenmesi.
Ürogenital enfeksiyonlar	<ul style="list-style-type: none"> • Üriner ve vajinal hücrelerin adhezyonu, • İnhibitör madde üretimi (H₂O₂ üretimi).

2.2. Laktik Asit Bakterileri

2.2.1. Genel özellikleri

Laktik asit bakterileri; gram pozitif, spor oluşturmeyen, çubuk ve kok şeklinde olmakla beraber, karbonhidrat fermantasyonu sırasında en yüksek son ürün olarak laktik asit üretirler. Bazı laktobasil'ların hareketli ve endospor oluşturduğu, bazı streptokoklarda aerob ortamda ürediği, yine bazı laktobasil ve tetrakoklarda katalaz pozitif reaksiyon verdikleri de bilinmektedir. Bu özellikleri gösteren bakteriler arasında 4 bakteri sınıfı ayırılmaktadır; *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc*' lar [21-1].

Bütün laktik asit bakterileri anaerobik koşullar altında gelişim gösterebilmektedir. Ancak, pek çok anaerobik bakterinin tersine oksijene karşı duyarlı değildirler, yani oksijen varlığında da gelişim gösterebilmektedirler. Bu nedenle de aerotolerant anaerob organizmalar olarak adlandırılırlar [22-23].

Laktik asit bakterileri laktik asit fermantasyonuyla oluşturdukları ürünlerin cins ve miktarına göre de sınıflandırılır. Zorunlu homofermentatif laktik asit bakterileri glukozu, Fruktöz Di Fosfat (FDP) yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucu % 99 oranında laktik asit, %1 oranında diğer bileşikleri meydana getirirler. Zorunlu ve fakültatif heterofermentatif laktik asit bakterileri, glukozu Hegzos Mono Fosfat (HMF) yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucu % 70 laktik asit ve %30 oranında da diğer bileşikleri, özellikle asetik asit, etil alkol ve karbondioksiti oluştururlar [24-25]. Homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterilerinin izledikleri metabolik yol birbirinden farklıdır. *L. plantarum* (sinonimleri: pentosus, arabinosus) glukozu homofermentatif olarak metabolize ederken, pentozları laktat ve asetata Pentoz Fosfat (PP) yolu ile hidroloize etmektedir. *L. casei* de glukozu homofermentatif, ribozu ise heterofermentatif olarak metabolize etmektedir [21].

Homofermentatif laktik asit bakterileri, fermentasyon işleminin son aşamasında pirüvik asitin laktik asite indirgenmesi için gliseraldehit 3-fosfat'ın dehidrogenasyonundan elde edilen NADH+H kullanmaktadır. Ortamdaki oksijenin varlığına da bağlı olarak diğer bir reaksiyon serisinde pirüvatın yalnızca küçük bir kısmı dekarboksile edilmekte ve asetat, etil alkol, karbondioksit ve belki asetoine dönüştürülebilmektedir [21].

Fakültatif heterofermantatif laktik asit bakteriler ise heksoz şekerleri laktik aside fermente ederken, pentoz şekerleri laktik asit ve asetik asite fermente ederler. Zorunlu heterofermentatif laktik asit bakterileri, heksoz ve şekerleri laktik asit, asetik asit (veya etanol) ve CO₂' e, pentoz şekerleri ise laktik asit ve asetik aside fermente ederler. Heterofermentatif laktik asit bakterileri FDP yolunun önemli enzimlerinden aldolaz ve trioz-fosfat izomeraz enzimine sahip değildirler. Bu yüzden heterofermentatif türler FDP yolunu kullanamamaktadır. Glukozun yıkımı pentozfosfat (PP) yolu ile olmakta ve sonuçta laktat ile birlikte yaklaşık eşdeğer miktarda etil alkol ve karbondioksit üretilmektedir. Bir kısım heterofermentatif laktik asit bakterileri ise Asetil - P'yi ya kısmen ya da tamamen asetik asite dönüştürebilmektedir [21].

Laktik asit bakterilerine su ve toprakta rastlanılmazken, çeşitli cins ve türlerde olmak üzere, süt ve süt ürünleri üretim yerlerinde, bitki ve bitki atıklarında, insan ve diğer canlıların bağırsak sistemlerinde rastlanır. Ayrıca sağlıklı kadınların vajen florasında dominant olarak bulunmaktadır [25, 26, 27].

2.2.2. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin genel özellikleri

Lactobacillus cinsi bakteriler, *Lactobacillaceae* familyasına ait olup, laktik asit bakterileri grubundandır. *Lactobacillus* spp.' ler aerotolerant, gram (+), katalaz (-) bakterilerdir, spor oluşturmazlar. Çoğu *Lactobacillus* spp. basil ancak bazı türleri koko-basil şeklindedir. Bu mikroorganizmalar gelişebilmeleri için aminoasit, peptit, nükleik asit türevi vitamin, tuz, yağ asidi

veya yağ asidi esterleri ile fermente edebilecekleri besin maddelerine ihtiyaç duyarlar [21]. Kromozomlarındaki nükleik asit kompozisyonunun % 33–55' ini G+C oluşturmaktadır [28]. Oksijeni kullanma özelliğine göre mikroaerofilik ya da anaerob olup %5 CO₂'li ortamda gelişme gösterebilirler [29]. 10-30 µ uzunluğunda 0,7-2 µ kalınlığında, çubuk şeklinde tek tek veya zincirler şeklinde bulunur. Genç bakteriler genellikle zincir oluşturmaz. Optimum olarak 37-45 °C' de aktivite gösterirler. 70 °C' nin üzerindeki sıcaklıklarda ise canlılıklarını kayıb ederler [14-16, 18, 30].



Resim 2.1. *Lactobacillus acidophilus*' a ait SEM görüntüsü [31].

Lactobacillus genusu türler, silajda, hayvan ve insan bağırsağında bulunurlar. Normal süt florasında yer alırlar. Nitratı redükte etmezler, katalaz enzimi üretmezler [21]. *Lactobacillus* genusu türlerine daha çok insan, hayvan ve bitkilerle birlikte bunların bulunduğu ortamda rastlanır. Genellikle zengin karbonhidratlı ortamlarda bulunurlar. Karbonhidrat metabolizması sonucunda oluşan ürünler ortamın asiditesini artırır. Böylece bu tip ortamlarda gelişemeyen bakteriler için antimikrobiyal etki yaratır. Özellikle insan ve hayvan bağırsaklarında yaşayanlar, o koşullara adapte olan türlerdir. Vajinanın normal florasını oluştururlar. Hücreler yuvarlaktan ovale kadar değişen şekilde olup 2 µm çapta, ikili veya zincir şeklinde bulunurlar. Genellikle hareketsiz olan bu bakteriler kültür ortamında küçük ve renksiz koloniler oluştururlar [21, 25, 26, 27].

Elektron mikroskopuyla yapılan incelemelerde *Lactobacillus* cinsi bakterilerin 5 ana kısımdan oluştuğu gösterilmiştir. Bunlar hücre çeperi, sitoplazmik membran, ribozomlar ve nükleer (kromozomlar ve plazmidler) elementlerdir. Hücre çeperi; *Lactobacillus* cinsi bakterilerde 20 – 40 nm kalınlığında, mineral maddeler (tuz vb.), su ve metabolitleri geçirebilen peptidoglikan (murein) bir tabakaya sahiptirler. Laktik asit bakterilerinin proteinleri kullanabileceği büyüklüğe dönüştürebilmesi enzimler yardımıyla sitoplazmik membranda gerçekleşir. Bunun yanında sitoplazmik membranda fosfotransferaz enzimleriyle aktif taşıma da yapılmaktadır. Peptidoglikanların ekstrasellüler polimerizasyonu için gereken enzimler de sitoplazmik membranda bulunmaktadır. Laktik asit bakterilerinde ribozomlar 70S tipindedir, 70S, 50S büyük ve 30S küçük olmak üzere iki alt üniteden oluşur. Laktik asit bakterilerinin birbirlerinden ayırımında 16S rRNA' nın özelliklerinden yararlanılmaktadır ve 16S rRNA' da değişen ve değişmeyen kısımlar bulunur. Değişen kısımlar yakın akrabaların tespitinde kullanılırken, değişmeyen kısımlar ise uzak akrabaların tespitinde kullanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin çoğu en az bir adet plazmid içerir. Plazmidler, ekzopolisakkarit ve antimikrobiyal madde sentezi gibi, koruma görevleri üstlenmiştir [32].

2.2.3. *Enterococcus* cinsi bakterilerin genel özellikleri

Enterokoklar, hayvanların sindirim atıklarında, toprakta, kirli suda hayvansal gıdalarda bulunabilen bakterilerdir. Bu bakteriler primer patojen olarak bilinmezler, fakat genellikle ikincil patojen olarak özellikle insan bağışıklığını tehlikeye atan bakteriler içinde tanımlanmaktadır. Ayrıca Enterokoklar, ciddi insan patojeni olan diğer bakteriler için düz (yatay) transfer edilebilen antibiyotik direnç genlerinin rezervuarı olarak dikkate alınmaktadır [33].



Resim 2.2. *Enterococcus faecalis* bakterisinin SEM görüntüsü [34].

Enterokoklar, laktik asit bakterileri içinde yer alan önemli bir cinstir. Başlangıçta *Streptococcus* cinsi içinde yer alan enterokoklar, “fekal streptokoklar” veya “Lancefield serolojik D grubu streptokoklar olarak bilinmekteydi. 1984 yılında streptokoklardan farklılığı ortaya konarak *Enterococcus* adı altında ayrı bir cins olarak kabul edilmiştir. *Enterococcus* cinsine ait türler, ikili ya da kısa zincirler halinde bulunan fakültatif anaerob koklardır. Bunlar kemoorganotrofikler ve homofermantatif laktik asit fermentasyonu ile heksozlardan L-laktik asit oluştururlar.

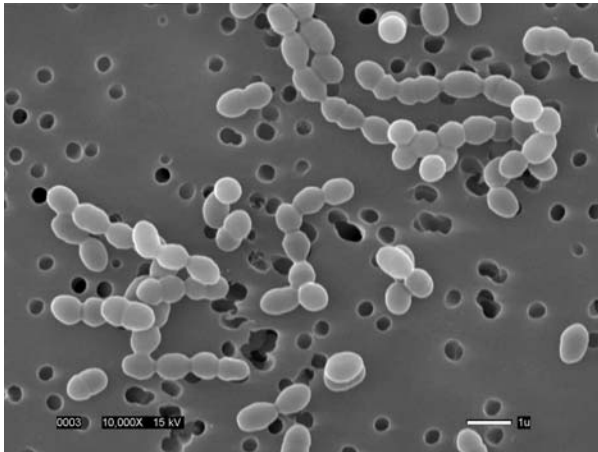
Optimum gelişme sıcaklıkları 35°C olan enterokoklar, 60°C’de 30 dakika uygulanan ısı ile canlılıklarını koruyabilme özelliğine sahiptir.

Enterokoklar, fırsatçı çok iyi patojen olarak bilinmekte ve özellikle de hastane enfeksiyonlarında önemli rol oynamaktadır. Bu bakteriler, hastane enfeksiyonlarından olan, bakteriemi, üriner sistem enfeksiyonu ve endokarditis olarak bilinen enfeksiyonlardan sorumludurlar. Bununla birlikte enterokoklar, bazı geleneksel fermente gıdalarda baskın mikroflora olarak rol oynarlar. Laktik asit bakterilerinden olan enterokoklar fermente gıdaların tat, sertlik ve yumuşaklık gibi özelliklerinde etkili olurlar [35].

İnsan ve hayvanların doğal mikroflorasının önemli bir bölümünü oluşturan enterokokların temel habitatları gastrointestinal sistemdir. Enterokokların pastörizasyon sıcaklıklarına dirençli olmalarının yanı sıra, farklı substrat ile düşük ve yüksek sıcaklık, ekstrem pH ve tuz konsantrasyonları gibi gelişme koşullarına adapte olma yetenekleri sayesinde, süt ve et gibi çığ materyallerden üretilen gıda ürünleri ile ısıtma işlemi uygulanan gıda ürünlerinden çok sık izole edilirler. Ayrıca enterokoklar, ürün işleme süresince son ürünü kontamine edebildikleri için özellikle peynir ve fermente etlerde gıda florasının önemli bir bölümünü oluştururlar [36].

2.2.4. *Leuconostoc* cinsi bakterilerin genel özellikleri

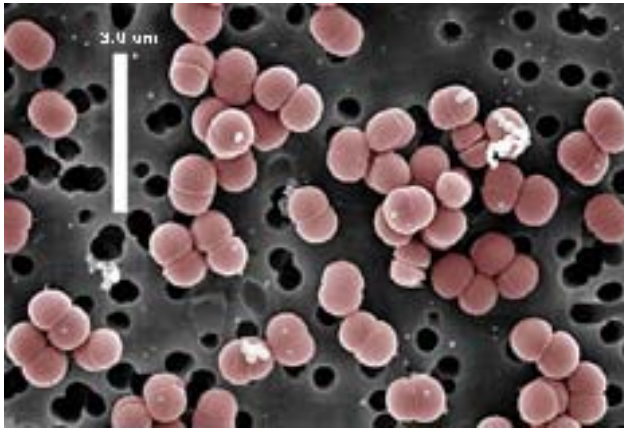
Leuconostoc spp. kok veya oval şekilde, gram (+), spor oluşturmeyen, katalaz (-), zincir ve grup şeklinde pleomorfik hareketsiz bakterilerdir. Çoğu türleri %3 hatta %6,5 tuz konsantrasyonuna dayanabilmektedirler. Optimum gelişme sıcaklıkları 20- 30°C arası olup, fakültatif anaerob koşullarda aktivite gösterebilmektedirler. Heterofermantatif olan bu bakteriler, karbonhidratları parçalayarak laktik asit yanında asetik asit, etil alkol ve CO₂ meydana getirirler [37].



Resim 2.3. *Leuconostoc mesenteroides* 'in elektron mikroskop görüntüsü [38].

2.2.5. *Pediococcus* cinsi bakterilerin genel özellikleri

Pediococcus spp. gram(+), hareketsiz, aerotolerant ve fermentatif, katalaz(-) kok şeklinde tekli, çiftli kısa zincir veya tetrad oluşturan bakterilerdir. Bu cinsin türleri, tuza dayanıklı homofermantatif özelliktedir ve doğal olarak bitkilerde bulunur. Ayrıca turşu, bira, şarap gibi fermente ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır [37].

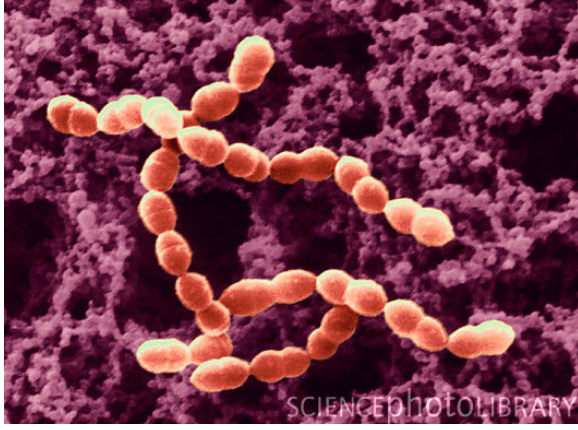


Resim 2.4. *Pediococcus pentasaceus*'un SEM görüntüsü [39].

2.2.6. *Streptococcus* cinsi bakterilerin genel özellikleri

Laktik asit üreten *Streptococcuslar*'lar, peynir ve bazı fermente süt ürünlerinin üretiminde önemli rol oynamakta olup en önemli türleri *S. thermophilus*, *S. lactis*, *S. cremoris* ve *S. raffinolactis*'tir. Ancak, yeni sınıflandırmada *S. lactis* ve *S. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* olarak, sınıflandırılmaktadır. *S. lactis*, doğal olarak, çiğ süt, süt ürünleri ve bitkilerde bulunan homofermantatif bir bakteri türüdür. *S. raffinolactis*, ise genelde asitliği gelişmiş sütlerden izole edilmektedir. Laktik streptokoklar, laktoz fermentasyonunda, laktozu önce glukoz ve galaktoz 6-fosfata dönüştürdükten sonra, son ürün olarak laktik asit meydana getirirler. Bu durum, süt ve süt ürünlerinde karakteristik aroma oluşumu açısından oldukça

önemlidir. Ancak proteolitik enzim sistemi zayıftır, *Lactobacillus*'un sağladığı peptitlerle sütte simbiyotik gelişme göstermektedir [40].



Resim 2.5. *Streptococcus thermophilus* 'un SEM görüntüsü [41].

2.3. Bakteriyel Ekzopolisakkaritler (EPS) ve Probiyotik Önemleri

Laktik asit bakterileri (LAB) diğer mikroorganizmalar gibi, hücre içinde yerleşimlerine göre sınıflandırılabilen üç çeşit polisakkarit üretirler. Bunlardan birincisi sitozol içinde yer alır ve karbon ve enerji kaynağı olarak işlev görürken, ikincisi peptido glikanlar ve teikoik asitler gibi çeperde yer alırlar. Üçüncü grup ise, hücre içinde oluştuktan sonra hücre dışına salgılanmaktadır. Bazı durumlarda iki form aynı mikroorganizma tarafından oluşturabilir. Bu polimerlere kapsül ve mikrokapsül şeklinde polisakkarit adı verilmektedir [26,27].

Karbonhidrat metabolizması birçok bakteri türünde enerji ve biyokütle üretimine ek olarak ekzopolisakkarit üretiminde de önemli bir rol oynamaktadır. Hücresel lokasyonları, kimyasal ve fiziksel yapı özellikleri ile fonksiyonları esas alınarak mikrobiyal ekzopolisakkaritleri üç ana grup altında toplamak mümkündür. Bunlar; hücre yüzeyine kovalent bağlarla bağlı olan kapsüler polisakkaritler (CPS), hücre duvarının bir bileşeni olan polisakkaritler (LPS) ve dış çevreye salınan ya da hücre yüzeyi ile kovalent olmayan, gevşek bağlarla ilişkilendirilmiş polisakkaritlerdir (LAM) [29].

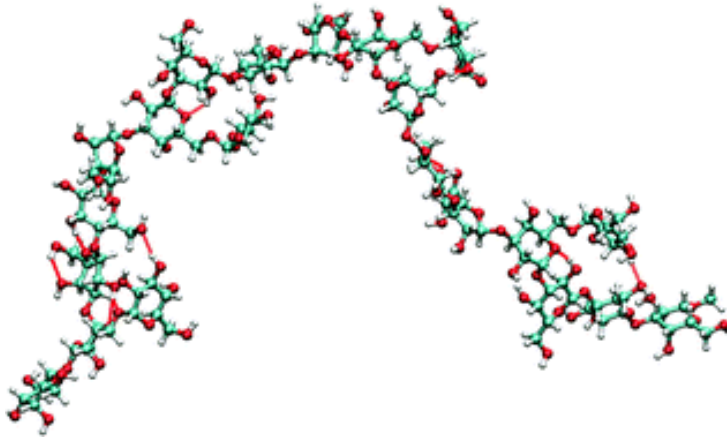
Ekzopolisakkaritlerin; bakteriyi sıvı kaybına, makrofajlara, fagositoza, bakteriyofajlara, protozoa, antibiyotik ve toksik bileşiklere karşı korumakla ve bunların yanında metal iyonlarının hücreye alınmasında görevli olduğu, bilinen özelliklerindedir. Ekzopolisakkaritler diğer önemli özellikleri ise; bakterinin yüzey tutunmasında yapıştırıcı (slime) işleve sahip olması ve bulunduğu ortama tutunma ve biyofilm oluşturmada etkili olmasıdır. Bütün bu özellikler ekzopolisakkarit üreten bir bakteriye bulunduğu ortamda stabil olarak kalabilme ve baskın olarak büyüme özelliği kazandırmaktadır [28].

