

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Hande ORAL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2015**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

06.02.2015

Hande ORAL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Hande ORAL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. ÖZLEM OSMANAĞAOĞLU

Bu çalışmada, fermente gıdalardan, yeni doğan bebek gaitasından ve vajinal sekresyondan olmak üzere farklı kaynaklardan izole edilen 40 adet izolat kısmi karakterizasyonunun ardından rastgele primerlerin kullanımı ile RAPD PZR işlemine tabi tutulmuştur. RAPD profilleri farklılık gösteren gram pozitif ve katalaz negatif özellikteki isolatlar 16S rDNA bölgeleri PZR ile çoğaltılıp, ürünlerin saflaştırılması sonrasında 16S rDNA dizi analizleri yapılmıştır. Dizi analiz sonuçlarına göre toplamda 12 adet farklı laktik asit bakterisi (LAB) tanımlanmıştır. Bu LAB'leri; *Lactococcus lactis* OZH1, *Pediococcus pentosaceus* OZH2, *Lactobacillus sakei* OZH3, *Lactobacillus fermentum* OZH4, *Lactobacillus delbrueckii* OZH5, *Enterococcus faecalis* OZH6, *Enterococcus faecium* OZH7, *Lactobacillus plantarum* OZH8, *Lactobacillus sakei* OZH9, *Lactobacillus brevis* OZH10, *Pediococcus acidilactici* OZH11 ve *Lactobacillus helveticus* OZH12 olarak tanımlanmış ve adlandırılmıştır. Yalnızca OZH2 suşu bakteriyosin üreticisidir. Bu 12 adet suş ve *Lactobacillus plantarum* suşu probiyotik özellikleri araştırılmak üzere; antibiyotik duyarlılıkları, düşük pH ve pepsine karşı direnç özellikleri, pankreatin ve safra tuzuna direnç özellikleri ve de hemolitik aktiviteleri bakımından testlere tabi tutulmuştur. Tüm bu testlerin sonucunda EFSA tarafından belirlenmiş probiyotik kriterlere uygun olan uygun antibiyotik direnç aralığında, düşük pH ve pepsine, pankreatine ve safra tuzuna dirençli olan ve de γ -hemolitik aktivite özelliği gösteren suşlar olarak OZH3 ve OZH8 suşları seçilmiştir. Bu iki suş in vivo ortamda gastrointestinal sistemden (GİS) transitlerinin araştırılıp canlılıklarını koruyarak uygun oranlarda geçişlerinin saptanmasının ardından probiyotik olma yolunda gelecek vaad eden suşlar olarak belirlenmiştir.

Şubat 2015, 72 sayfa

Anahtar Kelimeler: Probiyotik, laktik asit bakterileri, seçim kriterleri, suş direnci

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINING SOME PROBIOTIC PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM DIFFERENT SOURCES

Hande ORAL

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

In this study, 40 isolates that isolated from different sources which as fermented food, newborn faeces and vaginal secretions were subjected to RAPD PCR process with use of random primers after their partial characterization. 16S rDNA sequence analysis of the isolates showing differences in RAPD profiles and have gram positive and catalase negative properties were performed after PCR amplification of the 16S rDNA region and purification of the product. A total of 12 different lactic acid bacteria (LAB) were identified according to the sequence analysis results. These LABs were defined and named as *Lactococcus lactis* OZH1, *Pediococcus pentosaceus* OZH2, *Lactobacillus sakei* OZH3, *Lactobacillus fermentum* OZH4, *Lactobacillus delbrueckii* OZH5, *Enterococcus faecalis* OZH6, *Enterococcus faecium* OZH7, *Lactobacillus plantarum* OZH8, *Lactobacillus sakei* OZH9, *Lactobacillus brevis* OZH10, *Pediococcus acidilactici* OZH11 and *Lactobacillus helveticus* OZH12. OZH2 strain is the only bacteriocin producer among them. These 12 strain and *Lactobacillus plantarum* strain have been subjected to tests for their antibiotic sensitivity, resistance to low pH and pepsin properties, pancreatin and bile salt resistance characteristics and hemolytic activity to investigate their probiotic properties. As a result of these tests, OZH3 and OZH8 strains were selected as showing the properties that appropriate antibiotic resistance range, resistant to low pH, pepsin, pancreatin and bile salt and γ -hemolytic activity which is determined by EFSA in accordance with the probiotic criteria. These two strains were identified as promising to be probiotic strains upon investigation of transition from gastrointestinal interventions and determination of the passage in the appropriate proportions maintaining the viability *in vivo* conditions.

February 2015, 72 pages

Key Words: Probiotic, lactic acid bacteria, selection criteria, strain resistance

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında gerek bilimsel anlamda gerekse hayata dair hiçbir bilgi ve deneyimini benden esirgemeyen ve bana rehberlik eden, manevi desteği ile de her an yanımda olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU' na, (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı)

Tezimin savunmasında jüri üyesi olarak tezimi değerlendiren ve katkıda bulunan sayın hocalarım Prof. Dr. Ender YARSAN (Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı) ve Doç. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY' a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Çalışmalarında bilgilerini, yardımlarını ve gülyüzlerini hiçbir zaman esirgemeyen sayın Dr. Fadime KIRAN ve Araş. Gör. Harun ÖNLÜ'ye, Mikrobiyal Genetik Laboratuvarında birlikte çalıştığımız uzun çalışma saatlerinde dostluğunu ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim arkadaşım Mohamed MOKRANI' ye,

Her koşulda yanımda olan, sonsuz bir sabır ile her konuda beni destekleyen, yüreklendiren ve motive eden bütün değerli dostlarım ve arkadaşlarıma,

Beni olduğum kişi yapan, bugüne kadar her anımda yanımda olan, desteklerini, güvenlerini, emeklerini ve en önemlisi sevgilerini hep üzerimde hissettiğim, bu yolda ve hayatım boyunca benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, benimle gülen, ağlayan, zor zamanlarımda sabır ve özverilerini eksik etmeyen ve bana doğru yolu gösterip başarıya ulaşmamda her an destekçim olan, varlıklarından güç bulduğum sevgili annem Asuman ORAL, babam Süleyman ORAL ve abim Hakan ORAL' a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hande ORAL

Ankara, Şubat 2015

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Probiyotik Bakteriler.....	3
2.1.1 Probiyotiklerin tanımı ve tarihçesi.....	3
2.1.2 Probiyotiklerin güvenilirlik ve seçim kriterleri.....	5
2.1.3 Probiyotiklerin yararlı etkileri.....	7
2.1.4 Probiyotiklerin etki mekanizması.....	10
2.1.5 Probiyotiklerin kullanım alanları.....	12
2.2 Prebiyotikler.....	13
2.3 Fonksiyonel Gıdalar.....	14
2.4 İntestinal Mikroflora.....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1 Materyal.....	17
3.1.1 Bakteriler.....	17
3.1.2 Bakteri kültürlerinin aktivasyonları.....	17
3.1.3 Bakteri kültürlerinin saklanması.....	18
3.1.4 Tamponlar ve çözeltiler.....	18
3.1.5 Çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu.....	18
3.1.6 Moleküler markörler.....	18
3.1.7 Deney hayvanlarının temini.....	18
3.2 Yöntem.....	19
3.2.1 Farklı kaynaklardan örneklerin toplanması.....	19

3.2.2 Farklı kaynaklardan bakterilerin izolasyonu.....	19
3.2.3 İzolatların karakterizasyonu.....	19
3.2.3.1 İzolatların kısmi karakterizasyonu.....	19
3.2.3.1.1 Basit boyama.....	20
3.2.3.1.2 Gram boyama.....	20
3.2.3.1.3 Katalaz testi.....	20
3.2.3.2 İzolatların genotipik karakterizasyonu.....	21
3.2.3.2.1 Genomik DNA izolasyonu.....	21
3.2.3.2.2 Saflık ve miktar tayini.....	22
3.2.3.2.3 Agaroz jel elektroforezi.....	22
3.2.3.2.4 İzolatların RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNAs) PZR profillerinin belirlenmesi.....	23
3.2.3.2.5 İzolatların 16S rDNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyonu.....	23
3.2.3.2.5.1 16S rDNA bölgesinin PZR ile çoğaltılması.....	24
3.2.3.2.5.2 16S rDNA PZR ürününün agaroz jelden alınarak saflaştırılması.....	24
3.2.3.2.5.3 16S rDNA dizi analizi.....	25
3.2.4 Suşların bakteriyosin üretim özelliklerinin belirlenmesi.....	25
3.2.5 İzole edilen LAB suşlarının bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi.....	26
3.2.5.1 İzole edilen LAB suşlarının probiyotik özelliklerinin in vitro koşullarda belirlenmesi.....	26
3.2.5.1.1 Suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi.....	26
3.2.5.1.2 Suşların düşük pH değerlerine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi.....	27
3.2.5.1.3 Suşların pepsine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi.....	27
3.2.5.1.4 Suşların pankreatine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi.....	28
3.2.5.1.5 Suşların safra tuzuna karşı direnç özelliğinin belirlenmesi.....	28
3.2.5.1.6 Suşların hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi.....	28
3.2.5.2 Suşların in vivo koşullarda gastrointestinal sistemden canlılığını koruyarak geçişinin belirlenmesi.....	29
3.2.6 İstatistiksel analizler.....	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	31
4.1 Farklı Kaynaklardan Bakterilerin İzolasyonu.....	31

4.2 İzolatların Karakterizasyonu.....	33
4.2.1 İzolatların kısmi karakterizasyonu.....	33
4.2.2 İzolatların genotipik karakterizasyonu.....	34
4.2.2.1 İzolatların RAPD PZR profilleri.....	34
4.2.2.2 İzolatların 16S rDNA dizi analizi.....	38
4.3 Suşların Bakteriyosin Üretim Özellikleri.....	41
4.4 Farklı Kaynaklardan İzole Edilen LAB Suşlarının Bazı Probiyotik Özellikleri.....	42
4.4.1 LAB suşlarının probiyotik özelliklerinin in vitro koşullarda belirlenmesi.....	42
4.4.1.1 Suşların antibiyotik duyarlılıkları.....	42
4.4.1.2 Suşların düşük pH değerlerine karşı direnç özellikleri.....	43
4.4.1.3 Suşların pepsine karşı direnç özellikleri.....	44
4.4.1.4 Suşların pankreatine karşı direnç özellikleri.....	45
4.4.1.5 Suşların safra tuzuna karşı direnç özellikleri.....	45
4.4.1.6 Suşların hemolitik aktiviteleri.....	46
4.4.2 Suşların in vivo koşullarda gastrointestinal sistemden canlılığını koruyarak geçişinin belirlenmesi.....	46
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	48
KAYNAKLAR.....	53
EKLER.....	65
EK 1 Besiyerleri.....	66
EK 2 Tampon ve çözeltiler.....	67
EK 3 Moleküler markör.....	69
EK 4 Etik kurul kararı ve Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	72

SİMGELER DİZİNİ

g	Gram
kb	Kilobaz
L	Litre
log	Logaritma
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
pH	Hidrojen konsantrasyonunun logaritması
rpm	Dakikada Devir Sayısı
sn	Saniye
UV	Ultra viyole
V	Volt
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikromolar
$^{\circ}$ C	Santigrat (Celcius) derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

bç	Baz çifti
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
EFSA	European Food Safety AuthorityAvrupa (Gıda Güvenliği Otoritesi)
EtBr	Etidyum Bromit
FAO	Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
GİS	Gastrointestinal Sistem

GRAS	Generally Recognized as Safe (Genellikle Güvenli Kabul Edilen)
kob	Koloni oluşturan birim (cfu)
LAB	Laktik asit bakterileri
PBS	Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rDNA	Ribozomal DNA
RNA	Ribonükleik Asit
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 Gram boyama yapılmış S3 (a) ve PN2 (b) izolatlarının ışık mikroskopunda görüntüleri.....	34
Şekil 4.2 OPA1 primeri ile yapılan RAPD PZR jel görüntüsü.....	35
Şekil 4.3 OPA7 primeri ile yapılan RAPD PZR jel görüntüsü.....	36
Şekil 4.4 OPA8 primeri ile yapılan RAPD PZR jel görüntüsü.....	37
Şekil 4.5 OPA16 primeri ile yapılan RAPD PZR jel görüntüsü.....	38
Şekil 4.6 PZR ile çoğaltılmış 16S rDNA bölgelerinin saflaştırılmadan önce jel görüntüsü.....	39
Şekil 4.7 Saflaştırılmış 16S rDNA bölgeleri.....	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 İzolatlara verilen kodlar ve izolasyon kaynakları.....	32
Çizelge 4.2 İzolatların kısmi karakterizasyon sonuçları.....	33
Çizelge 4.3 İzolatların 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre gerçekleştirilen tanısı ve verilen suş adları.....	41

1. GİRİŞ

Probiyotikler, yeterli miktarlarda tüketildiğinde konak üzerinde olumlu etkiler oluşturan canlı mikroorganizmalardır (Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü Çalışma Grubu Gıda ve Tarım Örgütü). Probiyotik özelliklere sahip bir çok mikrobiyal tür vardır. Ancak en yaygın olarak kullanılan laktobasiller ve bifidobakterlerdir (Daly ve Davis 1998, Salminen vd. 1998, Caplice ve Fitzgerald 1999, Saarela vd. 2002, Leroy ve De Vuyst 2004).

Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin (LAB) sağlığa yararlı olduğu inancıyla fermente ürünlerde kullanımı yüzlerce yıl öncesine dayanmaktadır. Yirminci yüzyılın başlarında Elie Metchnikoff, probiyotik olarak kullanılan LAB'leri üzerinde ilk çalışmaları gerçekleştirmiştir. Probiyotik bakterilerden *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Enterococcus*, ayrıca bir maya olan *Saccharomyces cerevisia* gıdalara ilave edilen mikroorganizmalardır. Gıdalarda tüketilmelerini takiben normal floranın bir parçası olan bu mikroorganizmaların sayısı normal flora içerisinde hızla artmıştır. Bundan dolayı güvenli olarak kabul edilmişlerdir. Ayrıca probiyotiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri birçok hayvan modeli çalışmada ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir (Federico vd. 2010).

LAB gastrointestinal sistem (GIS) florasında doğal olarak bulunmaktadır ve bu özellikleri probiyotik olarak kullanılmalarında avantaj sağlamaktadır. Bununla birlikte, ürettiği antimikrobiyal maddeler, intestinal mukozaya tutunma becerileri, biyolojik aminleri üretmemeleri, antibiyotik duyarlılıkları ve mevcut pankreatik enzimleri tolere edebilme yetenekleri güvenilir probiyotikler olarak kullanılmalarına olanak sağlamaktadır (Rubio vd. 2013). Probiyotiklerin olumlu etkilerini sergileyebilmeleri için GIS'e ulaşan canlı bakteri sayısının yaklaşık 10^8 - 10^9 kob olması gerekmektedir. Probiyotik süşun GIS'e canlı bir şekilde ulaşabilmesi için mevcut mide asidi, pankreatik enzimler ve olumsuz çevre koşullarına dirençli olması gerekmektedir. Ayrıca bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kabul edilebilmesi için probiyotik seçim kriterlerine (patojenik olmaması, genetik olarak kararlı olması, immünomodülatör etkilere sahip olması, GIS ortam şartlarına dirençli olması, fermentasyon aşamalarındaki

işlemlere ve raf ömrü süresince bulunduğu saklama koşullarına dayanıklı olması gibi) sahip olması gerekmektedir. LAB doğal olarak GIS florasında bulunduğundan ve uzun yıllardır güvenli bir şekilde fermente gıdaların üretiminde kullanıldıklarından en iyi probiyotik adayları olarak kabul edilmektedirler (Saarela vd. 2000, Vizoso-Pinto vd. 2006). Günümüzde birçok LAB suşu probiyotik olarak tanımlanmış ve kullanılıyor olmasına rağmen ticari amaçlara uygun mikroorganizmaların doğal kaynaklardan izolasyonu yeni ve daha etkin probiyotiklerin elde edilmesi için en güçlü araçlardan biridir. Bu nedenle doğal nitelikli yeni ve etkin probiyotik suşların izolasyonu daima önem arz etmektedir.

Bu çalışmada farklı kaynaklardan (fermente gıda ürünleri, yeni doğan bebek gaitası, vajinal sekresyon) laktik asit bakterileri izole edilerek bu bakteriler tanımlanmıştır. Suş düzeyinde tanımlanan bakterilerin probiyotik seçim kriterlerine uygunlukları ve bazı probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda probiyotik kriterlere uygun olduğu belirlenen ve bazı probiyotik özellikleri taşıdığı düşünülen *Lactobacillus sakei* OZH3 ve *Lactobacillus plantarum* OZH8 suşlarının GIS'den canlı olarak geçişleri (transit) belirlenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Probiyotik Bakteriler

2.1.1 Probiyotiklerin tanımı ve tarihçesi

Patojen bakterilerin vermiş olduğu zararlı etkilerden dolayı hastalıklara neden olduğu yıllardır kabul edilen bir görüş haline gelmiştir. Bununla beraber, günümüzde mikroorganizmaların diğer mikroorganizmalarla antagonistik ilişkisinin anlaşılmasına dair yapılan çalışmaların artması sonucunda bazı hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde antagonistik etkiye sahip mikroorganizmaların kullanılabilmesi düşünülmüştür. Bu nedenle doğal olan probiyotikler üzerinde yapılan çalışmalara da aynı oranda ilgi artmaya başlamıştır (Kopp-Hoolihan 2001, Ouwehand vd. 2002, Broussard ve Surawicz 2004, Vanderhoof ve Young 2005, Floch ve Montrose 2005).

‘Probiyotik’ terimi 1960’larda tanıtılmıştır. Probiyotik kelimesi Latince “pro” ve “bios” kelimelerinden türetilmiş ve “yaşam için” anlamına gelmekte olup uzun yıllardır kullanılan bir kelimedir (Gomes ve Malcata 1999) ve antibiyotik teriminin anlamca karşıtıdır.

İlk olarak “probiyotik” terimi Nobel ödüllü araştırmacı Elie Metchnikoff’ un çalışmaları sonucunda dile getirilmiştir. 19. yy. başlarında Metchnikoff Bulgar köylülerinin uzun yaşamlarının kullanmış oldukları fermente süt ürünlerine bağlamış ve belirli bakteri türlerinin gastrointestinal sistemde olumlu etkilere neden olabileceği teorisini ileri sürmüştür. (Kopp-Hoolihan 2001, Sanders 2003). 1954 yılında Ferdinand Vergin tarafından “Anti- und Probiotika” adlı makalesinde “probiyotik” terimini kullanılmıştır. 1965 yılında ise Lilly ve Stillwell probiyotikleri mikroorganizmalar tarafından üretilen büyümeyi teşvik ve stimüle edici olarak tanımlamışlardır.

Fuller 1989 yılında, probiyotik terimini daha kabul gören bir hale getirmiş ve probiyotiklerin bireylerin intestinal mikroflorasını koruyan canlı mikrobiyal gıda içerikleri olarak tanımlamıştır (Fuller 1989). FAO ve WHO ise 2002 yılında

probiyotikleri, uygun miktarlarda alındıklarında konukçu sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlamışlardır ve aynı zamanda bunların GRAS (genel olarak güvenli bilinen) sistemine uygun olması gerektiğini bildirmişlerdir. Günümüzde ise probiyotikler insan ve hayvan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan gıda, yem ya da gıda katkı maddelerine ilave edilen canlı mikrobiyal preparatlar olarak tanımlanmaktadır. Probiyotiklerin bağırsak mukozasında tutunma bölgeleri için rekabet ederek patojen mikroorganizmaların epitel hücrelerine tutunmasını engellemeleri, bakteriyosin olarak bilinen antimikrobiyal maddeler üretmeleri ve sindirim için gerekli bazı enzimleri salgılayarak sindirime yardımcı olmaları ayrı bir özellikleridir (Bengmark vd. 2003).

Probiyotik bakteriler farklı maya ve bakteriyel suşları içermektedir. Günümüzde birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmaktadır. Probiyotik olarak kullanılan organizmalar içerisinde en önemli grubu LAB oluşturmaktadır (Schaafsma 1996). LAB'nin çok uzun yıllardan beri fermente gıdaların üretiminde kullanılması ve bu gıdalarla birlikte tüketilmesi LAB'nin GRAS kabul edilmesini sağlamıştır (Caplice ve Ray 1992, Wood ve Holzapfel 1995, Wood 1997, Fitzgerald 1999, Abriouel vd. 2012). LAB grubu lactobasil, lökonostok, pediokok, streptokok, laktokok ve bifidobakteri gibi cinsleri içermektedir. LAB gastrointestinal sistem (GİS) florasında doğal olarak bulunmaktadır ve bu özellikleri probiyotik olarak kullanılmalarında avantaj sağlamaktadır. Bununla birlikte, üretmiş oldukları antimikrobiyal maddeler, intestinal mukozaya tutunma becerileri, biyolojik aminleri üretmemeleri, antibiyotik duyarlılıkları ve mevcut pankreatik enzimleri tolere edebilme yetenekleri güvenilir probiyotikler olarak kullanılmalarına olanak sağlamaktadır (Rubio vd. 2013). 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. 1991).

LAB gastrointestinal sistem (GİS) florasında doğal olarak bulunmaktadır ve bu özellikleri probiyotik olarak kullanılmalarında avantaj sağlamaktadır. Bununla birlikte,

üretmiş oldukları antimikrobiyal maddeler, intestinal mukozaya tutunma becerileri, biyolojik aminleri üretmemeleri, antibiyotik duyarlılıkları ve mevcut pankreatik enzimleri tolere edebilme yetenekleri güvenilir probiyotikler olarak kullanılmalarına olanak sağlamaktadır (Rubio vd. 2013).

