



**ORAL LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN  
BİYOFİLM VE HALİTOSİS ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
İN VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**Doktora Tezi**

**Gizem ARIK**

**Eskişehir, 2019**

**ORAL LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BİYOFİLM VE HALİTOSİS  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

**Gizem ARIK**

**DOKTORA TEZİ**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ**

**(İkinci Danışman: Prof. Dr. Zuhal KIRZIOĞLU)**

**Eskişehir**

**Eskişehir Teknik Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Mart, 2019**

*Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1408F371 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir*

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gizem ARIK'ın "Oral Laktik Asit Bakterilerinin Biyofilm ve Halitosis Üzerine Etkilerinin İn Vitro Araştırılması" başlıklı tezi .../.../2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	.....	.....
Üye	.....	.....
Üye	.....	.....
Üye	.....	.....
Üye	.....	.....

.....

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### ORAL LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BİYOFİLM VE HALİTOSİS ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

Gizem ARIK

Biyoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mart 2019

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

(İkinci Danışman: Prof. Dr. Zuhal KIRZIOĞLU)

Çocuklarda oral biyofilmin mekanik olarak temizlenmesindeki zorluklar ve bu amaçla kullanılan kimyasalların bazı yan etkilere sahip olması probiyotik terapiyi ön plana çıkarmıştır. Bu çalışmada özellikle çocukların ağız sağlığını geliştirmeye yönelik etki sağlayacak antiadezyon, antibiyofilm aktivitelerine sahip, halitosis üzerine etkili oral probiyotiklerin tanımlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla sağlıklı çocukların diş yüzeylerindeki biyofilm oluşan bölgelerden alınan örneklerin fakültatif anaerobik bakteri ve maya çeşitliliği ortaya çıkarılmıştır. Bakteriler 16S rRNA gen dizisine göre, mayalar Vitek-2 sistemi ile biyokimyasal olarak tanımlanmıştır. *Lactobacillus* sp. olarak tanımlanan izolatların gastrointestinal şartlarda hayatta kalma oranları, antibiyotik duyarlılığı, antioksidan ve enzim aktivitesi, agregasyon aktiviteleri, antimikrobiyal aktivitesi, biyofilm oluşturma özellikleri belirlenmiştir. Seçilen laktik asit bakterilerinin tükürük kaplı hidroksiapatit disklerde antiadezyon ve antibiyofilm aktiviteleri incelenmiştir. 16S rRNA dizi analizi sonucunda mikrobiyal kompozisyonda *Firmicutes* (%83,4) baskın filum, *Lactobacillus* ise baskın cins olarak tanımlanmıştır. Bu cins içinde *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. casei*, *L. plantarum* ve *L. salivarius* türleri tanımlanmıştır. *Proteobacteria* filumunda *Neisseria*, *Actinobacteria* filumunda *Rothia* baskın cinsler olarak tanımlanmıştır. Maya izolatları arasında *Candida dubliniensis* baskın olan tür olmuştur. Laktik asit bakterilerinin gastrointestinal şartlara dirençli oldukları, antioksidan, agregasyon aktiviteleri gösterdikleri, biyofilm üreticisi oldukları saptanmıştır. Ancak seçilen oral mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermedikleri belirlenmiştir. Seçilen bazı laktik asit bakterilerinin antiadezyon ve antibiyofilm aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Duyusal analiz sonuçlarına göre *L. rhamnosus* LAB1.2.A'nın halitosis üzerine etkili olabileceği saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Biyofilm, laktik asit bakterisi, probiyotik, antibiyofilm, halitosis

## ABSTRACT

### IN VITRO INVESTIGATION ON THE EFFECTS OF ORAL LACTIC ACID BACTERIA ON BIOFILM AND HALITOSIS

Gizem ARIK

Department of Biology

Eskişehir Technical University, Graduate School of Sciences, March 2019

Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

(Co-Supervisor: Prof. Dr. Zuhâl KIRZIOĞLU)

Difficulties in the mechanical cleaning of oral biofilm in children and some side effects of the chemicals used for this purpose have highlighted probiotic therapy. The aim of this study was to determine the oral probiotics which have antiadhesion, antibiofilm activity and effects on halitosis. For this purpose, facultative anaerobic bacteria and yeast diversity of the samples taken from the biofilm areas on the tooth surfaces of healthy children were revealed. Bacteria were identified according to the 16S rRNA gene sequence and yeasts were biochemically identified by Vitek-2 system. Survival rates at gastrointestinal conditions, antibiotic susceptibility, antioxidant activity, aggregation activities, antimicrobial activity and biofilm forming properties of isolates which identified as *Lactobacillus* sp. were determined. Antiadhesion and antibiofilm activities of selected lactic acid bacteria on saliva coated hydroxyapatite discs were investigated. As a result of 16S rRNA sequence analysis, *Firmicutes* (83.4%) was the predominant phylum in the microbial composition and *Lactobacillus* was defined as the dominant strain. In this genus, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. casei*, *L. plantarum* ve *L. salivarius* species were identified. *Neisseria* in *Proteobacteria* phylum, *Rothia* in *Actinobacteria* phylum was identified as predominant genus. *Candida dubliniensis* was found to be the dominant species among yeast isolates. Lactic acid bacteria were found to be resistant to gastrointestinal conditions, showed antioxidant and aggregation activities and were biofilm producers. However, they did not have antimicrobial activity against selected oral microorganisms. Some selected lactic acid bacteria showed antiadhesion and antibiofilm activity. According to the results of organoleptic analysis, it was determined that *L. rhamnosus* LAB1.2.A could be effective on halitosis.

**Keywords:** Biofilm, lactic acid bacteria, probiotics, antibiofilm, halitosis

## TEŞEKKÜR

Doktora tezim boyunca her an desteğini hissettiğim, bilgi ve tecrübeleriyle yolumu aydınlatan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a; tez izleme komitesindeki hocalarım Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ ve Doç. Dr. İlhan Metin DAĞSUYU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Biyofilm örneklerini almamızı sağlayan ikinci danışmanım Prof. Dr. Zuhal KIRZIOĞLU'na; örneklerin alınmasında ve laboratuvara getirilmesinde yardımcı olan Dr. Dt. Begüm GÖK ÇOBAN'a teşekkür ederim.

Lisans eğitimimden bu yana desteğini hissettiğim hocam Prof. Dr. Ali Yavuz KILIÇ'a; örneklerin SEM analizini gerçekleştiren Dr. Öğr. Üyesi Volkan KILIÇ'a; hücre kültürü deneylerini gerçekleştirmemizi sağlayan arkadaşım Sinem DABAĞOĞLU PSAV'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Aynı çalışma ortamını paylaştığım, yıllardır yol arkadaşlığı yaptığım başta sevgili Sümeyra Nur ŞANAL DEMİRCİ, Ayça Fulya ÜSTÜNTANIR DEDE, Alper DEDE, Hatice GENÇ olmak üzere tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

2211-C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Bursu ile doktora çalışmamı destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde beni destekleyen, bana sonsuz güvenen, bu aşamaya gelmemdeki en büyük emeğin sahipleri biricik anneme, babama ve canım kardeşime tüm kalbimle teşekkür ederim.

**Gizem ARIK**

25/03/2019

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu, çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Gizem ARIK

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Oral Mikrobiyota.....	2
1.2. Oral Biyofilm.....	4
1.3. Oral Biyofilmdeki Ekolojik Etkileşimler.....	7
1.3.1. Sinerjik etkileşimler.....	7
1.3.2. Antagonistik etkileşimler.....	11
1.3.2.1.1. <i>Patojenite potansiyeli</i> .....	12
1.4. Laktik Asit Bakterileri.....	13
1.4.1. Oral laktik asit bakterileri.....	14
1.4.2. Probiyotik laktik asit bakterilerinin ağız sağlığına etkileri.....	15
1.4.2.1. <i>Diş çürüğü üzerine etkisi</i> .....	16
1.4.2.2. <i>Periodontal hastalıklar üzerine etkisi</i> .....	16
1.4.2.3. <i>Halitosis üzerine etkisi</i> .....	17
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	18
2.1. Materyal.....	18
2.1.1. Biyofilm örnekleri.....	18
2.1.2. Besiyerleri.....	18
2.1.2.1. <i>MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) agar</i> .....	18
2.1.2.2. <i>BHI (Brain Heart Infusion) agar</i> .....	18
2.1.2.3. <i>Mitis salivarius agar</i> .....	18
2.1.2.4. <i>M 17 agar</i> .....	18



2.1.2.5.	<i>Patates dekstroz agar</i> .....	19
2.1.2.6.	<i>Mueller hinton agar</i> .....	19
2.1.2.7.	<i>Kongo red agar (CRA)</i> .....	19
2.1.2.8.	<i>Nutrient agar</i> .....	19
2.1.2.9.	<i>MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) broth</i> .....	19
2.1.2.10.	<i>BHI (Brain Heart Infusion) broth</i> .....	19
2.1.2.11.	<i>Koyun kanlı agar</i> .....	20
2.1.2.12.	<i>Skim milk Besiyeri</i> .....	20
2.1.2.13.	<b>F-12K (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium</b> .....	20
2.1.3.	<b>Kimyasallar ve Çözeltiler</b> .....	20
2.1.3.1.	<i>%20'lik gliserol</i> .....	20
2.1.3.2.	<i>%3'lük hidrojen peroksit</i> .....	20
2.1.3.3.	<i>20 mM Tris-HCl</i> .....	20
2.1.3.4.	<i>2 mM EDTA</i> .....	20
2.1.3.5.	<i>%1,2'lik Triton X-100</i> .....	20
2.1.3.6.	<i>Lizozim solüsyonu</i> .....	21
2.1.3.7.	<i>Liziz solüsyonu</i> .....	21
2.1.3.8.	<i>Fosfat tamponu (PBS)</i> .....	21
2.1.3.9.	<i>0,72 N Trikloroasetik asit (TCA)</i> .....	21
2.1.3.10.	<i>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> çözeltisi</i> .....	21
2.1.3.11.	<i>Fenol ayıracı</i> .....	21
2.1.3.12.	<i>1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i> .....	21
2.1.3.13.	<i>Amonyum molibdat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>24</sub>) çözeltisi</i> .....	22
2.1.3.14.	<i>Potasyum iyodür (KI) çözeltisi</i> .....	22
2.1.3.15.	<i>0,2 mM DPPH solüsyonu</i> .....	22
2.1.3.16.	<i>7 mM ABTS<sup>+</sup> solüsyonu</i> .....	22
2.1.3.18.	<i>Fizyolojik tuzlu su (FTS)</i> .....	22
2.1.3.19.	<i>2,5 mM potasyum persülfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)</i> .....	22
2.1.3.20.	<i>%33'lük asetik asit</i> .....	22
2.1.3.21.	<i>%3'lük glutaraldehit</i> .....	22
2.1.3.22.	<i>1 X TAE solüsyonu</i> .....	22
2.1.3.23.	<i>Antibiyotik diskleri</i> .....	22
2.1.3.24.	<i>Antifungal diskleri</i> .....	23

2.2. Yöntem.....	23
2.2.1. Örneklerin alınması.....	23
2.2.2. Örneklerin kültüre edilmesi.....	24
2.2.3. Mikroorganizmaların izolasyonu.....	24
2.2.3.1. Gram boyama.....	24
2.2.3.2. Katalaz testi.....	24
2.2.4. Bakterilerin moleküler tanılaması.....	25
2.2.4.1. Genomik DNA izolasyonu.....	25
2.2.4.2. 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonu.....	25
2.2.4.3. PCR ürünlerinin saflaştırılması.....	26
2.2.4.4. 16S rRNA dizilerinin BLAST analizi.....	26
2.2.4.5. Filogenetik yakınlık.....	27
2.2.5. Mayaların biyokimyasal tanılanması.....	27
2.2.6. Laktik asit bakterilerinin gastrointestinal şartlara direnci.....	27
2.2.6.1. Lizozim direnci.....	27
2.2.6.2. Pepsin direnci.....	28
2.2.6.3. Pankreatin direnci.....	28
2.2.6.4. Safra tuzu (oxgall) direnci.....	28
2.2.7. Laktik asit bakterilerinin agregasyon aktiviteleri.....	28
2.2.7.1. Otoagregasyon.....	28
2.2.7.2. Koagregasyon.....	29
2.2.8. Laktik asit bakterilerinin hücre-yüzey hidrofobisitesi.....	29
2.2.9. Laktik asit bakterilerinin enzim aktivitesi.....	29
2.2.10. Proteolitik aktivite.....	30
2.2.11. Hidrojen peroksit üretimi.....	30
2.2.12. Laktik asit üretimi.....	31
2.2.13. Antioksidan aktivite.....	31
2.2.13.1. DPPH serbest radikali yakalama aktivitesi.....	32
2.2.13.2. ABTS <sup>+</sup> serbest radikal yakalama aktivitesi.....	32
2.2.14. Hemolitik aktivite.....	32
2.2.15. Bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi.....	33
2.2.16. Mayaların antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi.....	33

2.2.17. Laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi.....	33
2.2.18. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kapasitelerinin belirlenmesi.....	33
2.2.18.1. <i>Kongo kırmızılı agar (CRA) yöntemi</i> .....	34
2.2.18.2. <i>Mikrotitrasyon plak yöntemi</i> .....	34
2.2.19. Laktik asit süpernatantlarının antiadezyon ve antibiyofilm aktiviteleri.....	34
2.2.19.1. <i>Mikrotitrasyon plak yöntemi</i> .....	34
2.2.19.2. <i>Hidroksiapatit disk yöntemi</i> .....	35
2.2.19.3. <i>HA disklerinin SEM analizi</i> .....	36
2.2.20. TR146 bukkal epitel hücrelerinin hazırlanması.....	36
2.2.21. Laktik asit bakterilerinin halitosis üzerine etkisi.....	37
3. BULGULAR.....	38
3.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu.....	38
3.2. Bakterilerin Moleküler Tanılaması.....	41
3.3. Filogenetik Yakınlık.....	47
3.4. Mayaların Biyokimyasal Tanılaması.....	51
3.5. Laktik Asit Bakterilerinin Gastrointestinal Şartlara Direnci.....	51
3.5.1. Lizozim direnci.....	52
3.5.2. Pepsin direnci.....	52
3.5.3. Pankreatin direnci.....	55
3.5.4. Safra tuzu (oxgall) direnci.....	55
3.6. Laktik Asit Bakterilerinin Agregasyon Aktiviteleri.....	59
3.6.1. Otoagregasyon.....	59
3.6.2. Koagregasyon.....	60
3.7. Laktik Asit Bakterilerinin Hücre-Yüzey Hidrofobisitesi.....	62
3.8. Laktik Asit Bakterilerinin Enzim Aktivitesi.....	64
3.9. Laktik Asit Bakterilerinin Proteolitik Aktivitesi.....	69
3.10. Laktik Asit Bakterilerinin Hidrojen Peroksit Üretimi.....	70
3.11. Laktik Asit Bakterilerinin Laktik Asit Üretimi.....	72
3.12. Laktik Asit Bakterilerinin Antioksidan Aktivitesi.....	73
3.12.1. DPPH serbest radikali yakalama aktivitesi.....	73

3.12.2. ABTS <sup>+</sup> serbest radikal yakalama aktivitesi.....	73
3.13. Hemolitik aktivite.....	74
3.14. Laktik Asit Bakterilerinin Süpernatantlarının Antibakteriyal ve Antifungal Aktiviteleri.....	74
3.15. Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	75
3.16. Mayaların Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	80
3.17. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	81
3.17.1. Kongo kırmızılı agar (CRA) yöntemi.....	81
3.17.2. Mikrotitrasyon plak yöntemi.....	83
3.18. LAB'lerinin Süpernatantlarının Antiadezyon ve Antibiyofilm Aktiviteleri.....	90
3.18.1. Mikrotitrasyon plak.....	90
3.18.2. Hidroksiapatit (HA) disk.....	92
3.19. Laktik Asit Bakterilerinin Halitosis Üzerine Etkisi.....	94
4. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER.....	95
4.1. Mikrobiyal Çeşitliliğin Değerlendirilmesi.....	95
4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özellikleri.....	98
4.3. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....	111
4.4. LAB Süpernatantlarının Antiadezyon, Antibiyofilm Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....	113
4.5. LAB'lerinin Halitosis Üzerine Etkisi.....	114
KAYNAKÇA.....	117

## ÖZGEÇMİŞ

## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 3.1.</b> Bakteri izolatlarının Gram reaksiyonları ve katalaz aktiviteleri.....	38
<b>Tablo 3.2.</b> Maya izolatları.....	40
<b>Tablo 3.3.</b> Bakteri izolatlarının türleri ve GenBank erişim numaraları.....	41
<b>Tablo 3.4.</b> Bakteri cins ve türlerinin filumlara dağılımı.....	45
<b>Tablo 3.5.</b> Tanılanan bakteri türleri ve izolat sayıları.....	46
<b>Tablo 3.6.</b> Vitek 2 ile tanılanan mayalar ve benzerlik oranları.....	51
<b>Tablo 3.7.</b> Canlandırılan laktik asit bakterisi izolatları.....	52
<b>Tablo 3.8.</b> Laktik asit bakterilerinin <i>E. coli</i> , <i>S. mutans</i> ve <i>S. aureus</i> ile koagregasyon aktiviteleri.....	61
<b>Tablo 3.9.</b> Laktik asit bakterilerinin API ZYM ile belirlenen enzim aktiviteleri.....	65
<b>Tablo 3.10.</b> Laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivitesi.....	69
<b>Tablo 3.11.</b> Laktik asit bakterilerinin hidrojen peroksit üretim miktarı.....	71
<b>Tablo 3.12.</b> Laktik asit bakterilerinin laktik asit üretim miktarı .....	72
<b>Tablo 3.13.</b> Laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları.....	76
<b>Tablo 3.14.</b> Patojen olarak kullanılan bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları.....	79
<b>Tablo 3.15.</b> Maya izolatlarının antifungal duyarlılıkları.....	80
<b>Tablo 3.16.</b> Bakterilerin CRA aktiviteleri.....	81
<b>Tablo 3.17.</b> LAB izolatlarının farklı karbonhidratlarda oluşturdukları biyofilmlerin 570 nm'deki optik yoğunlukları.....	84
<b>Tablo 3.18.</b> Patojen bakterilerin farklı karbonhidratlarda oluşturdukları biyofilmlerin 570 nm'deki optik yoğunlukları.....	85

<b>Tablo 3.19.</b> Maya izolatlarının farklı karbonhidratlarda oluşturdıkları biyofilmlerin 570 nm'deki optik yoğunlukları.....	89
<b>Tablo 3.20.</b> Laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının antiadezyon aktiviteleri.....	90
<b>Tablo 3.21.</b> Laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının antibiyofilm aktiviteleri.....	91
<b>Tablo 3.22.</b> Laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının HA diskinde antiadezyon aktiviteleri.....	92
<b>Tablo 3.23.</b> Laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının HA diskinde antibiyofilm aktiviteleri.....	92
<b>Tablo 3.24.</b> HA diskindeki canlı bakteri sayısının inhibisyonu.....	92
<b>Tablo 3.25.</b> Koku analizi.....	94

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 1.1. Biyofilm oluşum aşamaları.....	5
Şekil 3.1. Bakteri izolatlarının cinslere dağılımı.....	46
Şekil 3.2. <i>Proteobacteria</i> filumundaki izolatların 16S rRNA dizileri ile oluşturulan Maximum Likelihood ağacı.....	48
Şekil 3.3. <i>Actinobacteria</i> filumundaki izolatların 16S rRNA dizileri ile oluşturulan Maximum Likelihood ağacı.....	49
Şekil 3.4. <i>Firmicutes</i> filumundaki izolatların 16S rRNA dizileri ile oluşturulan Maximum Likelihood ağacı.....	50
Şekil 3.5. Laktik asit bakterilerinin 3 mg/ml pepsin içeren pH 3 PBS tamponunda hayatta kalma yüzdeleri.....	54
Şekil 3.6. Laktik asit bakterilerinin 3 mg/ml pepsin içeren pH 2 PBS tamponunda hayatta kalma yüzdeleri.....	54
Şekil 3.7. Laktik asit bakterilerinin 1 mg/ml pankreatin içeren pH 3 PBS tamponunda hayatta kalma yüzdeleri.....	55
Şekil 3.8. LAB izolatlarının %0,08 safra tuzu (oxgall) içeren MRS broth besiyerinde inkübasyon sonrası 630 nm’de optik yoğunluk değerleri.....	56
Şekil 3.9. LAB izolatlarının %0,16 safra tuzu (oxgall) içeren MRS broth besiyerinde inkübasyon sonrası 630 nm’de optik yoğunluk değerleri.....	57
Şekil 3.10 LAB izolatlarının %0,3 safra tuzu (oxgall) içeren MRS broth besiyerinde inkübasyon sonrası 630 nm’de optik yoğunluk değerleri.....	57
Şekil 3.11. LAB izolatlarının %0,6 safra tuzu (oxgall) içeren MRS broth besiyerinde inkübasyon sonrası 630 nm’de optik yoğunluk değerleri.....	58
Şekil 3.12. LAB izolatlarının %1,25 safra tuzu (oxgall) içeren MRS broth besiyerinde inkübasyon sonrası 630 nm’de optik yoğunluk değerleri.....	58
Şekil 3.13. LAB izolatlarının %2,5 safra tuzu (oxgall) içeren MRS broth besiyerinde inkübasyon sonrası 630 nm’de optik yoğunluk değerleri.....	59

<b>Şekil 3.14.</b> LAB izolatlarının %5 safra tuzu (oxgall) içeren MRS broth besiyerinde inkübasyon sonrası 630 nm’de optik yoğunluk değerleri.....	59
<b>Şekil 3.15.</b> Laktik asit bakterilerinin otoagregasyon yüzdeleri.....	60
<b>Şekil 3.16.</b> Laktik asit bakterilerinin n-hekzadekan, etil asetat ve kloroform çözücülerine hidrofobisitesi.....	63
<b>Şekil 3.17.</b> Proteolitik aktivite standart eğrisi.....	69
<b>Şekil 3.18</b> Hidrojen peroksit standart eğrisi.....	70
<b>Şekil 3.19.</b> Laktik asit bakterilerinin DPPH serbest radikali yakalama yüzdesi.....	73
<b>Şekil 3.20.</b> Laktik asit bakterilerinin ABTS <sup>+</sup> serbest radikali yakalama yüzdesi.....	74
<b>Şekil 3.21.</b> Antibiyotik disklerinin LAB1.3.1.A izolatında oluşturdukları inhibisyon zonları.....	78
<b>Şekil 3.22</b> Antibiyotik disklerinin LAB6.3.A izolatında oluşturdukları inhibisyon zonları.....	78
<b>Şekil 3.23.</b> Antifungal disklerin oluşturdukları inhibisyon zonları.....	81
<b>Şekil 3.24.</b> CRA’da siyah renkli biyofilm pozitif (LAB13B) ve açık kırmızı renkli biyofilm negatif (KA8.1(1)) kolonilerin görüntüsü.....	83
<b>Şekil 3.25.</b> <i>Staph. aureus</i> BHI C1.2 izolatının HA diskinde oluşturduğu biyofilm görüntüsü.....	93
<b>Şekil 3.26.</b> <i>S. salivarius</i> M17A1.2 izolatının HA diskinde oluşturduğu biyofilm görüntüsü.....	93
<b>Şekil 3.27.</b> <i>N. perflava</i> BHIA7.A izolatının HA diskinde oluşturduğu biyofilm görüntüsü.....	93



## 1. GİRİŞ

İnsan vücudu 100 trilyondan fazla mikroorganizma tarafından kolonize edilmiştir (Wang vd., 2017). Mikrobiyal kolonizasyonun en yoğun olduğu bölgeler sindirim sistemi, ağız boşluğu, deri ve vajinadır. Sindirim sisteminden sonra mikrobiyal yüke sahip olan ikinci bölge ağız boşluğudur (Takashi, 2005). Ağız boşluğu tükürük ile sağlanan sürekli sıvı akışı, dişlerin sağladığı sert yüzeyler, sürekli karbon ve nitrojen girişiyle kendine has bir biyocoğrafyaya sahiptir. Ayrıca tükürüğün ve diş eti oluğu sıvısının salgılandığı noktalarda oluşan mikro çevreler de mikrobiyal çeşitliliğe katkı sunmaktadır (Kolenbrander vd., 2010). Yapılan araştırmalar oral mikrobiyotanın %70'i kültüre edilebilir, %30'u kültüre edilemeyen mikroorganizmalardan oluşan 700'den fazla türden oluştuğunu göstermektedir (Verma vd., 2018).

Biyofilm birbirine ve/veya yüzeylere bağlanmış bakteriyal popülasyonlarla kaplanan matriks ya da daha ayrıntılı bir tanım ile genellikle yakından ilişkili komünitelerin doğal ya da yapay yüzeylerde oluşturduğu, mikrobiyotanın ihtiyacını karşılayacak yeterli miktarda besinin olduğu sulu çevrelerde oluşan bakteriyal agregatlar olarak açıklanmaktadır. Biyofilm mikroorganizma, su ve bir miktar besinin olduğu tüm yüzeylerde oluşabilmektedir (Arweiler ve Netuschil, 2016).

Oral biyofilm ise mikroorganizmaların diş yüzeylerinde ya da subgingival bölgelerde oluşturdukları yapısal olarak organize olmuş dinamik ve kompleks bir ekosistemdir. Dünyada en yaygın hastalıklar olan periodontal hastalıklar ve diş çürüklerine neden olduğu bilinmektedir (Velsko ve Shaddox, 2018).

Oral biyofilmin oluşumunu önlemek için mekanik temizliğe destek olmak amacıyla bazı kimyasal ajanlar kullanılmaktadır. Bunların içinde klorheksidin geniş antimikrobiyal etki spektrumuna sahip olan en sık kullanılan ajandır (Jones, 1997). Oluşan biyofilimde asit oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (Van vd., 1996). Ancak dişlerde renklenme, uzun süreli kullanımında ise ağızda mantar oluşumu, tat duyusunun bozulması, diş taşı oluşumu gibi birçok yan etkisi bulunmaktadır (Addy, 1986). Bu nedenlerden ötürü özellikle çocuklarda biyofilm oluşumunun engellenmesi ve giderimine yönelik doğal içeriğe sahip uygulamaların kullanılması önem kazanmıştır.

Laktik asit bakterileri GRAS (Generally Regarded as Safe) statüsünde mikroorganizmalardır (Kuramitsu vd., 2007). Oral mikrobiyotada doğal olarak bulunan bu bakterilerin probiyotik özellikleri ile insan sağlığına katkı sağladığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda probiyotik içeren gıdaların diş çürüğü etmeni *Streptococcus*

*mutans*'ı inhibe ettiği gösterilmiştir (Nase vd., 2001; Çağlar vd., 2005). Ayrıca periodontal hastalıkların tedavisine katkı sağladıkları, laktik asit içeren gargaraların ağız kokusunu engellediği bildirilmiştir (Kang vd., 2006; Riccia vd., 2007).

Bu çalışmanın amacı çocukların diş yüzeylerinde oluşan biyofilmlerdeki kültüre edilebilen mikroorganizma çeşitliliğinin ortaya çıkarılması, izole edilen laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin incelenmesi ve antibiyofilm, antiadezyon etkileriyle halitosis üzerine etkilerinin açığa çıkarılarak ağız sağlığına fayda sağlayacak oral probiyotik potansiyellerinin değerlendirilmesidir.

### 1.1. Oral Mikrobiyota

İnsan sindirim sistemi yaklaşık  $10^{14}$  mikroorganizma içermektedir. Sindirim sisteminin girişi olan ağız boşluğu da insan vücudunda bağırsaklardan sonra en fazla mikrobiyal yüke sahip olan ikinci yerdir (Takahashi, 2005). Ağızda tükürük, mukoza, dil gibi yumuşak dokular ile diş yüzeyi, supragingival, subgingival dokular ve oral implantlar gibi sert yüzeylerin bulunması oral mikrobiyotanın heterojen bir yapıda olmasına neden olmaktadır. Her dokunun kendine özgü karakteristiği vardır. Bu çevreye en iyi uyum sağlayan mikroorganizmaların bölgeye yerleşmesine neden olur. Ağız boşluğundaki farklı lokasyonlara yerleşmiş 700'den fazla mikroorganizma türünün olduğu belirlenmiştir (Arweiler ve Netuschil, 2016). Ağızın sürekli tükürük ile yıkanmasının da ağız ekolojisi üzerinde büyük bir etkisi vardır. Ortalama pH değeri 6,75-7,25 arasındadır. Bu da birçok mikroorganizmanın gelişimini desteklemektedir (Marsh, 2000). Bunun yanı sıra IgA'nın da içinde bulunduğu antibakteriyal faktörler içererek konak savunmasında yer almaktadır (Marsh, 2000).

Diş eti oluğu sıvısı da tükürük gibi ağız ekolojisi üzerinde etkilidir. Serum bileşenleri ağıza bu sıvı aracılığı ile ulaşmaktadır. Sağlıklı bölgelerde sıvı akışı düşüktür fakat periodontal hastalıklar ile birlikte artmaktadır. Diş eti oluğu sıvısında IgM, IgA ve yüksek oranda IgG bulunmaktadır. Zayıf bağlanmış hücreleri uzaklaştırarak, konak savunma bileşenlerini taşıyarak ve mikroorganizmalara besin kaynağı sağlayarak oral ekolojiyi etkilemektedir (Marsh, 2000).

Kültürel ve kültür bağımsız çalışmalar oral mikrobiyotanın karakterizasyonu ile ilgili bilgiler sunmaktadır (Verma vd., 2018). Buna göre; *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *Tenericutes*, SR1 ve TM7 kommensal bakteri filumlarına ait üyeler oral mikrobiyotayı

oluşturmaktadır (Wade, 2013). Açık bir sistem olan ağızda tespit edilen *Acidobacteria*, *Chlamydiae* ve *Deinococcus-Thermus* filumu üyelerinin geçici kolonizasyon yapan bakteriler olduğu; gıdalar içecekler, çevreden alındığı bildirilmektedir. Arkea oral mikrobiyotanın küçük bir bileşenidir. Periodontitisle ilişkilendirilen *Methanobrevibacter oralis* ve *Methanobacterium curvum/congolense*, *Methanosarcina mazeii* ile temsil edilmektedir (Wade, 2013). Ökaryotik kommensal üyeleri ise funguslar oluşturmaktadır. Ağız boşluğundan en çok izole edilen tür *Candida albicans*'tır. Candidosize neden olduğu bilinen bu tür sağlıklı ağızlardan da izole edilmiştir. *Cryptococcus* spp., filamentli funguslar (*Aspergillus* spp., *Zygomycetes*) ve dimorfik fungusların (*Histoplasma*, *Blastomyces*, *Coccidioides*) ilişkili olduğu oral lezyonlar bildirilmiştir. Fakat bu örnekler daha çok bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda görülmüştür (Diaz vd., 2017).

Rahim içinde steril olan fetüse ilk mikroorganizma transferi doğum kanalı aracılığıyla olmaktadır. Ardından anneden, süt, su ve gıdalarda bulunan mikroorganizmalarla karşılaşmaktadır. Yenidoğanda kolonizasyon için sadece epitel yüzeyler mevcuttur. Öncü mikroorganizmalar aerobik ve fakültatif anaerobik türlerdir. *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* biovar 1 ve *Streptococcus salivarius* baskın türler olarak tespit edilmiştir. Öncü oral komünite üyelerinin çeşitliliği ilk birkaç ay boyunca artmaktadır ve Gram negatif anaerobik bakterilerin kolonizasyonu başlamaktadır. Bu aşamada en baskın anaerobik bakteri *Prevotella melaninogenica*'dır. Diğer türler ise *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella* sp., pigmentless *Prevotella* sp., *Capnocytophaga* spp., *P. loescheii* ve *P. intermedia*'dir. Dişlenme ile birlikte mikroorganizmaların kolonize edeceği lokasyonlar da artmaktadır. Bu da tür çeşitliliğine yansımaktadır. Bu dönemde Gram negatif bakterilerin sayıca arttığı ve *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sanguinis* kolonizasyonunun başladığı görülmektedir (Marsh, 2000). Karyojenik *S. mutans* kolonizasyonunun başladığı dönem Caufield vd., (1993) tarafından 'infektivite penceresi' olarak tanımlanmıştır. Fakat yapılan son çalışmalarda diş çıkarmamış çocuklarda bu bakterinin bulunması yumuşak dokuların oral patojenik bakteriler için bir kaynak olabileceğini göstermektedir (Sampaio-Maia ve Monteiro-Silva, 2014).

Üç yaşında tükürükteki mikroorganizma çeşitliliği artmakta ve mikrobiyotanın olgunlaşması yetişkinliğe kadar sürmektedir. İlk dişlenmeyle birlikte Gamaproteobakteri grubu, özellikle *Pseudomonaceae*, *Moraxellaceae*, *Enterobacteriaceae* ve *Pasteurellaceae* familyalarının bulunma oranı artmaktadır. Kalıcı dişlerin çıkmasıyla

*Veillonellaceae* familyası ve *Prevotella* cinsi üyelerinin sayısı artarken, *Carnobacteriaceae* familyası üyelerinin sayısı azalmaktadır (Sampaio-Maia ve Monteiro-Silva, 2014).

Herhangi bir yüzeyin kommensal mikroflorasının oluşması mikroorganizmaların kolonizasyon potansiyeline bağlıdır. Ağız boşluğundaki yüzeylere adsorbe olmuş tükürük bileşenlerine bağlanma ilk adezyondur. Yüzeyin kompozisyonuna göre spesifik bileşenler adsorbe edildiği için farklı yüzeylerde farklı reseptörler bulunmaktadır.

Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalar planktonik bakterilere yoğunlaşmış olsa da günümüzde oral mikrobiyota üyelerinin %80-90 oranında biyofilm oluşumu ile varlıklarını sürdürdükleri bilinmektedir (Arweiler ve Netuschil, 2016).

## **1.2. Oral Biyofilm**

Biyofilm mikroorganizmaların bir substrata ve birbirlerine bağlanarak, kendi üretmiş oldukları ekstraselüler polisakkaritlerden oluşan bir matriks içerisinde gömülü olan, planktonik mikroorganizmalara göre gen alışverişi ve büyüme hızları gibi farklılıklar gösteren bir komünitedir (Donlan ve Costerton, 2002).

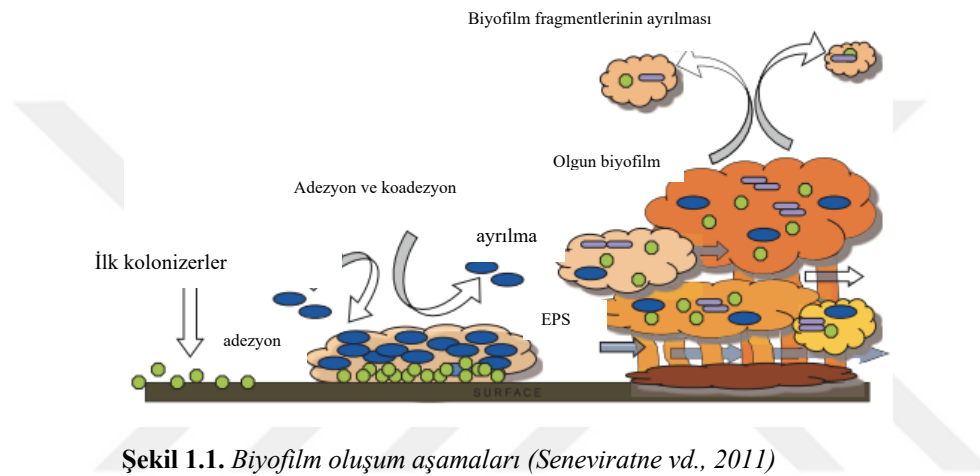
Biyofilm oluşumu ve olgunlaşması dinamik ve kompleks birçok biyolojik olayın neticesinde gerçekleşmektedir. Oral biyofilmin oluşmasında ilk adım olan adezyonu etkileyen yüzey gerilimi, hidrofobisite gibi kimyasal etkileşimler, van der Waals bağları, hidrojen ve kalsiyum köprülerini içeren etkileşimler mevcuttur. Sükroza bağlı adezyon biyofilm içinde baskın olan bir çeşittir ve glukoziltransferaz, fruktoziltransferaz enzimleriyle polisakkarit üretimi ile ilişkilidir. Glukoziltransferaz enzimi sükrozdan glukun üretimini katalizlemektedir. Glukunlar bakteri adezyonu ve oral yüzeylerde birikimde araçlardan biri olarak tanımlanmaktadır. Fruktoziltransferaz enzimi sükrozdan fruktan polimerlerinin sentezini katalizlemektedir. Bakteri karbonhidrat metabolizmasında yer alan ve besin rezervuarı olarak kullanılan fruktan aynı zamanda biyofilm oluşumunda bağlanma bölgesi görevi görmektedir (Steinberg, 2016).

Biyofilm içinde sinyalizasyon otoindükleyici adı verilen küçük moleküller ile gerçekleşmektedir. Bu sinyalizasyon çoğunluk algılamadır ve bakterilerin biyofilm yapısı içinde yakın mesafede iletişimini sağlamaktadır. Gram pozitif bakteriler kompetens stimüle edici peptidleri (CSP), Gram negatif bakteriler ise homoserin laktonları (HSL) kullanmaktadır. Otoindükleyici-2 (AI-2) ise Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler

tarafından da kullanıldığı için evrensel olarak tanımlanmaktadır (Steinberg, 2016). Bu etkileşimlerin gerçekleştiği oral biyofilm dört basamaklı bir süreçten oluşmaktadır.

Şekil 1.1.'de oluşum aşamaları verilmiştir.

- Pelikül oluşumu
- İlk adezyon
- Olgunlaşma
- Biyofilmin dağılması



Şekil 1.1. Biyofilm oluşum aşamaları (Seneviratne vd., 2011)

**Pelikül oluşumu:** Oral biyofilmler yüzeye tutunmak için konak tükürük glikoproteinlerine ihtiyaç duyduklarından diğer biyofilmlerden farklıdır. Tükürük glikoproteinlerinden türevlenmiş ince bir film olan pelikülün temiz diş yüzeyine tutunması biyofilm oluşumunda ilk basamaktır. Glikoproteinler, diğer tükürük bileşenleri ve diş yüzeyi arasında birçok etkileşim gerçekleşir. Bu etkileşimlerde rol oynayan güçler van der Waals bağları, hidrofobik etkileşimler ve kovalent bağlardır. Bu güçlerle adsorbe edilir, yeniden düzenlenir ve bazı konformasyonel değişiklikler geçirirler (Huang vd., 2011). Bazı tükürük reseptörleri kryptotiptir, yani aktif konfigürasyonu yalnızca bir yüzeye bağlandıktan sonra elde etmektedir. Prolin zengini proteinler ve statherin bileşenleri diş minesine sıkıca bağlanır. Böylece streptokoklar tarafından tanınacak peptid epitoplari ve kryptotipler sunarlar. gp340 gibi glikoproteinler, tükürük müsünlere diş minesine ve epitel yüzeylere adsorbe olur. Streptokoklara ve diğer ilk kolonizerlere reseptör sağlamış olurlar.  $\alpha$ -amilaz, immunoglobulinler, fibronektin, laktoferrine streptokokların bağlanabildiği, dolayısıyla adezyon için tüm reseptörlere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu da streptokokların reseptör tanımda daha düşük değişkenliğe sahip

olan türlere karşı avantajlı duruma geçmesini sağlamaktadır (Jenkinson ve Lamont, 2005).