Ekzopolisakkaritler (EPS) çok sayıda bakterinin (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) yüzeyinde bulunan ekzoselüler polimerlerdir [31]. Genellikle güvenilir olarak (GRAS) tanımlanan laktik asit bakterilerinin EPS ürettikleri bilinmekle birlikte, propiyonik asit bakterilerinin ve bifidobakterilerin de EPS ürettikleri bildirilmiştir [32]. Bu polimerlerin bir diğer dikkate değer özelliği gıda sanayinde kıvam arttırıcı olmalarıdır [42,43]. EPS üreten LAB suşları yoğurt, peynir, tereyağ, kefir ve geleneksel fermente süt ürünlerinin üretiminde starter kültür suşları olarak da kullanılmaktadırlar [44]. Starter kültürlerin EPS oluşturma yetenekleri, üretimde kullandıkları fermente süt ürünlerinin yapısal, aromatik ve reholojik özellikleri üzerinde belirgin bir şekilde etki etmektedir [45]. EPS'lerin immun sistemi teşvik ettiği, antitümoral ve kolesterol düşürücü aktiviteye sahip olduğu da saptanmıştır [46].

2.3.1. Laktik asit bakterilerinin ürettikleri ekzopolisakkaritler ve özellikleri

Pek çok diğer bakteri gibi LAB hücredeki yerlerine bağlı olarak sınıflandırılan farklı tipte polisakkaritler üretebilme yeteneğindedirler. Bunlardan hücre duvarı dışından salgılananlar ekzoselüler (hücre dışı) polisakkaritler ya da EPS' ler diye adlandırılırlar. Bunlar yapışkan tutucu bir tabaka oluşturabilirler ve kapsül polisakkaritleri olarak adlandırılırlar. EPS' ler aynı zamanda hafifçe yapışabilir ya da salgı olarak ortama salgılanabilir [47].

EPS biyosentezi, nükleotid şekerlerin üretimi ve birincil karbonhidrat metabolizma enerjisi ile bağlantılıdır [48-49]. Çeşitli çalışmalarda EPS üretiminin gelişim ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu doğrultuda; *Lactobacillus sakei* 0-1, *L. rhamnosus* C83, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 ve *S. thermophilus* bakteri suşları ile yapılan çalışmalarda heteropolisakkarit üretimi ile biyokütle oluşumunun paralel olduğu tespit edilmiştir [48-50-51]. EPS üretimi için optimum pH, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*' un sürekli kültürlerindeki gelişme için optimum olan pH' ya yakın (pH 6,5 civarı) bulunmuştur. Sıcaklık ile ilgili olarak da; bakteri gelişimi için kısmen uygun olan sıcaklık şartlarının çoğu zaman EPS sentezi için en uygun olduğu tespit edilmiştir [52,53].



Şekil 2.2. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 'un ürettiği ekzopolisakkaritin moleküler yapısı [48].

Bouzar ve arkadaşları (1997), fermentasyon parametrelerinin, EPS üretimi ve viskozite için karışık suşlu kültürlerde kullanılan *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* fenotipinde olduğundan daha az önemli olduğunu bildirmişlerdir [54]. Bakteriyel EPS' ler kendilerini üreten mikroorganizmalar tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmazlar. Bu maddelerin, hücrenin doğal çevresindeki kuraklık, fagositler ve protozoalar tarafından sindirim, faj saldırıları, antibiyotikler veya toksik bileşikler ve osmotik stres gibi faktörlere karşı

koruyucu bir fonksiyonu olduğu düşünölmektedir. EPS' ler aynı zamanda hücre tanımlanması, yüzeye yapışma ve çeşitli ekosistemlerin kolonizasyonunu kolaylaştıran biyofilimlerin oluşturulmasında da rol oynarlar [55].

LAB' nin ürettiği EPS' lerin ekolojik fonksiyonu tam olarak tanımlanamamıştır ve muhtemelen karmaşıktır; fakat hücreye yapışma ve farklı ortamlarda hücrenin korunması ile ilişkili olduğu anlaşılmaktadır. *Streptococcus thermophilus* ve *S. mutans* tarafından üretilen EPS' ler bakteri kolonizasyonu ve diş plağı oluşumunda rol oynarlar [56]. Looijesteijn ve arkadaşları (2001)' nin bir araştırması; *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* NZ4010 tarafından üretilen EPS' lerin bakteriyi bakteriyofajlar, metal iyonları, nisin ve lizozim gibi çeşitli antimikrobiyal faktörlere karşı koruduğunu göstermiştir. Bu ekolojik fonksiyonlardan farklı olarak, LAB' nin ürettiği EPS' ler çeşitli fermente ürünlerin üretiminde teknolojik öneme sahiptirler. EPS oluşturan *S. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* içeren “sünme özelliğindeki- ropy” kültürlerin kullanımı, yoğurt üretiminde tekstürü geliştirmek, su salmayı önlemek ve yoğurt viskozitesini arttırmak için alışıldık bir uygulamadır. “Viili” gibi iskandinav süt ürünlerinde, EPS üreten *Lactococcus* suşları kullanılmaktadır. Tekstür oluşumundaki bu role ilave olarak, fermente süt ürünlerinin insan sağlığı üzerine pozitif fizyolojik etkilerinin; LAB' nin çeşitli hücre duvarı bileşenlerine, özellikle hücre dışı (ekstraselölar) polisakkaritlere bağlanabileceği öne sürölmüştür.

Günümüzde probiyotik bakteri içeren fonksiyonel gıdaların gelişmesi, hem sağlık ve hem de ekonomik faydaları ile büyüyen bir pazar durumundadır. Probiyotikler sağlığa faydalı olan canlı mikrobiyolojik gıda bileşenleri olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde kullanılmakta olan probiyotik bakteriler; bazıları EPS' leri üreten, ağırlıklı olarak *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*' lardır. Aslında ileri sürölen, EPS üreten suşların sağlığı destekleyen etkileri bu biyopolimerlerin biyolojik aktiviteleri ile ilişkilidir. Ekzopolisakkaritler; prebiyotik ya da antitümör, antiülser, immünomodöle edici ya da kolesterol

düşürücü aktiviteleri sayesinde insan sağlığına katkıda bulunabilirler. Pek çok çalışma, LAB ve fermente süt ürünlerinin antikarsinojenik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Kitazawa ve arkadaşları (1991), liyofilize *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KVS 20 hücrelerinin intraperitoneal enjeksiyonunun farelerde Sarcoma-180 tümörlerinin gelişiminin durması ile sonuçlandığını, fakat LAB suşunun S-180 tümör hücrelerine karşı yapılan “*in vitro*” çalışmalarında sitotoksiste göstermediğini bulmuşlardır. Bu bilgi, bu suşun tümör gelişmesini önlemedeki etkinliğini immün aktivitesi ile ilişkilendirmiştir. Bu araştırmacılar *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KVS 20 tarafından üretilen salgı maddesinin, antitümör etkisindeki temel bileşen olabileceğini gerçekçi kabul etmektedirler. Daha sonraki bir çalışma, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KVS 20’ nin salgı maddesi ürünleri sayesinde B-hücresi mitojenik aktivitesinin belirgin şekilde arttığını göstermiştir. Nakajima ve ark. (1995) da *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SBT 0495 EPS’ sinin, farelerde intraperitoneal olarak artan özel antikorların üretimini yönettiğini tespit etmişlerdir. Bu da EPS’ in bağışıklık sistemini destekleyebildiğini göstermektedir. EPS üreten *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL 1073R-1 yoğurt kültürünün antitümör aktivitesi için arabulucu olarak kullanıldığı bildirilmiştir [57].

2.4. Agregasyon

Agregasyonun kelime anlamı; toplanma, bir araya gelerek kümeleşmedir. Bakterilerin agregasyon özelliğine sahip olması bulunduğu hücrelere tutunma ve dominant olarak kolonize olmasını sağlayacağından özellikle probiyotik açıdan önemli bir kriterdir. Laktik asit bakterilerinin bu özellikleri nedeniyle bulunduğu yüzeye ve birbirlerine yapışarak biyolojik bir bariyer oluşturduğu bilinmektedir [58, 59].

Bakterilerde agregasyonun iki şekilde gerçekleştiği bilinmektedir. Otogregasyon, aynı türe ait mikroorganizmaların birbirlerine tutunarak oluşturdukları hücre kolonileri şeklinde tanımlanmaktadır. Koagregasyon,

farklı türe ait iki mikroorganizmanın birbirine tutunması şeklinde tanımlanabilir. Probiyotik türler otoagregasyon yetenekleri ile bağırsak epitel hücrelerine tutunurken ve koagregasyon yetenekleri ile patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu önleyen bir bariyer görevi gördükleri bilinen özelliklerindedir [60-61].

2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri

2.5.1. Laktik asit üretimi

Antimikrobiyal maddeler, mikroorganizma gelişimini engelleyen, biyolojik kökenli, ikincil metabolitlerdir. Bunlar, mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyici “bakteriostatik” veya “fungustatik” olabildikleri gibi; mikroorganizmanın ölümüne sebep olan “bakterisit” ve “fungisit” gibi maddeler de olabilirler. Mikroorganizmalar tarafından üretilen, düşük moleküler ağırlıklı, organik doğal ürünlerdir [62, 63].

Çeşitli ürünlerin doğal fermantasyonundan sorumlu olan laktik asit bakterilerinin ana fermantasyon ürünü heksozdan D (-), L (+) ya da rasemik karışım şeklinde üretilen laktik asittir [64]. Laktik asit bakterilerinde laktik asit üretimi iki farklı yolla gerçekleşebilmektedir. Laktik bakteriler oluşturdukları ürünler temel alınarak homofermentatif (aldolaz enzimine sahip olanlar) ve heterofermentatif (aldolaz ve triozfosfat izomeraz enzimlerine sahip olmayanlar) olmak üzere iki alt guruba ayrılmaktadırlar [23].

Süt endüstrisinde starter bakteriler olarak kullanılan laktokok suşlarının fermantasyon süreçlerindeki en önemli rollerinden biri, süt sekeri olan laktozu fermente ederek laktik asit oluşturmalarıdır. Yapılan çalışmalar süt ürünlerinde laktik asit oluşumunun süte antimikrobiyal özellik kazandırdığını ve mikrobiyal bozulmalara karşı daha dirençli hale geldiğini göstermiştir [65].

2.6. Antibiyotikler

Antibiyotikler, bakteriler ve funguslar tarafından üretilen doğal antimikrobiyal metabolitlerdir. Bunlar, kendisini üreten mikroorganizma dışındaki ve antibiyotik üretmeyen etkenlere karşı inhibitör (statik) veya öldürücü (sidal) etkiye sahiptirler. Doğal antibiyotiklerin, mikroorganizmalar tarafından kolayca inhibe edilmesi nedeniyle semi sentetik olarak hazırlanmakta ve daha fazla dayanıklı olmaktadır [66].

Antibiyotikler mikroorganizmalar üzerinde çok değişik tarzda etkili olmaktadır. Bunlar; hücre duvarı sentezine mani olanlar, sitoplazmik membranı etkileyenler, protein sentezine mani olanlar, nükleik asit fonksiyonunu ve sentezini bozanlar olarak ayrılmaktadır [7]. Bir antibiyotiğin antimikrobiyal aktivitesinin saptanması için uygulanan in vitro işlemlere genel olarak duyarlılık testleri denir. Rutin laboratuvarlarda uygulanan testlerle genellikle ilaçların inhibitör (bakteriyostatik veya bakterisidal) aktivitesi değerlendirilir. Bu amaçla uygulanan yöntemler; a) Katı veya sıvı besiyerlerinde seyreltme (dilüsyon) yöntemleri, b) Disk difüzyon yöntemi, c) Gradyent difüzyon (Etest) yöntemi ve d) Antimikrobiyal ajanları inaktive eden enzimlerin saptanması olarak sıralanabilir.

Duyarlılık test sonuçları mutlaka identifikasyon sonuçları ile birlikte değerlendirilmelidir. Bazı bakteri türleri genetik özellikleri açısından bir antibiyotiğin hedefi olan yapıyı hiç içermediğinden ya da antibiyotiğin hedefe ulaşmasını engelleyecek bir yapıyı veya antibiyotiği inaktive edecek enzimleri taşıdığı için o antibiyotiğe dirençlidir. Buna doğal direnç adı verilmektedir [8].

Birçok kaynak tarafından mikroorganizmaların ürettiği EPS' nin biyoteknolojik ve probiyotik kültürler bakımından önemi vurgulanmış olmakla birlikte, EPS üretim miktarları ile antibiyotiklere dirençlilikleri arasındaki ilişkiye yönelik çalışmalar çok az veya mevcut değildir.

2.6.1. Antibiyotik dirençliliğinin probiyotik önemi

Probiyotik bakteriler birçok fermente gıda ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Çalışmalar üstün nitelikte bu bakteri grubunun üretimde kullanımını önermektedir. Selekte edilen kültürler ile üretilen ürünlerde kalite yüksekliği ile birlikte bu bakteri grubunun patojenler üzerinde antagonistik etkileri önem kazanmıştır. Probiyotiklerin bağırsak sisteminde bulunabilen patojen bakteriler üzerinde antagonistik etkileri de önemli bir yer tutmaktadır. Probiyotik bakterilerin bağırsak sisteminde yaşam ve bulunabilmeleri önemlidir. Bu bakterilerin pH, safra tuzlarına karşı tolerans ve dayanıklılıkları ile birlikte çeşitli antibiyotiklere karşı dirençlilikleri de seleksiyonda önemli görülmektedir [67].

Probiyotikler özellikle organizmada, gerek sağlıklı bir gelişme gerekse hastalıkların tedavisinde antibiyotiklerin yerine, doğal biyolojik ürünleri destekleyici alternatif ürünler olarak kullanılabilir. Bu sayede mikroflorada stabilite sağlandığı gibi dışarıdan alınan diğer maddelerin (ilaç, antibiyotik vb.) olumsuz etkilerinin de önüne geçilmiş olunur. Son yıllarda biyolojik sistemlerden tıp, eczacılık, endüstri, tarım ve hayvancılıkta faydalanılmaktadır. Günümüzde hem daha güvenilir, hem de daha ekonomik olması nedeniyle her dalda biyoteknolojik çalışmalara ağırlık verilmiştir. Probiyotik bakterilerinin doğal insan florasındaki olumlu etkileri düşünülerek probiyotik teknolojisinde, üstün özelliklere sahip bazı suşların kullanılarak, hastalıkların tedavisinde antibiyotiklere alternatif olması düşünülmektedir. Araştırmacılar, probiyotiklerin yalnızca tedavi amaçlı olmayıp, tıpta koruyucu amaçlı da kullanılabileceğini, ancak bunun için seçilecek suşların antibiyotiklere ve antifungal ilaçlara dirençli olmasının önemli bir kriter olduğunu bildirmişlerdir [68].

2.6.2. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlilikleri üzerine yapılan çalışmalar

Barton ve Wilksin (2001), toplam 1286 kümes hayvanı örneğinden izole ettikleri *Enterococcus* cinsine ait bakterilerin antibiyotik dirençlerini test etmişlerdir. Araştırmada, 160 izolat vankomisine karşı duyarlı bulunurken, 109 izolat vankomisine dirençli, 92 izolat ise yüksek seviyede dirençli bulunmuştur. Diğer 17 izolat ise, düşük seviyede direnç göstermiştir. *Enterococcus faecium* ise en çok izole edilen tür olarak bulunmuştur. Giraffa (2002), İsveç'te perakende satışa sunulan tavuklardan izole edilen *Enterococcus* türlerinin tetrasiklin, eritromisin ve vankomisin gibi antibiyotiklere karşı dirençli olduğunu belirlemişlerdir [69].

Lukasova ve Sustackova (2003), sucuk ve çiğ süttten izole ettikleri *Enterococcus* türlerinin, tetrasiklin, kloramfenikol, gentamisin, eritromisine karşı dirençli olduklarını belirlemişlerdir [35].

Temmerman ve arkadaşları (2003), 55 probiyotik üründen izole ettikleri toplam 268 bakterinin tanımlanmaları ve 187 suşun antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını araştırmışlardır. Bakteri suşlarının % 79'u kanamisine, % 65'inin vankomisine, %26'sının tetrasikline, %23'ünün penisilin G, % 16'sının eritromisine ve %11'inin ise kloramfenikol 'e karşı dirençlilik gösterdiğini belirlemişlerdir [3]

Aslım ve Beyatlı (2004), Türk yoğurtlarından izole edilen *S. thermophilus* soyları plazmit taşıyıcılığı ve bu türlerin antibiyotik dirençlilikleri ile ilgili yaptıkları çalışmada, *S. thermophilus*'un çoğu türlerinin gentamisine (%79) penisilinle G (%64) dirençli ve kloramfenikole (% 94) ve tetrasikline (%88) duyarlı olduğunu bulmuşlardır [70].

Herreros (2005), Armada peynirlerinden izole edilen 31 laktik asit bakterisinin antibiyotik dirençliliği ile ilgili yaptıkları araştırmada, izolatların büyük bir

çoğunluğunun cefotaksin, oksasilin, vankomisin, teicoplanin, nitrofurantoin ve trimethoprim karşı dirençli olduklarını belirlemişlerdir [71].

Çıtak ve arkadaşları (2004), yaptıkları araştırmada *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. mundtii* ve *E. hirae* türlerine ait 101 izolatın, 13 farklı antibiyotiğe karşı dirençlerini Kirby- Bover disk testi ile saptamışlar ve izolatların çoğununun streptomisin, oksasilin, eritromisin ve vankomisine karşı yüksek direnç gösterdiklerini ve beyaz peynirden izole edilen suşların %89,1'inin streptomisine, %88,1'inin oksasiline, %93'ünün eritromisin ve %86,1'inin vankomisine dirençli olduklarını bulmuşlardır [72].

Moubareck ve arkadaşları (2005), yaptıkları bir çalışmada insan, hayvan ve probiyotik ürünlerden izole edilen 50 *Bifidobacterium* türünün antibiyotik duyarlılıklarını incelenmişlerdir. Tüm *Bifidobacterium* türlerinin penisilinlere (penicilin G, amoksillin, piperasilin, ticarsillin, imipenem) ve gram (+) bakterilerde kullanılan antibiyotiklere (macrolides, klindamisin, pristinamisin, vankomisin ve teikoplanin) karşı duyarlılık gösterdikleri, bakterilerin %70 gibi oranın da fusidik asite dirençlilik gösterdiklerini bildirilmişlerdir [73].

Delgado ve arkadaşları (2005), insanların gastrointestinal sistemlerinden izole ettikleri 122 *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türüne ait bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarını incelemişlerdir. Sonuç olarak tüm türlerin kloramfenikol ve imipeneme duyarlı, metronidazole karşı dirençli olduğu bildirilmiştir. *Bifidobacterium* türleri cefoksitine duyarlı tetrasikline eritromisin ve klindamisine dirençli olduğu, *Lactobacillus* spp. 'un yarısından fazla türünün cefoksitine dirençli olduğu, bazı türlerinin eritromisin, klindamisinede dirençli olduğu belirlemişlerdir [74].

Hummel ve arkadaşları (2007), laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliği üzerine yaptıkları çalışmada, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* cinslerine ait 45 izolat üzerinde çalışmışlardır. Bu izolatlarının, 40'ünün fermente gıdalarda starter kültür olarak kullanılan, 3'ü

probiyotik 2' si ise ticari olarak kullanılan türlerden seçilmiştir. Sonuç olarak, suşların eritromisin, kloramfenikol, tetrasiklin ya da β -laktamaz dirençleri %7 gibi çok düşükken buna karşılık, aminoglikosid (gentamisin ve streptomisin) ve siprofloksasine %70 gibi yüksek direnç oluşturduğunu bildirmişlerdir [33].

Rosaria ve arkadaşları (2007), yoğurttan izole ettikleri *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait 21 türün antibiyotik dirençliliği üzerine bir araştırma yapmışlar ve çalışmada, 24 çeşit antibiyotik kullanmışlardır. Sonuç olarak, suşların ampisilin, basitrasin, klindamisin, dikloksasilin, eritromisin, novamisin, penisilin G, rifampisine duyarlı; aztreonam, kanamisin, nalidisiklik asite dirençli, cefalotin, kloramfenikol, gentamisin, linkomisin, metronidazole, neomisin, paromomisin, streptomisin, tetrasiklin ve vankomisin gibi antibiyotiklere karşı direnç gösterdiğini bulmuşlardır [75].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

3.1.1. Materyal örnekleri

Çalışmada kullanılan suşların bazıları Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür stoklarından, diğer suşlar ise Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden ve Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir. Araştırmada kullanılan suşların içeriği ve temin edildikleri kaynaklar Çizelge 3. 1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan suşların temin edildikleri kaynaklar, besiyerleri, inkübasyon dereceleri ve süreleri.