2.1.2 Probiyotiklerin güvenilirlik ve seçim kriterleri

Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmalarda bazı özellikler aranmaktadır. Güvenilir olmalı, kullanıldığı insan ve hayvanda yan etki oluşturmamalıdır. Probiyotik bir mikroorganizmanın tanımı için zorunlu kriterler LABIP (Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu) tarafından belirlenmiştir (Guarner ve Schaafsma 1998, Ewaschuk ve Dieleman 2006). Buna göre probiyotik potansiyeli taşıyan mikroorganizmalar:

- 1) İnsan orjinli olmalıdır.
- 2) Patojen ve toksijenik özellik içermemelidir.
- 3) Gastrik asit ve safra tuzuna direnç göstermelidir.
- 4) Bağırsak epitel dokularına tutunmalıdır.
- 5) Gastrointestinal sistemde olsa sürekliliğini devam ettirebilmelidir.
- 6) Antimikrobiyel bileşikler üretebilmelidir.
- 7) İmmünomodülatör etkilere sahip olmalıdır.
- 8) Metabolik etki kabiliyeti olmalıdır (kolesterol asimilasyonu, laktaz aktivitesi, vitamin üretimi).
- 9) Patojenlerin reseptörlere tutunmasına engel olmalıdır.
- 10) Genetik olarak kararlı mikroorganizmalar olmalıdır.
- 11) Teknolojik süreçlere direnç göstermelidir.

Ayrıca probiyotiklerde gıda alerjilerine ve patojenlere karşı immün sistemi güçlendirmesi, aktarılabılır antibiyotik direnç genlerine sahip olmaması ve daha sayılmayan benzer pek çok özellik de aranmaktadır. Probiyotik suşların seçiminde dikkat edilmesi gereken önemli kriter ise kullanılacak suşun canlı formda hazırlanabilmesi ve gastrointestinal sisteme ulaşana kadar karşılaşmış olduğu koşullar

altında canlılığını devam ettirebilmesidir. Kullanılacak suş, gıdalarda ve klinikte kullanılması açısından güvenilir olmalı, intestinal ekosisteme canlı olarak ulaşabilmeli, canlılığını devam ettirmeli, stabilitesini korumalı ve antimikrobiyal maddeler üretebilmeli ayrıca klinik olarak doğrulanmış ve belgelenmiş sağlık üzerinde olumlu etkiler gösterebilmelidir. Probiyotik suşların insan kökenli olmalarının önemi son zamanlarda tartışma konusu olmuştur. Ancak en güncel başarılı probiyotik suşların insan kaynaklı olduğu belirtilmiştir. LAB doğal olarak GİS florasında bulunduğundan ve uzun yıllardır güvenli bir şekilde fermente gıdaların üretiminde kullanıldıklarından en iyi probiyotik adayları olarak kabul edilmektedirler (Saarela vd. 2000, Vizoso-Pinto vd. 2006). Günümüzde birçok LAB suşu probiyotik olarak tanımlanmış ve kullanılıyor olmasına rağmen ticari amaçlara uygun mikroorganizmaların doğal kaynaklardan izolasyonu yeni ve daha etkin probiyotiklerin elde edilmesi için en güçlü araçlardan biridir. Bu nedenle doğal nitelikli yeni ve etkin probiyotik suşların izolasyonu daima önem arz etmektedir. Pek çok farklı kaynaktan laktik asit bakterisi izole edilebilir. Farklı kaynaklar, farklı profilde mikrobiyotalara sahiptir. Yani farklı kaynaklardan farklı türde laktik asit bakterileri izole edilebilir. Fermente gıda ürünlerinde genellikle laktokok, laktobasil, pediokok, streptokok ve lökonostok cinsilerine ait laktik asit bakterileri bulunurken klinik izolatlar ve gaita örneklerinde daha çok enterekoklar, laktobasiller ve bifidobakteriler bulunmaktadır. Ayrıca probiyotik olarak kabul edilen *Saccharomyces* mayalı ekmek ve alkollü içkilerde, *Aspergillus* ise soya sosunda bulunmaktadır.

Farklı kaynaklardan izole edilen LAB'lerinin probiyotik olarak adlandırılabilmesi için, suşların tanımlanmasının hemen sonrasında bahsedilen belirlenmiş probiyotik seçim kriterlerine sahip olup olmadıklarının belirlenmesi amacıyla farklı testlere (in vitro ve in vivo testler, hayvan deneyleri ve GRAS olarak belirlendikten sonra gönüllülerde insan çalışmaları) tabi tutulurlar.

Probiyotik ürün oluşturmak amacıyla yeni cins ve türlerin seçiminde FHO/WHO tarafından önerilen, uyulması zorunlu güvenlik kriterlerine dikkat edilmesi gerekmektedir. Güvenilir bir probiyotik seçiminde en önemli kriter, susun tanımlanmış olmasıdır. Bu amaçla DNA-DNA hibridizasyonu veya 16S rRNA dizi analiz teknikleri

yaygın olarak kullanılmaktadır. Probiyotik özellik gösteren bir bakteri, patojen suslara da sahip bir türün üyesi ise detaylı bir klinik tanının yapılması gerekmektedir. Dikkat edilmesi gereken bir diğer güvenlik kriteri de, antibiyotik direnç genlerini taşıyıp aktarabilen ve intestinal sistemde mukozal yapıya zarar veren susların probiyotik olarak kullanılmamasıdır (Anonymous 2001).

2.1.3 Probiyotiklerin yararlı etkileri

Probiyotiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri uzun yıllardan beri bilinmektedir. Gıdaların genellikle pastörize edilerek kullanıldığı günümüzde Metchnikoff' un 1900' lü yılların başında yoğurt tüketimine sağlık açısından dikkat çekmiş olmasını daha da anlamlı hale getirmektedir. İntestinal floradaki bakterilerin sağlık açısından önemleri günümüzde daha iyi anlaşılmış durumdadır. Bu bağlamda yapılan araştırmalar sağlıklı bir yaşam sürmek, vücut direncini arttırmak, intestinal düzensizliklerle ve hastalıklarla mücadele etmek için probiyotik ürün tüketimini önermektedir (Laurens-Hattingh ve Viljoen 2001).

Probiyotiklerin insan ve hayvan sağlığı üzerinde çok sayıda olumlu etki sergilediği iyi bir şekilde anlaşılmıştır. Probiyotiklerin ağızdan alımı yararlı mikroorganizmaların gelişmesini stimüle eder ve patojenlerin miktarını azaltır, böylelikle konakçının intestinal mikrobiyal dengesi düzenlenir ve gastro-intestinal hastalıkların riski azalır (Fuller 1989, Chiang ve Pan 2012). Bunların yanı sıra, belli intoleranslarda azalmaya (laktoz intoleransı gibi), gıdaların biyoyararlılığının artırılmasına ve duyarlı bireylerde alerji yayılımının engellenmesi veya azaltılmasına katkı sağlamaktadır (Isolauri 2001, Chiang ve Pan 2012).

Probiyotiklerin antimutajenik, antikarsinojenik, hipokolesterolemik, antihipertansif, anti-osteoporoz ve immünomodülatör etkilerinin de bulunduğu rapor edilmiştir (Chiang ve Pan 2012). Bununla beraber probiyotikler inflammatuar bağırsak hastalıkları, irritabl bağırsak sendromu, kolit, alkolik ciğer rahatsızlığı, kabızlık semptomlarının azaltılması, kolon, ciğer ve göğüs kanserleri gibi hastalıkların riskinin azalmasına katkı sağlamaktadır (Prado vd. 2008). Crohn rahatsızlığı (CD) ve ülseratif kolit (UC) gibi

inflatuar bağırsak hastalıkları (İBH) intestinal bölgede inflamasyon geliştiren kronik hastalıklardır. Bu hastalıklar gelişmiş ülkelerde artan bir yayılış göstermektedir. Genetik, çevresel ve immüno-regülatör faktörlerin yanı sıra enterik mikrobiyotanın da önemli bir rol oynadığı görülmektedir.

Probiyotiklerin özellikle *Lactobacillus salivarius*'un, kronik gastrit, peptik ülser ve mide kanseri ile yakından ilgisi olduğu bilinen *Helicobacter pylori*'nin aktivitesini ve kolonizasyonunu engelleme yetenekleri araştırılmıştır. İnsan ve hayvanlarla yapılan deneme sonuçları probiyotiklerin veya probiyotik son ürünlerinin *H. Pylori* enfeksiyonlarını durdurabileceğini göstermiştir (Kabir vd. 1997, Aiba vd. 1998, Michetti vd. 1999, Sanders 1999, McNaught ve MacFie 2001).

Yapılan araştırmalar kanser hastalığı üzerinde beslenmenin önemli bir etken olduğunu göstermektedir (Williams ve Wynder 1996). Buna karşın probiyotik bakterilerle hazırlanan diyetlerin kanser riskini azaltabildiği ispatlanmıştır (Hirayama ve Rafter 1999). Araştırmalar probiyotik bakterilerin bağırsaklarda ve diğer organlarda mutajenik ve genotoksik etkileri engelleyebildiğini ortaya koymuştur (Sanders vd. 1999). Probiyotiklerin genel olarak bilinen yararlı etkilerinden bazılarını maddeler halinde sıralayacak olursak;

- 1)Diyare ve bunun gibi intestinal rahatsızlıkları önleyici ve iyileştirici etkileri vardır,
- 2)Örneğin antibiyotik terapisinden sonra normal intestinal mikroflorayı yeniden düzenleyici etki gösterir,
- 3)İntestinal mikrofloraya pozitif etki gösterir,
- 4)B vitamini üreticisidirler,
- 5)Kolesterolü düzenlerler,
- 6)İntestinal pH'yı düzenlerler,
- 7)Bağırsak fonksiyonlarında gelişmeye yardımcı olurlar,
- 8)Toksik bileşenlere karşı etki gösterirler,
- 9)İmmün cevabı stimüle ederler.

Hatakka vd. (2001) araştırmalarında, uzun süreli probiyotik süt kullanımının gündüz bakım evindeki çocuklarda çok sık görülen solunum yolları ve gastrointestinal enfeksiyonlar üzerindeki etkilerini çift kontrollü denemelerle incelemişlerdir. Araştırmada elde edilen sonuçlara göre *L. rhamnosus* GG katılarak verilen sütü tüketen çocuklarda rotavirustan kaynaklanan diyarenin şiddetinin azaltıldığı, antibiyotik kullanımından kaynaklanan diyarenin ise önemli ölçüde önlendiği tespit edilmiş, ancak solunum yolu enfeksiyonlarının önlenmesinde daha az etkili olduğu belirlenmiştir. Laktobasiller vajina normal florasının en önemli grubunu oluşturmaktadır (Ocaña vd. 1999). Bu bakterilerin, üretmiş oldukları bakteriyosin, laktik asit ve hidrojen peroksit ile patojenlerin kolonizasyonuna engel oldukları birçok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır (McFarland ve Elmer 1997, Sönmez vd. 1999, Reid 2000, Çakır ve Çakmakçı 2002). Yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu probiyotik bakterilerin vajina içi uygulamaları şeklinde yapılmış olmasına karşın; ağız yoluyla alınan *L. Acidophilus* içeren ürünlerin *Candida albicans* enfeksiyonlarının tekrarlanma oranını azalttığı tespit edilmiştir (Shalev vd. 1996, Murray 1998). Ürogenital enfeksiyonların önlenmesinde, diyetle birlikte alınan probiyotik ürünlerinin rolünü kanıtlamak için plasebo kontrollü denemeler yapılması gerekmektedir.

Probiyotiklerin bütün bu yararlı etkileri arasında laktoz intoleransını düzenleyici etkisi önem taşımaktadır. Laktoz intoleransı probiyotik ürün kullanımı ile tedavi edilebilecek çok önemli bir sağlık sorunudur. Bu sorun laktozun laktaz ile parçalanıp sindirilememesi sonucu ortaya çıkan bir bozukluktur. Cerrahi operasyon, bağırsak düzensizlikleri ve antibiyotik tedavisi gibi faktörler vücudun laktaz üretimini azaltabilmektedir. Laktozu kullanan bakteriler ve oluşturdukları yan ürünler karın krampları, bulantı, diyare ve kusmaya neden olmaktadır. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus* gibi laktaz pozitif probiyotik bakteri türleri, genellikle pastörize süt ürünlerine ilâve edildiklerinde bu ürünlerdeki laktoz sindirimini arttırmaktadırlar (Murray 1998, Sanders 1999, Rolfe 2000).

Probiyotik bakterilerin immünomodülatör potansiyelleri; diyareden alerjiye kadar değişiklik gösteren çeşitli kompleks rahatsızlıklardaki önleyici ve iyileştirici özellikleri

açısından giderek artan bir ilgi uyandırmaktadır. Fakat klinik çalışmalar tamamen pozitif değildir.

İntestinal floranın probiyotik bakteri tüketimiyle desteklemesinin sağlık üzerindeki olumlu etkileri uzun yıllardır bilinmektedir. Bu doğrultuda yapılan araştırmalarda; daha sağlıklı bir yaşam sürmek, vücut direncini artırmak, intestinal düzensizliklerle ve hastalıklarla mücadele etmek için probiyotik tüketiminin gerekli olduğu klinik deneylerle ispatlanmıştır (Laurens-Hattingh ve Viljoen 2001, Sullivan ve Nord 2005).

Probiyotiklerin bahsettiğimiz bütün bu olumlu etkilerini sergileyebilmeleri için GİS'e ulaşan canlı bakteri sayısının yaklaşık 10^8 - 10^9 kob/mL olması gerekmektedir. Probiyotik suşun GİS'e canlı bir şekilde ulaşabilmesi için mevcut mide asidi, pankreatik enzimler ve olumsuz çevre koşullarına dirençli olması gerekmektedir.

2.1.4 Probiyotiklerin etki mekanizması

Günümüzde probiyotiklerin etki mekanizmalarını nasıl gerçekleştirdikleri halen bir tartışma konusudur. Probiyotiklerin moleküler mekanizmalarının önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Probiyotiklerin moleküler mekanizmalarıyla ilgili birçok hipotez, deneysel verililerle desteklenmektedir. Ancak bu konudaki çalışmalar henüz yetersizdir. Bu mekanizmaların daha iyi anlaşılması farklı klinik verilerin yorumlanmasına yardım edecek ve özel uygulamaları hedefleyen klinik çalışmalar için en uygun probiyotik suşların seçimine yardımcı olacaktır. Probiyotiklerle ilişkili sağlık iddiaları konusundaki endüstriyel ilgi, konakçı probiyotik interaksyonları üzerindeki moleküler araştırmaları tetikleyen en önemli etkidir. Bu mikroorganizmaların hücre yüzey molekülleri ve ekstrasellüler komponentleri, konakçıya etkileri açısından çalışılmaktadır. Probiyotiklerin yararlı etkilerinin çoğu GİS'de meydana gelir. GİS mikroplarıyla direk etkileşimde bulunan dendritik hücreler (DH) ve intestinal epitel hücreleri (İEH) gibi hücreler Toll-like reseptörleri (TLR) gibi farklı pattern tanıyan reseptörlere (PRR) sahiptir. PRR'ler lipopolisakkarit (LPS), flagellin, lipoteikoik asit (LTA), peptidoglikan gibi bakteriyel yüzey moleküllerinde ama aynı zamanda bakteriyel DNA'da da meydana gelebilen mikroorganizma-kaynaklı moleküler paternleri (MAMP) tanır. Bir MAMP ve

PRR arasındaki interaksiyon sonuç olarak İEH'lerde müsin üretimi, sitokin ekspresyonu veya DH'lerde antijen prezentasyonu için moleküllerde artışa neden olan bir sinyal basamağıyla sonuçlanır. Konakçının spesifik bir hücresinin karşılaşılan mikroplara karşı tepkisi tek bir MAMP-PRR etkileşimiyle değil ama birçok MAMP-PRR etkileşimiyle belirlenir. Probiyotik bakteriler, çeşitli MAMPler içerdiğinden, bunların kullanımı bu MAMP-PRR etkileşimlerini modüle edebilir ve uyarlayabilir.

Gram pozitif olan probiyotik laktobasiller, spesifik hücre duvar polisakkaritleri, peptidoglikan (PGN) ve LTA'ler gibi MAMP'lere sahiptirler. Bu MAMP'ler çok farklı lactobaciller tarafından üretiliyor gibi görünmesine rağmen, kimyasal yapıları polimer kompozisyon, uzunluk ve süstitüsyonlar açısından suşlar arasında farklılık gösterebilir ki bu da probiyotiklerin suş spesifikliğini kısmen açıklar (Bron vd. 2013).

Probiyotikler genel anlamda bağırsak mukozasında tutunma bölgeleri için patojen olma potansiyeli taşıyan mikroorganizmaların epitel hücrelerine tutunmasını engeller ve patojene karşı bakteriyosin etkisini göstermektedir. Probiyotiklerin İBH'daki etkinliğini açıklayabilen veriler bulunmaktadır. Son zamanlarda İBH'lı olguların bağırsak lümeninde bulunan antijenlere, özellikle kommensal bakterilere ve onların ürünlerine karşı agresif bir immün cevabın geliştiğini gösteren birçok kanıt elde edilmiştir (Obermeier vd. 1999).

Probiyotiklerin konagi intestinal sistem bozukluklarına karşı nasıl koruduğunu açıklamaya çalışan birçok mekanizma bulunmaktadır. Muhtemel etki mekanizmaları (Salminen 1998, Salminen 1999, Rolfe 2000, Forestier vd. 2001, Rastall vd. 2005) aşağıda belirtilmiştir.

1. İnhibe edici maddeler üreterek: Probiyotikler, Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalar üzerinde etkili birçok madde üretmektedir. Bunlardan bazıları organik asitler, hidrojen peroksit, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddelerdir.
2. Tutunma bölgelerini bloke ederek: Probiyotikler tutunma bölgeleri için patojenlerle rekabete girerek, intestinal sistemde yerleşmelerini engellemektedirler.

3. Besin maddeleri için rekabet: Probiyotikler patojenler için de gerekli olan besin maddelerini tüketerek, onların sistemde uzun süre kalmasını engellemektedirler. Ancak bu mekanizmanın kanıtlanabilmesi için in vivo verilere gereksinim duyulmaktadır.

4. Toksin reseptörlerinin yıkımı: Bu mekanizma hayvanlarda *S. boulardii*'nin intestinal mukozada bulunan *Clostridium difficile*'nin toksin reseptörlerini parçalayarak konakçıyı koruması nedeniyle ortaya atılmıştır (Castagliuola vd. 1999).

5. Bağışıklık sistemini güçlendirmesi: Son yıllarda yapılan çalışmalar probiyotiklerin spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sistemini güçlendirerek intestinal hastalıklara karşı konakçıyı koruduğunu ortaya koymuştur (Fukushima vd 1998). Bu mekanizma tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen spesifik hücre duvarı komponentlerinin veya hücre yüzeylerinin adjuvant etki gösterdiği ve humoral immun yanıtı güçlendirdiği düşünülmektedir.

2.1.5 Probiyotiklerin kullanım alanları

Çok sayıdaki hastalık türlerinde probiyotiklerin etkisi araştırılmaktadır. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu; *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) karsinojenik potansiyeli olan, ülser hastalığına yol açan bir enfeksiyon hastalığıdır. İn vitro çalışmalarda birçok *Lactobacillus* türünün *H.pylori*'nin gastrik mukozal adezyonunu ve çoğalmasını azalttığı gösterilmektedir (Penner vd. 2005).

İrritabl Bağırsak Sendromu (İBS); İBS, en sık görülen fonksiyonel Gİ sistem hastalığıdır. Tedavide amaç semptomların (rahatsızlık hissi, ağrı, şişkinlik, gaz, gayta yapmak için aciliyeti) ortadan kaldırılmasıdır. Yapılan çalışmalar probiyotiklerin İBS tedavisinde kullanımının faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Kim ve arkadaşları ishal ağırlıklı İBS'da VSL#3 kullanılması ile rahatsızlığın ve şişkinliğin azaldığını göstermektedir (Kim vd. 2003). O'Mahony ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise plasebo grubu ile *L. salivarius* veya *B. infantis* alan grup karşılaştırıldığında, *L. salivarius* alan grupta plasebo ile benzer yakınmalar devam ederken, *B. infantis* alan grupta semptomlarda azalma olduğu görülmüştür (O'Mahony vd. 2005).

İshaller; Probiyotikler günümüzde antibiyotik ilişkili ishaller, infeksiyöz etkenlere bağlı ishal tedavisinde kullanılmaktadır. Yapılan birçok klinik çalışmada oral olarak alınan probiyotiklerin kolonda kolonize olarak patojen mikroorganizmaların sayısını azalttığı ve ishal gelişimini önlediği gösterilmiştir. İnfeksiyöz etkenlere bağlı ishallerde de probiyotikler oldukça sık kullanılmaktadır. Özellikle çocuklarda akut infeksiyöz ishallerin başlıca sebebi olan rotavirüs enfeksiyonlarında kullanılan *Lactobacillus GG*'in enfeksiyon süresini kısalttığını göstermiştir (Van Niel vd. 2002). Diğer *E. coli* türleri ve *Vibrio cholerae*'ya bağlı ishal tedavilerinde probiyotiklerin etkili olduğu gösterilememiştir. Yetişkin gastroenteritlerinde de probiyotik kullanımının daha az etkili olduğu bilinmektedir (Brown vd. 2004).