**İlk adezyon:** Biyofilm oluşumunun ikinci basamağı bakterilerin peliküle adezyonudur. Bazı bakteriler peliküldeki  $\alpha$ -amilaz ve prolin zengini glikoprotein ya da proteinleri tanıyarak peliküle bağlanırlar. Fakat bu aşamada bağlanan bakteriler kolaylıkla uzaklaşabilir. Çünkü bağlanma elektrostatik çekime ya da fiziksel bağlanmaya dayanmaktadır. İlk kolonize olan mikroorganizmalar öncü türlerdir ve birlikte öncü mikrobiyal komüniteyi oluşturur. Öncü bakteriler bağlandıktan sonra ekstraselüler polisakkarit (EPS) salgılamaya başlar. Böylece peliküle ve birbirlerine bağlı kalmaları kolaylaşmaktadır (Huang vd., 2011).

Ağızda baskın öncü organizmalar streptokoklardır. İlk kolonize olan mikroorganizmalar öncü mikrobiyal komüniteyi oluşturur. Komünite gelişiminin başlangıcının altında yatan prensip mikroorganizmaların yüzeye adezyonudur. Öncü organizmalar ikincil mikroorganizmaların bağlanması için yeni bir yüzey ve sinyaller sağlarlar. Baskın öncü organizmalar *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* türleridir. Diğer ilk kolonizer olan bakteriler *Actinomyces*, *Veillonella* ve *Neisseria* cinsleridir (Jenkinson ve Lamont, 2005).

**Olgunlaşma:** Biyofilmin olgunlaşma basamağında ikincil kolonizer bakteriler öncü bakterilerin hücre yüzeylerindeki reseptörleri ya da proteinleri tanıyarak bağlanmaktadır. Bu bağlanma koregasyon olarak adlandırılmaktadır. Biyofilmdeki tür çeşitliliğinin temelini oluşturmaktadır. *Actinomyces* ve streptokoklar arasındaki lektin-karbonhidrat ve protein-protein etkileşimleri; *Veillonella* ve streptokoklar arasındaki metabolik etkileşimlerinin her iki türün de yararına olduğu bildirilmiştir. Türler arasındaki etkileşimler oldukça spesifik olabilmektedir. Örneğin; *Streptococcus gordonii*'nin SspB protein adezinleri yalnızca *Actinomyces naeslundii*'nin alt gruplarını tanımaktadır. (Jenkinson ve Lamont, 2005). Daha sonra bağlanan bakteriler arasında *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema* spp, *Tannerella forsythensis*, *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gibi türler bulunmaktadır. Olgun bir biyofilm ile başlangıç biyofilmi mikrobiyal içerik bakımından oldukça farklıdır. Biyofilm gelişimi süresince oransal bir değişim de gerçekleşmektedir. *Streptococcus* ve *Neisseria* miktarı düşerken, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Fusobacterium* ve *Veillonella* miktarı artmaktadır (Huang ve ark., 2011).

**Biyofilmin dağılması:** Olgunlaşmış bir biyofilmden tek bir hücrenin ya da hücre gruplarının ayrılması ile biyofilm dağılmaya başlamaktadır. Dağılmanın iki nedeni vardır. İlki biyofilmin oluştuğu alanda besin miktarının azalması ve besin miktarının daha fazla olduğu bölgelere yerleşme ihtiyacıdır. İkinci neden ise konak savunmasıdır. Dağılma mekanizması aktif ve pasif dağılma olarak iki şekilde gerçekleşmektedir. Aktif dağılma bakterinin kendisinin başlattığı mekanizmaları kapsarken, pasif dağılma tükürüğün akış kuvveti gibi dış etkenlerden ötürü gerçekleşmektedir (Kaplan, 2010).

### 1.3. Oral Biyofilmdeki Ekolojik Etkileşimler

Oral mikrobiyota üyeleri oluşturdukları biyofilm içinde yakın temas halindedirler. Bu yakın temas mikroorganizmaların birbirleriyle sinerjik ve antagonistik etkileşimler içinde olmasına neden olmaktadır. Oral mikrobiyotanın kompozisyonu oral çevre şartlarından etkilenir. Lokal çevre şartlarının değişimi oral mikrobiyota ile konak arasındaki ilişkiyi de etkilemektedir. Konak ve oral mikrobiyota arasındaki ilişki değişen çevre şartlarına göre simbiyotik ya da disbiyotik olmaktadır. Bu da potansiyel olarak oral komünitenin çürüğe ya da periodontal hastalıklara neden olma riskini taşımaktadır (Takahaski, 2005).

#### 1.3.1. Sinerjik etkileşimler

Oral biyofilm içindeki bakterilerin birbirleriyle sinerjik etkileşimleri bakterilerin biyofilimde varlıklarını sürdürmelerine yardımcı olmaktadır. Bu ilişki birbirlerinin metabolik ürünlerinden, biyofilmin yapısal özelliklerinden yararlanmayı, gen transferini, antibiyotik direnci ve quorum algılamayı içermektedir.

**Metabolik ürünlerden faydalanma:** Oral biyofilmi oluşturan mikroorganizmalar metabolik aktiviteleri sonucunda ürettikleri metabolitleriyle çevre şartlarını değiştirmektedir. Bu değişim bir ya da birden fazla türün gelişimine katkı sağlayabileceği gibi biyofilm içinde bir besin zinciri de oluşturmaktadır. Bu şekilde gelişen bir etkileşime örnek; *Veillonella* sp., *Prevotella* sp.ve *Porphyromonas* sp. arasındaki ilişkidir. *Veillonella* sp. ürettiği K vitamini sayesinde iki bakterinin gelişimi desteklemektedir. *Veillonella* sp. biyofilmdeki varlığı ise *Streptococcus* sp. tarafından üretilen bir kısa yağ asidi zinciri olan laktat üretimine bağlıdır. Benzer bir ilişki *P. gingivalis* ve *T. denticola* arasında bulunmaktadır. *T. denticola*'nın ürettiği süksinik asit *P. gingivalis*'in hücre zarındaki lipid ve fosfolipidlerin yapısına katılmaktadır. *T. denticola*'nın gelişimi ise *P.*

*gingivalis*'in ürettiği isobütirik asit ile stimüle edilmektedir (Hojo vd., 2009). *Candida* sp. ve *S. mutans* arasındaki sinerjik metabolik ilişki ise sükrözün *Candida* sp. tarafından etkili bir şekilde kullanılmamasına dayanmaktadır. *S. mutans* sükrözü parçaladıktan sonra oluşan glukoz ve fruktozu *Candida* sp. kullanmaktadır. Bununla birlikte *Candida* sp.'nin bulunması *S. mutans*'ın EPS üretimi ve kompetens ile ilişkili genlerini aktive etmektedir. Bu da *S. mutans*'ın mikro koloniler halinde toplanmasına katkı sağlamaktadır (Kim vd., 2016).

Aerobik ve obligat anaerobik bakteriler arasındaki oksijen metabolizması biyofilmdeki obligat anaerobik bakteriler için oldukça kritiktir. Aerobik bakteriler oksijen tüketerek redoks potansiyel gradientini oluşturur. *F. nucleatum* anaerobik ve aerobik bakteriler agregasyon oluşturabildiği için köprü görevi görmektedir. (Bradshaw, 1998).

Bazı bakteriler ise metabolizmaları sonucu ürettikleri asit ile diğer bakterilerin biyofilmdeki varlığını sürdürmelerine yardım etmektedir. *F. nucleatum* ve *Prevotella intermedia* geniş pH aralığında yaşayabilirken, *P. gingivalis* ise pH 6,5'ten düşük pH seviyesine duyarlıdır. *F. nucleatum* ve *P. intermedia*'nin glutamat ve aspartat fermentasyonu ile ürettiği amonyak ve organik asitler pH seviyesini daha nötr hale getirerek *P. gingivalis* için uygun bir ortam sağlamaktadır (Huang vd., 2011).

**Biyofilmin yapısından faydalanma:** Biyofilmin ana bileşenlerinden biri EPS'dir. Her biyofilmde farklı tiplerde EPS üretilmektedir. Biyofilm içindeki türler arasında iletişimi sağlayan bir ortamdır. Komüniteye zararlı substratların biyofilme girişini engellemesinin yanında besin konsantrasyonunun arttığı bir lokal çevre sunmaktadır. Bunlara ek olarak savunmada etkili bir rol oynamaktadır. Biyofilmi konağın bağışıklık sistemi hücrelerinin fagositozundan korumaktadır. Ayrıca antimikrobiyal ajanlara karşı da koruma sağladığı düşünülmektedir (Jefferson, 2004; Huang vd., 2011).

**Gen transferi:** Biyofilmdeki hücrelerin yakınlığı horizontal gen transferi için ideal bir ortam sunmaktadır. DNA dış ortamdan ya da bir başka türden de alınabilmektedir. DNA transferi üç şekilde gerçekleşmektedir: transdüksiyon, konjugasyon ve transformasyon. Transdüksiyonda bakteri bakteriyofaj ile enfekte olur ve virüs DNA'sı konak genomuna entegre olmaktadır. Bakterinin hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlerin rol oynadığı bu transferde paketlenmiş DNA 100 kb büyüklüğünde olabilmektedir. Bakteriyofaj proteinleri çift zincirli DNA'sını konak endonükleazlarından korur. Konak kromozomuna entegre olduktan sonra dormant halde kalabileceği gibi konağın lizisine de sebep olabilmektedir (Olsen vd., 2013).



Konjugasyon hücre-hücre teması ile gerçekleşir. Metabolik olarak aktif iki hücre arasında F plazmidleri, (seks faktörü), birleştirici konjugasyon elementleri, konjugatif transpozonlar (alıcı strainlere transpozisyonunu sağlayan proteinleri kodlar) ile DNA transferidir. Konjugatif transpozonlar sıklıkla Gram pozitif bakterilerde görülür. Transpozonların her yerde bulunuşları, geniş çeşitlilikteki antibiyotik direncinin yayılmasında önemli rol oynamalarına neden olur. Biyofilm içindeki yüksek yoğunluktaki hücreler konjugasyon ile plazmidlerin yayılmasını sağlar. Bu olay da biyofilm oluşumunu uyarır (Olsen vd., 2013).

Transformasyonu çevreden DNA'yı alabilme yeteneği olan hücreler gerçekleştirmektedir. Bu kompetens yeteneği farklı *com* genleri ile kodlanmaktadır ve quorum algılamayı içermektedir. Ağızdaki bazı türler doğal olarak kompetenstir. Örneğin; *Haemophilus*, *Campylobacter* ve *Neisseria* gibi. *Streptococcus* gibi diğer bazı türler ise sadece spesifik fizyolojik durumlarda kompetenstir. Dental plağın serbest DNA kaynağı biyofilm içinde bakterilerin etrafını saran matrikstir. Liziz olan hücrelerin DNA'ları, ya da matrikse yapısal destek vermek için yaşayan komünite üyeleri tarafından salgılanan DNA transformasyon kaynağını oluşturur (Olsen vd., 2013).

Birçok Gram negatif bakteri büyümeleri sırasında membran vezikülleri (MV) oluşturur ve salarlar. MV içindeki genetik içerik korunmaktadır. Bu veziküller diğer türlerin yüzeylerine entegre olarak genetik materyal ya da virülans faktörlerini tür içinde ya da türler arasında aktarabilmektedirler (Olsen vd., 2013).

Horizontal gen transferi oral bakterilerin içinde buldukları çevrenin geniş metagenomdan faydalanmasına imkan tanımaktadır. Bu şekilde çevresel değişimlere karşı adaptasyon potansiyelleri artmaktadır. Karbonhidrat açısından zengin olan ağız boşluğuna metabolik adaptasyonu sağlayan, glikolizde görev alan genlerin bir *Lactobacillus salivarius* suşunda plazmid içinde taşındığı gösterilmiştir (Marsh ve Zaura, 2017). Plazmidler fusobakterilerin horizontal gen transferinde önemli role sahiptir. *Fusobacterium nucleatum*'un genetik analizleri yüksek oranda çeşitlilik olduğunu göstermiştir ve bu nedenle bu türün evriminde önemli olduğu düşünülmektedir. Klinik *F. nucleatum* izolatlarından iki strainin, *F. nucleatum*, *Peptostreptococcus anaerobius* ve *Enterococcus faecalis*'e konjugasyon yolu ile tetrasiklin direnç genini (*tet*) aktardığı gösterilmiştir (Olsen vd., 2013).

*Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* ve patojen *Streptococcus pneumoniae* türlerindeki penisilin direnç genlerinin aynı mozaik yapıyı göstermesi oral biyofilm

içindeki gen transferi nedeni ile gerçekleşmektedir (Marsh ve Zaura, 2017).

**Çoğunluk algılama:** Bakterilerin biyofilm içinde haberleşmesini sağlayan kimyasal düzenlemeler hücre yoğunluğuna bağlı olan gen regülasyonu ile gerçekleşmektedir. Bu süreç çoğunluk algılama (QS) olarak adlandırılmaktadır. Bakterin kimyasal sinyaller ile iletişim kurduğu ilk olarak *Vibrio fischeri*'de tespit edilmiştir. Bakterinin sadece yüksek hücre yoğunluğuna ulaştığında biyoluminens olduğu gösterilmiştir (Biradar ve Devi, 2011). Bakterilerde quorum algılama sistemleri genel olarak üç sınıfa ayrılmaktadır: 1) LuxI/LuxR-tipi quorum algılama. Gram negatif bakterilerde görülen bu sistemde sinyal molekülleri olarak açıl-homoserin laktonlar (AHL) kullanılmaktadır. 2) İki bileşenli oligopeptid quorum algılama. Gram pozitif bakterilerde görülen bu sistemde küçük peptidler sinyal molekülü olarak kullanılmaktadır. 3) LuxS tarafından kodlanan otoindükleyici 2 (AI-2) quorum algılama. Her iki tipte sinyal molekülünün kullanıldığı bu sistem, Gram pozitif ve negatif bakterilerde görülmektedir (Li ve Tian, 2012).

*S. mutans* çoğunluk algılamada iki peptid; kompetens stimule edici peptid (CSP) ve sigma X-indükleyici peptid yer almaktadır. Bu peptidlerin üretimi lokal pH değerinden ve karbonhidrat kaynağından etkilenmektedir. CSP-quorum algılama sistemi *S. gordonii* ve *Streptococcus intermedius*'da da görülmektedir. Oral biyofilmi oluşturan birçok cinsinin haberleşmesini sağlayan AI-2 sisteminde ko-adezyon sinyalizasyonu arttırmaktadır. *S. oralis*'te AI-2 işlevi bozulduğunda *A. naeslundii* ile ko-adezyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir (Marsh ve Zaura, 2017).

*S. mutans*'ta en iyi açıklanan QS sistemi CSP-ComDE sistemidir. CSP-ComDE ile regüle edilmiş hücredeki ilk fenotip dış ortamdaki DNA'yı alarak kompetens hale gelmesidir. Genetik kompetens genel stres cevabıyla tetiklenmektedir. DNA hasarı ya da açlık gibi stres sinyalleri kompetens yolaklarını aktif hale getirerek DNA hasarı tamiri ya da diğer hücresel hasarları tamir edecek rekombinasyonel mekanizmaları devreye sokmaktadır. Isı şoku, oksidatif stres, asidik pH, amino asit yokluğu ve antibiyotik alımının CSP üretimini aktif hale getirdiği bilinmektedir. *S. mutans*'ta tanımlanan diğer QS sistemi sigma X-indükleyici peptid (XIP) ve transkripsiyonel regülatörü ComR'den oluşan ComRS sistemidir. CSP, besin yönünden zengin besiyerinde SigX'i aktif hale getirirken XIP ise ekzojen peptidlerden yoksun olan besiyerinde aktive etmektedir (Leung vd., 2015).

**Antibiyotik direnci:** Oral biyofilmi oluşturan bakteriler antimikrobiyal maddelere yüksek tolerans göstermektedir. Örneğin; biyofilm oluşturmuş *Streptococcus sobrinus*'u öldürmek için gereken klorhekzidin ve amin florid konsantrasyonu, planktonik *S. sobrinus*'un için gereken bakteriosidal konsantrasyondan sırasıyla 300 ve 75 kat daha fazladır. Araştırmalar antibiyotik direncinde biyofilmin yaşının da önemli olduğunu ortaya koymuştur. *S. sanguinis* ve *A. actinomycetemcomitans*'ın oluşturduğu olgun biyofilmlerin klorhekzidine karşı daha dirençli olduğu görülmüştür (Marsh, Moter ve Devine, 2011).

Oral biyofilmde antibiyotik direncini oluşturan birçok mekanizma açıklanmıştır: 1) antimikrobiyal maddelerin penetrasyonunun kısıtlanması, 2) genel stres cevabı, 3) büyüme oranının ve metabolizmanın azalması, 4) çoklu ilaç direnci (MDR) pompalarının ekspresyonunun artması, 5) quorum algılama sistemlerinin aktif hale gelmesi ve 6) dış membran proteinlerinin (OMP) profillerinin değişimi (Kouidhi vd., 2015).

### 1.3.2. Antagonistik etkileşimler

Oral biyofilmin kompleks ve bakteri çeşitliliği yüksek olan yapısının içinde bakterilerin varlıklarını korumaları rekabet yeteneklerine bağlıdır. Besin ve bağlanma bölgeleri için tür içi ve türler arasında antagonistik etkileşimler gerçekleşmektedir. Bakteriosin ve benzeri maddelerin üretilmesi ile diğer bakterilerin gelişimini engellemek ya da bakterilerin quorum algılama mekanizmalarını quorum sönmüleme adı verilen süreç ile inhibe etmek bakterilerin rekabet stratejilerindedir (Marsh ve Zaura, 2017; Basavaraju vd., 2016).

Bakteriosinler Gram pozitif ve negatif bakteriler tarafından üretilen, yakın türlerin ya da suşların büyümesini inhibe eden, protein yapısındaki bakteriosidal maddelerdir (Hojo vd., 2009). *S. mutans* iki farklı tipte mutasin üretmektedir. İlki geniş aktivite spektrum olan bir lantibiyotik, diğeri ise lantibiyotik olmayıp dar bir antimikrobiyal aktivite spektrumuna sahiptir (Merritt ve Qi, 2012). Oral biyofilmde bulunan diğer streptokok bakteriosinlerine örnek olarak *S. sanguinis*'in ürettiği sanguisin ve *S. salivarius*'un ürettiği salivarisin verilebilir (Marsh ve Zaura, 2017). Oral laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus reuteri* periodontal patojen ve karyojenik bakterilere karşı etkili olan reuterin adı verilen bakteriosin üretmektedir (Kang vd., 2011).

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) üretimi biyofilm içinde rekabet aracı olarak kullanılmaktadır. *S. gordonii* ve *S. sanguinis*, *S. mutans* ile rekabetlerinde  $H_2O_2$ 'yi

kullanmaktadır (Kreth vd., 2008). Oral biyofilmdeki potansiyel periodontal patojenlerin kontrolünde kullanılan ana mekanizma olarak tanımlanmaktadır. Supragingival biyofilmdeki *Neisseria* sp. ve *Actinomyces* sp. gibi türlerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i kullanabilmesi biyofilmin farklı yerlerinde değişen oranlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olmasına neden olarak antagonistik ve sinerjik etkiler arasında denge kurulmasını sağlamaktadır (Marsh ve Zaura, 2017).

Quorum sönmüleme; sinyal moleküllerinin degradasyonu, sinyal oluşumunun engellenmesi ve sinyal alımının inhibisyonu gibi birçok yol ile yapılmaktadır. Quorum algılama inhibitörleri yapıları ve işlevleri bakımından iki gruba ayrılmaktadır. İlk grup QS sinyallerini yapısal olarak taklit eden moleküllerdir. Halojenize furanonlar AHL sinyallerine, sentetik AI peptidleri ise AI peptidlerinin benzerleridir. Bu inhibitörler reseptörlere bağlanır ya da reseptör konsantrasyonunu düşürmektedir. Diğer grup ise enzim inhibitörlerini içermektedir. Örneğin; triklosan AHL sentezinde gerekli olan enoyl-ACP redüktazı inhibe etmektedir (Basavaraju vd., 2016).

#### **1.3.2.1. Patojenite potansiyeli**

Mikrobiyal ekosistem içinde mikrobiyal ve çevresel dinamiklerin değişimi patojenite potansiyelini arttırarak hastalık oluşumunu başlatabilir. Bu birbiri ardına meydana gelen değişimler Marsh (2003) tarafından 'ekolojik plak hipotezi' olarak adlandırılmıştır.

Supragingival bölgede, *S. mutans* ve *Actinomyces* sp. çevreyi asitleştirir. Asit adaptasyonu ile kazanılan asidojenite ya da asidurite bakterilerin karyojenik potansiyellerini arttırabilmektedir. *S. mutans*'ın çürüklerde ve diş yüzeyindeki beyaz noktalarda sağlıklı bölgelere göre daha fazla bulunduğu bilinmektedir (Takahashi, 2005).

Subgingival bölgede ise stabil bir diş yüzeyi ve stabil olmayan, dökülen bir epitel yüzeyi bulunmaktadır. İki yüzey de sürekli olarak diş eti oluğu sıvısı ile yıkanmaktadır. Bu sıvı kan plazmasından türevlenir, amino asit, peptid ve protein açısından zengindir. Diş eti oluğu derinleştikçe çevresel şartlar daha stabil (nötral pH, anaerobik) hale gelmektedir. Bu koşullar altından *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Campylobacter*, *Prevotella* ve *Porphyromonas* gibi sakkarolitik, anaerobik ve/veya proteolitik bakteriler bulunmaktadır. Bakteriye proteazlar ve metabolik son ürünler, lipopolisakkarit gibi bakteri hücre bileşenlerinin yaptığı gibi enflamasyon ve immun reaksiyonlarına sebep olmaktadır. Proteazlar konak dokularını degrades eder, dolaylı olarak konak savunma proteinlerini (immunoglobülin ve kan koagülasyon sistemi) degrades etmektedir. Kısa yağ

zincirleri (propionik, bütirik, izobütirik, izovalerik asit), amonyak ve sülfür bileşenleri (hidrojen sülfid, metil merkaptan) gibi metabolik son ürünler konak hücre fonksiyonlarını zayıflatır ve konak savunmasına zarar vermektedir. Bu sürecin sonunda periodontal hastalıkların oluşma olasılığı artmaktadır (Takahashi, 2005; Marsh ve Percival, 2006).

#### 1.4. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakteri (LAB) morfolojik, metabolik ve fizyolojik karakteristikleriyle bir takım oluşturan Gram pozitif bakterilerden oluşan bir gruptur. Bu gruptaki bakteriler genel olarak Gram pozitif, spor oluşturmeyen, karbonhidratların fermantasyonu sonucu son ürün olarak laktik asit üreten, kok ya da çubuk morfolojisinde bakterilerdir. Laktik asit bakterilerinin farklı cinslere klasifikasyonunda morfoloji, glikoz fermantasyonu şekli, büyüme sıcaklığı, laktik asit konfigürasyonu, yüksek tuz konsantrasyonlarında büyüme, asit ya da alkali toleransı kullanılan parametrelerdir. Hücre duvarı bileşenleri, yağ asidi kompozisyonu gibi kemotaksonomik markırlar da kullanılmaktadır. Şu anki taksonomi rRNA dizi bilgisinden elde edilen gerçek filogenetik ilişkilere dayanmaktadır (Wright ve Axelsson, 2012).

Heterojen bir grup olan LAB türleri iki ayrı filumda toplanmıştır. *Firmicutes* filumunda düşük G+C içeriğine (%31-49) sahip cinsler olan; *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* bulunmaktadır. *Actinobacterium* filumundaki yüksek G+C içeriğine (%58-61) sahip LAB cinsi *Bifidobacterium*'dur (Giraffa, 2014).

LAB'lerinin içinde bulunduğu cinsler *S. mutans* gibi bazı patojen türleri de içermektedir. Bu nedenle halk sağlığı ile ilişkili konularda odak noktası olan türler patojen olmayan ya da gıda zehirlenmesine neden olmadığı bilinen *Lactobacillus* sp. ve *Leuconostoc* sp.'dir (Holzapfel ve Wood, 2014).

LAB besin yönünden zengin olan süt ürünleri, fermente edilmiş yiyecek ve içecekler, dekompoze olmuş bitki materyalleri ile insan ve hayvanların ağız, genital, intestinal, solunum yolu boşluklarında bulunmaktadır (König ve Fröhlich, 2017).

Laktik asit bakterileri günümüzde probiyotik özellikleriyle öne çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) probiyotikleri yeterli miktarda alındığında insan vücuduna yararlı olan canlı mikroorganizmalar ya da canlı mikroorganizmalar içeren gıda bileşenleri olarak tanımlamaktadır (Azais-Braesco vd., 2010). Bir mikroorganizmanın probiyotik

olarak tanımlanabilmesi bazı kriterlere bağlıdır. Bunlar güvenlik, işlevsellik ve teknolojik açıdan değerlendirilmeleridir.

Güvenlik açısından değerlendirme şunları kapsamaktadır:

- İnsan kullanımı için insan kaynaklı mikroorganizmaların kullanılması
- Sağlıklı sindirim sisteminden izole edilmesi
- Plazmidlerde taşınan antibiyotik direnç genlerine sahip olmaması (Saarela vd., 2000).

İşlevsellik açısından değerlendirme:

- Asit ve safra tuzu toleransı
- Epitel hücrelere adezyon kabiliyeti ve sindirim sisteminde canlı kalabilme
- Patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etkiye sahip olmak
- Antimutajenik ve antikarsinojenik etkilere sahip olmak
- İnflamasyona neden olmadan bağışıklık sistemini uyarmak

Teknolojik açıdan ise faj direnci, işleme sürecinde canlılığını korumak, ürün içinde ve depolama sürecinde stabil kalabilme özellikleri aranmaktadır (Saarela vd., 2000).

#### 1.4.1. Oral laktik asit bakterileri

Ağız boşluğunda bulunan laktik asit bakterileri *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* ve *Weissella* cinslerini kapsayan geniş bir gruptur. Laktobasillerin kültüre edilebilir oral mikrobiyotanın %1'lik kısmını temsil ettiği belirtilse de kommensal mikrobiyotanın çeşitliliğine büyük katkı sunmaktadırlar. Ağız boşluğundan izole edilmiş suşlar genel olarak *Lactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus salivarius* türlerine aittir (Meurman ve Stamatova, 2011).

Laktik asit bakterilerinin diş ve diş eti hastalıklarını önlemede etkili oldukları gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar farklı LAB türlerinin probiyotik aktivitelerini ortaya koymuştur. Probiyotik özellik gösteren ağız boşluğundaki LAB'lerinin ağız sağlığına katkıda bulunmaları için birçok özelliğe sahip olmaları gerekmektedir. Öncelikle ağızdaki dokular için risk taşımamalı ve oral homeostaziye sağlayan mekanizmalara engel olmamalıdır. Ağız boşluğunda etkili olabilmesi için uzun süre hayatta kalabilmeli, yüzeylere adezyon yeteneği ile oral biyofilmlere katılabilmeli ve diğer bakteriler ile bağlanma bölgeleri ya da besin için rekabet etmelidir. Düşük pH değerlerine direnç gösterebilirken, kendisi pH değerini düşürmemeli ve gıdalardaki şekeri

metabolize ederken düşük miktarda asit üretmelidir. Diğer önemli özellik ise ürettikleri antimikrobiyal maddeler ile patojenlerin sayısını azaltmalarıdır (Meurman ve Stamatova, 2011; Güngör vd., 2015).

Probiyotik bakterilerin ağız boşluğundaki etki mekanizmaları:

**Kolonizasyon:** Bağlanma bölgeleri, besin ve büyüme faktörleri için diğer bakteriler ile rekabet ederler. *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. acidophilus*, *L. casei* ve *L. reuteri* *S. mutans*'ın gelişimini rekabetçi bir şekilde inhibe etmektedir (Haukioja, 2010).

**Ko-agregasyon:** LAB'lerinin oral kommensal bakteriler ile agregasyonu biyofilm kompozisyonunu değiştirerek çürükleri ve periodontal hastalıkları önlerler. Ko-agregasyon ile patojenlerin aktiviteleri kısıtlanır, böylece uzaklaştırılmaları kolaylaşmaktadır. *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei* *F. nucleatum* ile heterofermentatif laktobasiller ise *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ve *P. intermedia* agregat oluşturmaktadır (Menon, 2016).

**Patojenlere karşı metabolitlerin üretimi:** Probiyotik bakteriler tarafından üretilen organik asitler, hidrojen peroksit, bakteriosin, amonyak, karbon peroksit ve diasetil gibi antimikrobiyal maddeler patojenlerin gelişimini inhibe etmektedir. *Weissella cibaria* Gram pozitif bakterilere karşı hidrojen peroksit üretirken, *L. reuteri* reuterin ve reuterisiklin bakteriosinlerini üretmektedir.

**Enzimatik reaksiyonlar:** Probiyotik bakterilerin ürettikleri bazı enzimler patojenlerin zararlı metabolitlerinin üretimini engellemektedir. *Lactobacillus brevis*'in ürettiği arjinin deaminaz periodontitis hastalarında nitrit/nitrat oluşumunu engellemektedir.

**İmmunolojik etki:** Proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını azaltmak, IgA üretimi için bağışıklık sistemini uyarmak, matriks metalloproteinaz üretimini azaltmak ve fagositlerin uyarılması gibi faaliyetler ile oral epitelyumun bütünlüğü korunmaktadır (Menon, 2016).

#### 1.4.2. Probiyotik laktik asit bakterilerinin ağız sağlığına etkileri

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile probiyotik LAB'lerinin diş çürüğü, periodontitis ve halitosis gibi ağız ve diş sağlığı sorunlarına karşı etkili oldukları gösterilmiştir (Çağlar vd., 2006; Burton vd., 2006; Shimauchi vd., 2008).

#### **1.4.2.1. Diş çürüğü üzerine etkisi**

Gelişmiş ülkelerdeki yaygın florür kullanımına rağmen diş çürüğü özellikle çocuklarda sık görülmektedir. Florür ve diğer koruyucu uygulamalar diş çürüklerini azaltsa da enfeksiyonun kontrolü için yetersizdir. Bu nedenle oral ekolojiyi etkileyerek diş çürüklerine engel olan alternatif uygulamalar kullanılmaya başlanmıştır (Güngör vd., 2015). Diş çürüğü diş minesinin asit demineralizasyonu ile karakterize edilen çok etmenli, bakteriyel kökenli bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Oral ekosistemdeki homeostazinin değişimi oral biyofilmin artışına neden olurken, *S. mutans* gibi karyojenik bakterilerin aktivitesini arttırmaktadır. Sükrozdan oluşturdukları suda çözünmeyen ve enzimatik degradasyonu zor olan polisakkaritler patojenitelerini arttırmaktadır (Tandon vd., 2015).

Diş çürüklerinin önlenmesinde ya da azaltılmasında kullanılacak probiyotiklerin diş yüzeyine bağlanabilmesi ve oral biyofilmin oluşumuna katılabilmesi gerekmektedir. Probiyotikler *S. mutans*'ın diş yüzeyine bağlanmasında etkili olan tükürük aglütininin seviyesinde düşüşe neden olarak pelikül yapısını değiştirmektedir. Buna bağlı olarak oral ekosistemin pH ve redoks potansiyeli değerlerini düzenlemektedir. Ayrıca spesifik olmayan bağışıklığı düzenleyerek, inflamasyonun azalmasını sağlamaktadır (Güngör vd., 2015).

#### **1.4.2.2. Periodontal hastalıklar üzerine etkisi**

Periodontal hastalıklar gingivit ve periodontitis olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Gingivit diş eti iltihaplanması ile karakterize edilirken, periodontitis ise alveolar kemik de dahil olmak üzere tüm dokuları etkileyen yıkıcı bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Periodontitis ile ilişkili patojenler olan *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* ve *A. actinomycetemcomitans* konak savunma sisteminden kaçarak subgingival bölgelerde kolonize olmaktadır (Bonifait vd., 2009).

Oral ekolojinin bozulması nedeniyle meydana gelen bu hastalıklara karşı laktik asit bakterilerinin etkileri araştırılmıştır. Sağlıklı kişilerde *L. gasseri*, *L. fermentum* gibi laktik asit bakterilerin kronik periodontitis hastalarından daha fazla bulunması ve yapılan bazı araştırmalarda laktik asit bakterilerinin bu patojenleri inhibe etmesi laktik asit bakterilerinin oral ekolojik dengeyi sağlayabileceğini düşündürmüştür (Sookkhee vd., 2001; Koll-Klais vd., 2005).



Liyofilize edilmiş *L. salivarius*'un kullanıldığı bir çalışmada sekiz hafta sonunda hastaların ağız sağlığına katkı sağladığı bildirilmiştir (Shimauchi vd., 2008). Başka bir çalışmada hastalar düzenli olarak laktik asit bakterisi içeren süt ürünleri almış ve deney sonunda periodontal hastalıklar üzerinde olumlu etkiler gözlenmiştir (Shimazaki vd., 2008).

#### 1.4.2.3. *Halitosis üzerine etkisi*

Halitosis hoş olmayan, kötü ağız kokusu ya da nefesi tanımlamaktadır (Aylıkçı ve Çolak, 2013). Halitosis patolojik ve patolojik olmayan nedenlerden ötürü oluşan uçucu moleküller nedeniyle oluşmaktadır. Bu uçucu bileşenler; kükürt bileşenleri, aromatik bileşenler, nitrojen içeren bileşenler, aminler, kısa zincirli yağ asitleri, alkoller, fenil bileşenleri, alifatik bileşenler ve ketonlardır (Campisi vd., 2011).

Sistein, methionin, triptofan, arjinin ve lizinin mikrobiyal degradasyonu ile açığa çıkan uçucu kükürt bileşenleri halitosisin ana nedeni olarak kabul edilmektedir. Ağız boşluğundaki başlıca uçucu kükürt bileşenleri hidrojen sülfid, metil merkaptan ve dimetil sülfittir (Bollen ve Beikler, 2012).

Yapılan çalışmalar yetişkinlerin %15-35'inde, çocukların ise %14,5-40,9'unda halitosisle rastlandığını bildirmektedir. Bu problemin yüksek oranda yaygın olması ve sosyal yaşama negatif etkileri diş hekimi ziyaretlerinin en yaygın nedenlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Halitosis vakalarının %90'ı dilin kaplanması, diş eti ve periodontal hastalıklar, diş çürükleri gibi oral nedenlerden kaynaklanmaktadır. Halitosis ile ilişkili yapılan kültürel çalışmalar *Bacteroides* spp., *Centipeda periodontii*, *Eubacterium* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Selenomonas artemidis*, *Treponema denticola*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, *Solobacterium moorei* gibi anaerobik bakterilerin sülfür bileşiklerini oluşturduğunu göstermiştir (Ren vd., 2016).

Laktik asit bakterilerinin insan sağlığı üzerindeki geniş spektrumdaki yararlı etkileri, halitosisi inhibe edici özelliklerinin araştırılmasında etkili olmuştur (Allaker ve Stephen, 2017). *L. salivarius*'un halitosis üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada bakteri hastalara tablet şeklinde verilmiştir. İki haftanın sonunda ağız kokusu parametrelerinin düştüğü bildirilmiştir (Iwamoto vd., 2010).

## 2. MATERYAL ve YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Biyofilm örnekleri

Biyofilm örnekleri Süleyman Demirel Üniversitesi Pedodonti Kliniği'ne gelen 6-10 yaş arası çocukların diş yüzeylerinden eküvyon yardımı ile alınmıştır. Etik izin Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı'ndan alınmıştır (11.02.2013/509). Çalışmada Helsinki Bildirgesi prensipleri takip edilmiştir.

#### 2.1.2. Besiyerleri

##### 2.1.2.1. *MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) agar*

MRS Agar (Merck, 110660)	68,2 g
Distile su	1000 ml

Besiyerinin distile suda çözünmesi sağlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

##### 2.1.2.2. *BHI (Brain Heart Infusion) agar*

BHI Agar (Sigma-Aldrich, 70138)	52 g
Distile su	1000 ml

Besiyerinin distile suda çözünmesi sağlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

##### 2.1.2.3. *Mitis salivarius agar*

Mitis Salivarius Agar (Sigma-Aldrichi 01337)	90 g
%1'lik potasyum tellürit	1 ml
Distile su	1000 ml

Besiyerinin distile suda çözünmesi sağlandıktan sonra 121°C'de otoklavlanarak steril edilmiştir. Besiyeri 60°C'ye kadar soğuduktan sonra steril 1 ml potasyum tellürit eklenmiştir.

##### 2.1.2.4. *M 17 agar*

M 17 Agar (Merck, 115108)	55 g
Distile su	1000 ml

Besiyerinin distile suda çözünmesi sağlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **2.1.2.5. Patates dekstroz agar**

Patates Dekstroz Agar (Merck, 110130) 39 g

Distile su 1000 ml

Besiyerinin distile suda çözünmesi sağlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **2.1.2.6. Mueller hinton agar**

Mueller Hinton Agar (Merck, 105437) 35 g

Distile su 1000 ml

Besiyerinin distile suda çözünmesi sağlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **2.1.2.7. Kongo red agar (CRA)**

BHI Broth 37 g

Sükroz 50 g

Agar 20 g

Kongo red 0,8 g

Distile su 1000 ml

Besiyerinin distile suda çözünmesi sağlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **2.1.2.8. Nutrient agar**

Nutrient Agar (Merck,105450) 20 g

Distile su 1000 ml

Besiyerinin distile suda çözünmesi sağlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **2.1.2.9. MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) broth**

MRS Broth (Merck, 110661) 50 g

Distile su 1000 ml

Besiyerinin distile suda çözünmesi sağlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### **2.1.2.10. BHI (Brain Heart Infusion) broth**

BHI Broth (Sigma-Aldrich, 70138) 52 g

Distile su 1000 ml

Besiyerinin distile suda çözünmesi sağlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

### 2.1.2.11. *Koyun kanlı agar*

Koyun Kanlı agar GBL firmasından satın alınmıştır.

### 2.1.2.12. *Skim milk Besiyeri*

Skim milk	10 g
Distile su	100 ml

Besiyerinin distile suda çözünmesi sağlandıktan sonra 121°C'de 10 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

### 2.1.2.13. **F-12K (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium; Sigma, N3520)**

%10'luk inaktive edilmiş Fetal Sığır Serumumu (Sigma, F6178)

%1 penisilin sterptomisin (Sigma, P0781)

%7,5 NaHCO<sub>3</sub> ilave edilerek kullanılmıştır.

### 2.1.3. **Kimyasallar ve çözeltiler**

#### 2.1.3.1. *%20'lik gliserol*

Gliserol	20 ml
Distile su	80 ml

Gliserol ve distile su karıştırıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### 2.1.3.2. *%3'lük hidrojen peroksit*

%35'lik hidrojen peroksit	8,57 ml
Distile su	91,43 ml

#### 2.1.3.3. *20 mM Tris-HCl*

Tris-HCl (Sigma-Aldrich)	0,3152 g
Distile su	100 ml

#### 2.1.3.4. *2 mM EDTA*

EDTA (Sigma-Aldrich)	0,058 g
Distile su	100 ml

#### 2.1.3.5. *%1,2'lik Triton X-100*

Triton X-100 (Sigma-Aldrich)	1,2 ml
Distile su	98,8 ml

#### 2.1.3.6. *Lizozim solüsyonu*

Lizozim (Sigma-Aldrich)	2 g
Distile su	100 ml

#### 2.1.3.7. *Liziz solüsyonu*

20 mM Tris-HCl

2 mM EDTA

%1,2 Triton X-100

20 mg/ml lizozim

Tüm bileşenler 100 ml distile suya tamamlandıktan sonra pH 8'e ayarlanmıştır.

