

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

VAJİNAL SEKRESYONDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT  
BAKTERİLERİNE AİT BAZI SUŞLARIN POTANSİYEL PROBİYOTİK  
ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ

Feriba TURHAN ERYILMAZ

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

ANKARA

2011

Doç. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU danışmanlığında Feriba TURHAN ERYILMAZ tarafından hazırlanan tez çalışması 03/08/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı' da DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Cemal ÇÖKMÜŞ

İmza: 

Üye: Prof. Dr. Yavuz Beyatlı

İmza: 

Üye: Doç. Dr. Özlem Osmanağaoğlu

İmza: 

Üye: Yrd. Doç. Dr. Doruk Engin

İmza: 

Üye: Prof. Dr. Haluk Ataoglu

İmza: 

Enstitü Müdürü

# VAJİNAL SEKRESYONDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNE AİT BAZI SUŞLARIN POTANSİYEL PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ

## ÖZET

Bu çalışmada; Laktik Asit Bakterileri menopoza girmemiş, herhangi bir doğum kontrol yöntemi ile korunmayan ve 3 ay süre içerisinde antibiyotik kullanmayan bayanların vajinasından smear örneği alınarak izole edilmiştir. Biyokimyasal testlere ve 16S rDNA dizi analizine göre *Pediococcus acidilactici* OZV ve *Lactobacillus brevis* OZV olarak tanımlanan suşların *in vitro* koşullarda probiyotik olma özellikleri belirlenmiştir. Her iki suşun düşük pH değerlerine (pH 3), pH-pepsin, safra tuzu ve pankratin uygulamalarına gösterdikleri direnç düzeyleri probiyotik özellik için tanımlanan sınırlar içerisinde bulunmuştur.  $\gamma$ -hemolitik özellik gösteren suşlarda, özellikle tedavide kullanılan antibiyotikler için yüksek dirençlilik düzeyleri saptanmıştır. *P. acidilactici* OZV suşu bakteriyosin üretirken, *L. brevis* OZV suşunda bakteriyosin üretimi saptanmamıştır. *P. acidilactici* OZV suşunun 5.saatin sonunda otoagregasyonu % 79,49 iken *L. brevis* OZV suşunun otoagregasyonu % 78,13' tür. *P. acidilactici* OZV suşunun *S. Typhimurium* SL1344 ve *E.coli* LMG3083 (ETEC) ile 5.saatin sonundaki koagregasyon yüzdesi adı geçen sıra dahilinde % 4,35 ve % 11,82 iken *L. brevis* OZV suşunun bahsi geçen suşlar ile koagregasyonu yine 5. saatin sonunda sırasıyla % 9,52 ve % 9,09 olarak belirlenmiştir. *P. acidilactici* OZV ve *L. brevis* OZV suşlarının Caco-2 hücrelerine tutunma yüzdeleri adı geçen sıra dahilinde % 12,29 ( $\pm 1,42$ ) ve % 12,10 ( $\pm 3,7$ ) olarak saptanmıştır. İstatiksel olarak (ANOVA) suşların tutunma yüzdeleri arasında fark olmadığı bulunmuştur ( $p > 0.05$ ). Yarışma denemelerinde *P. acidilactici* suşunun *E.coli* LMG3083 (ETEC) suşunu % 87,31 ( $\pm 1,62$ ), *S. Typhimurium* SL1344 suşunu ise % 83,04 ( $\pm 3,46$ ) oranında engellendiği gözlemlenmiştir. *L. brevis* suşu ise *E.coli* LMG3083 (ETEC) suşunu % 82,21 ( $\pm 3,69$ ), *S. Typhimurium* SL1344 suşunu ise % 78,94 ( $\pm 1,62$ ) oranında engellemektedir

**Anahtar Kelimeler:** Laktik Asit Bakterisi, probiyotik, vajinal smear.

# IDENTIFICATION OF POTENTIAL PROBIOTIC PROPERTIES OF SOME LACTIC ACID BACTERIAL GENERA WHICH IS ISOLATED FROM VAGINAL SECRETION

## ABSTRACT

In this study, Lactic acid bacteria were isolated by smear example taken from women vaginas who were not in menopause period, not using any oral contraceptives and not had any antibiotic treatment in the last three months. *Pediococcus acidilactici* OZV and *Lactobacillus brevis* OZV were identified and used as main strains according to the biochemical tests and the analysis of 16S rDNA. The resistance value of the both strains to the low pH, bile salt, pepsin and pancreatin, so it could survive while passing through the upper part of the gastrointestinal tract and reveal its potential probiotic action on host organism. High resistance levels were observed for the strains with  $\gamma$ -hemolytic profile, especially for the ones used in antibiotic treatments. *P. acidilactici* OZV strain produced bacteriocin but, *L. brevis* OZV strain did not produced any bacteriocin. Autoaggregating proportion of *P. acidilactici* OZV strain was observed as 79,49% and also *L. brevis* OZV stain was observed as 78,13% at the end of five hours. The coaggregation of *P. acidilactici* OZV strain with *S. Typhimirium* SL1344 and *E. coli* LMG3083 (ETEC) after five hours respectively were 4,35% and 11,82%, whereas the coaggregation of *L. brevis* OZV strain with *S. Typhimirium* SL 1344 and *E.coli* LMG3083 (ETEC) after five hours respectively were 9,52% and 9,09%. The adhesion percentages of *P. acidilactici* OZV and *L. brevis* OZV strains to Caco-2 cells were determined as 12,29% ( $\pm 1,42$ ) and 12,10% ( $\pm 3,7$ ) respectively. There was no difference found in the adherence percentages of the all strains as of statistical analysis (ANOVA) ( $p > 0.05$ ). *P. acidilactici* OZV and *L. brevis* OZV strains inhibited *E.coli* LMG3083 (ETEC) strain with the level of 87,31% ( $\pm 1,62$ ), 82,21% ( $\pm 3,69$ ) and inhibited *S. Typhimirium* SL1344 strain with the level of 83,04% ( $\pm 3,46$ ), 78,94% ( $\pm 1,62$ ) in the competition tests.

**Key words;** Lactic acid bacteria, probiotic, vaginal smear.

## TEŞEKKÜR

Doktora tezim boyunca bana her türlü araştırma olanağını sağlayan, tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve önerileri ile bana yol gösteren değerli tez danışmanım Doç. Dr. Özlem Osmanağaoğlu'na,

Jüri üyesi olarak tezimi değerlendiren kıymetli bilgi ve desteklerinden faydalandığım değerli hocalarıma, Prof. Dr. Candan Gürakan'a, Prof. Dr. Yavuz Beyatlı'ya, Prof. Dr. Cumhur Çökmüş'e, Yard. Doç. Dr. Doruk Engin'e ve aynı zamanda çalışmamın deneysel aşaması için her türlü imkanı ve olanakları bana açan Prof. Dr. Haluk Ataoğlu'na,

Çalışmalarımnda, her zaman benden bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam, Doç. Dr. Sümer Aras'a,

Laboratuvar çalışmalarımnda bana her türlü imkanlarını ve yardımlarını sunan Prof. Dr. H. Mürvet Hayran'a, Doç. Dr. Erkan Yılmaz'a, Doç. Dr. Serdar Ceylaner'e ve Dr. Gülay Ceylaner'e,

Çalışmalarım ve tez yazım aşamalarında dostluk ve desteğini esirgemeyen Elif Yürümez'e ve A.Ü. Fen Fakültesi Mikrobiyal Genetik Laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma,

Bana her zaman manevi destekleriyle doğruya, başarıya nasıl ulaşacağımı gösteren canım anneme ve babama,

Hayatımın her aşamasında beni daima motive eden, olumlu düşünceleriyle her zaman yanımda olan ağabeyime ve hayatımın anlamı olan eşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

Feriba TURHAN ERYILMAZ

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Vajinal Floranın Tarihçesi.....	3
2.2. Vajinal Flora.....	3
2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri.....	5
2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Vajen Florasındaki Önemi.....	7
2.5. Probiyotikler.....	7
2.5.1. Probiyotik mikroorganizmaların özellikleri .....	9
2.5.2. Probiyotiklerin etki mekanizması.....	11
2.5.3. Laktik asit bakterilerinin diğer önemli probiyotik özellikleri .....	13
2.5.3.1. Asitlik ve safra tuzlarına direnç .....	13
2.5.4. Antimikrobiyel aktivite .....	13
2.5.5. Laktik asit bakterilerinin epitel yüzeye tutunması ve önemi.....	15
2.6. Vajinal Enfeksiyonlar .....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Bakteri kültürleri ve gelişme koşulları.....	19
3.1.2. Bakteri kültürlerinin saklanması.....	19
3.1.3. Kültür ortamları.....	19
3.1.4. Tampon ve çözeltiler.....	19
3.1.5. Moleküler markörler.....	20
3.1.6. Kimyasallar.....	20
3.1.7. Kullanılan çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu.....	20
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Laktik asit bakterinin izolasyonu .....	20

3.2.2. İzolatların tanımlanması.....	20
3.2.2.1. İzolatların kısmi karakterizasyonu.....	20
3.2.2.2. Biyokimyasal testler.....	23
3.2.2.3. İzolatların 16S rDNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyonu .....	23
3.2.2.3.1. Genomik DNA izolasyonu.....	24
3.2.2.3.2. Saflık ve miktar tayini.....	24
3.2.2.3.3. Agaroz jel elektroforezi.....	25
3.2.2.3.4. 16S rDNA bölgesinin baz dizininin belirlenmesi ve izolatın tanımlanması..	25
3.2.3 . <i>Pediococcus acidilactici</i> OZV ve <i>Lactobacillus brevis</i> OZV suşlarının endüstriyel açıdan özellikleri.....	26
3.2.3.1. Bakteriyosinin antimikrobiyal aktivite spektrumunun belirlenmesi.....	26
3.2.3.2. Tanımlaması yapılan suşların probiyotik özelliklerinin belirlenmesi.....	26
4. BULGULAR.....	33
4.1. Vajinal Smear'den Elde Edilen Bakterilerin İzolasyonu .....	33
4.2. İzolatların Morfolojik Karakterizasyonu.....	33
4.3. <i>Pediococcus acidilactici</i> OZV ve <i>Lactobacillus brevis</i> OZV suşlarının Endüstriyel Açıda n Özellikleri.....	35
4.3.1 <i>Pediococcus acidilactici</i> OZV suşu tarafından üretilen antimikrobiyel maddenin aktivite spektrumu.....	35
4.3.3. <i>Candida albicans</i> 'a karşı antimikrobiyal maddenin belirlenmesi.....	35
4.4. <i>Pediococcus acidilactici</i> ve <i>Lactobacillus brevis</i> suşlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi.....	37
4.4.1. Suşların düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzuna karşı direnç özellikleri.....	37
4.4.2. Hemolitik aktivitenin belirlenmesi.....	40
4.4.3. Suşların antibiyotik duyarlılık düzeyleri.....	41
4.4.4. Suşların Caco-2 Hücrelerine Tutunma Özellikleri .....	45
4.4.5. Patojen bakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunmalarının engellenmesi.....	49
5 . TARTIŞMA VE SONUÇ .....	50
KAYNAKLAR.....	57
EKLER.....	70
EK 1: Besi yerleri ve kimyasal bileşenler.....	71

<b>EK 2: Tampon ve Çözeltiler .....</b>	<b>72</b>
<b>EK 3: DNA Analizinde Kullanılan Moleküler markörler.....</b>	<b>74</b>
<b>EK 4: Kromozomal (Genomik) DNA İzolasyonunda Kullanılan Promega Wizard Genomik DNA İzolasyon Kiti Prospektüsü.....</b>	<b>75</b>
<b>EK 5: 16S Dizi analizi ve Blast sonucu.....</b>	<b>77</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>93</b>



## SİMGELER DİZİNİ

BV	Bakteriyal Vaginosis
DNA	Deoksiribonükleik Asit
HPV	Human Papilloma Virus
Caco-2	İnsan Kolon Adeno Carcinoma
DKVH	Doğum kontrolü sağlayan vajinal halkalarla
RNA	Ribonükleik Asit
rDNA	Ribozomal DNA
VVK	vulvovajinal kandidiasis
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
kb	Kilobaz
L	Litre
M	Molar
N	Normal
ml	Mililitre
rpm	Dakikada Devir Sayısı
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre
Mb	Megabaz
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
UV	Ultraviyole
OD	Optik Yoğunluk
nm	Nanometre
log	Logaritma
v/v	Hacim/Hacim
kob/ml	Mililitredeki Koloni Oluşturan Birim
kDa	Kilo Dalton
sn	Saniye
dk	Dakika
g	Gram
mg	Miligram
°C	Selsius Derecesi
bç	Baz Çifti

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.4.1. <i>Pediococcus acidilactici</i> OZV (a), <i>Lactobacillus brevis</i> OZV (b) suşlarının ışık mikroskop görüntüsü.....	34
Şekil.4.2. <i>Pediococcus acidilactici</i> OZV (a) <i>Lactobacillus brevis</i> OZV (b)suşlarının pH' a karşı direnç özellikleri (kob/ml).....	37
Şekil.4.3. <i>Pediococcus acidilactici</i> OZV (a) <i>Lactobacillus brevis</i> OZV (b) suşlarının pepsin direçliliği.....	38
Şekil.4.4. <i>Pediococcus acidilactici</i> OZV (a) <i>Lactobacillus brevis</i> OZV (b) suşlarının safra tuzu dirençliliği (kob/ml).....	38
Şekil.4.5. <i>Pediococcus acidilactici</i> OZV (a), <i>Lactobacillus brevis</i> OZV (b) suşlarının pankreatin dirençliliği (kob/ml).....	39
Şekil.4.6. <i>Pediococcus acidilactici</i> OZV suşunun 1.(a), 3.(b)ve 5.(c) saatlerindeki otoagregasyon sonucu ışık mikroskobundaki görüntüleri.....	43
Şekil.4.7. <i>Lactobacillus brevis</i> OZV suşunun 1.(a), 3.(b) ve 5.(c) saatlerindeki otoagregasyon sonucu ışık mikroskobundaki görüntüleri.....	43
Şekil.4.8. <i>Pediococcus acidilactici</i> OZV suşunun <i>E. coli</i> LMG3083 (ETEC) ile 1. saat (a), 3. saat(b) ve 5. saat (c) koagregasyonun ışık mikroskobik görüntüsü (1000X).....	44
Şekil.4.9. <i>Pediococcus acidilactici</i> OZV suşunun <i>S.Typhimurium</i> SL 1344 ile 1. saat(a), 3 saat(b) ve 5. saat(c) koagregasyonun ışık mikroskobik görüntüsü (1000X).....	44
Şekil.4.10. <i>Lactobacillus brevis</i> OZV suşunun <i>E. coli</i> LMG3083 (ETEC) ile 1.saat(a), 3.Saat(b) ve 5.saat(c) koagregasyonun ışık mikroskobik görüntüsü (1000X).....	45
Şekil.4.11. <i>Lactobacillus brevis</i> OZV suşunun <i>S.Typhimurium</i> SL 1344 ile 1.saat(a), 3. saat(b) ve 5. saat(c) koagregasyonun ışık mikroskobik görüntüsü (1000X).....	45
Şekil.4.12.. <i>E. coli</i> LMG3083 (ETEC), <i>S. Typhimurium</i> SL1344, <i>Lactobacillus brevis</i> OZV ve <i>Pediococcus acidilactici</i> OZV suşlarının Caco-2 hücrelerinin tutunma yüzdeleri.....	46
Şekil.4.13. <i>Pediococcus acidilactici</i> OZV suşunun Caco-2 hücrelerine tutunma görüntüleri (a) floresan mikroskop ve (b) SEM.....	47
Şekil. 4.14. <i>Lactobacillus brevis</i> OZV suşunun Caco-2 hücrelerine tutunma görüntüleri (a) floresan mikroskop ve (b) SEM.....	48

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. İnsan vajinasının normal mikroflorası.....	5
Çizelge 2.2 Probiyotik üretiminde kullanılan mikroorganizmalar.....	9
Çizelge 2.3. Probiyotik seçim kriterleri.....	10
Çizelge 2.4. Probiyotiklerin potansiyel etki mekanizmalarının temeli.....	12
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri, gelişme ortamları ve uygun gelişim sıcaklıkları.....	22
Çizelge 4.2. <i>Pediococcus acidilactici</i> OZV suşu tarafından üretilen antimikrobiyel maddenin aktivite spektrumu.....	36
Çizelge 4.3.a <i>Pediococcus acidilactici</i> OZV suşunun pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzunda yapılan deneyler sonucunda oluşan canlılıkları.....	39
Çizelge 4.4.b <i>Lactobacillus brevis</i> OZV suşunun pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzunda yapılan deneyler sonucunda oluşan canlılıkları.....	40
Çizelge 4.5 <i>Pediococcus acidilactici</i> OZV ve <i>Lactobacillus brevis</i> OZV suşlarının antibiyotik duyarlılık profili.....	42

## 1. GİRİŞ

Yetişkin kadınlarda genital bölgede çok sayıda aerobik ve anaerobik bakteri türlerini içeren bir mikrofloraya sahiptir. Bu mikroflora içerik olarak konağın anatomik, fizyolojik ve immunlojik gelişimi olarak değişmektedir (Di Rosa vd 1993). Kadın genital bölgesindeki mikroflorada sıklıkla *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus* ve *Enterococcus* cinslerine ait bakteri türleri görülmektedir (Koneman vd 1992). Ayrıca *Lactobacillus* cinsi bakteriler vajinanın normal florasında dominant mikroorganizmalar olarak bulunarak, patojenlere karşı özellikle ürogenital hastalıklara karşı korudukları bildirilmiştir (Boris vd 1989, Falsen vd 1999, McLean vd 2000). *Lactobacillus* cinsi bakterileri arasında çoğunluğu *L. acidophilus* oluştururken, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. jensenii*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. vaginalis* ve *L. salivarius* suşları da tesbit edilmiştir (Redondo vd 1990, Song vd 1999, Zhong vd 1998). *Lactobacillus* cinsi bakteriler sağlıklı kadının vajinal mukozasında bir vajen epiteline yapışarak, diğer patojen mikroorganizmaların vajen içinde yayılarak gelişmelerini engellerler. Buna ek olarak laktik asitlerin salgılanması, antimikrobiyal maddelerin (bakteriyosin ve hidrojen peroksit gibi) üretilmesi, besin maddeleri veya vajinal epitele tutunmada reseptörler için rekabet ve koagregasyon gibi çeşitli mekanizmaları kullanarak gelişimlerini engellerler (Boris vd 2000; Lepargnuer vd 2002). Probiyotik olarak kullanımı açısından bayanlarda görülen vaginitis engellemektedir. Bu nedenle araştırmalar vajinadan izole edilen laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin saptanmasına ve probiyotik özellikteki çeşitli bakterilerin endüstriyel alanda, tıpta tedavi amaçlı, probiyotik yardımcı olarak *Lactobacillus* cinsi bakterilerin probiyotik olarak kullanımı için araştırmalar önem arz etmektedir.

Probiyotikler, belirli miktarlarda tüketildiğinde konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkilere neden olan mikrobiyel gıda katkıları olarak tanımlanmaktadır. Probiyotiklerin tüketici sağlığı üzerinde yarattığı etkilerin en detaylı şekilde araştırıldığı mikroorganizma grubu laktik asit bakterileridir.

Probiyotik özellikleri açısından kullanılacağı gıda sistemindeki davranışı ve gerekse hedef tüketici sağlığı üzerinde yaratacağı olumlu etkiler esas alınarak belirlenmektedir. Probiyotik mikroorganizmanın öncelikli olarak insan orjinli olması ve gastrointestinal sistemde canlılığını sürdürmesi, gastrik aside ve fizyolojik konsantrasyondaki safra tuzuna

dirençli, ince bağırsak epitel hücrelerine tutunma özelliği göstermesi, diğer patojenlerin epitele tutunmasını engellemesi gerekmektedir. Suşların ilk aşamasında ince bağırsak mukozasına tutunma özellikleri, gastrointestinal sistemde kolonize olmalıdır. Söz konusu kolonizasyon sayesinde probiyotik mikroorganizmanın etki süresi artmakta ve immün sistem modülasyonu gerçekleştirilebilmektedir.

Laktik asit bakterilerinin vajen florasında ve doğal insan florasındaki olumlu etkilerinden dolayı, probiyotik özelliklere sahip endüstriyel işlem süresince uzun süreli canlı kalabilme yeteneğine sahip seçici mikroorganizmalar içermeli ve saklama süresince özellikleri değişmeden koruyabilen bazı suşlar kullanılarak, hastalıkların tedavisinde antibiyotiklere alternatif olması düşünülmektedir (Zarate vd 2006). Endüstriyel kullanımda giderek artan değeri nedeniyle, üstün probiyotik özelliklere sahip suşların detaylı tanısı üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülmektedir. Günümüzde hem daha güvenilir ve hem de daha ekonomik olması nedeniyle probiyotik biyoteknolojisine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır (Aroutcheva vd 2001, Charteris vd 1997). Bu esas doğrultusunda planlanan doktora tez çalışmasında; insan vajenasından izole edilen laktobasillerin probiyotik özelliklerinin evrensel kriterler kullanılarak probiyotik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Vajinal Floranın Tarihçesi

Doderlein tarafından normal insan vaginal mikroflorasının ilk çalışmaları 1892' de yayınlanarak, vaginal floranın homojen olduğunu ve sadece Gr (+) basiller içerdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca basilleri şimdiki *Lactobacillus* cinsinin üyeleri olduğu bilinmektedir. *Lactobacillus* türleri normal postpubertede vajinal florada baskın mikroorganizmalardır (Lepargner vd 2002), ayrıca ilk çalışmalarda vajinanın heterojen bir flora olduğu gözlenmiştir. Hasta kişilerde ilk olarak vajina florası araştırılmıştır. Son 80 yıl boyunca Koliform, Difteroidler, aerobik Gr (+) koklar ve diğer potansiyel patojen bakterileri içeren mikroorganizmaların geniş varyasyonları normal vajinada tespit edilirken, anaerob bakteriler 1928 yılında normal vajinada belirlenmiştir. Gebe ve gebe olmayan kadınların %90' dan fazlasında vajen salgılarında anaerob organizmaların bulunduğu 1938' de Weinstein tarafından tespit etmişlerdir. Benzer olarak 1947' de Hite ve arkadaşları normal vajinada anaerob organizmaların sıklığını belirlemişlerdir. Laktobasiller sağlıklı bir insan vajinasının dominant bakterileridir ve ilk defa Rogosa tarafından 1963 yılında tarif edilmiştir ve kadının üreme yatağı içinde iyi tanımlanmış normal veya doğal mikroflarının rutin olarak bulunan bir parçası olduğunu bildirmiştir (Lachlack vd 1996). 150 insan örneği içinde vajinal floradan *Lactobacillus acidophilus* izole edilmiştir (Reid vd 1996), 100 sağlıklı kadının vajinasından *Lactobacillus* türlerini tanımlamışlardır. *Lactobacillus* türlerinin insan vajinası içinde sayıları (sıvının yaklaşık 107-108 Cfu/ml) hakkındaki görüşler benzerlik gösterirken ana türler olup olmadığı hakkında bilgi ve görüşler farklılık gösterilmektedir. Çeşitli araştırmacılar 54 sağlıklı kadının vajinasından üç menstural siklus sırasında dokuz kez alınan örnekler 4997 isolat arasında 40 cins ve 94 tür belirlenmiştir. Sağlıklı kadının vajinasından *Lactobacillus* (% 100), *Gardnerella* (%33) izolasyonu rapor edilmiştir (Lopez vd 1990).

### 2.2. Vajinal Flora

Oral kontraseptif, gebelik ve doğum sırasında serviks kanalının bez yapısının değişmesi ve serviksin yapısından dolayı serviks mikroflorası net olarak bilinmemektedir. Serviksin mikroflorasında hem aerobik hemde anaerobik bakterilerin bulunduğu bildirilmiştir (Charteris 1997). Vajina epitelinde östrojen hormonunun salımından sorumlu glikojen

depoları bulunmaktadır (Paavonen vd 1983). Vajinadaki laktik asit kaynağının çoğunluğunu vajinal bakterilerin oluşturduğu önerilmektedir (Bosket vd 1999, 2001). Vajinal floranın pH'ının < 4-5 olmasının sebebi olarak Laktobasillerin çoğunlukta olması gösterilmektedir (Lopez vd 1990). Mikrofloranın düşük pH' da olması patojenlerin kolonizasyonunu engellemektedir (Maria vd 2003). Yaşa bağlı olarak vajinanın florası dört dönemde incelenmektedir. Neonatal dönem (yenidoğan dönemi), Prepubertal dönem (ergenlik öncesi dönem), Postpubertal dönem (ergenlik sonrası dönem), Postmenopozal dönem (menopoz sonrası dönem) olarak incelenir. Anne hormonlarının etkisinde bulunan doğumdan hemen sonra bebeğin vajinal florası asidik ortamında aerob *Lactobacillus*' lar bulunur. Vajinal florada *Lactobacillus*' lar puberteye kadar bulunmaz ve vajen flora pH' ı ise nötraldir. Bu dönemde *S. epidermidis* Gr (+) ve Gr (-) koklarla, Gr (-) koliform basillerden oluşan karışık bir flora bulunur. Menopozdan sonrada vajina florası buna benzerlik gösterir. Vajinal flora puberte ile değişir ve vajina epitelinde kornifikasyon ve yassılaşıma meydana gelir. Bu dönemde florada bulunan bakteriler; *Lactobacillus* (florada yoğun miktarda), *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Mycoplasma*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Listeria* cinsleri ile *Gardnerella vaginalis* bulunmaktadır. Menopoz' dan sonra *Lactobacillus*' lar tekrar ortamdan kaybolurlar ve yine karışık bir bakteri florası oluşur. Çizelge 2.1' de insan vajinasının normal mikroflorası verilmiştir (Lopez vd 1999). *Lactobacillus* cinsi bakteriler insan vajinasının normal florasında çoğunlukta görülen mikroorganizmalar olduğu bildirilmiştir (Lepargner vd 2002). Mukozadaki bir biyofilm tabakasını oluşturan *Lactobacillus* cinsi bakteriler sağlıklı bir insanın vajinal mikroflorasını oluşturmaktadır. Bu bakteriler vajen epiteline yapışarak, diğer mikroorganizmaların vajen içinde yayılıp, burada gelişmelerini engeller. Hidrojen peroksit üretimi ve pH'ının 4,0-4,5 arasında değişkenlik göstermesi bakteriyal vajinal enfeksiyonlara karşı mikroorganizmaların oluşmasını engellemektedir (Jack vd 1996). Bunun yanısıra vajinal floranın pH'ının artması *Lactobacillus* cinsi bakterilere negatif etki ettiği ayrıca laktik asidin ve *Lactobacillus*' ların lokal asidifikasyonu vajinal ekosistemin yenilenmesini sağladığı gösterilmiştir (Melis vd 2000).

Gebelik, yaş, menopoz, antibiyotik ve sigara kullanıma bağlı olarak vajinal mikrofloranın içeriği değişmekte *Lactobacillus* cinsi bakterilerin vajinadaki oranını düşürmekte ve buna bağlı vajinal enfeksiyonların arttığı bildirilmektedir (Lopez 1990, Mc Graarty 1993, Charteris 1997).