<u>Mikroorganizmalar</u>	<u>Temin Edildikleri Kaynaklar</u>	<u>İnkübasyon Derecesi ve Süresi</u>	<u>Besiyeri</u>
1. <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	G.Ü.B.B.	37°C / 24-48 saat	MRS
2. <i>L. helveticus</i> ATCC 15807	G.Ü.B.B.	37°C/ 24-48 saat	MRS
3. <i>L. bulgaricus</i> ATCC 11842	G.Ü.B.B.	37°C/ 24-48 saat	MRS
4. <i>L. bulgaricus</i> G11	G.Ü.B.B.	42°C/ 24-48 saat	MRS
5. <i>L. plantarum</i> DSM 20246	G.Ü.B.B.	37°C/ 24-48 saat	MRS
6. <i>L. plantarum</i> (RSKK NO: 02030)	G.Ü.B.B.	30°C/ 24-48 saat	MRS
7. <i>L. fermentum</i> ATCC 23271	G.Ü.B.B.	37°C/ 24-48 saat	MRS
8. <i>L. ruminis</i> ATCC 25644	G.Ü.B.B.	37°C/ 24-48 saat	MRS
9. <i>L. gasseri</i> ATCC 19992	G.Ü.B.B.	37°C/ 24-48 saat	MRS
10. <i>S. salvarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ATCC 14425	G.Ü.B.B.	42°C/ 24-48 saat	Elliker
11. <i>S. thermophilus</i> (RSKK NO: 667/01017)	R.S.K.K.	37°C/ 24-48 saat	Elliker
12. <i>Lactococcus</i> subsp. <i>cremoris</i>	A.Ü.B.B.	42°C/ 24-48 saat	Elliker
13. <i>E. faecium</i> DSM 20442	G.Ü.B.B.	37°C/ 24-48 saat	MRS
14. <i>E. faecium</i> RT 55	G.Ü.B.B.	37°C/ 24-48 saat	MRS
15. <i>E. faecium</i> RT 82	G.Ü.B.B.	37°C/ 24-48 saat	MRS
16. <i>E. fecalis</i> NCDO 581	G.Ü.B.B.	37°C/ 24-48 saat	MRS
17. <i>E. fecalis</i> RT 8	G.Ü.B.B.	37°C/ 24-48 saat	MRS
18. <i>E. fecalis</i> RT 121	G.Ü.B.B.	37°C/ 24-48 saat	MRS
19. <i>P. acidilactici</i> pedL	A.Ü.B.B.	37°C/ 24-48 saat	Elliker
20. <i>P. pentosaceus</i> CHR HANSEN	A.Ü.B.B.	37°C/ 24-48 saat	Elliker
21. <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> (RSKK NO: 06043-DSM 20346)	R.S.K.K.	30°C/ 24-48 saat	MRS
22. <i>L. mesenteroides</i> (RSKK NO:1061)	R.S.K.K.	26°C/ 24-48 saat	MRS

G.Ü.B.B. : Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı

A.Ü.B.B. : Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı

R.S.K.K. : Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Kültür Koleksiyonu

3.1.2. Besiyerleri

Araştırmada kullanılan *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve *Leconostoc* cinsi bakterilerin aktifleştirilmesinde ve deneylerin gerçekleştirilmesinde Man Rogosa ve Sharp (MRS) sıvı besiyeri kullanılmıştır [76]. Bu besiyerinin içeriği Çizelge 3. 2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. MRS besiyeri

Maddeler	g/l
Pepton	10,0
Beef Ekstrakt	10,0
Yeast Ekstrakt	5,0
Dekstroz	20,0
K ₂ HPO ₄	2,0
Na-Asetat. 3H ₂ O	5,0
Tri Amonyum Sitrat	2,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ . 4H ₂ O	0,05
Tween 80	1,08 ml

Madeler 1000 ml distile suya tamamlanmıştır. Deneyin amacına göre besiyerine %1,5 oranında agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlanmıştır. 0,01 N HCl ve/veya 0,01 N NaOH ile pH 6,2 ± 0,2'ye ayarlanarak, 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir [76].

Araştırmada kullanılan test bakterilerinin geliştirilmesi için Nutrient Broth besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerinin içeriği izelge 3.3' de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Nutrient Broth besiyeri

Maddeler	g/l
Beef Ekstrakt	1,0
Yeast Ekstrakt	2,0
Pepton	5,0
Sodyum Klorit	5,0

Madeler 1000 ml distile suya tamamlanmıştır. Deneyin amacına göre besiyerine %1,5 oranında agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlanmıştır. 0,01 M HCl ve/veya 0,01 M NaOH ile pH $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlanarak, 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir [77].

Araştırmada kullanılan *Streptococcus*, *Pediococcus* ve *Lactococcus* cinsi bakterilerinin geliştirilmesi için Elliker sıvı besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerinin içeriği izelge 3.4' de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Elliker sıvı besiyeri

Maddeler	g/l
Pepton	20,0
Glikoz	5,0
Yeast Ekstrakt	5,0
Laktoz	5,0
Sakaroz	5,0
NaCl	4,0
Sodyum Asetat	1,0
Askorbik asit	0,5

Madeler 1000 ml distile suya tamamlanmıştır. Deneyin amacına göre besiyerine %1,5 oranında agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlanmıştır. 0,01 M HCl ve/veya 0,01 M NaOH ile pH $6,8 \pm 0,2$ 'ye ayarlanarak, 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir [76].

Araştırmada dilüsyon için kullanılan serum fizyolojik çözeltisi, 0,875 g sodyum kloritin tartılarak 100 ml'ye distile su ile tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Dilüsyon çözeltisi 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

3.1.3. Bakterilerin muhafazası

1,5 ml' lik ağız kapaklı tüplere yaklaşık 400 µl gliserol (Merck) aktararak, 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiştir. Bakteriler uygun sıvı besiyerinde iki kez ard arda aktifleştirilip, aktif kültürlerden 600 µl gliserol içeren steril tüplere paralelli olarak aktarılmıştır. Suşlar derin dondurucuda -80 °C' de depolanarak, muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir [78].

3.1.4. Test bakterisi

Escherichia coli ATCC 11230, test bakterisi olarak agregasyon çalışmasında kullanılmıştır. Test bakterisi Nutrient Broth sıvı besiyerinde 37 ± 1 °C'de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Test bakterisi Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarı kültür stoklarından temin edilmiştir.

3.2. Metotlar

3.2.1. Bakteri suşlarının aktifleştirilmesi

Araştırmada LAB bakteri olarak *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Leuconostoc* cinsine dahil olan bazı türler kullanılmıştır.

Kültürler uygun besiyerlerine inoküle edilerek, uygun sıcaklıkta “30⁰–37⁰–42⁰C“ derecelerde 24 - 48 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir.

3.2.2. Bakterilerin hücre gelişiminin ve canlı hücre sayısının belirlenmesi

Aktif kültürlerin optikal yoğunluk (OD) değerleri 600 nm de 0,6±0,2'ye ayarlanarak MRS ve Elliker sıvı besi ortamına %2 oranında inoküle edilerek, aerobik koşullarda uygun inkübasyon sıcaklıklarında 24-48 saat inkübe edilmiştir. Aktifleştirilen kültürlerden 100 µl örnek alınarak önceden 900 µl serum fizyolojik çözeltisi içeren 1,5 ml'lik ependorflara aktarılmıştır. Böylece 10⁻¹ oranında seyreltilmiş kültür elde edilmiştir. Kültür vortekslenerek örneğin homojenliği sağlanmıştır. Ependorftaki örnekten 100 µl örnek alınarak aynı işlem 10⁻¹ den 10⁻⁷ 'ye kadar seri dilüsyonları hazırlanmıştır. 10⁻⁴ - 10⁻⁷ dilüsyonlarda 100 µl örnek alınarak agarlı besiyerine yayma tekniği ile ekim yapılmıştır. Petriyer uygun inkübasyon sıcaklığında, 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kolonilerin sayımları log₁₀ cfu/mL olarak tespit edilmiştir

Kob/g (cfu/g) = [Koloni sayısı×Seyreltme faktörü/Dilüsyon tüpünden petri kabına aktarılan örnek hacmi (ml)].

$$\text{Seyreltme faktörü} = [1/\text{Seyreltme oranı}] \quad (3.1)$$

3.2.3. Bakterilerin nicel asit üretimlerinin belirlenmesi

Nicel asit üretimi

Aktif laktik asit bakterileri 10 ml'lik MRS ve Elliker sıvı besi ortamına inoküle edilerek, uygun sıcaklıklarda 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 10 ml'lik kültür mezürlere aktarılarak, distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Titrasyon için 250 ml'lik cam erlene aktarılan örnekler üzerine 2-3 damla fenolfitaleyn indikatörü damlatılarak, 0,1 M NaOH

çözeltisi ile titre edilmiştir. Bakterilerin ürettiği asit titre edilebilir yüzde asitlik olarak hesaplanmıştır [79].

$$\% \text{ Asitlik} = \text{Harcanan } 0,1 \text{ N NaOH (ml)} \times 0,9 / \text{örnek (ml)} \quad (3.2)$$

Fenolfitaleyn

0,1 gram fenolfitaleyn (Merck) %60' lık etil alkolde (Merck) çözülerek hazırlanmıştır.

3.2.4. Bakterilerin eksopolisakkarit üretimlerinin incelenmesi

Laktik asit bakterileri uygun sıcaklıklarda iki kez ard arda MRS veya Elliker sıvı besi ortamında aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerin optikal yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm de $0,6 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan laktik asit bakterileri 5 ml'lik sıvı besi ortamlarına ikişer paralelli olarak %2 oranında inoküle edilerek, uygun sıcaklıklarda aerobik koşullarda 24 saat inkübe edilmiştir. Kültürlerin EPS üretimleri Marshall ve Rawson (1999)'e göre yapılmıştır [80]. Sonuçlar standart glukozu göre belirlenmiştir (mg/l). Standart 1 ml steril saf suda çözülerek hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki glukoz esas alınarak, fenol sülfürik asit metodu ile çıkarılmıştır [81].

Fenol- sülfürik asit metodu

Örneklerin üzerine 0,5 ml fenol (Sigma) ve 5 ml saf sülfürik asit (Merck) ilave edilerek, 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra iyice karıştırılmıştır. Karıştırılan örnekler 30°C'de 15–20 dk bekletildikten sonra, optik yoğunlukları 490 nm'de spektrofotometrik (Digilab Hitachi U–1800) ölçülmüştür.

EPS üretim miktarlarını belirlemek için 5–100 mg/l arasında değişen oranlarda glukoz kullanılarak standart bir eğri çıkarılmıştır. Bu standarda göre örneklerin EPS miktarları mg/l olarak belirlenmiştir [81].

3.2.5. Antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi

Araştırılan bakterilerinin antibiyotik duyarlıklarının belirlenmesinde 9 cm çapında petri kutuları kullanılmıştır. Bakterilerin yoğunlukları 0,5 McFarland'a ayarlanmış ve uygun sıvı besiyortamında aktiveleştirilip, %1 oranında katı besiyortamı üzerinde ekimleri gerçekleştirilmiştir. Aşılınmış agarlı besiyeri üzerine farklı antibiyotik diskleri yerleştirilip, uygun sıcaklıkta 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde oluşan inhibisyon zonlarının çapları milimetrik olarak ölçülmüştür [82]. Bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının saptanmasında Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) uygulanmıştır [83].

3.2.6. Bakterilerin agregasyon özelliklerinin tespiti

Uygun sıvı besiyerinde uygun sıcaklıklarda 24-48 saat aralıklarla ard arda iki kez aktiveleştirilmiş kültürler 5000 X g'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet 0,01 M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 fosfat tamponu (fosfat tamponu; %0,8 NaCl, %0,2 KCl, pH:7,2) ile 2 kez yıkanarak aynı tamponda yeniden süspansiyon edilerek OD'si spektrofotometrede 600 nm de $0,6 \pm 0,02$ 'ye ayarlanmıştır. Test bakterisi olarak kullanılan ve Nutrient sıvı besiyortamında 37°C'de 24 saat inkübasyonla geliştirilen *E. coli* ATCC 11230 için de aynı işlemler uygulanmıştır [84].

Otoagregasyon

Optikal yoğunluğu (OD) 600 nm de $0,6 \pm 0,02$ 'ye ayarlanan suşlardan 2 ml ve üçer paraleli olarak temiz tüplere alınmış aerobik çalkalamasız koşullarda 37

°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde üsteki fazdan 0,1 ml alınmış ve optikal yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm de ölçülmüştür. Eş. 3.3'de verilen formül kullanılarak bakterilerin otoagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{Otoagregasyon} = [(OD_1 - OD_2) / OD_1] \times 100 \quad (3.3)$$

OD₁: İlk optikal dansite.

OD₂: 4 saat sonraki optikal dansite.

Dört saatlik otoagregasyon süresi sonunda tüplerin alt kısımlarından 20 µl'lik örnekler alınarak preperatlar hazırlanmıştır. Tespit edilen preperatlar gram boyama yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir [85].

Koagregasyon

OD'si 600 nm de 0,6±0,02'ye ayarlanan suşlar ile ve test bakterisinden 2'şer ml alınarak ayrı bir tüp içinde 10-15 sn vortekslendikten sonra 37 °C'de 3'er paralelli olarak aerobik çalkalamasız koşullarda 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde üsteki fazdan 0,1 ml alınmış ve optikal yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm' de ölçülmüştür. Eş. 3.4'de verilen formül kullanılarak bakterilerin koagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{Koagregasyon} = [(OD_1 + OD_2) - 2(OD_3)] / (OD_1 + OD_2) \times 100 \quad (3.4)$$

OD₁: Laktik asit bakterilerinin optikal dansitesi.

OD₂: Test bakterisinin optikal dansitesi.

OD₃: Karışımın 4 saat sonundaki optikal dansitesi.

Dört saatlik koagregasyon süresi sonunda tüplerin alt kısımlarından 20 µl'lik örnekler alınarak preperatlar hazırlanmıştır. Tespit edilen preperatlar gram boyama yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir [86].

4. DENEYSEL BULGULAR

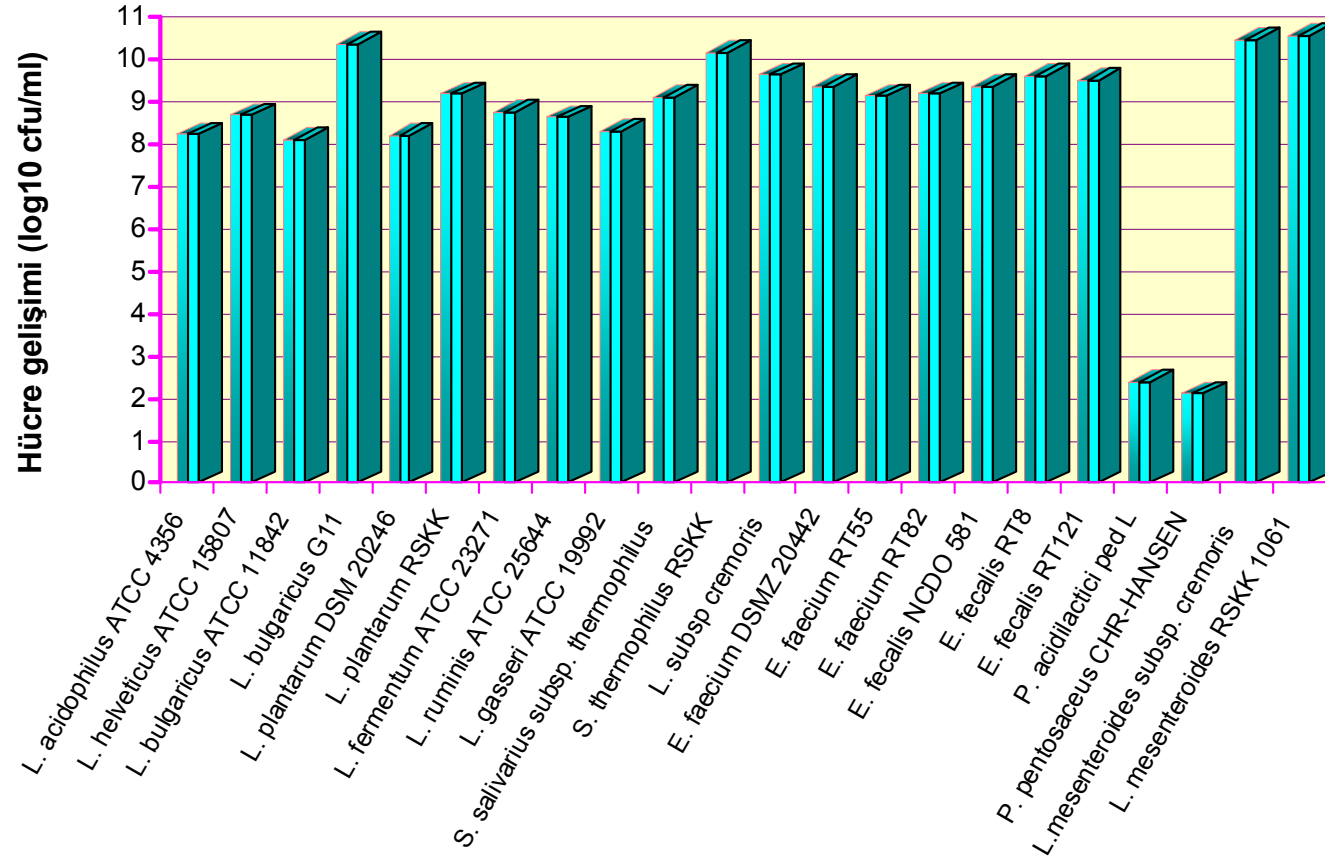
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin Hücre Gelişimlerinin Belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin hücre gelişimi belirlenmesi bölüm 3.2.2 'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Laktik asit bakterileri arasında *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Leuconostoc* cinsine dahil olan türlerinin canlı hücre gelişimleri yüksek belirlenirken, *Pediococcus* cinsi türlerin canlı hücre gelişim miktarları düşük bulunmuştur.

En yüksek hücre gelişimi *Leuconostoc mesenteroides* RSKK 1061 (\log_{10} 10,55 cfu/ml), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* RSKK 06043-DSM 20346 (\log_{10} 10,5 cfu/ml) ve *Lactobacillus bulgaricus* G11 (\log_{10} 10,4 cfu/ml) 'de görülmüştür. En düşük hücre gelişim miktarı ise *Pediococcus pentosaceus* CHR-HANSEN (\log_{10} 2,1 cfu/ml) ve *Pediococcus acidilactici* ped L (\log_{10} 2,4 cfu/ml) kültürlerinde belirlenmiştir. Ayrıca, *Lactobacillus* cinsi arasında en yüksek hücre gelişimini *Lactobacillus bulgaricus* G11 (\log_{10} 10,4 cfu/ml) suşunda belirlenmiş ve *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842 kültüründen daha yüksek bir hücre gelişimi (\log_{10} 8,1 cfu/ml) göstermiştir. *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 (\log_{10} 8,2 cfu/ml) kültürü, *Lactobacillus plantarum* RSKK 02030 (\log_{10} 9,2 cfu/ml) suşundan daha düşük hücre gelişimi göstermiştir. *Streptococcus thermophilus* RSKK 667/01017 (\log_{10} 10,2 cfu/ml) suşu yüksek hücre gelişimi gösterirken, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 14425 kültürü (\log_{10} 9,1 cfu/ml) düşük hücre gelişimi göstermiştir. *Enterococcus* cinsi bakterilerinden *Enterococcus faecium* DSM 20442 (\log_{10} 9,4 cfu/ml), *E. faecium* RT 55 (\log_{10} 9,1 cfu/ml) ve *E. faecium* RT 82 (\log_{10} 9,2 cfu/ml) hücre gelişimleri gösterdiği belirlenmiştir. *Enterococcus fecalis* NCDO 581 \log_{10} 9,4 cfu/ml, *E. fecalis* RT 8 \log_{10} 9,6 cfu/ml ve *E. fecalis* 121 \log_{10} 9,5 cfu/ml hücre gelişimleri göstermiştir.

Çalışmada kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin hücre gelişimi garfikleri Şekil 4.1'de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Bazı laktik asit bakterilerinin hücre gelişimleri (log₁₀ cfu/ml).