#### 2.1.3.8. *Fosfat tamponu (PBS)*

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
Distile su	1000 ml

Tüm bileşenler distile su ile karıştırıldıktan sonra pH 7,2'ye ayarlanmıştır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

#### 2.1.3.9. *0,72 N Trikloroasetik asit (TCA)*

Trikloroasetik asit	118 g
Distile su	1000 ml

#### 2.1.3.10. *Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> çözeltisi*

Sodyum karbonat	150 g
Sodyum difosfat	20 g
Distile su	1000 ml

#### 2.1.3.11. *Fenol ayıracı*

Folin Ciocalteu's fenol ayıracı	50 ml
Distile su	100 ml

Fenol ayıracı 1:2 oranında distile su ile karıştırılmıştır ve taze olarak hazırlanmıştır.

#### 2.1.3.12. *1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,67 ml
Distile su	1000 ml

**2.1.3.13. Amonyum molibdat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>24</sub>) çözeltisi**

Amonyum molibdat	0,12 g
Distile su	100 ml

**2.1.3.14. Potasyum iyodür (KI) çözeltisi**

Potasyum iyodür	16,6 g
Distile su	1000 ml

**2.1.3.15. 0,2 mM DPPH solüsyonu**

DPPH (Sigma-Aldrich, D9132)	0,078 g
Distile su	100 ml

**2.1.3.16. 7 mM ABTS<sup>+</sup> solüsyonu**

ABTS (Sigma-Aldrich, A1888)	3,602 g
Distile su	100 ml

**2.1.3.18. Fizyolojik tuzlu su (FTS)**

NaCl	85 g
Distile su	1000 ml

**2.1.3.19. 2,5 mM potasyum persülfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)**

Potasyum persülfat	6,757 g
Distile su	100 ml

**2.1.3.20. %33'lük asetik asit**

Asetik asit	33 ml
Distile su	67 ml

**2.1.3.21. %3'lük glutaraldehit**

%25 Glutaraldehit	12 ml
Distile su	88 ml

**2.1.3.22. 1 X TAE solüsyonu**

50 X TAE (Sigma-Aldrich, SRE0033)	20 ml
Distile su	980 ml

**2.1.3.23. Antibiyotik diskleri**

Ampisilin (AM 10 µg/disk, Bioanalyse)	
Eritromisin (E 15 µg/disk, Bioanalyse)	

Gentamisin (CN 10 µg/disk, Bioanalyse)  
Klindamisin (DA 2 µg/disk, Bioanalyse)  
Metisilin (ME 5 µg/disk, Bioanalyse)  
Metronidazole (MET 5 µg/disk, Bioanalyse)  
Okzasilin (OX 1 µg/disk, Bioanalyse)  
Sefalotin (KF 30 µg/disk, Bioanalyse)  
Sülfometoksazol+trimethoprim (SXT 25 µg/disk, Bioanalyse)  
Tetrasiklin (TE 30 µg/disk, Bioanalyse)  
Vankomisin (VA 30 µg/disk, Bioanalyse)  
Kloramfenikol (C 30 µg/disk, Bioanalyse)  
Kanamisin (K 30 µg), penisilin G (P 10 U/disk, Bioanalyse)  
Streptomisin (S 10 µg/disk, Bioanalyse)  
Amikasin (AK 30 µg/disk, Bioanalyse)  
Netilmisin (NET 30 µg/disk, Bioanalyse)  
İmipenem (IPM 10 µg/disk Bioanalyse)  
Linezolid (LNZ 30 µg/disk Bioanalyse)

#### **2.1.3.24. Antifungal diskleri**

Ketocanozole (KTC 10 µg /disk, Bioanalyse)  
Posaconazole (POS 5 µg /disk, Bioanalyse)  
Itraconazole (ITR 10 µg /disk, Bioanalyse)  
Fluconazole (FLU 25 µg/disk, Bioanalyse)  
Nistatin (NY 100 U/disk, Bioanalyse)  
Amphotericin B (AMB 100 U/disk, Bioanalyse)  
Caspofungin (CAS 5 µg /disk, Bioanalyse)  
Voriconazole (VOR 1 µg /disk, Bioanalyse)

## **2.2. Yöntem**

### **2.2.1. Örneklerin alınması**

Süleyman Demirel Üniversitesi Pedodonti Kliniği'ne gelen 6-10 yaş arası sağlıklı çocuklardan diş fırçalamasından en az 12 saat sonra sabah saatlerinde biyofilm örnekleme klinikteki uzman kişi tarafından yapılmıştır. Bu 12 saat içinde hastalar

yemek yememiş ve oral hijyen ürünleri kullanmamışlardır. Transport eküvyonları ile alınan örnekler soğuk zincirle Eskişehir Teknik Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na getirilmiştir.

### **2.2.2. Örneklerin kültüre edilmesi**

Örneklerin kültüre edilmesi için Brain Heart Infusion Agar (BHI), DeMan, Rogosa, Sharpe Agar, (MRS), Mitis Salivarius Agar, M17 Agar, Kanlı Agar ve Patates Dekstroz Agar (PDA), Nutrient Agar (NA) besiyerleri kullanılmıştır. Katı besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24-48 saat inkübe edilmiştir.

### **2.2.3. Mikroorganizmaların izolasyonu**

İnkübasyondan sonra farklı morfolojilerdeki koloniler seçilerek saflaştırılmıştır. Gram boyama ile saflıkları kontrol edildikten sonra %20'lik gliserolde -80°C'de stoklanmıştır.

#### **2.2.3.1. Gram boyama**

Uygun katı besiyerinde %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24 saat inkübe edilen izolatlar lama yayılıp kurutulularak preparat hazırlanmıştır ve ateşte fikse edilmiştir. Kristal viyole ile 1 dakika boyandıktan sonra su ile yıkanmıştır. 1 dakika lügol ile boyandıktan sonra su ile yıkanmıştır. Ardından %95'lik etanol ile 20-25 dakika dekolorize edilmiş ve tekrar su ile yıkanmıştır. Son olarak preparat safranin ile 40-45 saniye boyandıktan sonra tekrar yıkanmıştır. Hazırlanan preparat ışık mikroskopunda incelenmiş ve pembe renkli bakteriler Gram negatif, mor renkli hücreler Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir. Maya morfolojisinde görünen izolatlar ayrılmıştır (Tamer vd., 1989).

#### **2.2.3.2. Katalaz testi**

Uygun katı besiyerinde %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24 saat inkübe edilen izolatların üzerine birkaç damla %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılarak gaz kabarcığı oluşup oluşmadığı gözlenmiştir. Gaz kabarcığı oluşturan izolatlar katalaz pozitif, oluşturmayan izolatlar ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Akçelik vd., 2000).



#### 2.2.4. Bakterilerin moleküler tanılması

Bakterilerin moleküler tanılması 16S rRNA gen bölgesinin dizi bilgisine göre yapılmıştır. Bakterilerin genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra 16S rRNA gen bölgesi için PCR kurulmuştur. Elde edilen PCR ürünlerini saflaştırıldıktan sonra Macrogen Europe ve Medsantek şirketlerine dizi analizi yaptırılmıştır.

##### 2.2.4.1. Genomik DNA izolasyonu

Bakterilerin genomik DNA izolasyonu GeneJET genomik DNA saflaştırma kiti (ThermoFischer Scientific) kullanılarak yapılmıştır. Kitin protokolü aşağıdaki gibidir:

- 24 saatlik taze kültür 5000 x g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen pelet 180 µl liziz tamponunda resüspanse edilmiş ve 37°C su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiştir.
- 200 µl liziz solüsyonu ve 20 µl proteinaz K eklenmiş ve homojen bir süspansiyon elde etmek için vortekslenmiştir. Ardından 56°C su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiştir.
- 20 µl RNase A solüsyonu eklenip vorteksledikten sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Ardından 400 µl %50 etanol eklendikten sonra vortekslenmiştir.
- Lizat kolona transfer edilmiş ve 6000 x g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırılmıştır.
- 500 µl yıkama solüsyonu I eklenmiş ve 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırılmıştır.
- 500 µl yıkama solüsyonu II eklenmiş ve 3 dakika 12000 x g'de santrifüj edilmiştir.
- 50 µl elüsyon tamponu kolonun merkezine eklendikten sonra 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen DNA -20°C'de saklanmıştır.

##### 2.2.4.2. 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonu

16S rRNA gen amplifikasyonu için reaksiyon bileşenleri:

- 10X TaqBuffer (+KCl-MgCl<sub>2</sub>) 2,5 µl
- 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2,5 µl

- 2,5 mM dNTP mix 2,5 µl
- 2,5 mM 27 F primer 2,5 µl
- 2,5 mM 1492 R primer 2,5 µl
- Taq polimeraz (5 u/µl) 0,25 µl
- Nükleaz içermeyen distile su 11,75 µl
- Kalıp DNA 1 µl

PCR koşulları; ön denatürasyon 94°C 3 dk; denatürasyon 94°C 30 sn, bağlanma 55°C 1 dk, uzama 72°C 2 dk, 35 döngü; son uzama 72°C 5 dk şeklindedir. Reaksiyon sonucunda elde edilen ürünler 1X TAE tamponu içinde %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

Kullanılan primerler:

27 F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

1492 R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' (Pratten vd., 2003).

#### 2.2.4.3. PCR ürünlerinin saflaştırılması

PCR ürünlerinin saflaştırılması GFX PCR saflaştırma kiti (Sigma-Aldrich) kullanılarak yapılmıştır. Kitin protokolü aşağıdaki gibidir:

- 100 µl PCR ürünü için 500 µl capture tamponu eklenir ve karıştırılır. Karışımın sarı renge dönüşmesi beklenir.
- Karışım kolona aktarılır ve 30 sn 16.000 x g'de santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrasında koleksiyon tüpünde toplanan karışım atılır ve kolona 500 µl yıkama tamponu eklenerek 30 sn 16.000 x g'de santrifüj edilir.
- Kolon yeni bir santrifüj tüpüne alınır. 50 µl elüsyon tampon eklenerek 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.
- 1 dk 16.000 x g'de santrifüj edildikten sonra örnek -20°C'de saklanmıştır.

#### 2.2.4.4. 16S rRNA dizilerinin BLAST analizi

Dizi analizi sonucu elde edilen 16S rRNA gen dizileri BioEdit programı kullanılarak düzenlenmiştir. 27F ve 1492R primerleri ile okunan diziler birleştirilmiştir ve National Center for Biotechnology (NCBI) web sitesinde bulunan GenBank veritabanındaki diğer 16S rRNA dizileriyle BLAST programı kullanılarak

karşılaştırılmıştır. İzolatların tür düzeyinde tanınması yüzde benzerlik oranıyla belirlenmiştir.

#### **2.2.4.5. Filogenetik yakınlık**

Diziler BLAST analizinde yüksek benzerlik gösterdikleri referans diziler ile birlikte MEGA 7.0.26 programında yatay hizalanmış ve düzenlenmiştir. Ardından aynı programda Maximum Likelihood algoritması ile filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. Ağaç topolojisinin geçerliliği bootstrap yöntemi ile (1000 tekrar) kontrol edilmiştir (Kumar vd., 2016).

#### **2.2.5. Mayaların biyokimyasal tanınması**

Mikroskobik inceleme sonrasında maya olduğu tespit edilen izolatların tanınması için Vitek® 2 (Biomérieux) cihazı kullanılmıştır. Saf izolatların 3 ml tuzlu su (%0,45 su, %0,5 NaCl, pH 4.5-7.0) içinde bulanıklık ayarı DensiChek™ ile 1.80-2.20 McFarland aralığında olacak şekilde yapılmıştır. Mayalar için üretilmiş olan kartta karbon kaynaklarının kullanımı, enzim aktivitesi ve dirençlilik ölçen 46 adet biyokimyasal test bulunmaktadır. Yaklaşık sekiz saatlik inkübasyon sonunda her testin bulanıklığı ya da metabolizma ürünlerinin rengi ölçülerek sonuç “+”, “-”, “(-)” ya da “(+)” olarak verilmektedir. Parantez içindeki sonuçlar zayıf reaksiyonları göstermektedir (Pincus, 2005).

#### **2.2.6. Laktik asit bakterilerinin gastrointestinal şartlara direnci**

Laktik asit bakterilerinin gastrointestinal şartlara dirençli olup olmadıklarını belirlemek için lizozim, pepsin, pankreatin, safra tuzu direnç testleri yapılmıştır.

##### **2.2.6.1. Lizozim direnci**

Bakterilerin lizozim direnci kuyucuk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. MRS agar besiyerine %2 oranında bakteri süspansiyonu (McFarland 1.0) inoküle edilmiştir. Besiyeri donduktan sonra 8 mm çaplı agar delici ile açılan kuyucuklara 100 µl lizozim solüsyonu aktarılmıştır. 37°C’de 24 saat inkübasyon sonunda kuyucukların etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür. Lizozim solüsyonu 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 ve 10 mg/ml konsantrasyonlarında hazırlanmıştır (Koll vd., 2008). Çalışma çift paralel olarak yapılmıştır.

### **2.2.6.2. Pepsin direnci**

Laktik asit bakterilerinin gecelik kültürleri 10.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve iki defa PBS (pH 7,2) ile yıkanmıştır. Pepsin direnci için; pelet 3 mg/ml pepsin içeren pH 2 ve pH 3 PBS tamponunda resüspanse edilmiştir. 0., 3.ve 4. saatte MRS agar besiyerine damla plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübasyon sonunda koloni sayımı yapılmıştır (Taheur vd., 2016). Çalışma çift paralel olarak yapılmıştır.

### **2.2.6.3. Pankreatin direnci**

Laktik asit bakterilerinin gecelik kültürleri 10.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve iki defa PBS (pH 7,2) ile yıkanmıştır. Pankreatin direnci için; pelet 1 mg/ml pankreatin içeren PBS tamponunda resüspanse edilmiştir. 0. ve 4. saatte MRS agar besiyerine damla plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübasyon sonunda koloni sayımı yapılmıştır (Taheur vd., 2016). Çalışma çift paralel olarak yapılmıştır.

### **2.2.6.4. Safra tuzu (oxgall) direnci**

MRS broth besiyerine final konsantrasyonu %0,08, %0,16, %0,3, %0,6, %1,25, %2,5 ve %5,0 olacak şekilde safra tuzu eklenmiştir. 180 µl safra tuzu içeren besiyerine 20 µl bakteri kültürü inoküle edilerek 37°C'de inkübe edilmiştir. 0., 3. ve 24. saatte 630 nm'de optik yoğunluk ölçülmüştür (Koll vd., 2008). Çalışma çift paralel olarak yapılmıştır.

## **2.2.7. Laktik asit bakterilerinin agregasyon aktiviteleri**

### **2.2.7.1. Otoagregasyon**

Bakteriler 5.000 x g'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra pelet iki defa PBS ile yıkanmıştır. Aynı tampon ile resüspanse edilen bakterilerin 600 nm'deki optik yoğunluğu ölçülmüştür. Oda sıcaklığında 4 saatlik inkübasyon boyunca her saat üst fazdan ölçüm yapılmıştır (Bosch vd., 2012). Çalışma çift paralel olarak yapılmıştır. Otoagregasyon aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Agregasyon kapasitesi} = 1 - (\text{OD}_t / \text{OD}_0) \times 100$$

OD<sub>t</sub>: 4. saatteki optik yoğunluk

OD<sub>0</sub>: Başlangıçtaki optik yoğunluk

### 2.2.7.2. Koagregasyon

Bakterilerin koagregasyon aktivitelerinin belirlenmesi için patojen bakteri olarak *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 2575 seçilmiştir. Bakteri süspansiyonları otoagregasyon için belirtilen şekilde hazırlanmıştır. Laktik asit bakterisi ve patojen bakteri süspansiyonlarından eşit hacimde alınarak iyice karıştırılmıştır. Tüm bakteriler kendi süspansiyonlarıyla birlikte 5 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üst fazın 600 nm'deki optik yoğunluğu ölçülmüştür (Taheur vd., 2016). Çalışma çift paralel olarak yapılmıştır. Koagregasyon aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

Koagregasyon kapasitesi =

$$[(OD_{\text{patojen}} + OD_{\text{LAB}}) - 2 \times (OD_{\text{mix}})] / (OD_{\text{patojen}} + OD_{\text{LAB}}) \times 100$$

OD<sub>patojen</sub> : Patojen bakterilerin optik yoğunluğu

OD<sub>LAB</sub> : LAB'lerinin optik yoğunluğu

OD<sub>mix</sub> : Patojen ve LAB'lerinin birlikte optik yoğunluğu

### 2.2.8. Laktik asit bakterilerinin hücre-yüzey hidrofobisitesi

Hücre-yüzey hidrofobisitesi üç farklı çözücü ile (n-hekzadekan, kloroform, etil asetat) test edilmiştir. Bakterilerin gecelik kültürleri 10.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir ve pelet üç defa PBS ile yıkanmıştır. Aynı tamponda resüspanse edildikten sonra 580 nm'de optik yoğunluğu ölçülmüştür (1. okuma). Ardından 1,5 ml hücre süspansiyonu ile eşit hacimde çözücü 2 dakika vortekslenmiştir. Elde edilen karışım, iki fazın iyice ayrılabilmesi için 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Üst faz dikkatlice alınarak 580 nm'de 2. okuma yapılmıştır (Taheur vd., 2016). Çalışma çift paralel olarak yapılmıştır. Hücre-yüzey hidrofobisitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Hidrofobisite} = [(OD_{1.\text{okuma}} - OD_{2.\text{okuma}}) / OD_{1.\text{okuma}}] \times 100$$

### 2.2.9. Laktik asit bakterilerinin enzim aktivitesi

Laktik asit bakterilerinin enzim aktivitesi API ZYM (Biomerieux) ile belirlenmiştir. Kit 19 enzimin (alkalin fosfataz, esteraz, esteraz lipaz, lipaz, lösin arilamidaz, valin arilamidaz, sistein arilamidaz, tripsin,  $\alpha$ -kimotripsin, asit fosfataz, naphthol-AS-BI fosfohidrolaz,  $\alpha$ -galaktosidaz,  $\beta$ -galaktosidaz,  $\beta$ -glukuronidaz,  $\alpha$ -glukosidaz,  $\beta$ -glukosidaz, N-asetil- $\beta$ -glukozaminidaz) varlığını belirlemektedir. Test şeridinde bulunan kuyucuklara 65  $\mu$ l bakteri kültürü aktarılmış, 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda birer damla ZYM A ve ZYM B ayıraçları damlatılmıştır. Kuyucuklardaki renk değişimi enzim aktivitesinin varlığı olarak değerlendirilmiştir (Taheur vd., 2016).

#### **2.2.10. Proteolitik aktivite**

Laktik asit bakterileri MRS broth içerisinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren koşullarda 24 saat süreyle inkübasyona bırakılarak aktif hale getirilmiştir. Daha sonra, 5 ml skim milk besiyeri ortamına %1 oranında eklenerek 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Kültürlerin üzerine 1 ml distile su, daha sonra 10 ml 0,72 N trikloro asetik asit (TCA) ilave edilmiş ve örnekler iyice karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dakika süreyle bekletildikten sonra Whatman 1 nolu filtre kâğıdından geçirilerek süzölmüşlerdir. Oluşan süzöntüden 2,5 ml ayrı bir tüp içersine alınıp ve üzerine 5 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> çözeltisinden konularak iyice çalkalanmıştır. Daha sonra üzerlerine 1,5 ml Fenol ayırıcı konarak koyu mavi bir renk oluşuncaya kadar çalkalanmıştır. Renk oluşumunun gözlemlenmesinden sonra örnekler 8000 rpm' de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Üstte oluşan berrak mavi sıvı alınarak 650 nm'de optik yoğunlukları ölçülmüştür (Epoch 2, BioTech). Elde edilen değerler proteolitik aktivite için çıkarılan standart eğriye göre, µg / ml cinsinden değerlendirilmiştir (Aslım, 1994).

Standart eğri oluşturmak için tirozin aminoasidi kullanılmıştır. İçerisinde 5 ml skim milk besiyeri içeren tüplere sırasıyla 0,02, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1 mg tirozin /ml olacak şekilde tirozin eklenerek çözelti serisi elde edilmiştir. Serideki her bir tüp birer izolat gibi düşünülüp, izolatlar için uygulanan işlemler çözeltilere de uygulanmıştır ve yine 650 nm'de optik yoğunlukları ölçülmüştür. Daha sonra elde edilen OD değerleri grafik üzerine yerleştirilerek standart eğri oluşturulmuştur (Aslım, 1994).

#### **2.2.11. Hidrojen peroksit üretimi**

Laktik asit bakterileri MRS broth içerisinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren koşullarda 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültürlerle 5 ml distile su ilave edilmiş ve 5000 rpm 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bittikten sonra üstte oluşan açık renkli berrak sıvı Whatman 42 nolu filtre kâğıdından geçirilmiş ve elde edilen filtrattan 4 ml alınarak ayrı bir tüpe aktarılmıştır. 0,5 ml sülfürik asit, 0,5 ml amonyum molibdat ve 0,5 ml potasyum iyodür çözeltisi sırası ile tüp içerisindeki filtrata ilave edilerek, manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmıştır. Bu basamakların sonunda

elde edilen sıvının optik yoğunluğu 350 nm’de ölçülmüştür. Elde edilen optik yoğunluk değerleri; ayrıca hazırlanan standart eğriye göre µg/ml cinsinde hesaplanmıştır (Mumcu, 1997).

0,1 ml saf (%35) hidrojen peroksit bu tayin için oluşturulması gereken standart eğri için kullanılmıştır. 30 ml distile su ilavesi ile tamamlandıktan sonra elde edilen çözeltiden 1 ml başka bir falkona alınmış ve tekrar distile su ile 30 ml’ ye tamamlanmıştır. Elde edilen çözelti bir izolat gibi düşünülerek tüm işlem basamakları tek tek standart çözeltiliye de uygulanarak eğri elde edilmiştir.

1 µg/ml hidrojen peroksit karşılık gelen hidrojen peroksit değeri standart eğriye göre hesaplanmıştır. İzolatlardan elde edilen değerler ile standart eğri karşılaştırılarak µg/ml cinsine çevrilmiştir (Mumcu, 1997).

#### **2.2.12. Laktik asit üretimi**

Laktik asit bakterilerinin laktik asit üretim miktarları titrasyon yöntemi ile belirlenmiştir. İzolatların gecelik kültürleri 10 ml skim milk besiyerine %1 oranında inokülasyon yapılarak 24 saat inkübasyona bırakılmış ve laktik asit üretim tayininde bu kültürler kullanılmıştır. Çalışma çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda 10 ml olan aktif kültürler erlene alınarak üzerine 90 ml distile su eklenip 100 ml’ye tamamlanmıştır. Elde edilen karışımın üzerine 5 damla fenol fitalein indikatörü damlatılıp karıştırıldıktan sonra 0,1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Kültürlerin ürettiği asit, titre edilebilir yüzde asitlik olarak hesaplanmıştır (Genç, 2016).

$$\text{Asidite (\%laktik asit)} = (\text{Ç} \times 0.009 : \text{S}) \times 100$$

0.009: 0.1 N sodyum hidroksitin titre ettiği laktik asitin g cinsinden miktarı

Ç: titrasyonda harcanan sodyum hidroksit (ml)

S: titrasyonda kullanılan kültür (ml)

#### **2.2.13. Antioksidan aktivite**

Laktik asit bakterilerinin hücre süspansiyonlarının, kültür süpernatantının ve sonikasyona tabi tutulmuş hücre süspansiyonlarının 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve 2,2’ -azino-di-[3-etilbenzthiazolin sülfonat] ABTS<sup>+</sup> serbest radikallerini yakalama aktiviteleri belirlenmiştir.

### **2.2.13.1. DPPH serbest radikali yakalama aktivitesi**

Laktik asit bakterilerinin gecelik kültürleri 4°C 6000 x g' de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üç defa fizyolojik tuzlu su (FTS) ile yıkanmıştır. Kültür süpernatantı (KS), PBS ile resüspanse edilmiş hücre süspansiyonu (HS) ve 15 dakika süspansiyona tabi tutulan hücre süspansiyonunun (SHS) aktiviteleri denenmiştir.

Kullanılacak süspansiyon (1 ml), etanolik 0,2 mM DPPH solüsyonu ile karıştırılmış ve 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Kontrol grup için örnek yerine distile su, kör olarak ise DPPH solüsyonu yerine etanol kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda 6000 x g' de 10 dakika santrifüj edilen örneklerin 517 nm' de optik yoğunlukları ölçülmüştür (Tang vd., 2017). Serbest radikal yakalama aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Serbest radikal yakalama aktivitesi (\%)} = [(1 - (\text{OD}_{\text{örnek}} - \text{OD}_{\text{kör}}) / \text{OD}_{\text{kontrol}})] \times 100$$

### **2.2.13.2. ABTS<sup>+</sup> serbest radikal yakalama aktivitesi**

Laktik asit bakterilerinin gecelik kültürleri 4°C 6000 x g' de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üç defa fizyolojik tuzlu su (FTS) ile yıkanmıştır. 7 mM ABTS<sup>+</sup> ve 2,5 mM potasyum persülfat eşit hacimde karıştırılarak 16 saat karanlıkta inkübe edilmiştir. Elde edilen ABTS<sup>+</sup> solüsyonu, optik yoğunluğu 734 nm' de 0,7 olacak şekilde distile su ile dilüe edilerek çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Kültür süpernatantı (KS), PBS ile resüspanse edilmiş hücre süspansiyonu (HS) ve 15 dakika süspansiyona tabi tutulan hücre süspansiyonunun (SHS) aktiviteleri denenmiştir. KS, HS ya da SHS' den 20 µl alınarak 2 ml ABTS<sup>+</sup> çalışma solüsyonu ile karıştırılmış ve 6 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Distile su, ABTS<sup>+</sup> karışımı kör olarak kullanılmıştır. Optik yoğunluk 734 nm' de ölçülmüştür (Cao vd., 2018). Serbest radikal yakalama aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Serbest radikal yakalama aktivitesi (\%)} = [1 - \text{OD}_{\text{örnek}} / \text{OD}_{\text{kör}}] \times 100$$

### **2.2.14. Hemolitik aktivite**

Laktik asit bakterilerinin kanlı agara ekimi yapılmış ve 37°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakterilerin β-hemoliz (kolonilerin etrafında şeffaf zon), α-hemoliz (kolonilerin etrafında yeşil renkli zon) ve γ –hemoliz (zon oluşmaması) aktiviteleri incelenmiştir (Taheur vd., 2016).



### **2.2.15. Bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi**

Laktik asit bakterileri MRS broth besiyerinde, diğer bakteriler BHI broth besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakterilerin McFarland 1'e dilüsyonu yapılmıştır. Laktik asit bakterileri MRS agar besiyerine, diğer bakteriler BHI agar besiyerine 100 µl aktarıldıktan sonra steril eküvyon ile yayılmıştır. Ardından ekim yapılan petrilere steril pens ile eşit aralıklarla antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda disklerin çevresinde oluşan inhibisyon çapları ölçülmüştür.

### **2.2.16. Mayaların antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi**

Maya izolatları PDB besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş, McFarland 1'e göre dilüsyonları yapılmıştır. PDA besiyerine 100 µl aktarıldıktan sonra steril eküvyon ile yayılmıştır. Ardından ekim yapılan petrilere steril pens ile eşit aralıklarla antifungal diskleri yerleştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda disklerin çevresinde oluşan inhibisyon çapları ölçülmüştür.

### **2.2.17. Laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesi**

MRS broth besiyerinde 24 saat inkübe edilmiş kültürler 4°C, 11.000 x g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant başka bir tüpe alınmış ve pH 5,6'ya ayarlanmıştır. Deneyde kullanılacak patojen bakteriler; Gram (-), Gram (+) bakteri ve maya olarak tanılanmış izolatlar arasından seçilmiştir. Patojen mikroorganizmaların 24 saatlik kültürlerinden McFarland 1'e göre dilüsyon yapılmış, 100 µl Mueller Hinton Agar besiyerine aktararak steril eküvyon ile yayılmıştır. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra mantar delici ile 0,8 cm çapında kuyucuklar açılmıştır. Bu kuyucukların her birine 100 µl filtrat eklenmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülmüştür.

### **2.2.18. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kapasitelerinin belirlenmesi**

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma kapasiteleri Kongo kırmızılı agar ve mikrotitrasyon plağı yöntemleri ile belirlenmiştir.

### **2.2.18.1. Kongo kırmızılı agar (CRA) yöntemi**

Bakteriler BHI broth besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda CRA petrilere çizgi ekim yöntemi ile ekim yapılmıştır. 37°C'de 24-48 saat inkübasyon süresi sonunda açık kırmızı koloniler negatif, koyu kırmızı-siyah renkli kolonilere sahip izolatlar biyofilm oluşturma açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir (Kouidhi vd., 2010).

### **2.2.18.2. Mikrotitrasyon plak yöntemi**

Laktik asit bakterileri MRS, maya izolatları PDB ve diğer bakteriler BHI broth besiyerinde 37°C 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda izolatlar mikrotitrasyon plağında %2 oranında şeker içeren aynı besiyerine %10 oranında inoküle edilmiştir. Aynı inkübasyon şartlarında inkübe edilmiştir. Gelişen kültürlerin 490 nm'de optik yoğunlukları kontrol edilmiştir. Ardından mikrotitrasyon plakları fizyolojik tuzlu su ile üçer defa yıkanmış, böylece planktonik bakterilerin uzaklaşması sağlanmıştır. Plaklar kuruduktan sonra, kuyucuklar 200 µl %96'lık metanol ile 5 dakika muamele edilmiştir ve böylece biyofilm oluşturan bakterilerin fiksasyonu sağlanmıştır. İnkübasyon sonunda metanol uzaklaştırılmış ve plaklar kurutulmuştur. Kuyucuklara 200 µl %1'lik kristal viyole eklenmiş, 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Boya nazikçe yıkandıktan sonra 200 µl %33'lük asetik asit eklenerek 570 nm'de optik yoğunluk ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak bakteri eklenmemiş besiyeri kullanılmıştır (Rossoni vd., 2018). Biyofilm oluşumunda farklı karbonhidratların etkisini incelemek amacıyla besiyerine %2 oranında glikoz, fruktoz, sükroz, laktoz, rafinoz, galaktoz ve maltoz eklenmiştir.

## **2.2.19. Laktik asit süpernatantlarının antiadezyon ve antibiyofilm aktiviteleri**

### **2.2.19.1. Mikrotitrasyon plak yöntemi**

Antiadezyon ve antibiyofilm aktiviteleri incelenmek üzere seçilen laktik asit bakterileri 37°C 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürler 8.000 x g 15 dakika 4°C'de santrifüj edilerek süpernatantlar elde edilmiştir. pH değerleri 5,6'ya sabitlenen süpernatantlar 0,22 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiştir (Rossoni vd., 2018).

Laktik asit bakteri süpernatantlarının antiadezyon aktivitesini belirlemek için seçilen patojenler BHI broth besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin yoğunlukları %2 sükroz içeren BHI broth besiyerinde McFarland 1'e

göre ayarlanarak mikrotitrasyon plağına 100 µl ekim yapılmıştır. 37°C’de 4 saat inkübasyon sonunda 100 µl süpernatant eklenerek 37°C’de 2 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklar steril FTS ile yıkanarak 2.2.16.2’de anlatıldığı şekilde boyama yapılmıştır. Kontrol olarak süpernatant eklenmemiş kuyucuklar kullanılmıştır. Çalışma çift paralel olarak yapılmıştır (Zamani vd., 2017).

Biyofilm inhibisyonu aktivitesi için patojen bakteriler BHI broth besiyerinde 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin yoğunlukları %2 sükröz içeren BHI broth besiyerinde McFarland 1’e göre ayarlanarak mikrotitrasyon plağına 100 µl ekim yapılmıştır. 37°C 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki kültür uzaklaştırılarak steril FTS ile yıkanmıştır, 100 µl süpernatant eklenerek 37°C 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklar steril FTS ile yıkanarak 2.2.16.2’de anlatıldığı şekilde boyama yapılmıştır. Kontrol olarak süpernatant eklenmemiş kuyucuklar kullanılmıştır. Çalışma çift paralel olarak yapılmıştır (Zamani vd., 2017; Wasfi vd., 2018).

Deney sonuçlarında anti adezyon ve biyofilm inhibisyonu yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Costa vd., 2014).

$$\text{İnhibisyon yüzdesi} = 100 - (\text{OD}_{\text{örnek}} / \text{OD}_{\text{kontrol}}) \times 100$$

İnhibisyon yüzdesi yüksek olan süpernatantlar belirlenerek hidroksiapatit (HA) diskler üzerinde anti adezyon ve biyofilm inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir.

### **2.2.19.2. Hidroksiapatit disk yöntemi**

Otuz sekiz mm çap, 6-8 mm kalınlıktaki HA diskleri (Clarkson Chromatography, 060614) kullanılmıştır. HA diskleri 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 24’lük mikrotitrasyon plakalarına alınan steril HA diskleri yapay tükürük ile 1 saat 37°C’de inkübe edilerek adezyon için uygun hale getirilmiştir (Güngör vd., 2013; Ahn vd., 2018).

Anti adezyon aktivitesi için seçilen patojenler BHI broth besiyerinde 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin yoğunlukları %2 sükröz içeren BHI broth besiyerinde McFarland 1’e göre ayarlanarak mikrotitrasyon plağına 100 µl ekim yapılmıştır. 37°C’de 4 saat inkübasyon sonunda 100 µl süpernatant eklenerek 37°C’de 2 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklar steril FTS ile yıkanarak 2.2.16.2’de anlatıldığı şekilde boyama yapılmıştır. Kontrol olarak süpernatant

eklenmemiş kuyucuklar kullanılmıştır. Çalışma çift paralel olarak yapılmıştır (Zamani vd., 2017).

Biyofilm inhibisyonu aktivitesi için patojen bakteriler BHI broth besiyerinde 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin yoğunlukları %2 sükröz içeren BHI broth besiyerinde McFarland 1’e göre ayarlanarak mikrotitrasyon plağına 100 µl ekim yapılmıştır. 37°C 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki kültür uzaklaştırılarak steril FTS ile yıkanmıştır, 100 µl süpernatant eklenerek 37°C 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuklar steril FTS ile yıkanarak 2.2.16.2’de anlatıldığı şekilde boyama yapılmıştır. Kontrol olarak süpernatant eklenmemiş kuyucuklar kullanılmıştır. Çalışma çift paralel olarak yapılmıştır (Zamani vd., 2017; Wasfi vd., 2018).

Tüm deney setlerinde canlı bakteri sayımı yapılmıştır. İnkübasyondan sonra steril FTS ile yıkanan HA diskleri 1 ml FTS içinde 15 dakika sonikasyona tabi tutulmuştur. Bu şekilde disk yüzeyine bağlanan ve biyofilm oluşturan bakterilerin ayrılması sağlanmıştır. Damla plak yöntemi ile BHI agara ekim yapıldıktan sonra 37°C 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda koloni sayımı yapılmıştır. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Costa vd., 2014).

$$\text{İnhibisyon yüzdesi} = 100 - (\log \text{kob}_{\text{örnek}} / \log \text{kob}_{\text{kontrol}}) \times 100$$

### **2.2.19.3. HA disklerinin SEM analizi**

Kontrol ve filtrat eklenmiş HA disklerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) (GeminiSem, Zeiss) görüntülemesi yapılmıştır. Bunun için HA diskleri FTS ile yıkandıktan sonra %3’lük glutaraldehit solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda %30-50-70-90’lık etanol serilerinin her birinde 10 dakika bekletildikten sonra kurumaya bırakılır. Ardından disklerin üzeri altın film ile kaplanır ve Zeiss Ultra 50 SEM cihazında incelenmiştir (Kıvanç vd., 2018).

### **2.2.20. TR146 bukkal epitel hücrelerinin hazırlanması**

TR146 insan bukkal epitel hücre hattı F-12K (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium) besiyerinde %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C’lik inkübatörde yetiştirilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin plaktan ayrılmasını sağlamak amacıyla %0,25 tripsin ve %0,02 PBS-EDTA içeren çözeltiyle inkübe edilmiştir. Yetiştirme kabı yüzeyinden ayrılan hücreler, besiyeri ile birlikte 2 ml hacimde bir hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Ardından

hücre sayısını belirlemek amacıyla süspansiyondan 10 µl örnek alınarak 1:1 oranda %0,04'lük tripan mavisi ile karıştırılmış CEDEX XS cihazında sayım yapılmıştır.