İmmün Sistem Fonksiyonlarının Korunması; *L. casei*, *L. acidophilus* ve *B. bifidus*, IgA salınımını arttırarak mukozal immün cevabı kuvvetlendirirler. Çok sayıda çalışmada mitojenlere karşı dalak hücrelerinde T ve B lenfosit çoğalmasını arttırdıkları, sitokin cevabını etkiledikleri ve patojenlerin fagositozunu arttırdıkları gösterilmiştir.

2.2 Prebiyotikler

Prebiyotikler, seçici olarak kolonda bulunan bakteri türlerinin gelişimini ve/veya aktivitesini stimüle ederek konaga yararlı etkiler sağlayan, sindirilemeyen gıda içerikleridir. Prebiyotiklerin kullanımı, probiyotiklerden daha yaygındır. Bir gıda içeriğinin bir prebiyotik olarak değerlendirilebilmesi için asgari kriterler; gastrointestinal sistemin üst kısmında emilimi gerçekleşmeli ve hidrolize dirençli olmalıdır, kolonda bulunan laktobasiller ve bifidobakteriler gibi yararlı bakteriler için seçici bir substrat olmalıdır, kolonik mikroflorayı daha sağlıklı bir kompozisyona çevirebilmelidir (Gibson ve Roberfroid 1995). Prebiyotikler, normal bağırsak mikroflorasındaki türlerin gelişimini, dışardan alınan türlere göre daha fazla stimüle etmek amacı ile kullanılır. Prebiyotikler, ısıya dayanıklılık, oksijenden (O₂) etkilenmeme ve doğal probiyotik florayı destekleme özelliklerini içermelidir. Oligosakkaritler, prebiyotik sınıflandırması için gerekli tüm bu kriterleri karşıladıklarından, en önemli prebiyotik bileşikler olarak kabul edilmektedir (Rycroft vd. 1999).

Probiyotik ve prebiyotik bileşimi ise simbiyotik olarak tanımlanmaktadır. Birçok çalışmada simbiyotik tüketiminin oral yolla alınan probiyotik veya prebiyotiğe oranla daha yüksek oranda tedavi edici özellik gösterdiği belirtilmektedir (Kiebling vd. 2002).

2.3 Fonksiyonel Gıdalar

Fonksiyonel gıdalar son yıllarda hayatımızın önemli bir parçası haline gelmiştir. İnsanların fonksiyonel gıdalara yönelmesiyle birlikte endüstriyel anlamda yeni probiyotik/sinbiyotik ürünlerin geliştirilmesini içeren çalışmalarda artış hızlı bir artış meydana gelmiştir. Antibiyotikler, hastalıkların tedavisi yanında gıda koruyucusu olarak da yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Günümüzde gerek antibiyotik direnci gelişimi ve gerekse sağlık üzerinde oluşturduğu olumsuz yan etkiler nedeniyle, antibiyotiklerin kullanımının sınırlandırılması, fonksiyonel gıdalara olan ilgiyi artırmıştır (Collins ve Gibson 1999). Fonksiyonel gıdalar (probiyotik ve prebiyotik) esas olarak, temel besleme işlevi yanında, tüketici sağlığını destekleyen ve immün sistemi güçlendiren gıdalardır (Gibson 1998, Playne vd. 2003).

Tüm araştırmalar doğrultusunda sonuç olarak probiyotiklerin insan sağlığı üzerine olumlu etkilerinin anlaşılmasıyla bu ürünlerin geliştirilmesi ve tüketimi dünya çapında hızla artmaktadır. Probiyotiklerin insan sağlığına herhangi bir zarar vermemesi yani güvenli olarak kullanımı gerekmektedir. Bu ölçüde probiyotiklerin güvenilirliği ve patojeniteleri ile ilgili bir takım kaygılarda belirtilmiştir (Famularo vd. 1997).

Probiyotiklerin hakkındaki kaygılar; endokardit, gastrointestinal sistemde toksik etkiler oluşturması ve gastrointestinal sistemde sahip oldukları direnç genlerini aktarabilmeleri şeklinde sıralanabilmektedir. Probiyotik bakterilerin direnç genlerini gastrointestinal sistemde istenmeyen bakteri popülasyonlarına transfer etmesi gıda güvenirliliği açısından istenmeyen bir faktördür (Wassenaar ve Klein 2008). Bundan dolayı kullanılacak olan suşların aktarılabılır dirençlilik genlerine sahip olmaması başlıca kriterler arasında yer almaktadır.

Günümüzde laktik asit bakterileri ile ilgili mevcut bilgiler bunların güvenli olduğu yönündedir. Bilindiği kadarıyla enfeksiyona neden olan probiyotik bakterilerin bugüne kadar iki raporu mevcuttur. Hipertansiyon ve diabetes mellitus öyküsü olan yaşlı bir kadının karaciğer absesinden izole edilen *L. rhamnosus* GG'den farkı olmayan *L. rhamnosus* suşudur (Rautio vd. 1999). Diğer durumda ise yaşlı bir erkekte endokartite neden olduğu öne sürülen probiyotik *L. rhamnosus* suşudur (Mackay vd. 1999). Probiyotiklerin canlı olmayan formlarının sağlık üzerine yararlı etkileri olduğu da öne sürülmektedir. Bağırsak mikroflorasının bileşim ve aktivitesindeki olumsuz değişimleri minimum düzeye indirmek ve bunun bireye olan etkilerini sınırlamak için geliştirilen diyetetik yöntemler içinde öncelikle probiyotiklerin kullanılmasının yanında, özellikle son yıllarda bu mikroorganizmaların gelişmesini teşvik etmek amacıyla prebiyotiklerden de yararlanılmaktadır (Fuller ve Gibson 1998).

2.4 İntestinal Mikroflora

İnsan vücudunda, organlarda ve yüzeylerde bulunan toplam mikrobiyel hücre sayısı (10^{13} - 10^{14}) ökaryotik hücre sayısının yaklaşık 10 katı kadardır (Gorbach vd.1967). İntestinal flora, oldukça yüksek bir popülasyona yani 400'den fazla bakteriyel tür içeren bir ekosisteme sahiptir (Luckey ve Floch 1972). Mide-bağırsak sisteminin içeriginde yer alan trilyonlarca mikroorganizma yaklaşık 1,5 kg gibi bir kitle değerindedir. Bir başka ifade ile kolonda dışkıda 1×10^{12} kob/g bakteri bulunmaktadır. Söz konusu flora üyeleri, bağırsak savunma mekanizmasında önemli rol oynarlar (Collins ve Gibson 1999). Buna ek olarak gastrointestinal flora, patojenlere karşı doğal bir bariyer oluşturarak immün sistemi ve bağırsak hareketlerini stimüle eder (Hentges 1992). Sindirim sistemindeki mikrobiyal yük ve çeşitlilik beslenme şekli, bağışıklık, pH, yaş ve antimikrobiyal bileşenler gibi birçok faktöre bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Fooks vd. 1999). Sindirim sisteminde bulunan mikroorganizmaların dağılımı mide, duodenal, jejunal, ileal, çekal, kolonik, rektal ve fekal mikroflorada farklılaşmaktadır. Midede çok az mikroorganizma bulunurken bağırsagın sonlarına doğru sayıda artış gözlenmektedir. Mide ve ince bağırsagın büyük bir kısmında kolonizasyon bu bölgedeki asidite yüzünden sınırlıdır. Kalın bağırsaktaki mikroorganizma sayısı 10^{12} 'ye kadar yükselmektedir (Ballongue 1993). Sindirim sisteminde bulunan bakteri florasının %

90'ı veya daha fazlası Bifidobacterium, Lactobacillus ve Bacterioides cinslerine dahil anaerob bakteriler tarafından olusturulmaktadır. Floranın diger üyeleri; Enterococcus ve Streptococcus cinsinde yer alan türler ile Clostridium, Staphylococcus, Pseudomonas gibi patojen bakteriler, küfler ve Candida cinsi mayalardır (Salminen vd. 1998, Fonden vd. 2000, Dethlefsen vd. 2006).

Probiyotikler, bağırsakların mikrobiyal popülasyonunun yararlı etkilerini destekleyen canlı mikroorganizmalardır (Holzapfel ve Schillinger 2002). İnsan intestinal sisteminde laktik asit bakterileri (LAB) dogal olarak meydana geldiği için intestinal suslar özellikle ticari amaçla kullanılmak üzere probiyotik olarak geliştirilmektedir (Pinto vd. 2006).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteriler

Bu çalışmada probiyotik özellikleri araştırılmak üzere 3 - 18 ay aralığında 3 farklı annesi veya kendisine antibiyotik verilmemiş olan bebekten alınan gaita örneklerinden, menopoza girmemiş, herhangi bir doğum kontrol yöntemi ile korunmayan ve 3 ay süre içerisinde antibiyotik kullanmayan 3 bayanın vajinasından alınan smear örneklerinden ve Türkiye'nin 3 farklı ilinin farklı ilçelerinden sağlanan ve ticari olmayan fermente gıda ürünlerinden izole edilen 39 adet bakteri örneği ve bunlara ek olarak daha önceki bir çalışmada 12 aylık bir bebek gaitasından izole edilip moleküler teknikler neticesinde *Lactobacillus plantarum* olarak tanımlanan Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı'ndan temin edilen suş kullanılmıştır.

İndikatör bakteri olarak kullanılan suşlar (*Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Enterococcus faecium* ATCC 6057, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Leuconostoc mes. subsp. dextranicum* NRLL 3469, *Lactobacillus plantarum* NCDO 955) ise Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

Probiyotik özellikleri araştırılmak üzere izole edilen suşların gelişimi ve izolasyonu için de Man Rogosa Sharpe (MRS) (Merck) besiyeri kullanılmıştır. Bu besi ortamına ait ve çalışmanın diğer aşamalarında kullanılan indikatör bakterilerin geliştirildiği diğer besi ortamlarına ait kimyasal bileşenler **EK 1**'de belirtilmiştir.

3.1.2 Bakteri kültürlerinin aktivasyonları

Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri uygun besiyerinde 37°C'de 18 saat geliştirilmiştir.

3.1.3 Bakteri kültürlerinin saklanması

Bakteri kültürleri uygun sıvı besiyerinde 18 saat geliştirildikten sonra eppendorf tüplerine alınarak 10.000 rpm'de 90 saniye santrifüj edilmiştir. Daha sonra hücreler 1 ml steril serum fizyolojik (% 0.85 NaCl) ile 2 kez yıkandıktan sonra %50' lik steril 1 ml gliserol çözeltisinde -80°C'de saklanmıştır (Todorov vd. 1999).

3.1.4 Tampon ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanışı **EK 2**'de verilmiştir.

3.1.5 Çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu

Çalışma süresince kullanılan tüm cam malzemelerin, pipet uçlarının, tampon, çözelti ve besiyerlerinin sterilizasyonu için otoklav (Nüve, Türkiye) kullanılmıştır (121°C'de 15 dakika, MRS; 121°C'de 12 dakika).

3.1.6 Moleküler markörler

Bu çalışmada kullanılan moleküler markörler **EK 3**'de verilmiştir.

3.1.7 Deney hayvanlarının temini

Çalışma kapsamında kullanılan 8 haftalık erkek BALB/c türü fareler, Kobay DHL A.Ş.'den (Türkiye) temin edilmiş ve Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (GÜDAM, Türkiye) barındırılmıştır. Deney hayvanlarının barındırıldıkları odanın ısısı klima yardımı ile $22 \pm 1^\circ\text{C}$ olacak şekilde, nem oranı ise %40-60 oranında sabit tutulmuştur. Odanın camları ışık geçirmeyecek şekilde olup aydınlık-karanlık döngüsü otomatik olarak denetleyici bir cihaz ile 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Deney hayvanları için kullanılan yemler ise özel olarak deney hayvanları için üretilmekte olup (Harlan, Barcelona, İspanya) deneklere herhangi bir kısıtlama olmadan verilmiştir. Su

ihtiyaçları için ise yine herhangi bir kısıtlama olmadan eme suyu kullanılmıştır. Suluklar hepafiltreli özel kafes sistemlerinde kafese dışarıdan bağlanmıştır. alışmalar için gerekli olan etik kurul kararı ve Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası ise **EK 4**'te verilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Farklı kaynaklardan örneklerin toplanması

Gıda ve insan kaynaklı örneklerden aseptik koşullara dikkat edilerek alınan numuneler, uygun koşullarda laboratuvar ortamına getirilerek aynı gün içerisinde LAB izolasyonu için kullanılmıştır.

3.2.2 Farklı kaynaklardan bakterilerin izolasyonu

Laboratuvar ortamında numuneler steril kaplarda net ağlıkları 10 g olacak şekilde tartılarak veya 10 ml olacak şekilde ayarlanarak üzerlerine 90 mL steril fizyolojik sıvı (SF;% 0.85 NaCl) ilave edilmistir. SF ile homojenize edilen bu örneklerin 10^{-7} düzeyine kadar dilüsyonları hazırlanmış ve bu dilüsyonlardan 100 μ L alınarak MRS agar besiyerine yayma ekim yöntemiyle üçer paralel olacak şekilde ekimleri yapılmıştır. Ekim yapılan petriler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve bu süre sonunda farklı morfolojilerdeki koloniler seçilerek steril ze yardımı ile MRS broth besiyerine aktarılmış ve 24 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Inkbasyonun ardından izolatların tanımlanması amacına yönelik karakterizasyon testleri ve ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere izolatlar stoklanarak -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 İzolatların karakterizasyonu

3.2.3.1 İzolatların kısmi karakterizasyonu

İzolatların morfolojik ve fizyolojik özellikleri incelenmiştir (Lyhs 2002).

3.2.3.1.1 Basit boyama

37°C’de 18 saat geliştirilen her bir izolattan ayrı ayrı 5-10 µL alınarak her biri temiz birer lam üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Bu örnekler havada kurutulduktan sonra alevden 3-5 kez geçirilerek fiksasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Fikse edilen örneklerin üzerine metilen mavisi (Merck, Darmstadt, Germany) damlatılarak 5 dakika beklenmiş ve ardından distile su ile yıkanan lamlar kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamların üzerine immersiyon yağı damlatılarak bakterilerin hücre morfolojileri 1000X büyütme ışık mikroskopunda (ZEISS AxioCam MRc5 Imager system) gözlenmiştir.

3.2.3.1.2 Gram boyama

37°C’de 18 saat geliştirilen kültürler basit boyamada belirtildiği gibi temiz lamların üzerine hazırlanmıştır. Daha sonra Gram kristal viyole solüsyonu (Sigma, Gram Boyama Kiti, İsviçre) ile 1 dakika muamele edilen lamlar çeşme suyuyla yıkanmıştır ve Gram iyodin solüsyonu (Sigma, Gram Boyama Kiti, İsviçre) damlatılarak 1 dakika beklenmiş ve ardından çeşme suyu ile tekrar yıkanan lamlar dekolorizer solüsyonu (Sigma, Gram Boyama Kiti, İsviçre) ile 30 saniye dekolorize edilmiştir. Son olarak Gram safranin solüsyonu (Sigma, Gram Boyama Kiti, İsviçre) ile 1 dakika muamele edilen lamlar çeşme suyu ile yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. İmmersiyon yağı damlatılan lamların reaksiyon sonuçları 1000X büyütme ışık mikroskopunda (ZEISS AxioCam MRc5 Imager system) gözlenmiştir. Mavimsi mor bir renk oluşumu var ise kültürler Gram-pozitif, pembemsi kırmızı renk oluşumunda ise kültürler Gram-negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.1.3 Katalaz testi

Katalaz testi için, MRS agar ortamına çizgi ekim yapılarak 37°C’de 24 saat geliştirilen kolonilerin üzerine H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Germany) damlatılmış ve yüzeyde hava kabarcığının oluşup oluşmadığı gözlemlenmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak Bacillus subtilis ATCC 21332 suşu kullanılmıştır (Harrigan ve McCance 1976). Gaz çıkışı gözlemlenen izolatlar katalaz-pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.2 İzolatların genotipik karakterizasyonu

İzolatların genotipik karakterizasyonunun belirlenebilmesi için öncelikle farklı primerlerle RAPD PZR profilleri çıkartılmış ve her izolat için bu profiller karşılaştırılmıştır. Farklı profil gösterdiği gözlemlenen izolatlar için ise 16S rDNA dizi analizi yapılarak izolatların genotipik karakterizasyonu tamamlanmıştır. Hem RAPD PZR hem de 16S rDNA gen bölgesinin PZR'de çoğaltılabilmesi için ise öncelikle izolatlardan genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2.1 Genomik DNA izolasyonu

DNA izolasyonu; bakterilerin lize edilmesi, proteinlerin uzaklaştırılması, DNA'nın çöktürülmesi ve temizlenmesi aşamalarından oluşmaktadır. DNA izolasyon yöntemi için 37°C'de 18 saat geliştirilen aktif kültürlerden 1,5 mL alınarak 13200 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Aynı işlem aynı tüplerin içerisine aynı kültürü ekleyerek birer kez daha tekrarlanmıştır. Elde edilen pelletin (hücreler) üzerine 200µL spheroblast tamponu eklenerek 37°C'de 10-15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından 50µL lizis tamponu1 ve arkasından 50µL lizis tamponu2 eklenerek 65°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra örneklerin üzerine 100µL N3 tamponu eklenerek vortekslenmiş ve buz üzerinde 5 dakika inkübe edilmiştir. Buz üzerinden alınan bu örnekler +4°C'de 13200 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda elde edilen 400µL süpernatant yeni temiz bir eppendorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 400µL izopropanol eklenerek 5 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Bunun ardından örnekler oda ısısında, 16000g'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet 100µL %70'lik ethanol ile yıkanmış ve oda sıcaklığında 16000g'de 5 dakika santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak elde edilen pellet kurumaya bırakılmıştır. Pellet iyice kuruduktan sonra 50µL PZR suyu içerisinde çözülerek daha sonraki aşamada kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.2.3.2.2 Saflık ve miktar tayini

İzole edilen DNA numunelerinin saflık ve miktar tayinleri NANODROP (Wilmington, USA) spektrofotometrede (2µL DNA ile) 3 paralel okuma yapıp bu değerlerin ortalaması alınarak belirlenmiştir. DNA numunelerinin okunması için kontrol olarak PZR suyu kullanılarak 260nm, 280nm, 260nm/280nm, 260/230nm değerleri ölçülmüş ve DNA numunelerinin konsantrasyonları ng/µl olarak belirlenmiştir (Sambrook ve Russell 2001). DNA örneklerinin saflıklarının kontrolü için belirlenen OD260/OD280 değeri 1.8 ise numune saf olarak kabul edilmiştir. Daha yüksek değerler için RNA, daha düşük değerler içinse protein kontaminasyonu olduğu dikkate alınmıştır.

3.2.3.2.3 Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi için %1,5'lik jel hazırlanmıştır. Agaroz jelin hazırlanması için öncelikle 1,5gr agaroz 100 ml 1X Tris-Borik asit-EDTA (TBE, Merck) elektroforez tampon içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak çözülmüştür. Sıcaklığı yaklaşık 40°C'ye kadar indirilen jele % 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 taraklar ortamdan uzaklaştırılarak jel yükleme kuyucuklarının oluşumu sağlanmıştır. Agaroz jelde yürütülecek olan PZR ürünlerine yükleme boyası eklenerek mikropipet yardımı ile jel kuyucuklarına yükleme yapılmıştır. Elektroforez 100V'de yükleme boyası jeli terk edene kadar gerçekleştirilmiştir. Yükleme 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 ve fotoğraf çekimleri gerçekleştirilmiştir. PZR ürününün markörü olarak 100bp – 10KB ticari markör (BIO BASIC INC.) kullanılmıştır. Bahsedilen agaroz jel elektroforez yöntemi çalışmada hem 16S rDNA bölgesinin PZR ürünü, hem de RAPD PZR ürünü yürütmek için aynı şekilde uygulanmıştır.

3.2.3.2.4 İzolatların RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNAs) PZR profillerinin belirlenmesi

RAPD yönteminin temel prensibi genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş tek bir 9-10 bç oligonükleotidin düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PZR ile çoğaltma yapmasıdır. PZR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi sonucu jel görüntüleri karşılaştırılarak izolatların aynı veya farklı klon olup olmadığı hakkında bilgi edinilir.

Çalışmada genomik DNA'lar üzerinde farklı bölgelere bağlanacak ve rastgele seçilmiş olup ticari olarak sağlanan OPA1, OPA7, OPA8 ve OPA16 primerleri kullanılmıştır. Bu amaç için 200µL'lik PZR tüpüne son hacim 25µL olacak şekilde sırasıyla 14,175µL PZR suyu, 2,5µL standart taq buffer (Promega, USA), 4µL 25mM MgCl₂ (Promega,USA), 0,2µL 25mM deoksinükleotidtrifosfat (dNTP, Promega, USA), 1µL 10mM primer (her reaksiyon için farklı bir primer kullanılır), 0,125µL standart taq DNA polimeraz enzimi (Promega, USA) ve son olarak da 3µL kalıp DNA eklenmiştir. PZR işlemi 'Gradient PCR Thermocycler/Eppendorf' cihazında gerçekleştirilmiştir. PZR tüpleri cihaza yerleştirilerek 94°C'de 5 dakika ön denatürasyonun ardından bir döngüsü 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 35°C'de 1 dakika primer bağlanması ve 72°C'de 1 dakika 45 saniye uzama basamaklarından oluşan toplam 34 döngü içeren bir protokol izlenmiştir. Son olarak 72°C'de 8 dakika ilave uzama basamağı uygulanmıştır.