Çizelge 2.1. İnsan vajinasının normal mikroflorası (Lopez vd 1999)

Mikroorganizmalar	52 Sağlıklı insan vajinasından belirlenen mikroorganizmaların dağılımı	
<i>Lactobacillus</i>	45	87
<i>Staphylococcus</i>	32	62
<i>Ureaplasma</i>	28	54
<i>Corynebacterium</i>	19	37
<i>Streptococcus</i>	16	32
<i>Gardnerella</i>	9	17
<i>Bacteroides</i>	7	13
<i>Mycoplasma</i>	7	13
<i>Candida</i>	7	13
<i>Eubacterium</i>	4	8
<i>Bifidobacterium</i>	3	6
<i>Propionibacterim</i>	2	4
<i>Escherichia</i>	1	2
<i>Sarcina</i>	1	2
<i>Klebsiella</i>	1	2

### 2.3. Laktik Asit Bakterilerinin Genel Özellikleri

*Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragococcus*, *Aerococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* cinslerini içeren LAB, Gram- pozitif, fakültatif anaerob, katalaz negatif, “Hem” grupları (sitokrom ve katalaz) olmayan, spor oluşturmeyen, genelde hareketsiz, karbonhidrat fermantasyonu sırasında son ürün olarak laktik asit üreten *Lactobacillaceae* familyasına ait olan bakteri gruplarıdır (Daeschel vd 1989, Hofwerdahl vd 2000).

*Lactobacillus* cinsi bakteriler genellikle çubuk (basil) şeklinde olup, ancak bazı türleri farklı uzunlukta ve zincir şeklindedir (kok-basil) (Tunail vd 1989, Halkman vd 1991, Yetişmeyen vd 1995). Elektron mikroskopuyla yapılan incelemelerde *Lactobacillus* cinsi



bakteriler hücre çeperi, sitoplazmik membran, ribozomlar ve nükleer (kromozomlar ve plazmidler) elementlerden oluştuğu gösterilmiştir (Sneath vd 1986).

Hücre çeperi; *Lactobacillus* cinsi bakterilerin hücre çeper kalınlığı 20-40 nm kalınlığında, su, mineral maddeler ve metabolitleri geçirebilen, N-asetilglukozamin ve N-asetilmurminik asit monomerlerinden oluşan peptidoglikan bir tabakaya sahiptirler. Ayrıca hücre çeperi yapısında teikoik asit, şekerler, proteinler ve nötr polisakkeritler de bulunur. Bakterilerin hücre çeperi, çoğalma ve azotlu maddelerin parçalanmasında rol alan proteaz enzimlere sahiptirler (Sneath vd 1986).

Sitoplazmik membran; Proteinleri kullanabileceği büyüklüğe getirilmesi sitoplazmik membranda bulunan enzimler aracılığı ile gerçekleştirilir. Sitoplazmik membranda peptidoglikanların ekstrasellüler polimerizasyonu için gerekli enzimler bulunur ayrıca fosfotransferaz enzimi ile aktif taşıma yapılmaktadır (Sneath vd 1986).

Ribozomlar; Laktik asit bakterilerinde ribozomlar 70S tipindedir, 70S, 50S büyük ve 30S küçük olmak üzere iki alt ünitelerden oluşur. 50S' lik alt birim 50S rRNA ve 23S rRNA ile yaklaşık 35 çeşit protein; 30S' lik küçük alt birim ise 16S rRNA ve 25 farklı protein içerir. Laktik asit bakterilerinin birbirinden ayrımında 16S rRNA' nın özelliklerinden yararlanılmaktadır (Sneath vd 1986).

Plazmid; Ekzopolisakkarit ve antimikrobiyal madde sentezi yaparak bakteriyi korumaktadır. Laktik asit bakterileri genellikle en az bir adet plazmid içermektedir (Sneath vd 1986).

Laktik asit bakterileri laktik asit fermantasyonuyla oluşturdukları ürünlerin cinsine göre iki gruba ayrılırlar; Homofermentatif laktik asit bakterileri ve Heterofermentatif laktik asit bakterileri. Homofermentatif bakteriler (ör: *Lactobacillus acidophilus*) nadiren laktik asit üretirken, heterofermentatif bakteriler karbondioksit, etanol veya asetik asit üretmektedirler (Drinan vd 1976, Prescott vd 1987, Halkman vd 1999).

## 2.4. Laktik Asit Bakterilerinin Vajen Florasındaki Önemi

Vajen florasında bulunan laktik asit bakterilerinin önemli ölçüde ürogenital enfeksiyonları önlediği ve cinsel yolla bulaşan hastalıklara sebep olan patojenleri engellediği gözlemlenmiştir (Alejandra vd 2002). Sağlıklı kadının vajinasında %100 oranında *Lactobacillus* cinsi bakterilerin izolasyonu rapor edilmiştir (Lepargnuer vd 2002). Schroder (1921) yaptığı çalışmada *Lactobacillus*' un vajen florasındaki koruyucu rolünü (i) *Lactobacillus* 'ların dominant olduğu, en az patojenlerin bulunduğu (ii) orta ve (iii) *Lactobacillus* 'ların bulunmadığı, patojenlerin en yoğun olduğunu belirtmiştir (Schroder vd 1921). Yapılan çalışmalar Laktik asit bakterileri sağlıklı kişilerin gerek bağırsak, gerekse vajen florasında bulunarak patojen mikroorganizmalara karşı mikrobiyolojik bir bariyer görevi görmektedir. Ayrıca, kanserojen maddelere karşıda önemli bir savunma birliği içindedirler (Charteris vd 1999). Vajen florasındaki laktik asit bakterilerinin hemen hemen tümünün homofermantatif tipte laktik asit bakterisi olduğu bildirilmiştir (Nessler vd 1994). Vajinal floranın dominant ajanları olan *Lactobacillus* ' lar, vajinanın doğal dengesinin korunmasında ve patojenlerin yerleşmesinin engellenmesinde önemli rol oynadıkları çeşitli araştırmalar sonucu gözlenmiştir. Laktobasillerin vajinayı patojenlerin kolonizasyonundan, epitele yapışmalarını engelleyerek ya da üremelerini inhibe eden maddeler salgılayarak koruduğuna inanılmaktadır (Lopez vd 1990, Prosod vd 1998). Antonio (1999) *L. crispatus*, *L. jensenii* ve *L. gasseri* vajinadaki en önemli türlerinin olduğunu belirtirken, kadınların hiçbirinden *L. acidophilus* izole edilmediğini bildirmiştir. Diğer çalışmalarda *L. rhamnoosus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* ve *L. acidophilus* vajinada çoğunlukla görüldüğü belirtilmiştir (Rodendo vd 1990, Reid vd 1996, Zhong vd 1998). LAB' nin vajen florasındaki çeşitliliği birçok nedene bağlı olarak değiştiği ancak bulduğu bakteri ve miktarına göre insan sağlığında olumlu yönde önemli bir yer teşkil etmektedir.

## 2.5. Probiyotikler

Probiyotik kelimesi, Yunanca'dan gelmekle birlikte "yaşam için" anlamında kullanılmaktadır. Probiyotik kelimesi ilk defa 1960'lı yıllarda Lily ve Stilwell tarafından, bir protozoa tarafından salgılanıp, diğer bir protozoanın gelişmesini teşvik eden metaboliti tanımlamak amacıyla kullanılmıştır (Shortt vd 1999). Probiyotikler günümüzde, insanların bağırsak mikrobiyel dengesini düzenleyen yararlı, canlı mikrobiyel gıda içerikleri olarak değerlendirilmektedir (Shah vd 1997, Oh vd 2000, Shah vd 2000, FAO/WHO 2001).

Probiyotik bakterilerin sağlık üzerinde olumlu etkileri; laktoz toleransı azaltma, patojenik virüsleri ve bakterileri inhibe etme, vitamin üretimi, serum kolesterol seviyesinin düşürülmesi, tümör oluşumunu inhibe etme, diyare oluşumunu engelleme, kalsiyum absorpsiyonunu geliştirme, antikanserojenik aktivitede bulunma ve bağırsak mikrobiyel dengesinin düzenlenmesidir (Tamime vd 1997, Vinderola vd 2000a; Vinderola vd 2000b).

Probiyotik mikroorganizmaların en önemli grubunu laktik asit bakterileri oluşturmaktadır. Bunların içerisinde *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri en yaygın olarak kullanılan probiyotik mikroorganizmalardır. Ayrıca bazı bakteri cinsleri ile maya ve küf türlerinden de probiyotik ürünlerin hazırlanmasında yararlanılmaktadır (Lee vd 1995, Salminen vd 1998 (Çizelge 2.2), Billoo vd 2006, Kim vd 2006). Probiyotikler çeşitli etki mekanizmaları ile enfeksiyonları kontrol altına almaktadır (Klaenhammer vd 1998). Bu mekanizmalardan en etkili olanı, enteropatojen mikroorganizmaların konakçının gastrointestinal sisteminde kolonizasyonunu önlemek amacıyla bağırsak epitel yüzeyindeki tutunma bölgeleri için rekabet oluşturmalarıdır (Serdaroğlu vd 2004).

Çizelge 2.2. Probiyotik üretiminde kullanılan mikroorganizmalar (Salminen vd 1998)

<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>Lactobacillus cellobiosus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Bifidobacterium</i> türleri	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium thermophilum</i>
<i>Bacillus</i> türleri	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus lentus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus coagulans</i>
<i>Pediococcus</i> türleri	<i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i> türleri	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Bacteriodes</i> türleri	<i>Bacteriodes capillus</i> , <i>Bacteriodes suis</i> , <i>Bacteriodes ruminicola</i> , <i>Bacteriodes amylophilus</i>
<i>Propionibacterium</i> türleri	<i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Leuconostoc</i> türleri	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
Küfler	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Mayalar	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida torulopsis</i>

### 2.5.1. Probiyotik mikroorganizmaların özellikleri

Probiyotik bir mikroorganizmanın tanımı için zorunlu kriterler LABIP (Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu) tarafından belirlenmiştir (Guarner vd 1998, Ewaschuk vd 2006). Buna göre probiyotik potansiyeli taşıyan mikroorganizmalar Çizelge 2.3' de verilen kriterlere göre belirlenmektedir.

### Çizelge 2.3. Probiyotik seçim kriterleri

Probiyotik türün özellikleri	Açıklama
İnsanlar için kullanılacak ürünlerde insan kaynaklı suşların kullanımı	İnsan orijinli olmamasına rağmen insanlar için kullanılan <i>Saccharomyces boulardii</i> gibi bir örneğe rağmen türe bağlı sağlık etkileri açısından bu özellik önem taşımaktadır.
Asit ve safra tuzlarına direnç	Diğer kullanımlar için olmasa bile ağızdan yapılan uygulamalarda mikroorganizmanın canlı kalma, metabolik aktivitesini devam ettirebilme ve tutunabilme özelliklerini sürdürebilmesi önemlidir.
Mukozal yüzeylere tutunma	İmmün sistemin güçlendirilmesi, patojenlerle yarışmalı rekabet, tutunmanın engellenmesi ve kolonizasyonun engellenmesi açısından önemlidir.
Gıda ve klinik amaçlı kullanımlarda güvenilirlik	Suşların doğru olarak tanımlanmaları ve özelliklerinin belirlenmesi. İntestinal sistemde mukozal yapıya zarar vermeyen ve invazyon özelliği olan suşların kullanılmaması.
Klinik olarak kanıtlanmış ve sağlık üzerine olumlu etki	Her bir farklı suşun veya ürünün minimum etki dozunun belirlenmesi plasebo kontrollü ve çok tekerrürlü canlı denemelerinin gerçekleştirilmesi.
Teknolojik açıdan üstün özelliklere sahip suşlar	Suşun stabilitesi, faj dirençliliği, üründe canlı kalabilme kabiliyeti (canlı mikroorganizma gereksinimi varsa), büyük ölçekte üretime uygunluk, ürün tadına olumsuz etkisinin olmaması, oksijen direnç kabiliyeti.

Fermente ürünlerin ve probiyotiklerin çeşitli gastrointestinal hastalıkları önlediği ve tedavi ettiğini açıklayan bir çok yayın bulunmaktadır (Gorbach vd 1981, Kailasapathy vd 1997, Ocaña vd 2006 ). Ancak insan sağlığı söz konusu olduğundan tedavi amaçlı kullanılacak bu bakterilerin seçimi çok önemlidir. Yararlı olsun veya olmasın spesifik bir probiyotik mikroorganizma, cins ve tür düzeyinde doğru olarak tanımlanamadıkça sağlık üzerine olumlu etkisinden söz edilmemelidir (Sanders 1999). Çok sayıdaki ve çeşitli denemeler arasında nadiren de olsa suşa-özü etkilerden bahsedilmiştir. Buna karşılık immün fonksiyon, anti kanser etki ve diyarenin engellenmesi gibi faydaları, *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve *Bifidobacterium* gibi değişik cinslere özgü farklı kültürler tarafından gösterilmektedir. İlerleyen zamanlarda etki mekanizmaları daha iyi anlaşıldıkça ve kontrollü çalışmalarla aynı genetik yapıya sahip suşlar arasındaki farklılıklar tam olarak ortaya konuldukça, suşlara özgü tahmin edilen probiyotik etkiler kanıtlanmış olacaktır. Konakçının fizyolojik koşullarında mikroorganizma suşunun probiyotik etkinliğinde önemli rol oynamaktadır (Fuller vd 1989, Sanders vd 1999).

## 2.5.2. Probiyotiklerin Etki Mekanizması

Probiyotiklerin etki mekanizmasına yönelik çalışmalar, bağırsak florasının düzensizliğiyle ortaya çıkan gastrointestinal sistemdeki bozukluklara dayanarak yapılmaya başlanmıştır (Salminen vd 1999). Probiyotiklerin intestinal sistem bozukluklarına karşı konakçıyı nasıl koruduğunu gösteren çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Ancak yine de hangi patojenlere karşı hangi probiyotiklerin etkili olduğunun tam olarak belirlenmesi için daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir. Probiyotiklerin muhtemel etki mekanizmaları aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

*İnhibe edici maddeler üreterek:* Probiyotikler gram pozitif ve gram negative mikroorganizmalar üzerinde etkili birçok madde (laktik asit, hidrojen peroksit, bakteriosin ve bakteriosin benzeri maddeler) üreterek (Healander vd 1997).

*Tutunma bölgelerini bloke ederek:* Probiyotikler tutunma bölgeleri için patojenler ile rekabete girerek, intestinal sisteme yerleşmelerini engellemektedir (Tuomola vd 1999).

*Besin maddeleri için rekabet:* Probiyotikler patojenlerin sistemde uzun süre kalmasını engellemek için gerekli olan besin maddelerini tüketerek (Fuller vd 1989, Sanders vd 1999).

*Toksin resöptörlerinin yıkımı:* Hayvanlarda *S. boulardii*' nin intestinal mukozada bulunan *Clostridium difficile*' nin toksin resöptörlerini parçalayarak konakçıyı koruması nedeniyle ortaya atılmıştır (Fuller vd 1989, Sanders vd 1999).

*Bağışıklık sistemini güçlendirmesi:* Son yıllarda yapılan çalışmalar probiyotiklerin spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sistemini güçlendirerek intestinal hastalıklara karşı konakçıyı koruduğunu ortaya koymuştur (Marteau vd 2002).

Probiyotiklerin hastalıktan koruyucu ve tedavi edici etkileri aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 2.4) (Fuller vd 1989, Sanders vd 1999, Laurens vd 2001).

Çizelge 2.4. Probiyotiklerin potansiyel etki mekanizmalarının temeli

Yararlı etki	Etkinin mekanizması
Ürogenital enfeksiyonlar	- Kolonizasyon direnci - İnhibitör üretimi (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , biyosüfaktant) - Ürinar ve vajinal bölge hücrelerine adhesyon
Enterik patojenlere karşı direnç	- Bağışıklık salgılama etkisi - Kolonizasyon direnci - İntestinal sistemin patojenler için uygun olmayan koşullara değişimi (pH, kısa zincirli yağ asitleri ve bakteriyosinler) - Toksin bağlama bölgelerinin yapısal değişimi - İntestinal flora popülasyonları üzerindeki etki - İntestinal mukozada agregasyon oluşturarak patojenlerin bağlanmasını engelleme - İntestinal mucus üretimini düzenleyerek patojenlerin epitel hücrelere tutunmasını önlemek
Bağırsak kanserini önleyici etki	- Mutajenleri bağlama - Karsinojenlerin aktivitesini engelleme - Bağırsak mikroorganizmalarının ürettiği karsinojen üreten enzimlerin inhibisyonu - Bağışıklık sistemini güçlendirme (immün yanıt) - İkincil safra tuzu konsantrasyonunu etkileme
İnce bağırsakta aşırı bakteri gelişiminin engellenmesi	- İnce bağırsak florasındaki aşırı gelişmiş floranın aktivitesini etkileyerek, toksik metabolitlerin üretimini engelleme - İnce bağırsak koşullarını aşırı gelişen floranın aktivitesi için uygun olmayan hale getirme
Bağışıklık sisteminin düzenlenmesi	- Enfeksiyon ve tümör oluşumuna karşı spesifik olmayan savunma mekanizmasını güçlendirme - Antijene özgü immün yanıtı yardımcı etki - IgA üretiminin artırılması
Alerji	- Antijen etkiye sahip maddelerin dolaşım sistemine geçişinin Engellenmesi
Kan lipidleri ve kalp hastalıkları	- Kolesterolün bakteri hücresi içinde asimilasyonu - Safra tuzu hidrolazın dekonjugasyonu ile safra tuzlarının atılımını arttırmak - Antioksidasyon etkisi
Hipertansiyonu önleyici etki	- Peptidazın süt proteinleri üzerine etkisi sonucu oluşan tripeptitler angiotensin 1 enzim dönüşümünü inhibe etmesi - Hücre duvarı komponentlerinin angiotensin 1 enzim inhibitörleri gibi davranması
Laktoz sindirimine katkı	- Bakteriyel laktaz ile laktozun sindirimi
<i>Helicobacter pylori</i> 'nin neden olduğu enfeksiyonlar	- <i>H. pylori</i> inhibitörlerinin üretimi (laktik asit vb)
Hepatik ensefalopati	- Üreaz üreten bağırsak florasının inhibisyonu

### 2.5.3. Laktik Asit Bakterilerinin Diğer Önemli Probiyotik Özellikleri

#### 2.5.3.1. Asitlik ve safra tuzlarına direnç

Sindirim sisteminden geçişte probiyotik olarak kullanılacak bir mikroorganizmanın sırasında canlı kalabilmesi zorunludur. Bu nedenle lizozim başta olmak üzere, ağız boşluğunda bulunan enzimlere dayanıklı olması ve midenin gastrik ortamından (pH 1.5-3.0) etkilenmemelidir. Safra tuzları, karaciğerde kolesterolden sentezlenir ve safra kesesinden duodenuma salgılanır (500-700 mL/gün) (Hoffman vd 1983). Bu asitler daha sonra kolonda mikrobiyel aktiviteden dolayı kimyasal modifikasyonlara (dekonjugasyon, dehidroksilasyon, dehidrojenasyon ve deglukuronidasyon) uğrar (Hill vd 1968, Shimada vd 1969, Hylemon vd 1983). Konjuge olmayan safra tuzları daha yüksek antimikrobiyel aktiviteye sahiptir. Gram-pozitif bakterilerin safra tuzlarına hassasiyeti, Gram-negatif bakterilerden daha yüksektir (Floch vd 1972, Tahri vd 1996).

#### 2.5.4. Antimikrobiyel aktivite

Probiyotik mikroorganizma seçim kriterlerinden birisi de patojenlere ve bozulma etmeni mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktivite göstermesidir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen organik asitler, karbondioksit, diasetil, biyosümfaktan maddeler, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve protein yapısındaki bileşikler (bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler) gibi metabolitlerin birçoğu antimikrobiyel etkiye sahiptir (Mishra vd 1996, Rolfe vd 2000, Reid vd 2001).

Laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan antimikrobiyal maddeler :

A. Laktik asit: Laktik asit bakterilerinin fermentasyon yolu ile ürettikleri bir üründür ve mikroorganizmalar üzerinde olumsuz etki yapmaktadır. Ekşi tatda, kokusuz bir organik asittir (Theresa vd 2000).

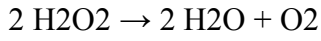
*Lactobacillus* ' lar pH' yı 3,5-3,2' ye kadar düşürebildiklerinden dolayı asitliğe karşı daha dayanıklıdırlar (Asa vd 2005).

Savay-de-Giori vd (1985), *L. plantarum* suşlarının asit üretim yeteneklerinin inkübasyon



ısına bağlı olduğunu ve *L. plantarum* CRL60 ve *L. plantarum* CRL83 suşlarının 30-37°C’ de asit üretirken, 15°C’ de asit üretmediğini bildirmişlerdir.

B. Hidrojen peroksit: Laktik asit bakterilerinin üremeleri sonucu hidrojen peroksit oluştururlar. Oluşturulan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı, laktik asit bakterilerinin cins, tür ve hatta suşlarına göre farklılık göstermektedir. Hidrojen peroksit termodinamik bakımdan kararsız bir bileşiktir, su ve oksijene ayrışır (Klaenhammer vd 1995, Delves-Broughton vd 1996).



Laktik asit bakterileri tarafından aerobik gelişme sırasında üretilen hidrojen peroksitin bir çok mikroorganizmanın gelişimini engellediği bildirilmiştir (Klaenhammer vd 1999).

Fernande (1987), bazı bakterilerin patojen mikroorganizmaların üremesini kontrol eden çeşitli antimikrobiyal maddeler oluşturduğunu bildirmişlerdir. Örneğin, *Lactobacillus lactis*’ in hidrojen peroksit üretilen *E. coli*’ nin in vivo olarak üremesini durdurduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca laktik asit bakterileri tarafından antimikrobiyal maddelerin intestinal ve üriner sistem enfeksiyonlarında koruyucu rol aldığını tespit etmişlerdir (Kmet vd 1997).

Hidrojen peroksit, ortamda yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu zaman, gerçek antibiyotik olmadığı halde *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Clostridium* gibi bir çok bakterilerin gelişimini engelleyebilmektedir (Klaenhammer vd 1995).

Seksüel yolla bulaşan Human Papilloma Virus (HPV) hastalığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’ in etkili olduğu düşünülmektedir. Aroutcheva 2001 yılında yapılan çalışmada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’ ten hipoklorik asit üretimi yapıldığı belirlenmiş ve bu ürünlerin kanser öncüsü hücreleri değiştirdiği saptanmıştır. Ayrıca hidrojen peroksit konsantrasyonu yüksek olan ortamdaki hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümünün engellendiği, hatta laktik asit bakterilerinin oluşturduğu hidrojen-peroksitin kanserli hücreleri tekrar eski haline dönüştürdüğu düşünülmektedir (Boris vd 1997).

Hidrojen peroksiti yüksek oranda üreten *Lactobacillus* türleri sağlıklı kadın vajinasında Bakteriyel Vajinosisli (BV) kadınlarda bulunan türlere göre daha fazla bulunduğu tespit

edilmiştir (Klearoff vd 1991). Ayrıca yüksek hidrojen peroksit üreten suşların bulunduğu vajinada, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Gardnerella vaginalis* gibi patojenlere öldürücü etki ettiği düşünülmektedir (Irani vd 1997).

HIV-1 virüsüyle vajinal florada bulunan *Lactobacillus*' lar arasında bir ilişki olup olmadığını belirleyen bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda vajen florasında *Lactobacillus* cinsi bakteri türlerine sahip kişilerde HIV-1 virüsüne rastlanmazken, vajinal florasında *Lactobacillus* cinsi bakteri türlerine sahip olmayan kişilerde HIV-1 virüsüne rastlanmıştır (Martin vd 2000).

### **2.5.5. Laktik asit bakterilerinin epitel yüzeye tutunması ve önemi**

Agregasyon toplanma, bir araya gelme, kümeleşme olarak tanımlanmaktadır (Kocatürk 1991). Laktik asit bakterilerinin agregasyon özelliği nedeniyle bulunduğu yüzeye ve birbirlerine yapışarak bir bariyer oluştururlar (Kımet 1997).

Laktobasillerin agregasyon olarak koloni oluşturması ağız boşluğunda ve ürogenital sistemde önemli bir rol üstlenmektedir (Reid vd 1990). Agregasyon yeteneği, benzer hücrelerin kümeleşerek otoagregasyon oluşturması, farklı genetik materyalli hücrelerin koagregasyon oluşturmasına göre belirlenmektedir (Kolenbrander vd 1988).

Laktik asit bakterileri koagregasyon özelliğinden dolayı bulunduğu ortama giren patojenlere agregasyon olarak onları etkisiz hale getirerek olası bir enfeksiyonu ve bakterinin toksik etkisini engellemiş olur (Kolenbrander vd 1988).

Probiyotikler, bağırsak epiteline tutunma, patojenlerin kolonizasyonunu azaltma, immün sistemi modüle etme ve zarar gören mukozanın iyileşmesini arttırdığı için önemlidirler. Laktik asit bakterilerin kolonizasyonunun, gastrointestinal hastalıkların önlenmesi için de önemli olduğu gösterilmiştir. Örneğin, mukozal *Lactobacillus*' ların sayılarının azalması, ulseratif kolitle ve rotavirüs diyareye neden olabileceği düşünülmektedir (Ouwehand vd 2001).

*Lactobacillus* cinsi bakterileri genelde hareketsizdirler ancak, flagellaya sahip bazı türleri hareket edebilmektedir. Bu hareketliliğin mikroorganizmaya toksik maddelerden sakınma

ve uygun yere taşınma imkanı verdiği düşünülmekte ve böylece ekosistemdeki diğer bakterilere nazaran üstünlük sağladığı düşünülmektedir (Mc Groarty 1994).

*Lactobacillus* cinsi bakterilerinden iki türü hariç diğer bütün türlerinde fimbria (pilus) gözlenmiştir (Mc Groarty 1994). Fimbrialar sindirim ve ürogenital sistemde yerleşen mikroorganizmalar için hücrelere tutunma, yapışma ve yerleşmeye yardımcı olduğu gözlenmiştir (Arda vd 1997).

Probiyotik bakteriler, ağız boşluğunda bulunan mikroorganizmaların kolonizasyonunda etkili olan tutunma ve/veya koagregasyon faktörleri gibi farklı kolonizasyon mekanizmalarına sahiptir. Laktobasillerin insanlarda ince ve kalın bağırsağa tutunma ve kolonize olma mekanizmaları, hayvanlardaki tutunma ve kolonizasyon mekanizmalarından farklıdır. Hayvanlarda bu tutunma proksimal sindirim sistemde bulunan katlanmış epitel yüzeylerinde gerçekleşmektedir (Boot vd 1996a).

İnsanda, in vivo olarak bakteriyel yapışma çalışmaları sırasında karşılaşılabilecek zorluklar nedeniyle, insan bağırsak hücrelerine bakteriyel tutunma için in vitro model sistemi geliştirilmiştir. Araştırmacılar, insan bağırsak epitelinde bulunan çeşitli tipteki hücrelerin özelliklerine sahip, insan kolon adeno carcinoma hücrelerini (Caco-2) izole ettiler. Caco-2 hücreleri normal ince bağırsak villus hücrelerinin özelliklerine sahiptir. Caco-2 hücreleri yalnızca normal mikroorganizmaların tutunma mekanizmasıyla ilgili çalışmada değil aynı zamanda bu bakterilerin patojenler ile aynı ekosistem için nasıl rekabete girebildiklerini gösteren çalışmada da kullanılmıştır. Epitel yüzeye tutunma probiyotik seçim kriterlerinden biridir. Pascual' ın 2008 yılında yaptığı çalışmada insane vajinasından izole edilen *L. rhamnosus* L60' ın bariyer mekanizmasıyla vajinal epitel koruduğu, engelleme mekanizmasıyla patojenlerin tutunmalarını engellediği ve antimikrobiyal içerik ürettiği belirtilmiştir (Pascual vd 2008). Probiyotik kültürlerin epitel yüzeye tutunabilmeleri için agregasyon yeteneğine sahip olmaları gerekmektedir (Boris vd 1997).