Hücrelerin sayısı belirlendikten sonra, TR146 hücreleri her bir kuyucukta  $5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücrelerin plaka yüzeyine yapışması için plakalar 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren bir inkübatörde 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

### **2.2.21. Laktik asit bakterilerinin halitosis üzerine etkisi**

Antiadezyon ve antibiyofilm aktiviteleri incelenmiş olan *L. fermentum* MRSC7.1, *L. fermentum* BHIC7.4, *L. rhamnosus* LAB1.2.A, *L. rhamnosus* LAB1.4.A ve *L. casei* LAB1.3.1.A izolatlarının *E. faecalis* NA 12.3.2 ve *S. anginosus* NA 2.2a'nın neden olduğu kötü kokuya etkisi değerlendirilmiştir. Bu amaçla tüm bakterilerin gecelik kültürlerinin McFarland 1'e göre süspansiyonları hazırlanmıştır. Laktik asit bakterileri için MRS broth, diğer bakteriler için BHI broth besiyeri kullanılmıştır. BHI broth besiyeri hidrojen sülfür üretimini teşvik etmek amacıyla %1 oranında sistein ve methionin ile zenginleştirilmiştir (Yoshida vd., 2009). Farklı 12'lik mikrotitrasyon plaklarında laktik asit bakterileri eşit hacimde *E. faecalis* NA 12.3.2 ve *S. anginosus* NA 2.2a ile birlikte 48 saat inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *E. faecalis* NA 12.3.2 ve *S. anginosus* NA 2.2a ve TR146 hücreleri ile birlikte kültüre edilmiştir. İnkübasyon sonunda kötü koku 1-5 aralığında değerlendirilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu

İzolasyon sonucunda toplam 181 adet bakteri, 25 adet maya izolatı saf olarak elde edilmiştir. Gram boyama sonucunda bakteri izolatlarından 160 tanesinin Gram (+), 21 tanesinin Gram (-) olduğu belirlenmiştir. Bakteri izolatlarından 100 tanesinin katalaz (-), 81 tanesinin ise katalaz (+) özellikte olduğu görülmüştür (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1.** Bakteri izolatlarının Gram reaksiyonları ve katalaz aktiviteleri

İzolat no	Gram reaksiyonu	Katalaz	İzolat no	Gram reaksiyonu	Katalaz
KA A7.2	(+)	(+)	M1713	(+)	(-)
KA C5.2.1	(+)	(+)	M179.2.1	(+)	(-)
BHI C1.4.2	(+)	(+)	KA10	(+)	(+)
BHI A5.3	(+)	(+)	M1712.1.4	(+)	(-)
BHI A7.2	(+)	(+)	NA5.1a)	(+)	(-)
M17 C4.1.2	(+)	(+)	KA4.4(1)2	(+)	(-)
M17 C4.2.2	(+)	(+)	BHIA2.2	(+)	(-)
M17 C4.2.3	(+)	(+)	BHIA1.1	(+)	(+)
KA 4.1 (2)	(+)	(+)	BHIA8.1	(+)	(-)
BHI A4.3	(+)	(-)	BHIC1.2	(+)	(+)
BHI A4.2	(+)	(-)	BHIC1.3.3	(+)	(+)
BHI A4.1	(+)	(+)	BHIC7.4	(+)	(-)
BHI C2.2	(+)	(-)	MitC3.3	(+)	(-)
KA 2.3	(+)	(+)	CA3.3a)	(+)	(-)
KA 4.2(3)	(+)	(+)	LAB8.2.B	(+)	(-)
LAB 1.5.1.A	(+)	(-)	M176.2(2)	(+)	(+)
KA 12.2	(+)	(+)	M1714.1	(+)	(+)
KA10.1.1cizgi	(+)	(+)	M175.1(1)	(+)	(+)
LAB1.1.B	(+)	(-)	M176.1.3	(+)	(-)
MitC7.2.2	(+)	(-)	M176.1.3.1	(+)	(-)
MitC8.3	(+)	(-)	LAB1.1.A	(+)	(-)
KA6.1(1)	(+)	(+)	LAB1.2.A	(+)	(-)
KA9b	(+)	(+)	LAB1.3.2.B	(+)	(-)
NA2.2b)	(+)	(+)	4.1.Y	(+)	(-)
NA2.2a)	(+)	(-)	NA9.4	(+)	(-)
KA8.1(1)	(+)	(+)	NA6.1	(+)	(+)
KA6.1.1alt	(+)	(+)	LAB1.3.B	(+)	(-)
KA1.2(2)	(+)	(+)	CA5.1b)	(+)	(-)
NA9.3a)	(+)	(+)	CA5.1a)	(+)	(+)
NA7.3c)	(+)	(+)	LAB13B	(+)	(-)

**Tablo 3.1.** (Devam) *Bakteri izolatlarının Gram reaksiyonları ve katalaz aktiviteleri*

<b>İzolat no</b>	<b>Gram reaksiyonu</b>	<b>Katalaz</b>	<b>İzolat no</b>	<b>Gram reaksiyonu</b>	<b>Katalaz</b>
CA1.2	(+)	(+)	KA10B	(+)	(+)
NA14	(+)	(+)	LAB1.2.B	(+)	(-)
LAB11.1.A	(+)	(-)	LAB12.1.2	(+)	(-)
NA13	(+)	(+)	M17C4.1.1	(+)	(+)
LAB6.5.A	(+)	(-)	MitC7.1	(+)	(+)
LAB1.3.1.B	(+)	(-)	NA12.1.1C)	(+)	(-)
NA5.1b)	(+)	(+)	NA12.1.2	(+)	(+)
LAB7.7	(+)	(-)	M1713.1(1)	(+)	(+)
LAB8.2.A	(+)	(-)	12.3.1.1b	(+)	(-)
CA3.2	(+)	(-)	M171.2(3)	(+)	(-)
LAB6.1.A	(+)	(-)	M177	(+)	(-)
CA3.6a)	(+)	(-)	M1712.1.3A	(+)	(-)
CA1.4b)	(+)	(-)	M1713.1.1	(+)	(-)
12.3.1.1a)	(+)	(+)	M1713.3	(+)	(-)
M17A2.2(k)	(+)	(+)	NA12.3	(+)	(-)
MitC2.2	(+)	(-)	NA12.1.1A)	(+)	(-)
M17C7.2	(+)	(+)	LAB9.3.A	(+)	(-)
BHIA1.2	(-)	(+)	CA3.4B	(+)	(-)
KAA5.2	(-)	(+)	KA5.2.1	(+)	(-)
KAA1.1.2	(-)	(+)	KA7.2	(+)	(-)
KAC4.1	(-)	(+)	KA4(1)	(+)	(-)
KAC6.1.b	(-)	(+)	KA4.4(1)1	(+)	(-)
KAC6.1.a	(-)	(+)	CA1.1	(+)	(-)
MitA1.2	(-)	(+)	NA12.3.2	(+)	(-)
KAC1.2	(-)	(+)	KA7(1)	(+)	(-)
BHIA1.5	(-)	(+)	LAB1.4.B	(+)	(-)
M17A2.1	(-)	(+)	LAB1.5.1.B	(+)	(-)
M17A6.1	(-)	(+)	LAB3.2.B	(+)	(-)
KAA4.3	(-)	(+)	LABNO3A	(+)	(-)
KAC3.1	(-)	(+)	MRSA2.1	(+)	(-)
BHIA7.1.1	(-)	(+)	MRSA2.2	(+)	(-)
BHIA7.a	(-)	(+)	MRSA3.1	(+)	(-)
KAC5.1	(-)	(+)	MRSA3.2	(+)	(-)
KAC5.2.2	(-)	(+)	LAB3.2.A	(+)	(-)
KAC8.3.1	(-)	(+)	LAB1.4.A	(+)	(-)
KAC8.3.3	(-)	(+)	LAB1.2.B	(+)	(-)
KAC5.1.1	(-)	(+)	4.1.Y.1	(+)	(-)
BHIC2.4	(-)	(+)	M176.1.2	(+)	(-)

**Tablo 3.1.** (Devam) *Bakteri izolatlarının Gram reaksiyonları ve katalaz aktiviteleri*

<b>İzolat no</b>	<b>Gram reaksiyonu</b>	<b>Katalaz</b>	<b>İzolat no</b>	<b>Gram reaksiyonu</b>	<b>Katalaz</b>
13.1.Y.1	(+)	(-)	LAB6.1.B	(+)	(-)
KA6.1.1UST	(+)	(+)	LAB6.3.B	(+)	(-)
LAB6.2.B	(+)	(-)	MRSC6.2	(+)	(-)
LAB6.2.A	(+)	(-)	KA10.1.2	(+)	(-)
KAA2.1	(+)	(+)	KA8.1(2)	(+)	(+)
KA5.1	(+)	(+)	M173.2(1)	(+)	(-)
KA6	(+)	(+)	KA10.2.2(1)	(+)	(+)
KA6.1(2)	(+)	(+)	MitC4.2.1	(+)	(-)
NA7.2	(+)	(+)	NA7.3b	(+)	(-)
LAB6.3.A	(+)	(-)	M17A1.2	(+)	(-)
LAB1.3.1.A	(+)	(-)	M173.1	(+)	(-)
LABNO3B	(+)	(-)	MitC8.1.a	(+)	(-)
LAB1.3.B	(+)	(-)	M17A2.2(i)	(+)	(-)
M17A3.2	(+)	(-)	M17A2.2	(+)	(-)
MRSC7.3	(+)	(-)	MitC8.1.b	(+)	(-)
MRSC7.2	(+)	(-)	MRSC6.1	(+)	(-)
MRSC7.1	(+)	(-)	KA2(2)	(+)	(+)
MRSC8.1	(+)	(-)	KA2(1)	(+)	(+)
MRSC8.3	(+)	(-)	KA2.3(1)	(+)	(+)
MRSC8.1.1	(+)	(-)	CA1.4A	(+)	(+)
M171.1(1)	(+)	(+)	KA3.1	(+)	(+)
KA10.2.2(2)	(+)	(+)	KA1.3(1)	(+)	(+)
BHIC3.3.2	(+)	(+)			

**Tablo 3.2.** *Maya izolatları*

<b>İzolat no</b>	<b>İzolat no</b>
M 9.1 b)	L 9.6.A
M 9.1 a)	L 9.6.1
Mit Ç7.2.1	L 9.6.A.1
MRS A4.1	L 9.3.A
Mit Ç8.2	L 9.5.A
BHI Ç8.2.1	NA 9.3 b)
BHI Ç8.2	NA 9.4 b)
Mit A5.2	M 5.1 b)
BHI Ç7.2	M 5.1 a)
MRS A4.2	Mit A5.1
M17 Ç1.1	PDA Ç8
L 9.1.B	L 9.6.2
L 9.1.A	



### 3.2. Bakterilerin Moleküler Tanılaması

16S rRNA gen bölgesi dizilenen bakterilerin moleküler tanınması BLAST analizi yapılarak gerçekleştirilmiştir. Ardından diziler GenBank veritabanına kaydedilerek erişim numaraları alınmıştır (Tablo 3.3). Böylece veritabanına katkı sağlanmıştır.

**Tablo 3.3.** Bakteri izolatlarının türleri ve GenBank erişim numaraları

İzolat no	Tür adı	Erişim no	İzolat no	Tür adı	Erişim no
BHI A4.3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MH997747	LAB1.4.B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MK014810
BHIA4.2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MH997748	LAB1.5.1.B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MK014811
LAB 1.5.1.A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MH997753	LAB3.2.B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MK014812
LAB1.1.B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MH997756	LABNO3A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MK014813
MitC7.2.2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MH997757	MRSA2.1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MK014814
BHIC7.4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MH997779	MRSA2.2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MK014815
LAB1.1.A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MH997788	MRSA3.1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MK014816
LAB1.2.A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MH997789	MRSA3.2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MK014817
LAB1.3.2.B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MH997790	LAB3.2.A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MK014818
4.1.Y	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MH997791	LAB1.4.A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MK014819
LAB1.3.B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MH997794	LAB1.2.B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MK014820
LAB7.7	<i>Lactobacillus paracasei</i>	MH997805	4.1.Y.1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MK014821
LAB8.2.A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MH997806	M176.1.2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MK014822
LAB11.1.A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MH997800	LAB6.1.B	<i>Lactobacillus paracasei</i>	MK020457
LAB6.5.A	<i>Lactobacillus casei</i>	MH997802	LAB6.3.B	<i>Lactobacillus paracasei</i>	MK020458
LAB1.3.1.B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MH997803	LAB6.2.B	<i>Lactobacillus paracasei</i>	MK020459
LAB6.1.A	<i>Lactobacillus casei</i>	MH997808	LAB6.2.A	<i>Lactobacillus paracasei</i>	MK020460
CA1.4b)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MH997810	LAB6.3.A	<i>Lactobacillus casei</i>	MK024236

**Tablo 3.3.** (Devam) *Bakteri izolatlarının türleri ve GenBank erişim numaraları*

<b>İzolat no</b>	<b>Tür adı</b>	<b>Erişim no</b>	<b>İzolat no</b>	<b>Tür adı</b>	<b>Erişim no</b>
LAB1.3.1.A	<i>Lactobacillus casei</i>	MK024237	BHIC3.3.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MK024280
LABNO3B	<i>Lactobacillus casei</i>	MK024238	KA2(2)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MK024292
LAB1.3.B	<i>Lactobacillus casei</i>	MK024239	KA2(1)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MK024293
M17A3.2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK024243	KA2.3(1)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MK024294
MRSC7.3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK024244	CA1.4A	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MK024295
MRSC7.2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK024245	KA3.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MK024296
MRSC7.1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK024246	KA1.3(1)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MK024297
MRSC8.1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK024247	KA10.2.2(1)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MK024298
MRSC8.3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK024248	BHI A4.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	MH997749
MRSC8.1.1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK024249	KA 2.3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MH997751
MitC8.1.a	<i>Lactobacillus salivarius</i>	MK027006	KA 4.2(3)	<i>Staphylococcus aureus</i>	MH997752
MitC8.1.b	<i>Lactobacillus salivarius</i>	MK027009	KA 12.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MH997754
MRSC6.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MK027020	KA6.1(1)	<i>Staphylococcus aureus</i>	MH997759
MRSC6.2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MK027021	KA9b	<i>Staphylococcus aureus</i>	MH997760
LAB1.2.B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MK005924	NA2.2b)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MH997761
KAA2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	MK024140	KA1.2(2)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MH997765
KA5.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	MK024141	NA7.3c)	<i>Staphylococcus aureus</i>	MH997767
KA6	<i>Staphylococcus aureus</i>	MK024142	KA10	<i>Staphylococcus aureus</i>	MH997770
KA6.1(2)	<i>Staphylococcus aureus</i>	MK024143	NA13	<i>Staphylococcus aureus</i>	MH997801
NA7.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	MK024144	12.3.1.1a)	<i>Staphylococcus warneri</i>	MH997811
M171.1(1)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MK024278	M17A2.2(k)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MH997812
KA10.2.2(2)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MK024279	NA5.1b)	<i>Staphylococcus aureus</i>	MH997804

**Tablo 3.3.** (Devam) *Bakteri izolatlarının türleri ve GenBank erişim numaraları*

<b>İzolat no</b>	<b>Tür adı</b>	<b>Erişim no</b>	<b>İzolat no</b>	<b>Tür adı</b>	<b>Erişim no</b>
NA6.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	MH997793	LAB13B	<i>Enterococcus faecium</i>	MH997797
CA5.1a)	<i>Staphylococcus aureus</i>	MH997796	CA3.6a)	<i>Enterococcus faecium</i>	MH997809
M1714.1	<i>Staphylococcus warneri</i>	MH997784	13.1.Y.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	MK005921
M175.1(1)	<i>Staphylococcus aureus</i>	MH997785	NA12.1.1C)	<i>Enterococcus faecium</i>	MK005928
BHIC1.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MH997777	LAB12.1.2	<i>Enterococcus faecium</i>	MK005925
CA1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	MH997798	12.3.1.1b	<i>Enterococcus faecium</i>	MK007306
NA14	<i>Staphylococcus aureus</i>	MH997799	M171.2(3)	<i>Enterococcus faecium</i>	MK007307
KA10B	<i>Staphylococcus aureus</i>	MK005923	M177	<i>Enterococcus faecium</i>	MK007308
M17C4.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	MK005926	M1712.1.3A	<i>Enterococcus faecium</i>	MK007309
MitC7.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	MK005927	M1713.1.1	<i>Enterococcus faecium</i>	MK007310
NA12.1.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MK005929	M1713.3	<i>Enterococcus faecium</i>	MK007311
M1713.1(1)	<i>Staphylococcus aureus</i>	MK005930	NA12.3	<i>Enterococcus faecium</i>	MK007312
CA3.3a)	<i>Enterococcus durans</i>	MH997781	NA12.1.1A)	<i>Enterococcus faecium</i>	MK007313
M176.1.3.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	MH997787	LAB9.3.A	<i>Enterococcus faecium</i>	MK007314
NA9.3a)	<i>Enterococcus faecium</i>	MH997766	CA3.4B	<i>Enterococcus faecium</i>	MK007315
M1713	<i>Enterococcus faecium</i>	MH997768	KA5.2.1	<i>Enterococcus faecium</i>	MK007316
M179.2.1	<i>Enterococcus faecium</i>	MH997769	KA7.2	<i>Enterococcus faecium</i>	MK007317
M1712.1.4	<i>Enterococcus faecium</i>	MH997771	KA4(1)	<i>Enterococcus faecium</i>	MK007318
NA5.1a)	<i>Enterococcus faecium</i>	MH997772	KA4.4(1)1	<i>Enterococcus faecium</i>	MK007319
KA4.4(1)2	<i>Enterococcus faecium</i>	MH997773	CA1.1	<i>Enterococcus lactis</i>	MK007320
NA9.4	<i>Enterococcus faecium</i>	MH997792	NA12.3.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	MK007321
CA3.2	<i>Enterococcus lactis</i>	MH997807	KA7(1)	<i>Enterococcus faecalis</i>	MK007322

**Tablo 3.3.** (Devam) *Bakteri izolatlarının türleri ve GenBank erişim numaraları*

<b>İzolat no</b>	<b>Tür adı</b>	<b>Erişim no</b>	<b>İzolat no</b>	<b>Tür adı</b>	<b>Erişim no</b>
BHI C2.2	<i>Streptococcus salivarius</i>	MH997750	KA10.1.1cizgi	<i>Bacillus subtilis</i>	MH997755
MitC8.3	<i>Streptococcus anginosus</i>	MH997758	BHIA1.1	<i>Bacillus licheniformis</i>	MH997775
BHIA8.1	<i>Streptococcus salivarius</i>	MH997776	KA6.1.1UST	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MK005922
NA2.2a)	<i>Streptococcus anginosus</i>	MH997762	M17C7.2	<i>Bacillus licheniformis</i>	MH997814
BHIA2.2	<i>Streptococcus oralis</i>	MH997774	KA8.1(2)	<i>Bacillus pumilus</i>	MK027246
M176.1.3	<i>Streptococcus salivarius</i>	MH997786	BHIA1.2	<i>Neisseria flavescens</i>	MH999421
MitC3.3	<i>Streptococcus salivarius</i>	MH997780	KAA5.2	<i>Neisseria flavescens</i>	MH999422
LAB8.2.B	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	MH997782	KAA1.1.2	<i>Neisseria flavescens</i>	MH999423
CA5.1b)	<i>Streptococcus salivarius</i>	MH997795	KAC4.1	<i>Neisseria flavescens</i>	MH999424
MitC2.2	<i>Streptococcus salivarius</i>	MH997813	KAC6.1.b	<i>Neisseria flavescens</i>	MH999425
MitC4.2.1	<i>Streptococcus anginosus</i>	MK024376	KAC6.1.a	<i>Neisseria flavescens</i>	MH999426
NA7.3b	<i>Streptococcus salivarius</i>	MK026976	MitA1.2	<i>Neisseria flavescens</i>	MH999427
M17A1.2	<i>Streptococcus salivarius</i>	MK026977	KAC1.2	<i>Neisseria flavescens</i>	MH999428
M173.1	<i>Streptococcus mutans</i>	MK026978	BHIA1.5	<i>Neisseria flavescens</i>	MH999429
M17A2.2(i)	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	MK027007	KAA4.3	<i>Neisseria sicca</i>	MH999432
M17A2.2	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	MK027008	KAC3.1	<i>Neisseria sicca</i>	MH999433
KA10.1.2	<i>Streptococcus sanguinis</i>	MK027245	BHIA7.1.1	<i>Neisseria elongata</i>	MH999434
M173.2(1)	<i>Streptococcus intermedius</i>	MK027247	BHIA7.a	<i>Neisseria perflava</i>	MH999435
M176.2(2)	<i>Bacillus subtilis</i>	MH997783	KAC5.1	<i>Neisseria subflava</i>	MH999436
BHIC1.3.3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MH997778	KAC5.2.2	<i>Neisseria subflava</i>	MH999437
KA8.1(1)	<i>Bacillus altitudinis</i>	MH997763	KAC8.3.1	<i>Neisseria subflava</i>	MH999438
KA6.1.1alt	<i>Bacillus velezensis</i>	MH997764	KAC8.3.3	<i>Neisseria subflava</i>	MH999439

**Tablo 3.3.** (Devam) Bakteri izolatlarının türleri ve GenBank erişim numaraları

İzolat no	Tür adı	Erişim no	İzolat no	Tür adı	Erişim no
KAC5.1.1	<i>Neisseria subflava</i>	MH999440	M17 C4.1.2	<i>Rothia mucolaginoso</i>	MH337312
BHIC2.4	<i>Neisseria subflava</i>	MH999441	M17 C4.2.2	<i>Rothia mucolaginoso</i>	MH337313
KA A7.2	<i>Rothia dentocarioso</i>	MH337307	M17 C4.2.3	<i>Rothia mucolaginoso</i>	MH337314
KA C5.2.1	<i>Rothia dentocarioso</i>	MH337308	M17A2.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MH999430
BHI C1.4.2	<i>Rothia dentocarioso</i>	MH337309	M17A6.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MH999431
BHI A5.3	<i>Rothia mucolaginoso</i>	MH337310	KA 4.1 (2)	<i>Corynebacterium argentoratense</i>	MH337315
BHI A7.2	<i>Rothia mucolaginoso</i>	MH337311			

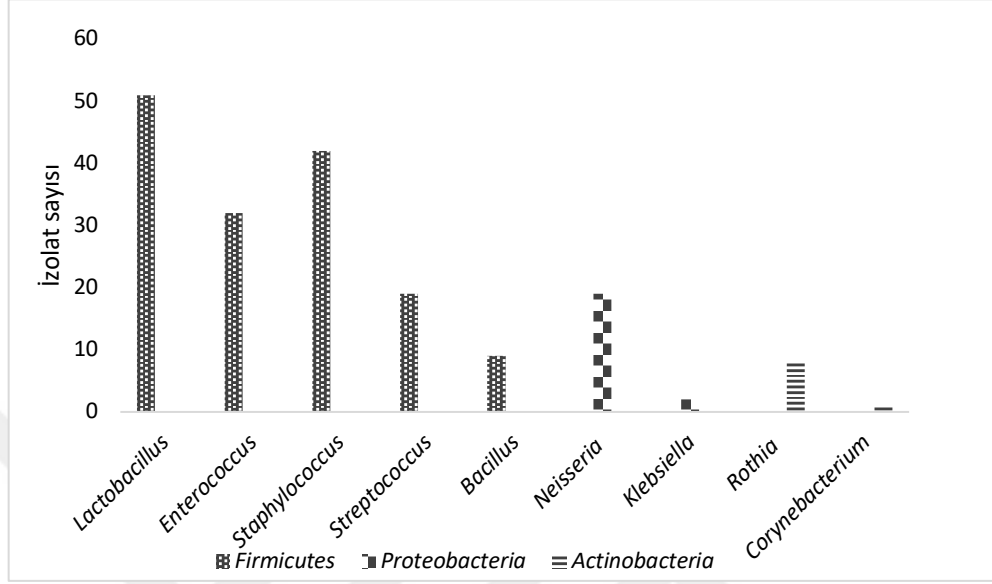
16S rRNA gen bölgesine göre tür tanılaması yapılan izolatların 3 farklı filuma ait oldukları belirlenmiştir. Bu filumlarda toplam 9 cins ve 37 tür bulunmaktadır (Tablo 3.4).

**Tablo 3.4.** Bakteri cins ve türlerinin filumlara dağılımı

Filum	Cins	Tür
<i>Firmicutes</i>	5	28
<i>Proteobacteria</i>	2	6
<i>Actinobacteria</i>	2	3
Toplam	9	37

*Firmicutes* 5 cins ve 28 tür ile en fazla çeşitliliğe sahip filumdur. *Proteobacteria* filumunda 2 cins, 6 tür bulunmaktadır. *Actinobacteria* ise 2 cins, 3 tür ile (*Rothia dentocarioso*, *Rothia mucolaginoso*, *Corynebacterium argentoratense*) en az çeşitliliğe sahip filumdur. *Firmicutes* filumunda *Lactobacillus* (49 izolat), *Proteobacteria* filumunda *Neisseria* (19 izolat), *Actinobacteria* filumunda ise *Rothia* (8 izolat) en baskın cins olmuştur. Şekil 3.1’de izolatların filum ve cinsler içinde dağılımı gösterilmiştir. *Staphylococcus* cinsi içinde 5; *Enterococcus*’ta 4; *Lactobacillus*’ta 6; *Neisseria*’da 5; *Bacillus*’ta 6; *Rothia*’da 2; *Streptococcus*’ta 8; *Klebsiella*’da 2 ve *Corynebacterium* cinsi

içinde ise 1 tür tanılanmıştır. Tablo 3.5'te tanımlanan türler ve izolat sayıları gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Bakteri izolatlarının cinslere dağılımı

Tablo 3.5. Tanımlanan bakteri türleri ve izolat sayıları

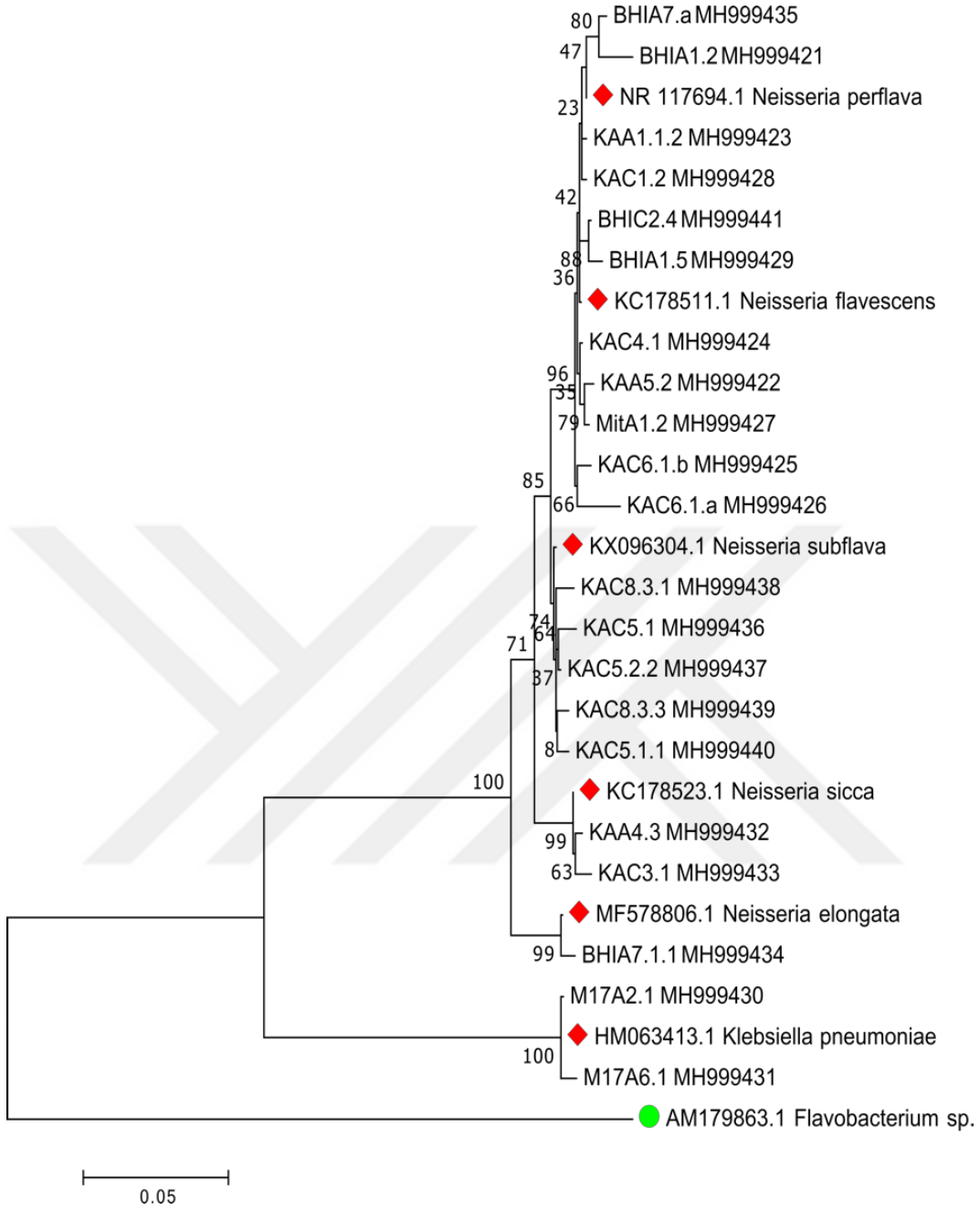
Tür	İzolat sayısı	Tür	İzolat sayısı
<i>Staphylococcus aureus</i>	22	<i>Streptococcus salivarius</i>	8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	17	<i>Streptococcus anginosus</i>	3
<i>Staphylococcus warneri</i>	2	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	2
<i>Enterococcus faecium</i>	25	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	<i>Streptococcus oralis</i>	1
<i>Enterococcus lactis</i>	2	<i>Streptococcus mutans</i>	1
<i>Enterococcus durans</i>	1	<i>Streptococcus intermedius</i>	1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	25	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1
<i>Lactobacillus fermentum</i>	11	<i>Neisseria flavescens</i>	9
<i>Lactobacillus paracasei</i>	5	<i>Neisseria subflava</i>	6
<i>Lactobacillus casei</i>	6	<i>Neisseria sicca</i>	2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	<i>Neisseria elongata</i>	1
<i>Lactobacillus salivarius</i>	2	<i>Neisseria perflava</i>	1
<i>Bacillus subtilis</i>	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2	<i>Rothia mucolaginosus</i>	5
<i>Bacillus licheniformis</i>	2	<i>Rothia dentocariosa</i>	3

**Tablo 3.5.** (Devam) *Tanımlanan bakteri türleri ve izolat sayıları*

<b>Tür</b>	<b>İzolat sayısı</b>	<b>Tür</b>	<b>İzolat sayısı</b>
<i>Bacillus velezensis</i>	1	<i>Corynebacterium</i>	1
		<i>argentoratense</i>	
<i>Bacillus pumilis</i>	1		
<i>Bacillus altitudinis</i>	1		

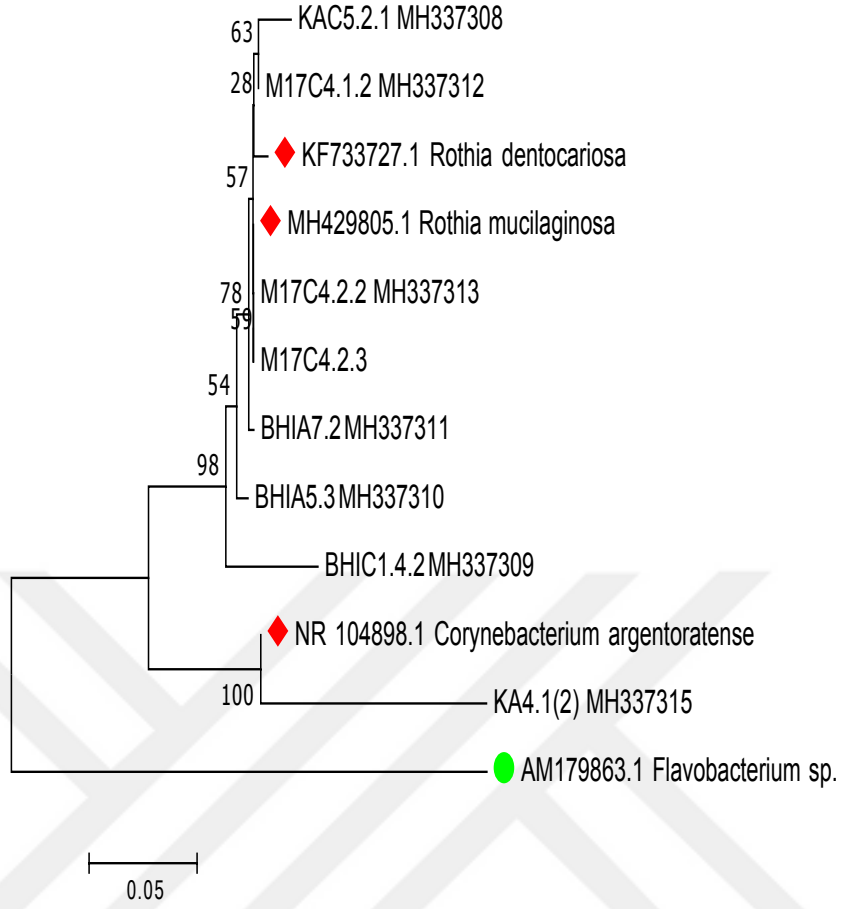
### **3.3. Filogenetik Yakınlık**

Bakteri izolatlarının filogenetik yakınlıkları MEGA 7.0.26 programında Maximum Likelihood algoritması ile oluşturulan ağaçlar ile ortaya çıkarılmıştır. Bunun için bakteri filumlarına göre 3 filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4). Filogenetik ağaçlarda dış grup olarak *Bacterioidetes* filumundan *Flavobacterium* sp. AM179863.1 16S rRNA dizisi GenBank'tan çekilerek kullanılmıştır.

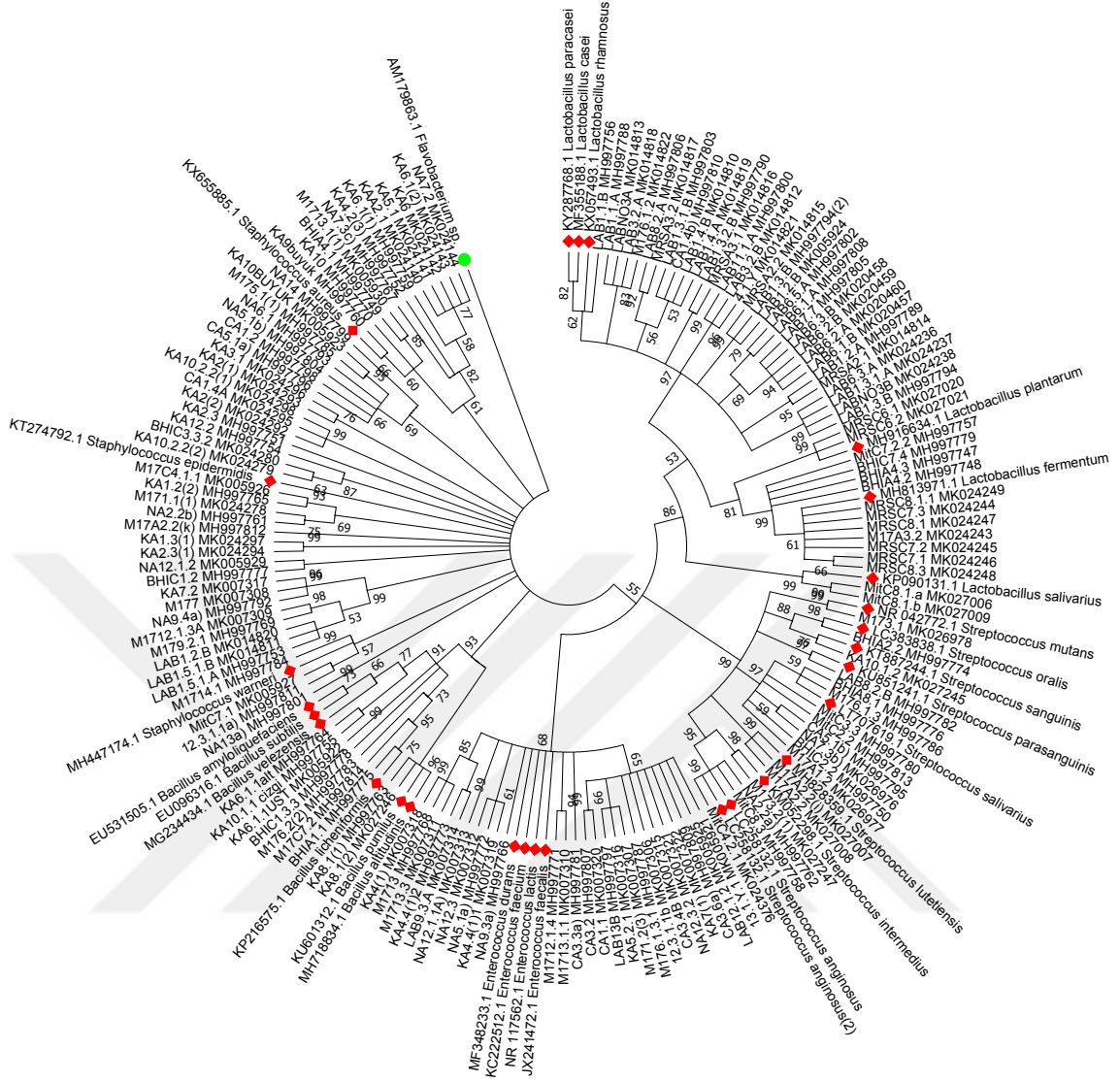


**Şekil 3.2.** *Proteobacteria* filumundaki izolatların 16S rRNA dizileri ile oluşturulan Maximum Likelihood ağacı. GenBank veritabanından çekilen referans diziler ◆ ile, dış grup ● ile gösterilmiştir.





**Şekil 3.3.** *Actinobacteria* filumundaki izolatlara 16S rRNA dizileri ile oluşturulan Maximum Likelihood ağacı. GenBank veritabanından çekilen referans diziler ◆ ile, dış grup ● ile gösterilmiştir.



**Şekil 3.4.** Firmicutes filumundaki izolatların 16S rRNA dizileri ile oluşturulan Maximum Likelihood ağacı. GenBank veritabanından çekilen referans diziler ◆ ile, dış grup ● ile gösterilmiştir. %50 ve üzerindeki bootstrap değerleri gösterilmiştir.

### 3.4. Mayaların Biyokimyasal Tanılaması

Vitek 2 (Biomérieux) cihazı maya kartları kullanılarak yapılan tanılamada 25 adet maya izolatının tamamının *Candida* cinsi olduğu belirlenmiştir. İzolatlardan 12 tanesi *Candida dubliniensis*, 9 tanesi *Candida albicans*, 2 tanesi *Candida norvegensis*, 1 tanesi *Candida tropicalis*, 1 tanesi *Cryptococcus laurentii* olarak tanılanmıştır. Tanılamada benzerlik yüzdeleri %85-99 aralığındadır (Tablo 3.6).

**Tablo 3.6.** Vitek 2 ile tanılanan mayalar ve benzerlik oranları

İzolot no	Tür	Benzerlik
M 9.1 b)	<i>Candida albicans</i>	%99
M 9.1 a)	<i>Candida albicans</i>	%98
Mit Ç7.2.1	<i>Candida dubliniensis</i>	%96
MRS A4.1	<i>Candida albicans</i>	%94
Mit Ç8.2	<i>Candida albicans</i>	%97
BHI Ç8.2.1	<i>Candida tropicalis</i>	%91
BHI Ç8.2	<i>Candida albicans</i>	%99
Mit A5.2	<i>Candida norvegensis</i>	%96
BHI Ç7.2	<i>Candida dubliniensis</i>	%93
MRS A4.2	<i>Cryptococcus laurentii</i>	%85
M17 Ç1.1	<i>Candida albicans</i>	%97
Mit A5.1	<i>Candida norvegensis</i>	%97
PDA Ç8	<i>Candida albicans</i>	%99
L 9.1.B	<i>Candida dubliniensis</i>	%91
L 9.1.A	<i>Candida dubliniensis</i>	%91
L 9.6.2	<i>Candida dubliniensis</i>	%91
L 9.6.A	<i>Candida.dubliniensis</i>	%89
L 9.6.1	<i>Candida dubliniensis</i>	%88
L 9.6.A.1	<i>Candida dubliniensis</i>	%91
L 9.3.A	<i>Candida dubliniensis</i>	%91
L 9.5.A	<i>Candida dubliniensis</i>	%91
NA 9.3 b)	<i>Candida albicans</i>	%96
NA 9.4 b)	<i>Candida albicans</i>	%96
M 5.1 b)	<i>Candida dubliniensis</i>	%96
M 5.1 a)	<i>Candida dubliniensis</i>	%96

### 3.5. Laktik Asit Bakterilerinin Gastrointestinal Şartlara Direnci

16S rRNA gen bölgesine göre yapılan tanılamada bakteri izolatlarının 51 tanesinin *Lactobacillus* cinsi olarak tanılanmıştır. Ancak 7 adet izolat gliserol stoklarından canlandırılmamıştır. Bu nedenle sonraki deneylere 44 adet laktik asit bakterisi ile devam edilmiştir (Tablo 3.7).