4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Asit Üretim Yeteneğinin ve Son Kültür pH Değerlerinin Belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin asit oluşturma yeteneği ile son kültür pH değerlerinin belirlenmesi bölüm 3.2.3 ve 3.2.4' de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Laktik asit bakterilerinin besi ortamındaki son kültür pH değerleri ortalama olarak birbirine yakın değerlerde bulunmuştur. Uygun besiyeri ortamlarında üretilen suş ve kültürlerin pH değer dağılımı Şekil 4.2 ve Çizelge 4.1.' de sunulmuştur.

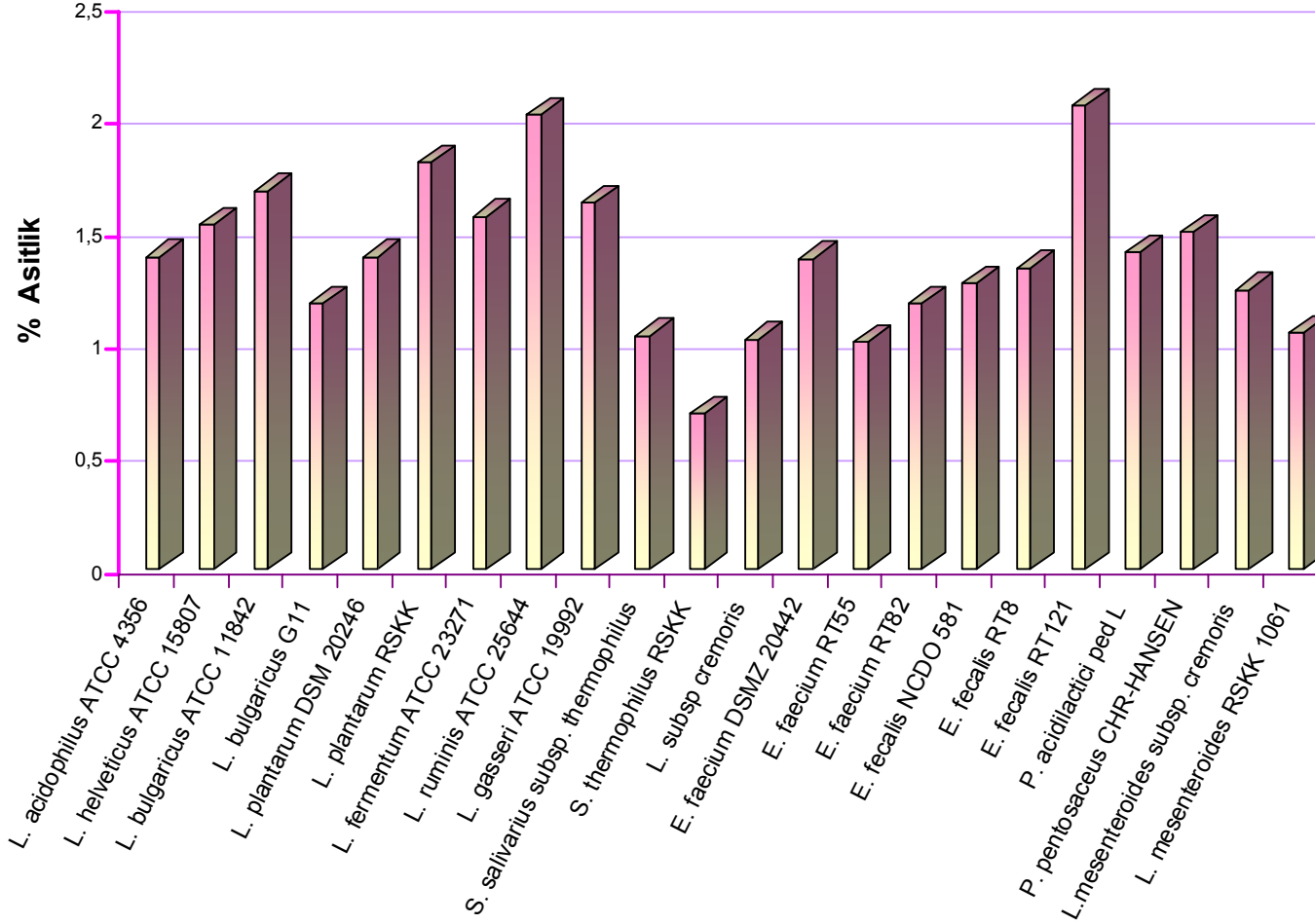
Çizelge 4.1. Laktik asit bakterilerinin son kültür pH değerleri.

Bakteriler	Son Kültür pH
1. <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	4,50 ± 0,01
2. <i>L. helveticus</i> ATCC 15807	4,04 ± 0,01
3. <i>L. bulgaricus</i> ATCC 11842	4,26 ± 0,01
4. <i>L. bulgaricus</i> G11	4,73 ± 0,01
5. <i>L. plantarum</i> DSM 20246	4,51 ± 0,01
6. <i>L. plantarum</i> (RSKK NO: 02030)	4,31 ± 0,01
7. <i>L. fermentum</i> ATCC 23271	4,44 ± 0,01
8. <i>L. ruminis</i> ATCC 25644	4,43 ± 0,01
9. <i>L. gasseri</i> ATCC 19992	4,42 ± 0,01
10. <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ATCC 14425	4,32 ± 0,01
11. <i>S. thermophilus</i> (RSKK NO: 667/01017)	4,44 ± 0,01
12. <i>Lactococcus</i> subsp. <i>cremoris</i>	4,22 ± 0,01
13. <i>E. faecium</i> DSM 20442	4,95 ± 0,01
14. <i>E. faecium</i> RT 55	4,73 ± 0,00
15. <i>E. faecium</i> RT 82	4,60 ± 0,04
16. <i>E. fecalis</i> NCDO 581	4,78 ± 0,01
17. <i>E. fecalis</i> RT 8	4,39 ± 0,01
18. <i>E. fecalis</i> RT 121	4,05 ± 0,01
19. <i>P. acidilactici</i> pedL	4,47 ± 0,00
20. <i>P. pentosaceus</i> CHR HANSEN	4,11 ± 0,01
21. <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> (RSKK NO: 06043-DSM 20346)	4,62 ± 0,01
22. <i>L. mesenteroides</i> (RSKK NO: 1061)	4,55 ± 0,01

Uygun sıvı besi ortamında ve uygun inkübasyon sürelerindeki kültürlerin titre edilebilir yüzde asit miktarları en düşük %0,69 (*Streptococcus thermophilus* RSKK) ve en yüksek %2,06 (*Enterococcus faecalis* RT121) suşlarında belirlenmiştir. Laktik asit bakterilerinin bazı suşlarının ürettiği nicel asit miktarları Çizelge 4.2. ve Şekil 4.2’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Laktik asit bakterilerinin ürettikleri yüzde asit miktarları.

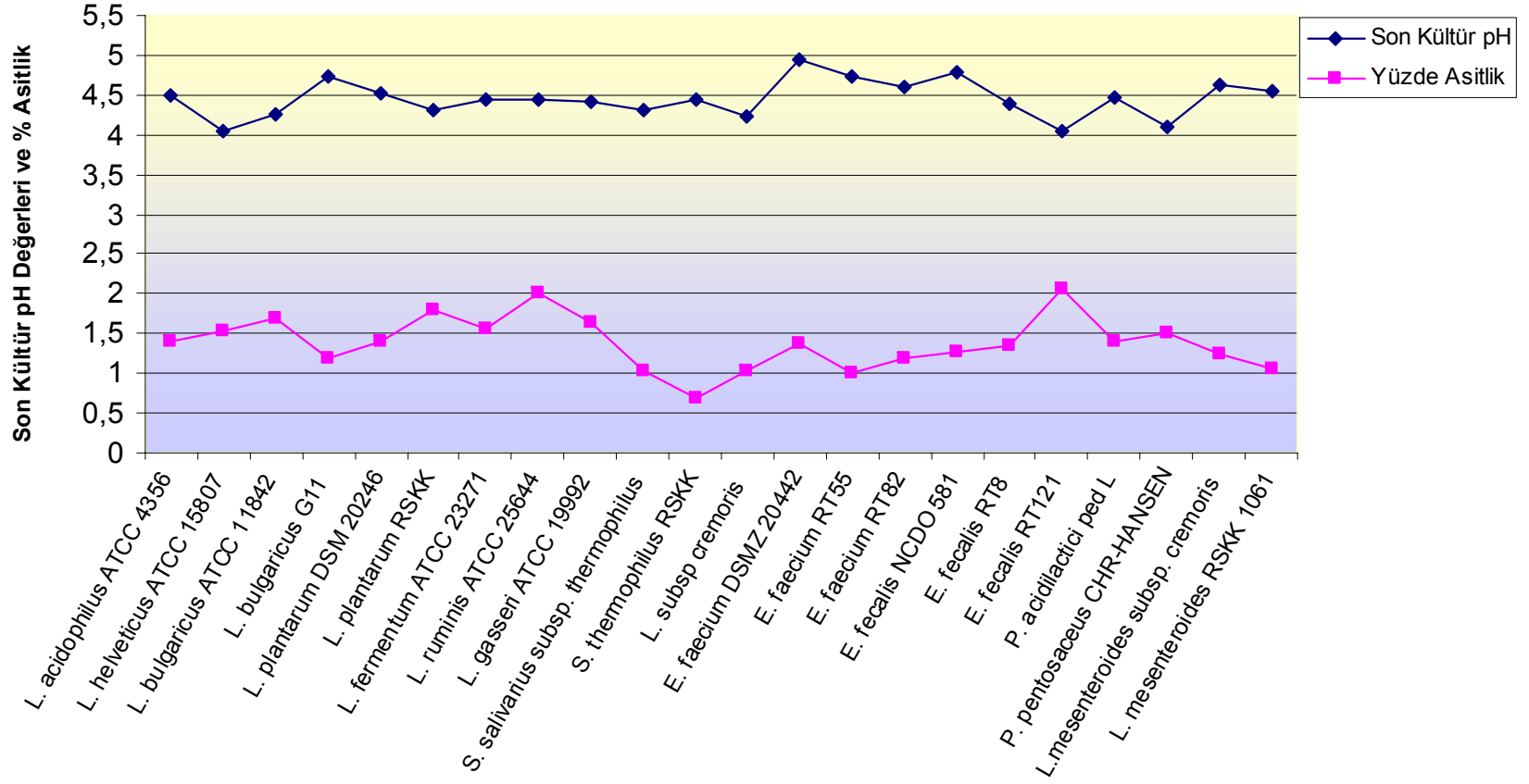
Bakteriler	% Asit Miktarları
1. <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	1,39 ± 0,01
2. <i>L. helveticus</i> ATCC 15807	1,53 ± 0,09
3. <i>L. bulgaricus</i> ATCC 11842	1,68 ± 0,01
4. <i>L. bulgaricus</i> G11	1,18 ± 0,06
5. <i>L. plantarum</i> DSM 20246	1,39 ± 0,01
6. <i>L. plantarum</i> (RSKK NO: 02030)	1,81 ± 0,01
7. <i>L. fermentum</i> ATCC 23271	1,57 ± 0,18
8. <i>L. ruminis</i> ATCC 25644	2,02 ± 0,01
9. <i>L. gasseri</i> ATCC 19992	1,63 ± 0,01
10. <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ATCC 14425	1,04 ± 0,02
11. <i>S. thermophilus</i> (RSKK NO: 667/01017)	0,69 ± 0,01
12. <i>L. subsp. cremoris</i>	1,02 ± 0,04
13. <i>E. faecium</i> DSM 20442	1,38 ± 0,31
14. <i>E. faecium</i> RT 55	1,01 ± 0,01
15. <i>E. faecium</i> RT 82	1,18 ± 0,01
16. <i>E. faecalis</i> NCDO 581	1,27 ± 0,01
17. <i>E. faecalis</i> RT 8	1,34 ± 0,03
18. <i>E. faecalis</i> RT 121	2,06 ± 0,01
19. <i>P. acidilactici</i> ped L	1,41 ± 0,01
20. <i>P. pentosaceus</i> CHR-HANSEN	1,50 ± 0,01
21. <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> (RSKK NO: 06043 DSM 20346)	1,24 ± 0,27
22. <i>L. mesenteroides</i> (RSKK NO: 1061)	1,05 ± 0,01



Şekil 4.2. Laktik asit bakterilerinin ürettikleri yüzde asit miktarları.

Uygun besiortamlarında 4 günlük inkübasyon sonunda kütlülerin son kültür pH değerlerinin 4,0 – 5,0 arasında olduğu tespit edilmiştir. Son kültür pH'ları en yüksek *Enterococcus faecium* DSM 20442 (pH 5,0) ve en düşük (pH 4,0) *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 kültürlerinde belirlenmiştir. *Lactobacillus bulgaricus* G11 suşunun son kültür pH değeri 4,7 iken *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842 kültürünün pH değeri 4,3 olarak belirlenmiştir. *Lactobacillus plantarum* RSKK 02030 suşunun pH değerinin (pH 4,3), *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 (pH 4,5) kültüründen daha düşük olduğu görülmüştür. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 14425 (pH 4,3) kültürünün son kültür pH değerinin *Streptococcus thermophilus* RSKK 667/01017 (pH 4,4) suşuyla yakınlık gösterdiği belirlenmiştir. *Enterococcus faecium* RT 55 (pH 4,7) ve *Enterococcus faecium* RT 82 (pH 4,6) suşlarının son kültür pH'larının, *Enterococcus faecium* DSM 20442 (pH 5,0) kültüründen düşük olduğu belirlenmiştir. *Enterococcus fecalis* NCDO 581 (pH 4,8) kültürünün ise *Enterococcus fecalis* RT 8 (pH 4,4) ve *Enterococcus fecalis* RT 121 (pH 4,1) suşlarından daha yüksek son kültür pH değeri gösterdiği belirlenmiştir. *Pediococcus pentosaceus* CHR-HANSEN düşük (pH 4,1) gösterirken, *Pediococcus acidilactici* ped L yüksek (pH 4,5) pH değeri göstermiştir. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* RSKK 06043-DSM 20346 (pH 4,6) ve *Leuconostoc mesenteroides* RSKK 1061 (pH 4,6) suşlarının benzer son kültür pH değerleri göstermiştir. Laktik asit bakterilerinin ürettikleri yüzde asit miktarları Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Normal ortamda laktik asit bakterilerinin bazı suşlarının üretmiş olduğu nicel asit miktarları ile son kültür pH değerlerinin grafiği Şekil 4.3 'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Laktik asit bakterilerinin son kültür pH değerleri ve ürettikleri yüzde asit miktarlarının karşılaştırılması.

* p < 0,01

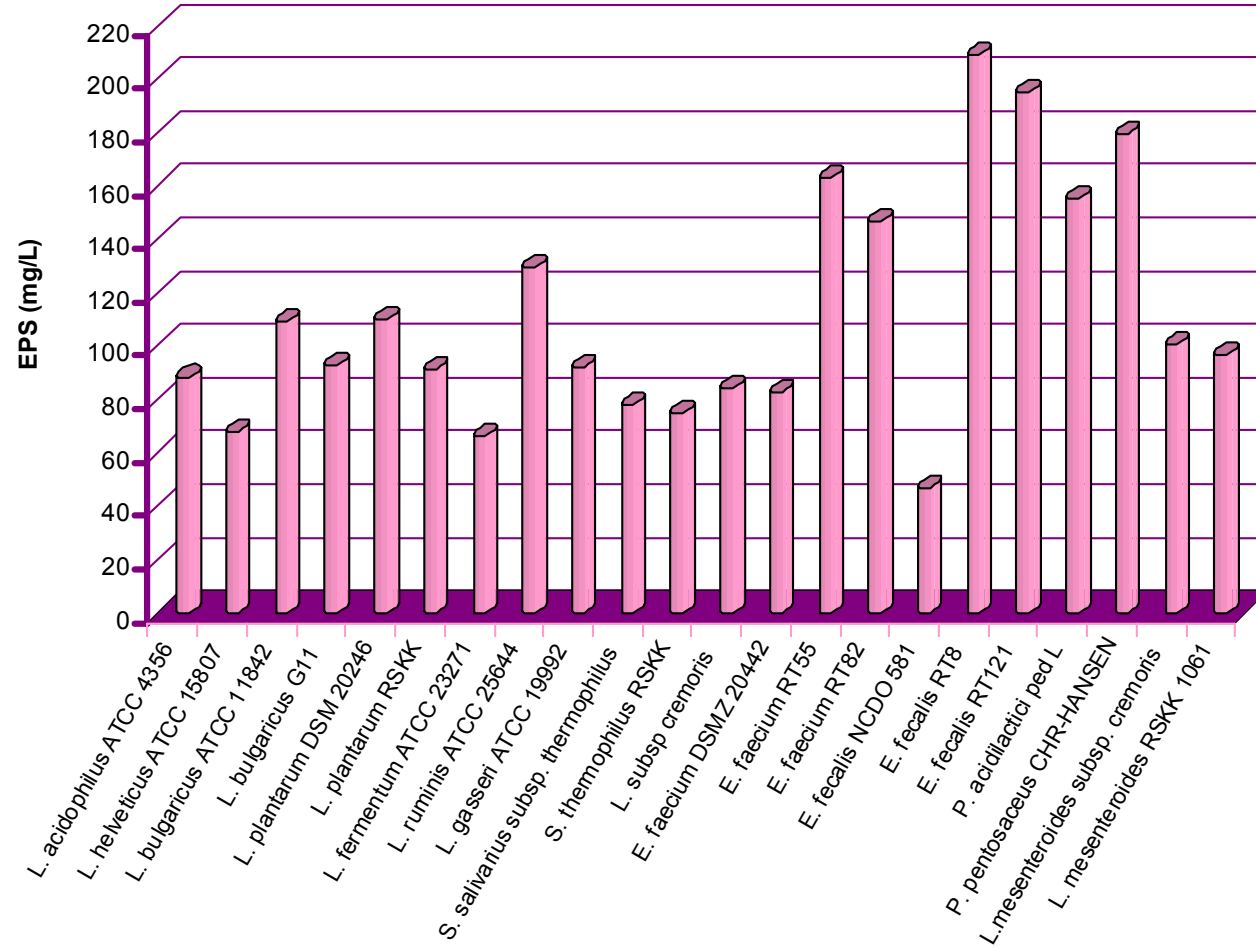
4.3. Laktik Asit Bakterilerinin EPS Üretimlerinin Tespiti

Laktik asit bakterilerinin ürettiği EPS miktarlarının tespiti bölüm 3.2.5. 'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Suşların uygun besi ortamlarında ve uygun inkübasyon sürelerinde EPS üretimleri 46,42 mg/l ve 208,88 mg/l arasında belirlenmiştir. En yüksek EPS üretimi *Enterococcus faecalis* RT8 suşunda tespit edilirken, en düşük EPS miktarı *Enterococcus faecalis* NCDO 581 kültüründe belirlenmiştir. Diğer suşların EPS miktarları Çizelge 4.3. ve Şekil 4.4.' de verilmiştir.

Çalışmada kullanılan *Lactobacillus* cinsi bakterilerden en yüksek EPS üretimi *Lactobacillus ruminis* ATCC 25644 (129,4 mg/l) kültüründe tespit edilmiştir. *Lactobacillus bulgaricus* G11 (93,1 mg/l) düşük EPS üretimi gösterirken, *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842 (109,1 mg/l) kültürünün yüksek EPS üretimi gösterdiği belirlenmiştir. *Lactobacillus plantarum* RSKK 02030 suşunun ürettiği EPS miktarının (91,3 mg/l), *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 (110,0 mg/l) kültürünün ürettiği EPS miktarından daha düşük olduğu görülmüştür. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 14425 (78,0 mg/l) kültürünün ürettiği EPS'nin *Streptococcus thermophilus* RSKK 667/01017 (74,7 mg/l) suşunun ürettiği EPS'den daha yüksek olduğu gözlenmiştir. *Enterococcus faecium* RT 55 (163,3 mg/l) ve *Enterococcus faecium* RT 82 (146,4 mg/l) suşlarının ürettikleri EPS miktarlarının, *Enterococcus faecium* DSM 20442 (82,4 mg/l) kültüründen daha yüksek olduğu bulunmuştur. *Enterococcus faecalis* NCDO 581 (46,4 mg/l) kültürü *Enterococcus faecalis* RT 8 (208,9 mg/l) ve *Enterococcus faecalis* RT 121 (195,4 mg/l) suşlarından daha düşük EPS üretimi gerçekleştirmiştir. *Pediococcus pentosaceus* CHR-HANSEN (179,6 mg/l) yüksek EPS üretimi gösterirken, *Pediococcus acidilactici* pedL (155,2 mg/l) daha düşük EPS üretmiştir. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* RSKK 06043-DSM 20346 (100,5 mg/l) EPS üretimi ile *Leuconostoc mesenteroides* RSKK 1061 suşundan biraz daha yüksek (96,9 mg/l) EPS üretimi göstermiştir.