3.2.3.2.5 İzolatların 16S rDNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyonu

16S rRNA yöntemi ile bakterilerin tanımlanması; DNA izolasyonu, izole edilen DNA'nın saflık ve miktar tayini, 16S ileri (5'-3') ve 16S geri (3'-5') primerleri kullanılarak izole edilen uygun saflık ve miktardaki DNA'nın PZR'de çoğaltılması, çoğaltılan DNA'nın baz dizi sırasının belirlenmesi ve bu sıranın, veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait baz dizi sıraları ile karşılaştırılarak isimlendirilmesi aşamalarından oluşmaktadır (Sanger vd. 1977, Lane vd. 1985, Saitou ve Nei 1987, Edwards vd. 1989, Wang vd. 1996, Müller 2000, Roy vd. 2000, Escalante vd. 2001, Roy vd. 2001, Sambrook ve Russell 2001, Yeung vd. 2002).

3.2.3.2.5.1 16S rDNA bölgesinin PZR ile çoğaltılması

Çalışmada kullanılan bakteri kültürlerinden izole edilen genomik DNA örnekleri üzerindeki 16S rDNA bölgelerini çoğaltmak amacıyla sırasıyla 9-27 ve 1492-1510 pozisyonlarına karşılık gelen 16S ileri (1F) (5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3') ve 16S geri (5R) (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') primer çifti kullanılmıştır (Beasley ve Saris 2004, Osborne vd. 2005). Bu amaçla 200µL'lik PZR tüpüne toplam hacim 50µL olacak şekilde sırasıyla 14µL steril PZR suyu, 6µL 5X KCL tamponu (Promega, USA), 4µL 2,5 mM deoksinükleotidtrifosfat (dNTP, Promega, USA) karışımı, ikisinden de ayrı ayrı 6µL 10pmol 16S ileri ve geri primerleri, 6µL 50 ünite Taq DNA polimeraz enzimi (Promega, USA), 3µL 25mM MgCl₂ (Promega, USA) ve 5µL kalıp DNA ilave edilmiştir. PZR işlemi 'Gradient PCR Thermocycler/Eppendorf' cihazında gerçekleştirilmiştir. PZR tüpleri cihaza yerleştirilerek bir döngüsü 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 58°C'de 1 dakika primer bağlanması ve 72°C'de 1 dakika 45 saniye uzama basamaklarından oluşan toplam 34 döngü içeren bir protokol izlenmiştir. Son olarak 72°C'de 10 dakika ilave uzama basamağı uygulanmıştır.

3.2.3.2.5.2 16S rDNA PZR ürününün agaroz jelden alınarak saflaştırılması

Agaroz jelde yürütülmüş olan 16S rDNA gen bölgesi fragmentleri DNA dizi analizinden önce ticari olarak temin edilen 'agaroz jel DNA ekstraksiyon kiti' (Roche, USA) ile saflaştırılmıştır. İşlem, kit kullanım kılavuzu uygulanarak gerçekleştirilmiştir. 16S rDNA PZR ürününü içeren bölge UV ışık altında kesilerek jelden alınmış ve darası alınmış olan steril mikrosantrifüj tüplerine aktararak hassas terazide ölçümleri yapılmıştır. Her 100mg jel için 100µL agaroz çözme tamponu eklenmiş ve 58°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon esnasında numuneler 2-3 dakikada bir vortekslenmiştir. İnkübasyonun ardından numuneler 14000rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj neticesinde membranlı eppendorflara aktarılmıştır. 1 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra 14000rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve membranın altında kalan sıvı atılmıştır. Kolona 700µL membran yıkama solüsyonu eklenerek tekrar 14000rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve yine sıvı kısım atılarak 500µL membran yıkama solüsyonu daha eklenmiş, 14000rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım

uzaklaştırılmış olan kolon temiz bir eppendorf tüpüne alınarak 50µL nükleaz içermeyen su eklenmiş ve 1 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. Son olarak 14000rpm'de 1 dakika santrifüjün ardından elde edilen saflaştırılmış 16S rDNA PZR ürününü içeren sıvı fazın bir miktarı kullanılarak agaroz jel elektroforezinde (%1,5) saflığı kontrol edilmiş ve kalanı ileriki çalışmalar için -20°C'de saklanmıştır.

3.2.3.2.5.3 16S rDNA dizi analizi

PZR ürünlerinin dizi analizleri Refgen Biyoteknoloji (ODTÜ Teknokent/Ankara) tarafından yapılmıştır. Dizi analiz sonuçları, BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) programı kullanılarak veri tabanı ile karşılaştırılmış, tarama sonucu aranan dizi sırasının hangi mikroorganizmaya ait olabileceği, benzerlik yüzdesiyle belirlenmiştir (Altschul vd. 1997, Tang vd. 1998). BLAST, aranan dizi sırasını (nükleotid veya amino asit) veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait baz dizileri ile karşılaştırarak aynı veya en yakın olan dizi sırasının ait olduğu mikroorganizmayı, % yaklaşımla veren bir bilgisayar programıdır.

3.2.4 Suşların bakteriyosin üretim özelliklerinin belirlenmesi

Suşların bakteriyosin üretiminden sorumlu olup olmadığını belirlemek amacıyla 37°C'de 18 saat geliştirilen kültürlerden 1mL alınarak 12.000rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar pH değerleri 7'ye ayarlanıp 0.22µm çaplı (Millex, Milipore) filtrelerden geçirildikten sonra 100°C'de 5 dakika kaynatılarak antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılmıştır. Uygun besiyerlerinde 18 saat geliştirilen indikatör bakteriler ve patojen suşlar %0,1 oranında olacak şekilde 5 ml yarı-katı besiyerine eklenmiştir. Katı besiyerine indikatörlerin bulunduğu yarı-katı besiyeri yayılmıştır. Bakteriyosin aktivitesine sahip olup olmadığına bakılmak istenen 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. 1987). Zon oluşumunun görüldüğü suşlar bakteriyosin pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5 İzole edilen LAB suşlarının bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi

Çalışma kapsamında probiyotik özellikleri belirlenmek istenen suşların *in vitro* ve *in vivo* denemeleri gerçekleştirilmiştir. *In vitro* denemeler ile suşların antibiyotik duyarlılık seviyeleri, pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzlarına direnç özellikleri ve hemolitik aktiviteleri belirlenmiştir. *In vitro* denemelerde probiyotik kriterleri sağladığı tespit edilen suşların ise *in vivo* denemeler ile gastrointestinal sistemi canlı olarak geçebilme kapasiteleri tespit edilmiştir.

3.2.5.1 İzole edilen LAB suşlarının probiyotik özelliklerinin in vitro koşullarda belirlenmesi

3.2.5.1.1 Suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

Suşların antibiyotik dirençlilikleri EFSA (European Food Safety Authority) tarafından belirlenmiş olan 9 farklı antibiyotiğin kullanımı ile önce disk diffüzyon daha sonra ise minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) olarak belirlenmiştir. Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için öncelikle her bir suşun mikrobiyolojik sayımı yapılmıştır. Mikrobiyolojik sayım için 37°C'de 18 saat geliştirilen aktif kültürlerin serum fizyolojik sıvı içerisinde seri dilüsyonları yapılmış ve ardından 3 paralel olacak şekilde bu seyreltmelerden MRS agar ortamına yayma ekimler yapıp 48 saat 37°C'de geliştirildikten sonra petrilere 30 ile 300 arası koloni içerenler seçilmiş ve bu kolonilerin sayımı yapılarak sonuçlar kob/mL olarak hesaplanmıştır. Mikrobiyolojik sayımları gerçekleştirilmiş olan suşlar her iki çalışma için de 1×10^5 kob/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Disk diffüzyon yönteminde suşların hücre yoğunluğu, uygun sıcaklığa gelen besiyerinde ayarlandıktan sonra besiyeri petrilere dökülüp donması beklenmiştir. Daha sonra her petriye uygun aralıklarla farklı antibiyogram diskleri yerleştirilmiş ve 37°C' de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından antibiyotik diskleri etrafında oluşan zonların çapı mm olarak ölçüm yapılmıştır (Wilkins vd. 1972). MIC değerinin belirlenmesi için ise hücre yoğunluğu yine 1×10^5 olarak ayarlanan kültürlerle farklı konsantrasyonlarda antibiyotiklerin eklenmesi ve yine 37°C' de 18 saat inkübasyona bırakılması sonucunda kültürlerin gelişme göstermediği minimum antibiyotik değeri MIC değeri olarak belirlenmiştir.

3.2.5.1.2 Suşların düşük pH değerlerine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi

Probiyotiklerin bağırsaklara ulaşabilme yeteneğini belirlemek için mide sıvısına benzer bir pH ortamı oluşturulmaya çalışılmıştır. Böylece suşların midenin asidik ortamından geçerek bağırsaklara ulaşabilme yeteneği gözlemlenmiştir. Aktif kültürlerden MRS besiyerine %1 oranında aktifleştirme yapılmış ve 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda 1 ml aktif kültür alınmış ve 12000rpm' de 5 dakika 4°C'de santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırılmıştır. PBS (pH 7,4) ile çökelti 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra PBS tamponu 5M HCl ile pH' ı 1.0, 2.0 ve 3.0 olacak şekilde ayarlanmış ve bu pelletlere pH' ı ayarlanmış olan tamponlardan 1'er mL ilave edilerek vortekslenmiş, 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Kontrol için pH değeri 7,4 olan PBS kullanılmıştır. İnkübasyonun 0. , 1. , 2. ve 3.saatlerinde örneklerden numune olarak seri dilüsyonlardan geçirilmiş ve MRS katı besiyerlerine ekimler 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. Örneklerin 37°C'de 48 saat inkübasyonunun sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, log/kob olarak değerleri hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006).

3.2.5.1.3 Suşların pepsine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi

Suşların pepsine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi 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 12000rpm' de 5 dakika 4°C'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından iki kez PBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Pepsin içeren PBS (pH 2.0 ve pH 3.0) tamponları ile çözülerek 37°C' de 3 saat inkübasyonun ardından 0., 1., 2. ve 3. saatin sonunda örneklerden numune alınarak bunların seri dilüsyonlarının sonunda MRS katı ortama yayma ekim 3 paralel olarak yapılmıştır. Kontrol olarak pH 7.4 olan PBS kullanılmıştır. Örneklerin 37°C'de 48 saat inkübasyonunun sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, log/kob olarak değerler hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006).

3.2.5.1.4 Suşların pankreatine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi

Suşların pankreatine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi amacıyla 1 mg/ml pankreatin (Merck) içeren ve pH değeri 8.0' a ayarlanmış PBS tamponları ile çalışılmıştır. Aktif bakteri kültüründen 1 ml alınarak 12000rpm' de 5 dakika 4°C'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından iki kez PBS (pH 7.4) 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 dilüsyonlarının yapılmasıyla MRS katı ortama yayma ekim 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak pH 7.4 olan PBS kullanılmıştır. Örneklerin 37°C'de 24 saat inkübasyonunun sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, log/kob olarak değerler hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006).

3.2.5.1.5 Suşların safra tuzuna karşı direnç özelliğinin belirlenmesi

Suşların safra tuzuna karşı direnç özelliğinin belirlenmesi amacıyla %0.3, %0.5 ve %1 oranında safra tuzu (Merck) içeren MRS besiyerleri kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak safra tuzu içermeyen MRS besiyeri kullanılmıştır. Aktif bakteri kültürlerinden 1 ml alınarak 12000rpm' de 5 dakika 4°C'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından iki kez PBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Safra tuzu (%0.3, %0.5 ve %1) içeren MRS besiyerlerinde 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 48 saat inkübasyonunun sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, log/kob olarak değerler hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006).

3.2.5.1.6 Suşların hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi

Hemolitik aktiviteleri belirlenmek istenen suşlar 37°C'de 18 saat geliştirildikten sonra %5 koyun kanı içeren Colombia agara (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 oluşturanlar β-hemolitik, parlak

yeşil zon oluşturan koloniler α -hemolitik ve zon oluşturmayanlar ise γ -hemolitik olarak değerlendirilmiştir (Maragkoudakis vd. 2006).

3.2.5.2 Suşların *in vivo* koşullarda gastrointestinal sistemden canlılığını koruyarak geçişinin belirlenmesi

Tasarlanan bu çalışmanın amacı, *in-vitro* deneyler sonucunda GIS şartlarına dirençli olduğu belirlenen *Lactobacillus plantarum* OZH8 ve *Lactobacillus sakei* OZH3 suşlarının *in-vivo* koşullarda GIS şartlarından canlı olarak geçebilme yeteneğini belirlemektir. Bu amaç için fare fekal örnekleri kullanılmıştır. Bir kontrol ve iki suş için de birer deney grubu olmak üzere üç grubun kullanıldığı bu çalışmada ayrı kafeslerde barındırılan her bir grupta 7 adet fare bulunmaktadır. Fareler beslemeye başlamadan önce gruplara ayrılıp kafeslenerek 1 hafta adaptasyon sürecinde tutulmuştur. Deney 1 grubu PBS içerisinde hazırlanmış OZH8 suşu (10^9 kob/200 μ L) ile, deney 2 grubu ise yine PBS içerisinde hazırlanmış OZH3 suşu (10^9 kob/200 μ L) ile beslenmiştir. Kontrol grubuna ise 200 μ L PBS verilmiştir. Beslemede kullanılan bakteri çözeltilerinin hazırlanması için 37°C'de 18 saat geliştirilen suşlar 10000rpm'de 2 dakika santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet PBS ile iki kez yıkanmış ve bakteri yoğunluğu 10^9 kob/mL olacak şekilde ayarlanarak PBS içerisinde çözülmüştür. Fareler 3 gün süreyle beslenmiş ve her bir gruptan beslemeden önce (0. saat) ve düzenli beslemeyi takiben belirli saatlerde (2, 4, 6, 8, 24 ve 48. saatler) ve beslemenin bittiği günün 24. saatinde fekal örnekler toplanmıştır. Farelerden toplanan fekal örnekler son hacim 100mg/mL olacak şekilde steril serum fizyolojik sıvı (% 0,85 NaCl) ile vortekslenerek homojen hale getirildikten sonra seri dilüsyonları gerçekleştirilmiştir. Dilüsyonun ardından suşlara özel belirli oranlarda amfisilin, kanamisin, oksasilin, penisilin, neomisin ve vankomisin antibiyotiklerini içeren besiyerlerine yayma ekimler yapılmıştır. 37°C'de 48 saat inkübasyonun ardından seçici besiyerlerinde gelişen koloniler sayılmış ve sonuçlar log kob/mL olarak hesaplanmıştır. *In vivo* çalışmada tüm aşamalar üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.6 İstatistiksel 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. Tüm istatistiksel analizlerde $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Farklı Kaynaklardan Bakterilerin İzolasyonu

Araştırmada başlangıç olarak 3-18 ay aralığındaki kendisi veya annesi son 3 ay süresinde antibiyotik kullanmamış üç farklı bebeğin gaitasından izole edilen 4 adet ve menopoza girmemiş, herhangi bir doğum kontrol yöntemi ile korunmayan ve 3 ay süre içerisinde antibiyotik kullanmayan bayanların vajinasından Özel Akropol Hastanesi'nde uzmanlar tarafından alınan smear örneklerinden izole edilen 7 adet izolat ve daha önce önceki bir çalışmada 12 aylık bir bebek gaitasından izole edilip moleküler teknikler neticesinde *Lactobacillus plantarum* olarak tanımlanan Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı'ndan temin edilen 1 adet suş olmak üzere toplam 12 adet insan kaynaklı izolat kullanılmıştır.

Gıda kaynaklı izolatlar ise Türkiye'nin farklı il veya ilçelerinden alınan fermente gıda örneklerinden izole edilmiştir. Kullanılan bütün gıda numuneleri ev yapımı olup hiçbir ticari gıdadan ürününden numune toplanmamış veya çalışma yapılmamıştır. İki farklı yoğurt numunesinden (Ankara/Sincan, Ankara/Polatlı) 3 adet, iki farklı peynir numunesinden ve bunların peynir altı suyundan (Ankara/Sincan, Ankara/Polatlı) 10 adet, iki farklı sucuk numunesinden (Ankara/Haymana, Kastamonu/Ilgaz) 5 adet, şalgam suyundan (Adana/Erzin) 7 adet ve turşu suyundan (Ankara/Çubuk) ise 3 adet olmak üzere toplam 28 adet gıda kaynaklı izolat ile çalışmaya başlanmıştır.

İnsan ve gıda kaynaklı örneklerin steril fizyolojik su (% 0.85 NaCl) içerisinde 10^{-7} düzeyine kadar seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyon tüpünden MRS Agar ortamlarına yayma ekimler yapılmış ve 37 °C'de 48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. inkübasyon süresi sonunda tipik koloni morfolojisine sahip olan izolatlar seçilerek steril öze yardımı ile MRS broth besiyerine aktarılmış ve 24 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. İzole edilen bakterilere laboratuvar çalışmaları sırasında verilen kodlar ve izolasyon kaynakları çizelge 4.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1 İzolatlara verilen kodlar ve izolasyon kaynakları

İzolasyon Kod No	İzolasyon Kaynağı
YA	Yoğurt
YB	Yoğurt
PAS1	peyniraltı suyu
PAS2	peyniraltı suyu
PAS3	peyniraltı suyu
PAS4	peyniraltı suyu
P1	Peynir
P2	Peynir
P3	Peynir
P4	Peynir
S1	Sucuk
S2	Sucuk
S3	Sucuk
ŞG1	şalgam suyu
ŞG3	şalgam suyu
ŞG4	şalgam suyu
ŞG7	şalgam suyu
ŞG8	şalgam suyu
ŞG9	şalgam suyu
ŞG10	şalgam suyu
EG1	bebek gaitası
EG2	bebek gaitası
SK1	Sucuk
SK2	Sucuk
PN1	Peynir
PN2	Peynir
YN	Yoğurt
TŞF1	turşu suyu
TŞF2	turşu suyu
TŞF3	turşu suyu
UG	bebek gaitası
G1	bebek gaitası
V1	vajinal sekresyon
V5	vajinal sekresyon
V7	vajinal sekresyon
V14	vajinal sekresyon
V15	vajinal sekresyon
V20	vajinal sekresyon
V21	vajinal sekresyon

4.2 İzolatların Karakterizasyonu

4.2.1 İzolatların kısmi karakterizasyonu

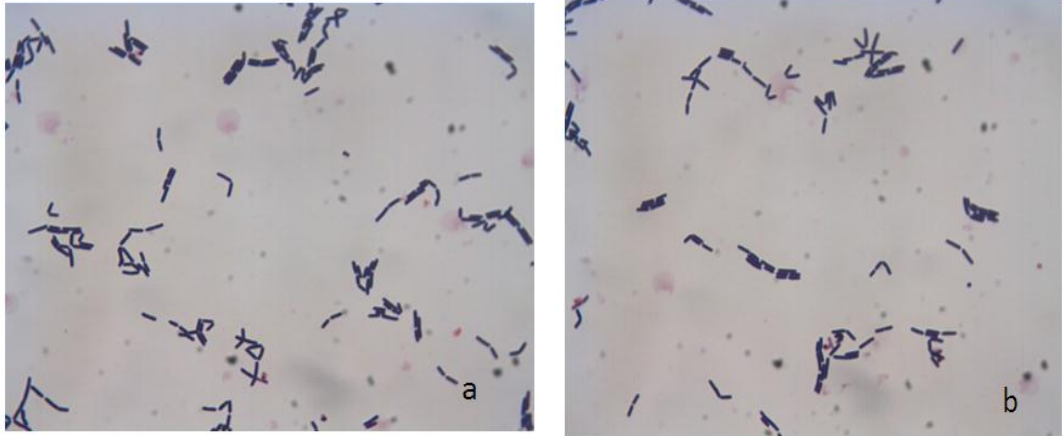
İzolatların kısmi karakterizasyonunda gram boyama sonuçları, katalaz testi sonuçları ve morfolojileri belirlenmiştir (Çizelge 4.2). İzolatlar boyama işlemi için öncelikle morfolojilerini gözlemek amacıyla metilen mavisi ile boyanarak ve daha sonraki aşamada gram boyama yapılarak 1000X büyütme ışık mikroskopunda (ZEISS AxioCam MRc5 Imager System) gözlemlenmiştir. Gram boyama sonuçlarının görüntüleri (Şekil 4.1) alınmıştır. İzolatların katalaz testi sonuçlarına bakıldığında 3 tanesi katalaz pozitif gerisi katalaz negatif olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2 İzolatların kısmi karakterizasyon sonuçları

İzolat Kod No	Gram Boyama	Morfoloji	Katalaz Aktivitesi
YA	+	basil	-
YB	+	basil	-
PAS1	+	kok	-
PAS2	+	kok	-
PAS3	+	kok	-
PAS4	-	basil	+
P1	+	kok	+
P2	-	basil	-
P3	-	basil	-
P4	-	basil	-
S1	+	kok	-
S2	+	kok	-
S3	+	basil	-
ŞG1	+	basil	-
ŞG3	+	basil	-
ŞG4	-	basil	-
ŞG7	-	basil	-
ŞG8	+	basil	-
ŞG9	+	basil	-
ŞG10	-	basil	-
EG1	+	kok	-
EG2	+	kok	-
SK1	-	kok	+
SK2	+	basil	-

Çizelge 4.2 İzolatların kısmi karakterizasyon sonuçları (devam)

PN1	+	kok	-
PN2	+	basil	-
YN	+	basil	-
TŞF1	+	basil	-
TŞF2	+	basil	-
TŞF3	+	basil	-
UG	+	kok	-
G1	+	kok	-
V1	+	kok	-
V5	+	kok	-
V7	+	kok	-
V14	+	kok	-
V15	+	kok	-
V20	+	kok	-
V21	+	kok	-