**Tablo 3.7.** Canlandırılan laktik asit bakterisi izolatları

İzolat no	Tür adı	İzolat no	Tür adı
LAB 1.5.1.A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MRSC6.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LAB1.1.B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MRSC6.2	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MitC7.2.2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LAB1.2.B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
BHIC7.4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LAB1.3.B	<i>Lactobacillus casei</i>
LAB1.1.A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MRSC7.3	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LAB1.2.A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MRSC7.2	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LAB1.3.2.B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MRSC7.1	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LAB7.7	<i>Lactobacillus paracasei</i>	MRSC8.1	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LAB11.1.A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MRSC8.3	<i>Lactobacillus fermentum</i>
LAB6.5.A	<i>Lactobacillus casei</i>	MitC8.1.a	<i>Lactobacillus salivarius</i>
LAB1.3.1.B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MitC8.1.b	<i>Lactobacillus salivarius</i>
LAB6.1.A	<i>Lactobacillus casei</i>	M176.1.2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
CA1.4b)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LAB6.1.B	<i>Lactobacillus paracasei</i>
LAB1.4.B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LAB6.3.B	<i>Lactobacillus paracasei</i>
LAB1.5.1.B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LAB6.2.B	<i>Lactobacillus paracasei</i>
LAB3.2.B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LAB6.2.A	<i>Lactobacillus paracasei</i>
LABNO3A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LAB6.3.A	<i>Lactobacillus casei</i>
MRSA2.1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LAB1.3.1.A	<i>Lactobacillus casei</i>
MRSA2.2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LABNO3B	<i>Lactobacillus casei</i>
MRSA3.1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LAB3.2.A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
MRSA3.2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LAB1.4.A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
4.1.Y	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LAB1.3.A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>

### 3.5.1. Lizozim direnci

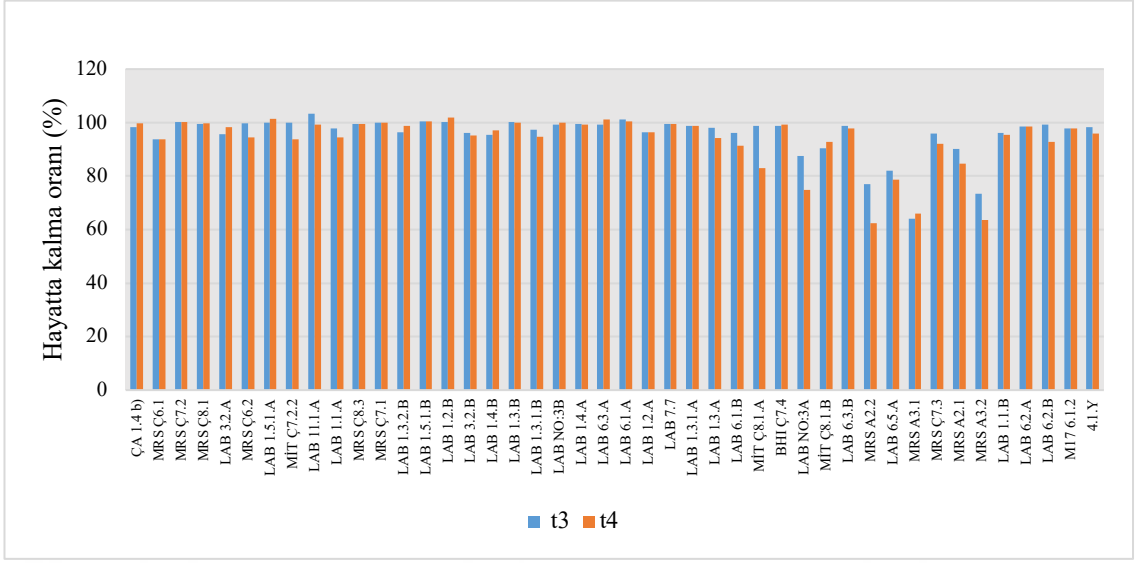
Laktik asit bakterilerinin lizozim direnci kuyucuk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Lizozim solüsyonları 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 ve 10 mg/ml konsantrasyonlarında kullanılmıştır. 37°C’de 24 saat inkübasyon sonunda kuyucukların etrafında zon oluşumu gözlenmemiştir. Tüm laktik asit bakterilerinin kullanılan lizozim konsantrasyonlarına karşı dirençli olduğu saptanmıştır.

### 3.5.2. Pepsin direnci

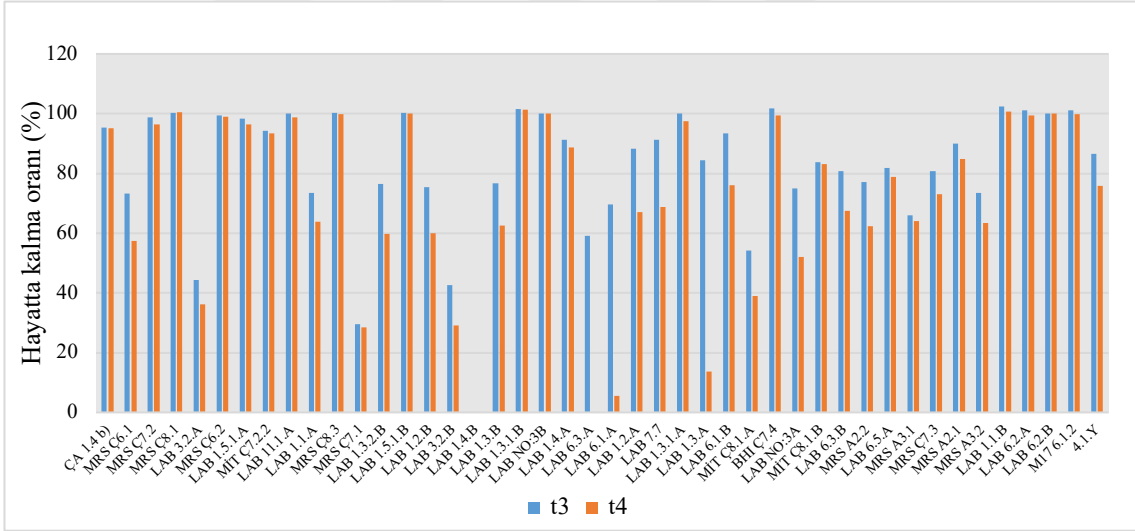
Laktik asit bakterilerinin pH 2 ve pH 3 olmak üzere iki farklı pH değerindeki PBS tamponunda pepsin direnci (3 mg/ml) incelenmiştir. Şekil 3.5’te laktik asit bakterilerinin 3. ve 4. saatlerdeki hayatta kalma yüzdeleri verilmiştir.

Buna göre 3mg/ml pepsin içeren pH 3 PBS tamponunda 3.saatte izolatların hayatta kalma oranının %64,14-100 aralığında olduğu görülmektedir. En düşük hayatta kalma oranı %64,14 ile MRSA3.1 izolatına aittir. 4. saatte ise MRSC6.2, MitC7.2.2, LAB1.1.A, LAB1.3.1.B, LAB 6.2.B, 4.1.Y, LAB1.3.A, LAB 6.1.B, MitC8.1.A, LABNo:3A, LAB6.3.B, MRSA2.2, LAB6.5.A, MRSC7.3, MRSA2.1, MRSA3.2, LAB1.1.B izolatlarının hayatta kalma yüzdelerinin düştüğü görülmektedir. Buna rağmen tüm izolatların hayatta kalma oranı%50'nin üzerindedir. 4.saatte en düşük hayatta kalma yüzdesi %62,41 ile MRSA2.2 izolatına aittir (Şekil 3.5).

pH 2 PBS tamponunda ise hayatta kalma yüzdelerinin düştüğü görülmektedir (Şekil 3.6). LAB1.4.B izolatı 3. saatin, LAB6.3.A izolatı ise 4. saatin sonunda üreme göstermemiştir. 3. saatte %50 ve üzeri hayatta kalma oranına sahip izolatlar; CA1.4b), MRSC6.1, MRSC7.2, MRSC8.1, MRSC6.2, LAB1.5.1.A, MitC7.2.2, LAB11.1.A, LAB1.1.A, MRSC8.3, LAB1.3.2.B, LAB1.5.1.B, LAB1.2.B, LAB1.3.B, LAB1.3.1.B, LABNO:3B, LAB1.4.A, LAB6.3.A, LAB6.1.A, LAB1.2.A, LAB7.7., LAB1.3.1.A, LAB1.3.A, LAB6.1.B, MitC8.1.A, BHIC7.4, LABNO:3A, MitC8.1.B, LAB6.3.B, MRSA2.2, LAB6.5.A, MRSA3.1, MRSC7.3, MRSA2.1, MRSA3.2, LAB1.1.B, LAB6.2.A, LAB6.2.B, M176.1.2, 4.1.Y nolu izolatlardır. Ancak 4.saattin sonunda LAB6.3.A, LAB6.1.A, LAB1.3.A ve MitC8.1.A izolatlarının hayatta kalma yüzdeleri bu oranın altına düşmüştür (Şekil 3.6).



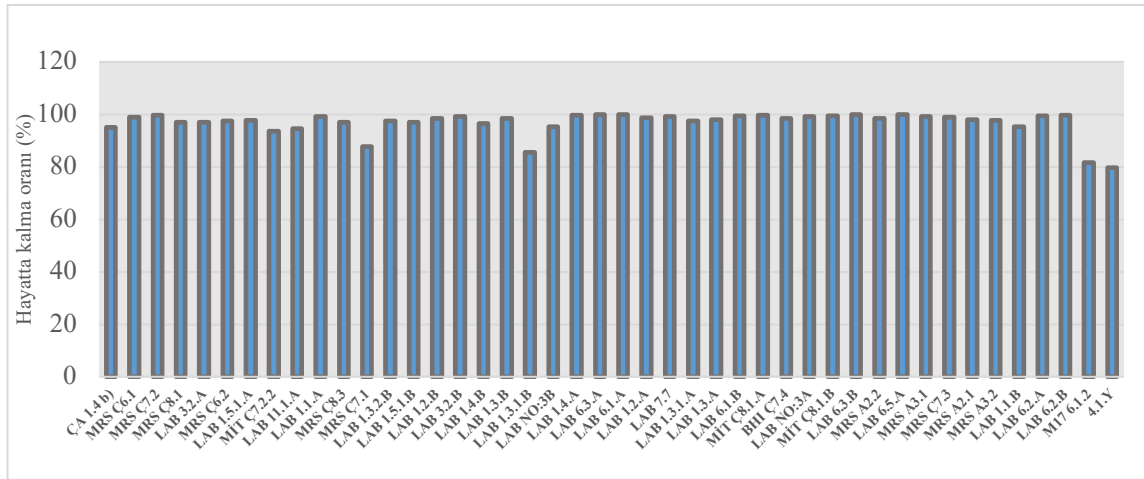
**Şekil 3.5.** Laktik asit bakterilerinin 3 mg/ml pepsin içeren pH 3 PBS tamponunda hayatta kalma oranları t3, 3.saati; t4 4.saati göstermektedir.



**Şekil 3.6.** Laktik asit bakterilerinin 3 mg/ml pepsin içeren pH 2 PBS tamponunda hayatta kalma oranları t3, 3.saati; t4 4.saati göstermektedir

### 3.5.3. Pankreatin direnci

Laktik asit bakterilerinin 1 mg/ml pankreatin içeren PBS tamponunda (pH 7,2) hayatta kalma yüzdeleri Şekil 3.7’de verilmiştir. Buna göre 4. saatin sonunda tüm izolatların dirençli olduğu, hayatta kalma oranlarının %99,86-79,6 aralığında olduğu görülmektedir. 4.1.Y izolatı %79,6 hayatta kalma oranı ile en duyarlı izolatdır (Şekil 3.7).



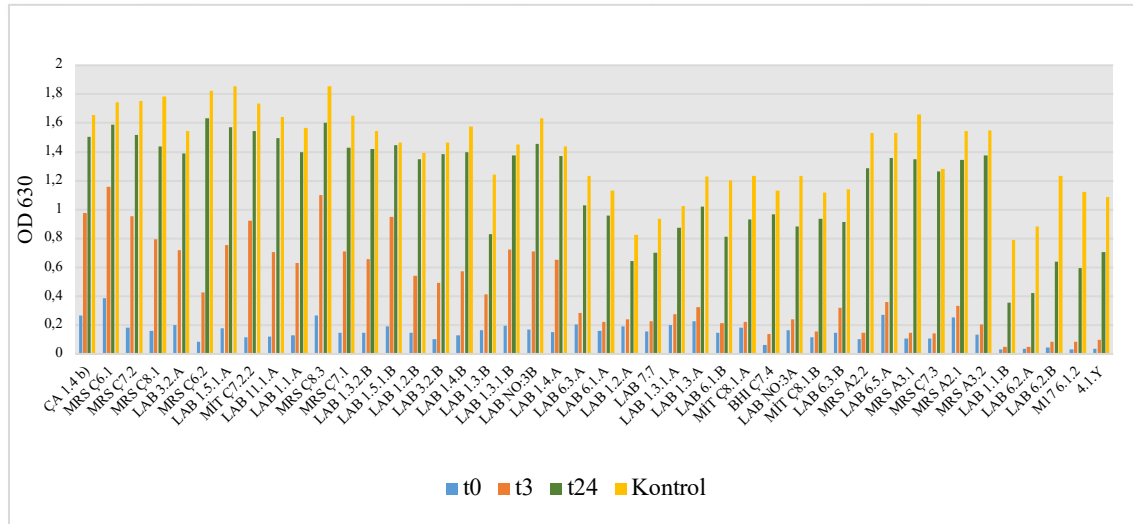
Şekil 3.7. Laktik asit bakterilerinin 1 mg/ml pankreatin içeren pH 3 PBS tamponunda hayatta kalma oranları

### 3.5.4. Safra tuzu (oxgall) direnci

Laktik asit bakterilerinin safra tuzu direnci %0,08, %0,16, %0,3, %0,6, %1,25, %2,5 ve %5 safra tuzu içeren MRS broth besiyerinde 4 ve 24 saatlik inkübasyonları sonucunda 630 nm’de optik yoğunlukları ölçülmüştür. Kontrol olarak izolatlar safra tuzu içermeyen MRS broth besiyerinde 24 saatlik inkübe edilmiştir.

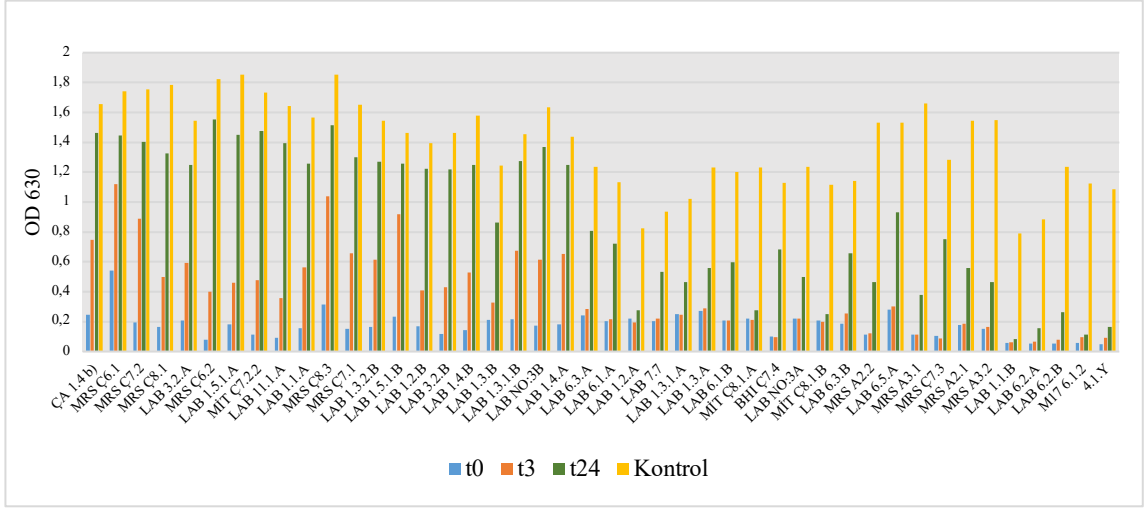
%0,08 safra tuzu içeren besiyerinde inkübasyon sonucunda tüm izolatların OD değerlerinde yükselme olduğu, izolatların bu konsantrasyona dirençli olduğu görülmektedir (Şekil 3.8). %0,16 safra tuzu konsantrasyonunda LAB1.2.A, MitC8.1.A, MitC8.1.B, LAB1.1.B, LAB6.2.A, LAB6.2.B, M176.1.2 ve 4.1.Y numaralı izolatlar haricinde diğer izolatlar gelişme göstermiştir (Şekil 3.9). %0,3 safra tuzu konsantrasyonunda OD değerinde yükseliş olan izolatlar: CA1.4 b), MRSC6.1, MRSC7.2, MRSC8.1, MRSC6.2, LAB1.5.1.A, MitC7.2.2, LAB11.1.A, MRSC8.3, MRSC7.1, LAB1.5.1.B, LABNO:3B, LAB1.4.A, BHIC7.4 nolu izolatlardır. 4 saatlik

inkübasyon sonunda yapılan okumada OD değerinde yükseliş olup, 24 saat sonunda OD değeri sabit kalan izolatlar ise: LAB3.2.A, LAB1.1.A, LAB1.3.2.B, LAB1.2.B, LAB1.4.B, LAB1.3.1.B'dir (Şekil 3.10). %0,6 safra tuzu konsantrasyonunda ise %0,3'lük konsantrasyonda gelişme gösteren izolatlardan MRSC7.2, LAB11.1.A ve BHIC7.4 haricinde diğer izolatların OD değerlerinde yükselme görülmüştür (Şekil 3.11). %1,25 safra tuzu konsantrasyonunda gelişme gösteren izolatlar: MRSC6.1, MRSC7.2, MRSC8.1, MRSC6.2, MitC7.2.2, MRSC8.3, MRSC7.1, LAB1.4.A, LAB3.2.A, LAB1.2.B'dir (Şekil 3.12). Aynı izolatlar %2,5 ve %5 safra tuzu konsantrasyonlarında da gelişme göstermiştir (Şekil 3.13, Şekil 3.14).

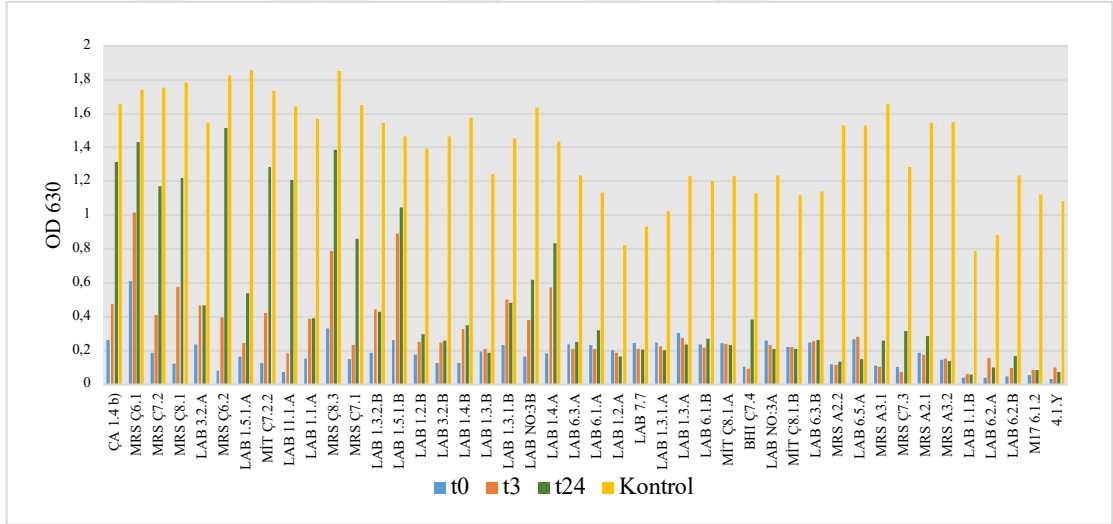


**Şekil 3.8.** LAB izolatlarının %0,08 safra tuzu (oxgall) içeren MRS broth besiyerinde inkübasyon sonrası 630 nm'de optik yoğunluk değerleri

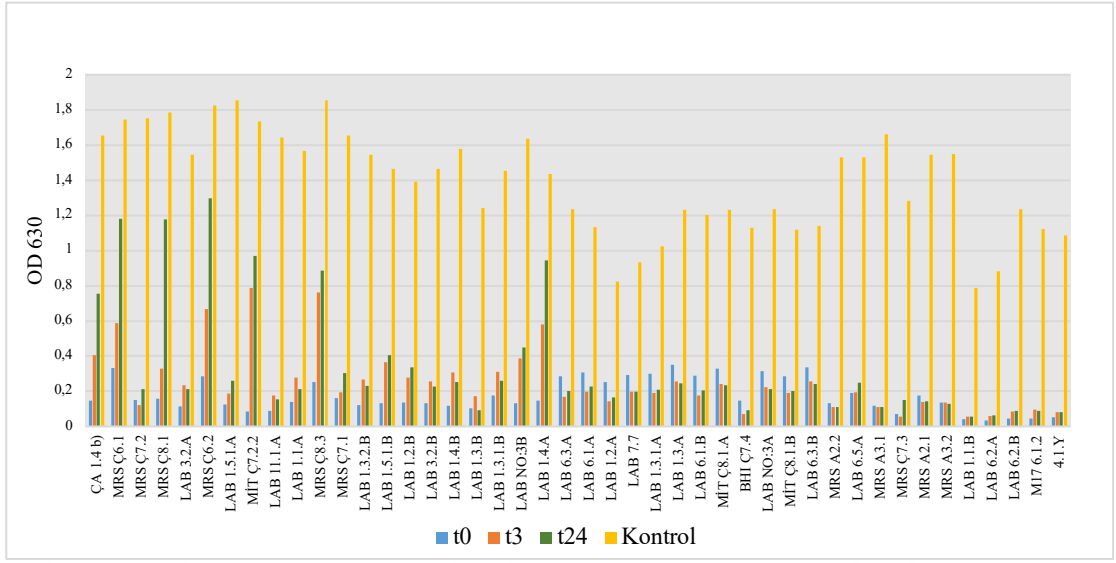




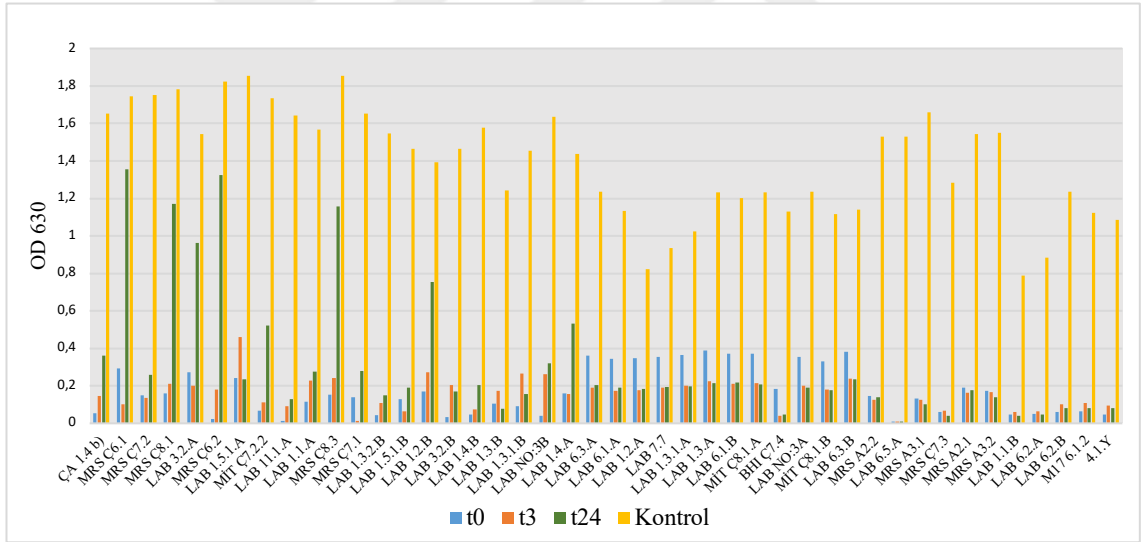
Şekil 3.9. LAB izolatlarının %0,16 safra tuzu (oxgall) içeren MRS broth besiyerinde inkübasyon sonrası 630 nm'de optik yoğunluk değerleri



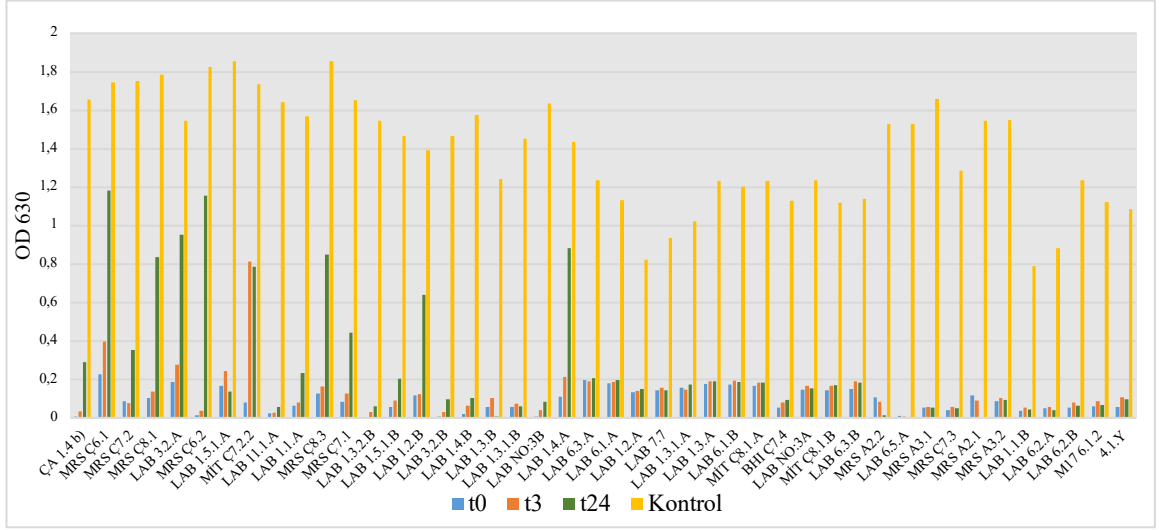
Şekil 3.10. LAB izolatlarının %0,3 safra tuzu (oxgall) içeren MRS broth besiyerinde inkübasyon sonrası 630 nm'de optik yoğunluk değerleri



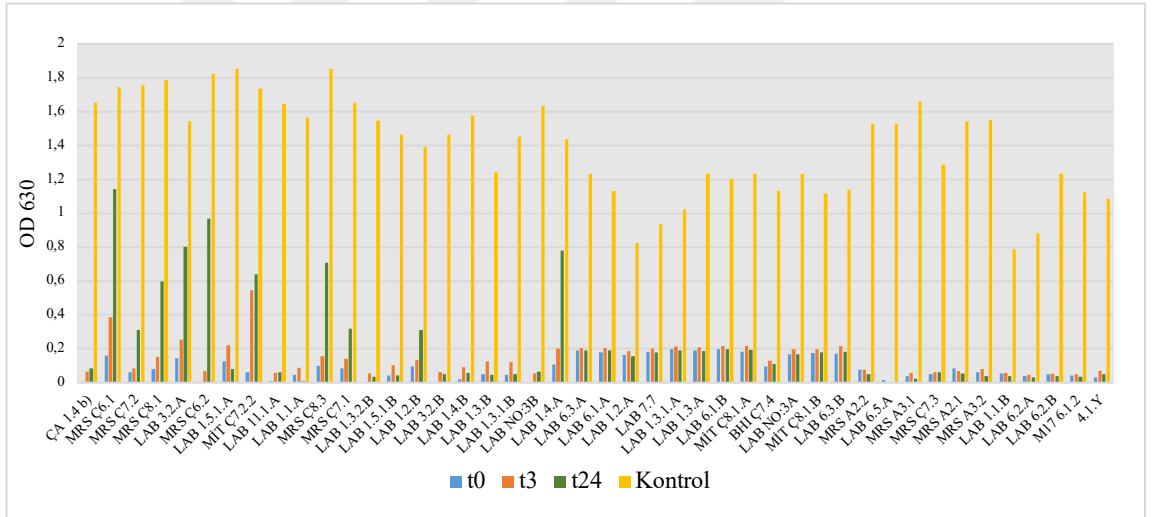
Şekil 3.11. LAB izolatlarının %0,6 safrı tuzu (oxgall) içeren MRS broth besiyerinde inkübasyon sonrası 630 nm'de optik yoğunluk değerleri



Şekil 3.12. LAB izolatlarının %1,25 safrı tuzu (oxgall) içeren MRS broth besiyerinde inkübasyon sonrası 630 nm'de optik yoğunluk değerleri



**Şekil 3.13.** LAB izolatlarının %2,5 safra tuzu (oxgall) içeren MRS broth besiyerinde inkübasyon sonrası 630 nm'de optik yoğunluk değerleri

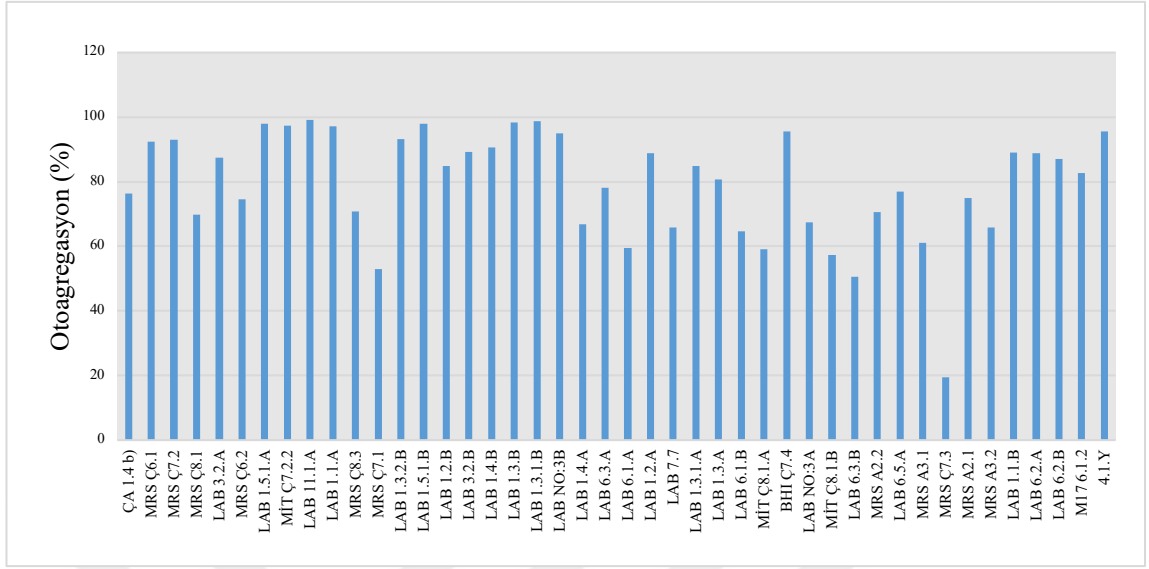


**Şekil 3.14.** LAB izolatlarının %5 safra tuzu (oxgall) içeren MRS broth besiyerinde inkübasyon sonrası 630 nm'de optik yoğunluk değerleri

### 3.6. Laktik Asit Bakterilerinin Agregasyon Aktiviteleri

#### 3.6.1. Otoagregasyon

Laktik asit bakterilerinin tamamı otoagregasyon aktivitesi göstermektedir (Şekil 3.15). En düşük otoagregasyon yüzdesi %19,4 ile MRSC7.3, en yüksek yüzde ise %98,68 ile LAB1.3.1.B izolatına aittir.



Şekil 3.15. Laktik asit bakterilerinin otoagregasyon yüzdeleri

### 3.6.2. Koagregasyon

Laktik asit bakterilerinin *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 2575 bakterileri ile koagregasyon aktiviteleri incelenmiştir. MRSC7.1, MRSC7.2, CA1.4b), MRSC6.1, LAB6.2.A, LAB1.3.B, MitÇ7.2.2, LAB1.2.B, LAB1.5.1.B izolatları seçilen patojenler ile koagregasyon yapmamıştır. 19 izolat *E.coli* ile agregasyon oluşturmuştur. En düşük koagregasyon oranına %2,33 ile LAB6.1.B, en yüksek orana ise %64,44 ile MRSA2.1 sahiptir. LAB6.1.B, LAB1.2.A, LAB1.3.A, 4.1.Y, LAB6.2.B, MRSC8.3 izolatları sadece *E. coli* ile agregasyon oluşturmuştur (Tablo 3.8).

26 izolat *S. mutans* ile agregasyon oluşturmuştur. En düşük koagregasyon oranına %3,48 ile LAB1.5.1.A, en yüksek orana ise %90,9 ile LABNO:3A sahiptir. LAB6.3.A, LAB1.1.B, LAB7.7 izolatları sadece *S. mutans* ile agregasyon oluşturmuştur (Tablo 3.8).

25 izolat *S. aureus* ile agregasyon oluşturmuştur. En düşük koagregasyon oranına %1,16 ile MRSC6.2, en yüksek orana ise %94,79 ile LAB6.3.B sahiptir.

**Tablo 3.8.** Laktik asit bakterilerinin *E. coli*, *S. mutans* ve *S. aureus* ile koagregasyon aktiviteleri

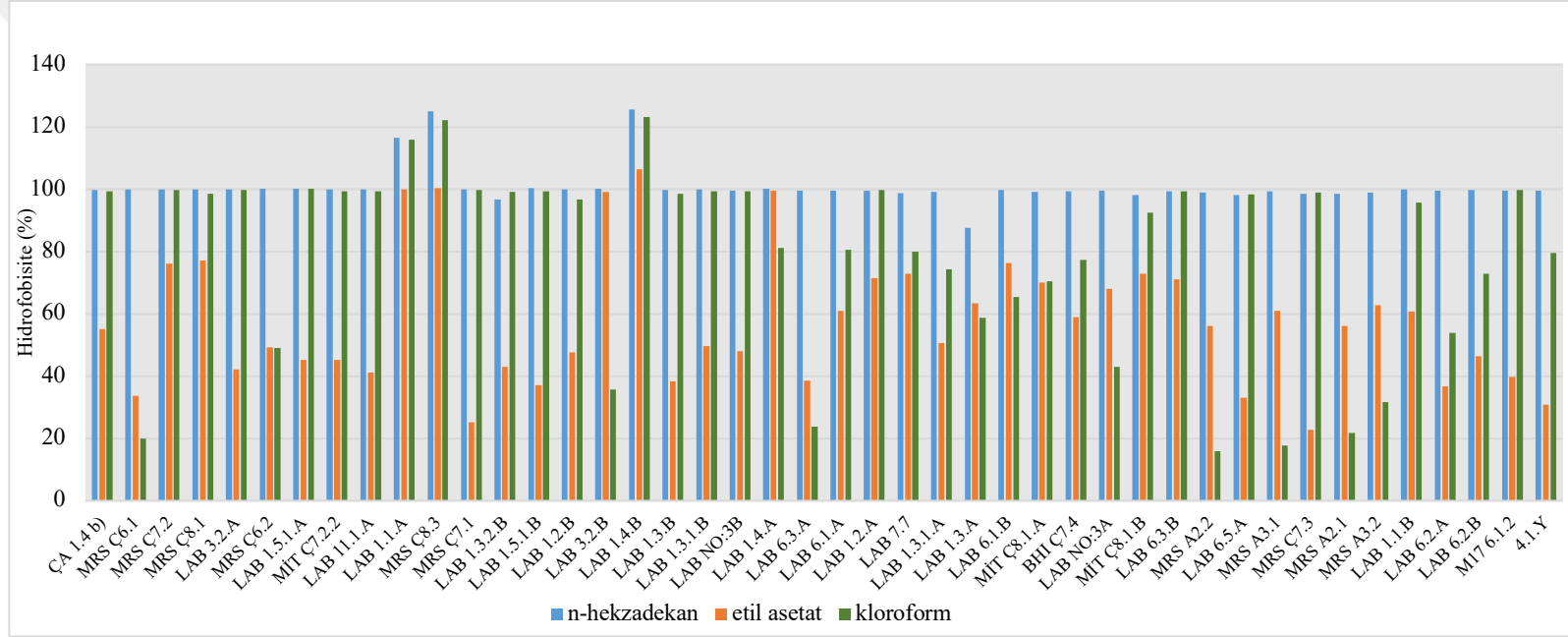
	<i>E.coli</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>
LABNO:3A	39,06	90,9	72,97
LAB6.5.A	-	34,14	20,58
MİTÇ8.1.B	8,46	4,34	9,09
LAB1.4.A	32,43	39,04	45,05
LAB1.4.B	18,4	-	28,88
LAB1.3.1.B	-	4,25	35
LAB6.1.A	-	35,94	48,63
LAB1.5.1.B	-	-	-
MİTÇ8.1.A	-	71,73	95,06
LAB6.1.B	2,33	-	-
LAB1.2.B	-	-	-
LAB1.3.1.A	45,47	29,45	4,73
MİTÇ7.2.2	-	-	-
LAB11.1.A	-	7,59	11,77
LAB6.3.A	-	3,91	-
LAB1.3.B	-	-	-
LAB1.2.A	14,29	-	-
LAB1.3.A	5,59	-	-
LAB1.3.2.B	11,32	-	14,72
LAB6.2.A	-	-	-
4.1.Y	11,98	-	-
M176.1.2	43,54	55,36	12,41
LAB6.2.B	6,379	-	-
MRŞÇ6.1	-	-	-
MRŞÇ8.1	5,92	10,41	-
MRŞÇ8.3	4,07	-	-
LAB1.1.B	-	27,26	-
MRŞÇ6.2	5,11	-	1,16
ÇA1.4 b)	-	-	-
LAB7.7	-	33,5	-
MRŞÇ7.2	-	-	-
LAB6.3.B	40,68	83,5	94,79
BHIÇ7.4	38,55	87,1	94,53
MRSA3.1	-	4,79	15,06
LABNO:3B	-	55,75	52,36

**Tablo 3.8.** (Devam) *Laktik asit bakterilerinin E. coli, S. mutans ve S. aureus ile koagregasyon aktiviteleri*

	<i>E.coli</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>
LAB1.5.1.A	-	3,484	19,44
MRSA2.2	16,63	19,56	47,35
MRSA2.1	64,44	77,49	89,11
MRSA3.2	-	55,24	68,04
MRSC7.3	53,84	55,37	82,39
MRSC7.1	-	-	-
LAB3.2.A	-	15,97	28,98
LAB1.1.A	-	34,07	20,99
LAB3.2.B	-	28,44	21,55

### 3.7. Laktik Asit Bakterilerinin Hücre-Yüzey Hidrofobisitesi

Laktik asit bakterilerinin n-hekzadekan, etil asetat ve kloroform çözücülerine hidrofobisite oranlarının n-hekzadekan karşı, en düşük oran ise etil asetata karşı olduğu görülmüştür (Şekil 3.15). Etil asetatta en düşük oran (%22,69) MRSC7.3; en yüksek oran (%106,3) LAB1.4.B numaralı izolatta görülmüştür. LAB1.3.2.B, LAB1.2.A, LAB6.5.A, MRSC7.3 ve M176.1.2 numaralı izolatlar kloroformda, kalan tüm izolatlar ise n-hekzadekanda yüksek hidrofobisite göstermiştir. Kloroformda en düşük oran (%15,99) MRSA2.2, n-hekzadekanda ise (%96,67) LAB1.3.2.B izolatında görülmüştür.



Şekil 3.16. Laktik asit bakterilerinin n-hekzadekan, etil asetat ve kloroform çözücülerine hidrofobisitesi

### 3.8. Laktik Asit Bakterilerinin Enzim Aktivitesi

Laktik asit bakterilerinin enzim aktiviteleri API ZYM (Biomerieux) ile belirlenmiştir. İzolatların hiçbirinde  $\beta$ -glukuronidaz ve  $\alpha$ -mannosidaz enzim aktivitesi gözlenmemiştir. Lösin, valin arilamidaz ve naphthol-AS-BI fosfohidrolaz enzim aktivitesinin izolatların tamamında değişen seviyelerde bulunduğu görülmüştür. N-asetil- $\beta$ -glukozaminidaz aktivitesinin sadece 3 izolatta (LAB 1.4.A, MRS Ç6.1, MRS Ç6.2); tripsin aktivitesinin ise LAB 1.4.B izolatında en düşük seviyede olduğu görülmektedir (Tablo 3.9).