Suşların hücre gelişimleri arasında önemli büyük değer farklılıkları gözlenmezken, hücre gelişiminin EPS üretimini fazla etkilemediği anlaşılmıştır.(şekil 4.5) Ayrıca suşların EPS üretimlerinin referans kültürlerden daha yüksek olduğu bulunmuştur.

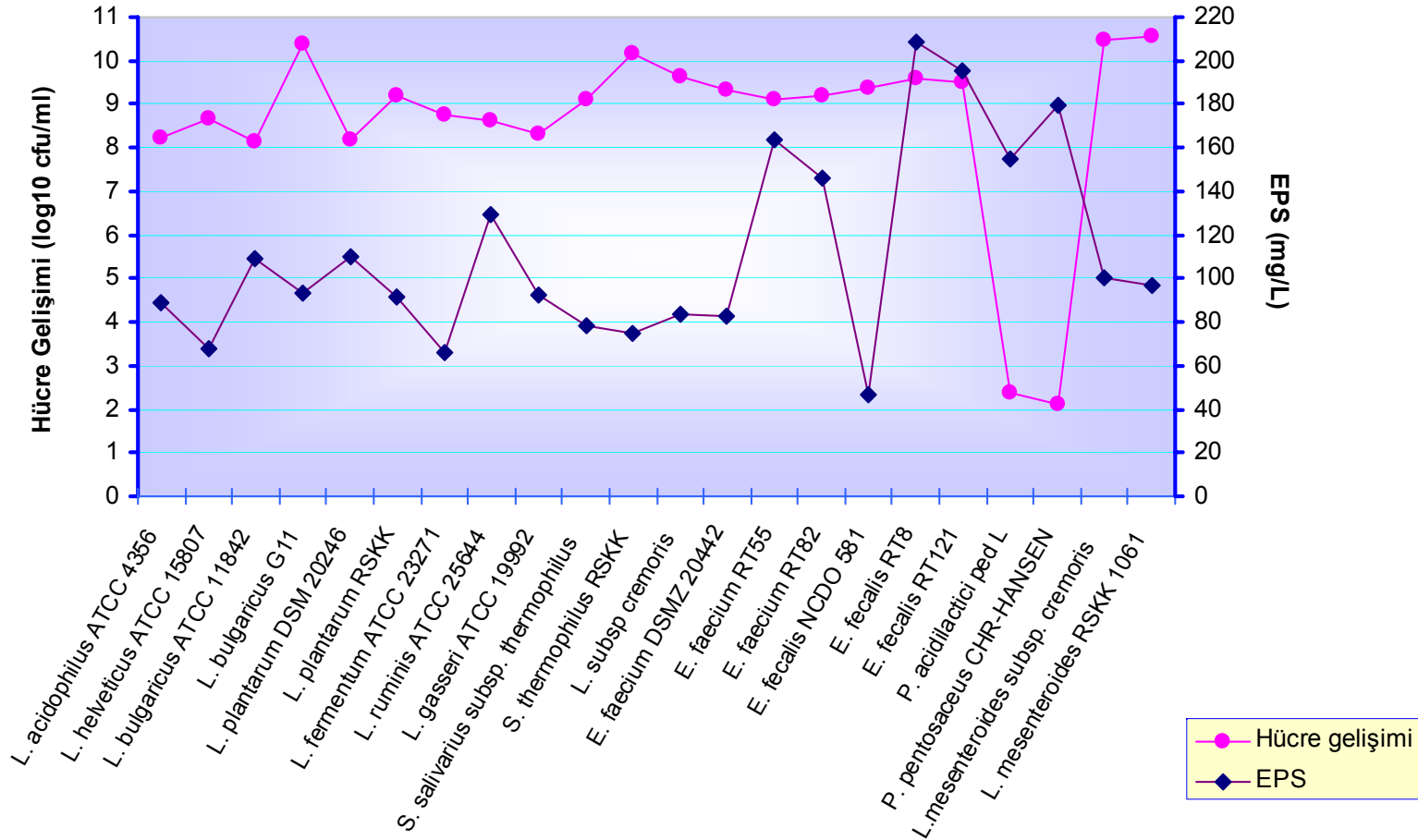


Şekil 4.4. Laktik asit bakterilerinin ürettikleri EPS miktarları.

Çizelge 4.3. Laktik asit bakterilerinin hücre gelişimleri ile ürettikleri EPS'lerin değerleri.

Laktik Asit Bakterileri	Hücre gelişimi log ₁₀ cfu/ml	EPS üretim miktarı (mg/L)
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	8,24 ± 0,06	88,50 ± 3,30
<i>L. helveticus</i> ATCC 15807	8,68 ± 0,33	67,50 ± 2,90
<i>L. bulgaricus</i> ATCC 11842	8,12 ± 0,25	109,06 ± 0,57
<i>L. bulgaricus</i> G11	10,38 ± 0,32	93,07 ± 0,33
<i>L. plantarum</i> DSM 20246	8,20 ± 0,11	110,00 ± 5,60
<i>L. plantarum</i> RSKK	9,19 ± 0,16	91,33 ± 0,50
<i>L. fermentum</i> ATCC 23271	8,77 ± 0,64	66,00 ± 3,48
<i>L. ruminis</i> ATCC 25644	8,63 ± 0,20	129,37 ± 0,72
<i>L. gasseri</i> ATCC 19992	8,30 ± 0,29	92,00 ± 2,30
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ATCC 14425	9,10 ± 0,19	78,00 ± 6,67
<i>S. thermophilus</i> RSKK	10,17 ± 0,45	74,70 ± 0,99
<i>L. subsp cremoris</i>	9,63 ± 0,13	83,90 ± 7,77
<i>E. faecium</i> DSMZ 20442	9,35 ± 0,23	82,41 ± 3,30
<i>E. faecium</i> RT 55	9,13 ± 0,33	163,25 ± 1,22
<i>E. faecium</i> RT 82	9,18 ± 0,13	146,38 ± 4,57
<i>E. fecalis</i> NCDO 581	9,37 ± 0,20	46,42 ± 4,78
<i>E. fecalis</i> RT 8	9,18 ± 0,37	208,88 ± 0,33
<i>E. fecalis</i> RT 121	9,51 ± 0,22	195,44 ± 7,40
<i>P. acidilactici</i> ped L	2,39 ± 0,08	155,15 ± 6,58
<i>P. pentosaceus</i> CHR-HANSEN	2,11 ± 0,01	179,55 ± 2,90
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> (RSKK NO: 06043 DSM 20346)	10,48 ± 0,14	100,51 ± 5,26
<i>L. mesenteroides</i> (RSKK NO:1061)	10,55 ± 0,23	96,91 ± 1,15

* Sonuçlar arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.



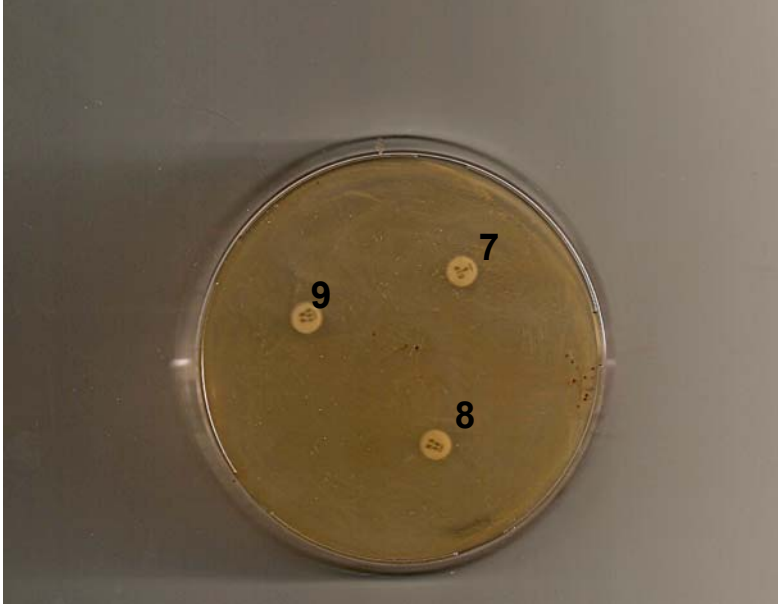
Şekil 4.5. Laktik asit bakterilerinin hücre gelişimleri ile ürettikleri EPS'lerin grafiği.

* Sonuçlar arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

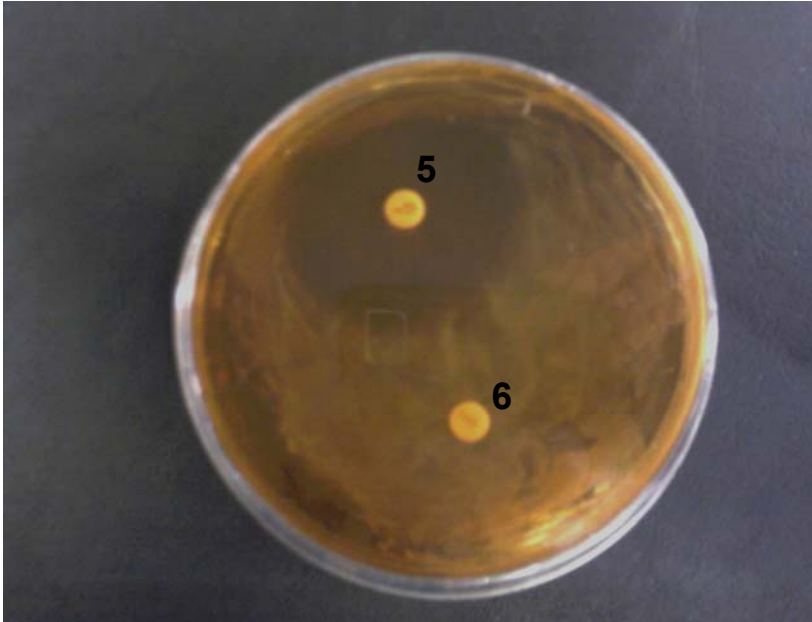
4.4. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin hücre duvar sentezini inhibe eden penisilin (10 unit), vankomisin (30 µg) ve ampisilin (10 µg); protein sentezini inhibe eden tetrasiklin (30 µg), streptomisin (10 µg), gentamisin (10 µg), kloramfenikol (30 µg) ve kanamisin (30 µg); nükleik asit sentezini inhibe eden trimetoprim (5 µg), nalidiksik asit (30 µg), siprofloksasin (5 µg) ve rifampisin (5 µg), sitoplazmik zar sentezini inhibe eden polimiksin-B (300 U) antibiyotiklerine duyarlılıkları disk difüzyon yöntemine göre bölüm 3.2.6.' da anlatıldığı gibi belirlenmiş sonuçlar CLSI standardına (Çizelge 4.4.) göre değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5.). Bu bakterilerin antibiyotiklere göstermiş oldukları yüzde duyarlılık oranları Çizelge 4.6. ve Şekil 4.6.' da verilmiştir.

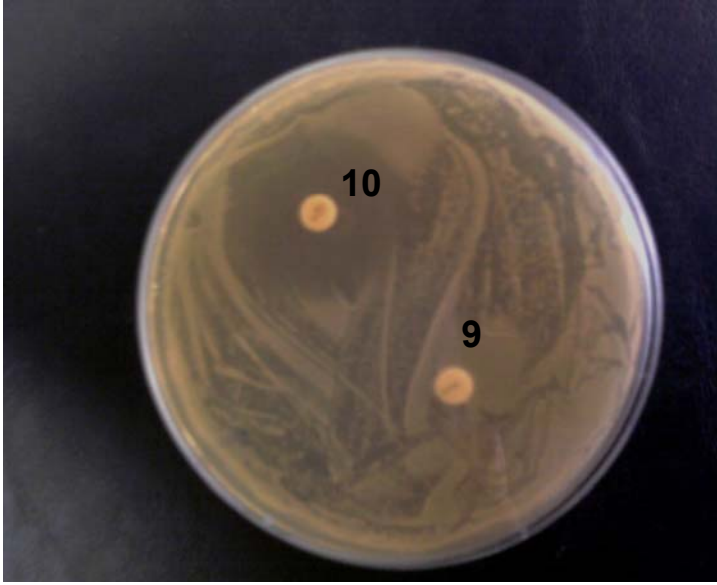
Araştırılan suşların tümü nalidiksik asid, polimiksin B ve kanamisin dışında tüm antibiyotiklere %9 ile % 95 oranında yüksek duyarlılık gösterdikleri tespit edilmiştir. Tetrasiklin (%95), amfisilin (%86), nükleik asit sentezini inhibe eden rifampisin (%86) ve protein sentezini inhibe eden kloramfenikol (%95) antibiyotikleri en yüksek duyarlılık gösteren antibiyotikler olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Çalışılan bütün suşların kullanılan antibiyotiklerden nalidiksik asid, polimiksin B ve kanamisin antibiyotiklerine genel olarak dirençli olduğu görülmüştür (Çizelge 4.5). *Enterococcus fecalis* RT8 suşunun siprofloksasin, nalidiksik asid ve polimiksin B antibiyotik disklere göstermiş olduğu direnç Resim 4.1'de; vankomisin antibiyotik diskine karşı gösterdiği direnç ve kloramfenikol antibiyotik diskine karşı oluşturduğu inhibisyon zonu Resim 4.2' de gösterilmiştir. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 14425 kültürünün polimiksin B antibiyotik diskine gösterdiği direnç ve trimetoprim antibiyotik diskine karşı oluşturduğu inhibisyon zonu Resim 4.3'de gösterilmiştir. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 kültürünün streptomisin antibiyotik diskine karşı gösterdiği dirençlilik ve gentamisin antibiyotik diskine karşı oluşturduğu inhibisyon zonu Resim 4.4'de gösterilmiştir.



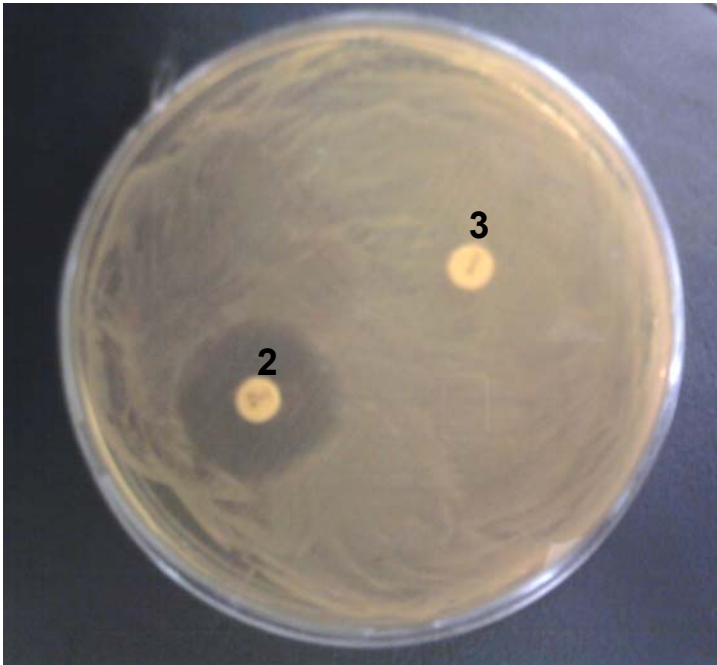
Resim 4.1. *Enterococcus fecalis* RT8 suşunun antibiyotik disklere göstermiş olduğu direnç. 7(CIP): Siprofloksasin, 8(NA):Nalidiksik asid,9(PB): Polimiksin B.



Resim 4.2. *Enterococcus fecalis* RT8 suşunun vankomisin antibiyotik diskine karşı gösterdiği direnç; kloramfenikol antibiyotik diskine karşı oluşturduğu inhibisyon zonu. 5(C):Kloramfenikol, 6(VAN):Vankomisin.

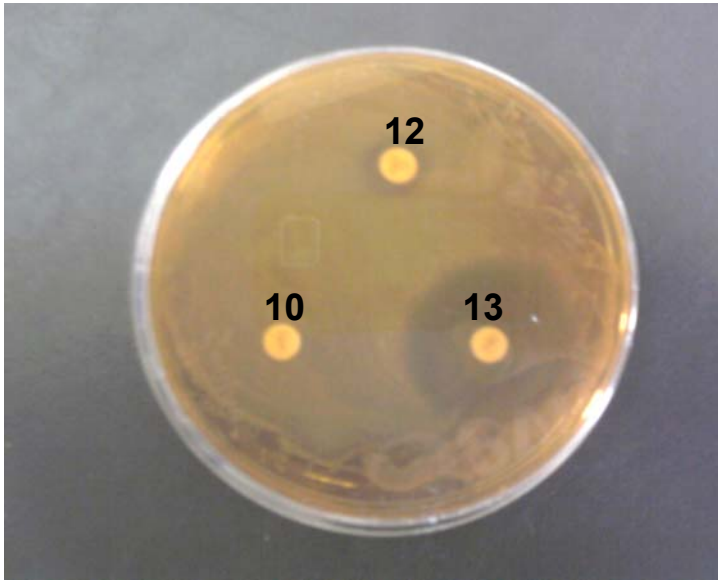


Resim 4.3. *Streptococcus salvarius* subsp. *thermophilus* ATCC 14425 kültürünün polimiksin B antibiyotik diskine gösterdiği direnç ve trimetoprim antibiyotik diskine karşı oluşturduğu inhibisyon zonu. 9(PB):Polimiksin B, 10(TMP):Trimetoprim.



Resim 4.4. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 kültürünün streptomisin antibiyotik diskine karşı gösterdiği dirençlilik ve gentamisin antibiyotik diskine karşı oluşturduğu inhibisyon zonu. 2(CN):Gentamisin, 3(S):Streptomisin.

Araştırmalar sonucunda laktik asit bakterilerinin hücre duvarı sentezi inhibe eden amfisilin (%13) ve nükleik asit sentezini inhibe eden rifampisin (%4) antibiyotiklerine düşük seviyede dirençli oldukları bulunmuştur. En yüksek dirençlilik nükleik asit sentezini inhibe eden nalidiksik asit (%100), stoplazmik zar sentezini inhibe eden polimiksin B (%100) ve protein sentezini inhibe eden kanamisin (%100) antibiyotiklerine karşı tespit edilmiştir. En düşük dirençlilik %4 oranında rifampisin antibiyotiğinde gözlenmiştir. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (RSKK 06043 – DSM 20346) suşunun kanamisin ve trimetoprim antibiyotik disklerine karşı gösterdiği dirençlilik; penisilin G antibiyotik diskine karşı oluşturduğu inhibisyon zonu Resim 4.5'de gösterilmiştir.



Resim 4.5. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (RSKK 06043 – DSM 20346) suşunun kanamisin ve trimetoprim antibiyotik disklerine karşı gösterdiği dirençlilik; penisilin G antibiyotik diskine karşı oluşturduğu inhibisyon zonu.

10(TMP):Trimetoprim, 12(K):Kanamisin, 13(P):Penisilin G.

Çizelge 4.4. CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi.