Şekil 4.1 Gram boyama yapılmış S3 a. ve PN2 b. izolatlarının ışık mikroskopunda görüntüleri

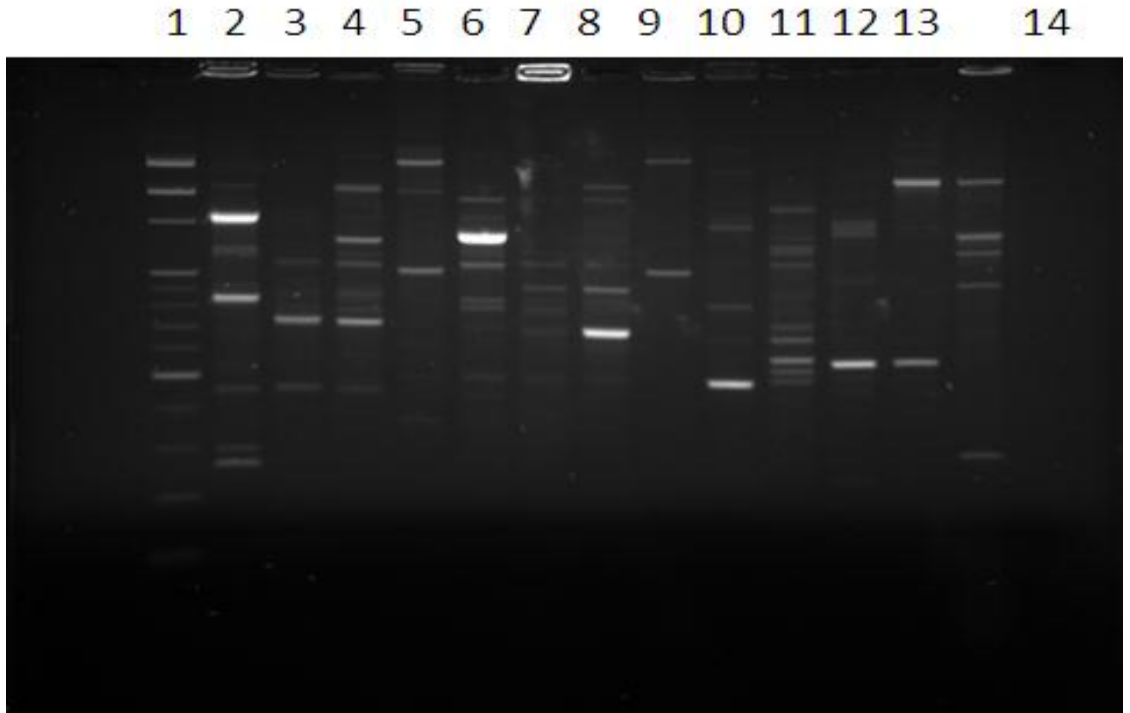
4.2.2 İzolatların genotipik karakterizasyonu

4.2.2.1 İzolatların RAPD PZR profilleri

İzolatlardan gerçekleştirilen genomik DNA izolasyonunun ardından DNA'lar saflık ve miktar tayini için nanodrop spektrofotometrede okunmuş ve OD₂₆₀/OD₂₈₀ değerlerinin

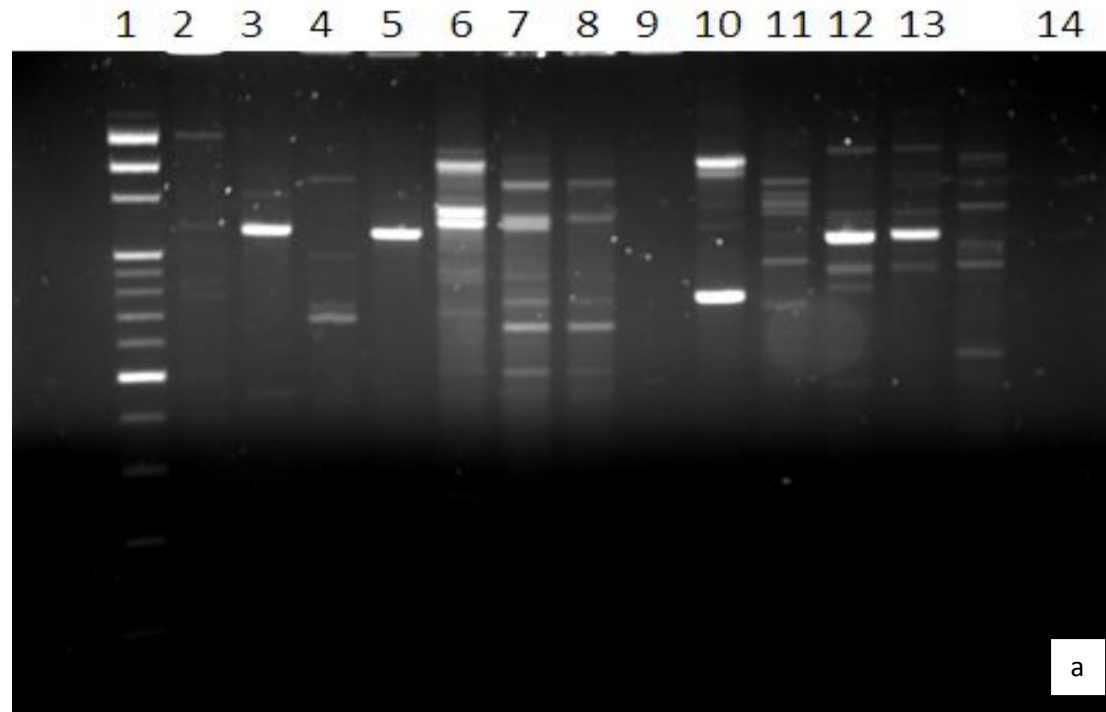
her bir örnek için 1.75-2.0 arasında olup konsantrasyonlarının uygun miktarda olduğu ve dolayısıyla izole edilen DNA'nın genomik çalışmalar için uygun olduğu belirlenmiştir.

OPA1, OPA7, OPA8 ve OPA16 primerleri ve elde edilen genomik DNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen RAPD PZR sonucunda oluşan ürünler %1.5'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Görülen RAPD profilleri izolatlar için karşılaştırılmıştır.

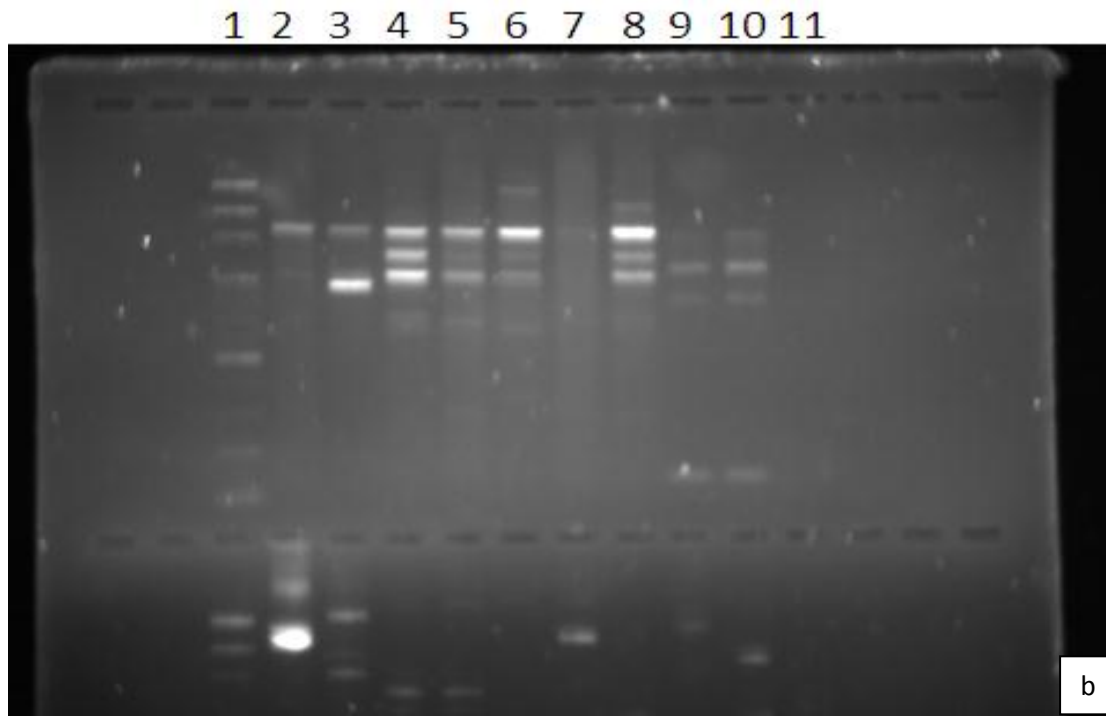


1: Marker 2: UG 3: G1 4: EG1 5: EG2 6: TŞF1 7: TŞF2 8: TŞF3 9: PN1 10: PN2 11: YN 12: SK1 13: SK2 14: Negatif kontrol

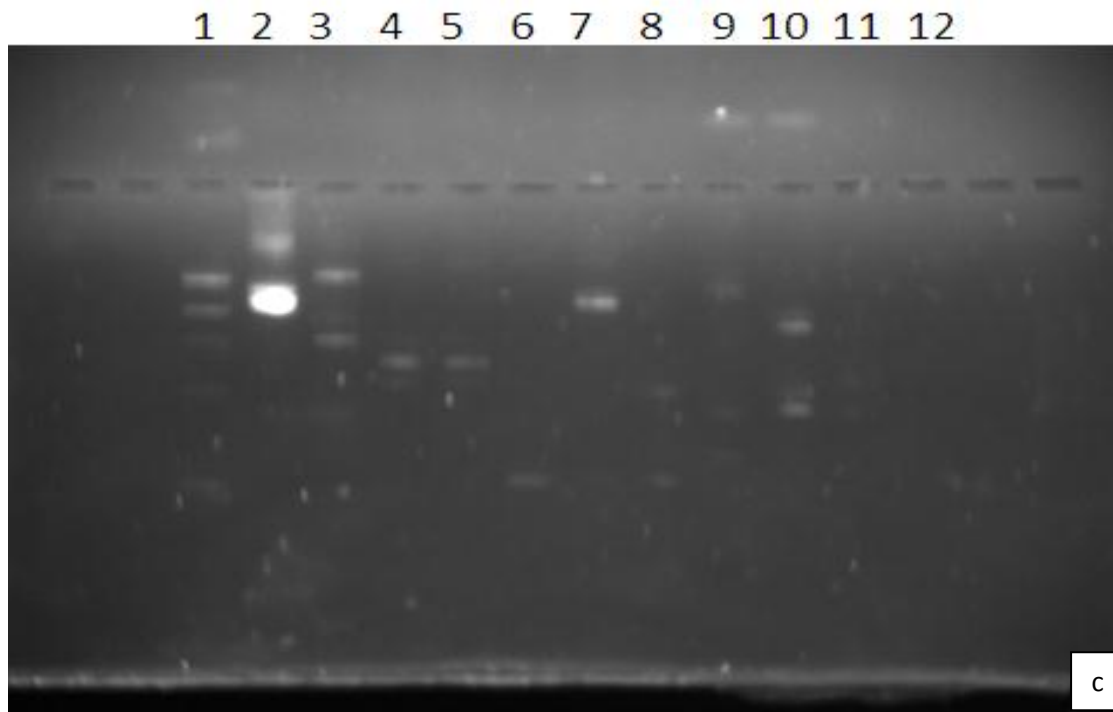
Şekil 4.2 OPA1 primeri ile yapılan RAPD PZR jel görüntüsü



1: Marker 2: UG 3: G1 4: EG2 5: EG1 6: TŞF1 7: TŞF2 8: TŞF3 9: PN1 10: PN2 11: YN 12: SK1 13: SK2 14: Negatif kontrol

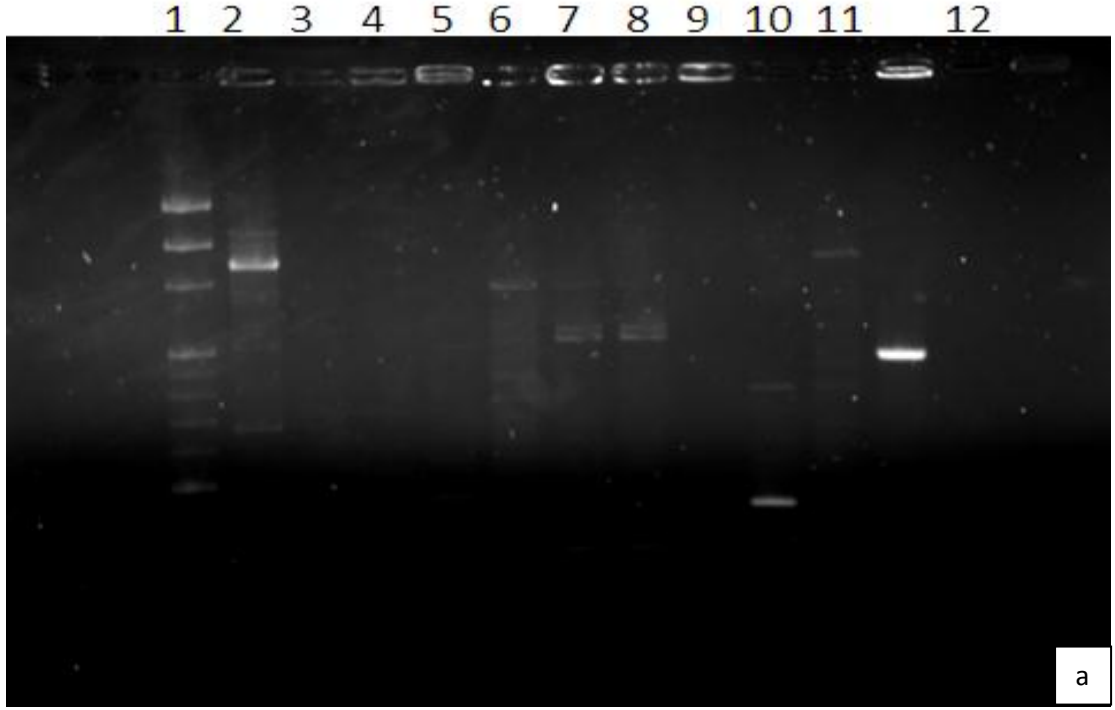


1: Marker 2: ŞG1 3: ŞG3 4: ŞG4 5: ŞG7 6: ŞG8 7: ŞG9 8: ŞG10 9: YA 10: YB 11: Negatif

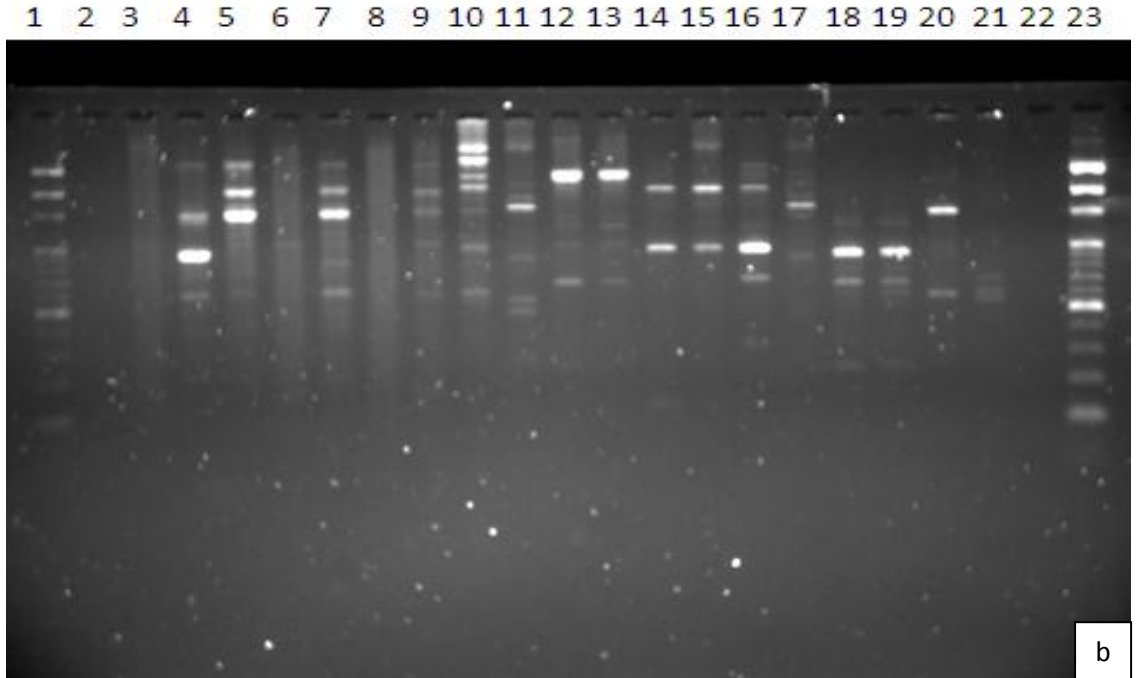


1: Marker 2: P1 3: P2 4: P3 5: P4 6: PAS1 7: PAS2 8: PAS3 9: PAS4 10: S1 11: S3 12: Negatif kontrol

Şekil 4.3 OPA7 primeri ile yapılan RAPD PZR jel görüntüsü

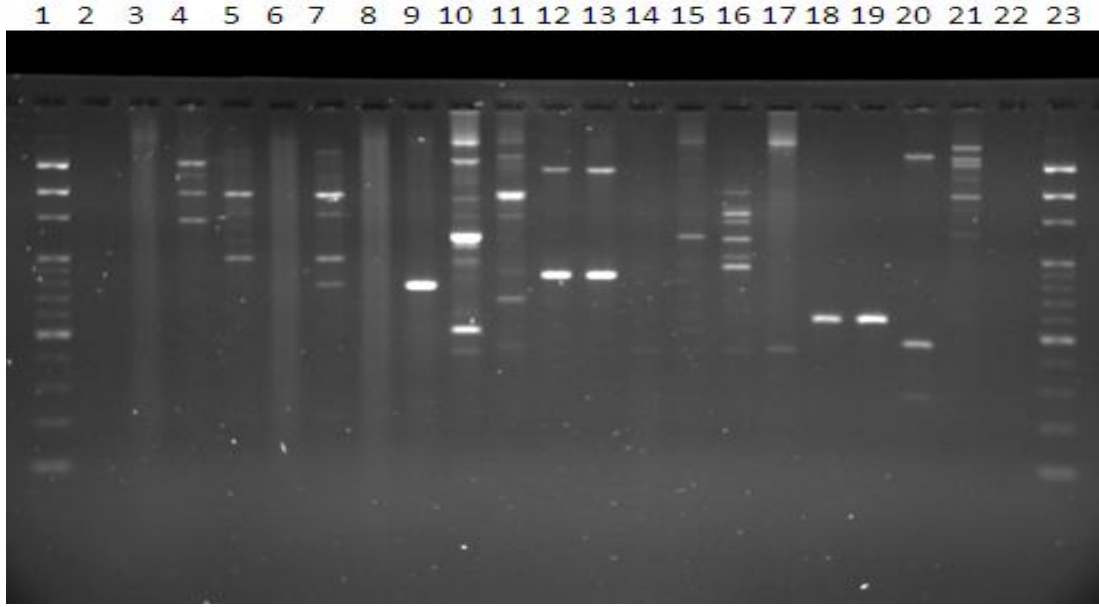


1: Marker 2: UG 3: G1 4: EG1 5: EG2 6: TŞF1 7: TŞF2 8: TŞF3 9: PN1 10: PN2 11: YN 12: Negatif kontrol



1: Marker 2: Negatif kontrol 3: ŞG1 4: ŞG3 5: ŞG4 6: ŞG7 7: ŞG8 8: ŞG9 9: ŞG10 10: P1 11: P2 12: P3 13: P4 14: PAS1 15: PAS2 16: PAS3 17: PAS4 18: YA 19: YB 20: S1 21: S3 22: Negatif kontrol 23: Marker

Şekil 4.4 OPA8 primeri ile yapılan RAPD PZR jel görüntüsü



1: Marker 2:Negatif kontrol 3: ŞG1 4: ŞG3 5: ŞG4 6: ŞG7 7: ŞG8 8: ŞG9 9: ŞG10 10: P1 11: P2 12: P3 13: P4 14: PAS1 15: PAS2 16: PAS3 17: PAS4 18: YA 19: YB 20: S1 21: S3 22: Negatif kontrol 23: Marker

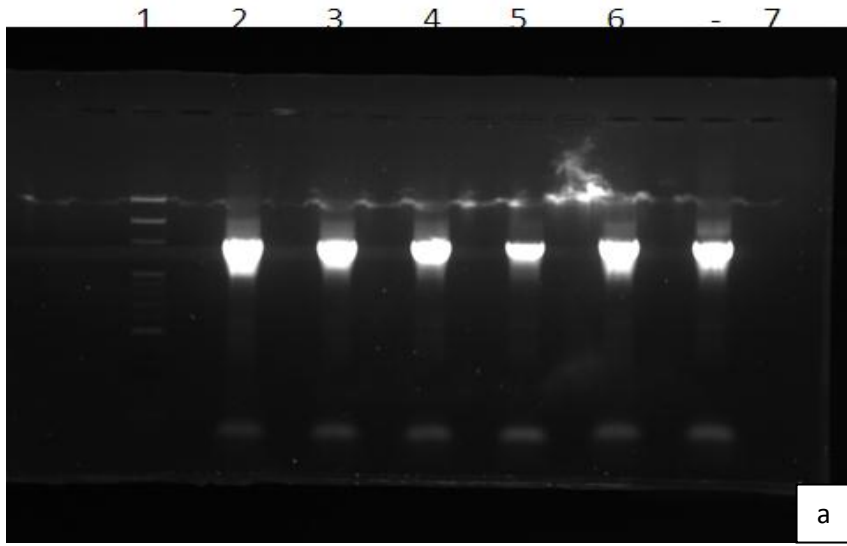
Şekil 4.5 OPA16 primeri ile yapılan RAPD PZR jel görüntüsü

Agaroz jeldeki görüntüleri karşılaştırıldığında farklı profiller gösteren izolatlar seçilmiştir. Laboratuvar kodları olarak sırasıyla PAS2, S1, S3, ŞG1, ŞG3, ŞG8, YA, EG1, EG2, PN1, PN2, SK, TŞF1, TŞF2, UG, YN, V1, V5, V7, V14, V15, V20 ve V21 olmak üzere toplam 23 adet izolat daha sonraki aşamada çalışmalara devam etmek üzere seçilmiştir.