**Tablo 3.9.** *Laktik asit bakterilerinin API ZYM ile belirlenen enzim aktiviteleri*

	MRS Ç6.1	MRS Ç7.2	LAB 1.3.2.B	MRS Ç6.2	LAB 3.2.A	ÇA 1.4b)	LAB NO:3B	MRS Ç8.1	LAB 1.3.B	LAB 1.1.A	LAB 1.5.1.A	LAB 1.2.B
<b>Alkalin fosfataz</b>	1	-	1	1	1	3	-	-	2	1	1	1
<b>Esteraz</b>	-	3	2	-	1	3	2	4	2	3	1	2
<b>Esteraz lipaz</b>	1	3	3	1	2	3	4	4	3	2	2	3
<b>Lipaz</b>	-	-	3	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<b>Lösin arilamidaz</b>	5	4	5	5	4	4	5	5	4	4	5	5
<b>Valin arilamidaz</b>	5	3	5	4	4	5	5	3	4	4	5	5
<b>Sistein arilamidaz</b>	3	3	1	3	3	2	4	2	3	2	2	2
<b>Tripsin</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math> -kimotripsin</b>	-	-	-	-	2	-	1	-	-	1	1	1
<b>Asit fosfataz</b>	5	3	4	4	4	4	5	4	3	5	4	4
<b>Napthol-AS-BI fosfohidrolaz</b>	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4
<b><math>\alpha</math> -galaktosidaz</b>	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-
<b><math>\beta</math> -galaktosidaz</b>	4	5	2	4	4	2	4	5	4	4	4	4
<b><math>\beta</math> -glukuronidaz</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math> -glukosidaz</b>	5	3	3	5	4	2	3	5	4	4	4	4
<b><math>\beta</math> -glukosidaz</b>	5	-	4	5	4	2	3	-	5	4	5	5
<b>N-asetil- <math>\beta</math> -glukozaminidaz</b>	5	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math> -mannosidaz</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math> -fukosidaz</b>	-	-	3	-	4	2	3	-	5	4	4	4

**Tablo 3.9. (Devam)** *Laktik asit bakterilerinin API ZYM ile belirlenen enzim aktiviteleri*

	LAB	LAB	LAB	MRS	MRS	LAB	MİT	LAB	LAB	LAB	LAB	LAB
	1.3.1.B	3.2.B	1.5.1.B	Ç7.1	Ç8.3	11.1.A	Ç7.2.2	1.2.A	1.1.B	6.2.A	1.3.1.B	3.2.B
<b>Alkalin fosfataz</b>	1	-	1	1	-	2	-	1	1	-	1	-
<b>Esteraz</b>	2	3	4	1	-	2	3	5	2	2	2	3
<b>Esteraz lipaz</b>	3	3	4	1	-	3	1	5	1	1	3	3
<b>Lipaz</b>	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<b>Lösin arilamidaz</b>	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>Valin arilamidaz</b>	5	5	5	1	2	5	4	5	5	5	5	5
<b>Sistein arilamidaz</b>	3	2	3	2	3	4	-	3	3	4	3	2
<b>Tripsin</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math> -kimotripsin</b>	1	1	-	-	-	3	-	-	3	1	1	1
<b>Asit fosfataz</b>	4	2	2	4	3	4	4	2	4	1	4	2
<b>Napthol-AS-BI fosfohidrolaz</b>	2	4	3	3	3	5	1	3	4	1	2	4
<b><math>\alpha</math> -galaktosidaz</b>	-	-	-	5	5	-	3	-	-	-	-	-
<b><math>\beta</math> -galaktosidaz</b>	4	3	5	5	5	4	5	3	4	4	4	3
<b><math>\beta</math> -glukuronidaz</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math> -glukosidaz</b>	4	4	5	4	5	4	-	1	5	4	4	4
<b><math>\beta</math> -glukosidaz</b>	5	5	5	-	-	5	5	4	5	-	5	5
<b>N-asetil- <math>\beta</math> -glukozaminidaz</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math> -mannosidaz</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math> -fukosidaz</b>	4	4	3	-	-	4	-	4	4	-	4	4

**Tablo 3.9 (Devam)** *Laktik asit bakterilerinin API ZYM ile belirlenen enzim aktiviteri*

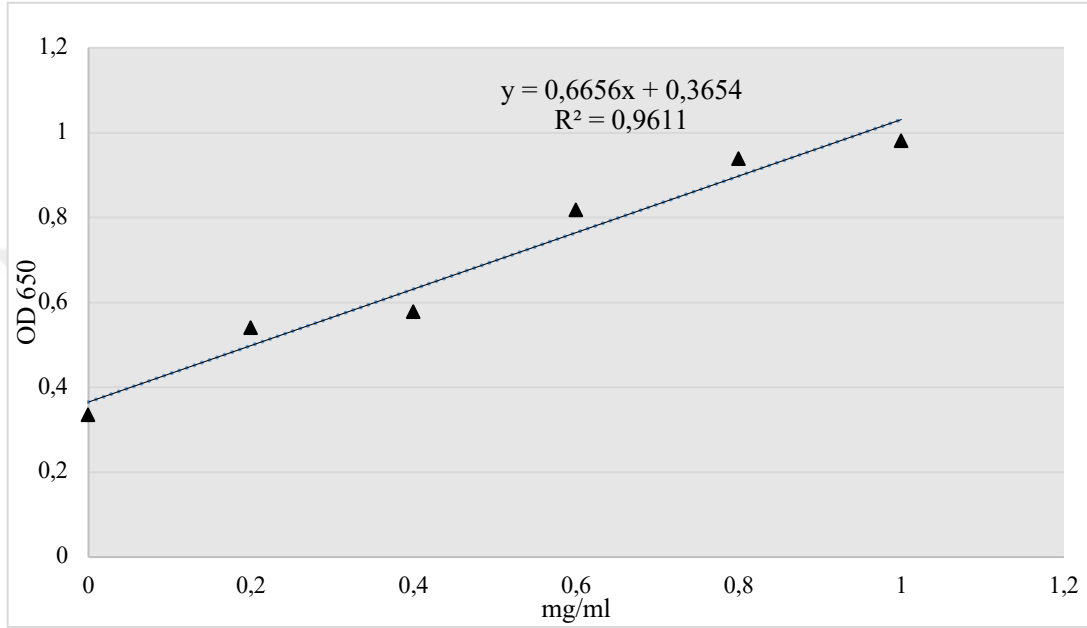
	LAB 1.3.A	LAB 7.7	LAB 6.3.A	LAB 6.3.B	LAB 6.1.A	MİT Ç8.1.A	LAB NO:3A	LAB 6.1.B	LAB 1.3.1.A	MRS A3.2	MRS Ç7.3	MRS A3.1
<b>Alkalin fosfataz</b>	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	-	2
<b>Esteraz</b>	2	-	2	2	3	-	2	3	2	2	1	1
<b>Esteraz lipaz</b>	3	-	2	2	3	1	3	3	3	3	2	4
<b>Lipaz</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>Lösin arilamidaz</b>	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	4	5
<b>Valin arilamidaz</b>	5	5	5	2	5	-	5	5	5	5	1	5
<b>Sistein arilamidaz</b>	2	1	2	1	3	-	2	2	3	4	-	4
<b>Tripsin</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math> -kimotripsin</b>	1	-	1	-	1	-	1	1	1	1	-	-
<b>Asit fosfataz</b>	3	-	4	3	4	3	4	4	3	4	1	4
<b>Napthol-AS-BI fosfohidrolaz</b>	4	1	2	1	2	1	4	3	4	5	1	5
<b><math>\alpha</math> -galaktosidaz</b>	-	-	-	3	1	1	-	-	-	-	4	-
<b><math>\beta</math> -galaktosidaz</b>	3	5	5	5	5	1	3	5	4	4	5	4
<b><math>\beta</math> -glukuronidaz</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math> -glukosidaz</b>	2	1	2	-	2	-	2	3	2	3	4	4
<b><math>\beta</math> -glukosidaz</b>	4	-	2	4	1	-	4	2	4	5	-	5
<b>N-asetil-<math>\beta</math>-glukozaminidaz</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math> -mannosidaz</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math> -fukosidaz</b>	3	-	1	-	-	-	3	-	4	5	-	5

**Tablo 3.9 (Devam)** *Laktik asit bakterilerinin API ZYM ile belirlenen enzim aktiviteri*

	LAB	MRS	MRS	LAB	LAB	MİT	BHI	M17	4.1.Y	LAB	LAB	MRS
	6.5.A	A2.1	A2.2	1.4.B	1.4.A	Ç8.1.B)	Ç7.4	6.1.2		6.2.B	6.5.A	A2.1
<b>Alkalin fosfataz</b>	-	1	-	1	3	1	-	-	1	-	-	1
<b>Esteraz</b>	1	2	3	4	2	2	1	4	2	3	1	2
<b>Esteraz lipaz</b>	1	4	4	4	4	4	1	2	3	3	1	4
<b>Lipaz</b>	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<b>Lösin arilamidaz</b>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>Valin arilamidaz</b>	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5
<b>Sistein arilamidaz</b>	3	4	4	4	4	4	-	3	3	3	3	4
<b>Tripsin</b>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math> -kimotripsin</b>	-	-	-	2	1	-	-	1	-	2	-	-
<b>Asit fosfataz</b>	4	4	4	4	4	3	4	3	3	5	4	4
<b>Napthol-AS-BI fosfohidrolaz</b>	4	4	4	5	5	3	2	4	3	3	4	4
<b><math>\alpha</math> -galaktosidaz</b>	-	-	-	-	-	3	3	-	4	-	-	-
<b><math>\beta</math> -galaktosidaz</b>	5	4	3	5	4	5	4	2	-	5	5	4
<b><math>\beta</math> -glukuronidaz</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math> -glukosidaz</b>	4	4	3	4	5	1	-	2	4	1	4	4
<b><math>\beta</math> -glukosidaz</b>	1	5	5	5	5	5	5	3	5	-	1	5
<b>N-asetil- <math>\beta</math> -glukozaminidaz</b>	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math> -mannosidaz</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math> -fukosidaz</b>	-	5	5	5	4	-	-	1	4	-	-	5

### 3.9. Laktik Asit Bakterilerinin Proteolitik Aktivitesi

Laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivite değerleri oluşturulan standart eğri ile belirlenmiştir (şekil 3.17). Buna göre en düşük aktivite 0,035 mg/ml LAB6.1.A izolatına, en yüksek aktivite ise 0,665 mg/ml LAB1.2.A izolatına aittir (Tablo 3.10).



Şekil 3.17. Proteolitik aktivite standart eğrisi

Tablo 3.10. Laktik asit bakterilerinin proteolitik aktivitesi (tirozin mg/ml)

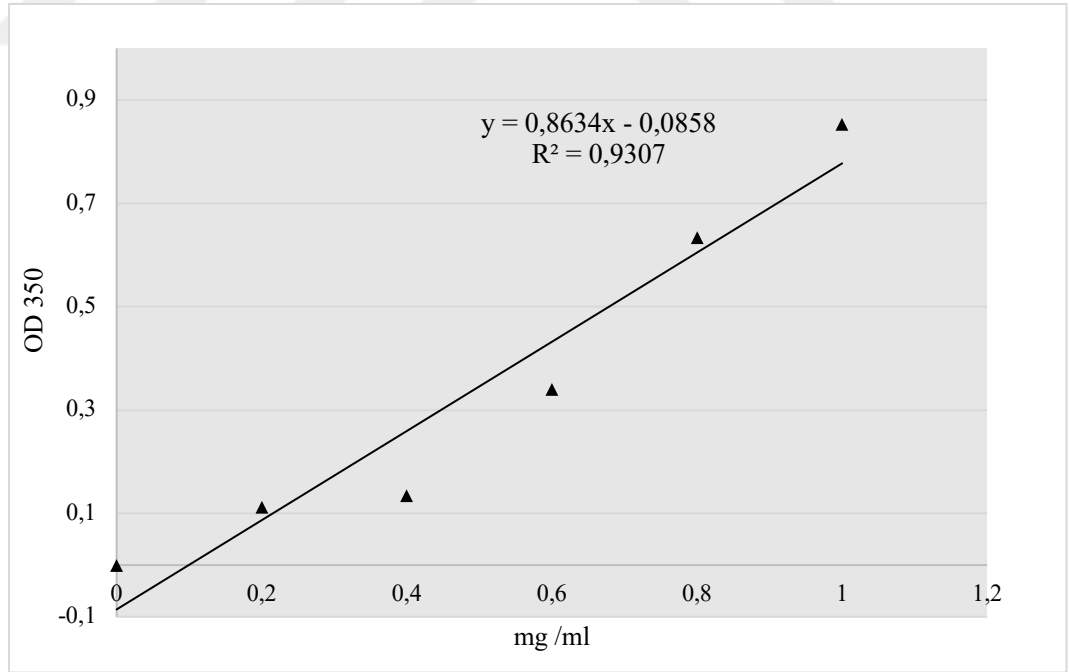
İzolat no	Proteolitik aktivite	İzolat no	Proteolitik aktivite
ÇA 1.4.b	0,300±0,013	LAB 1.1.B	0,405±0,019
MRS Ç8.1	0,207±0,009	LAB 1.3.1.A	0,400±0,001
LAB 1.3.A	0,335±0,006	LAB 1.5.1.A	0,345±0,002
LAB 11.1.A	0,475±0,015	MRS Ç7.2	0,238±0,009
LAB 1.5.1.B	0,499±0,008	MRS C6.1	0,491±0,009
LAB 1.4.B	0,127±0,010	MRS A3.2	0,481±0,000
LAB 6.3.B	0,191±0,008	Mit Ç8.1.a	0,190±0,010
LAB NO:3A	0,201±0,004	MRS A3.1	0,353±0,008
LAB 1.1.A	0,202±0,004	MRS Ç7.3	0,230±0,011
MİT Ç8.1.B	0,082±0,006	MRS A2.2	0,476±0,008
LAB NO:3B	0,170±0,008	Mit Ç7.2.2	0,085±0,002
MRS A2.1	0,231±0,006	LAB 6.1.A	0,035±0,012
LAB 6.2.A	0,216±0,007	MRS Ç8.3	0,056±0,006
M17 6.1.2	0,399±0,005	MRS Ç7.1	0,216±0,005

**Tablo 3.10.** (Devam) *Laktik asit bakterinin proteolitik aktivitesi ( tirozin mg/ml)*

İzolat no	Proteolitik aktivite	İzolat no	Proteolitik aktivite
LAB 3.2.B	0,267±0,00	LAB 1.2.B	0,582±0,001
LAB 1.4.A	0,270±0,001	LAB 6.3.A	0,575±0,006
LAB 6.5.A	0,476±0,005	LAB 1.3.B	0,642±0,001
LAB 6.1.B	0,568±0,000	LAB 7.7	0,514±0,009
LAB 6.2.B	0,404±0,013	LAB 1.3.2.B	0,695±0,006
LAB 1.3.1.B	0,492±0,008	BHI Ç7.4	0,399±0,012
4.1.Y	0,552±0,004	LAB 3.2.A	0,127±0,005
LAB 1.2.A	0,665±0,022	MRS Ç6.2	0,054±0,001

### 3.10. Laktik Asit Bakterilerinin Hidrojen Peroksit Üretimi

Laktik asit bakterilerinin hidrojen peroksit üretim miktarları oluşturulan standart eğri ile belirlenmiştir (Şekil 3.18). Buna göre en düşük hidrojen peroksit üretimi 0,056 mg/ml MitC8.1.a izolatına; en yüksek üretim miktarı ise 0,961 mg/ml MRSC7.1 izolatına aittir (Tablo 3.11).



**Şekil 3.18.** *Hidrojen peroksit standart eğrisi*

**Tablo 3.11.** *Laktik asit bakterilerinin hidrojen peroksit üretim miktarı (mg/ml)*

<b>İzolat no</b>	<b>Hidrojen peroksit</b>	<b>İzolat no</b>	<b>Hidrojen peroksit</b>
ÇA 1.4.b	0,522±0,004	LAB 1.1.B	0,223±0,006
MRS Ç8.1	0,362±0,009	LAB 1.3.1.A	0,455±0,001
LAB 1.3.A	0,494±0,004	LAB 1.5.1.A	0,339±0,004
LAB 11.1.A	0,184±0,004	MRS Ç7.2	0,542±0,006
LAB 1.5.1.B	0,158±0,003	MRS C6.1	0,519±0,009
LAB 1.4.B	0,315±0,005	MRS A3.2	0,464±0,007
LAB 6.3.B	0,355±0,006	Mit Ç8.1.a	0,056±0,010
LAB NO:3A	0,181±0,002	MRS A3.1	0,269±0,002
LAB 1.1.A	0,180±0,002	MRS Ç7.3	0,569±0,007
MİT Ç8.1.B	0,270±0,001	MRS A2.2	0,135±0,005
LAB NO:3B	0,328±0,003	Mit Ç7.2.2	0,116±0,004
MRS A2.1	0,260±0,001	LAB 6.1.A	0,250±0,006
LAB 6.2.A	0,323±0,007	MRS Ç8.3	0,572±0,001
M17 6.1.2	0,176±0,006	MRS Ç7.1	0,961±0,000
LAB 3.2.B	0,105±0,004	LAB 1.2.B	0,167±0,005
LAB 1.4.A	0,272±0,007	LAB 6.3.A	0,361±0,001
LAB 6.5.A	0,299±0,005	LAB 1.3.B	0,341±0,003
LAB 6.1.B	0,150±0,003	LAB 7.7	0,360±0,006
LAB 6.2.B	0,268±0,002	LAB 1.3.2.B	0,263±0,006
LAB 1.3.1.B	0,290±0,002	BHI Ç7.4	0,399±0,012
4.1.Y	0,417±0,010	LAB 3.2.A	0,279±0,002
LAB 1.2.A	0,423±0,007	MRS Ç6.2	0,446±0,005

### 3.11. Laktik Asit Bakterilerinin Laktik Asit Üretimi

Laktik asit bakterilerinin laktik asit üretim miktarı titrasyon yöntemi ile belirlenmiştir. En düşük laktik asit üretim yüzdesi %0,306 MRSC7.1 izolatına; en yüksek üretim yüzdesi ise %1,062 LAB6.3.A izolatına aittir (Tablo 3.12).

**Tablo 3.12.** Laktik asit bakterilerinin laktik asit üretim miktarı (%)

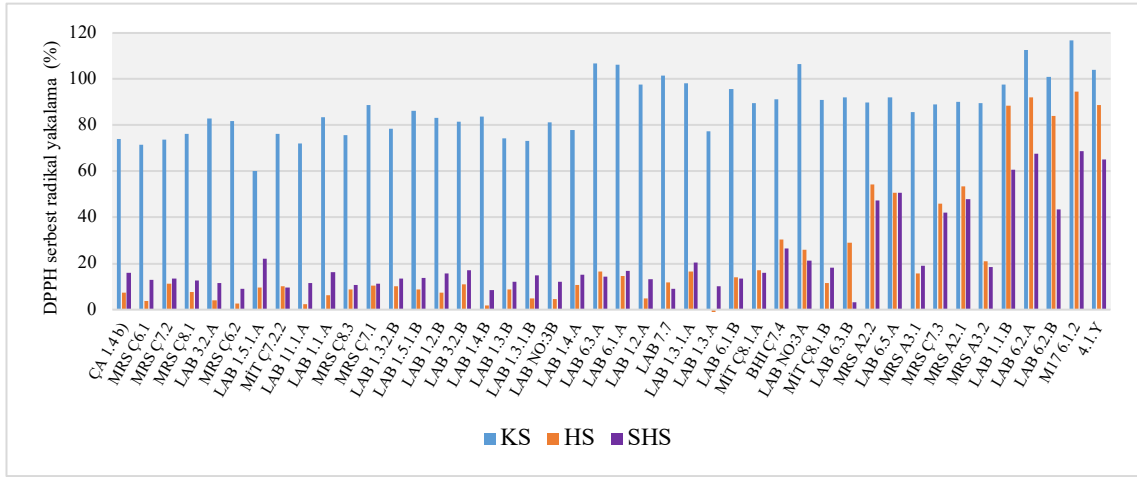
İzolat no	Üretim miktarı	İzolat no	Üretim miktarı
ÇA1.4 b)	0,666±0,025	LAB1.3.1.B	0,382±0,002
MRŞÇ6.1	0,414±0,000	LABNO:3B	0,522±0,000
MRŞÇ7.2	0,342±0,010	LAB1.4.A	0,472±0,000
MRŞÇ8.1	0,342±0,012	LAB6.3.A	1,062±0,000
LAB3.2.A	0,63±0,017	LAB6.1.A	0,99±0,014
MRŞÇ6.2	0,486±0,012	LAB1.2.A	0,63±0,007
LAB1.5.1.A	0,45±0,011	LAB7.7	0,828±0,001
MİTÇ7.2.2	0,63±0,008	LAB1.3.1.A	0,576±0,004
LAB11.1.A	0,81±0,007	LAB1.3.A	0,468±0,001
LAB1.1.A	0,522±0,001	LAB6.1.B	0,954±0,004
MRŞÇ8.3	0,324±0,001	MİTÇ8.1.A	0,468±0,003
MRŞÇ7.1	0,306±0,002	BHIÇ7.4	0,45±0,008
LAB1.3.2.B	0,675±0,006	LABNO:3A	0,918±0,001
LAB1.5.1.B	0,742±0,007	MİTÇ8.1.B	0,738±0,001
LAB1.2.B	0,576±0,006	LAB6.3.B	0,855±0,002
LAB3.2.B	0,522±0,002	MRSA2.2	0,558±0,001
LAB1.4.B	0,702±0,007	LAB6.5.A	0,846±0,010
LAB1.3.B	0,504±0,005	MRSA3.1	0,468±0,001
MRŞÇ7.3	0,432±0,003	M176.1.2	0,648±0,004
MRSA2.1	0,54±0,016	4.1.Y	0,63±0,009
MRSA3.2	0,54±0,009	LAB6.2.A	0,72±0,007
LAB1.1.B	0,702±0,002	LAB6.2.B	0,9±0,064



### 3.12. Laktik Asit Bakterilerinin Antioksidan Aktivitesi

#### 3.12.1. DPPH serbest radikali yakalama aktivitesi

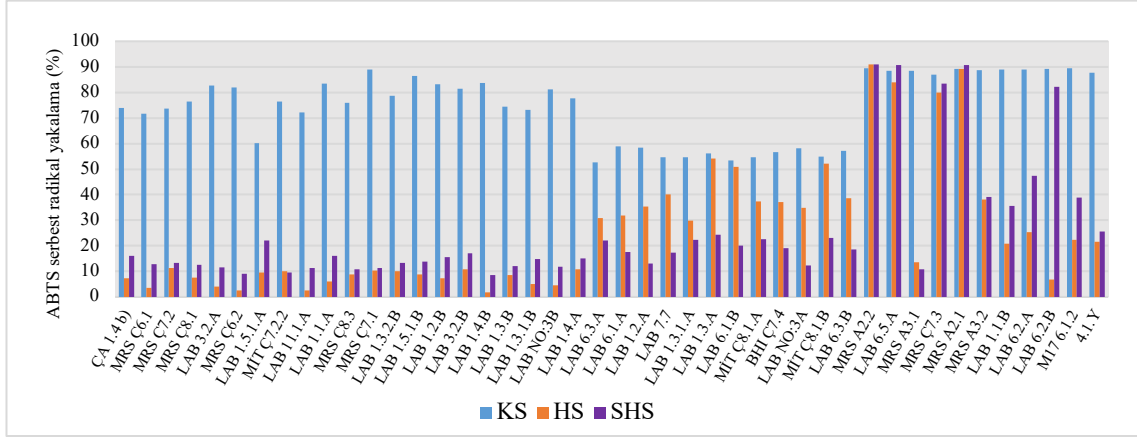
Laktik asit bakterilerinin DPPH serbest radikali yakalama aktivitesinin kültür süpernatantında (KS) en yüksek değerlerde olduğu görülmüştür. KS aktivitesi en düşük olan (%60,09) izolat LAB 1.5.1.A numaralı izolatdır. En yüksek KS aktivitesi (%116,70) gösteren ise M17 6.1.2'dir. HS aktivitesi en düşük (%1,81) izolat LAB 1.4.B; en yüksek izolat (%92,14) MRS A2.2'dir. SHS aktivitesi en düşük izolat (%8,60) LAB 1.4.B; en yüksek aktivite (%68,65) gösteren ise M17 6.1.2 nolu izolat olmuştur (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. Laktik asit bakterilerinin DPPH serbest radikali yakalama yüzdesi. KS: kültür süpernatantı, HS: hücre süspansiyonu, SHS: sonike edilmiş hücre süspansiyonu

#### 3.12.2. ABTS<sup>+</sup> serbest radikal yakalama aktivitesi

LAB izolatlarının ABTS<sup>+</sup> serbest radikali yakalama aktivitesinin kültür süpernatantında (KS) en yüksek değerlerde olduğu görülmüştür. KS aktivitesi en düşük olan (%52,58) izolat LAB 6.3.A numaralı izolatdır. En yüksek KS aktivitesi (%89,41) gösteren ise M17 6.1.2'dir. HS aktivitesi en düşük (%1,81) izolat LAB 1.4.B; en yüksek izolat (%91) MRS A2.2'dir. SHS aktivitesi en düşük izolat (%8,60) LAB 1.4.B; en yüksek aktivite (%90,93) gösteren ise MRS A2.2 olmuştur (Şekil 3.20).



Şekil 3.20. Laktik asit bakterilerinin ABTS<sup>+</sup> serbest radikali yakalama yüzdesi. KS: kültür süpernatantı, HS: hücre süspansiyonu, SHS: sonike edilmiş hücre süspansiyonu

### 3.13. Hemolitik aktivite

İnkübasyon sonunda laktik asit bakterilerinin kolonileri çevresinde zon oluşumu gözlenmemiştir. Tüm laktik asit bakterileri  $\gamma$ -hemolitik olarak değerlendirilmiştir.

### 3.14. Laktik Asit Bakterilerinin Süpernatantlarının Antibakteriyal ve Antifungal Aktiviteleri

Laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının seçilen izolatlar karşı antibakteriyal ve antifungal aktiviteleri kuyucuk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Seçilen patojen izolatlar: *Staphylococcus epidermidis* BHIC1.2, *Streptococcus salivarius* M17A1.2, *Streptococcus parasanguinis* LAB8.2.B, *Staphylococcus aureus* KA5.1, *Rothia dentocariosa* KAA7.2, *Neisseria flavescens* KAA1.1.2, *Bacillus subtilis* M176.2(2), *Staphylococcus warneri* M1714.1, *Streptococcus mutans* M173.1, *Neisseria perflava* BHIA7.a, *Enterococcus faecium* M179.2.1, *Corynebacterium argenteratense* KA4.1(2), *Candida albicans* MRSA4.1, *Candida tropicalis* BHIC8.2.1, *Cryptococcus laurentii* MRSA4.2, *Candida norvegensis* MitA5.2 numaralı izolatlardır. İnkübasyon sonunda inhibisyon zonu görülmemiştir.

### 3.15. Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Laktik asit bakterilerinin 19 farklı antibiyotik için duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları birbirinden farklılık göstermesine rağmen tamamının kanamisin, linezoid, tetrasiklin, sefalotin, ampisilin, eritromisin, klindamisin ve imipeneme duyarlı olduğu görülmüştür. En az duyarlı oldukları antibiyotikler ise kanamisin, vankomisin ve sülfometoksazol+trimethoprim olmuştur (Tablo 3.13). Şekil 3.21’de disklerin LAB1.3.1.A izolatında, Şekil 3.22’de LAB6.3.A izolatlarında oluşturdukları inhibisyon zonları gösterilmiştir.

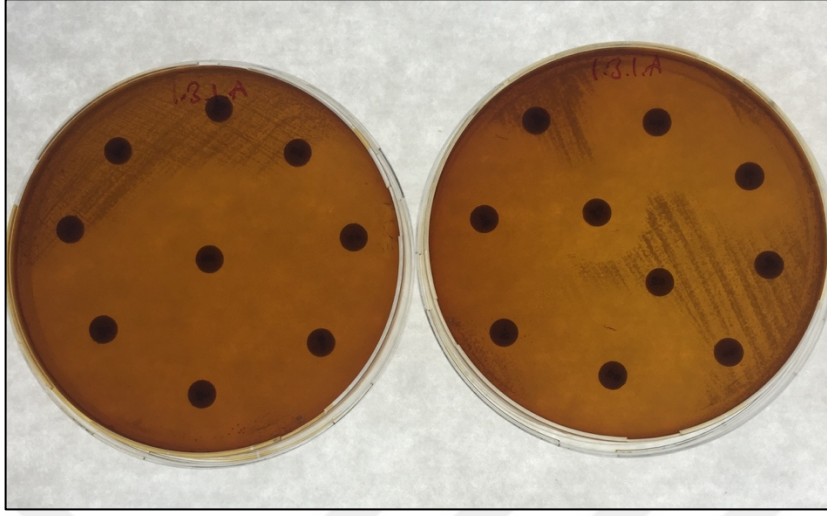
Laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının antibakteriyal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan patojen bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları Tablo 3.14’te verilmiştir. Buna göre tüm bakteriler farklı seviyelerde sülfometoksazol+trimethoprim, penisilin, kloramfenikol, linezoid, tetrasiklin, cephalothin, ampisilin, eritromisin, klindamisin, vankomisin ve imipeneme duyarlılık göstermiştir.

**Tablo 3.13.** Laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları (zon çapı, mm) \* azalan üreme, R: dirençli

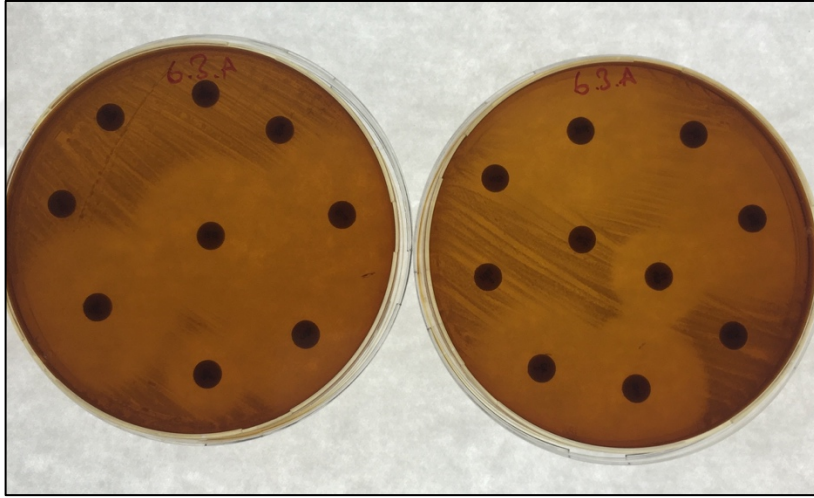
	SXT 25	AK 30	P 10	C 30	ME 5	LNZ 30	K 30	NET 30	TE 30	S 10	KF 30	OX 1	AM 10	CN 10	E 15	DA 2	MET 5	VA 30	IPM 10
<b>LAB 1.4.B</b>	R	10	R	25	R	25	R	15	25	20	22	R	15	15	36	30	R	R	24
<b>LAB 1.3.A</b>	R	15	R	18	R	30	10	20	25	12	18	R	16	R	30	28	R	8	34
<b>MRS A3.2</b>	R	14	R	24	R	28	R	18	28	16	26	10	25	10	30	30	R	R	17
<b>MRS Ç6.2</b>	16	9	R	21	R	26	R	15	16	12	13	10	10	18	34	16	R	R	42
<b>LAB 6.5.A</b>	R	R	11	26	R	27	R	R	25	10	20	R	12	15	24	34	R	R	30
<b>MİTÇ8.1b)</b>	R	10	20	30	R	30	R	R	24	21	29	R	16	30	30	36	R	10	36
<b>MRS A2.1</b>	R	R	27,5	33	16	37	R	9	32	9	20	R	34	R	32	21	R	R	22,5
<b>MRS Ç6.1</b>	18	R	18	28	R	31	R	12	20	8	20	14	32	11	30	13	12	R	25
<b>MRS Ç7.2</b>	18	22	R	40	R	35	16	27	35	25	10	10	12	25,5	17	20	R	R	25
<b>MRS Ç8.3</b>	R	R	25	31	R	36	R	R	26	R	31	9,5	23,5	R	26	31	R	R	35
<b>MRS Ç7.3</b>	15	24	R	37	R	40	17	27	37	29	13	10,5	18	26	26	28	R	R	45
<b>MRS A3.1</b>	R	22	26	26	14	26	16	22	40	26	26	R	36	20	30	20	R	R	24
<b>MRS Ç7.1</b>	17,5	R	R	34	R	33,5	R	18	28	R	16	R	16,5	9	35	36	R	R	32
<b>LAB 1.1.B</b>	R	R	35	28	20	32	R	R	34	R	35	10	32	R	36	26	R	R	21
<b>M17 6.1.2</b>	R	R	14	33	R	32	R	9	34	14	30	R	21	10*	42	24	R	R	23*
<b>LAB1.3.1.B</b>	R	R	30	20	17	28	R	R	34	R	32	12	35	R	34	25	R	R	22
<b>LAB 6.1.B</b>	R	R	28	30	16	34	R	R	32	R	32	R	35	R	36	34	R	R	22
<b>LAB 1.2.A</b>	R	R	36	20	23	20	R	R	34	9	30	12	36	R	33	34	R	R	22
<b>LAB 3.2.A</b>	R	R	34	30	22	36	R	R	35	8	32	12	38	R	32	20	R	R	23
<b>ÇA 1.4 B)</b>	15*	10*	10	24	R	25	R	13	25	14	18	R	11	13	36	26	R	R	26
<b>LAB 1.4.A</b>	R	R	24	22	22	34	R	R	34	R	32	10	35	R	32	30	R	R	20
<b>LABNO:3B</b>	R	R	11	32	R	30	R	8	34	21	27	R	22	20	30	24	R	R	24

**Tablo 3.13. (Devam)** *Laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları (zon çapı, mm) \* azalan üreme, R: dirençli*

	SXT 25	AK 30	P 10	C 30	ME 5	LNZ 30	K 30	NET 30	TE 30	S 10	KF 30	OX 1	AM 10	CN 10	E 15	DA 2	MET 5	VA 30	IPM 10
LAB 1.3.2.B	R	R	36	25	20	24	R	R	35	R	30	12	35	R	30	24	12	R	25
LAB NO:3A	R	R	36	28	22	35	R	R	36	8	32	12	30	R	28	20	R	R	20
LAB 6.3.B	R	R	32	30	18	35	R	R	32	R	32	9	35	R	32	32	R	R	23
MİT Ç7.2.2	15	R	20	26	R	28	R	14	23	8	30	R	25	10	25	30	R	R	35
BHI Ç7.4	13*	10	20	30	R	27	R	15	24	R	32	10	23	9	24	30	R	R	35
MRS A2.2	R	R	12	20	8	25	R	11	29	16	30	R	17	R	22	16	R	R	21
LAB 6.2.A	R	R	32	28	15,5	32	R	R	30	R	28	R	29	R	25	23	R	R	19
4.1.Y	R	R	36	26	12	32	R	10	38	18	40	11	22	10	42	20	R	R	26
LAB 3.2.B	R	R	30	28	20	30	R	R	34	R	29	10	32	R	31	21	R	R	23
LAB 7.7	R	R	32	30	15	32	R	R	32	R	24	R	30	R	25	28	R	R	17
LAB 6.1.A	R	R	31	32	19	36	R	R	35	R	29	R	33	R	30	26	R	R	20,5
LAB 6.3.A	R	R	31	30	16	35	R	R	32	R	32	R	32	R	30	28	R	R	21,5
LAB 1.1.A	R	R	32	30	20	36	R	R	32	R	30	13	34	R	30	23	R	9	22
LAB 1.5.1.B	R	R	32	24	11	32	R	R	32	R	32	12	33	R	30	30	R	R	24
LAB 1.2.B	R	R	20	34	18	36	R	R	30	10	29	R	31	R	30	20	R	R	20
LAB 1.5.1.A	R	R	40	27	15	40	R	R	40	R	34	14	36	R	32	30	R	R	24
LAB 1.3.1.A	R	R	26	32	22	38	R	R	38	R	34	R	40	R	32	24	R	R	22
LAB 1.3.B	R	R	21	29	11	32	R	11	32	10	36	20	40	R	32	20	R	R	25
MRS Ç8.1	13	R	16	30	R	31	R	12	25	10	30	R	21	10	29	22	R	R	35
MİT Ç8.1 a)	16*	R	15	38	R	34	R	10	34	R	32	R	16	R	24	29	R	R	32
LAB 11.1.A	R	R	19	32	11	40	R	R	32	R	32	R	18	R	32	26	R	R	21
LAB 6.2.B	R	R	R	34	R	35	R	R	32	9	32	R	16	R	36	32	R	R	21



**Şekil 3.21.** Antibiyotik disklerinin LAB1.3.1.A izolatında oluşturdukları inhibisyon zonları



**Şekil 3.22.** Antibiyotik disklerinin LAB6.3.A izolatında oluşturdukları inhibisyon zonları

**Tablo 3.14.** *Patojen olarak kullanılan bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları (zon çapı, mm), R: dirençli*

	<b>SXT 25</b>	<b>AK 30</b>	<b>P 10</b>	<b>C 30</b>	<b>ME 5</b>	<b>LNZ 30</b>	<b>K 30</b>	<b>NET 30</b>	<b>TE 30</b>	<b>S 10</b>	<b>KF 30</b>	<b>OX 1</b>	<b>AM 10</b>	<b>CN 10</b>	<b>E 15</b>	<b>DA 2</b>	<b>MET 5</b>	<b>VA 30</b>	<b>IPM 10</b>
<b>BHIC1.2</b>	17	11	13	24	15	31	10,5	18	33	8	35	21	22	19	26	22	R	24	20
<b>M17A1.2</b>	21	9	22	26	15	32	8	11	35	16	26	14	29	14	28	28	R	25	26
<b>LAB8.2.B</b>	15	R	11	21	R	30	R	R	21	R	15	R	23	R	11	10	R	24	20,5
<b>KA5.1</b>	25	16	15	18,5	20	28	15	18	25	12	9,5	21	17,5	9	10	10	R	19	22
<b>KAA7.2</b>	12	R	12,5	23,5	R	26	R	R	29	R	15	R	20,5	R	10	10	R	23	20,5
<b>KAA1.1.2</b>	25	15,5	12	20	18,5	21,5	15	19	28	13	31	25	16	16	17	14,5	18	15	26
<b>M176.2(2)</b>	35	23	26	31	29	35	22	25	26	16	20	16	30	22	38	10	8	26	21
<b>M1714.1</b>	12	R	10	19	R	23	17	24	24	R	14	R	19	R	10	9	R	22	19
<b>M173.1</b>	13	R	10	20	R	20	R	R	22,5	R	16	R	21	R	10	11	R	22,5	20
<b>M179.2.1</b>	21	R	22	26	15	32	8	11	35	16	26	14	29	14	28	28	R	25	26
<b>KA4.1(2)</b>	12	R	12	23	R	27	R	R	29	R	16	R	20,5	R	10	10	R	23	20,5
<b>BHIA7.A</b>	25	16	12	20	19	21,5	15	19	28	13	31	25	16	16	17	14	18	15	20

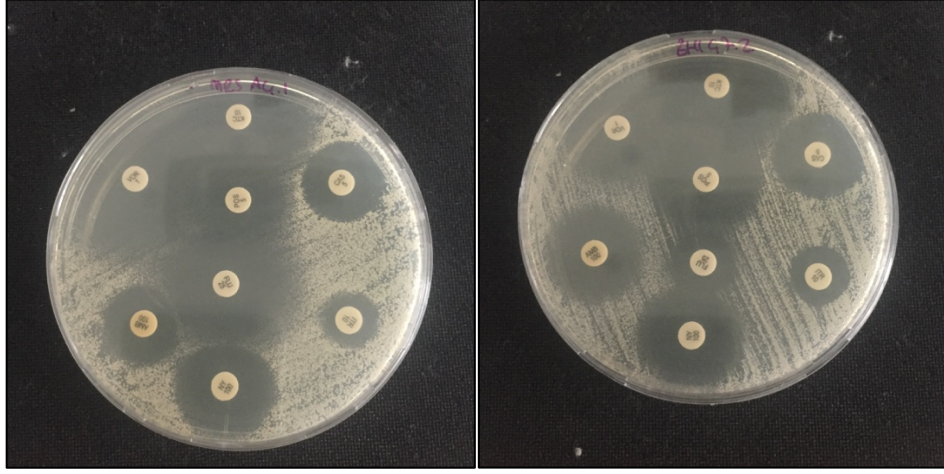
### 3.16. Mayaların Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Maya izolatlarının 8 farklı antifungale karşı duyarlılıkları incelenmiştir. Bunun sonucunda tüm izolatların farklı seviyelerde tüm antifungallere karşı duyarlı oldukları görülmüştür. Maya izolatlarının en duyarlı olduğu antifungal ketoconazole, en az duyarlı oldukları ise itraconazole olmuştur (Tablo 3.15). Şekil 3.23'te disklerin MRSA4.1 ve BHIÇ7.2 izolatlarında oluşturdukları inhibisyon zonları gösterilmiştir.