## **2.6. Vajinal Enfeksiyonlar**

Son yıllarda probiyotik teknolojisine yönelik bilimsel ve teknolojik çalışmalar kadın ürogenital bölge enfeksiyonlarının kontrolünde ilerlemektedir. Bir kişinin hayatının her döneminde ürogenital sistemde enfeksiyon ile karşılaşabilir. Ancak vulva ve vajinanın

hormonlara olan duyarlılığı nedeniyle yaşamın her döneminde farklı etyolojik nedenlerden dolayı birbirinden farklı klinik tablolar gösterir. Bu aşamada laktobasillerden bir flora oluşturarak birçok patojen mikroorganizmaya karşı doğal bağışıklık oluşturarak sistemi koruma altına alır.

Laktobasiller glikojence zengin, kalınlaşmış epitelin glikojenini kullanması sonucu laktik asit ve asetik asit ortaya çıkar. Bu ise, vajina pH' sını 3,5 ila 4,5 arasında tutarak birçok ajan patojenin barınmasına engel olur. Kadın genital ve ürogenital sistemde görülen bazı enfeksiyonel hastalıklar aşağıda anlatılmıştır.

Bakteriyel vajinosis (BV), normal vajinal bakteriyel floranın değişmesiyle, hidrojen peroksid üreten laktobasillerin kaybı ve anaerobik bakterilerin artması ile ortam florasına hakim olası sonucu görülmektedir (Pypus vd 1999). Normal kadınların florasında anaerobik bakteri oranı %1' in altında, BV' li kadınlarda ise anaerobların konsantrasyonu ile *Gardnerella vaginalis* ve *Mycoplasma hominis* konsantrasyonları normalden 100 ile 1000 kat daha yüksektir. Laktobasiller genellikle bulunmaz (Berek vd). Yapılan bir çalışmada ise *L. acidophilus*' un BV tedavisinde etkili olmadığı belirtilmiştir (Gregor 1990).

Trikhomonas vajiniti, cinsel yolla bulaşan, etmeni *Trikomonas vaginalis*' dir. Vajen ve servikste enfeksiyona neden olarak vajinal akıntı, vajen ve vulvada kaşıntıya sebep olur. 16-35 yaşlar arasında daha sık görülmektedir (Kocatürk 1991, Neyzi vd 1997, Ustaçelebi 1999).

Servisit, görülmesinin en önemli sebeplerini *Chlamydia trachomatis* ve *Neisseria gonorrhoeae* oluşturmaktadır. Enfeksiyöz servisitte servikal epitelinde enfeksiyon oluşur. Tedavi edilmediği takdirde pelvik enflamatuvar hastlığın (PID) neden olur (Neyzi vd 1997).

Vulvovajinal Kandidiasis , vajinal enfeksiyonlar içinde en yaygın olarak görülmektedir. Bütün kadınların %75' inin yaşam süreleri boyunca en az bir kez vulvovajinal kandidiasis (VVK) geçirdiği rapor edilmiştir. Vajinal mantar enfeksiyonlarının %85-90' ından *Candida albicans* sorumludur. *C. glabrata* ve *C. tropicalis* gibi diğer *Candida* türleri de vulvovajinal semptomlara yol açabilir (Sobel 1996). Vajinada saprofit halde

bulunabileceği gibi patojen olarak da bulunur. ‘‘Kolonizasyon direnci’’ adı verilen bir mekanizma ile laktobasiller mantarların fazla büyümesini engellerler. Antibiyotik kullanımı normal florayı ve laktobasilleri bozarak mantarların büyümesini sağlarlar (Berek vd). Gebe kadınlarda, diyabetli kişilerde, oral kontraseptif ve antibiyotik kullananlarda hücrel bağışıklığın kalitatif olarak azalması sonucu mantar enfeksiyonlarının artması görülmektedir (Neyzi vd 1997).

Doğum kontrolü sağlayan vajinal halkalarla (DKVH) ilgili yapılan çalışmada *C. albicans* ve *L. acidophilus*’ un DKVH’ a çok yüksek adhezyon kapasitesi olduğu bildirilmiştir. *L. albicans* ve *L. acidophilus* arasındaki koagregasyon mayaların vajinal hücrelere adhezyonunu azaltarak, ürogenital enfeksiyonların kontrolüne yardım eder (Chassot vd 2010).

İnsan immün yetmezlik virüsü, AIDS, genital siğiller ve üriner yolların enfeksiyon gibi enfeksiyonel hastlıklar ürogenital sistemde görülen diğer enfeksiyon türleridir. Ürogenital enfeksiyonlar dünyada kadınlar üzerinde yaygın bir sağlık problem olmasından dolayı tedavi ve korunma amaçlı bir çok uygulama yapılmaktadır. Son yıllarda seçici laktik asit bakterilerini içeren probiyotik yaklaşımlar geliştirilmiştir (Charteris 1997).

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Bakteri kültürleri ve gelişme koşulları**

Çalışmamızda kullanılan Laktik Asit Bakterileri (LAB) menopoza girmemiş, herhangi bir doğum kontrol yöntemi ile korunmayan ve 3 ay süre içerisinde antibiyotik kullanmayan 11 bayanın vajinasından smear örneği alınarak izole edilmiştir. Farklı örnekleri içeren petrilere yapılan rastgele seçimler neticesinde izolatlardan 1 tanesi *Pediococcus acidilactici*, 2 tanesi *Lactobacillus brevis* ve 1 tanesi *Pediococcus pentosaceus* olarak tespit edilmiştir. Ana suş olarak *Pediococcus acidilactici* ve *Lactobacillus brevis* suşları kullanılmıştır.

Suşların gelişimi için deMan Rogosa Sharpe agar (MRS) (Merck) besiyeri kullanılmıştır. Kullanılan kültürlerin uygun gelişim sıcaklıkları ve suşların kaynakları Çizelge 3.1' de, besiyerlerin kimyasal bileşenleri ise EK 1' de gösterilmiştir.

##### **3.1.2. Bakteri kültürlerinin saklanması**

Bakteri kültürleri uygun sıvı besiyerinde 18 saat geliştirildikten sonra mikrosantrifüj tüplerine alınarak 10.000 rpm' de 75 saniye santrifüj edilmiştir. Hücreler 1 ml steril serum fizyolojik (% 0.85 NaCl) ile 1 kez yıkandıktan sonra %50' lik steril gliserol çözeltisinden 1 ml alınarak -20°C' de saklanmıştır.

##### **3.1.3. Kültür ortamları**

Laktik Asit Bakterilerinin ve diğer bakterilerin gelişimleri için kullanılan besiyerlerinin isimleri ve içerikleri EK 1' de verilmiştir.

##### **3.1.4. Tampon ve çözeltiler**

Çalışma süresince kullanılan kristal violet stok, bazik fuksin stok, iyot tampon ve çözeltilerin içeriği EK 2' de gösterilmiştir.

### **3.1.5. Moleküler markörler**

Çalışmada kullanılan moleküler markörler EK 3' de gösterilmiştir.

### **3.1.6. Kimyasallar**

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları EK 4'de verilmiştir.

### **3.1.7. Kullanılan çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu**

Çalışmada kullanılan cam malzemelerin sterilizasyonu için 185°C'de 1 saat pastör fırını kullanılmıştır. Kullanılan besiyerleri, tampon ve solüsyonlar için ise 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir.

## **3.2 . Yöntem**

### **3.2.1. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu**

Medicana International Ankara Hastanesinin Kadın Doğum Polikliniğine başvuran 5 gönüllü kadının, vajenlerinden steril swap ile smear alınmıştır. Alınan numuneler, steril şartlarda laboratuvara getirilerek aynı gün içerisinde analize alınmıştır.

### **3.2.2. İzolatların Tanımlanması**

#### **3.2.2.1. İzolatların kısmi karakterizasyonu**

İzolatların kısmi karakterizasyonu; Gram boyanma ve metilen boyanma özellikleri ile katalaz testi sonuçlarına göre yapılmıştır. Metilen mavisi ile boyanma özelliğine basit boyama da denmektedir. Geliştirilen kültürlerden 5-10 µl alınarak lama yayılmıştır. Havada kurutma işleminden sonra alevken 3-5 kez geçirilmesiyle fiksasyon işlemi tamamlanmıştır. Üzerine Metilen mavisi (Merck, Darmstadt, Germany) damlatılarak 5 dakika beklenmiş ve distile su ile yıkanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kurumaya bırakılan

lamın üzerine immersiyon yağı damlatılarak izolatların morfolojisi 1600X büyütme ışık mikroskopunda (ZEISS AxiCam MRc5 Imager system) gözlenmiştir.

Gram boyama işlemi için de yine aynı miktarda lamın üzerine yayılan kültür havada kurutulmuş ve aynı şekilde fiske edilmiştir. Fiksasyondan sonra gram boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Boyamada kullanılan çözeltiler ve içerikleri EK 2’de verilmiştir. İlk olarak kristal viyole boyasında 1 dakika bekletilmiş, distile su ile yıkandıktan sonra lugol çözeltisinde 1-2 dakika bekletilmiştir. Yine distile su ile yıkanarak 15 saniye etanole tabi tutulmuş ve daha sonra 15 saniye bazik fuksin ile muamele edilmiştir. Su ile yıkanmasından sonra kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan lam üzerine immersiyon yağı damlatılarak 1600X büyütme ışık mikroskopunda (ZEISS AxiCam MRc5 Imager system) incelenmiştir. Mor renkli olanlar Gram-pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Katalaz testi için, MRS Agar ortamında geliştirilen kolonilerin üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılmış ve mikroskop altında gaz kabarcıklarının çıkışı gözlenmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak *Bacillus subtilis* ATCC 21332 suşu kullanılmıştır.



Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri, gelişme ortamları ve uygun gelişim sıcaklıkları

Bakteri adı	Gelişme ortamı	Gelişim sıcaklıkları	Kaynak
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	LB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Candida albicans</i> ATCC 25555	TSB	30°C	Prof. Dr. Haluk Ataoğlu
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25295	LB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	LB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	MRS	30°C	A.Ü.F.F. Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCDO 955	MRS	37°C	A.Ü.F.F. Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı
<i>Lactococcus lactis</i> 3113	TGE	30°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 7962	TGE	30°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Lactococcus lactis</i> SIK 83	TGE	30°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> OZ1	TGE	30°C	A.Ü.F.F. Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı
<i>Listeria innocua</i> M40	TSB	30°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	TSB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Micrococcus luteus</i> M41	TSB	30°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PedL	TGE	35°C	A.Ü.F.F. Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı
<i>Salmonella</i> Typhimurium SL 1344	LB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	LB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı

### 3.2.2.2 Biyokimyasal testler

İzolatların biyokimyasal olarak tanımlanabilmesi için API (Analytical Profile Index) 50 CHL test kiti (BioMerieux, Inc., France) kullanılmıştır. API 50 CHL tanımlama kiti; farklı biyokimyasal test substratlarını dehidre olarak içeren 1 tanesi kontrol tüpü olmak üzere 50 adet mikrotüp içermektedir. Bu kitin içerdiği kullanıma hazır 10 ml hacimdeki steril besi ortamına (API 50CHL Medium) bakteri kültüründen aktarılarak bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyonun turbiditesi 2 McFarland Standartı göz önüne alınarak ayarlanmış ve 50 mikrotüpe, steril damlalık kullanılarak tek tek inokülasyon işlemleri yapılmıştır. Daha sonra bu kuyucukların üst kısmı mineral yağ (BioMerieux) ile kapatılmış ve uygun koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bromkresol moru indikatörü içeren mikrotüplerdeki besi ortamı renginin söz konusu karbonhidrat fermantasyonuna (asit üretimine) bağlı olarak mordan sarıya dönüşmesi durumunda sonuç pozitif, rengin değişmemesi durumunda ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Eskülin testi gerçekleştirilen 25 nolu mikrotüpte ise besi ortamı renginin siyaha dönüşmesi durumunda sonuç pozitif, aynı kalması durumunda ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Renk değişimi konusunda şüpheye düşülmesi durumunda sonuç pozitif/negatif olarak renk tonlamasına göre kaydedilmiştir. Sonuçlar “**API Identification Software (API Lab Plus Program, bioMerieux)**” programına aktarılmış ve izolatlar içinde seçilen örnekler bu bilgisayar programına göre tanımlanmıştır.

### 3.2.2.3. İzolatların 16S rDNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyonu

İzolatların, 16S rDNA dizi analizine göre tanımlanması için ilk olarak genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA'nın saflık ve miktar tayini yapıldıktan sonra agaroz jel elektroforezinde gözlenmiştir. İzolatların 16S rDNA dizi analizine göre tanımlanabilmesi için 16S ileri (5'-3') ve geri (3'-5') primerleri kullanılarak 16S rDNA bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması ve baz dizilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Baz dizileri belirlenerek ve elde edilen bulgular veri tabanındaki mikroorganizmalara ait baz sıraları ile karşılaştırılıp tanımlamaları yapılmıştır.

### 3.2.2.3.1. Genomik DNA izolasyonu

Çalışmada kullanılan 2 suştan PROMEGA Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanımı ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. 37°C'de 18 saat süre ile geliştirilen aktif kültürlerden 2 ml alınarak 14500 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj edildikten sonra üst sıvı ortamdaki uzaklaştırılmış ve test kiti aşamalarına geçilmiştir. Kit içeriğinde yer alan uygulama basamakları takip edilmiştir. İzolasyon aşamalarında kit tarafından sağlanan prospektüs (EK 5) üzerinden birkaç değişikliğe gidilmiştir. Bu değişiklikler sırasıyla (i) elde edilen hücre miktarını arttırmak için toplam hücre hacminin 2 katına çıkarılması (ii) izopropanol ile DNA muamele edildikten sonra DNA'nın iplikli yapıdaki zincirleri gözlemlenebilir bir kütle oluşturabilsin diye solüsyon buz üzerinde 30 dk süreyle inkübasyona bırakılması ve bu zaman diliminde ependorf tüpün arada bir yavaş hareketlerle sallanması ve (iii) çalışma sonucunda elde edilen ve içerisinde DNA molekülünün bulunduğu pellet üzerine 40 µl kit tarafından temin edilen DNA Rehidrasyon solüsyonunun (Tris-EDTA) eklenmesi ve önce 65°C'de 15 dk ardından 1 gece +4°C'de inkübasyona bırakılması şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen DNA daha sonraki çalışmalarda kullanılacak şekilde 1:10 oranında dehidrasyon tamponu içerisinde seyreltilerek (5 µl DNA + 45 µl *dehidrasyon tamponu* veya) bir sonraki aşamada kullanılmaya kadar -20°C'de saklanmıştır. Bu arada ana stok DNA sı -86°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2.3.2. Saflık ve miktar tayini

Promega Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kit kullanımı ile izole edilen DNA numunelerinin saflık ve miktar tayinleri NANODROP spektrofotometrede seyreltilmemiş ana stok DNA'ların kullanımı (2 µl) ile 3 paralel okuma yapıp bu değerlerin ortalaması alınarak gerçekleştirilmiştir. DNA numunelerinin okunması için kontrol olarak dehidrasyon tamponu kullanılarak 260nm, 280nm, 260nm/280nm, 260/230nm değerleri ölçülmüş ve DNA numunelerinin konsantrasyonları ng/µl olarak belirlenmiştir (Sambrook ve Russell 2001). Ölçümler 3 tekrarlı yapılmıştır. DNA örneklerinin saflıklarının kontrolü için OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> için kullanılmıştır. Değerlendirme saf örnekler için 1.8 ideal, daha yüksek değerler için RNA, daha düşük değerlerde ise protein kontaminasyonu olarak kabul

edilmiştir.

### **3.2.2.3.3. Agaroz jel elektroforezi**

Promega Wizard® Genomik DNA İzalasyon Kiti kullanımıyla izole edilen DNA numunelerinin saflık ve miktar tayini yapıldıktan sonra elektroforezleri % 1 agaroz içeren jellerde yapılmıştır (Sambrook ve Russell 2001). Agaroz jel elektroforezi için öncelikle 1 gr agaroz 100 ml 1X Tris-Borik asit-EDTA (TBE, Merck) elektroforez tampon içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak çözülmüştür. Sıcaklığı yaklaşık 40°C'ye kadar indirilen jelle % 2 Etidyum bromit (10 mg/ml) çözeltisi eklenmiş ve homojen bir karışım sağlandıktan sonra elektroforez plakalarına aktarılıp, taraklar yerleştirilmiş ve bir saat jelin polimerizasyonu için beklenmiştir. Bu süre sonunda elektroforez tanklarına, jelin yüzeyini kapatacak şekilde “tampon çözelti” (1xTBE) ilave edilmiştir. Ardından jelin hasar görmemesine dikkat edilerek taraklar ortamdaki uzaklaştırılmıştır. -20°C'de saklanan 1:10 seyreltilmiş DNA numuneleri bir süre oda sıcaklığında buz üzerinde bekletildikten sonra 3µl DNA numunesi üzerine 2 µl “yükleme boya çözeltisi” ilave edilerek mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir.

Elektroforez 100 V'da 2.5-3 saat süreyle yapılmıştır. Markör olarak “supercoiled DNA ladder” kullanılmıştır (3 µl markör + 2 µl yükleme boyası). Yüklem boyası jeli terk ettikten sonra akım kesilmiş ve agaroz jel Kodak Jel Görüntüleme (Gel Logic 200 Imaging System) cihazına yerleştirilerek 365 nm dalga boyunda UV ışık altında incelenmiş, fotoğraf çekimleri de yine aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.2.3.4. 16S rDNA bölgesinin baz dizisinin belirlenmesi ve izolatin tanımlanması**

*Pediococcus acidilactici* suşunun dizi analizi Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji merkez laboratuvarında, *Lactobacillus brevis* suşunun dizi analizi ise Refgen Biyoteknoloji (ODTÜ Teknokent/ Ankara) tarafından yapılmıştır. Dizi analizi sonuçları, BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) programı kullanılarak veritabanları ile karşılaştırılmış ve tarama sonucunda dizinin hangi mikroorganizmaya ait olduğu benzerlik yüzdesiyle

belirlenmiştir. İzolatların 16S rDNA bölgesinin dizisi ve BLAST tarama sonucu EK 6' de verilmiştir.

### **3.2.3. *Pediococcus acidilactici* ve *Lactobacillus brevis* suşlarının Endüstriyel Açıdan Özellikleri**

#### **3.2.3.1. Bakteriyosinin antimikrobiyal aktivite spektrumunun belirlenmesi**

*Pediococcus acidilactici* ve *Lactobacillus brevis* suşlarının bakteriyosin üretiminden sorumlu olup olmadığını belirlemek amacıyla 37°C'de 18 saat geliştirilen kültürlerden 1-2 ml alınarak 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst kısım 0.22 µm çaplı (Millex, Milipore) membrandan geçirilmiştir. 100°C'de 5 dakika kaynatılarak antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılmıştır. Uygun besiyerlerinde 18 saat geliştirilen indikatör bakteriler ve patojen suşlar %1 oranında olacak şekilde 5 ml yarı-katı besiyerine eklenmiştir. Katı besiyerine indikatörlerin bulunduğu yarı-katı besiyeri yayılmıştır. İndikatör olarak Çizelge 4.2' de belirtilen suşlar kullanılmıştır. Bakteriyosin olduğu düşündüğümüz örneklerden 5 µl olacak şekilde nokta ekim ile ekim yapılmıştır. Petriler 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. 18 saat sonucunda inhibisyon zonu olup olmadığı kontrol edilmiştir (Bhunia vd 1988).

#### **3.2.3.2. Tanımlaması yapılan suşların probiyotik özelliklerinin belirlenmesi**

Tanımlanan suşlarının düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzlarına karşı dirençliliği ve antibiyotik duyarlılık seviyeleri gibi probiyotik özellikleri saptanmıştır. Her iki suş için de Caco-2 hücrelerine tutunma testi yapılmıştır.

**Düşük pH değerine karşı gelişimlerinin belirlenmesi:** Probiyotiklerin bağırsaklara ulaşabilme yeteneğini belirlemek için midenin yüksek asitli ortamından geçerek mide sıvısına benzer bir ortam oluşturulmaya çalışılmıştır. Böylece suşların mideden geçerek bağırsaklara ulaşabilme yeteneği gözlemlenmiştir. Aktif kültürlerden MRS besiyerine %1 oranında aktifleştirilmiş ve 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda 1 ml alınmış ve 10.000 g' de 5 dakika 4°C' de santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırılmıştır. PBS (pH 7.2) ile çökelti 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra PBS tamponu pH' ı 1.0, 2.0 ve

3.0 olacak şekilde çözülerek, 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Kontrol için pH değeri 7.2 olan PBS kullanılmıştır. İnkübasyonun 0., 1. ve 3. saatinde örneklerden numune alarak seri dilüsyonlardan geçirilerek MRS katı besiyerlerine ekimler 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. Örneklerin 37°C'de 24-48 saat inkübasyonun sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, log/kob olarak değerler hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd 2006).

**Safra tuzuna karşı gelişimlerinin belirlenmesi:** Her iki suşunda safra tuzuna karşı direnç özelliğinin belirlenmesi amacıyla %0.3, %0.5 ve %1 oranında safra tuzu (Merck) içeren MRS besiyerleri kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak MRS besiyeri kullanılmıştır. Aktif bakteri kültürlerinden 1 ml alınarak 10.000 g'de 5 dakika 4°C'de santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırılmıştır. Ardından iki kez PBS (pH 7.2) ile yıkanmıştır. Safra tuzu oranı %0.3, %0.5 ve %1 içeren MRS besiyerinde çözülerek 37°C'de 4 saat inkübasyonun ardından 0. ve 4. saatinde örnekler alınmış ve seri dilüsyonlar yapılarak MRS katı ortamına yayma ekim yapılmıştır. Örneklerin 37°C'de 24 saat inkübasyonun sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, log/kob olarak değerler hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006).

**Pepsine karşı gelişimlerinin belirlenmesi:** Suşların pepsine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi ve gastrik koşulların *in-vitro* ortamda oluşturabilmek amacıyla 3 mg/ml pepsin (Merck) içeren ve pH 2.0 ve pH 3.0 olan PBS tamponu ile çalışılmıştır. Aktif bakteri kültüründen 1 ml alınarak 10.000 g'de 5 dakika 4°C'de santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırılmıştır. Ardından iki kez PBS (pH 7.2) ile yıkanmıştır. Pepsin içeren PBS (pH 2.0 ve pH 3.0) tamponu ile çözülerek 37°C'de 3 saat inkübasyonun ardından 0., 1. ve 3. saatin sonunda örneklerden numune alınarak seri dilüsyonların sonunda MRS katı ortama yayma ekim 3 paralel olarak yapılmıştır. Kontrol olarak pH 7.2 olan PBS kullanılmıştır. Örneklerin 37°C'de 24 saat inkübasyonun sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, log/kob olarak değerler hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd 2006).

**Pankreatine karşı gelişimlerinin belirlenmesi:** Suşların pankreatine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi amacıyla 1 mg/ml pankreatin (Merck) içeren PBS pH' ı 8.0

olan tamponlar ile çalışılmıştır. Aktif bakteri kültüründen 1 ml alınarak 10.000 g'de 5 dakika 4°C' de santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırılmıştır. Ardından iki kez PBS (pH 7.2) ile yıkanmıştır. Daha sonra pankreatin içeren pH 8.0 değerine ayarlanmış PBS tamponunda çözülmüştür. 37°C' de 4 saat inkübasyonun ardından 0.ve 4. saatin sonunda örneklerden numune alınarak seri dilüsyonların sonunda MRS katı ortama yayma ekim 3 paralel olarak yapılmıştır. Kontrol olarak pH 7.2 olan PBS kullanılmıştır. Örneklerin 37°C' de 24 saat inkübasyonun sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, log/kob olarak değerler hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd 2006).

**Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi:** Suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenebilmesinde antibiyotik disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Kültürler 37°C' de 18 saat inkübasyonun ardından hücre yoğunluğu 10 ml MRS besiyerinde  $1 \times 10^6$  kob/ml ( $A_{600}=0.008-0.1$ ) olacak şekilde ayarlanarak, 90 ml MRS agar uygun sıcaklığa geldikten sonra karıştırılarak petrilere dökülmüştür. Agarın katılaşması sonunda her petriye uygun aralıklarla farklı antibiyogram diskleri yerleştirilmiş ve 37°C' de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak LB besiyerinde *S. aureus* ATCC6538 suşu kullanılmıştır. İnkübasyonun ardından antibiyotik diskleri etrafında oluşan zonların çapı mm olarak ölçüm yapılmıştır (Wilkins vd 1972).

**Hemolitik aktivelerinin belirlenmesi:** Her 2 suşda 37°C' de 24 saat geliştirildikten sonra %5 koyun kanı içeren Colombia agarda (bioMerieux, Inc.) çizgi ekim yapılmıştır. *S. aureus* ATCC 6538 ve *E.coli* ATCC 25295 kontrol olarak kullanılmıştır. 37°C' de 24 saat inkübasyondan sonra koloniler etrafında berrak zon oluşturan  $\beta$ - hemolitik, parlak yeşil zon oluşturan koloniler  $\alpha$ -hemolitik ve zon oluşturmeyenler ise  $\gamma$ -hemolitik olarak değerlendirilmiştir (Maragkoudakis vd 2006).

**Otoagregasyon özelliğinin belirlenmesi:** Otoagregasyon özelliğinin belirlenmesinde Kos vd (2003) tarafından uygulanan yöntem kullanılmıştır. %1 oranında MRS besiyerine inoküle edilen kültür 37°C' de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 5000g' de 15 dakika santrifüj edilerek iki kez PBS ile yıkanarak  $10^8$  kob/ml olacak şekilde MRS besiyerinde çözülmüştür. Bu şekilde 4 ml hazırlanan kültür 10 saniye vorteksenerek, otoagregasyon özelliği 5 saat süresince oda sıcaklığında hareket ettirmeden

bekletilmiştir. Saat başlarında üst kısımdan 0.1 ml alınarak 3.9 ml MRS sıvı besiyeri ile seyreltilerek kültürün bekletme öncesi ve bekletme sonrası optik yoğunlukları 600nm' ye ayarlanmış spektrofotometrede okunmuştur. Otoagregasyon için kullanılan hesplama  $[1 - (A_t / A_0) \times 100]$  formül kullanılarak yapılmıştır (A: Absorbans, t: saat, 0: 0. saat).

**Koagregasyon özelliğinin belirlenmesi:** Koagregasyon özelliğinin belirlenmesinde de aynı yöntem kullanılmıştır. %1 oranında MRS besiyerine inoküle edilen kültür 37°C' de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 5000g' de 15 dakika santrifüj edilerek iki kez PBS ile yıkanarak  $10^8$  kob/ml olacak şekilde MRS besiyerinde çözülmüştür. Koagregasyon için *Salmonella enteric* serotype Typhimurium SL1344 ve *Escherichia coli* LMG3083 (ETEC) kullanılmıştır. Her iki suşdan da 2 ml alınarak diğer hücre süspansiyon ile eşit miktarda karıştırılarak, 10 saniye vortekslenerek koagregasyon özelliği 5 saat süresince oda sıcaklığında hareket ettirmeden bekletilmiştir. Her saat başında üst fazdan 0.1 ml alınarak 3.9 ml MRS sıvı besiyeri ile seyreltilerek kültürün bekletme öncesi (OD1) ve bekletme sonrası (OD2) optik yoğunlukları 600nm' ye ayarlanmış spektrofotometrede okunmuştur. Koagregasyon yüzdesinin belirlenebilmesi için şu formül kullanılmıştır;

$$\% = \frac{(A_x + A_y/2) - A_{(x+y)}}{A_x + A_y/2} \times 100$$

x ve y: kontrol tüplerindeki 2 tür  
x+y: karışım

**İnsan kolon adenokansiroma (Caco-2) hücrelerine tutunma özelliğinin belirlenmesi:** Her iki suşunda probiyotik özellikleri belirlendikten sonra, suşların Caco-2 hücrelerine tutunma özellikleri ve *S. Typhimurium* SL 1344 ve *E.coli* LMG3083 (ETEC) patojenler ile tutunmalarının engellenmesi denemeleri Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Caco-2 hücreleri %10 inaktive edilmiş fetal bovin serum, 2mM L-glutamin, 20U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde (Gibro BRL) ve 37°C'de anaerobik şartlarda inkübe edilmiş ve pasajlama sırasında sürekli yenilerek



geliştirilmiştir. Tutunma özelliklerinin belirlenebilmesi için Caco-2 hücreleri 24 kuyulu doku kültür plaklarında geliştirilmiştir.