No	Etki Mekanizması	Antibiyotik	Dirençli	Orta derece duyarlı	Duyarlı
1.	Protein sentezi inhibitörü	Tetracycline	≤ 14	15 - 18	≥ 19
2.	Protein sentezi inhibitörü	Gentamycin	≤ 12	-	≥ 13
3.	Protein sentezi inhibitörü	Streptomycin	≤ 11	12-14	≥ 15
4.	Hücre duvarı sentezi inhibitörü	Ampicillin	≤ 12	13 - 15	≥ 16
5.	Protein sentezi inhibitörü	Chloramphenicol	≤ 13	14 - 17	≥ 18
6.	Hücre duvarı sentezi inhibitörü	Vancomycin	≤ 14	15 - 16	≥ 17
7.	Nükleik asit sentezi inhibitörü	Ciprofloxacin	≤ 13	14 - 18	≥ 19
8.	Nükleik asit sentezi inhibitörü	Nalidixic acid	≤ 13	14 - 17	≥ 18
9.	Sitoplazmik zar sentezi inhibitörü	Polymyxin B	≤ 8	9 - 11	≥ 12
10.	Nükleik asit sentezi inhibitörü	Trimethoprim	≤ 11	12-14	≥ 15
11.	Nükleik asit sentezi inhibitörü	Rifampicin	≤ 14	15 - 17	≥ 18
12.	Protein sentezi inhibitörü	Kanamycin	≤ 13	14 - 17	≥ 18
13.	Hücre duvarı sentezi inhibitörü	Penicillin G	≤ 19	20 - 27	≥ 28

Çizelge 4.5. Bakterilerin antibiyotik disklerine gösterdiği duyarlılık test sonuçları.

Bakteriler	Antibiyotikler	TE 30 µg	CN 10 µg	S 10 µg	AMP 10 µg	C 30 µg	VAN 30 µg	CIP 30 µg	NA 30 µg	PB 300 U	TMP 5 µg	RD 5 µg	K 30 µg	P (G) 10 U
1. <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356		++	-	-	++	++	++	-	-	-	-	++	-	++
2. <i>L. helveticus</i> ATCC 15807		++	++	-	++	++	-	-	-	-	++	++	-	+
3. <i>L. bulgaricus</i> ATCC 11842		++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	++	-	++
4. <i>L. bulgaricus</i> G11		++	-	-	++	++	++	+	-	-	-	-	-	+
5. <i>L. plantarum</i> DSM 20246		++	-	-	++	++	++	-	-	-	-	++	-	++
6. <i>L. plantarum</i> (RSKK NO: 02030)		++	++	-	++	++	-	-	-	-	++	++	-	++
7. <i>L. fermentum</i> ATCC 23271		++	-	-	++	++	-	-	-	-	++	++	-	++
8. <i>L. ruminis</i> ATCC 25644		++	-	-	++	++	-	-	-	-	++	++	-	++
9. <i>L. gasseri</i> ATCC 19992		++	++	-	++	++	-	-	-	-	++	++	-	++
10. <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ATCC 14425		++	++	++	++	++	++	+	-	-	++	++	-	+
11. <i>S. thermophilus</i> (RSKK NO: 667/01017)		++	++	-	-	++	++	++	-	-	++	++	-	+

++ : Duyarlı, + : Orta Derece Duyarlı, - : Dirençli

Çizelge 4.5. (Devamı) Bakterilerin antibiyotiklere gösterdiği duyarlılık test sonuçları.

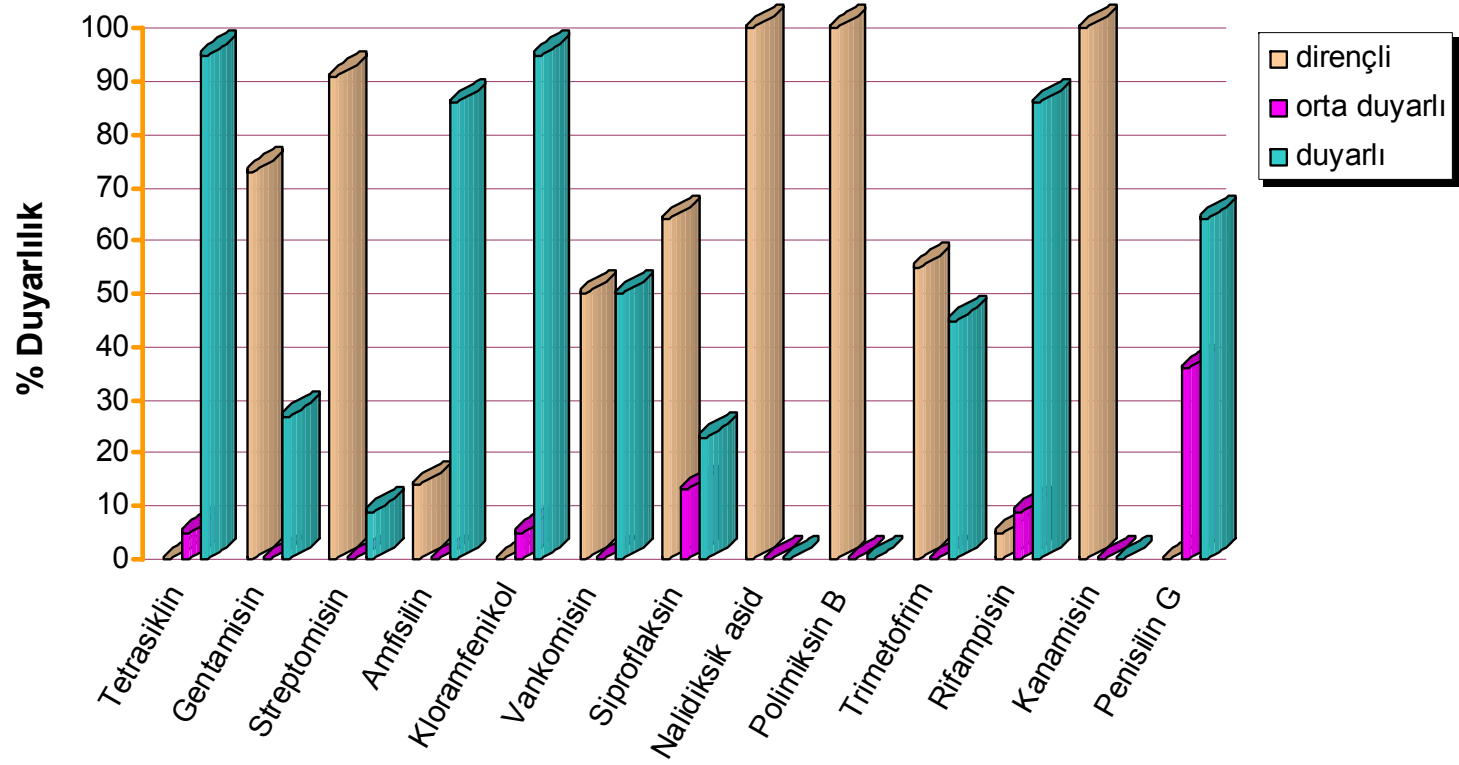
Bakteriler	Antibiyotikler	TE 30 µg	CN 10 µg	S 10 µg	AMP 10 µg	C 30 µg	VAN 30 µg	CIP 30 µg	NA 30 µg	PB 300 U	TMP 5 µg	RD 5 µg	K 30 µg	P (G) 10 U
12. <i>L. subsp. cremoris</i>		++	-	-	++	++	++	++	-	-	-	++	-	++
13. <i>E. faecium</i> DSMZ 20442		++	-	-	++	++	++	++	-	-	++	+	-	++
14. <i>E. faecium</i> RT 55		++	-	-	++	++	++	+	-	-	-	++	-	++
15. <i>E. faecium</i> 82		++	-	-	++	++	++	++	-	-	++	++	-	++
16. <i>E. fecalis</i> NCDO 581		++	-	-	++	+	++	++	-	-	-	+	-	+
17. <i>E. fecalis</i> RT 8		++	-	-	++	++	-	-	-	-	-	++	-	+
18. <i>E. fecalis</i> 121		++	-	-	++	++	-	-	-	-	++	++	-	+
19. <i>P. acidilactici</i> ped L		++	-	-	++	++	-	-	-	-	-	++	-	++
20. <i>P. pentosaceus</i> CHR HANSEN		+	-	-	++	++	-	-	-	-	-	++	-	+
21. <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> (RSKK NO: 06043-DSM 20346)		++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-	++
22. <i>L. mesenteroides</i> (RSKK NO: 1061)		++	-	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-	++

+ + : Duyarlı, + : Orta Derece Duyarlı, - : Dirençli

Çizelge 4.6. Bakterilerin antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları.

Antibiyotikler	Dirençli (-)	Orta Derece Duyarlı (+)	Duyarlı (++)
Tetrasiklin (TE) 30 µg	0	5	95
Gentamisin (CN) 10 µg	73	0	27
Streptomisin (S) 10 µg	91	0	9
Amfisillin (AMP) 10 µg	14	0	86
Kloramfenikol (C) 30 µg	0	5	95
Vankomisin (VAN) 30 µg	50	0	50
Siprofloksasin (CIP) 30 µg	64	13	23
Nalidiksik asid (NA) 30 µg	100	0	0
Polymiksin B (PB) 300 U	100	0	0
Trimetoprim (TMP) 5 µg	55	0	45
Rifampisin (RD) 5 µg	5	9	86
Kanamisin (K) 30 µg	100	0	0
Penisilin G (P) 10 U	0	36	64

+ + : Duyarlı, + : Orta Derece Duyarlı, - : Dirençli



Şekil 4.6. Bakterilerin antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları.

En yüksek EPS üretimi gösteren *Enterococcus faecalis* RT 8 suşunun, protein sentezini inhibe eden tetrasiklin ve kloramfenikol, nükleik asit sentezini inhibe eden rifampisin ve hücre duvarı sentezini inhibe eden amfisilin antibiyotiklerine yüksek duyarlılık gösterdiği, yine hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotik grubunda yer alan penisilin G antibiyotiğine ise orta dereceli duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Protein sentezini inhibe eden gentamisin, streptomisin ve kanamisin, nükleik asit sentezini inhibe eden trimetoprim, siprofloksasin ve nalidiksik asid, hücre duvarı sentezini inhibe eden vankomisin antibiyotiklerine ise *Enterococcus faecalis* RT 8 suşu yüksek direnç göstermiştir.

Enterococcus faecalis RT 8 suşu en yüksek 208,88 mg/l EPS üretirken denenen 13 adet farklı antibiyotiklere karşı duyarlılığı; 8 adet antibiyotiğe her birine % 62 oranında dirençli, 1 adet antibiyotiğe %8 oranında orta derecede duyarlı ve 4 adet antibiyotiğin her birine %31 oranında az duyarlı olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.7).

Lactobacillus plantarum DSM 20246 suşu 110 mg/l EPS üretmiştir. Bu suşun antibiyotik duyarlılıkları ise; 7 adet antibiyotiğin her birine %54 oranında dirençli ve 7 adet antibiyotiğe karşı %46 oranında duyarlı olduğu tesbit edilmiştir (Çizelge 4.8).

Enterococcus faecalis NCDO 581 en düşük 46,42 mg/l miktarda EPS üretmiştir. Suşun antibiyotik duyarlılığı; 6 adet antibiyotiğe karşı %46 oranında dirençli, 3 adet antibiyotiğe karşı %23 oranında orta derecede duyarlı ve 3 adet antibiyotiğin her birine karşı %31 oranında az duyarlı olduğu tesbit edilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.7. En yüksek miktarda EPS üreten *Enterococcus faecalis* RT 8 suşunun antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları.

Antibiyotikler	Dirençli (-)	Orta Derece Duyarlı (+)	Duyarlı (++)
Tetrasiklin (TE) 30 µg	-	-	31
Gentamisin (CN) 10 µg	62	-	-
Streptomisin (S) 10 µg	62	-	-
Amfisillin (AMP) 10 µg	-	-	31
Kloramfenikol (C) 30 µg	-	-	31
Vancomisin (VAN) 30 µg	62	-	-
Siprofloksasin (CIP) 30 µg	62	-	-
Nalidiksik asid (NA) 30 µg	62	-	-
Polymiksin B (PB) 300 U	62	-	-
Trimetoprim (TMP) 5 µg	62	-	-
Rifampisin (RD) 5 µg	-	-	31
Kanamisin (K) 30 µg	62	-	-
Penisilin G (P) 10 U	-	8	-

Çizelge 4.8. Orta derecede EPS üreten *Lactobacillus plantarum* DSM 20246 kültürünün antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları.

Antibiyotikler	Dirençli (-)	Orta Derece Duyarlı (+)	Duyarlı (++)
Tetrasiklin (TE) 30 µg	-	-	46
Gentamisin (CN) 10 µg	54	-	-
Streptomisin (S) 10 µg	54	-	-
Amfisillin (AMP) 10 µg	-	-	46
Kloramfenikol (C) 30 µg	-	-	46
Vancomisin (VAN) 30 µg	-	-	46
Siprofloksasin (CIP) 30 µg	54	-	-
Nalidiksik asid (NA) 30 µg	54	-	-
Polymiksin B (PB) 300 U	54	-	-
Trimetoprim (TMP) 5 µg	54	-	-
Rifampisin (RD) 5 µg	-	-	46
Kanamisin (K) 30 µg	54	-	-
Penisilin G (P) 10 U	-	-	46

Çizelge 4.9. En az miktarda EPS üreten *Enterococcus faecalis* NCDO 581 suşunun antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları.

Antibiyotikler	Dirençli (-)	Orta Derece Duyarlı (+)	Duyarlı (++)
Tetrasiklin (TE) 30 µg	-	-	31
Gentamisin (CN) 10 µg	46	-	-
Streptomisin (S) 10 µg	46	-	-
Amfisillin (AMP) 10 µg	-	-	31
Kloramfenikol (C) 30 µg	-	23	-
Vancomisin (VAN) 30 µg	-	-	31
Siprofloksasin (CIP) 30 µg	-	-	31
Nalidiksik asid (NA) 30 µg	46	-	-
Polymiksin B (PB) 300 U	46	-	-
Trimetoprim (TMP) 5 µg	46	-	-
Rifampisin (RD) 5 µg	-	23	-
Kanamisin (K) 30 µg	46	-	-
Penisilin G (P) 10 U	-	23	-

4.5. Laktik Asit Bakterilerinin Agregasyonu

4.5.1. Laktik asit bakterilerinin otoagregasyon

Laktik asit bakterilerinin otoagregasyon denemeleri bölüm 3.2.7. 'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. En yüksek (% 35) otoagregasyon özelliğini *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 kültüründe gösterdiği belirlenmiştir. *Lactococcus* subsp. *cremoris* (% 5) en düşük otoagregasyon özelliği göstermiştir. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (% 35) orta dereceli otoagregasyon gösterirken, diğer kültürlerin düşük dereceli otoagregasyon gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10.'da sunulmuştur.

Çizelge 4.10. Laktik asit bakterilerinin otoagregasyonları.

Bakteriler	Yüzde Otoagregasyon
1. <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	35,00 ± 8,2 (++)
2. <i>L. helveticus</i> ATCC 15807	27,50 ± 2,4 (+)
3. <i>L. bulgaricus</i> ATCC 11842	13,30 ± 0,0 (+)
4. <i>L. bulgaricus</i> G11	10,83 ± 1,2 (+)
5. <i>L. plantarum</i> DSM 20246	22,50 ± 5,9 (+)
6. <i>L. plantarum</i> (RSKK NO: 02030)	26,67 ± 1,8 (+)
7. <i>L. fermentum</i> ATCC 23271	30,00 ± 4,7 (+)
8. <i>L. ruminis</i> ATCC 25644	14,17 ± 1,2 (+)
9. <i>L. gasserii</i> ATCC 19992	8,33 ± 2,4 (+)
10. <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ATCC 14425	12,50 ± 3,5 (+)
11. <i>S. thermophilus</i> (RSK NO: 667/01017)	20,83 ± 1,6 (+)
12. <i>L. subsp. cremoris</i>	5,00 ± 0,0 (+)
13. <i>E. faecium</i> DSM 20442	15,83 ± 2,3 (+)
14. <i>E. faecium</i> RT 55	22,50 ± 3,5 (+)
15. <i>E. faecium</i> RT 82	10,00 ± 0,1 (+)
16. <i>E. fecalis</i> NCDO 581	10,83 ± 1,5 (+)
17. <i>E. fecalis</i> RT 8	19,17 ± 5,9 (+)
18. <i>E. fecalis</i> RT 121	28,33 ± 7,1 (+)
19. <i>P. acidilactici</i> ped L	19,17 ± 3,5 (+)
20. <i>P. pentosaceus</i> CHR-HANSEN	19,17 ± 2,3 (+)
21. <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> (RSKK NO: 06043-DSM 20346)	18,33 ± 2,4 (+)
22. <i>L. mesenteroides</i> (RSKK NO: 1061)	27,50 ± 5,9 (+)

++: Orta dereceli otoagregasyon ; +: Düşük otoagregasyon

4.5.2. Laktik asit bakterilerinin koagregasyon

Laktik asit bakterilerinin *E. coli* ATCC 11230 ile koagregasyon denemeleri bölüm 3.2.7' 'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Koagregasyon sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek koagregasyon *Enterococcus faecalis* RT 121 (%31), *Enterococcus faecium* RT 55 (%22) ve *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 14425 (%22) kültürlerinde belirlenmiştir. Genel suşların düşük derecede koagregasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.11.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.11. Bakterilerin *E. coli* ATCC 11230 ile koagregasyonları.

Bakteriler	Yüzde Koagregasyon
1. <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	9,17 ± 1,2 (+)
2. <i>L. helveticus</i> ATCC 15807	4,17 ± 0,5 (+)
3. <i>L. bulgaricus</i> ATCC 11842	7,50 ± 0,9 (+)
4. <i>L. bulgaricus</i> G11	5,83 ± 1,2 (+)
5. <i>L. plantarum</i> DSM 20246	4,17 ± 1,2 (+)
6. <i>L. plantarum</i> (RSKK NO: 02030)	19,17 ± 1,2 (+)
7. <i>L. fermentum</i> ATCC 23271	8,33 ± 1,7 (+)
8. <i>L. ruminis</i> ATCC 25644	5,83 ± 0,9 (+)
9. <i>L. gasseri</i> ATCC 19992	0,83 ± 1,2 (+)
10. <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> ATCC 14425	21,67 ± 4,7 (+)
11. <i>S. thermophilus</i> (RSKK NO: 667/01017)	11,67 ± 2,1 (+)
12. <i>L. subsp. cremoris</i>	20,83 ± 2,9 (+)
13. <i>E. faecium</i> DSMZ 20442	16,67 ± 0,0 (+)
14. <i>E. faecium</i> RT 55	21,67 ± 0,0 (+)
15. <i>E. faecium</i> RT 82	8,33 ± 1,8 (+)
16. <i>E. faecalis</i> NCDO 581	15,83 ± 1,2 (+)
17. <i>E. faecalis</i> RT 8	10,83 ± 8,3 (+)
18. <i>E. faecalis</i> RT 121	30,83 ± 1,3 (+)
19. <i>P. acidilactici</i> ped L	19,17 ± 1,3 (+)
20. <i>P. pentosaceus</i> CHR-HANSEN	11,67 ± 2,4 (+)
21. <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> (RSKK NO: 06043-DSM 20346)	5,00 ± 0,7 (+)
22. <i>L. mesenteroides</i> (RSKK NO: 1061)	11,67 ± 2,4(+)

++: Orta dereceli koagregasyon ; +: Düşük koagregasyon

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

LAB'nin ortamda üremesi, besin maddesinin karbonhidratın miktarına bağlıdır. Üreme sonucu laktik asit üreterek ortamın pH düzeyini düşürmektedir. Ortam pH'sını hızlı bir şekilde düşürülmesi LAB'nin istenilen önemli özelliklerinden birini oluşturmaktadır. LAB düşük pH'da (~ 4) canlılıklarını ve gelişmelerini sürdürmekte ve patojen mikroorganizmalar üzerindeki baskılayıcı özelliğiyle gıdaların raf ömrünü uzatmakta ve patojen kontaminasyonunu engellemektedir [2].

LAB'leri farklı tipte polisakkaritler üretebilme yetenegindedirler. Bunlardan hücre duvarı dışından salgılananlar polisakkaritler veya EPS' ler diye adlandırılırlar. Bunlar yapışkan tutucu bir tabaka oluşturabilirler ve kapsül polisakkaritleri olarak adlandırılırlar [47].

Bakteriyel EPS' ler kendilerini üreten mikroorganizmalar tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmazlar. Doğal ortamda kurumaya, fagositozis ve protozoa tarafından parçalanma, faj etkisi, antibiyotikler ya da toksik bileşenler ve ozmotik basınç gibi olaylara karşı koruyucu etkileri vardır. EPS' ler aynı zamanda hücre tanımlanması, yüzeye yapışma ve çeşitli ekosistemlerin kolonizasyonunu kolaylaştıran biyofilimlerin oluşturulmasında da rol oynarlar [56]. LAB' nin ürettiği EPS' lerin ekolojik fonksiyonu tam olarak tanımlanamamıştır. EPS'nin hücreye yapışma ve farklı ortamlarda hücrenin korunması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin antitümoral, bağışıklık sistemini düzenleyici ve kandaki kolesterol seviyelerini düşürücü etkilerinin olduğu da kanıtlanmıştır [57].