**Tablo 3.15.** Maya izolatlarının antifungal duyarlılıkları (zon çapı, mm)

	KTC 10	CAS 5	ITR 10	NY 100	AMB 100	VOR 1	POS 5	FLU 25
NA 9.3 b)	30	25	14	24	25	28	29	24
M 5.1 a)	33	22	16	23	23	24	28	15
M 5.1 b)	33	23	19	23	22	22	31	17
M 9.1 b)	33	20	18	26	20	34	31	27
M 9.1a)	35	21	15	23	18	35	27	30
BHI Ç7.2	30,5	21	14	23,5	19,5	22	22	15,5
MRS A4.1	26,5	18,5	12,5	21	13,5	29	16,5	23
MRS A4.2	29	19	10,5	21	16	25	18	21,5
Mit A5.2	25	20	6,5	26	18,5	27	24	15,5
Mit A5.1	23,5	21	10	26,5	20	28,5	20,5	18
BHI Ç8.2	26,5	20	14,5	22	16,5	24,5	19,5	22,5
Mit Ç8.2	29,5	19,5	13	18	17,5	30	20	25
BHI Ç8.2.1	29	19,5	13	20,5	17	27,5	19,5	24,5
L 9.5.A	32	23	10	30	26	31,5	26,5	24,5
L 9.6.1	27	23	9	24	28	29	28	18
L 9.6.A.1	31	24	11	26	27	26,5	25	21
L 9.1.A	31	21	9	24	26	26	26	20
9.3.A	30	26	12	26	25	27	25	21
9.6.2	32	23	11	23	28,5	26	25	20
9.1.B	34	24	10	25	26	28	23	21
9.6.A	30	22	10	24	23	27	25	20
M17 Ç1.1	25	20	10	26	13	30	20	18
PDA Ç8	30	21	10	26	17	30	17	22
NA 9.4 b)	25	25	15	20	25	30	28	24
Mit Ç7.2.1	30	20	12	25	18	27	18	17





Şekil 3.23. Antifungal disklerin oluşturdukları inhibisyon zonları (MRS A4.1 ve BHIC7.2)

### 3.17. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Belirlenmesi

#### 3.17.1. Kongo kırmızılı agar (CRA) yöntemi

Laktik asit bakterileri dışındaki diğer bakterilerin CRA yöntemi ile biyofilm oluşturma kapasiteleri incelenmiştir. Bakterilerin koloni renkleri derecelendirilmiş ve açık kırmızı koloni oluşturan bakteriler (-), en koyu renk olanlar ise (+++) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.24). Buna göre 35 izolat (-), 28 izolat (+), 34 izolat (++) ve 26 izolat (+++) bakteri olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.16).

Tablo 3.16. Bakterilerin CRA aktiviteleri

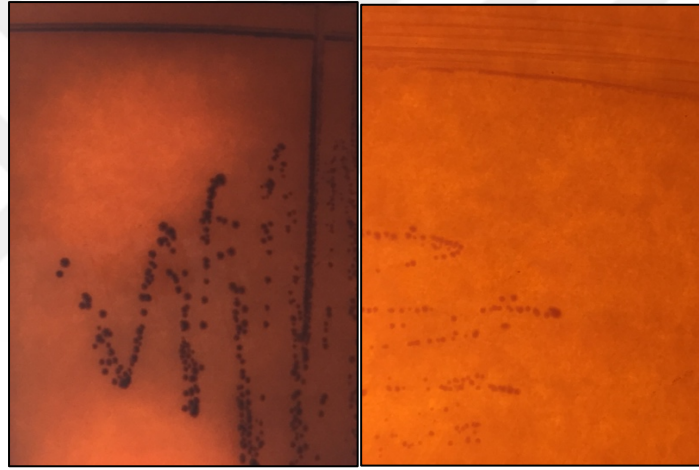
İzolat no	CRA	İzolat no	CRA
KA 6.1 (1)	+	M17 5.1 (1)	-
NA 2.2 a)	+	M17 6.2 (2)	+
KA 1.2 (2)	++	KA 8.1 (1)	-
NA 9.3 (A)	+	M17 6.1.3.1	+++
NA 2.2B)	+	M17 6.1.3	+++
LAB 13B	+++	M17 7	-
KA 2.3 (1)	++	M17 13	-
NA 5.1 B)	+++	M17 3.1	++
KA 4(1)	-	M17 3.2 (1)	++
12.3.1.1A	-	M17 1.1 (1)	-
NA 6.1	+	BHIC2.2	-
KA 2(1)	++	13.1.Y.1	-

**Tablo 3.16. (Devam).** *Bakterilerin CRA aktiviteleri*

<b>İzolat no</b>	<b>CRA</b>	<b>İzolat no</b>	<b>CRA</b>
M17 13.3	-	ÇA 3.6 a)	+
M17 14.1	+++	ÇA 1.2	++
ÇA 1.1	++	KAC1.2	++
BHI A7.2	-	KA 6	-
NA 12.3.2	+	KA 4.2 (3)	++
M17 12.1.4	++	MİT Ç4.2.1	+
M17 A2.1	++	KA 10.2.2 (1)	++
KA 7.2	++	KA 1.3 (1)	+
KA 6.1.1 alt	-	KA 4.1 (2)	++
M17C4.2.3	-	MİT Ç7.1	-
KA 9buyuk	++	MİT Ç7.2	+
NA 13 A)	++	KA 10.2.2 (2)	++
MİT Ç2.2	+++	M17 Ç4.2.2	+++
NA 12.3.1.1B)	+	BHI Ç1.4.2	+
KA 6.1 (2)	-	KA 8.1 (2)	-
KA 6.1.1ust	+	M17 A6.1	+++
NA 9.4 A)	+	NA 14	+++
KA A4.3	-	ÇA 3.2	+++
M17 9.2.1	-	BHI A1.1	-
BHIA7.1.1	-	BHIA1.5	-
KA 12.2	++	KA 2.3	-
ÇA 1.4 A)	-	KA A1.1.2	++
KA 5.2.1	-	M17 A2.2K	++
NA 12.1.1A)	+	BHI Ç1.3.3	+
M17 13.1.1	++	KA 4.4 (1)2.21	+
BHIA4.1	+++	MitA1.2	++
KA Ç5.2.1	+	KA 10küçük	++
M17 A2.2 ince	++	BHI A7.A	+++
NA 12.3	+	KA 7(1)	++
KA 10.1.2	+	NA 7.2	+++
KA 5.1	++	KA 10 büyük	+++
KA 10.1.1çizgi	+++	ÇA 3.3 a)	++
M17 1.2 (3)	+	KA Ç8.3.1	++
NA 12.1.1C	+	KA Ç5.2.2	++
ÇA 3.4B	+	KA Ç5.1	++
LAB12.1.2	++	KA Ç8.3.3	+++
LAB 8.2.B	+	BHI A1.2	++
NA 5.1 A)	+++	KA Ç4.1	+++
KA A2.1	+++	KA A.5.2	-
M1712.3.1.A	+++	KA Ç3.1	-

**Tablo 3.16. (Devam).** *Bakterilerin CRA aktiviteleri*

<b>İzolat no</b>	<b>CRA</b>	<b>İzolat no</b>	<b>CRA</b>
NA 7.3 C)	+++	BHI A8.1	+++
LAB 9.3.A	-	BHI A5.3	-
ÇA 5.1 A)	-	M17 A1.2	+++
KA 2(2)	++	M17 Ç4.1.1	+
BHIC3.3.2	+	M17 A2.2	++
NA 12.1.2	+	BHI A2.2	+++
NA 7.3 B)	-	MİT Ç3.3	+++
ÇA 5.1 B)	-	BHI Ç1.2	+++
NA 12.1.1 B)	+++	KAC6.1.b	-
M17 13.1 (1)	-		



**Şekil 3.24.** *CRA'da siyah renkli biyofilm pozitif (LAB13B) ve açık kırmızı renkli biyofilm negatif (KA8.1(1)) kolonilerin görüntüsü*

### **3.17.2. Mikrotitrasyon plak yöntemi**

Tüm bakterilerin farklı karbonhidrat kaynakları içeren besiyerinde biyofilm oluşturma kapasiteleri incelenmiştir. Tablo 3.17'de laktik asit bakterilerinin, Tablo 3.18'de diğer bakterilerin oluşturdukları biyofilm aktivitesi verilmiştir. Buna göre laktik asit bakterilerinden 12 tanesi laktoz, 9 tanesi sükroz, 8 tanesi fruktoz, 7 tanesi glikoz, 5 tanesi maltoz ve 3 tanesi rafinoz içeren besiyerinde en yüksek biyofilmi oluşturmuştur. Patojen bakterilerden 22 tanesi maltoz, 20 tanesi laktoz, 19 tanesi glikoz, 18 tanesi fruktoz, 17 tanesi sükroz, 16 tanesi rafinoz ve 9 tanesi ise galaktoz içeren besiyerinde en yüksek biyofilmi oluşturmuştur.

Maya izolatlarından 10 tanesi rafinoz, 8 tanesi maltoz, 3 tanesi galaktoz, 2 tanesi glikoz ve 2 tanesi fruktoz içeren besiyerinde en yüksek biyofilmi oluşturmuştur (Tablo 3.19).

**Tablo 3.17.** LAB izolatlarının farklı karbonhidratlarda oluşturdukları biyofilmlerin 570 nm'deki optik yoğunlukları

	<b>Laktoz</b>	<b>Maltoz</b>	<b>Galaktoz</b>	<b>Glikoz</b>	<b>Rafinoz</b>	<b>Sükroz</b>	<b>Fruktoz</b>
<b>MiT C8.1.a</b>	0,574	0,472	0,455	0,615	0,647	0,723	0,707
<b>BHI C7.4</b>	3,056	2,927	3,056	3,097	2,959	3,118	2,943
<b>MiT C8.1.b</b>	3,061	2,947	3,092	3,128	3,032	3,129	2,982
<b>LAB 6.3.B</b>	3,144	3,077	3,172	3,222	3,161	3,176	3,075
<b>MRS A2.2</b>	0,777	0,680	0,812	0,762	0,780	0,592	0,848
<b>MRS A3.1</b>	0,903	1,036	0,700	1,100	1,099	0,966	1,107
<b>MRS C7.3</b>	2,895	3,037	2,907	3,005	3,092	2,952	3,036
<b>MRS A2.1</b>	0,893	0,728	0,606	1,064	2,258	0,829	1,041
<b>MRS A3.2</b>	1,063	1,004	0,922	1,202	1,272	1,196	1,112
<b>MiT C7.2.2</b>	2,919	2,956	2,931	2,941	2,919	2,993	3,002
<b>LAB 1.4.B</b>	1,170	1,212	1,046	1,333	1,276	1,043	1,222
<b>LAB 1.4.A</b>	2,106	2,319	2,207	2,954	2,410	3,002	2,732
<b>LAB 11.1.A</b>	2,553	2,724	2,639	2,639	2,667	2,648	2,651
<b>LAB 1.5.1.B</b>	2,872	2,637	2,173	2,751	2,038	2,128	1,743
<b>LAB NO:3B</b>	2,884	2,487	2,362	2,622	2,581	1,736	2,238
<b>LAB 1.5.1.A</b>	2,611	2,109	2,525	2,331	2,346	2,086	2,622
<b>LAB 1.2.A</b>	2,483	2,582	0,770	2,135	2,013	1,780	2,236
<b>LAB 1.3.2.B</b>	2,714	2,280	2,598	2,759	2,559	2,390	2,138
<b>LAB 6.1.A</b>	0,903	0,993	0,428	1,026	0,217	0,991	0,625
<b>LAB 3.2.A</b>	2,944	2,425	2,347	1,174	2,479	2,944	2,549
<b>LAB 6.3.A</b>	1,711	1,625	1,432	2,243	0,845	2,154	1,407
<b>LAB 1.3.1.B</b>	2,930	2,781	2,802	1,671	2,611	2,754	2,390

**Tablo 3.17.** (Devam) *LAB* izolatlarının farklı karbonhidratlarda oluşturdukları biyofilmlerin 570 nm'deki optik yoğunlukları

	<b>Laktoz</b>	<b>Maltoz</b>	<b>Galaktoz</b>	<b>Glikoz</b>	<b>Rafinoz</b>	<b>Sükroz</b>	<b>Fruktoz</b>
<b>LAB 1.3.B</b>	2,940	3,055	2,539	1,867	2,840	2,952	2,649
<b>LAB 1.1.A</b>	2,798	2,543	1,870	2,226	1,840	2,402	2,179
<b>LAB 1.3.1.A</b>	2,947	2,325	2,913	1,907	2,947	2,939	2,322
<b>LAB 6.5.A</b>	2,964	0,855	2,216	0,887	0,723	1,847	1,768
<b>LAB NO:3A</b>	2,799	2,518	2,283	2,241	2,510	2,830	2,082
<b>LAB 6.1.B</b>	0,741	0,690	1,131	2,046	1,343	1,046	2,945
<b>LAB 3.2.B</b>	3,043	2,614	2,734	1,072	2,841	2,822	2,877
<b>LAB 1.2.B</b>	2,914	2,723	2,615	0,882	2,808	2,732	0,045
<b>LAB 7.7</b>	0,011	0,022	0,017	1,332	0,051	0,004	0,646
<b>MRS C7.1</b>	3,654	3,999	0,170	0,155	3,560	3,997	1,923
<b>MRS C8.3</b>	2,136	1,736	0,114	0,190	1,908	3,657	1,749
<b>MRS C6.2</b>	2,605	3,185	0,013	0,052	2,866	3,595	3,035
<b>ÇA 1.4 B)</b>	1,163	0,806	1,018	1,115	0,365	1,233	0,569
<b>MRS C6.1</b>	3,041	3,135	0,281	0,228	3,036	3,647	2,404
<b>MRS C7.2</b>	3,042	3,992	0,042	0,061	3,507	3,944	3,873
<b>MRS C8.1</b>	2,168	2,251	0,188	0,115	1,813	3,229	2,224
<b>LAB 1.1.B</b>	2,797	2,142	2,786	1,825	2,640	1,732	0,035
<b>LAB 6.2.A</b>	1,093	0,760	1,003	1,826	1,095	0,763	2,189
<b>LAB 6.2.B</b>	1,906	0,514	0,721	2,696	0,926	0,873	1,960
<b>M17 6.1.2</b>	1,371	0,831	0,779	1,161	0,815	0,744	1,119
<b>4.1.Y</b>	0,062	0,341	0,810	0,785	0,340	0,560	1,380

**Tablo 3.18.** *Patojen bakterilerin* farklı karbonhidratlarda oluşturdukları biyofilmlerin 570 nm'deki optik yoğunlukları

	<b>Galaktoz</b>	<b>Maltoz</b>	<b>Fruktoz</b>	<b>Laktoz</b>	<b>Glikoz</b>	<b>Sükroz</b>	<b>Rafinoz</b>
<b>KA 6.1 (1)</b>	0,297	0,156	0,155	0,521	0,113	0,601	0,143
<b>NA 2.2 a)</b>	0,909	0,455	0,581	0,492	0,817	0,830	0,121
<b>KA 1.2 (2)</b>	1,656	1,659	1,651	1,206	0,781	1,414	0,875
<b>NA 9.3 (A)</b>	0,882	1,658	0,448	1,277	0,308	0,680	0,633
<b>NA 2.2B)</b>	1,121	1,619	1,495	0,802	0,891	0,707	0,368
<b>LAB 13B</b>	0,417	0,306	0,372	0,536	0,126	0,081	0,096
<b>KA 2.3 (1)</b>	1,367	1,692	2,082	1,571	1,432	1,228	0,834
<b>NA 5.1 B)</b>	2,385	1,486	1,810	1,173	1,199	1,987	0,897
<b>KA 4(1)</b>	1,231	1,715	1,114	0,007	0,923	0,463	0,340
<b>12.3.1.1A</b>	1,078	1,143	1,251	0,023	0,797	0,488	0,249
<b>NA 6.1</b>	0,785	1,268	0,264	0,121	0,457	0,877	0,054
<b>KA 2(1)</b>	1,491	1,254	1,157	0,404	1,024	1,614	1,814

**Tablo 3.18.** (Devam) *Patojen bakterilerin farklı karbonhidratlarda oluşturdukları biyofilmlerin 570 nm'deki optik yoğunlukları*

	<b>Galaktoz</b>	<b>Maltoz</b>	<b>Fruktoz</b>	<b>Laktoz</b>	<b>Glikoz</b>	<b>Sükroz</b>	<b>Rafinoz</b>
<b>M17 1.2 (3)</b>	1,068	1,612	0,738	0,355	0,464	0,522	0,347
<b>NA 12.1.1C</b>	1,266	1,632	0,981	0,563	0,576	1,089	0,555
<b>ÇA 3.4B</b>	1,909	1,324	0,679	1,245	0,423	0,653	1,110
<b>LAB12.1.2</b>	2,091	1,451	1,211	0,994	0,624	1,090	1,763
<b>LAB 8.2.B</b>	1,304	1,457	1,014	0,220	0,614	0,840	0,445
<b>NA 5.1 A)</b>	1,899	2,451	2,126	1,166	1,705	2,603	0,847
<b>KA A2.1</b>	2,428	2,190	2,277	1,801	1,391	2,120	0,561
<b>M1712.3.1A</b>	2,392	2,053	2,874	1,438	1,881	1,892	0,784
<b>NA 7.3 C)</b>	2,344	2,483	2,936	1,020	0,876	2,544	1,306
<b>LAB 9.3.A</b>	0,523	0,977	0,631	0,419	0,010	0,351	0,067
<b>ÇA 5.1 A)</b>	1,167	1,577	0,927	0,840	0,055	0,355	0,377
<b>KA 2(2)</b>	2,306	2,065	1,946	1,627	0,175	1,577	0,863
<b>BHIC3.3.2</b>	1,857	1,168	0,928	1,121	0,228	0,797	0,197
<b>NA 12.1.2</b>	1,275	1,761	2,254	1,310	1,033	0,717	0,167
<b>NA 7.3 B)</b>	0,474	0,426	0,422	1,538	0,267	0,472	0,931
<b>ÇA 5.1 B)</b>	2,443	1,943	2,554	0,348	2,444	0,083	0,766
<b>BHIC2.4</b>	1,062	0,075	0,479	1,452	3,068	2,026	0,076
<b>M17 13.1 (1)</b>	0,158	0,096	0,254	0,064	0,683	0,186	0,180
<b>M17 13.3</b>	0,140	0,119	0,331	0,069	0,035	0,165	0,162
<b>M17 14.1</b>	1,372	2,712	0,478	3,022	0,165	3,008	0,948
<b>M17 5.1 (1)</b>	0,635	0,360	0,618	0,330	1,486	0,319	0,596
<b>M17 6.2 (2)</b>	0,736	0,724	0,830	1,108	0,650	0,955	0,685
<b>KA 8.1 (1)</b>	0,054	0,106	0,200	0,572	0,073	0,154	0,126
<b>M17 6.1.3.1</b>	1,544	2,316	2,958	2,273	0,762	3,064	1,029
<b>M17 6.1.3</b>	0,820	2,133	2,672	2,207	1,051	2,996	1,282
<b>M17 7</b>	0,086	0,095	0,131	0,074	0,054	0,116	0,113
<b>M17 13</b>	0,062	0,115	0,154	0,054	0,044	0,139	0,250
<b>M17 3.1</b>	0,585	2,186	1,106	2,666	1,012	2,119	3,016
<b>M17 3.2 (1)</b>	0,611	2,708	0,797	2,285	0,243	1,528	3,006
<b>M17 1.1 (1)</b>	0,595	0,510	0,592	0,810	0,213	0,505	0,705
<b>BHIC2.2</b>	0,301	0,908	0,320	0,263	1,302	0,029	0,534
<b>13.1.Y.1</b>	0,128	2,029	0,088	2,030	0,108	0,084	1,310
<b>KA Ç8.3.1</b>	2,502	2,906	1,092	3,011	1,735	1,965	2,861
<b>KA Ç5.2.2</b>	2,020	2,075	1,525	2,062	0,528	2,025	0,998
<b>KA Ç5.1</b>	3,020	3,079	2,950	3,042	3,005	1,557	1,224
<b>KA Ç8.3.3</b>	2,141	2,233	2,134	3,007	2,608	2,495	1,885
<b>BHI A1.2</b>	3,022	2,293	2,998	3,010	3,029	1,324	2,007
<b>KA Ç4.1</b>	2,184	2,906	2,820	2,843	3,004	2,882	1,482

**Tablo 3.18.** (Devam) *Patojen bakterilerin farklı karbonhidratlarda oluşturdukları biyofilmlerin 570 nm'deki optik yoğunlukları*

	<b>Galaktoz</b>	<b>Maltoz</b>	<b>Fruktoz</b>	<b>Laktoz</b>	<b>Glikoz</b>	<b>Sükroz</b>	<b>Rafinoz</b>
<b>KA A.5.2</b>	1,193	2,843	0,737	3,049	2,721	0,431	2,048
<b>KA Ç3.1</b>	0,204	0,249	3,177	0,421	3,101	0,312	1,424
<b>BHI A8.1</b>	0,824	0,259	0,672	0,528	0,745	3,509	2,382
<b>BHI A5.3</b>	0,148	0,228	3,259	0,104	2,913	0,214	1,138
<b>M17 A1.2</b>	2,469	3,854	3,991	3,419	3,846	3,628	3,611
<b>M17 Ç4.1.1</b>	1,116	1,365	3,515	0,927	3,158	0,556	0,930
<b>M17 A2.2</b>	1,712	2,070	1,402	0,520	1,927	1,839	1,676
<b>BHI A2.2</b>	2,728	2,370	1,651	1,272	2,762	3,532	3,112
<b>MİT Ç3.3</b>	0,375	0,805	0,257	1,584	0,534	3,624	0,411
<b>BHI Ç1.2</b>	1,251	2,349	0,004	0,944	2,466	3,526	1,717
<b>KAC6.1.b</b>	0,074	0,580	0,002	0,690	0,838	0,431	0,164
<b>ÇA 3.3 a)</b>	0,522	0,780	0,542	1,563	1,755	0,990	1,284
<b>ÇA 3.6 a)</b>	0,007	0,693	0,288	1,471	1,136	0,841	0,295
<b>ÇA 1.2</b>	2,045	2,648	1,673	1,644	2,641	1,928	0,753
<b>ÇA 1.1</b>	0,332	0,200	0,032	0,557	0,978	0,723	0,090
<b>BHI A7.2</b>	0,002	0,152	0,493	0,393	0,985	0,109	0,010
<b>NA 12.3.2</b>	0,085	0,798	0,023	1,047	0,943	0,693	0,338
<b>M17 12.1.4</b>	0,100	0,761	0,014	0,868	0,781	0,944	0,499
<b>M17 A2.1</b>	1,312	1,700	1,010	2,168	2,093	1,656	1,900
<b>KA 7.2</b>	0,024	0,056	0,007	0,050	0,011	1,845	0,530
<b>KA 6.1.1alt</b>	0,007	1,826	0,963	0,400	1,733	0,481	0,016
<b>M17C4.2.3</b>	0,380	0,489	0,024	0,732	0,560	0,510	0,377
<b>KA 9 büyük</b>	0,351	0,462	0,658	1,521	2,270	1,146	0,235
<b>NA 13 A)</b>	0,601	0,745	0,833	1,406	2,388	1,992	0,235
<b>MİT Ç2.2</b>	1,552	0,987	1,459	2,456	2,501	2,223	2,570
<b>NA 12.3.1.1B)</b>	0,020	0,839	0,015	1,665	0,878	0,578	0,212
<b>KA 6.1 (2)</b>	0,005	0,004	0,004	0,025	0,383	0,017	0,074
<b>KA 6.1.1üst</b>	0,282	2,178	1,212	1,910	2,492	0,684	0,045
<b>NA 9.4 A)</b>	0,115	0,940	0,034	0,497	1,460	0,769	0,325
<b>KA A4.3</b>	0,008	0,010	0,012	0,047	0,073	0,01	0,039
<b>M17 9.2.1</b>	0,698	0,166	0,005	0,388	0,369	0,391	0,086
<b>BHIA7.1.1</b>	0,005	0,021	0,004	0,071	0,046	0,102	0,064
<b>KA 12.2</b>	1,454	2,079	0,448	0,995	2,253	2,053	1,112
<b>ÇA 1.4 A)</b>	1,027	2,329	0,978	0,021	1,719	0,003	0,408
<b>KA 5.2.1</b>	0,008	0,096	0,004	0,155	0,586	0,261	0,097
<b>NA 12.1.1A)</b>	0,707	1,136	0,539	0,865	1,911	0,715	1,000
<b>M17 13.1.1</b>	0,848	0,730	0,356	1,744	1,697	1,368	0,346
<b>BHIA4.1</b>	1,901	1,549	1,533	2,614	2,611	2,337	2,681

**Tablo 3.18.** (Devam) *Patojen bakterilerin farklı karbonhidratlarda oluşturdukları biyofilmlerin 570 nm'deki optik yoğunlukları*

	<b>Galaktoz</b>	<b>Maltoz</b>	<b>Fruktoz</b>	<b>Laktoz</b>	<b>Glikoz</b>	<b>Sükroz</b>	<b>Rafinoz</b>
<b>KA Ç5.2.1</b>	0,123	0,067	0,221	0,119	0,372	0,577	0,246
<b>M17A2.2 ince</b>	1,851	2,063	1,623	2,338	2,224	2,219	2,092
<b>NA 12.3</b>	0,895	0,509	0,126	0,411	0,870	0,930	0,510
<b>KA 10.1.2</b>	1,828	1,249	2,231	1,537	1,052	0,973	2,076
<b>KA 5.1</b>	0,992	1,334	1,303	1,223	1,077	1,363	1,725
<b>KA 7(1)</b>	0,988	1,347	1,137	1,130	1,130	1,470	1,503
<b>NA 7.2</b>	1,776	1,973	1,581	1,999	2,413	2,337	1,015
<b>KA 10büyük</b>	1,424	2,114	2,867	1,571	1,537	2,502	2,365
<b>KA10.1.1çizgi</b>	0,911	2,149	2,348	1,780	1,595	2,919	2,777
<b>M17 A2.2K</b>	2,138	1,715	2,246	2,830	2,152	1,383	1,555
<b>BHI Ç1.3.3</b>	1,0744	1,8930	0,6041	1,7096	0,6856	0,6060	0,5498
<b>KA 4.4 (1)2.21</b>	1,3789	1,6789	1,4373	1,1525	1,2704	1,1487	1,3380
<b>MitA1.2</b>	0,8280	1,8797	1,4994	0,9973	1,2308	1,8024	1,8183
<b>KA 10 küçük</b>	2,9323	3,0392	2,9553	3,0106	3,0264	1,5031	1,9442
<b>BHI A7.A</b>	2,7760	3,1674	3,0453	3,0710	3,0836	3,0343	3,0007
<b>KA A1.1.2</b>	0,4548	1,2961	1,5939	1,0635	1,0950	2,0489	2,4302
<b>KAC1.2</b>	2,1059	2,9225	2,9819	2,9498	3,0474	1,1505	0,9212
<b>KA 6</b>	0,6615	0,6681	1,7117	0,5675	0,5264	0,4821	1,8389
<b>KA 4.2 (3)</b>	1,0045	0,5524	0,5560	0,5792	0,5449	2,1510	0,6318
<b>MİT Ç4.2.1</b>	0,8206	0,9369	1,3276	1,0730	0,8006	0,5889	0,8244
<b>KA 10.2.2 (1)</b>	0,8558	1,9328	1,8072	1,2024	1,1365	1,4725	1,7593
<b>KA 1.3 (1)</b>	0,4530	0,5621	0,4754	0,5789	0,5126	0,5544	1,4155
<b>KA 4.1 (2)</b>	0,4987	1,1919	0,3976	1,8844	0,4545	1,9668	0,4201
<b>MİT Ç7.1</b>	0,4947	0,6497	0,4375	0,5366	0,4095	0,5505	0,9857
<b>M17 Ç7.2</b>	3,1457	2,9694	3,0164	3,0794	2,5890	1,0354	2,9733
<b>KA 10.2.2 (2)</b>	0,9496	1,6452	1,7250	1,7730	1,1476	1,7936	2,6098
<b>M17 Ç4.2.2</b>	1,3179	1,3595	1,6025	2,6009	2,2968	2,6133	2,9365
<b>BHI Ç1.4.2</b>	0,7658	0,6127	0,9428	0,6396	0,7880	1,0168	0,6586
<b>KA 8.1 (2)</b>	0,5518	0,6024	1,7384	0,7419	1,0101	0,6434	1,0897
<b>M17 A6.1</b>	1,7741	1,3803	2,3589	2,8284	3,0323	2,7958	3,1235
<b>NA 14</b>	1,3744	1,3365	2,1644	1,6065	1,8473	2,5344	1,2289
<b>ÇA 3.2</b>	1,0462	1,7313	2,6373	0,9596	1,2760	2,4229	2,0313
<b>BHI A1.1</b>	0,5253	1,2113	3,2597	0,8399	1,8788	0,5581	0,6547
<b>BHIA1.5</b>	0,3555	0,4364	0,5967	0,6509	0,4529	0,6724	1,2132
<b>KA 2.3</b>	0,3753	0,3953	0,4737	0,6356	0,4911	0,5072	0,4975



**Tablo 3.19.** *Maya izolatlarının farklı karbonhidratlarda oluşturdukları biyofilmlerin 570 nm'deki optik yoğunlukları*

	<b>Laktoz</b>	<b>Maltoz</b>	<b>Galaktoz</b>	<b>Glikoz</b>	<b>Rafinoz</b>	<b>Sükroz</b>	<b>Fruktoz</b>
<b>M 9.1 b)</b>	0,302	0,257	0,731	0,009	0,823	0,371	0,225
<b>M 9.1 a)</b>	0,348	0,328	0,600	1,046	0,317	0,353	0,292
<b>Mit Ç7.2.1</b>	0,141	0,243	0,438	0,006	0,252	0,112	0,211
<b>MRS A4.1</b>	0,175	0,375	0,554	0,243	0,146	0,372	0,240
<b>Mit Ç8.2</b>	0,217	0,259	0,574	0,152	0,710	0,220	0,355
<b>BHI Ç8.2.1</b>	0,318	0,617	0,550	0,823	0,399	0,426	0,450
<b>BHI Ç8.2</b>	0,271	0,345	0,648	0,136	0,651	0,111	0,312
<b>Mit A5.2</b>	0,012	0,022	0,028	0,082	0,086	0,025	0,105
<b>Mit A5.1</b>	0,115	0,114	0,112	0,073	0,210	0,061	0,175
<b>NA 9.3 b)</b>	0,084	0,102	0,211	0,159	0,392	0,153	0,273
<b>M 5.1 b)</b>	0,126	0,169	0,299	0,024	0,698	0,250	0,248
<b>BHI Ç7.2</b>	0,470	0,719	0,804	0,423	0,990	0,374	0,374
<b>MRS A4.2</b>	0,357	0,399	0,746	0,334	1,278	1,094	1,837
<b>M 5.1 a)</b>	0,282	0,293	0,355	0,377	0,674	0,172	0,291
<b>NA 9.4 b)</b>	0,078	0,053	0,117	0,072	0,278	0,036	0,183
<b>L 9.6.A</b>	0,043	0,314	0,016	0,138	0,024	0,002	0,059
<b>L 9.6.2</b>	0,101	1,340	0,049	0,416	0,483	0,075	0,294
<b>L 9.1.B</b>	0,025	1,891	0,005	0,577	0,066	0,045	0,463
<b>L 9.5.A</b>	0,000	1,220	0,020	0,455	0,178	0,021	0,323
<b>L 9.6.A.1</b>	0,061	0,914	0,009	0,301	0,012	0,002	0,207
<b>L 9.3.A</b>	0,000	1,932	0,026	0,694	0,041	0,022	0,287
<b>L 9.6.1</b>	0,043	0,354	0,008	0,162	0,038	0,004	0,099
<b>L 9.1.A</b>	0,059	2,310	0,039	0,588	0,219	0,025	0,296
<b>M17 Ç1.1</b>	0,278	0,377	0,650	0,135	0,673	0,161	0,315
<b>PDA Ç8</b>	0,175	0,386	0,570	0,245	0,166	0,375	0,240

### 3.18. LAB'lerinin Süpernatantlarının Antiadezyon ve Antibiyofilm Aktiviteleri

#### 3.18.1. Mikrotitrasyon plak

Seçilen laktik asit bakterilerinin biyofilm aktivitesi yüksek patojenlere karşı antiadezyon ve antibiyofilm aktiviteleri incelenmiştir. Seçilen patojenler: *Staphylococcus aureus* BHIC1.2, *Neisseria perflava* BHIA7.A, *Streptococcus salivarius* M17A1.2, *Streptococcus mutans* M173.1. Seçilen laktik asit bakterileri ise *L. casei* LAB1.3.1.A, *L. rhamnosus* LAB1.4.A, *L. fermentum* BHIC7.4, *L. casei* LABNo:3B, *L. paracasei* LAB6.2.A, *L. fermentum* MRSC8.3, *L. fermentum* MRSC7.1, *L. rhamnosus* LAB1.2.A'dır. Tablo 3.20'de laktik asit bakterilerin antiadezyon aktiviteleri, Tablo 3.21'de biyofilm inhibisyonu aktiviteleri verilmiştir.

*S.aureus* BHIC1.2 için en yüksek antiadezyon aktivitesini *L. fermentum* MRSC7.1, *Neisseria perflava* BHIA7.A için *L. fermentum* MRSC7.1, *Streptococcus salivarius* M17A1.2 için *L. rhamnosus* LAB1.4.A, *Streptococcus mutans* M173.1 için *L. rhamnosus* LAB1.2.A göstermiştir.

*S.aureus* BHIC1.2 için en yüksek biyofilm inhibisyonu aktivitesini *L. fermentum* BHIC7.4, *Neisseria perflava* BHIA7.A için *L. rhamnosus* LAB1.4.A, *Streptococcus salivarius* M17A1.2 için *L. casei* LAB1.3.1.A göstermiştir.

**Tablo 3.20.** Laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının antiadezyon aktiviteleri (%)

	<i>S. aureus</i> BHIC1.2	<i>S. mutans</i> M173.1	<i>N. perflava</i> BHIA7.A	<i>S. salivarius</i> M17A1.2
<i>L. casei</i>				
LAB1.3.1.A	31,40±0,225	67,75±0,012	23,94±0,282	35,70±0,033
<i>L. rhamnosus</i>				
LAB1.4.A	44,51±0,012	72,51±0,010	55,21±0,145	44,82±0,236
<i>L. fermentum</i>				
BHIC7.4	38,26±0,492	65,87±0,047	52,36±0,102	9,91±0,235
<i>L. casei</i>				
LABNO:3B	39,68±0,108	72,57±0,010	39,56±0,042	17,12±0,434
<i>L. paracasei</i>				
LAB6.2.A	(-)	62,79±0,061	36,15±0,082	38,17±0,016
<i>L. fermentum</i>				
MRSC8.3	25,32±0,142	71,76±0,066	37,66±0,007	42,61±0,079
<i>L. fermentum</i>				
MRSC7.1	50,26±0,070	70,80±0,030	58,76±0,166	26,25±0,175
<i>L. rhamnosus</i>				
LAB1.2.A	45,82±0,207	73,42±0,053	56,69±0,013	42,74±0,371

**Tablo 3.21.** *Laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının antibiyofilm aktiviteleri (%)*

	<i>S. aureus</i> BHIC1.2	<i>S. mutans</i> M173.1	<i>N. perflava</i> BHIA7.A	<i>S. salivarius</i> M17A1.2
<i>L. casei</i>				
LAB1.3.1.A	53,91±0,121	(-)	80,71±0,059	25,53±0,284
<i>L. rhamnosus</i>				
LAB1.4.A	47,54±0,222	(-)	83,83±0,086	14,76±0,266
<i>L. fermentum</i>				
BHIC7.4	64,21±0,102	(-)	83,20±0,049	(-)
<i>L. casei</i>				
LABNO:3B	48,93±0,105	(-)	80,24±0,052	(-)
<i>L. paracasei</i>				
LAB6.2.A	(-)	(-)	39,43±0,138	(-)
<i>L. fermentum</i>				
MRSC8.3	63,09±0,198	(-)	81,16±0,057	(-)
<i>L. fermentum</i>				
MRSC7.1	61,83±0,094	(-)	80,06±0,125	(-)
<i>L. rhamnosus</i>				
LAB1.2.A	45,56±0,264	(-)	80,17±0,103	2,42±0,963

### 3.18.2. Hidroksiapatit (HA) disk

Mikroplate deneyinde en fazla antiadezyon ve biyofilm inhibisyonu aktivitesi gösteren laktik asit bakterilerinin HA disk üzerinde aktiviteleri incelenmiştir (Tablo 3.22, Tablo 3.23). Ayrıca diskler üzerindeki biyofilm oluşturmuş canlı bakteri sayısı belirlenmiştir (Tablo 3.24). Disklerin SEM görüntüleri çekilmiştir (Şekil 3.25, Şekil 3.26, Şekil 3.27).