*P. acidilactici* ve *L. brevis* suşları MRS besiyerinde 18 saat geliştirildikten sonra 6000 devirde 15 dakika santrifüj edildikten sonra hücreler çöktürülmüştür. Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra PBS (pH 7.4) ile 2 kez yıkanmıştır. Hücre konsantrasyonu RPMI besiyeri ile  $10^8$  kob/ml'ye ayarlanarak steril tüplere alınmıştır. Kuyulardaki RPMI besiyeri ortamdaki hücreler PBS tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Bakteri RPMI besiyeri karışımından kuyulara 1ml konulmuştur. Plaklar 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>, %95 atmosfer basıncında 90 dakika inkübe edilmiştir. Ardından kuyulardaki bakteri süspansiyonu alınarak, tutunmamış bakteriler ortamdaki hücreler PBS tamponu ile yıkanmıştır. Caco-2 hücrelerine tutunan bakterileri kuyulardan alabilmek için ortama 1 ml Tween 80 (%0,1) aktararak 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda bakteri süspansiyonu steril mikrosantrifüj tüplerine alınarak  $10^{-7}$  ye kadar seyreltilmiştir. Dilüsyonlar MRS ve LB katı besiyerlerine ekilerek 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Kontrol suşları olan *E. coli* LMG3083 (ETEC) ve *S. Typhimurium* SL1344 uygun besiyerlerinde yine 18 saat geliştirilerek aynı basamaklar tekrarlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petrilere koloniler sayılarak canlı hücre sayısı belirlenmiştir (Maragkoudakis vd. 2006).

Tutunma yeteneklerini belirlemek istediğimiz suşların Caco-2 hücrelerine tutunma yetenekleri hesaplama için; tutunmuş bakteri sayısının (TBS) başlangıç bakteri sayısına (BBS) oranlanmasıyla hesaplanmıştır. Çalışma 6 paralel üzerinden yapılmıştır.

$$\text{Bakteri Tutunma Oranı (BTO)} = \frac{\text{TBS}}{\text{BBS}} \times 100$$

**Patojen bakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunmalarının engellenmesi:** Patojen mikroorganizmaların Caco-2 hücrelerine tutunmalarının engellenmesi için *S. Typhimurium* SL1344 ve *E. coli* LMG3083 (ETEC) suşları ile *Pediococcus acidilactici* ve *Lactobacillus brevis* suşları kullanılmıştır.

MRS besiyerinde *Pediococcus acidilactici* ve *Lactobacillus brevis* suşları 18 saatlik geliştirildikten sonra, 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek üst faz atılmış ve pellet iki kez PBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Hücre konsantrasyonu  $10^{-8}$  kob/ml'ye ayarlanarak steril tüplere aktarılmıştır. Caco-2 hücrelerinin bulunduğu kuyular PBS tamponu ile 3 kez yıkandıktan sonra 24 kuyuluk kültür plağına ilk 6 kuyusuna *P. acidilactici* diğer 6 kuyusuna *L. brevis* suşu konulmuştur. Daha önce belirtilen yöntemle tutunma denemesi gerçekleştirilmiştir. 90 dakika inkübasyon sonucunda kuyular 4 kez PBS ile yıkanmıştır. Kültür plağının diğer 6 kuyusuna *S. Typhimurium* SL1344, diğer 6 kuyusuna *E. coli* LMG3083 (ETEC) RPMI süspansiyonundan 1 ml aktarılmıştır. Tekrar 37°C'de anaerobik koşullarda 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Kuyular tekrar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra bakterilerin kuyulardan alınabilmesi için Tween 80 (%0,1) ilave edilerek 30 dakikalık inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kuyulardan alınan bakteriler  $10^{-7}$  düzeyine kadar seyreltilmiş ve hazırlanan dilüsyonlar McConkey Agar (Merck) ortamlarına ekilmiştir. 37°C'de 24-48 saat inkübasyon sonrası petrillerdeki koloniler sayıları belirlenmiş ve tutunmuş patojen bakteri sayısı (TPBS) hesaplanmıştır. Tutunmuş patojen bakteri sayısı (TPBS), başlangıç patojen bakteri sayısına (BPBS) oranlanarak hesaplanmıştır. Tutunma denemeleri, her suş için 6 paralel yapılmıştır (Maragkoudakis vd 2006).

#### **Caco-2 hücrelerine tutunma özelliğinin floresan mikroskobunda görüntülenmesi:**

Caco-2 hücrelerine *Pediococcus acidilactici* ve *Lactobacillus brevis* suşlarının tutunmasının floresan mikroskobunda görüntülenebilmesi için 24 kuyulu kültür plağının kuyularına 12 mm çapında daha önceden steril edilmiş olan coverslipler yerleştirilmiştir. Caco-2 hücreleri her bir kuyucukta bulunan coverslipler üzerinde geliştirilmiştir. Hücrelerin tutunması yukarıda belirtildiği gibi uygulanmıştır. Bakteri süspansiyonu kuyulara aktararak 90 dakika inkübe edilmiştir. Ardından PBS ile tutunmamış bakteri hücrelerini ortamdan uzaklaştırmak amacıyla yıkanmıştır. Tutunan bakterilerin geri alınması gerçekleştirilmemiş, Caco-2 hücrelerine tutunan bakterilerin coverslipleri yavaşça kuyulardan çıkarılarak PBS (pH 7.4) tamponunda %70 oranında hazırlanan metanolde 15 dakika bekletilmiştir. Bu şekilde fiske edilen coverslipler iki kez PBS ile yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Boyama Akridin oranj (% 0.1 oranında PBS 'de (pH 7.4) seyreltilmiş) ile yapılmıştır. Coversliplerin üzeri boya ile kaplanarak 2 dakika beklenmiştir. Ardından PBS ile yıkanarak üzerine immersiyon yağı damlatılarak 1600X büyütmede floresan mikroskobunda görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

**Caco-2 hücrelerine tutunma özelliğinin SEM’ de görüntülenmesi:** *Pediococcus acidilactici* ve *Lactobacillus brevis* suşlarının Caco-2 hücrelerine tutunmasının SEM’ de görüntülenmesi için 24 kuyulu kültür plağının kuyularına 12 mm çapında önceden steril edilmiş coverslipler yerleştirilmiştir. Coverslipler üzerine Caco-2 hücreleri geliştirilmiştir. Diğer tutunma denemelerinde belirtildiği gibi bakteri süspansiyonu kuyulara aktararak 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Aynı basamaklar tekrarlanmıştır ancak tutunan bakterilerin Tween-80 ile geri alınımı gerçekleştirilmemiştir. Coversliplerin üzerinde tutunan Caco-2 hücreleri ve bakteriler bulunduğu kuyulardan yavaşta çıkarılarak PBS (pH 7.4) % 2,5 oranında hazırlanan glutaraldehitte 1 saat bekletilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra, coverslipler üç kez PBS ile yıkandıktan sonra %2 OsO<sub>4</sub> ile 30 dakika bekletilmiştir. Tekrar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra seri etanol konsantrasyonlarıyla dehidrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Chauviere vd 1992). Coverslipler havada kurutulduktan sonraaltınla (Gatan 682PECS, Gatan Inc.) kaplanarak SEM’de gözlemlenmiştir. SEM’de inceleme için Bilkent Üniversitesi UNAM’da (Malzeme Bilimi ve Nanateknoloji Enstitüsü) bulunan FEI QUANTA 200F Taramalı Elektron Mikroskobu kullanılmıştır.

**Hesaplamalar ve istatistiksel analizler:** İstatistiksel analizler için SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) istatistiksel analiz programı kullanılmıştır. Varyansın tek yönlü analizi olan ANOVA, Tukey posthoc testi ve bağımsız *t*-testi kullanılarak veriler değerlendirilmiştir.

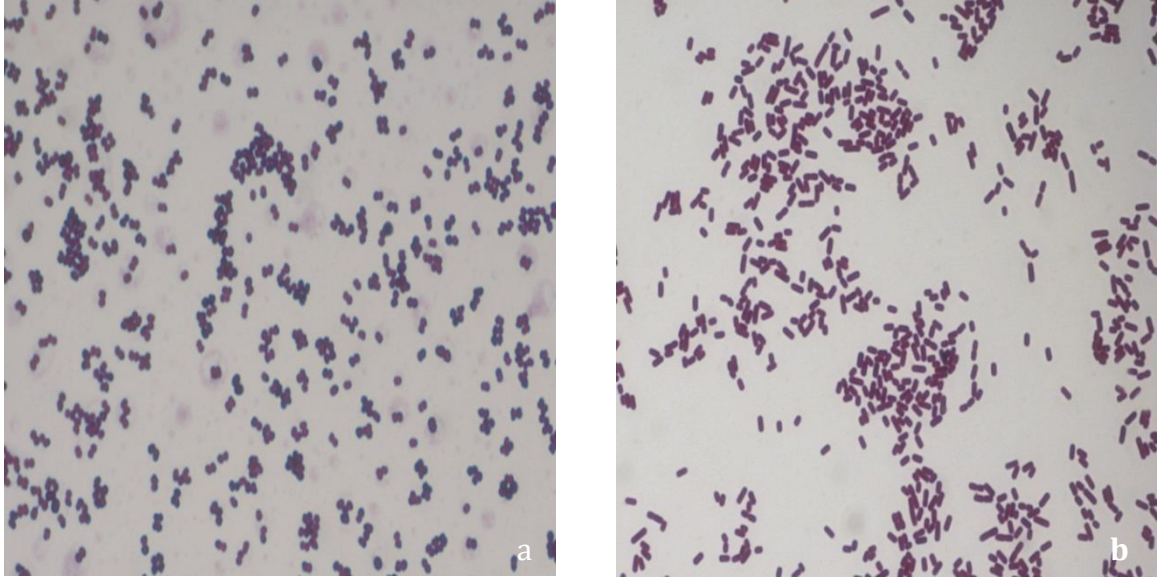
## 4. BULGULAR

### 4.1. Vajinal Smearden Elde Edilen Bakterilerin İzolasyonu

Çalışmamızda kullanılan laktik asit bakterileri menopoza girmemiş, herhangi bir doğum kontrol yöntemi ile korunmayan ve 3 ay süre içerisinde antibiyotik kullanmayan bayanların vajinasından smear örneği alınarak izole edilmiştir. Suşların gelişimi için çoğunlukla MRS besiyeri kullanılmıştır. Smear örneklerinin alındığı steril swaplardan steril enjektör ucu yardımıyla alınan örnekler  $10^{-7}$ 'ye kadar steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  ve  $10^{-7}$  dilüsyonlardan 0,1' er ml alınarak MRS besiyerine yayma ekimler yapılmış ve 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından izolatların koloni morfolojisi, Gram reaksiyonları ve katalaz aktiviteleri incelenmiştir (Erkkilä vd 2000). Stokları alınan saf kültürler sporsuz, Gram pozitif, kok ve çubuk şekilli, katalaz reaksiyonu negatif olarak değerlendirilmiştir (Thornton vd 1996, Hartemink vd 1997).

### 4.2. İzolatların Morfolojik Karakterizasyonu

İzolatlar boyama işlemi için metilen mavisi ve gram boyama yapılarak 1600X büyütme ışık mikroskopunda (ZEISS AxioCam MRc5 Imager System) ve gözlemlenmiştir. *P. acidilactici* tetradsı yapıda ve mor renkte gözlemlenirken (Şekil 4.1a), *L. brevis* uzun çubuk şekilli ve mor renkte gözlemlenmiştir (Şekil 4.1b). Her iki suş da gram pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil.4.1. *Pediococcus acidilactici* OZV(a) ve *Lactobacillus brevis* OZV (b) suşlarının ışık mikroskop görüntüsü.

#### İzolatların genotipik karakterizasyonu

Promega Wizard DNA izolasyon kit kullanımı neticesinde izolatın DNA'sı izole edilmiş, saflık ve miktar tayini nanodrop spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür.  $OD_{260}$  nm, DNA molekülünün absorbe edildiği dalga boyudur. Bu değer numunedeki DNA konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılmaktadır. 280 nm'de okunan absorpsiyon değeri  $OD_{260}/OD_{280}$  oranının belirlenmesinde kullanılmaktadır ve teorik olarak  $OD_{260}/OD_{280}$  değerinin 1.75-2.0 arasında olması gerekmektedir. 1.75-2.0 arasında tespit edilen  $OD_{260}/OD_{280}$  oranı UV skaladaki absorpsiyonun nükleik asitlerden kaynaklandığı anlamına gelmektedir. Bununla beraber, 1.75'den daha düşük  $OD_{260}/OD_{280}$  oranı protein ve diğer UV absorbe edicilerin varlığını, 2.0'dan daha büyük  $OD_{260}/OD_{280}$  oranı ise numunenin kloroform veya fenol ile kontamine olmuş olabileceğini göstermektedir.

İzole edilen DNA'nın konsantrasyonu; *P. acidilactici* için 1800,74 ng/ $\mu$ l (  $OD_{260}$  oranı 36.1,  $OD_{280}$  oranı 18.34,  $OD_{260}/280$  oranı 1,96), *L. brevis* için ise 1457,06 ng/ $\mu$ l (  $OD_{260}$  oranı 30.7,  $OD_{280}$  oranı 15.02,  $OD_{260}/280$  oranı 2,04) olarak ölçülmüştür. Bu bilgiler neticesinde elde edilen veriler ise izole edilen DNA'nın genomik çalışmalar için uygun olduğunu göstermektedir. Kromozomal DNA molekülüne ait elektroforez % 1 agaroz içeren 0.02  $\mu$ L/ml EtBr eklenmiş jelde yapılmıştır.

İzolatların PZR ile çoğaltılan 16S rDNA bölgesinin dizi analizinden elde edilen baz sırası, bu baz sırasının NCBI BLAST veri tabanında gerçekleştirilen karşılaştırmalı analizinden elde edilen kesin tanı sonuçları EK6'de verilmiştir. *API 50CHL kit sonucunda P. acidilactici ve L. brevis olarak belirlenen izolatlar aynı şekilde 16S rDNA dizi analizi neticesinde de %99 benzerlik oranıyla P. acidilactici ve L. brevis olarak tanımlanmıştır.* Gerek morfolojik, kültürel ve biyokimyasal gerekse API 50CHL kit sonucu 16S rDNA dizi analizinden elde edilen sonuçla kesinleştirilmiş olup izolat çalışmanın diğer aşamalarında *P. acidilactici OZV ve L. brevis OZV* olarak isimlendirilmiştir. İzolatların tanımlanması Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarında ve Refgen Biyoteknoloji (ODTÜ Teknokent) tarafından yapılmıştır. GenBank' dan accession numarası alınmıştır. *Pediococcus acidilactici OZV*; #1468234 Seq1 JN390973, *Lactobacillus brevis OZV*; #1466053 Seq1 JN256939.

### **4.3. *Pediococcus acidilactici OZV* ve *Lactobacillus brevis OZV* suşlarının Endüstriyel Açıdan Özellikleri**

#### **4.3.1. *Pediococcus acidilactici OZV* suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivite spektrumu**

*P. acidilactici OZV* suşu tarafından üretilen antimikrobiyel maddenin bazı patojenler ve indikatör bakteriler üzerindeki antimikrobiyel etkisi araştırılmıştır. Gıda kaynaklı intoksikasyon ve enfeksiyonlarda son yıllarda etkili olan ve gıda mikrobiyolojisinde sıkça kullanılan Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı test edilmiştir. Suşun birçok Gram-pozitif mikroorganizmaya karşı duyarlı olduğu bulunmuştur. Gram-negatif bakteriler üzerinde ise bir etki gözlenmemiştir (Çizelge 4.2). *L. brevis OZV* suşunda ise bakteriyosin üretimi gözlemlenmemiştir.

Çizelge 4.2. *Pediococcus acidilactici* OZV suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivite spektrumu

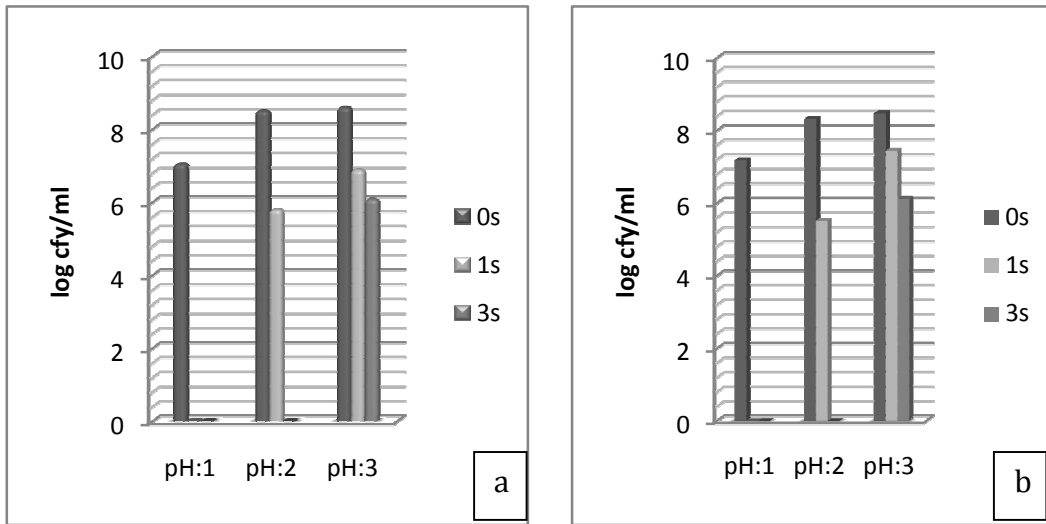
Mikroorganizma adı	Aktivite	Mikroorganizma adı	Aktivite
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC21332	+	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> OZ1	+
<i>Candida albicans</i> ATCC26555	-	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	+	<i>Listeria monocytogenes</i> MA	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC25295	-	<i>Listeria innocua</i> M40	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCDO955	+	<i>Pediococcus pentosaceus</i> Ped L	+
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC7962	+	<i>Salmonella enterica</i> serotype Typhimurium SL 1344	-
<i>Lactococcus lactis</i> 3113	+	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-
<i>Lactococcus lactis</i> SIK83	+	<i>Micrococcus luteus</i> M41	+

#### 4.4. *Pediococcus acidilactici* ve OZV *Lactobacillus brevis* OZV Suşlarının Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

##### 4.4.1. Suşların düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzuna karşı direnç özellikleri

Besinlerin sindirim sisteminden geçerken, midede kalma süresi 3 saattir. Bu sürede midenin pH'sı 1-4 arasında değişmektedir (Vinderola vd 2003).

*P. acidilactici* OZV suşunun pH' a karşı direnç özelliklerinin belirlenmesinde pH 1.0'de, 1 saat içerisinde canlılıklarını kaybettiği tespit edilmiştir. Buna karşın, pH 2.0'de 1. saatin sonunda % 66.74 canlılık oranı tespit edilmiş olup, 3. saatin sonunda canlılığını kaybettiği görülmüştür. pH 3,0'de 3. saatin sonunda % 70.62 oranında canlılık tespit edilmiştir (Şekil.4.2a). *L. brevis* OZV suşunun pH' a karşı direnç özelliklerinin belirlenmesinde pH 1.0'de, 0. saatte canlılık oranı % 85.87 iken 1. ve 3. saatte herhangi bir canlılık tespit edilmiştir. pH 2'de 1. saatin sonunda % 64.94 canlılık oranı gözlemlenirken 3. saatte hiçbir canlılık oranı gözlemlenmiştir. pH 3'de 3. saatin sonunda canlılık oranı % 71.80 olarak saptanmıştır (Şekil.4.2.b).

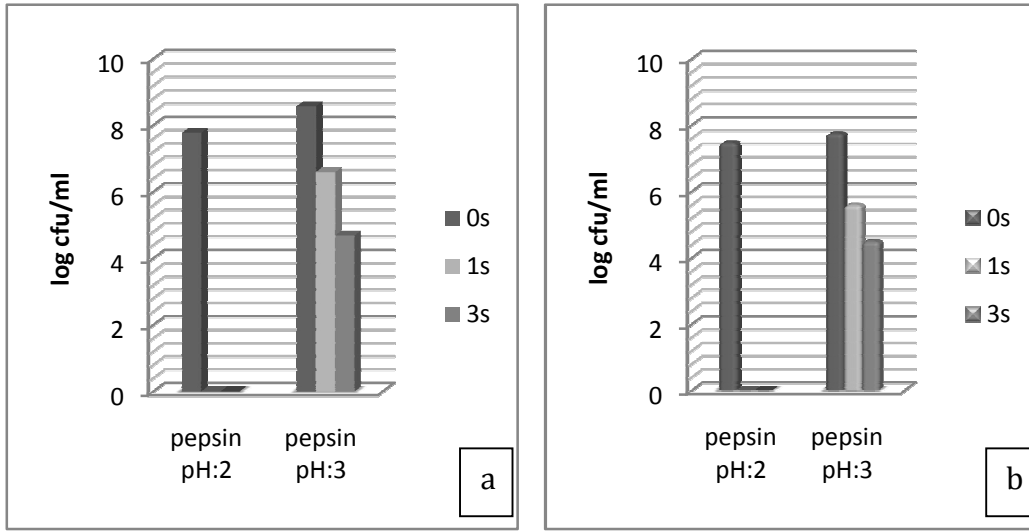


Şekil.4.2. *Pediococcus acidilactici* OZV (a) ve *Lactobacillus brevis* OZV (b) suşlarının pH' a karşı direnç özellikleri (kob/ml).



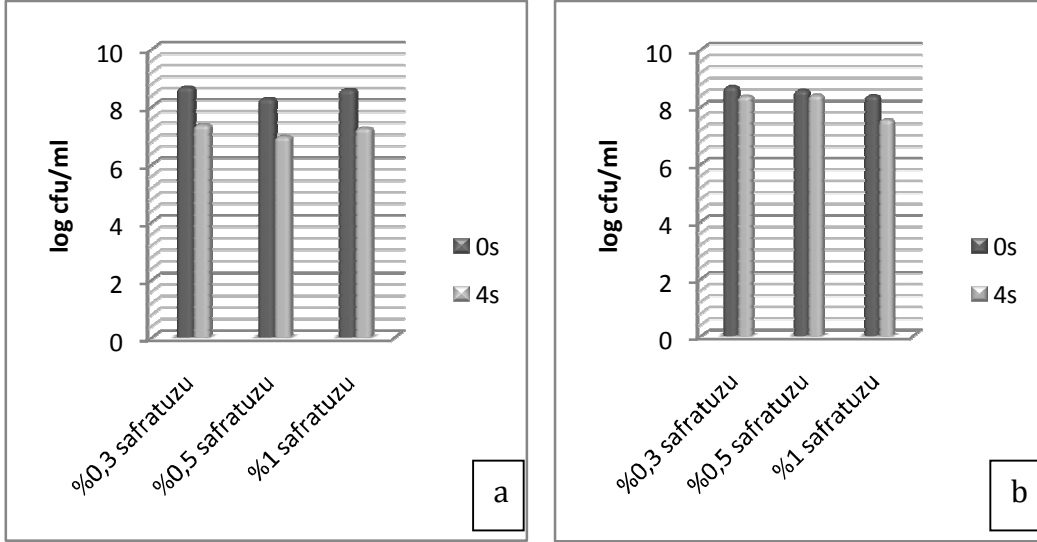
pH 2.0 ve 3.0' deki pepsin uygulaması ile sindirim sistemine ulaşan mikroorganizmaların gastrik koşullara direnç düzeylerinin *in-vitro* olarak belirlenmesidir (Maragkoudakis vd 2006). Pepsin' e karşı direnç özelliklerinin belirlenmesinde;

*P. acidilactici* OZV suşu pepsin pH 2,0'de 1.saatin sonunda herhangi bir canlılık tesbit edilmezken, pepsin pH 3.0'de 3. saatin sonunda % 56.05 oranında canlılık gözlemlenmiştir (Şekil.4.3.a). *L. brevis* OZV suşu pepsin pH 2.0' de 1.saatin sonunda herhangi bir canlılık tesbit edilmezken, pepsin pH 3,0'de 2. saatin sonunda % 70.19 iken, 3. saatin sonunda % 53.52 varan bir azalma gözlemlenmiştir (Şekil.4.3.b).



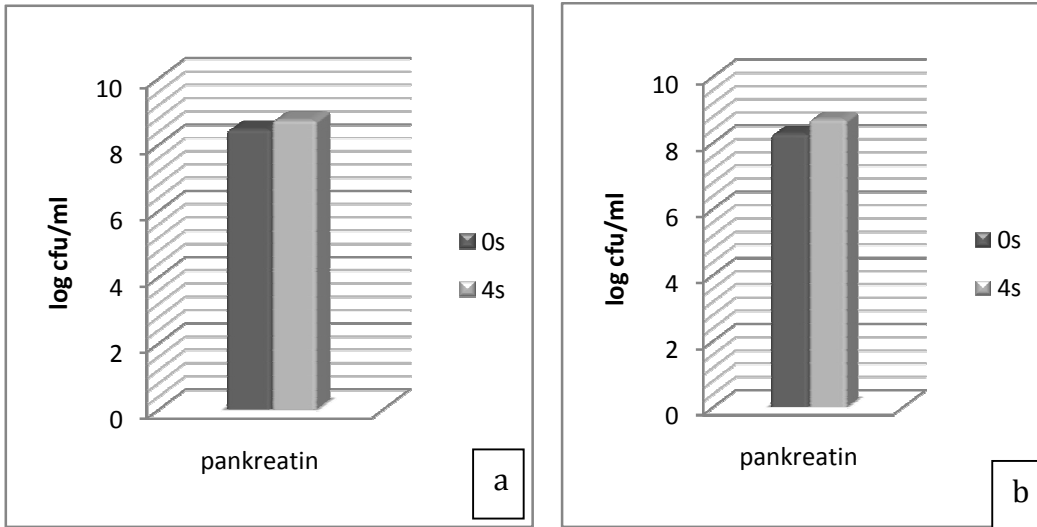
Şekil.4.3. *Pediococcus acidilactici* OZV (a) ve *Lactobacillus brevis* OZV (b) suşlarının pepsin direçliliği (kob/ml)

Safra tuzu uygulamasının *P. acidilactici* OZV suşu 4. saatinde % 0.3'lük konsantrasyonunda % 85.08 oranında canlılık tesbit edilirken, % 0.5 ve % 1'lik konsantrasyonlarda ise çok az bir oranda düşüş tesbit edilmektedir (Şekil. 4.4.a). *L. brevis* OZV suşunda ise; safra tuzu dirençliliğinin 4. saatinde % 0.3'lük konsantrasyonunda % 95.98 oranında canlılık tesbit edilirken, % 0.5 ve % 1'lik konsantrasyonlarda ise çok az bir oranda düşüş tesbit edilmektedir (Şekil. 4.4.b).



Şekil.4.4. *Pediococcus acidilactici* OZV (a) *Lactobacillus brevis* OZV (b) suşlarının safra tuzu dirençliliği (kob/ml)

Pankreatin uygulamasında her iki suşta da % 100' den daha fazla canlılık tesbit edilmiştir (Şekil.4.5.a/b).



Şekil.4.5. *Pediococcus acidilactici* OZV (a) ve *Lactobacillus brevis* OZV (b) suşlarının pankreatin dirençliliği (kob/ml)

Araştırma kapsamında incelenen suşların, düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzuna değerlerine direnç özellikleri, yapılan deneylerin sonucunda bulunan değerler Çizelge 4.3.a-b'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. a *Pediococcus acidilactici* OZV suşunun pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzunda yapılan deneyler sonucunda oluşan canlılıkları.