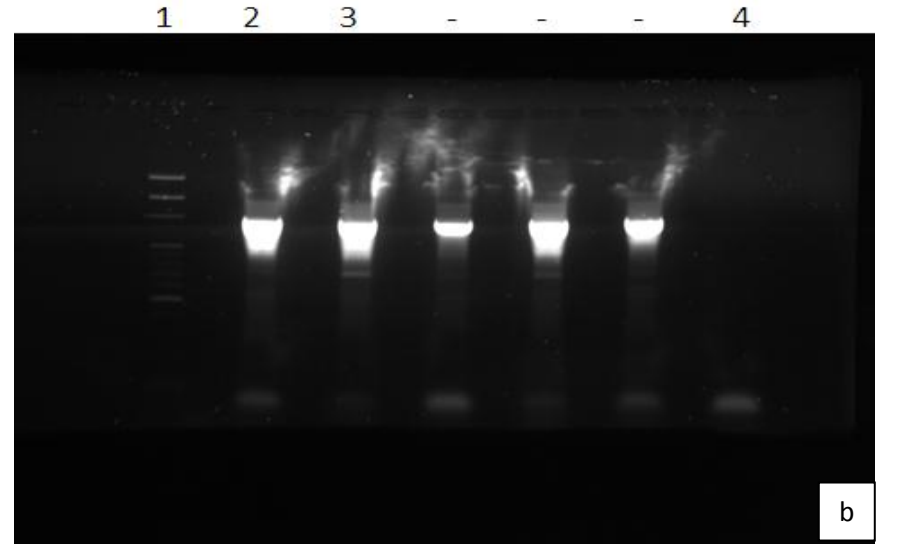
4.2.2.2 İzolatların 16S rDNA dizi analizi

RAPD PZR profillerine ve gram pozitif olma özelliklerine bakılarak genotipik karakterizasyonlarının yapılması için seçilen 23 adet insan ve gıda kaynaklı izolattan elde edilmiş olan genomik DNA' lar, 16S rDNA ileri ve geri primerleri kullanılarak PZR reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Bu reaksiyon sonucunda oluşan ürünler agaroz jel elektroforezi ile yürütülerek jel görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.6). Bu aşamada saf olmayan 16S rDNA gen bölgesi fragmentleri 'agaroz jel DNA ekstraksiyon kiti' kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PZR ürünlerinin bir miktarı kontrol amaçlı tekrar agaroz jelde yürütülmüş ve saflıkları görülmüştür (Şekil 4.7). Saflaştırılan 16s

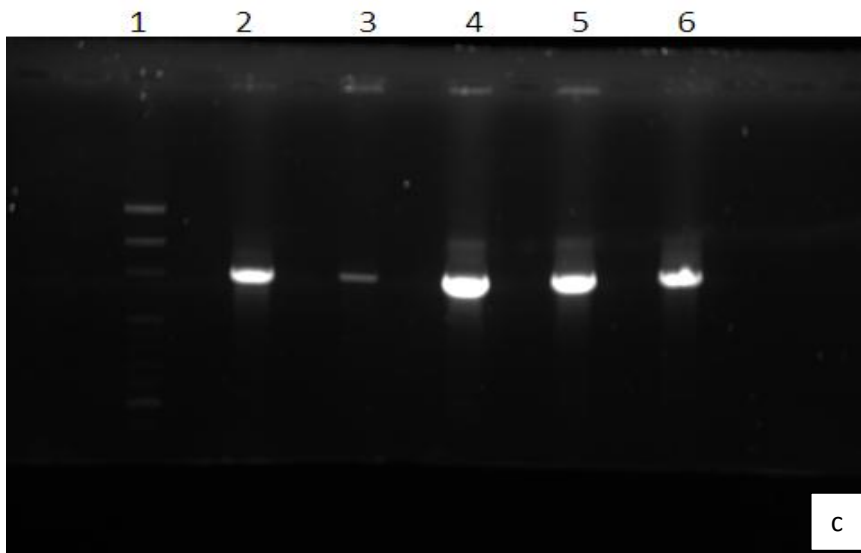
rDNA gen bölgesi fragmentlerinin Refgen Biyoteknoloji (ODTÜ Teknokent/Ankara) tarafından yapılan dizi analizinden elde edilen baz sıralarının NCBI BLAST veri tabanında gerçekleştirilen karşılaştırmalı yorumlarından ortaya çıkan kesin tanı sonuçları (%99 benzerlik oranıyla) ve laboratuvar kültür koleksiyonuna eklenen bu suşların bundan sonraki çalışmalar için kullanılmak üzere verilen suş adları çizelge 4.3’de verilmiştir.



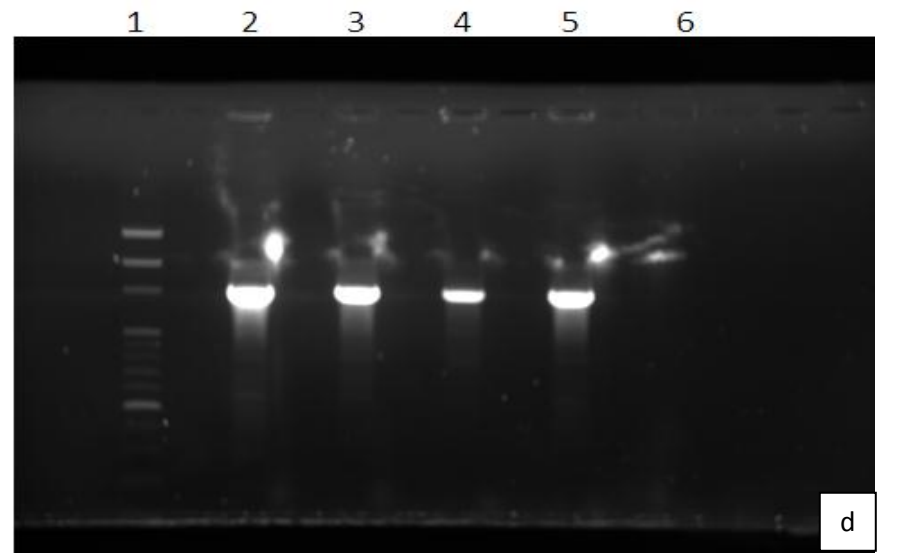
1: Marker 2: ŞG1 3: ŞG3 4: ŞG8 5: S1 6: S3 7: Negatif kontrol



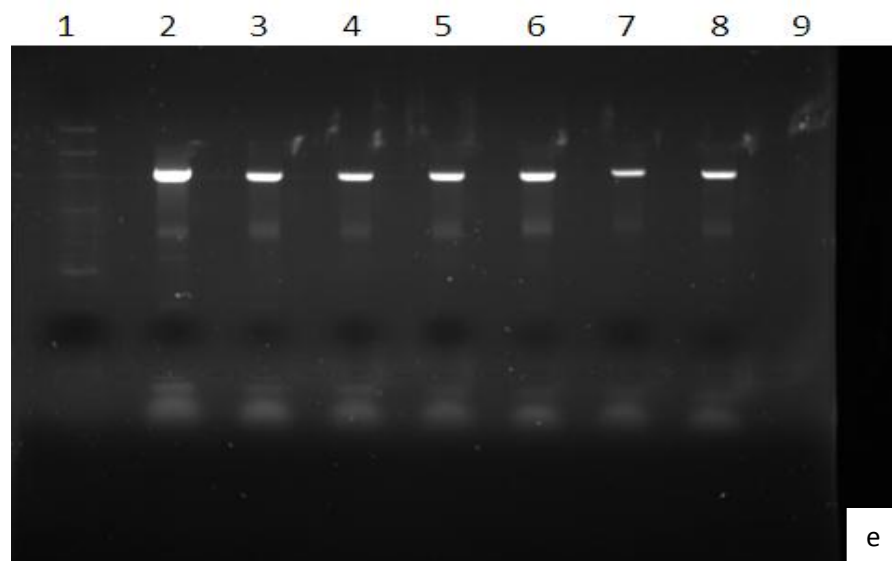
1: Marker 2: PAS2 3: YA 4: Negatif kontrol



1: Marker 2: TŞF1 3: TŞF3 4: UG 5: EG1 6: EG2

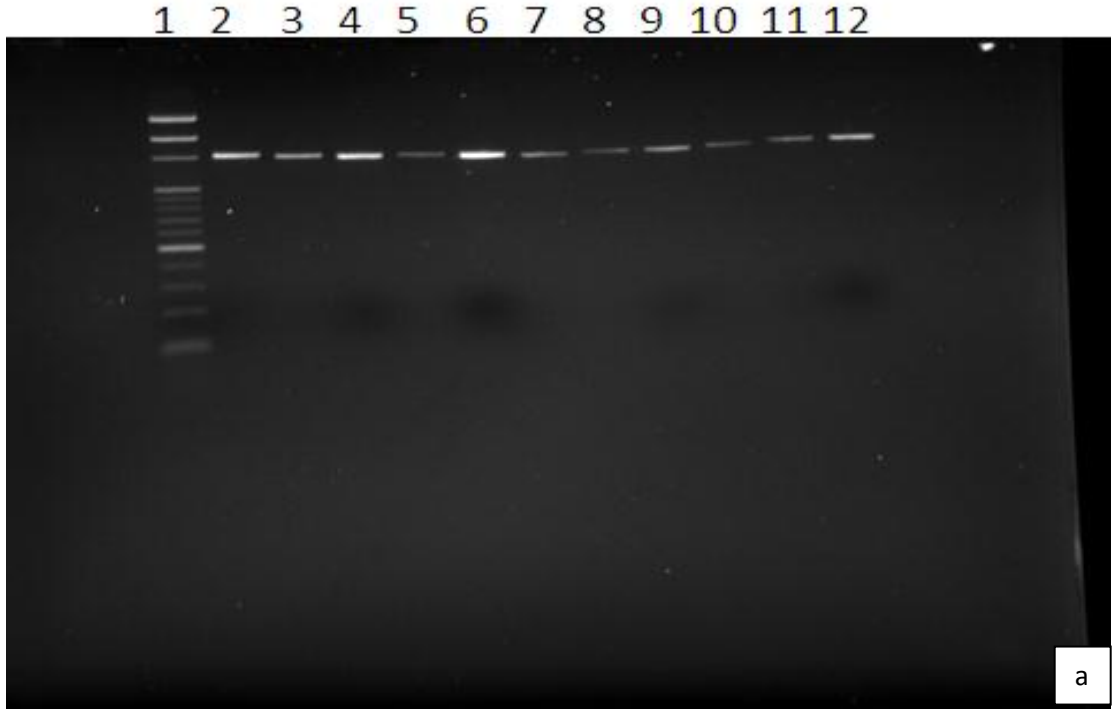


1: Marker 2: PN1 3: PN2 4: YN 5: SK2 6: Negatif kontrol

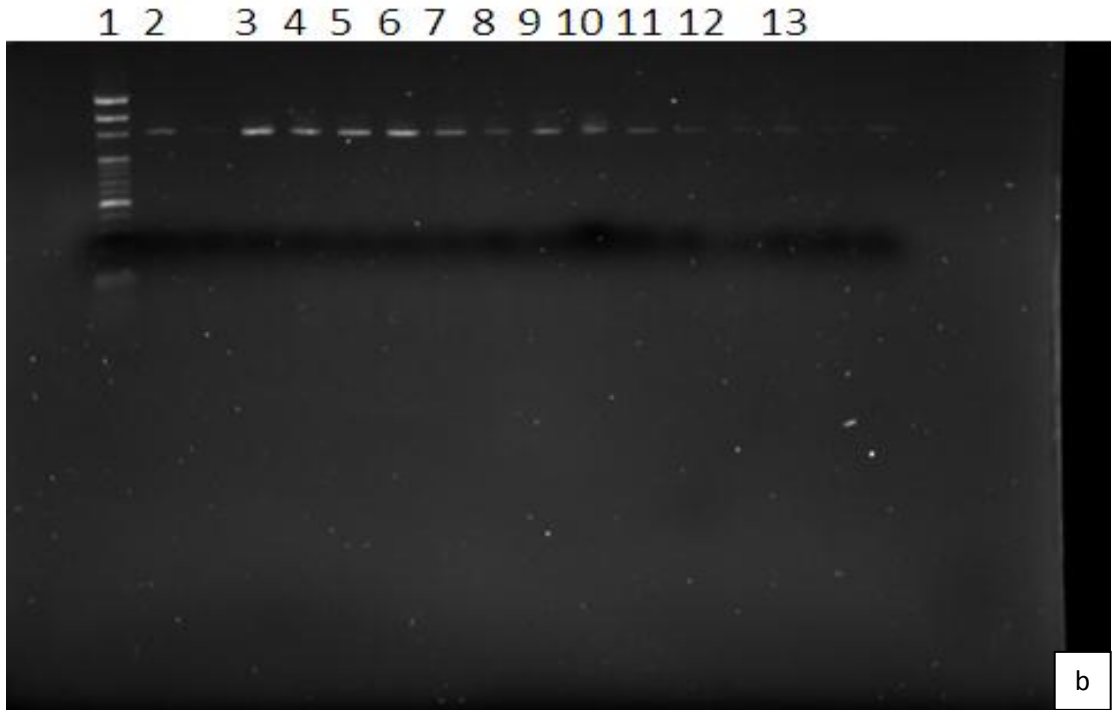


1: Marker 2: V1 3: V5 4: V7 5: V14 6: V15 7: V20 8: V21 9: Negatif kontrol

Şekil 4.6 PZR ile çoğaltılmış 16S rDNA bölgelerinin saflaştırılmadan önce jel görüntüsü



1: Marker 2: ŞG1 3: ŞG3 4: ŞG8 5: S1 6: S3 7: PAS2 8: YA 9: PN1 10: PN2 11: YN 12: SK2



1: Marker 2: TŞF1 3: TŞF3 4: UG 5: EG1 6: EG2 7: V1 8: V5 9: V7 10: V14 11: V15 12: V20 13: V21

Şekil 4.7 Saflaştırılmış 16S rDNA bölgeleri

Çizelge 4.3 İzolatların 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre gerçekleştirilen tanısı ve verilen suş adları

İzolat Kod No	16S rDNA Dizisine Göre Yapılan Tanı	Suş Adı
PAS2	<i>Lactococcus lactis</i>	OZH1
S1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	OZH2
S3	<i>Lactobacillus sakei</i>	OZH3
ŞG1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	OZH4
YA	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	OZH5
EG1	<i>Enterococcus faecalis</i>	OZH6
EG2	<i>Enterococcus faecium</i>	OZH7
PN2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	OZH8
SK	<i>Lactobacillus sakei</i>	OZH9
TŞF1	<i>Lactobacillus brevis</i>	OZH10
V1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	OZH11
YN	<i>Lactobacillus helveticus</i>	OZH12

4.3 Suşların Bakteriyosin Üretim Özellikleri

İnsan ve gıda örneklerinden izole edilen ve karakterizasyonları yapılan laktik asit bakteri suşlarının bakteriyosin üretiminden sorumlu olup olmadıklarını belirlemek amacıyla 7 farklı indikatör bakteriye karşı nokta ekim yöntemi ile ekim yapıp 18 saat inkübasyon sonucunda inhibisyon zonunun oluşup oluşmadığına bakılarak suş bakteriyosin pozitif veya bakteriyosin negatif olarak belirlenmiştir. Test edilen suşların arasından yalnızca *Pediococcus pentosaceus* OZH2 suşu bakteriyosin aktivitesi göstermiştir. Daha sonra bu suşun bakteriyosin aktivite özelliği doğrulanmak amacıyla Proteinaz K ile muamele edilerek bakteriyosin aktivitesi inaktive edilmiş ve bakteriyosin üretiminden sorumlu olduğu doğrulanmıştır. OZH2, bakteriyosin pozitif olarak nitelendirilirken diğer bütün suşlar bakteriyosin negatif olarak belirlenmiştir.

4.4 Farklı Kaynaklardan İzole Edilen LAB Suşlarının Bazı Probiyotik Özellikleri

4.4.1 LAB suşlarının probiyotik özelliklerinin *in vitro* koşullarda belirlenmesi

4.4.1.1 Suşların antibiyotik duyarlılıkları

EFSA tarafından belirlenmiş 9 antibiyotige karşı (kanamisin, amfisilin, vankomisin, streptomisin, gentamisin, eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve klindamisin) disk diffüzyon yöntemi uygulanmıştır.

Disk diffüzyon yöntemine göre suşlarda en çok direnç gösterilen antibiyotik kanamisin olarak belirlenmiş ve öncelikle bu antibiyotik ile tüm suşlar üzerinde MIC değeri hesaplanmıştır. Kanamisin MIC değeri hesaplanan 13 suştan EFSA'nın antibiyotik dirençliliği için belirlediği güvenlik aralığına göre 7 tanesinin fazla dirençli olduğu belirlenerek sonraki çalışmalar için elenmiştir. Kanamisine gösterdikleri yüksek dirençten dolayı elenen suşlar; *Pediococcus pentosaceus* OZH2 (MIC=90mg/L), *Lactobacillus fermentum* OZH4 (MIC=60mg/L), *Lactobacillus delbrueckii* OZH5 (MIC=30mg/L), *Lactobacillus plantarum* (MIC=90mg/L), *Enterococcus faecium* OZH7 (MIC=1200mg/L), *Lactobacillus helveticus* OZH12 (MIC=30mg/L), *Pediococcus acidilactici* (MIC=90mg/L). Diğer 6 suş ise kanamisine duyarlıdır. Bunlar sırasıyla MIC değerleriyle birlikte; *Lactobacillus sakei* OZH3; 10mg/L, *Lactococcus lactis* OZH1; 70mg/L, *Lactobacillus plantarum* OZH8; 60mg/L, *Lactobacillus sakei* OZH9; 30mg/L, *Lactobacillus brevis* OZH10; 40mg/L, *Enterococcus faecalis* OZH6; 1000mg/L olarak belirlenmiştir.

Sonraki aşamada kanamisine duyarlı olduğu belirlenen bu 6 suшта amfisilinin MIC değeri belirlenmiştir. OZH10 suşu amfisiline dirençli (MIC=10mg/L) bulunmuştur. Geri kalan 5 suş amfisiline duyarlıdır. Bunlar sırasıyla MIC değerleriyle birlikte; OZH3;1.5mg/L, OZH1;0.5mg/L, OZH8;0.5mg/L, OZH9;1.5mg/L, OZH6;0.5mg/L olarak belirlenmiştir.

Daha sonra kalan suşların vankomisin ile MIC değeri hesaplanmıştır. Vankomisinde dirençten dolayı elenen suş olmamıştır. Suşların vankomisin MIC değerleri; OZH3;1000mg/L, OZH1;1mg/L, OZH8;1000mg/L, OZH9;1000mg/L, OZH6;2mg/L. Bu suşlarla streptomisin MIC değeri belirlemek amacıyla çalışmaya devam edilmiştir. OZH1 ve OZH6 suşları streptomisine dirençli bulunmuştur. Sırasıyla MIC değerleri; 60mg/L ve 200mg/L olarak hesaplanmıştır. Diğer 3 suşun streptomisin MIC değerleri ise OZH8;10mg/L, OZH9;10mg/L, OZH3;30mg/L olarak belirlenmiştir.

Kalan 3 suşun, gentamisin, eritromisin, tetrasiklin ve kloramfenikol kullanımı ile belirlenen MIC değerlerinde bu antibiyotiklere duyarlı oldukları belirlenmiştir. Gentamisin MIC değerleri, OZH8;5mg/L, OZH9;10mg/L, OZH3;15mg/L. Eritromisin MIC değerleri; OZH8;1mg/L, OZH9;1mg/L; OZH3;1mg/L. Tetrasiklin MIC değerleri; OZH8;32mg/L, OZH9;8mg/L, OZH3;8mg/L. Kloramfenikol MIC değerleri; OZH8;8mg/L, OZH9;4mg/L, OZH3;4mg/L.

Sonuç olarak antibiyotik duyarlılıkları belirlenen bu suşlardan EFSA'nın güvenlik kriterlerine göre aşırı dirençli olarak belirlenen suşlar elimine edilerek antibiyotiklerin hepsine karşı belirtilen dozda direnç gösteren veya duyarlı olan *Lactobacillus sakei* OZH3, *Lactobacillus plantarum* OZH8 ve *Lactobacillus sakei* OZH9 suşları ile daha sonraki çalışmalara devam edilmiştir.