Bu çalışmada, LAB'nin ürettikleri EPS ile antibiyotiklere dirençlilikleri araştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan LAB'lerin hücre gelişimlerinin, ürettikleri EPS miktarını etkilemediği bulunmuştur. Suşların hücre gelişim değerleri ile ürettikleri EPS

miktarları arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir. *P. pentosaceus* CHR-HANSEN (\log_{10} 2,1 cfu/ml) en düşük hücre gelişimi göstermesine karşılık ürettiği EPS (179,6 mg/l) miktarının yüksek olduğu belirlenmiştir. *E. fecalis* NCDO 581 (46,42 mg/l) kültüründe en düşük EPS üretim miktarı belirlenmesine karşılık hücre gelişimi (\log_{10} 9,4 cfu/ml) ortalama sınırın üstünde olduğu gözlenmiştir.

Laktik asit bakterileri, metabolizmaları sırasında laktozu parçalayarak başlıca laktik asit oluşturan mikroorganizmalardır [87]. Laktik asit bakterileri laktozu, çoğunlukla %0,5–1,5' luk laktik asit konsantrasyonuna kadar parçalarlar, ancak %3 konsantrasyona kadar fermentasyon yapan türleri de vardır [88]. Laktik asit bakterileri, laktik asidin yanında hidrojen peroksit, hidrojen sülfür, bakteriosin gibi antimikrobiyal maddeler oluştururlar [89-90]. Laktik asit bakterilerinin metabolizmaları sonucu oluşan çeşitli antimikrobiyal maddeler, diğer kontaminant mikroorganizmaların üremelerini engeller [91,92].

Laktik asit bakterilerinin en önemli inhibitör etkisi, özellikle asidik ortamlarda oluşmaktadır. Ayrıca besiyerine inoküle edilen starter kültür miktarı ve aktivitesi de, özellikle fermantasyonun ilk aşamasında, patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmektedir [87].

Bu araştırmada bazı laktik asit bakterilerinin asit üretim yetenekleri ve son kültür pH'ları incelenmiştir. Çalışılan bakteriler arasından titre edilebilir yüzde asit miktarları en düşük *S. thermophilus* RSKK (%0,69) ve en yüksek *E. fecalis* RT121 (%2,06) suşlarında belirlenmiştir. Uygun besi ortamlarında 4 günlük inkübasyon sonunda kütlülerin son kültür pH değerlerinin (*L. helveticus* ATCC 15807) 4,0 – 5,0 (*E. faecium* DSM 20442) arasında olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada kullanılan diğer bakterilerin de yüksek asit üretim yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. Bakterilerin hücre gelişimlerinin, ürettikleri yüzde asit miktarlarını etkilemediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. En düşük hücre gelişimleri *P. pentosaceus* CHR-HANSEN (\log_{10} 2,1 cfu/ml) ve *P. acidilactici* ped L (\log_{10}

2,4 cfu/ml) suşlarında belirlenmesine karşılık ürettikleri yüzde asit miktarları sırasıyla %1,5 ve %1,4 olarak bulunmuştur. Bu bakterilerin düşük hücre gelişimlerine rağmen yüksek asit ürettikleri gözlenmiştir. Ayrıca, yüzde asit miktarının artışıyla tüm bakterilerde son kültür pH değerlerinin düştüğü belirlenmiştir. Son kültür pH değerleri ile yüzde asit miktarları arasında anlamlı bir ilişki ($p<0,01$) olduğu bulunmuştur. Ortam pH'sının düşmesi ve asidik bir ortamın oluşması, laktik asit bakterilerinin inhibitör etkisinin oluşması açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Çalışmada kullanılan laktik asit bakterilerinin yüksek oranda asit üretmeleri ve böylece ortamın pH değerini düşürmüş olmaları, patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmelerinde önemli birer etken olduğu düşünülmektedir.

Yapılan birçok araştırma sonucunda organik asitler (laktik asit, asetik asit, formik asit), diasetil ve hidrojen peroksidin tek başına veya birlikte gerek gram pozitif gerekse gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [93,94]. Özellikle *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Enterococcus*, *Listeria* ve *Pseudomonas* cinsi mikroorganizmalara karşı antagonistik etki gösterdikleri gösterilmiştir [94-52].

EPS'nin probiyotik açıdan önemi; antibiyotiklerin toksik etkisinden, mide-bağırsak koşullarının olumsuz etkilerinden korunmak ve bağırsakta kolonizasyonu artırmak gibi probiyotik suşa çeşitli avantajlar kazandırmaktadır. Ekzopolisakkaritlerin, fermente süt ürünlerinin yapısal özellikleri üzerinde olumlu etkileri ile birlikte antitümör, antiülser, immün sistemi uyarıcı ve kolesterol düşürücü aktivitelerinden dolayı insan sağlığını koruyucu etkiye sahip oldukları birçok araştırmalarda bildirilmiştir [95].

Araştırmada elde edilen sonuçlarda, suşların EPS üretimleri 46,4 mg/l ve 208,9 mg/l arasında olduğu belirlenmiştir. En yüksek EPS üretimi *E. fecalis* RT8 (208,9 mg/l) suşunda tespit edilirken, en düşük EPS miktarı *E. fecalis* NCDO 581 (46,4 mg/l) kültüründe belirlenmiştir. Çalışılan bakterilerin hücre gelişim grafiği ile EPS üretim grafikleri karşılaştırıldığında, hücre gelişiminin

EPS üretimini etkilemediği ve her bakteri cinsinin farklı miktarlarda EPS ürettiği ortaya çıkmıştır. En yüksek hücre gelişimi *L. mesenteroides* RSKK 1061 (\log_{10} 10,55 cfu/ml), *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* RSKK 06043-DSM 20346 (\log_{10} 10,5 cfu/ml) ve *L. bulgaricus* G11 (\log_{10} 10,4 cfu/ml) suşlarında tespit edilmesine karşılık, en yüksek EPS üretimini *E. fecalis* RT8 suşunun gösterdiği belirlenmiştir.

Araştırmada kullanılan bakterilerin ürettikleri yüzde asit miktarlarının artışı ile üretilen EPS miktarının artışı arasında orantılı bir bağ olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar arasında anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuştur ($p < 0,01$). Laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik asidin patojen mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etkisinin olduğu bilinmektedir. Ayrıca, bakteriyal EPS' nin bakteri hücrelerinin doğal çevresindeki kuraklık, fagositler ve protozoalar tarafından sindirim, faj saldırıları, antibiyotikler veya toksik bileşikler ve osmotik stres gibi faktörlere karşı koruyucu bir fonksiyonu olduğu düşünülmektedir [57].

Yapılan çalışmalarda, Frengova ve arkadaşları (2000), yoğurt starter kültürü olarak kullanılan *S. thermophilus*'un 10 suşunun 57-270 mg/l arasında EPS ürettiğini, Cerning ve arkadaşları (1992), *L. bulgaricus* suşlarının 55-150 mg/l aralığında EPS ürettiklerini bildirmişlerdir [96,97]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlarda da *S. thermophilus* suşlarının 74,70-78 mg/l ve *L. bulgaricus* suşlarının 93,06 -109,07 mg/l miktarlarında EPS üretmiş oldukları belirlenmiş ve sonuçlar önceki araştırmaların sonuçlarıyla desteklenmiştir.

S. thermophilus ve *S. mutans* tarafından üretilen EPS'lerin bakteri kolonizasyonu ve diş plağı oluşumunda rol oynadıkları bildirilmiştir [56]. Looijesteijn ve arkadaşları (2001)' nin bir araştırması; *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* NZ4010 tarafından üretilen EPS' lerin bakteriyofajlar, metal iyonları, nisin ve lizozim gibi çeşitli antimikrobiyal faktörlere karşı koruduğunu göstermiştir. Bu ekolojik fonksiyonlardan farklı olarak, LAB' nin ürettiği EPS' ler çeşitli fermente ürünlerin üretiminde teknolojik öneme sahiptirler [55].

Antibiyotikler, bakteri veya mantarlar tarafından sentez edilen ve diğer mikroorganizmaların gelişimini engelleyen veya ölümüne yol açan maddelerdir. Bu güne kadar yüzlerce antibiyotik tanımlanmış olup bunların önemli bir bölümü geliştirilerek enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Antibiyotikler kendi aralarında antibakteriyel etki spektrumu, etki mekanizması, fiziksel ve kimyasal özellikler bakımından farklılıklar gösterirler [66].

Probiyotik kültürlerde yaygın olarak bulunan laktobasiller tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklerin pek çoğuna doğal olarak direnç gösterebilmektedir. Fakat antibiyotik dirençliliğinin aktarımının çok yaygın bir özellik olmadığı belirlenmiştir [98].

Yapılan çalışmada bazı laktik asit bakterilerinin antibiyotiklere dirençlilikleri ile ürettikleri EPS arasındaki etki araştırılmıştır. Çalışılan laktik asit bakterilerinin penisilin, vankomisin ampisilin, tetrasiklin, streptomisin, gentamisin, kloramfenikol, kanamisin, trimetoprim, nalidiksik asit, siprofloksasin, rifampisin ve polimiksin-B antibiyotiklerine duyarlılıkları disk difüzyon yöntemine göre belirlenmiştir. Sonuçlar CLSI standardına (Çizelge 4.4.) göre değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5.). Elde edilen sonuçlarda bakterilerin tümünün nalidiksik asid, polimiksin B ve kanamisin dışındaki antibiyotiklere %9 ile % 95 oranında yüksek duyarlılık gösterdikleri tespit edilmiştir. Bunlardan tetrasiklin %95, amfisilin %86, rifampisin %86 ve kloramfenikol %95 oranlarında en yüksek duyarlılık gösteren antibiyotikler olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Ayrıca, suşların kullanılan antibiyotiklerden nalidiksik asid, polimiksin B ve kanamisin antibiyotiklerine genel olarak dirençli olduğu gözlenmiştir. (Çizelge 4.6).

Yapılan araştırmada en yüksek EPS üretimi gösteren *E. fecalis* RT8 suşunun, protein sentezini inhibe eden tetrasiklin ve kloramfenikol, nükleik asit sentezini inhibe eden rifampisin ve hücre duvarı sentezini inhibe eden amfisilin antibiyotiklerine yüksek duyarlılık gösterdiği, yine hücre duvarı

sentezini inhibe eden antibiyotik grubunda yer alan penisilin G antibiyotiğine ise orta dereceli duyarlı olduğu belirlenmiştir. *Enterococcus faecalis* RT8 suşu protein sentezini inhibe eden gentamisin, streptomisin ve kanamisin, nükleik asit sentezini inhibe eden trimetoprim, siprofloksasin ve nalidiksik asid, hücre duvarı sentezini inhibe eden vankomisin antibiyotiklerine yüksek direnç göstermiştir. Araştırmada kullanılan bakterilerin ürettikleri EPS'lerin artışının antibiyotik dirençliliklerini etkilediği düşünülmektedir.

Sönmez ve arkadaşları (1999), tavuk bağırsaklarından izole ettikleri 3 adet *L. acidophilus*, 5 adet *L. agilis*, 2 adet *L. animalis*, 2 adet *L. brevis*, 2 adet *L. coryneformis* subsp. *torquens*, 9 adet *L. fermentum* ve 17 adet *L. plantarum* olmak üzere toplam 40 izolatın antibiyotik dirençliliklerini incelemiştir. Çalışma sonucunda laktobasil suşlarının penisilin grubu antibiyotiklerden amoksisilin, ampisilin ve karbenisiline %100, penisiline %97,5, oksasiline %70, metisiline %35 oranında duyarlı olduklarını tespit etmişlerdir. Buna karşın, kloramfenikol %92,5, tetrasiklin %85, makrolidlerden eritromisin %85 ve rifampisin %82,5 değerleriyle laktobasillere yüksek düzeyde etkili diğer antibiyotikleri oluşturmuşlardır. Ancak aminoglikozidlere (kanamisin, gentamisin, neomisin, streptomisin) karşı suşların %50'den fazlası direnç göstermiştir. Linkomisin, nistatin, spektinomisin ve peptid grubu antibiyotiklerden basitrasine dirençli suşların oranı ise %60-90 arasında değişmiştir. Yine peptid grubu antibiyotiklerden polimiksin B'ye karşı suşların %100'ü dirençli olduğunu bildirmişlerdir [99]. Bu araştırmada, kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin penisilin grubu antibiyotiklerden amfisiline %86 ve penisiline %64 oranında duyarlı oldukları, kloramfenikol ve tetrasikline de %95 oranında duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Ancak aminoglikozidler grubunda bulunan kanamisin, gentamisin ve streptomisin antibiyotiklerine %72-100 arasında dirençli oldukları belirlenmiştir. Peptid grubu antibiyotiklerden olan polimiksin B'ye karşı suşların %100'ü dirençli bulunmuştur.

Temmerman ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan bir araştırmada 8 Avrupa ülkesinden toplanan 55 probiyotik üründen izole edilen 187 izolatın antibiyotik duyarlılıkları incelenmiş ve izolatların %65'nin vankomisine dirençli oldukları, buna karşın kloramfenikole direnç gösteren izolatların oranının ise %11 olduğu ifade edilmiştir [3]. Çalışmada suşların %50 oranında vankomisine dirençli, buna karşılık kloramfenikole %95 oranında duyarlı oldukları tespit edilmiştir.

Temmerman ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan çalışmada izole edilen enterokokların disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyotik duyarlılıkları incelenmiş ve %38'inin vankomisine dirençli oldukları belirlenmiştir [3]. Bu araştırmada ise enterokokların %33'nün vankomisin antibiyotiğine dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Kirtzalidou ve arkadaşları (2011) tarafında yapılan bir çalışmada izole edilen laktobasillerin büyük çoğunluğunun, ampisilin, amoksisilin / klavulanik asit, tetrasiklin, eritromisin, sefalotin, kloramfenikol ve rifampisin antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir. Suşların %34'ünün ise vankomisine dirençli olduğu tespit edilmiştir [100]. Yapılan çalışmada ise *Lactobacillus* türlerinin ampisilin, tetrasiklin ve kloramfenikol antibiyotiklerine karşı duyarlı oldukları belirlenmiştir. *L. bulgaricus* G11 suşu dışındali laktobasillerin rifampisin antibiyotiğine de duyarlı olduğu belirlenmiştir. Suşların vankomisin antibiyotiğine dirençliliği ise %55 olarak bulunmuştur.

Nueno-Palop ve Narbad' ın (2010) yaptıkları araştırmada *E. faecalis* CP58 suşunun vankomisin, tetrasiklin, rifampisin ve eritromisin antibiyotiklerine duyarlı olduğu; kanamisin ve kloramfenikol antibiyotiklerine ise dirençli olduğu belirlenmiştir [101]. Bu araştırmada ise *E. faecalis* suşlarının tümü tetrasiklin ve rifampisin antibiyotiklerine duyarlılık gösterirken, vankomisin antibiyotiğine karşı duyarlılık gösteren sadece *E. faecalis* NCDO581 suşu olmuştur. Suşlar kanamisine dirençlilik gösterirken, kloramfenikole karşı duyarlı oldukları belirlenmiştir.

Yapılan başka bir araştırmada 15 beyaz peynir örneğinden izole edilen 23 LAB suşlarının %53'ü vankomisine, 21'i gentamisine %31'i, siprofloksasine, %12'si eritromisine, %3'ü kloramfenikole ve %3'ü rifampisine dirençli, %28'i ise test edilen tüm antibiyotiklere karşı duyarlı olarak belirlenmiştir [102]. Bu çalışmada ise suşların vankomisine %50'si, gentamisine % 73'ü, siprofloksasine % 64'ü ve rifampisine %5'i dirençlilik göstermiştir.

Forsen ve arkadaşları (1987), EPS üreten laktik asit bakterilerinin sindirim sisteminde sentezlediği EPS'lerin özellikle antitümör, bağışıklık sistemini geliştirici ve kolesterol düşürücü olarak insan sağlığına yararlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda EPS'lerin bağışsak florasını düzenlediği, kolesterolü düşürdüğü ve antiülser aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir [50].

Araştırmadan elde edilen sonuçlarda *E. fecalis* RT 8 suş en yüksek 208,88 mg/l EPS üretirken denenen 13 adet farklı antibiyotiklere karşı duyarlılığı; 8 adet antibiyotiğe her birine % 62 oranında dirençli, 1 adet antibiyotiğe %8 oranında orta derçede duyarlı ve 4 adet antibiyotiğin her birine %31 oranında az duyarlı olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.7). *L. plantarum* DSM 20246 suş 110 mg/l EPS üretmiştir. Bu suşun antibiyotik duyarlılıkları ise; 7 adet antibiyotiğin her birine %54 oranında dirençli ve 7 adet antibiyotiğe karşı %46 oranında duyarlı olduğu tesbit edilmiştir (Çizelge 4.8). *E. fecalis* NCDO 581 en düşük 46,42 mg/l miktarda EPS üretmiştir. Suşun antibiyotik duyarlılığı; 6 adet antibiyotiğe karşı %46 oranında dirençli, 3 adet antibiyotiğe karşı %23 oranında orta derecede duyarlı ve 3 adet antibiyotiğin her birine karşı %31 oranında az duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9). Bu sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde EPS üretimi yüksek olan kültürlerin genellikle antibiyotiklere karşı daha dirençli olduğu düşünölmektedir.

Probiyotik olarak tanımlanmak istenen bakterinin; patojen olmaması, mide-bağışsak sistemi koşullarına toleranslı olması, bağışsak mukozasına adezyon ve rekabetle patojenlerin bağışsaktan uzaklaştırılması beklenen en önemli

özellikleridir. Probiyotiklerin konak için yararlı etkiler gösterebilmesi için agregasyon ile yeterli yoğunlukta olmaları gerekmektedir. Bu nedenle probiyotiklerin agregasyon yetenekleri probiyotik seçiminde istenilen bir özellik olduğu bildirilmiştir. Probiyotiklerin patojen bakterilerle koagregasyonu bu bakterilere, bağırsakta tutunamayan ve koagregat olmaya göre avantaj sağladığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Yapılan bir araştırmada *Lactobacillus* türlerinin koagregasyon yeteneklerinin patojenlerin kolonizasyonunu engelleyen bir bariyer olabileceğini bildirilmiştir [103].