<i>Pediococcus acidilactici</i> OZV				
Canlılığın denendiği durumlar	İnkübasyon 0.saat	Zamanı		
		1.saat	3.saat	4.saat
pH 1.0	7.05	0	0	
pH 2.0	8.51	5.8	0	
pH 3.0	8.6	6.89	6.08	
Pepsin pH 2.0	7.77	0	0	
Pepsin pH 3.0	8.57	6.59	4,68	
%0,3 safratuzu	8.66	-	-	7.36
%0,5 safratuzu	8.26	-	-	6.95
%1 safra tuzu	8.58	-	-	7.24
Pankreatin	8.45	-	-	8.73

Çizelge 4.4.b *Lactobacillus brevis* OZV suşunun pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzunda yapılan deneyler sonucunda oluşan canlılıkları.

<i>Lactobacillus brevis</i> OZV				
Canlılığın denendiği durumlar	İnkübasyon 0.saat	Zamanı		
		1.saat	3.saat	4.saat
pH 1.0	7.17	0	0	
pH 2.0	8.31	5.5	0	
pH 3.0	8.47	7.43	6.11	
Pepsin pH 2.0	7.46	0	0	
Pepsin pH 3.0	7.73	5.58	4.48	
%0,3safra tuzu	8.69	-	-	8.36
%0,5safra tuzu	8.56	-	-	8.39
%1 safra tuzu	8.37	-	-	7.53
Pankreatin	8.26	-	-	8.7

#### 4.4.2. Hemolitik aktivitenin belirlenmesi

Hemolitik aktivitenin belirlenmesinde kontrol suşları olarak *E. coli* ATCC 25295'nin bulunduğu ortamlarda kolonilerin etrafında parlak-yeşil zon ( $\alpha$ -hemolitik) oluşurken, *Staphylococcus aureus* ATCC6538'un geliştiği ortamda, kolonilerin etrafında berrak zon

( $\beta$ -hemolitik) gözlemlenmektedir. Aynı ortamda geliştirilen çalışmamızda kullanılan her iki suşun kolonilerinin etrafında ise zon oluşumu gözlenmemiştir ( $\gamma$ -hemolitik).

Çalışmamızda, suşların hemolitik aktivitelerinin sonucunda elde edilen veriler bakımından probiyotik olarak kullanımı açısından bir sorun teşkil etmeyeceğini göstermektedir.

#### **4.4.3. Suşların antibiyotik duyarlılık düzeyleri**

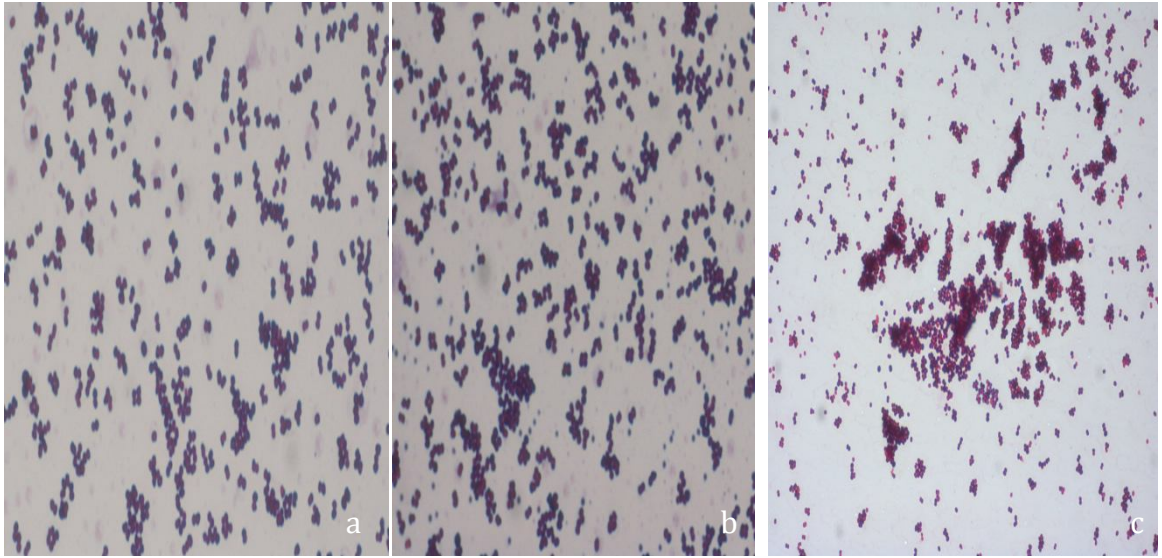
Suşların antibiyotik dirençliliği hücre duvar sentezini, protein ve nükleik asit sentezini inhibe eden antibiyotikler kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile tesbit edilmiştir. Her iki suşun 37°C’ de 18 saat inkübasyonun ardından farklı antibiyotik disklerinin etrafında oluşan zonların çapları mm olarak ölçülerek Çizelge 4.5’ de gösterilmiştir. Sonuçlar daha sonra ICMR Bulletin (Indian Council of Medical Research, ISSN 0377-4910-2009) esas alınarak, Dirençli (R), Yarı hassas (I), Hassas (S) olarak sınıflandırılmıştır. Çalışmamızda her iki suşunda peniciline duyarlı olduğu, clindamysin antibiyotiğe karşı *P. acidilactici* OZV suşunun dirençli iken *L. brevis* OZV suşunun ise duyarlı olduğu görülmüştür. Amoxicilline karşı ise *Pediococcus acidilactici* suşunun yarı hassas iken, *Lactobacillus brevis* OZV suşunun dirençli olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.5. *Pediococcus acidilactici* OZV ve *Lactobacillus brevis* OZV suşlarının antibiyotik duyarlılık profili

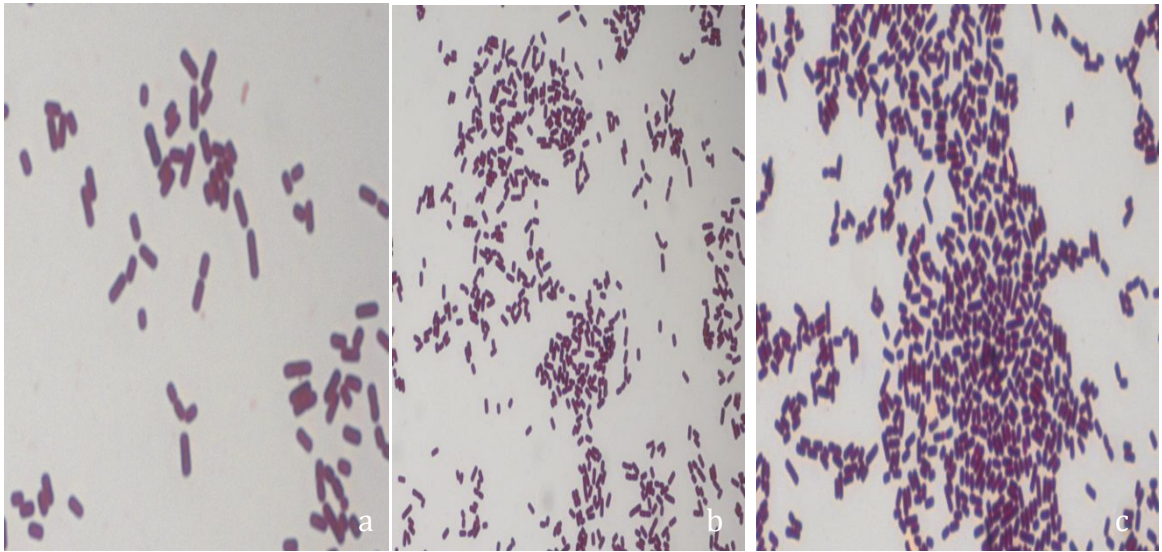
Antibiyotik	Konsantrasyon (mg)	<i>Pediococcus acidilactici</i>	ICMR STANDART 2009	<i>Lactobacillus brevis</i>	ICMR STANDART 2009
Piperallisin	100	12	R	16	R
Cefuroxime sodium	30	12	R	14	R
Ampicillin	10	12	R	12	R
Penicilin	10	18	S	24	S
Vancomycin	30	-	R	-	R
Cefoperazone	75	20	I	16	I
Bacitracin	10	-	R	-	R
Cefotaxime sodium	30	14	R	12	R
Cefepime	30	8	R	10	R
Cephazolin	30	14	R	10	R
Amoxicillin	30	14	I	12	R
Ceftazidime	30	-	R	-	R
Meropenem	10	14	I	14	I
Tetracyclin	30	10	R	12	R
Clindamycin	2	12	R	20	S
Erythromycin	15	12	R	12	R
Gentamycin	10	10	R	12	R
Chloromphenicol	30	16	I	20	S
Kanamycin	30	-	R	-	R
Amikacin	30	12	R	12	R
Streptomycin	10	-	R	-	R
Neomycin	5	-	R	-	R
Ofloxacin	5	-	R	-	R
Ciprofloxacin	5	-	R	-	R
Trimethoprim	25	-	R	-	R
Novobiocin	30	12	R	14	I
Aztreonam	30	-	R	-	R
Tobramycin	10	-	R	-	R

## Suşların otoagregasyon ve Koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

*P. acidilactici* OZV suşunun 5. saat sonundaki otoagregasyon yüzdesi %79.49 iken *L. brevis* OZV suşunun yüzdesi %78.13'tür. *P. acidilactici* OZV suşunun 1., 3. ve 5. saatlerdeki otoagregasyon ile ilgili ışık mikroskobu görüntüleri Şekil.4.6 da verilmiştir. *L. brevis* OZV suşunun 1., 3. ve 5. saatlerdeki otoagregasyon ile ilgili ışık mikroskobu görüntüleri ise Şekil.4.7 de verilmiştir.

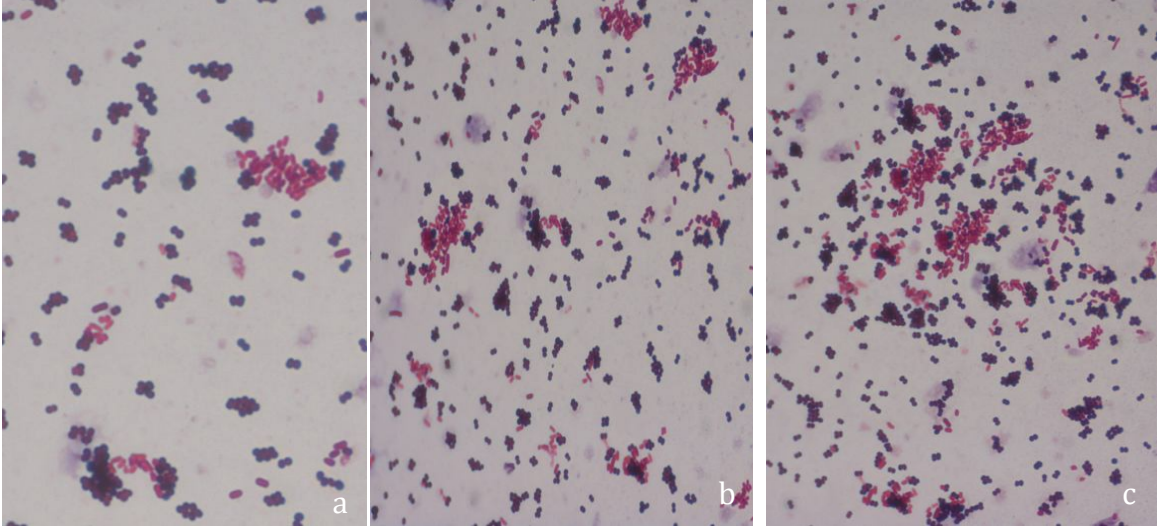


Şekil.4.6. *Pediococcus acidilactici* OZV suşunun 1.(a), 3.(b) ve 5.(c) saatlerindeki otoagregasyonun ışık mikroskobundaki görüntüleri

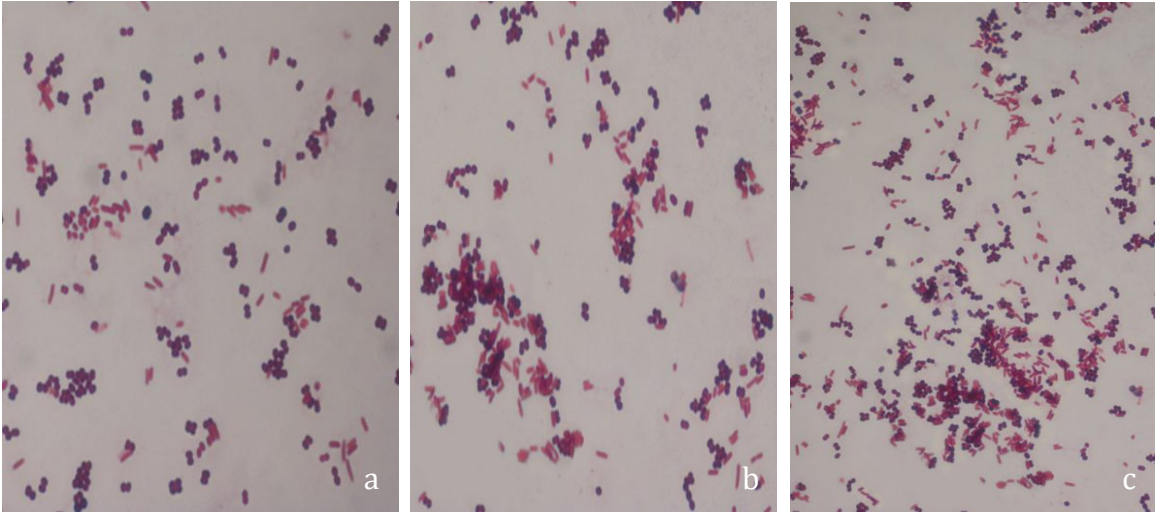


Şekil.4.7. *Lactobacillus brevis* OZV suşunun 1.(a), 3.(b) ve 5.(c) saatlerindeki otoagregasyonun ışık mikroskobundaki görüntüleri

*P. acidilactici* OZV suşunun *S. Typhimurium* SL1344 ile koagregasyonu; % 4.35, *E.coli* LMG3083 (ETEC) ile 5. saatin koagregasyon yüzdesi; % 11.82 iken *Lactobacillus brevis* OZV suşunun *Salm. Typhimurium* SL 1344 ile koagregasyonu; % 9.52, *E.coli* LMG3083 (ETEC) ile 5.saatin koagregasyonu; % 9.09'dur. Sırasıyla her iki suşun 1., 3.ve 5. saatlerindeki koagregasyon sonucu ışık mikroskobundaki görüntüleri Şekil.4.8, 4.9, 4.10 ve 4.11 'de verilmiştir.

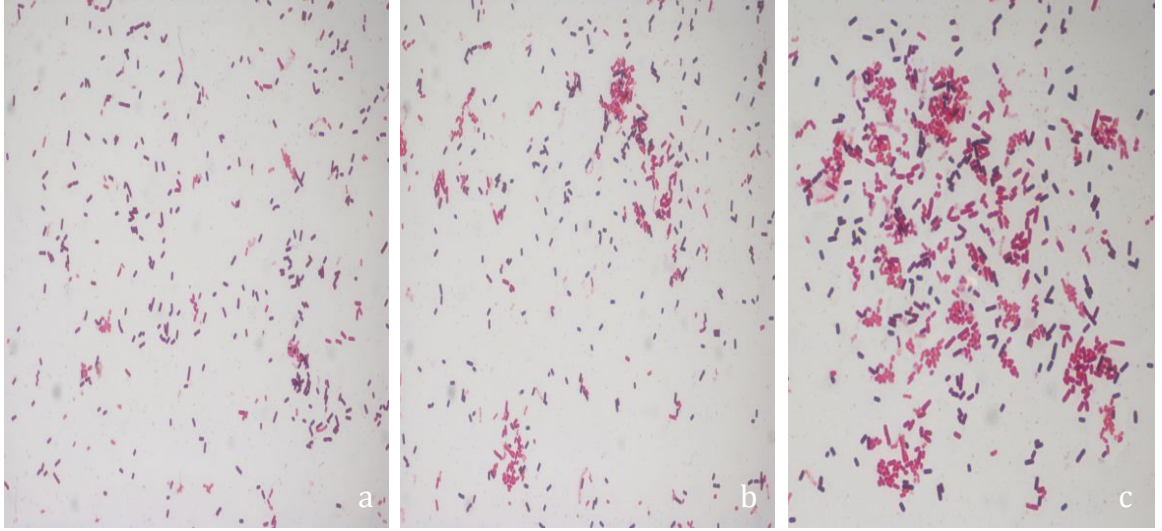


Şekil.4.8. *Pediococcus acidilactici* OZV suşunun *E. coli* LMG3083 (ETEC) ile 1. saat (a), 3. saat (b) ve 5. saat (c) koagregasyonun ışık mikroskobik görüntüsü (1000X)

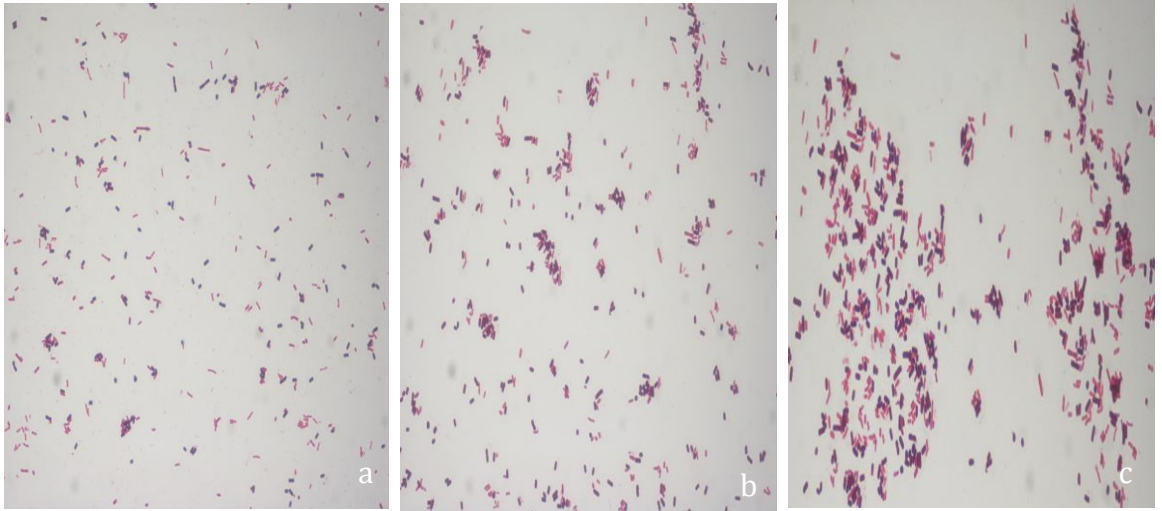


Şekil.4.9. *Pediococcus acidilactici* OZV suşunun *S. Typhimurium* SL 1344 ile 1. saat (a), 3. saat (b) ve 5. saat (c) koagregasyonun ışık mikroskobik görüntüsü (1000X)





Şekil.4.10. *Lactobacillus brevis* OZV suşunun *E. coli* LMG3083 (ETEC) ile 1. saat (a), 3. saat (b) ve 5. saat (c) koagregasyonun ışık mikroskopik görüntüsü (1000X).



Şekil.4.11. *Lactobacillus brevis* OZV suşunun *S. Typhimurium* SL 1344 ile 1. saat (a), 3. saat (b) ve 5. saat (c) koagregasyonun ışık mikroskopik görüntüsü (1000X).

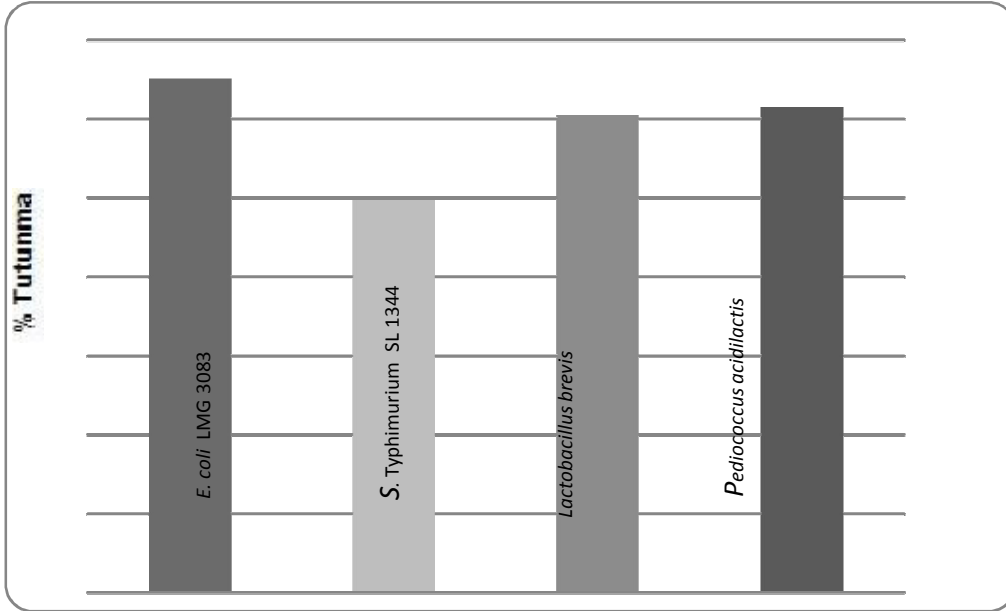
#### 4.4.4. Suşların Caco-2 Hücrelerine Tutunma Özellikleri

Probiyotik mikroorganizmaların intestinal sisteme ulaşmasıyla, mikrovillusların yüzeyine ya da mukozaya tutunma yetenekleri, iyi karakterize edilmiş Caco-2 hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmalarla tespit edilmektedir (Maragkoudakis vd 2006). Caco-2 hücrelerine tutunma denemelerinde; pozitif kontrol olarak çalışılan *S. Typhimurium* SL 1344 suşunun % 9,94 ( $\pm 1,93$ ), *E. coli* LMG3083 (ETEC) suşunun ise %13,02 ( $\pm 3,11$ )

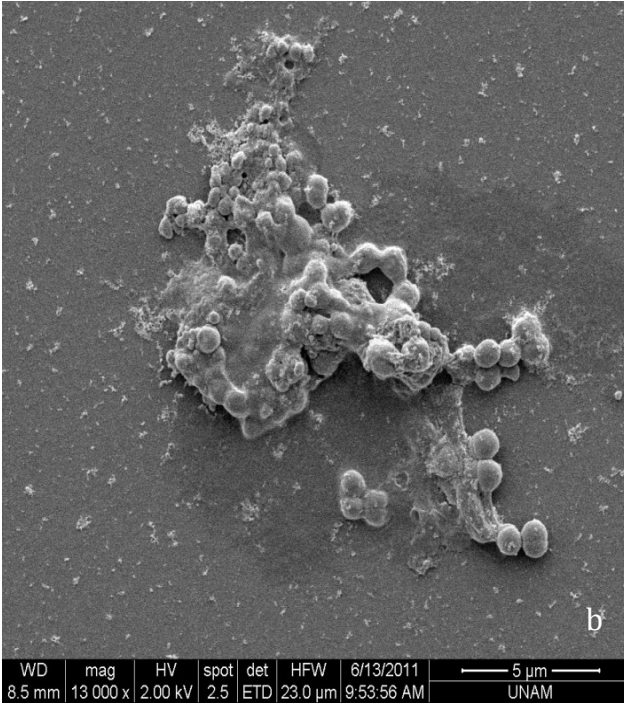
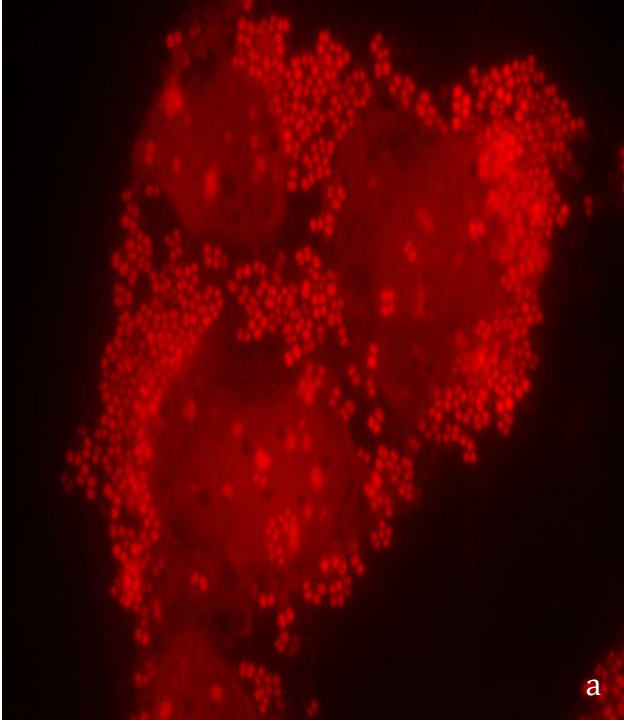


düzeyinde tutunma özelliği belirlenmiştir. *Pediococcus acidilactici* ve *Lactobacillus brevis* suşlarının tutunma oranları sırasıyla % 12,29 ( $\pm 1,42$ ) ve % 12,10 ( $\pm 3,7$ ) olarak saptanmıştır (Şekil 5.12). İstatiksel olarak (ANOVA) tüm suşların tutunma yüzdelerinin arasında fark olmadığı bulunmuştur ( $p > 0.05$ ).

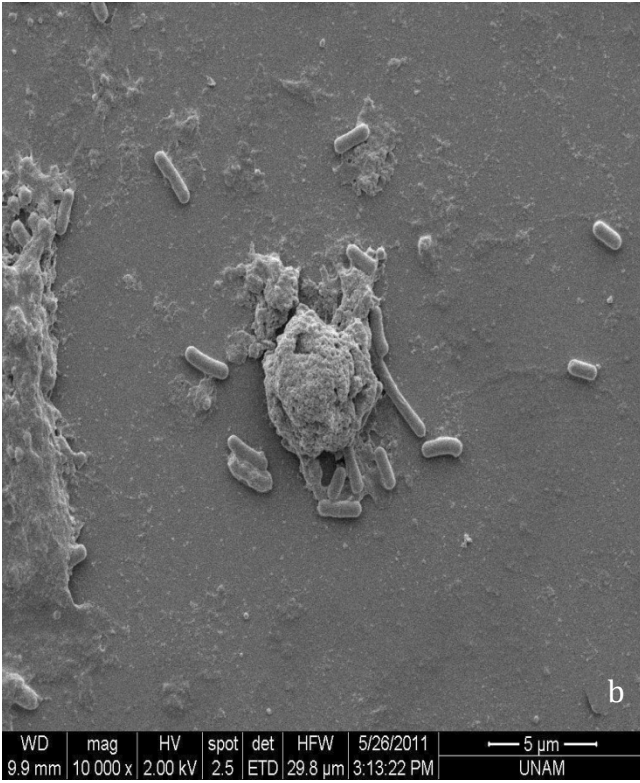
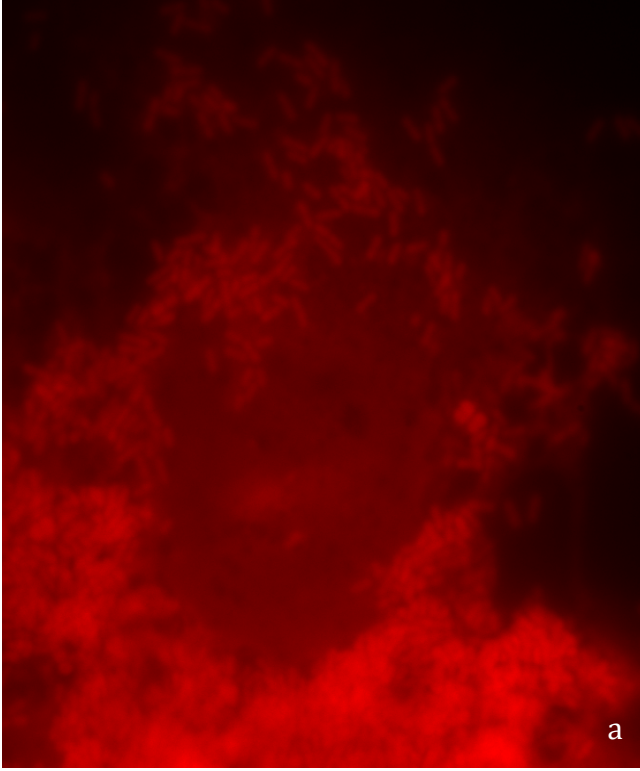
Her iki suşunda floresan ve tarayıcı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri Şekil 5.13 ve Şekil 5.14'de belirtilmiştir. Çalışmamızda denemeye alınan her iki suş içinde saptanan yüksek tutunma özellikleri, bu suşların *in vivo* sistemlerde probiyotik olarak kullanımına uygunluklarına işaret etmektedir.