4.4.1.2 Suşların düşük pH değerlerine karşı direnç özellikleri

Bir suşun probiyotik özellik gösterebilmesi için sindirim sisteminden geçerken midenin 1-4 arasında değişen düşük pH'sına karşı dirençli olması gerekmektedir. Midede kalma süresi 3 saat olduğu için suşların düşük pH seviyelerinde 3 saat süreyle canlılık değişimi gözlemlenmiştir (Vinderola ve Reinheimer 2003, Dunne vd. 2001).

pH denemelerinde; *Lactobacillus sakei* OZH3, *Lactobacillus plantarum* OZH8 ve *Lactobacillus sakei* OZH9 suşlarının üçünün de pH 1.0 değerinde 1 saat içerisinde bütün canlılıklarını kaybettikleri tespit edilmiştir.

Lactobacillus sakei OZH3 suşunun pH 2.0'de 1. saatin sonunda %18.6 oranında canlılık gösterdiği, 2. saatin sonunda ise canlılığını tamamen kaybettiği gözlemlenmiştir. pH 3.0 için yapılan deneylerde bu suş 1. saatin sonunda canlılığını %95 oranında, 2. saatin sonunda canlılığını %93 oranında ve 3. saatin sonunda ise canlılığını %87.5 oranında korumuştur. Kontrol olarak kullanılan pH 7.4' te canlılığın 3. saat sonunda halen %96 oranında korunduğu tespit edilmiştir.

Lactobacillus plantarum OZH8 suşunun pH 2.0'de 1. saatin sonunda %37 oranında canlılık gösterdiği, 2. saatin sonunda ise canlılığını tamamen kaybettiği belirlenmiştir. pH 3.0 için yapılan deneylerde OZH8 suşu 1. saatin sonunda canlılığını %98 oranında korurken 3. saatin sonunda canlılık %97 oranında devam etmektedir. Kontrol olarak kullanılan pH 7.4'te ise bu suşun canlılığı 3. saat sonunda %98 oranındadır.

Lactobacillus sakei OZH9 suşu pH 2.0'de 1 saat içerisinde canlılığını tamamen kaybetmektedir. pH 3.0 değerinde bu suş canlılığını 1. saatin sonunda ancak %52 oranında, 2. saatin sonunda %51 oranında ve 3. saatin sonunda ise canlılığını %43 oranında devam ettirebilmiştir. Kontrol olarak kullanılan pH 7.4'te canlılık 3. saatin sonunda %90 oranındadır.

4.4.1.3 Suşların pepsine karşı direnç özellikleri

pH 2.0 ve 3.0'deki pepsin uygulamasının amacı sindirim sistemine ulaşan mikroorganizmaların gastrik koşullara direnç düzeylerinin in-vitro olarak belirlenmesidir (Maragkoudakis vd. 2006).

Lactobacillus sakei OZH3 suşunun pepsin uygulamasında pH 2.0'de 1. saatin sonunda %14 oranına kadar düşen canlılık 2. saatten itibaren tamamen kaybolmuştur. pH 3.0 pepsin uygulamasında OZH3 suşu canlılığını 1. saatin sonunda %96.5 oranında, 2. saatin sonunda %93 oranında, 3. saatin sonunda ise %87 oranında korumuştur. Kontrol olarak çalışılan pH 7.4'te ise 3. saatte canlılık %96.5 oranında devam etmektedir.

Lactobacillus plantarum OZH8 suşu pH 2.0 pepsin uygulamasının 1. saatinde canlılığını %37 oranında devam ettirirken 2. saat sonundan itibaren canlılık kaybolmuştur. pH 3.0 pepsin uygulamasında bu suş canlılığını 1. saatin sonunda %97 oranında korurken 3. saatin sonunda %96 oranında devam etmektedir. Kontrolde ise 3. saatte canlılık %98'dir.

Lactobacillus sakei OZH9 suşu pH 2.0 pepsin uygulamasında 1 saat içerisinde canlılığını kaybetmiştir. pH 3.0 pepsin uygulamasında bu suş 1. saat sonunda %46.5 oranına düşen canlılığını 3. saat sonunda ancak %35 oranına kadar koruyabilmiştir. Kontrolde ise suşun canlılığı 3. saat sonunda %91 oranındadır.

4.4.1.4 Suşların pankreatine karşı direnç özellikleri

OZH3 suşunun pankreatin uygulamasında 4. saatin sonunda kontrol grubunda canlılık %98 iken deney grubunda ise %93 olarak hesaplanmıştır.

OZH8 suşu pankreatin uygulamasında kontrolde suş 4. saat sonunda canlılığını %97 oranında korurken pankreatin deney grubunda aynı saat sonunda %96 oranında korumaktadır.

OZH9 suşunun kontrolünde 4. saat sonunda %95 canlılık gözlemlenmiş ve pankreatin içeren ortamdan alınan sonuçlarda suşun canlılığının %85 oranında olduğu belirlenmiştir.

4.4.1.5 Suşların safra tuzuna karşı direnç özellikleri

OZH3 suşunun safra uygulamasında 4. saatin sonunda canlılıklar; %0.3'lük safra tuzu denemesinde %89.5 oranında, %0.5'lik safra tuzu denemesinde % 87.2 oranında ve %1'lik safra tuzu denemesinde ise %82.5 oranında devam etmiştir.

OZH8 suşunun safra tuzuna dirençlilik testlerinde 4. saatin sonunda canlılıklar; %0.3'lük safra tuzu denemesinde %88.5, %0.5'lik safra tuzu denemesinde %85.3 ve %1'lik safra tuzu denemesinde ise %81 oranlarında gözlemlenmiştir.

OZH9 suşunun safra tuzu uygulamasında 4. saatin sonunda canlılıkların; %0.3'lük safra tuzu denemesinde %88.3 oranında, %0.5'lik safra tuzu denemesinde %85 oranında ve %1'lik safra tuzu denemesinde ise %81.3 oranında olduğu belirlenmiştir.

4.4.1.6 Suşların hemolitik aktiviteleri

OZH8 ve OZH3 suşlarının hemolitik aktivitesinin belirlenmesinde kontrol suşları olarak kullanılan *E. coli* ATCC 25295'in bulunduğu ortamda kolonilerin etrafında parlak-yeşil zon (α -hemolitik) oluşurken, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538'in geliştiği ortamda, kolonilerin etrafında berrak zon (β -hemolitik) meydana geldiği tespit edilmiştir. Aynı ortamda geliştirilen OZH8 ve OZH3 suşlarının kolonilerinin etrafında ise zon oluşumu gözlenmemiştir (γ -hemolitik). Probiyotik organizmaların seçiminde, hemolize neden olmayan γ -hemolitik suşlara dikkat edilmektedir (Maragkoudakis vd. 2006). Bu suşların hemolitik aktivitelerinin belirlenerek probiyotik olarak kullanımları açısından bir sorun teşkil etmeyecekleri belirlenmiştir.

4.4.2 Suşların *in vivo* koşullarda gastrointestinal sistemden canlılığını koruyarak geçişinin belirlenmesi

In vitro koşullarda denemeleri yapılarak izole edilen LAB suşlarının probiyotik kriterlere uygun olup olmadıkları belirlenmiştir. Antibiyotik duyarlılıklarına göre probiyotik kriterlerine uygun aralıklarda olduğu belirlenen OZH3, OZH8 ve OZH9 suşları GİS şartlarına dayanıklı olup olmadıklarını belirlemeye yönelik testlere tabi tutulmuştur. Bu testler sonucunda OZH9 suşu GİS şartlarından canlılığını koruyarak geçişini sağlayamayacağı ve dolayısıyla uygun probiyotik suş olabilme şartlarını sağlamadığı belirlenerek bu çalışmalar sonucunda elenmiştir. *In vitro* deneyler sonucunda probiyotik kriterleri sağladığı belirlenen OZH3 ve OZH8 suşları GİS'den transitlerine *in vivo* koşullarda bakılmak üzere seçilmiştir.

In vivo denemelerde OZH3 ve OZH8 suşlarının GİS'den geçişini ve canlılığının devamını belirlemek için oral yoldan farelerin suşlarla beslenmesini (10^9 kob/200 μ L) takiben fekal örnekler toplanarak analiz edilmiştir. Bu amaçla kontrol grubuna SF, Deney1 grubuna OZH8 suşu, Deney2 grubuna ise OZH3 suşu verilmiştir. Grupların gavaj yoluyla beslenmesini takiben öncelikle 2 saatte bir ve daha sonra 24 saatte bir fekal örnekler toplanmaya başlanmış ve deney gruplarında her grubun beslendiği suşun varlığı seri seyreltmeler yapılarak antibiyotikli seçici besiyerine yapılan ekimler sonucunda log kob/ml olarak olarak belirlenmiştir.

OZH8 suşu beslemeyi takip eden 4. saatten itibaren fekal örneklerde tespit edilmiştir. 8. saatte ise en yüksek sayısına (8.2 log) ulaşmıştır. Daha sonraki saatlerin fekal örneklerinde ise tespit edilen bakteri sayısında azalma gözlenmiştir. 24. saatte alınan fekal örneklerden itibaren hiçbir bakteri çıkışı gözlemlenmemiştir.

OZH3 suşu da beslemeyi takiben 4. saatten itibaren fekal örneklerde tespit edilmiştir. 6. saatte ise en yüksek sayısına (6.3 log) ulaşmıştır. Daha sonraki saatlerin fekal örneklerinde ise tespit edilen bakteri sayısında azalma gözlenmiştir. 24. saatte alınan fekal örneklerden itibaren hiçbir bakteri çıkışı gözlemlenmemiştir.

Bu sonuçlarla beraber kontrol gruplarına ait fekal örneklerden hiçbir saatte herhangi bir gelişme gözlenmemiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda *Lactobacillus sakei* OZH3 ve *Lactobacillus plantarum* OZH8 suşlarının *in vivo* sistemde farenin GİS'inden canlılığını kaybetmeden başarılı bir şekilde transitinin gerçekleştiği belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüze kadar yapılan araştırmalar sonucunda probiyotiklerin insan ve hayvan sağlığı üzerinde çok sayıda olumlu etki sergilediği iyi bir şekilde anlaşılmıştır. Probiyotiklerin ağızdan alımı yararlı mikroorganizmaların gelişmesini stimüle eder ve patojenlerin miktarını azaltır, böylelikle konakçının intestinal mikrobiyal dengesi düzenlenir ve gastro-intestinal hastalıkların riski azalır (Fuller 1989, Chiang ve Pan 2012). Bunların yanı sıra probiyotiklerin araştırmalar sonucunda gözlemlenmiş olan daha birçok yararlı etkileri (antimutajenik, antikarsinojenik, hipokolesterolemik, antihipertansif, anti-osteoporoz, antialerjen ve immünomodülatör etkiler, inflammatuar bağırsak hastalıkları, irritabl bağırsak sendromu, kolit gibi semptomların azaltılması vb. etkiler) de bulunmaktadır (Prado vd. 2008, Chiang ve Pan 2012). Günümüzde birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmaktadır. Probiyotik olarak kullanılan organizmalar içerisinde en önemli grubu laktik asit bakterileri oluşturmaktadır (Schaafsma 1996). Günümüzde birçok LAB suşu probiyotik olarak tanımlanmış ve kullanılıyor olmasına rağmen ticari amaçlara uygun mikroorganizmaların doğal kaynaklardan izolasyonu yeni ve daha etkin probiyotiklerin elde edilmesi için en güçlü araçlardan biridir. Bu nedenle doğal nitelikli yeni ve etkin probiyotik suşların izolasyonu daima önem arz etmektedir.

Bu çalışmada farklı insan ve fermente gıda (ev yapımı, doğal ürünler) kaynaklarından toplam 40 adet izolat elde edilmiş ve bu izolatlar probiyotik özelliklerinin araştırılması amacıyla kullanılmıştır. İzole edilen bu 40 bakterinin Gram boyamaları ve katalaz aktivite testleri yapıldıktan sonra rastgele primerler ile RAPD profilleri çıkartılmıştır. Tüm izolatların arasından RAPD profillerinde mümkün olduğunca farklı profil gösteren, gram pozitif ve katalaz negatif olan izolatlar sečilerek bu izolatların 16S rDNA dizi analizleri yapılmıştır. 16S rDNA dizi analiz sonuçlarına göre laktobasil, laktokok, pediokok ve enterokok cinslerine ait 13 adet suř tanımlanmıştır (Çizelge 4.3). Daha sonra ise tanımlanan suşların düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzlarına karşı direnç gibi bazı probiyotik özellikleri, hemolitik aktivitesi ve antibiyotik duyarlılık seviyeleri belirlenmiştir.

Bakteriyosinin biyolojik olarak aktif protein ve çoğunlukla plazmid orjinli oldukları düşünülmektedir (Tagg vd 1976). Bu suşlardan yalnızca *Pediococcus pentosaceus* OZH2 suşu bakteriyosin üretim özelliği göstermiştir. Proteinaz K uygulaması, bu suşta bakteriyosin aktivitesini inaktif hale getirmektedir.

Antibiyotik dirençlilik özelliği birçok bakteride aktarılabilen gen bölgesi üzerinde kodlanmış bir özelliktir. Probiyotik suşlar, GİS'e ulaştıklarında doğal mikrobiyota ile etkileşime girerek gen transferini meydana getirebilmektedir (Teuber vd.1999, Mathur ve Singh 2005, Salim Ammor vd. 2007, Licht ve Wilcks 2005). Direnç genlerinin intestinal flora içerisindeki transferi; GİS florasında bulunan patojenler tarafından bu genlerin kazanılma riski ve başarısız antibiyotik tedavisine sebep olması nedeniyle istenmemektedir (Licht ve Wilcks 2005). EFSA bu doğrultuda bir suşun probiyotik olarak kullanılabilmesi için gösterdiği dirençte bir güvenlik aralığı belirlemiştir. Suşların antibiyotik dirençlilikleri EFSA tarafından belirlenmiş olan 9 farklı antibiyotik kullanımını ile EFSA'nın belirlediği güvenlik aralığını sağlayıp sağlamadığına bakılarak test edilmiştir. Genotipik karakterizasyonları yapılmış 13 adet suşun MIC₅₀ değerlerinin belirlenmesi sonucunda antibiyotik duyarlılık seviyeleri probiyotik bakteri olarak kullanılabilmesi için genel olarak güvenli kabul edilen 3 adet suş (*Lactobacillus sakei* OZH3, *Lactobacillus plantarum* OZH8 ve *Lactobacillus sakei* OZH9) belirlenmiştir.

Laktik asit bakterilerinin asitlik, pepsin, pankreatin 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. Örneğin midede pH 1.0 ile 3.0 arasında ve ince bağırsakta % 0.3'lük safra tuzuna karşı direnç göstermeleri gerekmektedir (Mainville vd. 2005). OZH8 ve OZH3 suşları pH 3.0 değerinde 3. saatin sonunda canlılıklarını sırasıyla %97 ve %87.5 düzeylerinde korumaktadırlar. Bu suşlar pepsin ve pankreatin uygulamalarına karşı da benzer direnç oranları göstermişlerdir. Yapılan bir çalışmada farklı safra tuzu konsantrasyonları denenerek % 0,3'lük safra tuzu konsantrasyonunun susların safra tuzuna toleransının belirlenmesi için kritik miktar olduğu tespit edilmiştir (Gilliand vd. 1984, Goldin ve Gorbach 1992). Safra tuzuna dirençlerinin ölçümünde %0.3 ve 0.5 safra tuzu oranına

her iki suşun da dirençli oldukları belirlenmiştir. Bu suşların sonuçları daha önceden yapılmış çalışmalara benzerlik göstermektedir (Conway vd. 1987, Dunne vd. 2001, Jacobsen vd. 1999). Ancak OZH9 suşu pankreatin ve safra tuzuna direnç gösterirken bu suşun canlılığı pH 3.0 değerinde 3. saatin sonunda %43 oranına kadar düşmüş ve aynı pH’ da pepsin uygulamasında canlılık 3. saat sonunda ancak %35 oranında tespit edilebilmiştir. Bu suş GİS şartlarından canlılığını koruyarak geçişini sağlayamayacağı ve dolayısıyla uygun probiyotik suş olabilme şartlarını sağlamadığı belirlenerek bu çalışmalar sonucunda elenmiştir. OZH3 ve OZH8 suşları düşük pH değerlerine, bu pH değerlerinde pepsin varlığına, pankreatine ve bağırsak ortamında karşılaşacakları safra tuzuna karşı direnç gösterebilmiş ve bu şartlarda canlılıklarını yüksek oranda koruyabilmişlerdir. Bu nedenle çalışmanın bu aşamasına kadar bakılmış olan probiyotik kriterlerini sağlayan bu iki laktobasil ile geriye kalan probiyotik özellikleri belirlemek amacıyla bir sonraki aşamaya geçilmiştir.

Maragkoudakis vd. (2006) yaptıkları çalışmada, *L. acidophilus* ACA-DC 295, *L. paracasei* ACA-DC 126, *L. rhamnosus* ACA-DC 112 ve *Lactobacillus sp.* ACA-DC 108 suşlarını α -hemolitik, *L. casei* Shirota ACA-DC 6002, *L. casei* ACA-DC 6003, *L. plantarum* ACA-DC 146 γ -hemolitik olarak saptamışlardır. Kanlı agara yapılan çizgi ekimler neticesinde kolonilerin etrafında yeşil zon veren *E. Coli* ATCC 25295 α hemolitik, berrak zon veren *S. aureus* ATCC 6538 β hemolitik, zon oluşumunun gözlenmediği *Lactobacillus sakei* OZH3 ve *L. plantarum* OZH8 ise γ hemolitik olarak değerlendirilmiştir. Hemolitik aktivitelerinin sonucunda elde edilen veriler, suşların probiyotik kullanımına engel teşkil etmemektedir.

İzole edilen LAB suşlarının yapılan bütün *in vitro* denemeleri sonucunda *Lactobacillus plantarum* OZH8 ve *Lactobacillus sakei* OZH3 suşları denemelerde probiyotik kriterlere uygun sonuçlar ve özellikler gösteren suşlar olarak belirlenmiştir. Bu iki laktobasil GİS’den transitlerine yani canlılıklarını koruyarak geçip geçemediklerine ve eğer geçiyorsa ne kadar sürede geçmeye başlayıp ne kadar sürenin sonunda canlılıklarını yitirdiklerine *in vivo* koşullarda bakılmak üzere seçilmiştir. *In vivo* denemelerde OZH3 ve OZH8 suşlarının GİS’den geçişini ve canlılığının devamını belirlemek için iki suş için birer deney grubu (n=7) ve bir kontrol grubu (n=7) olmak

üzere üç gruptan oluşan erkek BALB/c türü deneklere oral yoldan gavaj ile 10^9 kob/200 μ L olacak şekilde suş ve kontrol grubuna ise 200 μ L SF verilmiştir. Beslemeyi takiben 2. saatten itibaren her iki saatte bir ve daha sonrasında ise 24. saatten itibaren 24 saatte bir fekal örnekler toplanarak analiz edilmiştir. Fekal örneklerde her grubun beslendiği suşun varlığı tespit edilmek amacıyla seri dilüsyonlarının ardından bu suşa özgü antibiyotikli seçici besiyerine yapılan ekimlerinin sonuçları log kob/mL olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubunda suş çıkışı gözlemlenmemiştir. OZH8 suşunun beslendiği grup sonuçlarına göre bu suş 4. saatten itibaren fekal örneklerde saptanmış, 8. saatte en yüksek miktarına ulaşmış (8.2 log) ve ardından azalma göstererek 24. saat sonunda hiçbir bakteri çıkışına rastlanmadığı tespit edilmiştir. OZH3 suşunun beslendiği grupta ise fekal örneklerde suş çıkışına yine 4. saatten itibaren rastlanmaya başlanırken bu suş en yüksek sayısına (6.3 log) 6. saatte ulaşmıştır. Daha sonraki saatlerin fekal örneklerinde ise tespit edilen bakteri sayısında azalma gözlenmiş, 24. saatte alınan fekal örneklerden itibaren hiçbir bakteri çıkışı gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlara bakılarak *Lactobacillus sakei* OZH3 ve *Lactobacillus plantarum* OZH8 suşlarının in vivo sistemde farenin GİS'inden canlılığını kaybetmeden başarılı bir şekilde transitinin gerçekleştiği belirlenmiştir. Veriler doğrultusunda OZH8 suşunun ise OZH3'e oranla GİS'den geçişteki canlılığını daha yüksek oranda ve daha uzun süre koruyabildiği sonucuna ulaşılmıştır. *In vivo* transitlerinin başarılı olduğu gözlemlenen bu iki suş, çalışma süresince bu aşamaya kadar test edilen bütün probiyotik kriterlere uygun bulunmuştur.