Bu çalışmada bazı laktik asit bakterilerinin otoagregasyon ve test bakterisiyle koagregasyon yetenekleri incelenmiştir (Çizelge 4.10. ve 4.11.). En yüksek otoagregasyon özelliği *L. acidophilus* ATCC 4356 kültüründe %35 belirlenmiştir. *L. acidophilus* ATCC 4356 (% 35) orta dereceli otoagregasyon gösterdiği belirlenirken, diğer suş ve kültürlerin düşük dereceli otoagregasyon gösterdiği yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan suşların *E. coli* ATCC 11230 ile koagregasyon sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek koagregasyon *E. faecalis* RT 121 (%31), *E. faecium* RT 55 (%22), *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 14425 (%22) kültürlerinde belirlenmiştir. Genel olarak çalışılan tüm bakterilerin düşük derecede koagregasyon gösterdiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada bazı laktik asit bakterilerinin EPS üretimleri ile antibiyotiklere dirençlilikleri değerlendirildiğinde; laktik asit bakterilerinin EPS üretimlerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Probiyotik grupta yer alan laktik asit bakterilerinin bağırsak fizyolojisi üzerine dolaylı veya doğrudan etkide bulunarak immün sistemi uyardığı, bu çerçevede konakçının ağız ve sindirim sistemi dâhil, üst solunum yolu ve ürogenital sistem mukozal yüzeyini etkileyerek iyi hal ve sağlığı geliştirici, hastalık riskini azaltıcı potansiyel etkiye sahip olduğu bilinmekte ve laktik asit bakterilerinin bu yararlı etkilerinin yüksek miktarda ürettiği nicel asit ve yüksek miktarda EPS üretiminden kaynaklandığı düşünülmektedir [20]. Antibiyotiklere karşı dirençlilikleri incelendiğinde de hücre duvarından sentezlenen EPS'nin, laktik asit

bakterilerini toksik bileşiklere, antibiyotiklere ve ozmotik stres gibi doğal ortam tehlikelerine karşı koruduğu görülmüştür. Bu bakteriler tarafından sentezlenen EPS'nin bakteriyi koruma ve antibiyotiklere karşı dirençliliğini artırma gibi etkileri olduğu belirlenmiştir. EPS' nin suşlara sağladığı bu avantajlarının yanında suşların epitel yüzeylere tutunması, otoagregasyon ve koagregasyonunda da etkili olduğu düşünülmektedir. EPS' nin laktik asit bakterilerine sağlamış olduğu bu özellik ve avantajları dikkate alınacak olursa, EPS üretimi yüksek bir suşun hem starter hem de probiyotik olarak kullanımının çok önemli avantajı olacaktır. EPS' nin mikrobiyal hücreyi toksik maddelere karşı koruduğu göz önüne alınırsa çalışmada kullanılan laktik asit bakterilerinin EPS üretimi bunların antibiyotik kullanımından sonrada bağırsak florasında canlı kalmalarını etkileyen bir yapı olduğu düşünülmekte ve bu çalışmanın esas sonucunu oluşturmaktadır. Daha önce bu bakterilerin ürettikleri EPS ve antibiyotik dirençlilikleri arasındaki ilişkiyi açıklayan araştırmalar olmadığından alınan sonuçların ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir. Böylece infeksiyon hastalıklarında kullanılan antibiyotikler, insan bağırsağındaki yararlı bu bakterilerin canlılığını ve miktarını daha az etkileyecektir. Bu çalışma, bağırsakta daha uzun süre kalabilen, patojen mikroorganizmalara karşı etkili antitümör, antiülser, bağışıklık sistemini düzenleyici ve kolesterol düşürücü aktivite göstererek insan sağlığına olumlu katkıda bulunan laktik asit bakterilerinin ve ürettikleri EPS'lerin endüstriyel kullanımına olanak sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Çakır, İ., "Lactobacillus ve Bifidobacterlerde bazı probiyotik özelliklerin incelenmesi ", Doktora Tezi, **Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 4-7, 7-12, 12-14, 14-16,16-19, 35-39, (2003).
2. Fuller, R., "Probiotics in man and animal" , **J. Appl. Bacteriol.**, 66: 365-378, (1998).
3. Yılsay, T.Ö., Kurdal, E.,"Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerindeki etkisi", **VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri)**, Tekirdağ, 279-294, (2000).
4. Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., "Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biochemical, technological and threapeutic properties revelant for use as probiotics" , **Trends. Food Sci. Techn.**, 10: 139, (1999).
5. Fuller, R., "Probiotics in man and animal" , **J. Appl. Bacteriol.**, 66: 365-378, (1998).
6. Salminen, S., Bouley, C., Boutron- Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M. C., Roberfroid, M., Rowland, O., "Functional food science and gastrointestinal physiology and function" , **Brit. J. Nutr.**, 80 (1): 147, (1998).
7. Sanders, M.E., "Probiotics" , **Food Tecnol.**, 53: 67-77, (1999).
8. Salminen, S., Ouwehand, A.C., Isolauri, E., "Probiotics: an overview of beneficial effects" , **Anton Leeuw.**, 82: 279-289 (2002).
9. Girsmondo, M.R., Dargo, L., Lombardi, A., "Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora" , **Int. J. Antimicro. Agents.**, 12: 287-292, (1999).
10. Pelto, L., Salminen, S.J., Isolauri, E., "Lactobacillus GG modulates milk induced immune inflammatory response in milk-hypersensitive adults" , **Nutr Doday Suppl.**, 31: 454-455, (1996).
11. Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-Saldholm, T., "Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties" , **J. Biotechnol.**, 84: 197-215, (2000).
12. Klaenhammer, R. T., Kullen, J. M., "Selection and design of propeitics" , **Int. J. Food Microbiol.**, 50: 45-57, (1999).

13. Donohue, D. C., Salminen, S. J., "Safety of probiotic bacteria" , ***Asia., Pac., J.Clin. Nutr.***, 5: 25–28, (1996).
14. Salminen, S., Isolauri, E., Salminen, E., " Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier successful strains and future challenges", ***Antonie Van Leeuwenhoek***, 70: 347-358, (1996).
15. Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., Lee, K.Y., "Probiotics: How should they be defined?", ***Trends in Food Sci. & Technol***, 10: 107-110, (1999).
16. Zubillago, M., Weill, R., Postaine, E., Goldman, C., Caro, R., Boccio, J., "Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases", ***Nutrition Research***, 21: 569-579, (2001).
17. Rolfe, R.D., "The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health", ***Journal of Nutrition***, 130: 3965-4025, (2000).
18. Yücesan, S., "Probiyotikler ve sağlık üzerine etkileri", ***Türk Diyetisyenler Derneği Bülteni***, 2: 1-13, (2002).
19. Shah, N., "Functional foods from probiotics and prebiotics", ***Food Technology***, 55:46-53, (2001).
20. Sillanpää, J., "Tissue-Adherence in Lactic Acid Bacteria: Identification and Characterization of the Collagen Binding S-Layer Protein of *Lactobacillus crispatus*" , ***University of Helsinki***, Helsinki, 7-11, (2001).
21. Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Wright, A., "Lactic Acid Bacteria, microbial and Functional Aspects, ***Food Sci. & Technol.*** 3: 1-53, (2004).
22. Beasley, S., "Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota", ***Academic Dissertation in Microbiology***, 361-371, (2004).
23. Madigan, M.T., Martinko, J.M. 'Brock Biology Of Microorganisms,' ***Pearson Education***, Inc. 11: 375–378, (2006).
24. Drinan, D.F., Tobin, S., Cogan, T.M., "Citric acid metabolism in hetero and homofermentative lactic acid bacteria", ***Appl. Envir. Microbiol.***, 31 (4): 481-486, (1976).
25. Tekinşen, O.C., Atasever, M., "Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür", ***Selçuk Ü. Vet. Fak. Yayınları***, Konya, 150: 8-12, (1994).

26. Mc Groarty, J.A., "Cel surface appandages of *Lactobacilli*", **FEMS Microbiol. Lett.**, 124: 405-410, (1994).
27. Tunail, N., Köşker, Ö., "Süt Mikrobiyolojisi", No:1116, **A. Ü. Ziraat Fak. Yayınları**, Ankara, 113, (1989).
28. Stiles, M.E., Holzapfel, W.H., 'Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy'. , **Int. J. Food Microbiol.**, 36: 1-29, (1997).
29. Hammes, W.P., Vogel, R.F., "The genus *Lactobacillus*", in the lactic acidbacteria. The genera of lactic acid bacteria, **Blackie Academics and Professionals**, 2: 19-55, (1995).
30. Marteau, P.R., Vrese, M., Cellier, J.C., Schrezenmeir, J., "Protection from gastrointestinal diseases with use of probiotics", **Am. J. Clin. Nutr**, 73: 430-436, (2001).
31. İnternet:National Center For Complementary and Alternative Medicine, "Probiotics"
<http://nccam.nih.gov/health/probiotics/> (2008).
32. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Holt, J. G., "Bergey' s Manual of Systemic Bact., Volume 2", **Willims & Wilkins.**, London, 1208-1304 (1986).
33. Hummel, A., Holzapfel, W. H., Franz, C. M. A. P., "Characterisation and Transfer of Antibiotic Resistance Genes From Enterococci Isolated From Food", **Systematic and Applied Microbiology**, 30: 1-7, (2007).
34. İnternet:Cleaning Industry Research Institute, "*Enterococcus*"
http://www.ciriscience.org/ph_114Enterococcus (2009).
35. Lukasova, J., Sustackova, A., "Enterococci and Antibiotic Resistance", **Acta Veterinary Brno**, 72: 315-323, (2003).
36. İşleroğlu H., Yildirim Z., Demirpençe Y., Yildirim M., "Enterekokların Biyokimyasal, Fizyolojik Ve Fonksiyonel Özellikleri ile Patojenitesi", **Akademik Gıda Bilimi ve Teknolojis Dergisi**, 6(3): 16-26, (2008).
37. Hayaloğlu, A.A., Erginkaya, Z., "Gıda Endüstrisinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri", **Gıda Teknolojileri Derneği**, Yayın No:23, (2001).
38. İnternet:Doe Joint Genome Institute, "*Leuconostoc*"
<http://genome.jgi-psf.org/leume/leume.home.html> (2009).

39. İnternet:Doe Joint Genome Institute, “*Pediococcus*”
<http://genome.jgi-psf.org/pedpe/pedpe.home.html> (2009).
40. Erginkaya, Z., Hayaloğlu, A.A., ‘Gıda Endüstrisinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri’, **Gıda Teknolojisi Derneği**, Yayın No: 23, Adana, (2001).
41. İnternet:Science Photo Library, “*Streptococcus*”
<https://www.sciencephoto.com/media/13030/enlarge> (2009).
42. Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M.J., Landon, M., “Isolation and Characterization of Exocellular Polysaccharide Produced by *Lactobacillus bulgaricus*”, **Biotech .Lett.**, 8: 625-628, (1986).
43. Cerning, J., Bouillanne, C., Desmazeaud, M.J., Landon. M., “Comparision of Exocellular Polysaccharide Production by Thermophilic Lactic Acid Bacteria”, **Sci.Aliments** 10: 43-451, (1990).
44. Bouzar, F., Cerning, J., Desmazeaud, M., “Expoloyasaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants”, **J. Dairy Sci.**, 79: 205-211, (1996).
45. Leigh, J.A., Walker, C.G., “Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function1” , **Trends Genet.**, 10: 63–67, (1994).
46. Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., Reyes-Gavilan, C. G., Salminen, S., “Exsopolisaccarides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to Human intestinal Mucus” , **J Food. Protect.**, 69(8): 2011-2015, (2006).
47. Cerning, J., ”Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques” , In H. de Roissart, F. M. Luquet, Bactéries Lactiques, **Aspects Fondamentaux et Technologiques.**, France: Loriga, Vol. I, 309- 329, (1994).
48. De Vuyst, L., Degeest, B., “Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria” , **FEMS Microbiol. Rev.**, 23:153- 177, (1999).
49. Atkins, E.D.T., “Polysaccharides Topics in Structure and Morphology”, **Macmillan Press**, London, 543-876, (1985).
50. Cerning, J., “Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria”, **Lait**, 75: 463- 472, (1995).

51. Grobben, G.J., Sikkema, J., Smith, M.R., de Bont, J.A.M., "Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium", **J. Appl. Bacteriology**, 79: 103-107 (1995).
52. Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M.J., "Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime forming mesophilic lactic acid bacteria", **J. Dairy Sci.**, 75: 692-699, (1992).
53. Gancel, F., Novel, G., "Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* cultures: 2. Distinct modes of polymer production and degradation among clonal variants", **J. Dairy Sci.**, 77: 689- 695, (1994)
54. Bouzar, F., Cerning, J., Desmazeaud, M., "Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants", **J. Dairy Sci.**, 79: 205- 211, (1996)
55. Looijesteijn, P.J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T., Hugenholtz, J., "Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*", **International J. Food Microbiol.**, 64: 71-80, (2001).
56. Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M.J., "Comparison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria", **Sci. Des Aliments**, 10: 443- 451, (1990).
57. Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P., "An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria", **International Dairy Journal**, 12: 163-171, (2002).
58. Boris, S., Suarez, J. E., Barbés, C., "Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, vaginal isolate" , **J. Appl. Microb.**, 83: 413-420, (1997).
59. Kos, B., Šušković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S., "Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92" , **J. Appl. Microbiol.**, 94: 981-987, (2003).
60. Boris, S., Suárez, J. E., Vázquez, F., Barbés, C., "Adherence of human vaginal *Lactobacilli* to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens" , **Infect. Immun.**, 66 (5): 1985-1989, (1998).

61. Demain, A.L., "Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms" , ***Appl. Microbiol. Biotechnol.***, 52: 455-463, (1999).
62. El-Adaway, T.A., "Optimum production, stability, partial purification and inhibitory spectrum of antimicrobial compounds produced by *Pediococcus pentosaceus* D1" , ***Nahrung/Food.***, 45: 118-124, (2001).
63. Jehanno, D., Thuault, D., Bourgeois, C.M., 'Development of a Method for Detection of Lactic Acid Bacteria Producing Exclusively the L-(+)- Isomer of Lactic Acid,' ***Applied and Environmental Microbiology***, 58 (12): 4064-4067, (1992).
64. Kılıç, S., "Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri", ***Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları***, 542: 109-111, (2001).
65. deMan, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E., "A medium for the cultivation of lactobacilli" , ***J. Bacteriol.***, 23: 130, (1960).
66. Arda, M., "Mikrobiyel Üremenin Kontrolü", ***Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi***, Temel Mikrobiyoloji, 1, (2006).
67. Klaenhammer, R.T., Kullen, J.M., "Selection and design of propeptics" , ***Int. J. Food Microbiol.***, 50: 45-57, (1999).
68. Çakır, İ., "Lactobacillus ve Bifidobacterler' de bazı probiyotik özelliklerin incelenmesi " , Doktora Tezi, ***Ankara Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü***, Ankara, 4-7, (2003).
69. Barton, M.D., Wilkins, J., "Antibiotic Resistance in Bacteria Isolated from Poultry", ***RIRDC Publication***, NO:01/105 USA, (2001).
70. Aslım, B., Beyatlı, Y., "Antibiotic Resistance and Plasmid DNA Contents of *Streptococcus Thermophilus* Strains Isolated from Turkish Yoghurts", ***Turkish Journal of Veterinary and Animal Science***, 28: 257-263, (2004).
71. Herreros, M.A., Sandoval, H., Gonzalez, L., Castroj. M., Frenso, J.M., Tornadijo, M.E., "Antimicrobial Activity and Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria Isolated from Armada Cheese (A Spanish Goats' Milk Cheese) Spain", ***Food Mikrobiology***, 22: 455-459, (2005).
72. Çıtak, S., Yücel, N., Orhan, S., "Antibiotic Resistance and Incidence of *Enterococcus* Species in Turkish White Cheese", ***International Journal of Dairy Technology***, 57: 27.31, (2004).

73. Moubareck, C., Gavini, F., Vaugien, L., Butel, M.J., Doucetpopulaire, F., "Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria", **J. Antimicrob. Chemother**, 55: 38–44, (2005).
74. Delgado, S., Flo´ rez, A.B., Mayo, B., "Antibiotic Susceptibility of Lactobacillus and Bifidobacterium Species From The Human Gastrointestinal", **Tract. Curr. Microbiol.**, 50: 202–207, (2005).
75. Rosaria, M., Modesto, M., Biavati, B., "Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacterium* Spp. Isolated From Dairy And Pharmaceutical Products", **International Journal Of Microbiology** 115: 35-42, (2007).
76. Anonymous, "Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları" , Halkman, A.K., **Başak Matbaacılık Ltd. Şti.**, Ankara, 243-244, 246, 247, 250, 289, 261, 320, (2005).
77. Baer, A., Ryba, I., "Serological identification of propionibacteria in milk and cheese samples" , **Inter. Dairy J.**, 2: 299-310, (1992).
78. Anonymous, "Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları" , **Halkman, A.K., Başak Matbaacılık Ltd. Şti.**, Ankara, 243-244, 246, 247, 250, 289, 261, 320, (2005).
79. Drinan, F.D., Cogan, T.M., "Detection of propionic acid bacteria in cheese" , **J. Dairy Res.**, 59: 65-69, (1992).
80. Halkman, A.K., Ayhan H., "Gıdaların mikrobiyolojik analizi 2 mikroorganizma sayımı", Gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları, **Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü**, Ankara, 229-254, (2000).
81. Krieg, N.R., Gerhardt, P., "Solid, liquid/solid, and semisolid culture" , Methods for General and Molecular Bacteriology, Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., And Krieg, N.R., **American Society for Microbiology**, Washington, DC., 222, (1994).
82. Çetin, E.T., Güller N., "Bakterilerin antibiyotik duyarlık deneyinin yapılması" , **Kükem Derg.**, 12(2): 97-105, (1989).
83. Gülay, Z., "Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yorumu", **Toraks Dergisi**, 3:75-88, (2002).
84. Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, Palenzona, D., "Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*" , **Lett. Appl. Microbiol.**, 31: 438-442, (2000).

85. Del Re, B., Busetto, A., Vignola, G., Sgorbati, B., Palenzona, D.L., "Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain" , **Letf. Appl. Microbiol.**, 27: 307-310 ,(1998).
86. Vandevorde, L., Chistiaens, H., Verstraeta, W., "Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli" , **J. Appl. Bacteriol.**, 72: 214-219, (1992).
87. Yetişmeyen, A., "Süt Teknolojisi", **A.Ü. Ziraat Fak Yayınları**, 1420: 229, (1995).
88. Sönmez, N., Çakmakçı, M.L., Karahan, A.G., "Probiyotik Kullanımı ve Ülke Şartlarında Geliştirilmesi", **Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Müdürlüğü**, Araştırma Projesi (yayınlanmamış), Ankara, 23-28, (1999).
89. Reiter, B., Harnulv, G., "Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and partical applications", **J. Food Protect.**, 47(9): 724-732, (1984).
90. Fitzsimmons, N., Berry, D.R., "Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*: Evidence for the involvement of a peroxidase system", **Microbios**, 80:, 125-133, (1994).
91. Attaie, R., Whalen, P.J., Shahani, K.M., Amer, M.A., "Inhibition of growth of *Staphylococcus aureus* during production of acidophilus Yogurt", **J. Food Protec.**, 50(3): 224-228, (1987).
92. Juven, B.J., Schved, F., Lidner, P., "Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of *Lactobacillus acidophilus*", **J. Food Protect.**, 55(3):157-161, (1992).
93. Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E., Klaenhammer, T.R., "Antimikrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*", **J. Food Protect.**, 52(6): 384-387, (1989).
94. Attaie, R., Whalen, P.J., Shahani, K.M., Amer, M.A., "Inhibition of growth of *Staphylococcus aureus* during production of acidophilus Yogurt", **J. Food Protec.**, 50(3): 224-228, (1987).
95. Ding, Y., Karie, O., Labbe, J., Palcic, M.M., Ernat, B., Hindsgaul, O., 'Syntesis and biological activity of oligosaccharide libraries', **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 376:261-269 (1995).

96. Frengova, G.I., Simova, E.D., Beshkova, D.M., Simov, Z.I., "Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains" , *Znaturforsch.*, 57: 805-810, (2002).
97. Collado, M.C., Meriluoto, J., Salminen, S., "Development of New Probiotics by Strain Combinations: Is It Possible to Improve the Adhesion to Intestinal Mucus?" , *J. Dairy Sci.*, 90: 2710-2716, (2006).
98. Nicas, T.I., Cole, C.T., Preston, D.A., Schabel, A.A., Nagarajan, R., "Activity of glycopeptides against vancomycin-resistant gram-positive bacteria", *Antimicrob. Agents Chemother*, 33: 1477-1481, (1989).
99. Sönmez, N., Çakmakçı, M.L., Karahan, A.G., "Probiyotik Kullanımı ve Ülke Şartlarında Geliştirilmesi", *Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Müdürlüğü*, Araştırma Projesi (yayınlanmamış), Ankara, 23-28, (1999).
100. internet: Kirtzalidou, E., Pramateftaki, P., Kotsou, M., . Kyriacou, A., "Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota", *Science Direct*, 2011 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996411000928> (2011).
101. Nueno-Palop, C., Narbad, A., "Probiotic assessment of *Enterococcus faecalis* CP58 isolated from human gut", *International Journal of Food Microbiology*, 145(2-3): 390-394, (2011).
102. Tatlı, D., "Geleneksel Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 57, (2009).
103. Collado, M. C., Meriluoto, J., "Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains" , *Eur. Food Res Technol.*, 226: 1065-1073, (2008).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : AHI, Sema
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 17.06.1986 / Ankara
Medeni hali : Bekar
Telefon : 05325840700
e-mail : sma_ahi@hotmail.com

Eğitim

Derece tarihi	Eğitim Birimi	Mezuniyet
Y. Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji / Biyoteknoloji	2011
Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	2008
Lise	Özel Arı Lisesi	2004

Yabancı Dil

İngilizce