Şekil.4.12. *E. coli* LMG3083 (ETEC), *S. Typhimurium* SL1344, *Lactobacillus brevis* OZV ve *Pediococcus acidilactici* OZV suşlarının Caco-2 hücrelerinin tutunma yüzdeleri



Şekil.4.13. *Pediococcus acidilactici* OZV suşunun Caco-2 hücrelerine tutunma görüntüleri  
(a) floresan mikroskop ve (b) SEM



Şekil. 4.14. *Lactobacillus brevis* OZV suşunun Caco-2 hücrelerine tutunma görüntüleri (a) floresan mikroskop ve (b) SEM

#### 4.4.5. Patojen Bakterilerin Caco-2 Hücrelerine Tutunmalarının Engellenmesi

*E. coli* LMG3083 (ETEC) suşunun Caco-2 hücrelerinin tutunma yeteneğinin engellenmesi çalışmasında *P. acidilactici* OZV ve *L. brevis* OZV suşları, *E. coli* LMG3083 (ETEC) suşunun Caco-2 hücrelerine tutunmasını sırasıyla % 87,31 ( $\pm 1,62$ ), % 82,21 ( $\pm 3,69$ ) oranında engellediği saptanmıştır. Aynı denemenin *S. Typhimurium* SL1344 ile yapıldığında ise, bu patojenin Caco-2 hücrelerine tutunma yeteneğinin *P. acidilactici* OZV suşu % 83,04 ( $\pm 3,46$ ), *L. brevis* OZV % 78,94 ( $\pm 1,62$ ) oranında engellendiği gözlemlenmiştir. Ayrıca istatistiksel analizlere göre her 2 suşunda tutunma yeteneğinin engellenmesi bakımından bir farklılık saptanmamıştır ( $p < 0,001$ ).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Araştırmalar sonucu vajinada bulunan birincil laktik asit kaynağının vajinada bulunan bakteriler olduğu düşünülmektedir (Boskey vd 1999, 2001). Laktik asit bakterilerinin yapılan çeşitli çalışmalar sonucu insan vücudunun bir çok yerindeki gastrointestinal sistemde ve kadın ürogenital sistemlerinde yararlı etkileri gösterilmiştir (Hammes 1995). Klebanoff vd (1991) kadınlarda bakteri kaynaklı vajina enfeksiyonlarında laktobasillerin oral veya vajinal kullanılmasıyla, enfeksiyonun azaldığına dair kanıtlar ileri sürmüşlerdir. Günümüzde kadın ürogenital sistem enfeksiyonlarının koruyucu ve tedavi amaçlı olarak endüstrayal bakımdan maliyeti ve üretim kolaylığı bakımından insan kaynaklı laktik asit bakterilerinin probiyotik amaçlı kullanımı ile ilgili çalışmalara ağırlık verilmektedir.

Vajenden izole edilen ve hem API-50CHL kit kullanımı hem de 16S rDNA dizi analiz sonuçlarına göre *Pediococcus acidilactici* ve *Lactobacillus brevis* olarak tanımlanan suşlar *P. acidilactici* OZV ve *L. brevis* OZV olarak adlandırılmış ve düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzlarına karşı direnç gibi bazı probiyotik özellikleri, hemolitik aktivitesi ve antibiyotik duyarlılık seviyeleri belirlenmiştir. Ayrıca suşun Caco-2 hücrelerine tutunma testi üzerine bazı denemeler gerçekleştirilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin asit ve safra tuzlarına direnç özellikleri, probiyotiklerin mide asitliğinden geçebilmesi ve bağırsak sistemine ulaştığında ise safra tuzlarına karşı dirençli olmaları istendiğinden probiyotik seçiminde önemli bir kriterdir. Sağlıklı insan vajen pH' a değeri 3,5- 4,6 arasında değişkenlik göstermektedir (Andersch vd 1986, Tevi-Benissan vd 1997). Çalışmamız da her iki suşun pH dirençli olduğu, *P. acidilactici* OZV suşunun pH 3,0' de 3. saatin sonunda % 70,62 oranında canlılık sergilerken, *L. brevis* OZV suşunun pH 3' de 3. saatin sonunda canlılık oranının % 71,80 olduğu saptanmıştır. Aynı şekilde her iki suşun safra tuzlarına karşı dirençli oldukları saptanmıştır. *P. acidilactici* OZV suşu 4. saatinde % 0,3' lük konsantrasyonunda % 85,08 oranında canlılık tesbit edilirken, % 0,5 ve % 1' lik konsantrasyonlarda ise çok az bir oranda düşüş tesbit edilirken, *L. brevis* OZV suşunda ise; safra tuzu dirençliliğinin 4. saatinde % 0,3' lük konsantrasyonunda % 95,98 oranında canlılık tesbit edilirken, % 0,5 ve % 1' lik konsantrasyonlarda ise aynı şekilde çok az bir oranda düşüş tesbit edilmiştir. *P. acidilactici* OZV ve *L. brevis* OZV suşlarının pepsin pH 2.0' de 1. saatin sonunda herhangi bir canlılık tesbit edilmezken, pepsin pH 3.0' de 3. saatin sonunda sırasıyla % 56,05 , % 53,52 oranında benzer oranda

canlılık göstermektedirler. Bu sonuçlar daha önceden yapılmış çalışmalara benzerlik göstermektedir (Conway vd 1987, Dunne vd 2001, Jacobsen vd 1999, Uymaz vd 2009, Osmanağaoğlu vd 2010). Boskey (1999) 8 vajinal *Lactobasillus* suşlarının geliştikleri besiyerini asidik bir hale soktuğunu (pH 3.2-4.8), böylece Laktobasillerin asidik bir ortam sağlayarak diğer mikroorganizmaların gelişimlerini engelleyebileceğini savunmuştur. İntestinal sistemdeki safra tuzunun fizyolojik konsantrasyonu % 0.3-0.5 arasında değişmektedir (Begley vd 2005). Erkkilä (2000), et starter kültürlerinin probiyotik özelliklerini araştırdıkları çalışmada, *L. curvatus* (RM10) ve *P. acidilactici* (P2) suşlarının pH 3,0 ve %0,3 safra tuzu varlığında en dirençli suşlar olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda, insandaki safra konsantrasyonuna yakın bir değer olmasından dolayı safraya dirençli olan suşları belirlemek için özellikle % 0,3' lük safra konsantrasyonunun kritik bir değer olduğu bildirilmiştir (Erkkilä vd 2000).

Kanlı agara yapılan çizgi ekimler neticesinde kolonilerin etrafında yeşil zon veren *E. coli* ATCC 25295  $\alpha$  hemolitik, berrak zon veren *S. aureus* ATCC 6538  $\beta$  hemolitik, zon oluşumunun gözlenmediği *P. acidilactici* OZV ve *L. brevis* OZV ise  $\gamma$  hemolitik olarak değerlendirilmiştir. Hemolitik aktivitesin sonucunda elde edilen veri, suşun probiyotik kullanımına engel teşkil etmemektedir. Maragkoudakis (2006) yılında yaptıkları çalışmada *L. acidophilus* ACA-DC 295, *L. paracasei* ACA-DC 126, *L. rhamnosus* ACA-DC 112 ve *Lactobacillus* sp. ACA-DC 108 suşlarını  $\alpha$ -hemolitik, *L. casei* Shirota ACA-DC 6002, *L. casei* Imunitass ACA-DC 6003, *L. plantarum* ACA-DC 146, *L. casei*  $\gamma$ -hemolitik olarak saptamışlardır.

Bakteriyosinin biyolojik olarak aktif protein ve çoğunlukla plazmid orjinli oldukları düşünülmektedir (Tag vd 1976). *P. acidilactici* OZV suşu bakteriyosin üretirken, *L. brevis* OZV suşunun bakteriyosin üretmediği saptanmıştır.

Laktik asit bakterileri antibiyotik tedavisinden sonra meydana gelen mikrofloranın değişmesinden sonra oluşan yeni floranın tekrar eski haline getirilmesinde görev alırlar. Bayanların % 25' i hayatları boyunca ürogenital bir enfeksiyon geçirmekte ve bunların % 80' ninde tekrarlama söz konusudur (Kass 1962, Kunin 1987). Suşların antibiyotiklere dirençlilikleri suşların yönetimindeki normal floranın bakteriyal oranını koruyabilmekte veya antibiyotik tedavi sonrası hızlı bir şekilde yeniden floranın düzenlenmesini

sağlamaktadır (Testore vd 2002). Osmanağaoğlu (2010) yaptıkları çalışmada anne sütünden izole edilen *Ped. pentosaceus* OZF suşunun methisilin, vankomisin, kanamisin, sulfamethoxazole ve aztreonam antibiyotiklerine karşı dirençli, Ampicillin, Penicillin, Cephazolin, Amoxycillin, Piperacillin, Tetracyclin, Streptomycin, Gentamycin, Chloramphenicol Erythromycin, Novobiocin, Rifampicin, Ofloxacin, Sulphamethoxazole, Aztreonam antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Antibiyotik duyarlılıklarıyla ilgili yapılan diğer çalışmalarda da *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb.plantarum*, *pediococci* ve *Leuconostoc spp.* suşlarının vankomisin' e karşı dirençli olduğu belirtilmiştir (Swenson 1990). Temmerman (2003) potansiyel probiyotik özelliğe sahip 55 adet *Lactobacillus spp.*' lerin (protein sentezini inhibitörü) tetrasiklin (%29), kloramfenikol (%12), eritromisin (%21) antibiyotiklerine düşük oranda dirençli iken, hücre duvarı inhibitörü olan vankomisine (%65) yüksek oranda dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Antibiyotik duyarlılık çalışmalarında, *Lb. rhamnosus* HN001 ve HN067, *Lb. acidophilus* HN017, penisilin ve amfisiline duyarlı suşlar olarak tespit edilmiştir (Zhou vd 2005). *Bizim çalışmamızda benzer sonuçlar bulunmuştur, her iki suşunda penisiline duyarlı olduğu, clindamysin antibiyotiğe karşı P. acidilactici OZV suşunun dirençli iken L. brevis OZV suşunun ise duyarlı olduğu görülmüştür.*

Probiyotik mikroorganizmaların en önemli özelliklerinden biri de, ortamda bulunan gıda kaynaklı patojenlerin ve kontaminant mikroorganizmaların (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* gibi) gelişimini engellemeleri ve ölümlerine sebep olmalarıdır (Halkman vd 1991). Bu özelliklerinden dolayı gıdaların korunmasında laktik asit bakterilerinin fermantasyonu sonucu ortamda bulunan karbonhidratların miktarı azalır ve antimikrobiyal aktiviteye sahip organik moleküller (laktik, asetik, formik, propiyonik asit) ve antimikrobiyal bileşikler (hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriyosin) oluşur (Attaie 1987, Rodriguez vd 2003). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bu metabolitler *E. coli* gibi gram-negatif bakteriler üzerinde etkili olmaktadır (Okereke vd 1999). Reid (1990) farklı *Lactobacillus spp.* türlerinin birçok patojen üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiğini belirlemişlerdir.

Laktik asit bakterilerinin kadınların genital ve ürogenital sistemlerindeki enfeksiyon yapan bazı patojen bakterilere (*P. aeruginosa* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 2392, *S. enteritidis* RSKK 171, *E. coli* ATCC 11230 ve maya olarak *C. albicans* AJD 180, *C. albicans* ATCC 10239) mikroorganizmaları üzerine inhibisyon etkilerinin değişik oranda olduğu

gözlemlenmiştir (Hillier vd 1992). Yapılan diğer bir çalışmada vajinadan izole edilen *Lactobacillus* suşlarının *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aureus* ve *Pseudomonas* türleri üzerine yapılan inhibisyon çalışmalarının sonucunda *Lactobacillus* suşlarının hidrojen peroksit üretimi sonucunda ortaya çıktığını belirtmişlerdir (Miyamoto vd 1999). Çalışmamızda, *P. acidilactici* OZV suşu, *Salmonella enterica* serotype Typhimurium SL 1344, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25295, ve *Candida albicans* ATCC 26555 dışında test edilen tüm mikroorganizmalara karşı bakteriyosin aktivitesi göstermiştir. Bununla beraber, *L. brevis* OZV suşunun bakteriyosin üretmediği tespit edilmiştir.

Laktobasillerin agreve olarak koloni oluşturması ağız boşluğunda ve ürogenital sistemde önemli bir rol üstlenmektedir (Reid vd 1990). Agregasyon yeteneği, benzer hücrelerin kümeleşerek otoagregasyon oluşturması, farklı genetik materyalli hücrelerin koagregasyon oluşturmasına göre belirlenmektedir (Kolenbrander vd 1988). Braun (1999), Okkers vd (1999), vajinal enfeksiyonların vajinaya Laktobasillerin kolonize edilmesi ile önlenemediğini belirtmişlerdir. Bu mekanizma, laktik asit bakterilerinin besinlere ve reseptörlere hidrofobik bağlanmasındaki yüksek rekabet gücüne ve bazı olgularda ise bakteriyosin benzeri fungostatik peptitler üretmelerine bağlamışlardır. Hücre agregasyonu lipotekoik asit, protein ve karbonhidrat içerikli hücre yüzeyine bağlanma amacıyla oluşmaktadır (Clewel vd 1989, Reniero vd 1991).

Epitel kolonizasyon gösteren probiyotik kriterlerden olan agregasyon ve otoagregasyon faaliyetlerinin asidik (pH 3-4) ortamda en iyi olduğu, nötr pH' da sabit kaldığı ve pH 10 da ise tamamen yok olduğu bildirilmiştir (Boris, 1997). *L. casei* GR-1 suşunun pH 3.3 de 5.6 ya oranla daha iyi otoagreve olduğu tespit edilmiştir (Reid vd 1988). Çalışmamızda *P. acidilactici* OZV suşunun otoagregasyonu % 79,49 benzer şekilde *L. brevis* OZV suşunun ise % 78,13 olarak saptanmıştır.

Laktobasillerin otoagregasyon mekanizması anlamak üzere yapılan bir çalışma sonucunda, kültür süpernatantındaki proteinlerin hücre yüzeyinde bulunan proteinler ve lipoproteinlerin hücre agregasyonu için görev yaptığı saptanmıştır. Bunun yanında hücre kültür süpernatantının aynı zamanda diğer laktik asit bakterileri ve *Escherichia coli* ile agreve olduğu saptanmıştır (Schachtsiek vd 2004).



İnsan vajinasından izole edilen *Lactobacillus ramnosus* L60 suşunun *E. coli*, *C. albicans* ve *G. vaginalis* koagrega olduğunu ancak *C. glabrata* ile koagrega olmadığını bildirmişlerdir. Vajinal sağlığın sağlanabilmesi için Laktobasiller koagregasyon ile patojenlerin etrafında antimikrobiyal içeriğini artırarak sağladığı bildirilmiştir (Pascual vd 2008). Yapılan bu çalışmaların yanında diğer bir görüşte gastrointestinal ve ürogenital sistemdeki mikrobiyal kolonizasyonun otoagregasyon ve koagregasyonu gerekli iken, intestinal veya vajinal bölgede *Lactobacillus*' ların gerekliliği bilinmemekte olduğunu düşünmekte (Ocaña vd 2002).

*Bizim çalışmamızla benzer sonuçları gösteren P. pentosaceus OZF suşunun 2 enteropatojenle koagregasyon oranı Salm. Typhimurium SL 1344 ile % 6.26 iken E. coli LMG 3083 (ETEC) ile % 12.99 saptanmıştır (Osmanağaoğlu O. vd 2010). Bizim çalışmamızda da P. acidilactici OZV suşunun Salm. Typhimurium SL 1344 ve E. coli LMG 3083 (ETEC) ile sırasıyla 5. saatin sonundaki koagregasyonu % 4,35, % 11,82 bulunmuştur. L. brevis OZV suşunun Salm. Typhimurium SL 1344 ile % 9,52 koagregasyonu ile P. acidilactici suşuna göre daha yüksekken E. coli LMG 3083 (ETEC) ile % 9,09 koagregasyon ile P. acidilactici OZV suşuna göre daha düşük koagrega olmuştur. Bizim çalışmamızın sonucundan farklı olarak Xu vd (2009) yaptıkları bir araştırmada da P. acidilactici OZV suşunun Salm. Typhimurium ile koagregasyonun % 55.4 olarak rapor etmişlerdir.*

Probiyotik özellikteki bakterilerin bağırsağa ulaşması halinde, peristaltik hareketler ile bağırsaktan kayıp gitmemesi için bağırsak lümenini örten mukus tabakasına ve epitel hücrelerine tutunması gerekmektedir (Fernández vd 2003). Bağırsak hücrelerine bakterilerin tutunma yeteneği en önemli probiyotik seçim kriteri olarak dikkate alınmaktadır (Bibiloni vd 1999). Bağırsak epiteline veya mukusa tutunma, başarılı kolonizasyon, enteropatojenlere karşı antagonistik aktivite gösterebilme, immün sistemin modülasyonu ve mide mukoza hasarlarının iyileştirilmesinin artırılması için gerekli olan ön koşullardan biridir (Fang vd 2001). Bu nedenle, bağırsak yüzeyine kolonizasyonda ilk adım olarak, bakterilerin bağırsak hücrelerine veya mukusa tutunması düşünülmektedir (Beachey vd 1981, Havenaar vd 1992).

Tutunma deneyleri iyi karakterize edilmiş Caco-2 hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* denemelerle tespit edilmektedir (Maragkoudakis vd 2006). *In vitro* denemelerde, probiyotik ürünlerden izole edilen laktik asit bakterilerinden; *Lb. acidophilus* BFE704'ün % 63, *Lb. johnsonii* BFE654 ve 744'ün sırasıyla % 50 ve % 48 oranında tutunma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir (Schillinger vd 2005). Caco-2 hücreleri kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise; süt ürünlerinden izole edile *Lb. plantarum* ACA-DC146 için % 25.5, *Lb. paracasei* sp. *paracasei* ACA-DC 221, 3334 ve 3335 suşları için sırasıyla % 13.1, % 13.8 ve % 11.8 tutunma oranları saptanmıştır (Maragkoudakis vd 2006).

McLean (2002) vajinal laktobasillerin vajinal epitel hücrelerine yapışma yeteneklerini araştırdıkları çalışmalarında, vajen epiteline en iyi adezyon gösteren 3 adet *Lactobacillus acidophilus* (48101, 61701, ve 61880) suşunun insan O kan grubu donörlerininin vajinal epitel hücrelerine, diğer kan grubu eritrositine sahip vajinal epitel hücrelerine kıyasla daha iyi adezyon gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Laktobasillerin insan intestinal hücrelerine adezyonu ile ilgili çalışmalar tam anlamıyla açıklığa kavuşturulmamıştır (Conway vd 1988, Reid vd 1990). Yapılan diğer bir çalışma sonucunda 27 insan Lactobasillus izolatların sonucunda 4 tane *L. acidophilus* suşunun insan fetal intestinal epitel hücrelerine tutunduğu gösterilmiştir (Kleeman vd. 1982). Elo ve arkadaşlarının 1991' de *L. casei* GG suşunun CaCo-2 hücrelerine tutunduğunu göstermiştir. Diğer bir çalışmada *L. acidophilus* LB' nin sıcaklık artışının bağlanmaya etkisi olmadığı ve 100°C'ye çıkartıldığında canlılığını kaybettiği, bunun nedeni olarakta D-mannoz, L-fukoz ve D-galaktoz gibi basit şekerlerin LB suşunun etkisi olmadığı gösterilmiştir (Gilles vd 1992). *Bizimde çalışmamızda CaCo-2 hücrelerine P. acidilactici* OZV suşunun tutunma oranı % 12,29 ( $\pm 1,42$ ), *L. brevis* OZV suşunun tutunma oranı ise % 12,10 ( $\pm 3,7$ ) olarak saptanmıştır.

Şehir yaşıntısının gerektirdiği riskler ve yaygın antimikrobiyal kullanımı, günümüz kadınlarını vajinal enfeksiyonlarla giderek artan oranda karşı karşıya bırakmaktadır. Dünyada yaklaşık 1 milyar kadın her yıl cinsellik dışı ürogenital mantar vajinitis, bakteriyel vajinozis ve üriner enfeksiyonlarından şikayetçi olup, Amerika Birleşik Devletlerindeki Hastalık Kontrol merkezine göre 1966 ila 1999 yılları arasında non-trichomonas vajinitten şikayet edenlerin sayısının üç kat arttığı bildirilmiştir (Reid vd 2003). Bu nedenlerden dolayı, vajinal enfeksiyonların önlenmesinde probiyotik kullanımı bir kez daha gündeme gelmiştir. Probiyotik olarak etkin olarak kullanımını sınırlayan faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Bazı laktobasiller vajinal duvara kuvvetli bir şekilde

tutunurken, bazıları patojenlerin tutunmasını engeller ve diğeri patojenlerin gelişmesini engeller. Bunun dışında aynı laktobasil türleri, farklı patojenleri bloke ederek ya da gelişmelerini inhibe ederek farklı etkiler gösterebilir. Bu, insanlarda laktobasillerin probiyotik olarak kullanılmadan önce, türlerin karakterize edilmesinin önemini göstermektedir. Laktobasillerin probiyotik olarak rollerinin tanımlanması için daha geniş çalışmalara gerek duyulmaktadır. Probiyotik etkinlik açısından en iyi suşun tespit edilmesinde objektif ve universal kriterlerin çalışılmamış olması, vajinit proflaksisi için önerilen *Lactobacillus* içeren preparatların etkinliğini ve güvenilirliğini sorgulama gereğini ortaya koymaktadır.

Günümüzde kadın ürogenital sistem enfeksiyonlarında koruyucu ve tedavi amaçlı olarak antimikrobiyal ilaçlar kullanılmaktadır. Son yıllarda, kadın ürogenital sistem enfeksiyonlarında, koruyucu ve tedavi amaçlı olarak, insan kaynaklı laktik asit bakterilerinin probiyotik amaçlı kullanımı ile ilgili çalışmalara ağırlık verilmektedir (Charteris vd 1997).

Yapılan araştırmalar probiyotiklerin uygulamalı olarak kullanımını tasarlamaktadır. Dünyada, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* cinsi bakterileri içeren ilaçlar, vajina içine uygulanarak kullanılmaktadır. Bu nedenlerden dolayı vajina içerisine uygulanan bu ilaçların ne kadar faydalı olabilecekleri daha fazla araştırma yapılarak aydınlatılmalıdır. Bu çalışmada probiyotik özellikleri bakımından iki suşun, probiyotik amaçlı kullanımı ile endüstriyel üretim süreçlerine uygunluğunun belirleyerek, probiyotik amaca yönelik vajinal tabletler hazırlanmasında ve bu tabletlerin vajinal flora enfeksiyonlarından korunmak ve tedavisi için kullanımını önermekteyiz.

## KAYNAKLAR

- Alander, M., Satokari, R., Korpela, R. 1999. Persistence of colonization of human colonic mucus by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG after oral consumption. *Appl. Environ. Microb.* Vol. 65, 351–354.
- Alejandra, V., Jakobsson T., Ahrne S., Forsum U., Molin, G. 2002. Vaginal *Lactobacillus* Flora of Healthy Swedish Women. *Journal of Clinical Microbiology*, Aug., Vol. 40, No. 8, 2746–2749.
- Andersch, B., Forssman, L., Lincoln, K., Tortensson, P., 1986. Treatment of bacterial vaginosis with an acid cream: a comparison between the effect of lactate-gel and metronidazole. *Gynecol. Obstet. Invest.* Vol. 21, 19-25.
- Antonio, M.A.D., Hawes, S.E., Hillier, S.L. 1999. The Identification of Vaginal *Lactobacillus* Species and The Demographic and Microbiologic Characteristics of Women Colonized by These Species. *J. Infect. Dis.* Vol. 180, 1950- 1956.
- Aroutcheva, A., Gariti, D., Simon, M., Shott, S., Faro, J., Simoes, J. A., Gurguis, A., Faro, S. 2001. Defense Factors of Vaginal Lactobacilli. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, Vol. 185, 375-379.
- Batish, V., Roy, U., Grover, S. 1997. Antifungal Attributes of Lactic Acid Bacteria-A Review. *Critical Reviews in Biotechnology.* Vol. 17(73), 209- 225.
- Beachey, E.H. 1981. Bacterial adherence: adhesin receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* Vol. 143, 325-345.
- Begley, M., Gahan, C.G. and Hill, C. 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.*, Vol. 29, 625-651.

- Beuerman D. ,Heinemann C. , Bruce AW. , Reid G. 2001. Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *Immunol Med Microbiol. Dec*, Vol. 32 (1), 37-41.
- Bibiloni, R., Perez, P.F., De Antoni, G.L. 1999. Factors Involved in Adhesion of Bifidobacterial Strains to Epithelial Cells in Culture. *Anaerobe*. Vol. 5, 483-485.
- Bilgehan, H. 1995. *Bacillus* Genusu: Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları. Fakülteler Kitabevi, İzmir, 529-532 .
- Bhunai, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. 1988. Purification, characterization and microbial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*. Vol. 65, 261-268.
- Biswas, S.R., Ray, P. , Johnson, M. C., Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici*. *H. Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 57, 1265-1268.
- Boot, H.J., Kolen, C.P.A.M., Andreadaki, F.J. and Pouwels, P. H. 1996. The *Lactobacillus acidophilus* gene expression site comprises two consensus promoter sequence one of which directs transcription of stable mRNA. *J. Bacteriol*, Vol. 178, 5388-5394.
- Boris, S., Sua´rez, J.E., Va´zquez, F., and Barbe´s, C. 1998. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect. Immun.* Vol. 66, 1985–1989.
- Boris, S. 2000. Role played by *Lactobacilli* in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes. Infect.* Vol. 2 (5), 543-546.
- Boskey, E. R., Telsch, K. M., Whaley, K. J., Moench, T. R. & Cone, R. A. 1999. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with therate and extent of vaginal acidification. *Infect Immun.* Vol. 67, 5170–5175.

- Boskey, E. R., Cone, R. A., Whaley, K. J. & Moench, T. R. 2001. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Hum Reprod.* Vol. 16, 1809–1813.
- Boskey, E.R., Cone, R.A., Whaley, K.J., Moench, T.R. 2001. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Hum. Reprod.* Vol. 16 (9), 1809-1813.
- Chauviere, G., Coconnier, M.H., Kerneis, S., Fourniat, J., Servin, A.L. 1992. Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Journal of General Microbiology.* Vol. 138, 1689-1696.
- Clewell, D. B., Weaver, K. E. 1989. Sex pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid.* Vol. 21, 175-184.
- Charteris, W.P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J.K. 1997. The role and therapeutic potential of *Lactobacillus* species in female urogenital tract infection. *Microecol. Ther.* Vol. 26, 59-96.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. 1999. Development of agar overlay disc diffusion method for the antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species. *Egyptian J. Dairy Sci.* Vol. 27, 71-82.
- Conway, P., Gorbach, S., Goldin, B. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* Vol. 70, 1–12.
- Conway, P. 1988. Lactobacilli: Fact. an fiction. In the *Regulatory and Protective Role of the Normal Flora.* Edited by R. Grun, T. Midvedt, Norin. Stockton Press. pp, 263-281.
- Çakır, İ., ve Çakmakçı, M.L. 2004. Probiyotikler: Tanımı, Etki Mekanizması, Seçim ve Güvenilirlik Kriterleri. *Gıda.* Vol. 29 (6), 427-434.

- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie von Leeuwenhoek*. Vol. 96; 193-202.
- Di Rosa R., Mastrantonio P. 1993. Anaerobic bacteria and gynecologic infections. *Recenti Prog. Med*. Vol. 84:749-800.
- Drinan, D.F., Tobin, S., and Cogan, T.M. 1976. Citric acid metabolism in hetero and homofermentative lactic acid bacteria, *Appl. Envir. Microbiol*. Vol. 31(4), 481-486.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* Vol. 73(2 suppl), 386–392.
- Elo, S., Saxelin, M., Salminen, S. 1991. Attachment of *Lactobacillus casei* strain GG to human colon carcinoma cell line Caco-2: comparison with other dairy strains. *Letters in Applied Microbiology*. Vol.13, 153-156.
- Erkkilä, S., and Petäjä, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*. Vol. 55, 297-300.
- Ewaschuk, J. B., and Dieleman, L. A. 2006. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*. Vol. 12, 5941-5950.
- Falagas, M.E., Betsi, G.I., Athanasiou, S. 2007. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Infect. Jul*. Vol. 13(7), 657-64.
- Falsen, E., C. Pascual., Sjo'de'n, B., Ohle'n, M., and Collins, M.D. 1999. Phenotypic and phylogenetic characterisation of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. Vol.49, 217–221.

- Fang, H., Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Hosoda, M., Benno, Y., Salminen, S. 2001. Differences in Composition and Mucosal Adhesion of Bifidobacteria Isolated from Healthy Adults and Healthy Seniors, *Curr. Microbiol.* Vol. 43, 351-354.
- Fernández, M.F., Boris, S., Barbés, C. 2003. Probiotic Properties of Human Lactobacilli Strains to be Used in The Gastrointestinal Tract. *App. Microbiol. Biot.* Vol. 94: 449-455.
- Floch, M.H., Binder, H.J., Filburn, B., Gershengoren, W. 1972. The Effect of Bile Acids on Intestinal Microflora. *Am. J. Clin. Nutr.* Vol. 25, 1418-1426.
- Fuller, R. 1999. Probiotics for Farm Animals.. *Probiotics A Critical Review*. Editor G. W. Tannock, Horizon Scientific Press. Wymondham, UK. 164 p., 15-22
- Gilles, C., Marie, H.C., Sophie, K., Jacky, F., Alain, LS. 1992. Adhesion of Human *Lactobacillus acidophilus* Strain LB to Human Enterocyte-like Caco-2 cells. *Journal of General Microbiology.* Vol. 138, 1689-1696.
- Guarner, F., Schaafsma, G. J. 1998. Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol. 39, 237-238.
- Gruter, M., Leeflang, B.R., Kuiper, J., Kamerling, J.P., Vliegenthart, F.G. 1993. Structural Characterisation of The Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus delbrueckii* Subspecies *bulgaricus* rr grown in skimmed milk, *Carbohydr. Res.* Vol. 239, 209–226.
- Halkman, K. 1991. Tarım Mikrobiyolojisi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Yayınları, Ankara. Vol. 1214, 82 .
- Hammes, W., Weiss, N., Holzapfel, W. 1995. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Balows A, Trüper H, Dworkin M., Harder W., Schleifer KH, eds. *The Prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Applications.* Vol II. 2<sup>nd</sup> ed. New York, NY: Springer; 2536-1594.



- Handley, P.S., Harty, D.W.S., Wyatt, J.E., Brown, C.R., Doran, J.P., Gibbs, A.C.C.A. 1987. Comparison of The Adhesion, Coaggregation and Cell-Surface Hydrophobicity Properties of Fibrillar and Fimbriate Strains of *Streptococcus salivarius*. *Journal of General Microbiology*, Vol. 133, 3207-3217.
- Helander, I.M., Von Wright, A., and Mattila-Sandholm, T.M. 1997. Potential of Lactic Acid Bacteria and Novel Antimicrobials Against Gram-Negative Bacteria, *Trends Food Sci. Tech.* Vol. 8, 146-150.
- Havenaar, R., Brink, B., Huis in't Veld, J.H. 1992. Selection of Strains for Probiotic Use: In *Probiotics, The Scientific Basis*. R. Fuller. Chapman & Hall, London. 209-224.
- Hill, M.J., Draser, B.S. 1968. Degradation of Bile Salts by Human Intestinal Bacteria. *Gut*, Vol. 9, 22-27.
- Hylemon, P.B., Glass, T.L. 1983. Biotransformation of Bile Acids and Cholesterol by The Intestinal Microflora. In: Hentes D. J. (Ed) *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*. Academic Press, New York. 189-213.
- Hoffman, A.F., Molino, G., Milanese, M., and Belforte, G. 1983. Description and Stimulation of a Physiological Pharmacokinetic Model for The Metabolism and Enterohepatic Circulation of Bile Acids in Man. *J. Clin. Invest.* Vol. 71, 1003-1022.
- Hofvendahl, K., Hahn-Hagerdal, B. 2000. Factors Affecting The Fermentative Lactic Acid Production from Renewable Resources. *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 26, 87-107.
- Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollot, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T., Goldschmit-Clermont, P.J. 1997. Mitogenic Signalling by Oxidants Ras-transformed Fibroblasts, *Science*. Vol. 275, 1649-1652.

- Jack, D.S., Walter, C. 1996. Vaginal Microbiology of Women with Acute Recurrent Vulvovaginal Candidiasis :Journal of Clinical Microbiology, Oct. Vol. 34. 2497–2499.
- Jacobsen, C.N., Nielsen, R.V., Hayford, A.E., Moller, P.L., Michaelsen, K.F., Pærregaard, A., Sandstroëm, B., Tvede, M., Jakobsen, M. 1999. Screening of Probiotic Activities of Forty Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro Techniques and Evaluation of The Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 65, 4949–4956.
- Kass, E.H. 1962. Pyelonephritis and bacteriuria. A Major Problem in Preventive Medicine. *Ann. Intern. Med.* Vol. 56, 46-53.
- Kailasapathy, K., Rybka, S. 1997. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. – Their Therapeutic Potential and Survival in Yogurt. *The Aust. J. Dairy Technol.* Vol. 52, 28-35.
- Klebanoff, S. J., Hillier, S. L., Eschenbach, D. A., Waltersdorff, A.M. 1991. Control of The Microbial Flora of The Vagina by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generating *Lactobacilli*. *J. Infect. Dis.* Vol. 164, 94-100.
- Klaenhammer, T.R., Ahn, C., Fremaux, C. and Milton, K. 1995. Molecular Properties of *Lactobacillus* Bacteriocins. NATO ASI Series.. Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics p. Vol. H65, 37-58.
- Kleeman, E.G., Klaenhammer, T.R. 1982. Adherence of *Lactobacillus* species to human fetal intestinal cells. *Journal of Dairy Science* Vol. 65, 2063-2069.
- Kunin, C.M. 1987. Detection, prevention and management of urinary tract infections. 4<sup>th</sup> ed. Lea&Fbiger, Philadelphia. 1-447.
- Kolenbrander, P. E. 1988. Intergeneric Coaggregation Among Human Oral Bacteria and Ecology of Dental Plaque. *Annu. Rev. Microbiol.* Vol. 42, 627-656.

- Koneman, E.W., Alien, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, J.R. 1992. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 4<sup>th</sup> ed., Philadelphia JB Lippincott Co. 522.
- Kos, B., Suskovic, S., Simpraga, M., Frece, J., and Matosic, S., 2003. Adhesion and Aggregation Ability of Probiotic Strain *Lactobacillus acidophilus* M92. Journal Applied of Microbiology. Vol. 94, 981-987.
- Laurens-Hattingh, A., Viljoen, B. C. 2001. Yogurt as Probiotic Carrier Food. Int. Dairy J., Vol. 11, 1-17.
- Lepargner, J.P., Rousseau, V. 2002. Protective Role of Doderlien Flora. J.Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. Vol. 31 (5), 484-485.
- Lopez, R.V., Cook, L.R., Sobel, D.J., 1990. Emerging Role of *Lactobacilli* in The Control and Maintenance of The Vaginal Bacterial Microflora. Rev. Infect. Dis. Vol. 12 (5), 856- 872.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G. , Pot, B., Tsakalidou, E. 2006. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated from Dairy Products. International Dairy Journal. Vol. 16, 189-199.
- Mari´a S.T., Ocan˜ a, V. S., Wiese, B., Nader-Maci´as, M.N. 2003. Growth and Lactic Acid Production by Vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and Inhibition of Uropathogenic *Escherichia coli*. J. of Medical Microbiology. Vol. 52, 1117-1124.
- Martin, H.L., Richsrdsn B.A. 2000. Vaginal Lactobascilli Microbial Flora and Risk of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Sexually Transmitted Disease Acquisition, J. Infect. Dis. Vol. 180(6), 1863-1868.
- Mc Groarty, J.A. 1993. Probiotic Use of Lactobacilli in The Human Female Urogenital Tract. Fems Immunol. Med. Mic. Vol. 6, 251-264.

- Melis, G.B., Ibba, M.T., Steri, B., Kotsonis, P., Matta, V., Paoletti, A.M. 2000. Role of pH as a regulator of vaginal physiological environment. *Minerva Ginecol.* Vol. 52, 111– 121 (in Italian).
- Mishra, C., Lambert, J. 1996. Production of Anti-Microbial Substances by Probiotics. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* Vol. 5, 20-24.
- Nessler, S. 1994. Crystallization of D-lactate Dehydrogenase from *Lactobacillus Bulgaricus*. *J. Mol. Biol.* Vol. 235, 370-371.
- Osmanagaoglu Ö., Kiran F., Ataoglu H. 2010. Evaluation of in vitro Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF Isolated from Human Breast Milk. *Probiotics & Antimicro. Prot.* Vol.2, 162–174.
- Paavonen, J. 1983. Physiology and ecology of the vagina. *Scand J. Infect. Dis. Suppl.* Vol. 40, 31–35.
- Pascual, L.M., Daniele, M.B., Ruiz, F., Giordano, W., Pajaro, C., Barberis, L. 2008. *Lactobasillus rhamnosus* L60, a Potential Probiotic Isolated From The Human Vagina. *J. Gen. Appl. Microbial.*, Vol. 54, 141-148.
- Prescott, C.S., Dunn, G.C. 1987. *Industrial Microbiology*, Published on Distributors, Delhi, India, pp 882.
- Prosod, J. 1998. Selection and Characterization of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* Strains for Use as Probiotics. *Int. Dairy J.* Vol. 8, 993-1002.
- Redondo-Lopez, V., Cook, R. L., Sobel, J. D. 1990. Emerging Role of Lactobacilli in The Control and Maintenance of The Vaginal Bacterial Microflora. *Rev. Infect. Dis.*, Vol. 12, 856–872.
- Reid, G., Bruce, A. W., McGroarty JA., Cheng KJ., Costerton JW. 1990. Is There a Role for Lactobacilli in Prevention of Urogenital and Intestinal Infection. *Clinical Microbiological Reviews.* Vol. 3, 335-344.

- Reid, G., Bruce, A. W., Fraser, N., Heinemann, C., Owen, J., Henning, B. 2001. Oral Probiotics Can Resolve Urogenital Infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. Vol. 30, 49-52.
- Rolfe, R. D. 2000. The Role of Probiotic Cultures in The Control of Gastrointestinal Health. *J. Nutr. (Supplement)*, Vol. 130, 396-402.
- Roy, D., Ward, P., Vincent, D., Mondou, F. 2000. Molecular Identification of Potentially Probiotic Lactobacilli. *Current Microbiology*. Vol. 40, 40-46.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., Lee, K.Y. 1999. Probiotics: How should they be defined?. *Trends in Food Sci. & Technol.* Vol. 10, 107-110.
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, New York.
- Schroder, R. 1921. Zur Pathogenese und Klinik des vaginalen Fluors. *Zentralbl. Gynaekol.*, Vol. 38, 1350–1361.
- Serdaroğlu, M., Turp, G.Y. 2004. Probiyotikler: Mekanizmaları ve Etkileri. *Bilimsel Gıda*, (2)30-34.
- Shah, N.P., Lankaputhra, W.E.V. 1997. Improving Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. In *Yogurt*. *International Dairy Journal*. Vol. 7, 349-356.
- Shah, N.P. 2000. Symposium: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*. Vol. 83, 894-907.
- Shimada, K., Bricknell, K.S., Finegold, S.M. 1969. Deconjugation of bile acids by intestinal bacteria: a review of literature and additional studies. *J. Infect. Dis.* Vol. 119, 73-81.

- Song, Y.-L., Kato, N., Matsumiya, Y., Liu, C.-X., Kato, H., Watanabe, K. 1999. Identification of and Hydrogen Peroxide Production by Fecal and Vaginal Lactobacilli Isolated from Japanese Women and Newborn Infants. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 37, 3062– 3064.
- Swenson, J.M., Facklam, R.R., Thornberyy, C. 1990. Antimicrobial susceptibility of vancomycin resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Lactobacillus* species. *Antimicrob Agents Ch.* Vol. 34, 543–549.
- Redondo-Lopez, V., Cook, R.L., Sobel, J.D. 1990. Emerging role of Lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis.* Vol. 12, 856–872.
- Rees, T.J. 1997. The development of a Novel Antifungal Silage Inoculant. Doctoral Resaerch Thesis, Cranfield University Biotechnology Centre, UK, 8-23.
- Reid, G., McGroarty, J.A., Tomeczek, L., Bruce, A.W. 1996. Identification and Plasmid Profiles of *Lactobacillus* Species from The Vagina of 100 Healthy Women. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* Vol. 15, 23–26.
- Uymaz, B., Simşek, O., Akkoc, N., Ataoglu, H., Akçelik, M. 2009. In vitro Characterization of *Pediococcus pentosaceus* BH105 Isolated from Human Faeces. *Ann Microbiol.* Vol. 59, 485–491.
- Tomás, J.S.M., Ocaña, S.V., Wiese, B., Nader-Macias E.M. 2003. Growth and Lactic Acid Production by Vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and Inhibition of Uropathogenic *Escherichia coli*. *J. of Medical Microbiology.* Vol. 52, 117-1124.
- Tamime, A.Y., Marshall, V.M.E. 1997. Microbiolgy and Technology of Fermented Milk, (editör B.A. LAW ). *Microbiolgy and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, Blackie Academic & Proffesional Publ. London. p: 153-192.

- Tahri, K., Grill, J.P., Schneider, F. 1996. Bifidobacteria Strain Behavior Toward Cholesterol: Coprecipitation with Salts and Assimilation. *Curr. Microbiol.* Vol. 33, 187-193.
- Temiz, A. 2000. Genel mikrobiyoloji uygulama Teknikleri. III. Baskı. Hatipoğlu Yayınevi. ANKARA.
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J. 2003. Identification and Antibiotic Susceptibility of Bacterial Isolates from Probiotic Products. *International Journal of Food Microbiology.* Vol. 81, 1-10.
- Testore, G.P., Sarrecchia, C., Zupi, E., Sordillo, P., Valli, E., Bove, F., Andreoni, M. 2002. Antibiotic Susceptibility of Lactobacilli Isolated from The Cervix of Healthy Women, *Microbial Ecology in Health and Disease.* Vol.14, 14-18.
- Tevi-Bènissan, C., Bèlec, L., Lèvy, M., Schneider-Fauveau, V., Si Mohamed, A., Hallouin, M-C., Matta, M., Grèsenguet, G. 1997. In vivo semen-associated Ph neutralization of cervicovaginal secretions. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, Vol. 4, 367-374.
- Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. 1999. The effect of Probiotic Bacteria on the Adhesion of Pathogens to Human Intestinal Mucus, *FEMS Immunol. Med. Mic.*, Vol.26, 137-142.
- Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J.A. 2000a. Viability of Probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and Nonprobiotic Microflora in Argentinian Fresco Cheese. *Journal of Dairy Science.* Vol. 83, 1905-1911.
- Xu, H., Jeong, H.S., Lee, H.Y., Ahn, J. 2009. Assessment of Cell Surface Properties and Adhesion Potential of Selected Probiotic Strains. *Lett. Appl. Microbiol.* Vol. 49, 434-442.

- Wilkins, T.D., Holdeman, L.V., Abramson, I.J., Moore, W.E.C. 1972. Standardized Single-Disc Method for Antibiotic Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. Vol.1(6), 451-459.
- Zhong, W., K. Millsap, H. Bialkowska-Hobrzanska, G. R. 1998. Differentiation of *Lactobacillus* Species by Molecular Typing. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 64, 2418–2423.



## **EKLER**

**EK 1: Besiyerleri ve kimyasal bileşenler**

**EK 2: Tampon ve çözeltilerin bileşenleri**

**EK 3: Moleküler markörler**

**EK 4: Genomik DNA izolasyon kit aşamaları**

**EK 5: 16S Dizi analizi ve Blast sonucu**

## EK 1

### BESİYERLERİNİN KİMYASAL BİLEŞENLERİ

MRS (deMan Rogosa Sharpe)  
besiyerinin kimyasal bileşeni

BİLEŞEN	MİKTAR (g/L)
Kazein pepton	10g
Et ekstraktı	8g
Maya ekstraktı	4g
Glukoz	20g
Dipotasyum hidrojenfosfat	2g
MgSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,5g
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,2g
Tween 80	1ml
Triamonyum sitrat	2g
Sodyum asetat	5g
Ph 5,7±0,02 ( sterilizasyon önce)	

Luria Bertani (LB) besiyerinin  
kimyasal bileşeni

BİLEŞEN	MİKTAR (g/L)
Tripton	10 g
Maya Ekstraktı	5 g
NaCl	10 g
pH 7,0 ± 0,02 ( sterilizasyon önce)	

Tripton Glukoz Yeast Ekstrakt (TGE )  
besiyerinin kimyasal bileşeni

BİLEŞEN	MİKTAR (g/L)
Tripton	10g
Glukoz	10g
Maya ekstraktı	10g
Tween 80	1g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,05g
pH: 6,8±0,2 (sterilizasyon önce)	

Triptik Soy Agar (TSB)  
besiyerinin kimyasal bileşeni

BİLEŞEN	MİKTAR(g/L)
Kazein pepton	17 g
Soya pepton	3 g
Glukoz	2,5 g
NaCl	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g
pH 6,8 ±0,2 (sterilizasyon önce)	

GM17 besiyerinin kimyasal bileşeni

BİLEŞEN	MİKTAR (g/L)
Polipepton	5 g
Fitopepton	5 g
Maya ekstraktı	2 g
Et ekstraktı	5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O(1M)	1 ml
Glukoz	5 g
Askorbik asit	0,5 g
pH: 6,8 ± 0,2 (sterilizasyon önce)	

**EK 2**  
**Tampon ve Çözeltiler**

Phosphate Buffered Saline (PBS) tamponu

NaCl	8,00g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,21g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,34g/L

Gram Boyama çalışmasında kullanılan çözeltilerin içerikleri

<b>Kristal Violet stok çözeltisi</b>	
Kristal Violet	1gr
Etanol	%95
dH <sub>2</sub> O	100 ml'ye tamamlanır
<b>Bazik Fuksin stok çözeltisi</b>	
Bazik fuksin	3gr
Etanol	%95
dH <sub>2</sub> O	100 ml'ye tamamlanır
<b>Iyot çözeltisi</b>	
Iyot	1gr
Potasyum İyodür	2gr
Sodyum karbonat	60ml
dH <sub>2</sub> O	140ml

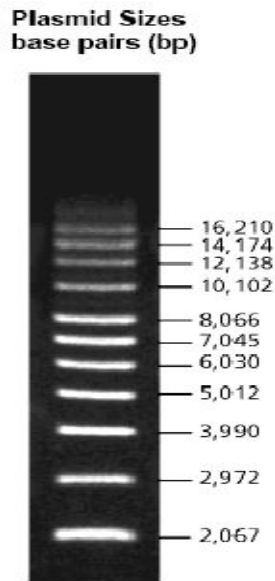
### Agaroz Jel Elektroforezinde kullanılan tamponlar ve çözeltiler

<b>Tris-Borik asit tampon(1X) pH.8.3</b>	
Tris	10.8gr
Borik Asit	5.5gr
EDTA	0.94gr
Distile su	1000ml
<b>Yükleme Boyası</b>	
Brom fenol blue	0,25gr
Sakkaroz	40gr
Distile su	100ml
Karışım 100ml de çözülerek 0,22µm çapındaki Sartorius (Germany) membran filtreden geçirilmiştir.	
<b>Etidyum Bromit Çözeltisi</b>	
Etidyum Bromit	<b>1gr</b>
Distile su	<b>100ml</b>
Karışım 100ml de çözülerek 0,22µm çapındaki Sartorius (Germany) membrane filtreden geçirilmiştir.	
%0,7' lik agaroz jel	
Agaroz	0,7 gr
1X TBE	100ml
EtBr	4µl

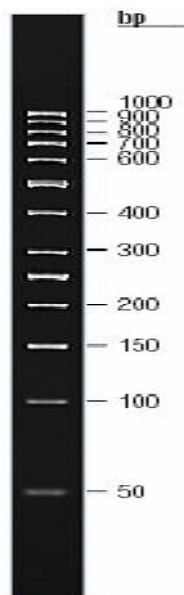
**EK3**  
**DNA ANALİZİNDE KULLANILAN**  
**MOLEKÜLER MARKÖRLER**

**DNA Ladder, Supercoiled**  
11 Supercoiled fragments, 2–16 kb  
Product Number **D5292**  
Storage Temperature  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

**Product Description**  
The Supercoiled DNA Ladder contains **11** supercoiled fragments (2,067–16,210 bp) and is suitable for use as an electrophoresis marker for supercoiled DNA.



**GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (FERMENTAS)**



## EK 4

# KROMOZOMAL (GENOMİK) DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN PROMEGA WIZARD GENOMİK DNA İSOLASYON KİTİ PROSPEKTÜSÜ



### III.G. Isolating Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria

#### Materials to Be Supplied by the User

- 1.5ml microcentrifuge tubes
- water bath, 80°C
- water bath, 37°C
- isopropanol, room temperature
- 70% ethanol, room temperature
- water bath, 65°C (optional; for rapid DNA rehydration)
- 50mM EDTA (pH 8.0) (for gram positive bacteria)
- 10mg/ml lysozyme (Sigma Cat.# L7651) (for gram positive bacteria)
- 10mg/ml lysostaphin (Sigma Cat.# L7386) (for gram positive bacteria)

1. Add 1ml of an overnight culture to a 1.5ml microcentrifuge tube.
2. Centrifuge at 13,000–16,000 × g for 2 minutes to pellet the cells. Remove the supernatant. For Gram Positive Bacteria, proceed to Step 3. For Gram Negative Bacteria go directly to Step 6.
3. Resuspend the cells thoroughly in 480µl of 50mM EDTA.
4. Add the appropriate lytic enzyme(s) to the resuspended cell pellet in a total volume of 120µl (see note in the margin), and gently pipet to mix. The purpose of this pretreatment is to weaken the cell wall so that efficient cell lysis can take place.

**Note:** For certain *Staphylococcus* species, a mixture of 60µl of 10mg/ml lysozyme and 60µl of 10mg/ml lysostaphin is required for efficient lysis. However, many Gram Positive Bacterial Strains (e.g., *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia otitidiscaviarum*, *Rhodococcus rhodochrous*, and *Brevibacterium albidum*) lyse efficiently using lysozyme alone.

5. Incubate the sample at 37°C for 30–60 minutes. Centrifuge for 2 minutes at 13,000–16,000 × g and remove the supernatant.
6. Add 600µl of Nuclei Lysis Solution. Gently pipet until the cells are resuspended.
7. Incubate at 80°C for 5 minutes to lyse the cells; then cool to room temperature.
8. Add 3µl of RNase Solution to the cell lysate. Invert the tube 2–5 times to mix.
9. Incubate at 37°C for 15–60 minutes. Cool the sample to room temperature.
10. Add 200µl of Protein Precipitation Solution to the RNase-treated cell lysate. Vortex vigorously at high speed for 20 seconds to mix the Protein Precipitation Solution with the cell lysate.
11. Incubate the sample on ice for 5 minutes.
12. Centrifuge at 13,000–16,000 × g for 3 minutes.

13. Transfer the supernatant containing the DNA to a clean 1.5ml microcentrifuge tube containing 600µl of room temperature isopropanol.  
**Note:** Some supernatant may remain in the original tube containing the protein pellet. Leave this residual liquid in the tube to avoid contaminating the DNA solution with the precipitated protein.
14. Gently mix by inversion until the thread-like strands of DNA form a visible mass.
15. Centrifuge at 13,000–16,000 × g for 2 minutes.
16. Carefully pour off the supernatant and drain the tube on clean absorbent paper. Add 600µl of room temperature 70% ethanol and gently invert the tube several times to wash the DNA pellet.
17. Centrifuge at 13,000–16,000 × g for 2 minutes. Carefully aspirate the ethanol.
18. Drain the tube on clean absorbent paper and allow the pellet to air-dry for 10–15 minutes.
19. Add 100µl of DNA Rehydration Solution to the tube and rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour. Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the DNA by incubating the solution overnight at room temperature or at 4°C.
20. Store the DNA at 2–8°C.