Araştırma sonucunda yapılan deneyler doğrultusunda evrensel probiyotik kriterlerine uygun olan *Lactobacillus plantarum* OZH8 ve *Lactobacillus sakei* OZH3 olmak üzere iki adet LAB suşu tanımlanmıştır. Probiyotiklerin insan ve hayvan beslenmesinde destekleyici ajanlar olarak kullanımının giderek önem kazandığı gıda ve yem endüstrisinde, yeni probiyotik susların tanımı tüm dünyada yüksek bütçelerle desteklenen çalışmalardır. Yapılan araştırmalar probiyotiklerin uygulamalı olarak kullanımını tasarlamaktadır. Bu çalışmada yapılan ve ileride yapılmasına gereksinim duyulan *in vitro* analizler ile probiyotik özellikleri bakımından öne çıkan bu iki suşun probiyotik olabilmesi için önemli veriler sağlanmaktadır. Ancak bu veriler bu suşlara 'probiyotik suşlar' denilebilmesi için henüz yetersiz verilerdir. Bu iki probiyotik

olabilme özelliği göstermesi beklenen laktobasilin uygun gelişim koşullarının incelenmesi, endüstriyel üretim süreçlerine uygunluğunun belirlenmesi, genomik ve proteomik karakteristiklerinin tanımlanması gibi daha pek çok *in vitro* ve *in vivo* (hayvan ve insan denemeleri) deneye gereksinimleri vardır. Bu süreçlerin tamamlanması halinde *Lactobacillus sakei* OZH3 ve *Lactobacillus plantarum* OZH8 suşlarının probiyotik olarak nitelendirilebilme ve patentlenebilme olasılığı bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fuentes, M.A.F., Pérez-Pulido, R. and Gálvez, A. 2012. Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiology*. 32; 308-316.
- Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A. M. A., Takagi, A. and Koga, Y. 1998. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Amer. J. Gastroenterol.*, 93; 2097-2101.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. L. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25 (17); 3389-3402.
- Anonymous. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO/WHO, 34 p., Argentina.
- Anonymous. 2002a. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.
- Anonymous. 2002b. Guidelines for the evaluation of probiotics in foods, Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food.
- Anonymous. 2008. Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J.* 732; 1-15.
- Ballongue, J. 1993. Bifidobacteria and probiotic action. In: *Lactic acid bacteria*, Seppo Sliminen and Atte von Wright (eds.), pp. 357-428. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Bengmark, S. 2003. Use of some pre-, pro- and synbiotics in critically ill patients. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 17; 833-848.

- Bhunia, A.K., Johnson, M.C. and Ray, B. 1987. Purification, characterization and microbial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65; 261-268.
- Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C. and Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied and Environmental Microbiology*. 57; 1265-1268.
- Bron, P.A. vd. 2013. Cell surface-associated compounds of probiotic lactobacilli sustain the strain-specificity dogma. *Current Opinion in Microbiology*. 16;262–269
- Brown, A.C. and Valiere, A. 2004. Probiotics and medical nutrition therapy. *Nutr Clin Care*. 7(2): 56-68.
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol*. 50; 131-149.
- Castagliuola, L., Riegler, M. F., Valenick, L., LaMont, J. T. and Pathoulakis, C. 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect. Immun.*, 67; 302-307.
- Chiang, S.S. and Pan, T.M. 2012. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 93; 903-916.
- Collins, M.D. and Gibson, G.R. 1999. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69; 1052-1057.
- Conway, P., Gorbach, S. and Goldin, B. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci*. Vol. 70, 1–12.
- Çakır, İ., Karahan, A. G. ve Çakmakçı, M. L. 2002. Probiyotikler ve etki mekanizmaları. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 6 (12); 15-19.
- Daly, C. and Davis, R., 1998. The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health. *Agric. Food Sci. Finland* 7; 219–250.

- Dethlefsen, L., Eckburg, P. B., Bik, E. M. and Relman, D. A. 2006. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends in Ecology and Evolution*, 21; 517-523.
- 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. and Collins, J. K. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings. *Am. J. Nutr.*, 73; 386S-392S.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcher, H., Emde, M. and Böttger, E. C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17 (19); 7843-7853.
- Escalante, A., Wachter, C. and Farrés, A. 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Int. J. Food Microbiol.*, 64; 21-31.
- Ewaschuk, J.B. and Dieleman, L.A. 2006. Probiotics and prebiotics in choronic inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 12; 5941-5950.
- Famularo, G., Moretti, S., Marcellini, S., De Simone, D. 1997. Stimulation of immunity by probiotics. “ Fuller, R.(ed), *Probiotics 2: Applications and Practical Aspects*”
- Federico, Lara-V., Illoslada, Mônica., Olivares and Jordi Xaus. 2010. *Bioactive Foods in Promoting Health:Probiotics and Prebiotics.*
- Floch, M.H. 2005 Montrose D.C. Use of probiotics in humans; an analysis of the literature. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 34; 547-570.
- Fonden, R., Mogensen, G., Tanaka, R. and Salminen, S. 2000. Effect of culture containing dairy products on intestinal microflora, human nutrition and health current knowledge and future perspectives. *Bulletin IDF*, 352; 5.

- Fooks, L.J., Rycroft, C.E. and Gibson, G.R. 1999. Methods for assessing the potential of prebiotics and probiotics. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2 (6); 481-484.
- Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C. and Joly, B. 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res. Microbiol.*, 152; 167–173.
- Fukushima, Y., Kawata, Y., Hara, H., Terada, A. and Mitsuoka, T. 1998. Effect of probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int. J. Food Microbiol.*, 42; 39-44.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66 (5); 365-378.
- Fuller, R. and Gibson, G.R. 1998. Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health. *Clinical Microbiology and Infection*, 4 (9); 477-480.
- Gibson, G.R. 1998. Dietary modulation of the human gut microflora using probiotics. *British Journal of Nutrition*, 80; 209-212.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microflora introducing the concept of probiotics. *Journal of Nutrition*, 125; 1401-1412.
- Gilliand, S., Staley, T. and Bush, L. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, 67; 3045-3051.
- Goldin, B. R. and Gorbach, S. L. 1992. Probiotics for humans. In R. Fuller, *Probitics the scientific basis* London, Chapman and Hall; 355-376.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutic properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 10; 139
- Gorbach, S.L., Nahas, L. and Lerner, P.I. 1967. Studies of intestinal microflora. Effects of diet, age and periodic sampling on numbers of faecal microorganisms in man. *Gastroenterology*, 53; 845-855.
- Guarner, F. and Schaafsma, G. J. 1998. Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 39; 237-238.

- Halkman, K. 1991. Tarım Mikrobiyolojisi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Yayınları, Ankara. Vol. 1214; 82.
- Harrigan, W. F. and McCance, M. E. 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology.
- Hatakka, K., Savilahti, E., Pönkä, A., Meurman, J. H., Poussa, T., Näse, L., Saxelin, M. and Korpela, R. 2001. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *British Microbiology Journal*, 322; 1-5.
- Hentges, D.J. 1992. Gut flora and disease resistance. In: Fuller, R. (Ed.), *Probiotics*. Chapman and Hall, Cambridge, pp. 87-110.
- Hirayama, K. and Rafter, J. 1999. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention: mechanistic consideration. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76; 391-394.
- Holzapfel, W.H. and Schillinger, U. 2002. Introduction to pre-and probiotics. *Food Research International*, 35 (2-3); 109-116.
- Isolauri, E. 2001. Probiotics in the prevention and treatment of allergic disease. *Pediatr. Allergy Immunol.* 12; 56-59.
- Isolauri, E. 2004. The role of probiotics in paediatrics. *Curr. Pediatr.* 14; 104-109.
- Jacobsen, C.N., Nielsen, R.V., Hayford, A.E., Moller, P.L., Michaelsen, K.F., Pærregaard, A., Sandstroöm, 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.
- Kabir, A. M. A., Aiba, Y., Takagi, A., Kamiya, S., Miwa, T. and Koga, Y. 1997. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut*, 41; 49-55.
- Kiebling, G., Schneider, J. ve Jahreis, G. 2002. Long term consumption of fermented diary products over 6 months increases HDL cholesterol. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56; 843-849.

- Kim, H.J., Camilleri, M. and McKinzie, S. 2003. A randomized controlled trial of probiotic, VSL#3, on gut transit and symptoms in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 17(7); 895-904.
- Kopp-Hoolihan L. 2001 Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J. Am. Diet Assoc.* 101; 229-238.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L. and Pace, N. R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82; 6955-6959.
- Laurens-Hattingh, A. and Viljoen, B. C. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.*, 11; 1-17.
- Leroy, F., De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15; 67-78.
- Licht, T.R., Wilcks, A. 2005. Conjugative Gene Transfer in the Gastrointestinal Environment. *Adv. Appl. Microbiol.* 58C; 77-95.
- Luckey, T.D. and Floch, M.A. 1972. Introduction to intestinal microbiology. *American Journal of Clinical Nutrition*, 25; 1291-1295.
- Lyhs, U. 2002. Lactic acid bacteria associated with spoilage of fish pucts. PhD Thesis, Academic Dissertation, University of Helsinki, Finland.
- Mackay, A.D., Taylor, M.B., Kibbler, C.C. and Hamilton-Miller, J.M.T. 1999. *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clin. Microbiol. Infect.* 5; 290–292.
- Mainville, I., Arcand, Y. and Farnworth, E.R. 2005. A dynamic model that simulates the human upper gastro-intestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 99; 287-296.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int. Dairy J.* 16; 189-199.
- Mathur, S. and Singh, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteri a review. *Int. J. Food Microbiol.* 10; 281-295.

- McFarland, L.V. and Elmer, G.W. 1997. Pharmaceutical probiotics for the treatment of anaerobic and other infections. *Anaerobe*, 3; 73-78.
- McNaught, C. E. and MacFie, J. 2001. Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. *Nutrition Research* 21; 343–353.
- Michetti, P., Dorta, G., Wiesel, P. H., Brassart, D., Verdu, E., Herranz, M., Felley, C., Porta, N., Rouvet, M., Blum, A. L. and Corthésy-Theulaz, I. 1999. Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion*, 60; 203-209.
- Müller, M.R.A. 2000. Characterization of the microbial ecosystem of cereal fermentation using molecular biological methods. Ph.D. Thesis, 145 p., Technischen Universität München.
- Murray, F. 1998. *Acidophilus and Your Health: The beneficial microorganisms that aid digestion and fight disease*. Keats Publishing, Inc., 46 p. New Canaan, Connecticut.
- Obermeier, F., Kojouharoff, G., Hans, W., Schölmerich, J., Gross, V. and Falk, W. 1999. Interferon gamma (IFN- γ) and tumour necrosis factor (TNF) induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS) induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol.* 116; 238-245.
- Ocaña, S.V., Holgado, A.A. P.R. and Nader-Macias, M. E. 1999. Selection of vaginal H₂O₂-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. *Curr. Microbiol.*, 38; 279-284.
- O'Mahony, L., McCarthy, J. and Kelly, P. 2005. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*. 128(3); 541-551.
- O'Shea, E.F. vd. 2011. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *International Journal of Food Microbiology*. 152; 189–205.
- Ouwehand, A., Salminen, S. and Isolauri, E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*.82; 279-289.

- Penner, R., Fedorak, R.N. and Madsen, K.L. 2005. Probiotics and nutraceuticals: non medicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 5(6); 596-603.
- Pinto, M.G.V., Franz, C.M.A.P., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. 2006. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International Journal of Food Microbiology*, 109; 205-214.
- Playne, M.J., Bennett, L.E. and Smithers, G.W. 2003. Functional dairy foods and ingredients. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58; 242-264.
- Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A. and Soccol, C.R. 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Res. Int.* 41 (2); 111-123.
- Prescott, C.S. and Dunn, G.C. 1987. *Industrial Microbiology*, Published on Distributors, Delhi, India, pp 882.
- Rastall, R., Gibson, G.R., Gill, H.S., Guarner, F., Klaenhammer, T.R., Pot, B., Reid, G., Rowland, I.R. and Sanders, M.E. 2005. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiology Ecology*, 52; 145-152.
- Rautio, M., Jousimies-Somer, H., Kauma, H., Pietarinen, I., Saxelin, M., Tynkkynen, S. and Koskela, M. 1999. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin. Infect. Dis.* 28; 1160-1161.
- Ray, B. 1992. The need for food biopreservation. In: Ray, B., Daeschel, M. (Eds.), *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp; 1-23.
- Reid, G. 2000. In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFMTM as a possible probiotic for the urogenital tract. *Int. Dairy J.*, 10; 415-419.
- Rolfe, R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.(Supplement)*, 130; 396-402.

- Roy, D., Ward, P., Vincent, D. and Mondou, F. 2000. Molecular identification of potentially probiotic lactobacilli. *Current Microbiology*, 40; 40-46.
- Roy, D., Sirois, S. and Vincent, D. 2001. Molecular discrimination of lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Current Microbiology*, 42; 282-289.
- Rubio, R., Jofré, A., Martín, B., Aymerich, T. and Garriga, M. 2013. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiology*. doi: 10.1016/j.fm.2013.07.015.
- Rycroft, C.E., Fooks, L.J. and Gibson, G.R. 1999. Methods for assessing the potential of prebiotics and probiotics. *Current Opinion in Clinical Nutrition and metabolic Care*.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J. and Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84 (3); 197-215.
- Saarela, M., Lahteenmaki, L., Crittenden, R., Salminen, S. and Mattila-Sandholm, T. 2002. Gut bacteria and health foods--the European perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 78; 99-117.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4; 406-425.
- Salim Ammor, M., Belen Florez, A. and Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 24; 559-570
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D. and de Vos, W.M., vd. 1998. Demonstration of safety of probiotics - a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44; 93-106.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fonde'n, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.-E. and Mattila-Sandholm, T. 1998b. Demonstration of safety of probiotics - a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44; 93-106

- Salminen, S. 1999. Probiotics: Scientific support for use. *Food Technol.*, 53; 66.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, New York.
- Sanders, M.E. 1999. Probiotics. *Food Technology*, 53; 67-77.
- Sanders, M.E. 2003. Probiotics: considerations for human health. *Nutr. Rev.* 61; 91-99.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA.*, 74 (12); 5463-5467.
- Schaafsma, G. 1996. State of the art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutrition Newsletter*. 5; 23–24.
- Shalev, E., Battino, S., Weiner, E., Colodner, R. and Keness, Y. 1996. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* compared with pasteurized yogurt as prophylaxis for recurrent candidal vaginitis and bacterial vaginosis. *Arch. Fam. Med.*, 5; 593-596.
- Sönmez, N., Çakmakçı, M.L., Karahan, A.G. ve Çakır, İ. 1999. Probiyotik Kullanımı ve Ülke Şartlarında Geliştirilmesi. *SDÜ Basımevi*, 134 s., Isparta.
- Sullivan, A. and Nord, C.E. 2005. Probiotics and gastrointestinal diseases. *J. of Int. Medicine*, 257; 78-92.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Vannamaker, L.V. 1976. Bacteriocin of gram Positive Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40; 721-756.
- Tang, Y. W., Ellis, N. M., Hopkins, M. K., Smith D. H., Dodge, D. and Persing, D. H. 1998. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic Gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (12); 3674-3679.
- Teuber, M., Meile, L. and Schwarz, F. 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76; 115-137.
- Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J.M., Ivanova, I. and Dousset, X. 1999. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *Inter. J. of Food Microbiol.*, 48; 167-177.

- Van Niel, C.W., Feudtner, C., Garrison, M.M. and Christakis, D.A. 2002. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics*. 109(4); 678-684.
- Vanderhoof, J.A. and Young, R.J. 2005. Pediatric applications of probiotics. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 34; 451-463.
- Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative 'in vitro' study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36; 895-904.
- Vizoso-Pinto, M.G., Franz, C., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. 2006. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International Journal of Food Microbiology* 109; 205–214.
- Wang, R.F., Cao, W.W. and Cerniglia, C.E. 1996. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (4); 1242-1247.
- Wassenaar, T.M. and Klein, G. 2008. Safety aspects and implications of regulation of probiotic bacteria in food and food supplements. *Journal of Food Protection*, 71(8); 1734-1741.
- Wilkins, T.D., Holdeman, L.V., Abramson, I.J. and Moore, W.E.C. 1972. Standardized single-disc method for antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1(6); 451-459.
- Williams, G.M. and Wynder, E.L. 1996. Diet and cancer: A synopsis of causes and prevention strategies. In "Nutrition and Cancer Prevention," ed. R.R. Watson and S.I. Mufti, pp. 1–23. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Wood, B.J.B. 1997. *Microbiology of Fermented Foods*. Blackie Academic & Professional, London.
- Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. 1995. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Blackie Academic & Professional, London.

Yeung, P. S. M., Sanders, M. E., Kitts, C. L., Cano, R and Tong, S. 2002. Species-specific identification of commercial probiotic strains, *J. Dairy Sci.*, 85; 1039-1051.

EKLER

EK 1 Besiyerleri

EK 2 Tampon ve Çözeltiler

EK 3 Moleküler markör

EK 4 Etik kurul kararı ve Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

EK 1 Besiortamları

MRS BESİYERİ (52.2g/L)

100 ml'de 5.2 g hazır besiyeri içeriği çözülerek hazırlanmıştır. Katı besiyeri için % 1.5 agar ilave edilmiş ve sterilizasyon 121°C'de 12 dakika yapılmıştır.

İçerik	%g
Kazein pepton	10
Et ekstraktı	8
Maya ekstraktı	4
Glukoz	20
Dipotasyum hidrojenfosfat	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.2
Tween 80	1 ml
Triamonyum sitrat	2
Sodyum asetat	5

pH 5,7±0.02

TGE BESİYERİ (Trypton-glucose-yeast extract)

İçerik	%g
Trypton	1.0
Glukoz	1.0
Maya ekstraktı	1.0
Tween 80	0.1
MgSO ₄	0.005
MnSO ₄	0.005

Bu içerikler 100 ml distile su içerisinde çözülür, pH 6.8'e ayarlanır. Katı besiyeri hazırlamak için üzerine % 1.5 agar eklenir. 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

TSB BESİYERİ

İçerik	%g
Kazein pepton	1.7
Soya pepton	0.3
NaCl	0.5
Glukoz	0.25
K ₂ HPO ₄	0.25

Sterilizasyondan önce pH 7.3 ±0.2'ye ayarlanarak 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

EK 2 Tampon ve çözeltiler

TBE TAMPONU (Tris-Borik asit-EDTA)1X

İçerik (pH: 8.3)	% g
Tris	10.8
Borik asit	5.5
EDTA (1M)	0.95
Distile su	1 lt

FOSFAT TAMPON SOLÜSYONU (PBS)

İçerik (PH=7,4)	% gr
NaCl	2
Na ₂ HPO ₄	0.144
KH ₂ PO ₄	0.024

ETİDYUM BROMİT ÇÖZELTİSİ

İçerik	% g
Etidyum bromit	1.0
Distile su	100 ml

Bu bileşenler çözülerek 0.22 µm çapındaki Sartorius membran filtreden geçirilir ve + 4 °C' de stok olarak koyu renk, ısı almıyan bir sisede saklanır.

SPHEROBLAST TAMPONU

İçerik	% g
Sükroz	10
Lizozim	2
RNaz A	0,4
25 mM Tris (pH: 8,4)	
25 mM EDTA (pH: 8)	

Bu bileşenler çözülerek 0.22 µm çapındaki Sartorius membran filtreden geçirilir ve - 20 °C' de stok olarak saklanır.

LİZİS TAMPON 1

% 5 SDS çözeltisi

LİZİS TAMPON 2

5 M NaCl çözeltisi

N3 TAMPONU

İçerik

5 M Sodyum asetat

Asetik asit

Distile su

% mL

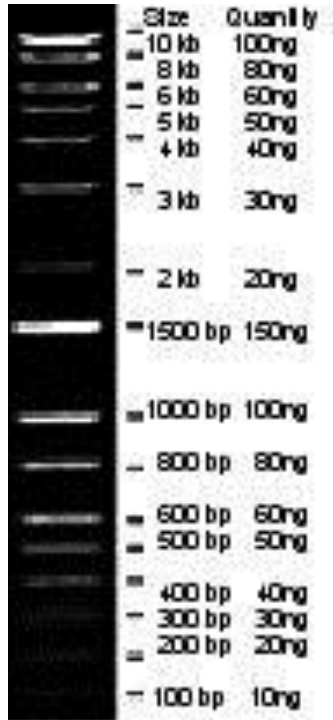
60

11,5

28,5

EK 3 Moleküler markör

BIO BASIC DNA Ladder 100bp-10KB



EK 4 Etik kurul kararı ve Deneysel Hayvanları Kullanım Sertifikası

Evrak Tarih ve Sayısı: 30/05/2014-15230



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof.Dr.Özlem OSMANAĞAOĞLU
Ankara Üniversitesi
Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Özlem OSMANAĞAOĞLU, Hande ORAL ve Harun ÖNLÜ'den oluşan,G.Ü.ET-14.036 kod numaralı ve "*Farklı Kaynaklardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-14.036 and entitled "*Determining some probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from different sources*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

BELGENİN ASLI
ELEKTRONİK İMZALIDIR

19.06/2014
Nursel GÜNER
Şef N. Çelik

EK :
1Liste

Prof. Dr. Leyla AÇIK
Kurul Başkanı

Evrak Doğrulama İçin: <http://belgedogrulama.gazi.edu.tr>

Pin : 18931

Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 Faks:0 (312) 202 20 63
E-Posta :hadyek@gazi.edu.tr Web Adresi :http://dhek.gazi.edu.tr/

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.



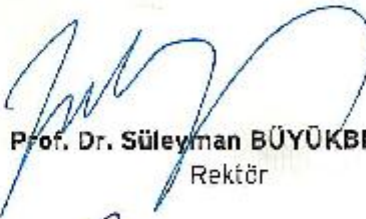
28 Mayıs-07 Haziran 2013

XIII. DENEY HAYVANLARI UYGULAMA VE ETİK KURSU

KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, **Hande ORAL**

Gazi Üniversitesi Hayvan DeneYleri Yerel Etik Kurulu onayı ile Gazi Üniversitesi
Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve
Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından,
28 Mayıs-07 Haziran 2013 tarihleri arasında düzenlenen
"Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu XIII"e katılarak,
Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve
bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.


Prof. Dr. Süleyman BÜYÜKBERBER
Rektör


Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN
Merkez Müdürü


Prof. Dr. Leyla AÇIK
Etik Kurul Başkanı

Sertifika No. 2013/13 / 58

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hande ORAL

Doğum Yeri : Meram

Doğum Tarihi : 05.08.1990

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu:

Lise : Ankara Kırkkonaklar Anadolu Lisesi (2008)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2012)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı-
(Ağustos 2012- Şubat 2015)