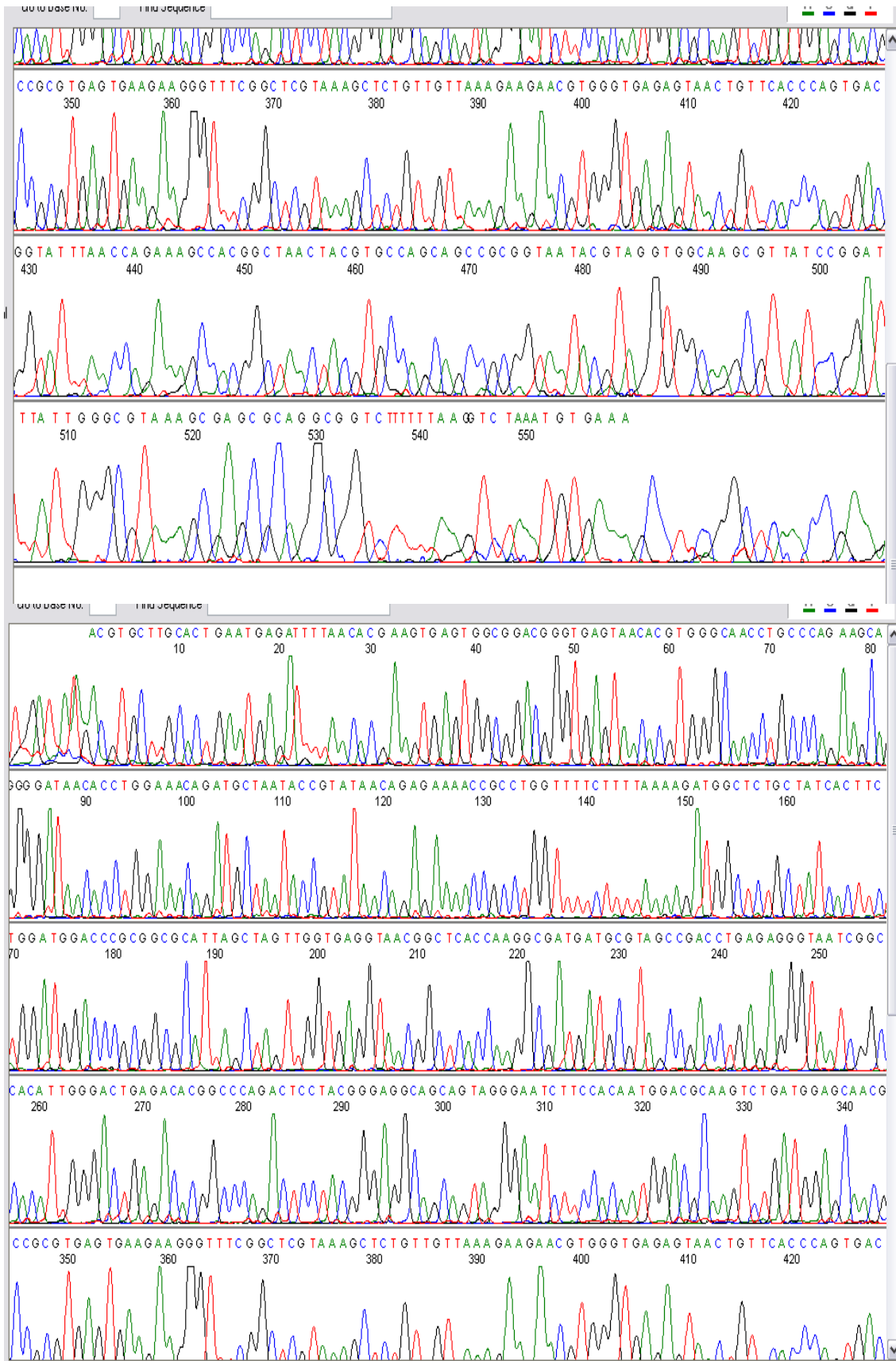
## EK 5

### 16S Dizi analiz ve BLAST sonucu

*Pediococcus acidilactici* suşunun 16S rDNA Analizi Sonucu

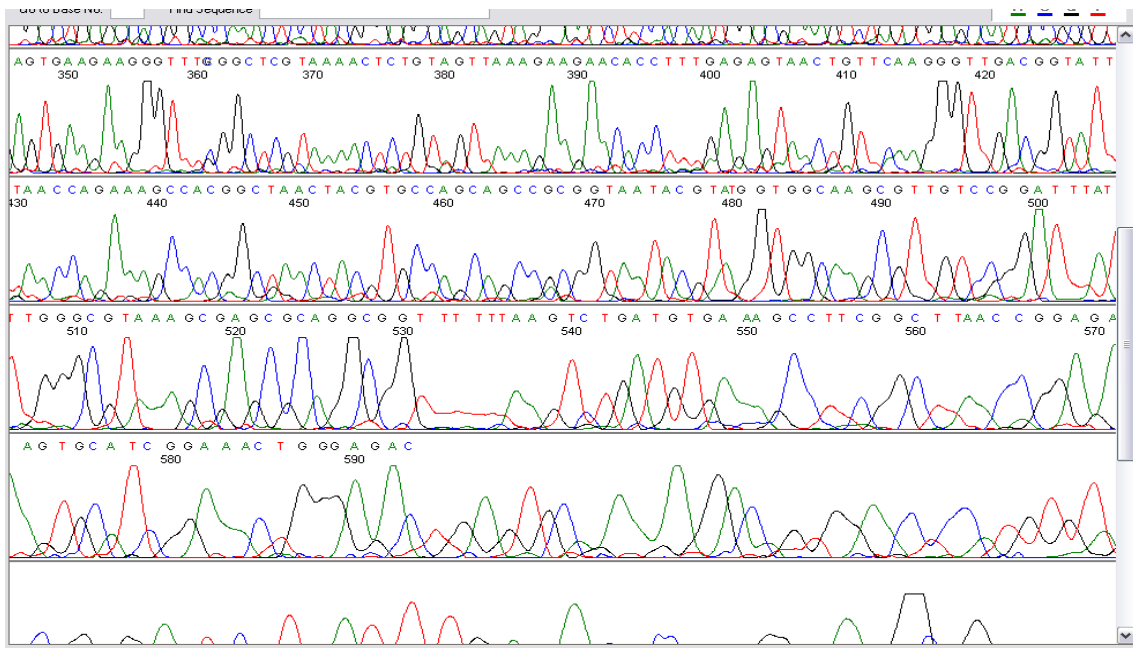
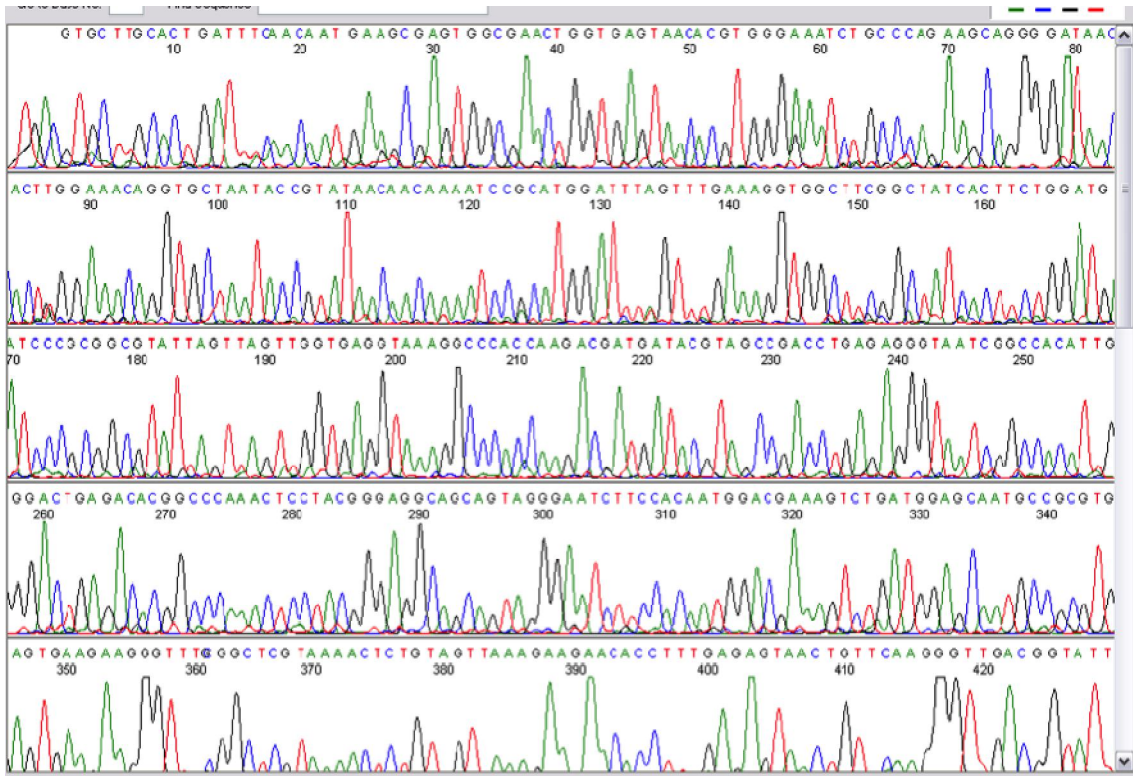
ACGTGCTTGCACTGAATGAGATTTTAAACACGAAGTGAGTGGCGGACGGGTGAG  
TAACACGTGGGCAACCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAAACAGATG  
CTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCCTGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCT  
GCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG  
CTCACCAAGGCGATGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGG  
GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA  
CAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCG  
GCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTGAGAGTAACTGTTCCACC  
CAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC  
AGGCGGTCTTTTTTAAGGTCTAAATGTGAAA





*Lactobacillus brevis* suşunun 16S rDNA Analizi Sonucu

GTGCTTGCACTGATTTCAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACG  
TGGGAAATCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATAC  
CGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTAGTTTGAAAGGTGGCTTCGGCTATC  
ACTTCTGGATGATCCCGCGGCGTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAGGCCACC  
AAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTG  
AGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATG  
GACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTGCGGCTC  
GTAAACTCTGTAGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTGTTCAAGGGTT  
GACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  
TACGTATGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG  
GCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATC  
GGAAACTGGGAGAC



Sequences producing significant alignments:

<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<b><u>Max score</u></b>	<b><u>Total score</u></b>	<b><u>Query coverage</u></b>	<b><u>E value</u></b>	<b><u>Max ident</u></b>
<a href="#">GQ222409.1</a>	Bacterium FUA 3138 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1005</a>	1005	100%	0.0	99%
<a href="#">GQ222394.1</a>	<i>Pediococcus</i> sp. FUA 3226 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1005</a>	1005	100%	0.0	99%
<a href="#">GQ222393.1</a>	<i>Pediococcus</i> sp. FUA 3137 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1005</a>	1005	100%	0.0	99%
<a href="#">GQ222392.1</a>	<i>Pediococcus</i> sp. FUA 3140 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1005</a>	1005	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ457014.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain LAB 001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1005</a>	1005	100%	0.0	99%
<a href="#">EF059987.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain UL5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1005</a>	1005	100%	0.0	99%
<a href="#">EF059986.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain UVA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1005</a>	1005	100%	0.0	99%
<a href="#">HM076835.1</a>	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_94 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">HM076781.1</a>	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">HM289340.1</a>	Uncultured bacterium clone ncd754e08c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">HM101329.1</a>	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain LBRH025 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">GU904688.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain L169 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">GU904684.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain L94 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ751795.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain DSPV 358T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ751789.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain DSPV 348T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">GQ421480.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain GL20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%

Sequences producing significant alignments:

<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<b><u>Max score</u></b>	<b><u>Total score</u></b>	<b><u>Query coverage</u></b>	<b><u>E value</u></b>	<b><u>Max ident</u></b>
<a href="#">GQ421479.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain GL16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">GQ421474.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain GL22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">GQ421473.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain GL17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ917739.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain IMAU60189 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ915729.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain IMAU10073 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ844984.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain IMAU20075 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ844982.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain IMAU20070 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ844981.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain IMAU20068 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ844959.1</a>	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain IMAU20032 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ787307.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain DSPV 006T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538593.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain 20SYCU01MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538592.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain 5S2YCU01MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538591.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain 5SYCU01MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538588.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain YFPB3BMX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538583.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CSI34MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538581.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CSI32MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538580.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CSI31MX	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%

Sequences producing significant alignments:

<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<b><u>Max score</u></b>	<b><u>Total score</u></b>	<b><u>Query coverage</u></b>	<b><u>E value</u></b>	<b><u>Max ident</u></b>
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence					
<a href="#">FJ538579.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CSI30MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538578.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CSI29MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538576.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CSI27MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538571.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain YTX20B2MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538569.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain YTX16BMX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538555.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain YXT41BMX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538511.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain 14DCCH01MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538507.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain 8D2CCH01MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538506.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain 8DCCH01MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538503.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CLM10MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538501.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CLM6MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538498.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CLM2MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538497.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CLM1MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ538496.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain 65SYCU2MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">EU689057.1</a>	[ <i>Tetragenococcus halophilus</i> ] JCM 2014 strain JCM 2014 16S ribosomal RNA gene,	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%

Sequences producing significant alignments:

<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<b><u>Max score</u></b>	<b><u>Total score</u></b>	<b><u>Query coverage</u></b>	<b><u>E value</u></b>	<b><u>Max ident</u></b>
	partial sequence					
<a href="#">EU180608.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain NS96 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">EU147316.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain BFE 8262 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">EU147315.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain BFE 8260 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">EU147314.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain BFE 8390 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">EU147313.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain BFE 8230 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">EU147312.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain BFE 8384 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">EU147311.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain BFE 8387 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">EU147310.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain BFE 8246 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">EU147309.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain BFE 8245 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">EF700094.1</a>	Uncultured Bacilli bacterium clone MS144A1_B10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">AB272369.1</a>	<i>Pediococcus</i> sp. MFC1 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: MFC1	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">AB219053.1</a>	<i>Pediococcus</i> sp. L04 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">DQ294960.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain Uga146-3 16S rRNA gene, complete sequence	<a href="#">1000</a>	1000	100%	0.0	99%
<a href="#">DQ523486.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain L200 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">998</a>	998	99%	0.0	99%
<a href="#">GU369791.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain JS-9-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">996</a>	996	99%	0.0	99%
<a href="#">GU369790.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain JS-9-4 16S	<a href="#">996</a>	996	99%	0.0	99%



Sequences producing significant alignments:

<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<b><u>Max</u> <u>score</u></b>	<b><u>Total</u> <u>score</u></b>	<b><u>Query</u> <u>coverage</u></b>	<b><u>E</u> <u>value</u></b>	<b><u>Max</u> <u>ident</u></b>
	ribosomal RNA gene, partial sequence					
<a href="#">GU369789.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain JS-9-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">996</a>	996	99%	0.0	99%
<a href="#">GU369788.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain JS-9-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">996</a>	996	99%	0.0	99%
<a href="#">FJ360445.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain YFPB7BMX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">996</a>	996	99%	0.0	99%
<a href="#">FJ538589.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain YFPB8BMX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">996</a>	996	99%	0.0	99%
<a href="#">FJ538582.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CSI33MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">996</a>	996	99%	0.0	99%
<a href="#">FJ538577.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CSI28MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">996</a>	996	99%	0.0	99%
<a href="#">FJ538502.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CLM9MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">996</a>	996	99%	0.0	99%
<a href="#">FJ538500.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CLM4MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">996</a>	996	99%	0.0	99%
<a href="#">FJ538499.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CLM3MX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">996</a>	996	99%	0.0	99%
<a href="#">HM076834.1</a>	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_93 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">994</a>	994	100%	0.0	98%
<a href="#">HM076823.1</a>	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_80 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">994</a>	994	100%	0.0	98%
<a href="#">HM076796.1</a>	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">994</a>	994	100%	0.0	98%
<a href="#">HM076785.1</a>	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">994</a>	994	100%	0.0	98%
<a href="#">HM076761.1</a>	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">994</a>	994	100%	0.0	98%



Sequences producing significant alignments:

<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<b><u>Max score</u></b>	<b><u>Total score</u></b>	<b><u>Query coverage</u></b>	<b><u>E value</u></b>	<b><u>Max ident</u></b>
<a href="#">GU369793.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain YM-1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">994</a>	994	100%	0.0	98%
<a href="#">GQ183924.1</a>	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain B-2-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">994</a>	994	100%	0.0	98%
<a href="#">GQ183911.1</a>	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain B-2-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">994</a>	994	100%	0.0	98%
<a href="#">FJ390107.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain DFR1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">994</a>	994	100%	0.0	98%
<a href="#">AF515229.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain RO17 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	<a href="#">994</a>	994	100%	0.0	98%
<a href="#">FJ915738.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain IMAU10082 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">992</a>	992	100%	0.0	98%
<a href="#">DQ294958.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain KLB67-1 16S rRNA gene, complete sequence	<a href="#">992</a>	992	100%	0.0	98%
<a href="#">EU263132.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CFR2193 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">990</a>	990	99%	0.0	98%
<a href="#">HM076816.1</a>	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_71 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">989</a>	989	100%	0.0	98%
<a href="#">HM076788.1</a>	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">989</a>	989	100%	0.0	98%
<a href="#">HM076766.1</a>	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">989</a>	989	100%	0.0	98%
<a href="#">AB362985.1</a>	<i>Pediococcus lolii</i> gene for 16S ribosomal RNA, complete sequence	<a href="#">989</a>	989	100%	0.0	98%
<a href="#">AJ305322.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> 16S rRNA gene, strain B1104	<a href="#">989</a>	989	100%	0.0	98%
<a href="#">HM076772.1</a>	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">987</a>	987	99%	0.0	98%
<a href="#">FJ915623.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain IMAU20090 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">987</a>	987	100%	0.0	98%
<a href="#">AB018213.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strainLA 3	<a href="#">987</a>	987	100%	0.0	98%

Sequences producing significant alignments:

<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<b><u>Max score</u></b>	<b><u>Total score</u></b>	<b><u>Query coverage</u></b>	<b><u>E value</u></b>	<b><u>Max ident</u></b>
<a href="#">FJ538590.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain YFPB9BMX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">985</a>	985	99%	0.0	98%
<a href="#">AB186311.1</a>	<i>Pediococcus acidilactici</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:DST 0701	<a href="#">985</a>	985	99%	0.0	98%
<a href="#">HM076822.1</a>	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_79 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">983</a>	983	100%	0.0	98%
<a href="#">HM076813.1</a>	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_68 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">983</a>	983	100%	0.0	98%
<a href="#">HM076811.1</a>	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_66 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">983</a>	983	100%	0.0	98%
<a href="#">AY587802.1</a>	Bacterium Te2R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">979</a>	979	99%	0.0	98%
<a href="#">HM067022.1</a>	<i>Lactobacillus brevis</i> strain KLDS1.0410 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">HM067021.1</a>	<i>Lactobacillus brevis</i> strain KLDS1.0409 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">HM058973.1</a>	<i>Lactobacillus brevis</i> culture-collection IMAU:80808 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">HM058761.1</a>	<i>Lactobacillus brevis</i> culture-collection IMAU:80567 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">HM058758.1</a>	<i>Lactobacillus brevis</i> culture-collection IMAU:80562 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">HM058400.1</a>	<i>Lactobacillus brevis</i> strain MGC8-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">HM058398.1</a>	<i>Lactobacillus brevis</i> strain MGC8-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">HM058385.1</a>	<i>Lactobacillus brevis</i> strain MGC5-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">HM130535.1</a>	<i>Lactobacillus brevis</i> strain Lbr-42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%

<a href="#">FN667120.1</a>	Uncultured compost bacterium partial 16S rRNA gene, clone FS1023	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">GU369768.1</a>	Lactobacillus brevis strain JS-7-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">GU369767.1</a>	Lactobacillus brevis strain JS-7-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">GU295951.1</a>	Lactobacillus brevis strain SC19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">GU132846.1</a>	Lactobacillus brevis strain VII 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">GU132845.1</a>	Lactobacillus brevis strain P4+ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">GU125543.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">GU125505.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80083 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">GU125484.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80062 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">GU125482.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80060 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">GU125423.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">GQ289390.1</a>	Lactobacillus brevis strain YJ11A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">GQ289388.1</a>	Lactobacillus brevis strain TJ3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ824740.1</a>	Lactobacillus brevis strain JH-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ532366.1</a>	Lactobacillus brevis strain JS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ227317.1</a>	Lactobacillus brevis strain b4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ227314.1</a>	Lactobacillus brevis strain bh3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">FJ227309.1</a>	Lactobacillus brevis strain bh1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">EU096227.1</a>	Lactobacillus brevis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%

<a href="#">EU194349.1</a>	Lactobacillus brevis strain ATCC 14869 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">EU626012.1</a>	Lactobacillus brevis strain KLDS 1.0727 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">EU626011.1</a>	Lactobacillus brevis strain KLDS 1.0726 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">AB362619.1</a>	Lactobacillus brevis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0138	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">EU147302.1</a>	Lactobacillus brevis strain BFE 8266 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">EF120367.1</a>	Lactobacillus brevis strain ATCC 14687 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">EU019540.1</a>	Lactobacillus brevis strain TBRA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">AB289048.1</a>	Lactobacillus brevis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: JCM 1065	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">AB289046.1</a>	Lactobacillus brevis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: JCM 1059	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">DQ974207.1</a>	Lactobacillus brevis strain BH2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">AB266535.1</a>	Lactobacillus brevis gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: FERM BP-4693	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">DQ523492.1</a>	Lactobacillus brevis strain LA122 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">AY929284.1</a>	Lactobacillus brevis strain BFE 6673 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">AY244636.1</a>	Lactobacillus brevis strain BJ G23-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1064</a>	1064	100%	0.0	99%
<a href="#">HM162416.1</a>	Lactobacillus brevis strain CGMCC_1.2028 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">HM854726.1</a>	Lactobacillus brevis strain ABRIINW-P60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">HM462421.1</a>	Lactobacillus brevis strain Chr-I-str17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">HM067020.1</a>	Lactobacillus brevis strain KLDS1.0408 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">HM104306.1</a>	Lactobacillus brevis strain 0945 16S	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%

ribosomal RNA gene, partial sequence

<a href="#">FN667286.1</a>	Uncultured compost bacterium partial 16S rRNA gene, clone FS1994	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">HM018707.1</a>	Lactobacillus brevis strain C36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">HM018706.1</a>	Lactobacillus brevis strain C23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">HM018704.1</a>	Lactobacillus brevis strain B79 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">HM018703.1</a>	Lactobacillus brevis strain B72 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">HM018701.1</a>	Lactobacillus brevis strain B63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">HM018699.1</a>	Lactobacillus brevis strain B47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">HM018698.1</a>	Lactobacillus brevis strain B43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">HM018696.1</a>	Lactobacillus brevis strain B19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU358409.1</a>	Lactobacillus brevis strain JM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU220024.1</a>	Lactobacillus brevis strain SC2A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU138534.1</a>	Lactobacillus brevis IMAU:10206 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU138509.1</a>	Lactobacillus brevis IMAU:10181 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125595.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80175 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125592.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80172 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125584.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80164 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125562.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80140 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125561.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80139 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125560.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80138	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%

16S ribosomal RNA gene, partial sequence

<a href="#">GU125558.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80136 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125557.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80135 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125545.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80123 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125511.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80089 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125504.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80082 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125503.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80081 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125502.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80080 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125491.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80069 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125489.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80067 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125477.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80055 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125444.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125441.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80019 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GU125430.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU80008 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">FJ982851.1</a>	Uncultured Lactobacillus sp. clone OHW13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GQ289391.1</a>	Lactobacillus brevis strain YJ11B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GQ289389.1</a>	Lactobacillus brevis strain YJ10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GQ131198.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU70082 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GQ131197.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU70081 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GQ131195.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU70079	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%

	16S ribosomal RNA gene, partial sequence					
<a href="#">GQ131141.1</a>	Lactobacillus brevis strain IMAU70025 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">GQ072001.1</a>	Uncultured bacterium clone nbw191a02c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">FJ532365.1</a>	Lactobacillus farciminis strain SC21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">FJ532364.1</a>	Lactobacillus brevis strain SC13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">FJ476121.1</a>	Lactobacillus brevis strain TJ5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">FJ405226.1</a>	Lactobacillus brevis strain ZJ2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">FJ227316.1</a>	Lactobacillus brevis strain b3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">FJ227311.1</a>	Lactobacillus brevis strain bh7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">FJ227308.1</a>	Lactobacillus brevis strain b1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">1059</a>	1059	100%	0.0	98%
<a href="#">AJ422044.1</a>	Lactobacillus brevis partial 16S rRNA gene, strain ACA-DC 3401	<a href="#">1057</a>	1057	100%	0.0	98%
<a href="#">AJ422043.1</a>	Lactobacillus brevis partial 16S rRNA gene, strain ACA-DC 3368	<a href="#">1057</a>	1057	100%	0.0	98%
<a href="#">AJ422041.1</a>	Lactobacillus brevis partial 16S rRNA gene, strain ACA-DC 3406	<a href="#">1057</a>	1057	100%	0.0	98%
<a href="#">AJ422040.1</a>	Lactobacillus brevis partial 16S rRNA gene, strain ACA-DC 3416	<a href="#">1057</a>	1057	100%	0.0	98%
<a href="#">AB494718.1</a>	Lactobacillus brevis gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: KF23	<a href="#">1055</a>	1055	100%	0.0	98%

## ÖZGEÇMİŞ

Feriba TURHAN ERYILMAZ  
Mutluköy Sitesi 12.Blok No:10 Ümitköy/ Ankara

Cep: (532) 767 33 11

feribaturhan@yahoo.com

### KİŞİSEL BİLGİLER

Uyruğu : T.C.

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : Ağustos 1981

### EĞİTİM DURUMU

- 2007 - ---- : Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji  
Doktora, Ankara
- 2004 - 2006 :Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji & Embriyoloji  
Anabilim Dalı, Yüksek Lisans, Ankara
- 2000 - 2004 : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara
- 1987 - 1999 : Özel Türkmen Lisesi, Mersin

### İŞ DURUMU

- 2010-..... : Ankara Özel Güven Hastanesi, Ankara, Tüp Bebek Laboratuvar  
Sorumlusu
- 2004 - 2010 : Gen-Art Kadın Sağlığı ve Üreme Biyoteknolojisi Merkezi,  
Ankara, Androloji ve embriyoloji laboratuvarında embriyolog.
- 01/02/2003- 02/03/2004 : Mersin Devlet Hastanesi

Stajyer – Mikrobiyoloji Laboratuvarı



2003 – 2004 : Gen-Art Kadın Sağlığı ve Üreme Biyoteknolojisi Merkezi  
Stajyer – Androloji Laboratuvarı, Embriyoloji Laboratuvarı

### **KATILINAN SEMİNERLER ve PROJELER**

2010 : TSRM kongresi- Antalya  
2009 : American Society of Repreductive Medicine kongresi- Amerika  
2008 : Sis Medikal – Vitrifikasyon kursu- Antalya  
2008 : TSRM kongresi- Antalya  
2008 : ESHRE kongresi- İspanya  
2008 : REGPOT-2008 Projesine yazım ve katılımcı görevi- Ankara  
2007 : Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü tarafından verilen ICSI sertifikası- Ankara  
2006 : XII. Tivak Üreme Tıbbi ve İnfertilite Kongresi, konuşmacı- Ankara  
2005 : Gazi Tıp Fakültesi - Menstrüel döngüde sıçan uterus yapısındaki elektron mikroskopik değişiklikler adlı proje sahibi- Ankara  
2005 : Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü tarafından verilen embriyoloji laboratuvarında çalışma yeterliliği sertifikası- Ankara  
2005 : Irvine Scientific' s Vitrification System Hands- On Workshop Training- Ankara  
2004 : In-Vitro Seminerleri 2- İstanbul  
2003 : Ankara Üniversitesi Biyoloji Sergisi- Ankara

### **YABANCI DİL**

İngilizce: İleri seviyede

### **BİLDİRİLER**

- The effectiveness of intracytoplasmic sperm injection combined with piezoelectric stimulation in infertile couples with total fertilization failure.

Baltacı V, Ayvaz OU, Ünsal E, Aktaş Y, Baltacı A, Turhan F, Özcan S, Sönmezer M.  
Fertil Steril. 2009 May 20.

- Preimplantation Genetic Diagnosis for Leigh

Ünsal E., Aktaş Y., Ayvaz Ö., Baltacı A., Özcan S., Turhan F., Baltacı V.

TSRM kongresi 2008. Poster olarak sergilendi.

- Successful application of preimplantation genetic diagnosis for Leigh syndrome.

Ünsal E, Aktaş Y, Uner O, Baltacı A, Özcan S, Turhan F, Baltacı V.

Fertil Steril. 2008 Nov;90.

- Menstrüel döngüde sıçan uterus yapısındaki elektron mikroskopik değişiklikler

Deniz Erdoğan, Feriba Turhan, Gülnur Take ve Yeşim Bardakçı

Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Biyolojik Bilimler 29 Ağustos 2007 Poster olarak sergilendi.

- Relationship Between Embryo Quality and Aneuploidies

Şatıroğlu H., Baltacı V., Kabukçu C., Ünsal E., Aydınuraz B., Üner Ö., Aktaş Y.,  
Turhan

F., Aktan A.

A. Reproductive BioMedicine Online, Vol 12. No 1. 2006 69-74.

- Relationship Between Embryo Quality and Aneuploidies

Şatıroğlu H., Baltacı V., Kabukçu C., Ünsal E., Aydınuraz B., Üner Ö., Aktaş Y.,  
Turhan F.

2004 PGD London kongresinde poster olarak sergilendi.

- A Simplified Blastomere Fixation Protocol For PGD Applications

Şatıroğlu H., Baltacı V., Kabukçu C., Ünsal E., Aydınuraz B., Üner Ö., Aktaş Y.,  
Turhan F.

2004 PGD London kongresinde poster olarak sergilendi.