**Tablo 3.22.** Laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının HA diskinde antiadezyon aktiviteleri (%)

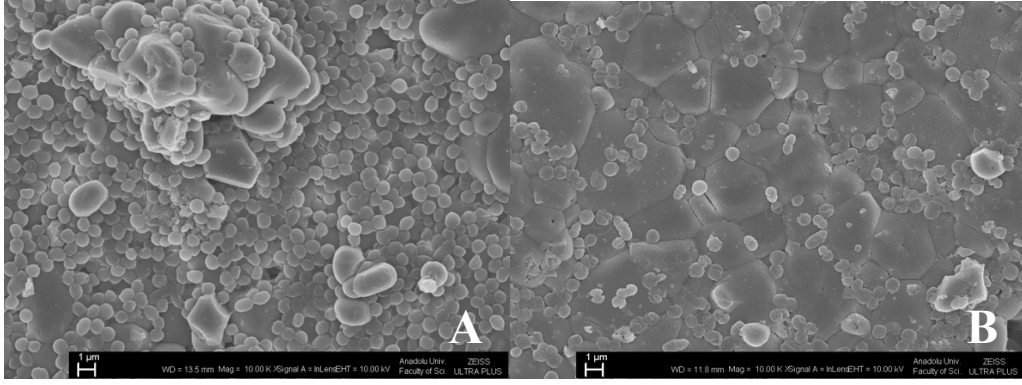
	Antiadezyon
<i>Staph. aureus</i> BHIC1.2/ <i>L. fermentum</i> MRSC7.1	32,27±2,4
<i>S. mutans</i> M173.1/ <i>L. rhamnosus</i> LAB1.2.A	20,98±6,02
<i>S. salivarius</i> M17A1.2/ <i>L. rhamnosus</i> LAB1.4.A	6,6±2,2
<i>N. perflava</i> BHIA7.A/ <i>L. fermentum</i> MRSC7.1	23,3±6,44

**Tablo 3.23.** Laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının HA diskinde antibiyofilm aktiviteleri (%)

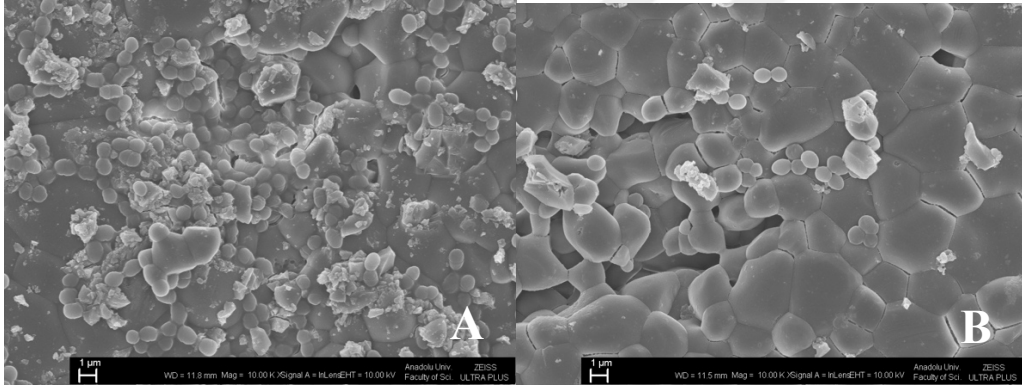
	Antibiyofilm
<i>Staph. aureus</i> BHIC1.2/ <i>L. fermentum</i> BHIC7.4	44,89±9,62
<i>S. salivarius</i> M17A1.2/ <i>L. casei</i> LAB1.3.1A	75,31±10,12
<i>N. perflava</i> BHIA7.A/ <i>L. rhamnosus</i> LAB1.4.A	(-)

**Tablo 3.24.** HA diskindeki canlı bakteri sayısının inhibisyonu

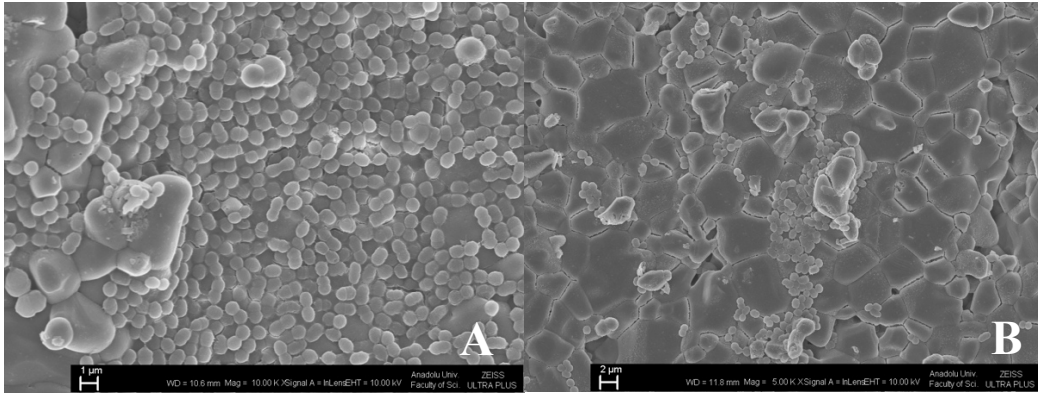
	Adezyon	Biyofilm
<i>S. mutans</i> M173.1	12,02±0,4556	(-)
<i>Staph. aureus</i> BHIC1.2	5,25±0,437	24,95±0,156
<i>S. salivarius</i> M17A1.2	7,74±0,456	31,54±0,156
<i>N. perflava</i> BHIA7.A	12,43±0,051	(-)



**Şekil 3.25.** *Staph. aureus* BHI C1.2 izolatının HA diskinde oluşturduğu biyofilm görüntüsü. A: Kontrol, B: Bakterinin *L. fermentum* BHI C7.4 süpernatantı ile inkübasyonu sonucunda oluşturduğu biyofilm



**Şekil 3.26.** *S. salivarius* M17A1.2 izolatının HA diskinde oluşturduğu biyofilm görüntüsü. A: Kontrol, B: Bakterinin *L. casei* LAB1.3.1A süpernatantı ile inkübasyonu sonucunda oluşturduğu biyofilm



**Şekil 3.27.** *N. perflava* BHI A7.A izolatının HA diskinde oluşturduğu biyofilm görüntüsü. A: Kontrol, B: Bakterinin *L. rhamnosus* LAB1.4.A süpernatantı ile inkübasyonu sonucunda oluşturduğu biyofilm

### 3.19. Laktik Asit Bakterilerinin Halitosis Üzerine Etkisi

*E. faecalis* NA 12.3.2 ve *S. anginosus* NA 2.2a ile inkübasyonu sonucunda oluşturdukları koku 5 kişi tarafından analiz edilmiştir. 1-5 arasında yapılan puanlamada en kötü kokuya 5 puan verilmiştir. Negatif kontrol olarak TR146 hücreleri kullanılmıştır. Koku analizi sonuçları Tablo 3.25’te verilmiştir.

**Tablo 3.25.** Koku analizi

	LAB1.2.A	Negatif Kontrol	MRSC7.1	MRSC7.4	LAB1.4.A	Pozitif Kontrol	LAB1.3.1A
1.kişi	4	2	5	4	4	2	2,5
2.kişi	1	1	2	2	4	5	4
3.kişi	2	1	4	4	4,5	5	3
4.kişi	1	1	4	4,5	5	5	2,5
5.kişi	5	1	4	2	3	2	4
Ortalama	2,6	1,2	4	3,3	4,1	3,2	3,8

## 4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

### 4.1. Mikrobiyal Çeşitliliğin Değerlendirilmesi

Çalışmanın ilk basamağında çocuklardan alınmış oral biyofilm örneklerinden mikroorganizma izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonucunda 206 mikroorganizma izole edilmiştir. Mikroskopik inceleme sonrasında bunların 181 tanesinin bakteri, 25 tanesinin ise maya izolatı olduğu görülmüştür. Bakteri izolatlarından 21 tanesinin Gram negatif, 160 tanesinin Gram pozitif; 100 tanesinin katalaz negatif, 81 tanesinin katalaz pozitif olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.1). Bu şekilde bakteri izolatlarının ilk sınıflandırması yapılmıştır.

Bakterilerin tür düzeyinde moleküler olarak tanılanması 16S rRNA gen bölgesine göre yapılmıştır. 16S rRNA gen bölgesi bakteriyal filogeni ve taksonomi çalışmalarında en sık kullanılan genidir (Janda ve Abbott, 2007). Bu genin tüm bakterilerde bulunması; genin işlevinin zaman içinde değişmemiş olması ve bu nedenle dizi değişimlerinin evrimsel süreci yansıtmaması; 1500 baz çiftlik uzunluğunun yeterli biyoinformatik bilgiyi sağlaması; evrimsel süreçte hem korunmuş hem de değişken bölgeler içermesi en sık kullanılan genetik markır olmasını sağlamıştır (Janda ve Abbott, 2007; Verma vd., 2018; Clarridge, 2004).

Elde edilen 16S rRNA dizilerinin BLAST analizi sonucunda bakteri izolatlarının *Firmicutes*, *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* filumlarına ait olduğu görülmüştür (Tablo 3.4). Kültür bağımlı ve kültür bağımsız yapılan oral mikrobiyota çalışmalarında söz konusu bu filumların en baskın filumlar olduğu bildirilmiştir (Lazaveric vd., 2009; Heller vd., 2016; Tanner 2011).

Mikrobiyal kompozisyonda en baskın filumun *Firmicutes* (%83,4) olduğu görülmüştür. Bu filum içinde birbirine yakın temsil edilme oranlarıyla baskın olan cins *Lactobacillus* (%28,17) olmuştur. *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. salivarius* ve *L. plantarum* türleri ile temsil edilmiştir (Tablo 3.5). Oral mikrofloranın daimi üyesi olan *Lactobacillus* çalışmada izole edilen en baskın cins olmuştur. Özellikle son yıllarda probiyotik özellikleri ile popüler olan bu bakterilerin günlük diyetlerdeki süt ve süt ürünleriyle çokça alınmaya başlanması oral mikrobiyotaya yerleşme oranını arttırmaktadır. *L. rhamnosus*'un yoğurt tüketiminin kesilmesinden iki hafta sonra dahi ağız boşluğunda kolonize olmayı sürdürdüğü gösterilmiştir (Meurman vd., 1994). Bunun yanı sıra izolasyonda selektif besiyeri seçilmesi temsil oranını arttırmıştır.

*Firmicutes* filumu içinde *Staphylococcus* cinsi en baskın ikinci cins (%22,5) olmuştur. *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. warneri* türleri ile temsil edilmiştir. Nazal floranın doğal üyesi olduğundan ağıza sürekli geçişi söz konusudur. Yetişkinlerle yapılan bazı çalışmalarda ağızdaki kolonizasyonunun yaş ile doğru orantılı olduğu gösterilmiştir (Smith vd., 2003; Percival vd., 1991). Ohara-Nemoto vd., (2008) sağlıklı yetişkinlerden alınan biyofilm örneklerinde yaptıkları kültürel çalışmada *S. aureus* ve *S. epidermidis* türlerinin baskın olduğunu bulmuştur. Bu bulgular çalışmamızla paralellik göstermektedir. Bizim çalışmamızda da *Staphylococcus* içinde *S. aureus* (%12,15), *S. epidermidis* (%9,39) baskın türler olarak belirlenmiştir.

Çalışmada *Enterococcus* en fazla izole edilen üçüncü cins (%17,67) olmuştur. *Enterococcus* sp. gastrointestinal sistemin doğal üyesidir, nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan fırsatçı patojenler olarak bilinmektedirler. Menenjit, Yara, üriner enfeksiyonlarla da ilişkili olduğu gösterilmiştir (Donlan, 2002). Oral mikrobiyatada düşük oranda ve geçici olarak bulunur. Oral mikrobiyotada bulunuşu ile ilgili verilerin çoğunlukla endodonti tedavisi gören hastalardan sağlandığı görülmektedir. Sedgley vd., (2004) örnekleme yaptıkları yetişkinlerin %11'inden *E. faecalis* izole etmiştir. Çalışmada *E. faecalis* pozitif bulunan kişilerden yalnızca bir tanesinin diş ve diş eti sağlığı bakımından sağlıklı olduğu bildirilmiştir (Sedgley vd., 2004). Komiyama vd., (2016) sağlıklı çocuklardan ağız çalkalama tekniği ile aldıkları örneklerde *Enterococcus* sp. izolasyonu yapmıştır. Örneklerin %10'u *Enterococcus* sp. pozitif değerlendirilmiş, tanılama sonrası *E. faecalis* yaygın tür olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda ise *Enterococcus* sp. içinde izolasyon oranı en yüksek tür *E. faecium* (%13,81), *E. faecalis* izolasyon oranı ise %2,2 olmuştur. *E. faecalis* taşıdığı virülans faktörleri ve bunları horizontal gen transferi ile aktarması nedeniyle diş sağlığı ile ilgili enfeksiyonlarda tedaviyi zorlaştırmaktadır (Anderson vd., 2015). Bu veriler doğrultusunda çalışmamızda *E. faecalis*'in izolasyon oranının düşük olması beklenen bir sonuçtur.

*Firmicutes* filumundan izole edilen diğer üyeler *Streptococcus* sp. (%9,94) ve *Bacillus* sp. (%4,97)'dir. *Streptococcus* cinsine ait izolat sayısı düşük olsa da tür çeşitliliği en fazla cins olmuştur. *S. salivarius*, *S. anginosus*, *S. lutetiensis*, *S. parasanguinis*, *S. oralis*, *S. mutans*, *S. intermedius* ve *S. sanguinis* türleri ile temsil edilmiştir. *Streptococcus* spp.'nin oral biyofilmdeki oranının *Lactobacillus* spp. varlığıyla baskılandığı görülmektedir. Yapılan birçok çalışmada *Lactobacillus* sp.'nin *S. mutans* üzerine antibakteriyal ve antibiyofilm etkisi olduğu bildirilmiştir (Güngör vd., 2013; Wu vd.,



2014; Lin vd., 2015; Ahn vd., 2018). *Bacillus* sp.'nin oral mikrobiyotada düşük oranda bulunduğu bildirilmiştir (Dewhirst vd., 2010). Bu veriler bizim bulgularımızla örtüşmektedir.

*Proteobacteria* filumundan *Neisseria* sp. %10,49 izolasyon oranına sahiptir. *N. flavescens*, *N. subflava*, *N. sicca*, *N. elongata* ve *N. perflava* türleriyle temsil edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda sağlıklı bireylerde *Neisseria* sp. oranının düşük olduğu bildirilmiştir. Kanasi vd., (2010) yaptıkları klonal çalışmada; Ma vd., (2015) ise mikroarray çalışmasında erken dönem diş çürükleri ve sağlıklı çocuklarda *Neisseria* sp. tespit etmiştir. Daha önceki çalışmalarda diş çürüğü olan yetişkinlerden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* çalışmamızda düşük oranda izole edilmiştir. Fırsatçı patojen ve oral mikrobiyotada doğal olarak yer almayan bu bakteri Rajaprabu vd., (2018) yaptığı çalışmada, 30 yaşın üzerinde diş çürüğü olan 6 yetişkinden izole edilmiştir.

*Actinobacteria* filumundan *Rothia mucolaginoso* (%2,76) ve *R. dentocariosa* (%1,65) ve *Corynebacterium argentoratense* (%0,55) izole edilmiştir. Ma vd., (2015) yaptıkları mikroarray çalışmasında diş çürükleri olan ve sağlıklı çocuklarda *Rothia* sp. tespit etmiştir. Çürüklerde bulunma oranının daha fazla olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada sağlıklı çocuklardan alınan biyofilm örneklerinde *Corynebacterium matruchotii* tespit edilmiştir. İlk dişlenmede ve kalıcı dişlerde oluşan çürüklü ve çürüksüz biyofilmlerle yapılan klonal bir çalışmada iki grupta da *Corynebacterium* sp. bulunmuştur (Aas vd., 2008).

Bakteri izolatlarının Maximum Likelihood filogenetik ağaçları yapılarak filogenetik analizi gerçekleştirilmiştir. Ağaçlara dış grup olarak *Bacteroidetes* filumuna ait *Flavobacterium* sp. (GenBank erişim no:AM179863.1) seçilmiştir. Filogenetik ağaçların doğruluğunu test etmek için bootstrap yöntemi kullanılarak 1000 tekrarlı yapılmıştır. *Proteobacteria* filumu ağacında *Klebsiella pneumoniae* M17A6.1, M17A2.1 ağacın kökü konumundadır. *Actinobacteria* filumu ağacında ise *Corynebacterium argentoratense* ağacın köküdür. *Firmicutes* filumu ağacında ise *Staphylococcus aureus* NA7.2 köktür. Filogenetik ağaçlarda ağacın kökü gruba evrimsel olarak en uzak diziyi göstermektedir.

*Candida albicans* ve diğer *Candida* türleri ağız boşluğundaki kommensal mikroorganizmalar ile birlikte yaşayan fırsatçı patojenlerdir. Sağlıklı kişilerde bulunma oranı %20-40 arasındadır (Signoretto vd., 2009). Konağın bağışıklık sistemi baskılandığında ya da ağız içindeki ekolojik denge bozulduğunda enfeksiyona neden

olduğu bilinmektedir. Bağışıklığı baskılanan kişilerin %60'ından fazlasında baskın mikrobiyota haline geldiği bildirilmiştir (Moore vd., 1993). Çalışmamızda sağlıklı çocuklardan alınan biyofilm örneklerinden 25 adet maya izolatu elde edilmiştir Vitek 2 ile yapılan biyokimyasal tanılama sonucunda baskın cinsin *Candida* olduğu ve *C. dubliniensis*, *C. albicans*, *C. norvegensis*, *C. tropicalis* türleri ile temsil edildiği görülmüştür (Tablo 3.6). İzole edilen toplam mikroorganizma sayısı içinde izolasyon oranı %12,13'tür. Al-Ahmad vd, (2016) çocuklardan alınan biyofilm örnekleriyle yaptıkları kültürel çalışmada maya izolasyon oranının %1 olduğunu göstermiştir.

Çocuklardan alınan biyofilm örnekleriyle yapılan kültürel bir çalışmada %50 *C. albicans* ve %27 oranında *C. dubliniensis* bulunmuştur (Al-Ahmad vd., 2016). Kadir vd., (2005) 0-12 yaş arasındaki çocuklardaki *Candida* türlerinin bulunma oranını araştırmıştır. 300 çocukla yapılan araştırmada çocukların %22,3'ünde *C. albicans*, %0,3'ünde *C. tropicalis* bulunmuştur. Srivastava vd., (2012) 3-18 yaş arasındaki 60 çocukla yaptıkları kültürel çalışmada 38 çocukta *C. albicans* varlığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda bir izolat *Cryptococcus laurentii* olarak tanılanmıştır. Ancak literatürde bu maya ile ilgili oral biyofilm ile ilişkilendirilmiş herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bir çalışmada Vitek 2 sistemi ile *C. laurentii* olarak tanılanmış 42 mayanın internal transcribed spacer (ITS) gen bölgesinin dizilenmesi sonucunda sadece 2 tanesinin gerçekten *C. laurentii* olduğu, diğer maya izolatlarının çoğunlukla *C. neoformans* olduğu gösterilmiştir (Xiao vd., 2016). Bu nedenle *C. laurentii* olarak tanılanan MRSA4.2 nolu izolatu ve diğer tüm maya izolatlarının ITS gen bölgesine göre tanılanması daha doğru ve geçerli bir tanılama olacaktır.

Çalışmamız kültür bağımlı olduğu için ortaya koyduğu mikrobiyal çeşitlilik kısıtlıdır. İnkübasyon şartları aerob ve %5 CO<sub>2</sub> içeren şartlarda gelişebilen fakültatif anaerob bakterilerin gelişimi için uygundur. Dolayısıyla oral biyofilmde varlığı bilinen *Fusobacterium* sp. ve *Bacteriodes* filumu üyeleri gibi anaerob bakteriler izole edilememiştir.

#### **4.2. Laktik Asit Bakterilerin Probiyotik Özellikleri**

Çalışmamızda izole edilen *Lactobacillus* sp. izolatlarının probiyotik özellikleri incelenmiştir. Bir laktik asit bakterisinin probiyotik amaçla kullanılabilmesi için öncelikle gastrointestinal şartlara direnç göstermesi beklenmektedir (Dunne vd., 2001).

Bu nedenle izolatların öncelikle gastrointestinal sistemin girişi olan ağızda canlılıkları devam ettirmeleri gerektiği için lizozim direnci incelenmiştir. Lizozim bakteri hücre duvarında bulunan N-asetil glukozamin ve N-asetil muramik asit arasındaki beta 1-4 glikozidik bağlarını yıkarak antimikrobiyal etki göstermektedir (Vilcacundo vd., 2018). 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 ve 10 mg/ml konsantrasyonlarındaki lizozim solüsyonlarına tüm laktik asit bakterilerinin direnç gösterdiği görülmüştür. Bakterilerin izole edildiği yer ağız olduğu için, tükürükte bol miktarda bulunan lizozime dirençli olmaları beklenen bir sonuç olmuştur. Benzer sonuçlar Koll vd., (2008) yaptıkları çalışmada da elde edilmiştir.

Mide sıvısı pH 1,0 asitliğindedir. Ancak besin alındığında proteinlerin tamponlama özelliklerinden ötürü pH 3,0-4,0'e kadar çıkmaktadır (Koll vd., 2008). LAB'lerinin gastrointestinal sistemin ikinci durağı olan midede hayatta kalma oranlarını belirlemek amacıyla pepsin direnci deneyleri yapılmıştır. Bakterilerin 3 mg/ml pepsine pH 2,0 ve pH 3,0'te; 3 ve 4 saatlik inkübasyonlar sonunca hayatta kalma yüzdeleri değerlendirilmiştir. İnkübasyon süreleri gıdanın midede ortalama süresine göre belirlenmiştir (Maragkoudakis vd., 2006). Buna göre pH 3,0'te 3. saatte izolatların hayatta kalma oranı %64,14-100 arasındadır. 4. saatin sonunda *Lactobacillus plantarum* MRSC6.2, *L. fermentum* MitC7.2.2, *L. rhamnosus* LAB1.1.A, *L. rhamnosus* LAB1.3.1.B, *L. paracasei* LAB 6.2.B, *L. rhamnosus* 4.1.Y, *L. rhamnosus* LAB1.3.A, *L. paracasei* LAB 6.1.B, *L. salivarius* MitC8.1.A, *L. rhamnosus* LABNo:3A, *L. paracasei* LAB6.3.B, *L. rhamnosus* MRSA2.2, *L. casei* LAB6.5.A, *L. fermentum* MRSC7.3, *L. rhamnosus* MRSA2.1, *L. rhamnosus* MRSA3.2, *L. rhamnosus* LAB1.1.B izolatlarının hayatta kalma yüzdelerinin düştüğü görülmektedir. Buna rağmen tüm izolatların hayatta kalma oranı %50'nin üzerindedir (Şekil 3.5). Bu sonuçlar García-Ruiz vd., (2014) sonuçlarıyla uyumludur.

pH 2'de ise hayatta kalma yüzdeleri düşmüştür. *L. rhamnosus* LAB1.4.B izolatı 3. saatin sonunda *L. casei* LAB6.3.A izolatı ise 4. saatin sonunda üreme göstermemiştir. 4. saatin sonunda %80 ve üzerinde hayatta kalma oranına sahip olan izolatlar: *L. rhamnosus* CA1.4.b, *L. fermentum* MRSC7.2, *L. fermentum* MRSC8.1, *L. plantarum* MRSC6.2, *L. rhamnosus* LAB1.5.1.A, *L. fermentum* Mit C7.2.2, *L. rhamnosus* LAB11.1.A, *L. fermentum* MRSC8.3, *L. rhamnosus* LAB1.5.1.B, *L. rhamnosus* LAB1.3.1.B, *L. casei* LABNo:3B, *L. rhamnosus* LAB1.4.A, *L. casei* LAB1.3.1.A, *L. fermentum* BHIC7.4, *L. salivarius* MitC8.1.b, *L. rhamnosus* MRSA2.1, *L. rhamnosus* LAB1.1.B, *L. paracasei* LAB6.2.A, *L. paracasei* LAB6.2.B, *L. rhamnosus* M17 6.1.2 (Şekil 3.6). Strahinic vd., (2007) ağız boşluğundan izole ettikleri *L. salivarius* izolatının pH 2'de 4 saatlik

inkübasyon sonunda %80 hayatta kalma oranına sahip olduğunu göstermiştir. Bao vd., (2010) *L. fermentum* izolatlarının aynı şartlarda hayatta kalma oranlarının %91-80,4 arasında değiştiğini bildirmiştir. Aynı tür laktik asit bakterilerinin farklı direnç seviyelerinde olmaları, probiyotik özelliklerin suş spesifik olduğunu göstermektedir (Ramos vd., 2013; Collado vd., 2012).

LAB'lerinin pankreatin direnci 4. saatlik inkübasyon sonunda oluşturdukları optik yoğunluğa bakılarak değerlendirilmiştir. Buna göre tüm izolatların yüksek hayatta kalma oranlarına sahip olduğu görülmüştür. (Şekil 3.7). En düşük oran (%79,6) *L. rhamnosus* 4.1.Y izolatına aittir. Bengoa vd., (2018) kefirde izole ettikleri *L. paracasei* izolatlarının aynı konsantrasyondaki pankreatin direncini incelemiştir. Bu çalışmadaki sonuçlar, elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumludur.

LAB'lerinin safra tuzu direnci geniş bir konsantrasyon aralığında (%0,08-5) incelenmiştir. Bunun nedeni daha önceki yapılan çalışmalarda kullanılan safra tuzu konsantrasyonunun farklılık göstermesidir. Argyri vd., (2013) %0,5; Cao vd., (2018) %0,3; %0,08 ve Taheur vd., (2016) %0,3, %0,5 ve %1; Koll vd., (2008) %0,08-5 oranında safra tuzu konsantrasyonlarını kullanmışlardır. %0,08 safra tuzu konsantrasyonunda tüm LAB gelişmiştir (Şekil 3.8). %0,16 safra tuzu konsantrasyonunda ise LAB1.2.A, *L. salivarius* MitC8.1.A, *L. salivarius* MitC8.1.B, *L. rhamnosus* LAB1.1.B, *L. paracasei* LAB6.2.A, *L. paracasei* LAB6.2.B, *L. rhamnosus* M176.1.2 ve *L. rhamnosus* 4.1.Y numaralı izolatlar haricinde diğer izolatlar gelişme göstermiştir (Şekil 3.9). %0,3 safra tuzu konsantrasyonunda *L. rhamnosus* CA1.4 b), *L. plantarum* MRSC6.1, *L. fermentum* MRSC7.2, *L. fermentum* MRSC8.1, *L. plantarum* MRSC6.2, *L. rhamnosus* LAB1.5.1.A, *L. fermentum* MitC7.2.2, *L. rhamnosus* LAB11.1.A, *L. fermentum* MRSC8.3, *L. fermentum* MRSC7.1, *L. rhamnosus* LAB1.5.1.B, *L. casei* LABNO:3B, *L. rhamnosus* LAB1.4.A, *L. fermentum* BHIC7.4 izolatları gelişme göstermiştir. 4 saatlik inkübasyon süresi ince bağırsakta geçirilen süreyi yansıttığı için bu sürede bakterilerin canlılıklarını koruması probiyotik aktivite için önemlidir (Taheur vd., 2016). Ancak bazı çalışmalarda inkübasyon süresi 24 saate kadar uzatılmıştır (KAYNAK). İnkübasyon sonunda bazı bakterilerinin gelişmelerini sürdüremedikleri görülmüştür. Bunlar: *L. rhamnosus* (LAB3.2.A, LAB1.1.A, LAB1.3.2.B, LAB1.2.B, LAB1.4.B, LAB1.3.1.B) izolatlarıdır (Şekil 3.10). %0,6 safra tuzu konsantrasyonunda ise %0,3'lük konsantrasyonda gelişme gösteren izolatlardan, *L. rhamnosus* LAB11.1.A ve *L. fermentum* (BHIC7.4, MRSC7.2) haricinde diğer izolatlar gelişmiştir (Şekil 3.11). %1,25 safra tuzu konsantrasyonunda

gelişme gösteren izolatlar: *L. plantarum* (MRSC6.1, MRSC6.2), *L. fermentum* (MRSC7.2, MRSC8.1, MitC7.2.2, MRSC8.3, MRSC7.1) *L. rhamnosus* (LAB1.4.A, LAB3.2.A, LAB1.2.B) olmuştur (Şekil 3.12). Aynı izolatlar %2,5 ve %5 safra tuzu konsantrasyonlarında da gelişme göstermiştir (Şekil 3.13, Şekil 3.14). Bu sonuçlar çalışmamızda elde edilen LAB'lerinin safra tuzu direncinin artan konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığını göstermiştir. En yüksek konsantrasyonda canlılıklarını koruyabilen *L. fermentum*, *L. rhamnosus* ve *L. plantarum* izolatları olmuştur. Fuochi vd., (2016) oral *L. fermentum* izolatlarının %0,5 safra tuzunda canlılıklarını koruduğu göstermiştir. Koll vd., (2008) bazı oral *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* izolatlarının %5, bazı *L. fermentum* izolatlarının ise %2,5'lik safra tuzunda canlılıklarını koruduğunu bildirmiştir. Bu veriler çalışmamızda elde edilen sonuçlarla uyumludur.

Safra bağırsağın savunma mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. Patojen bakterilere karşı inhibitör etkisi safra tuzu konsantrasyonu ile belirlenmektedir (Charteris vd., 2000). Bu nedenle laktik asit bakterilerinin probiyotik potansiyelleri araştırmalarında bakterilerin safra tuzu direnci önemli bir karakteristik özelliştir (Reyes-Nava vd., 2016). İnsan safrasının fizyolojik konsantrasyonu %0,3-%0,5 arasındadır (García-Ruiz vd., 2014). Bu nedenle potansiyel probiyotik aday bakterilerin bu konsantrasyonlarda canlılıklarını koruması beklenmektedir.

Çalışmamızda izole edilmiş LAB'lerinin gastrointestinal sistemdeki zorlu koşullara dirençli olduğu görülmektedir. Ancak konağa yararlı etkilerini gösterebilmesi için bakterilerin bağırsak ya da ağız gibi mukozal yüzeylere adezyonu önemlidir. Bu amaçla LAB'lerinin otoagregasyon, koagregasyon aktiviteleri ile hücre-yüzey hidrofobisite özellikleri incelenmiştir.

LAB'lerinin tamamının otoagregasyon aktivitesi gösterdiği görülmüştür (Şekil 3.15). Türler içinde en yüksek ve en düşük aktivite gösteren izolatlar: *L. rhamnosus* izolatları içinde LAB11.1.A (%99,2), MRSA3.1 (%61,06); *L. casei* izolatları içinde LAB1.3.B (%98,28), LAB6.1.A (%59,50); *L. paracasei* izolatları içinde LAB6.2.A (%88,92), LAB6.3.B (%50,50); *L. salivarius* izolatları MitC8.1.A (%59,19), MitC8.1.B (%57,26); *L. fermentum* izolatları içinde BHIC7.4 (%95,59), MRSC7.3 (%19,4); *L. plantarum* izolatları MRSC6.1 (%92,4), MRSC6.2 (%74,52) olmuştur. Zakaria (2013), *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum* ve *L. rhamnosus* izolatlarının %51-78,17 arasında otoagregasyon aktivitesi gösterdiğini bildirmiştir. Campana vd., (2017) *L. salivarius* (%19,33), *L. casei* (15,92), *L. plantarum* (%15,03) ve *L. rhamnosus* (%21,08)

otoagregasyon aktivitelerini göstermiştir. Guan vd., (2017) ise fermente süttten izole edilen *L. plantarum* izolatının otoagregasyon aktivitesinin 24 saat sonunda %87,74 olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçların çok daha yüksek olması bakterilerin orijini ile ilgilidir. Bakterilerin otoagregasyon aktivitesinin yüksek oluşu biyofilm içinde bulunma oranlarını arttırmıştır (Tablo 3.4).

Koagregasyon aktivitesi patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu engelleyebilen bir özellik olduğu için probiyotik bakterilerde aranan bir özelliktir (Kos vd., 2003). LAB'lerinin *E. coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 2575 bakterileri ile koagregasyon aktivitesi incelenmiştir (Tablo 3.8). *L. fermentum* (MRSC7.1, MRSC7.2, MitC7.2.2), *L. rhamnosus* (CA1.4.b, LAB1.2.B, LAB1.5.1.B), *L. plantarum* (MRSC6.1), *L. paracasei* (LAB6.2.A), *L. casei* (LAB1.3.B) izolatları seçilen patojenler ile koagregasyon yapmamıştır. Patojenlerin en yüksek ve en düşük koagregasyon aktivitesi gösterdiği izolatlar: *E. coli* için *L. rhamnosus* MRSA2.1 (%64,44), *L. paracasei* LAB6.1.B (%2,33); *S. aureus* için *L. paracasei* LAB6.3.B (%94,79), *L. plantarum* MRSC6.2 (%1,16); *S. mutans* için *L. rhamnosus* LABNo:3A (%90,9), *L. rhamnosus* LAB1.5.1.A (%3,48). Campana vd., (2017) *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 ile *L. rhamnosus* (%11,0), *L. plantarum* (%10) koagregasyon oluşturduğunu, *L. salivarius* ile oluşturmadığını bildirmiştir. Guan vd., (2017) *E. coli* DH5 $\alpha$ 'nın *L. plantarum* ile (%27,76), Gupta ve Bajaj (2018) fermente gıdadan izole edilen *L. plantarum* izolatının *Bacillus cereus* (%82,7), *S. aureus* (%87,1), *Enterococcus faecalis* (%92,4) oranlarında koagregasyon aktivitesi gösterdiğini bildirmiştir. Laktobasillerin hücre yüzey yapıları çok çeşitlidir ve çevresel etkilere karşı modifiye olabilmektedir (Sengupta vd., 2013). Bu bilgiler ve daha önce yapılan çalışmaların ışığında LAB'lerinin koagregasyon aktivitesinin suşa ve patojen bakteriye özgü olduğunu görülmektedir.

LAB'lerinin adezyonunda etkili olan diğer parametre hücre yüzeyinin hidrofobik etkileşimleridir (Servin ve Coconnier, 2003). LAB'lerinin n-hekzadekan (apolar), etil asetat (monopolar ve bazik) ve kloroform (monopolar ve asidik) çözücülerine hidrofobisiteyi incelenmiştir (Şekil 3.16). %0-35 düşük, %36-70 orta ve %71-100 yüksek hidrofobisite olarak değerlendirilmiştir (Samot vd., 2011). Buna göre LAB'lerinin tamamı n-hekzadekana yüksek hidrofobisite göstermiştir. Etil asetata 13 izolat yüksek, 26 izolat orta ve 5 izolat düşük; kloroforma ise 31 izolat yüksek, 7 izolat orta, 6 izolat düşük hidrofobisite göstermiştir. Etil asetat için en yüksek *L. rhamnosus* LAB1.4.A

(%106,3), en düşük *L. fermentum* MRSC7.3 (%22,69) izolatları hidrofobisite göstermiştir. Genel olarak LAB'lerinin en az hidrofobisite gösterdiği çözücü etil asetat olmuştur. Samot vd., (2011) *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum* ve *L. paracasei*'nin de içinde olduğu oral laktik asit bakterisi izolatları ile yaptıkları çalışmada kloroform ve hekzadekana düşük hidrofobisite olduğunu bildirmiştir. Ancak Piwat vd., (2015) oral laktik asit bakterilerinin (*L. casei*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*) ksilen, kloroform ve etil asetata hidrofobisiteilerinin orta-yüksek değerlerde olduğunu göstermiştir. En düşük etil asetata, en yüksek kloroforma hidrofobisite göstermesi bizim bulgularımızla uyumludur. Ji vd., (2015) yeni doğan dışkı ve kimchiden izole edilen laktik asit bakterilerinin n-hexadekan ve kloroforma %90'ının üzerinde hidrofobisite gösterdiğini bildirmiştir. Bu veriler de sonuçlarımızla örtüşmektedir.

Bakteriyel kolonizasyonda ilk basamak konak dokularına adezyondur. Probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin konağın mukozal yüzeylerine bağlanabilmesi en önemli özelliklerden biridir (FAO/WHO, 2002). Hidrofobisitenin de bakteri hücre yüzeyi elektriksel yükü gibi adezyon üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (Piwat vd., 2015). Ayrıca agregasyon kapasitesinin adezyon özelliği ile ilişkili olduğu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Collado vd., 2008; Xu vd., 2009; Tuo vd., 2013). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda izole edilen LAB'lerinin konak epitel hücrelerine bağlanabilecek potansiyelde olduğu görülmektedir.

LAB'lerinin enzim aktiviteleri API ZYM (Biomerieux) ile belirlenmiştir. API ZYM 19 farklı hidrolaz enzimini içeren, bakterilerin enzim profillerini çıkarmak için kullanılan hızlı, kolay ve tekrarlanabilir bir tekniktir (Arora vd., 1990). Lösin, valin arilamidaz ve naphthol-AS-BI fosfohidrolaz enzim aktivitesinin izolatların tamamında değişen seviyelerde bulunduğu görülmüştür (Tablo 3.9). N-asetil- $\beta$ -glukozaminidaz aktivitesinin sadece 3 izolatta (*L. rhamnosus* LAB 1.4.A, *L. plantarum* MRS Ç6.1 ve MRS Ç6.2), tripsin aktivitesinin ise *L. rhamnosus* LAB1.4.B izolatında en düşük seviyede olduğu görülmektedir. Sistein arilamidaz *L. fermentum* (MitC7.2.2, MRSC7.3, BHIC7.4) izolatları dışında tüm izolatlarda; asit fosfataz ise *L. paracasei* LAB7.7 dışında tüm izolatlarda bulunmuştur. *L. fermentum* (MitC7.2.2, MRSC8.3, MRSC7.1, MRSC8.1, MRSC7.2, BHIC7.4, MRSC7.3), tüm *L. salivarius* izolatları, *L. paracasei* LAB6.3.B, *L. casei* LAB6.1.A ve *L. rhamnosus* 4.1.Y izolatları  $\alpha$ -galaktosidaz pozitifdir.

Tüm LAB'lerinde  $\beta$ -galaktosidaz enziminin yüksek oranda bulunduğu görülmüştür. Bu enzimler laktoz intoleransına fayda sağlayan enzimlerdir (Bassyouni vd., 2012;). Laktoz intoleransı semptomlarını azalttığı bildirilmiştir (Hussain vd., 2008). Ayrıca galakto-oligosakkaritlerin oluşmasını sağlayarak bağırsaktaki probiyotik bakterilerin gelişimini ve kolonizasyonunu desteklemektedir.  $\beta$ -galaktosidaz enzimini varlığı süt ürünleri teknolojisinde asidifikasyonu sağladığı için önemlidir. (Monteagudo-Mera vd., 2011). Daha önce yapılan çalışmalarda bazı laktik asit bakterilerinde API ZYM ile  $\beta$ -galaktosidaz enzimi varlığı bildirilmiştir (Taheur, vd., 2016; Bassyouni vd., 2012; Colombo vd., 208).

$\alpha$ -glukosidaz *L. fermentum* (MitC7.2.2, BHIC7.4), *L. paracasei* LAB6.3.B ve *L. salivarius* MitC8.1.A dışında diğer izolatlarda pozitifdir. Bu enzim karbonhidratların sindirimini son basamağını katalizlemektedir. Probiyotik amaçla kullanılacak bakteriler için yararlı bir özelliktir (Monteagudo-Mera vd., 2011).

Probiyotik bakterilerinin insan sağlığı için güvenli olması zararlı enzimler içermemeleri ile ilişkilidir.  $\beta$ -glukuronidaz bazı karsinojenlerin proksimal karsinojenlere dönüşümüne neden olarak kolon kanseri oluşumunu uyarmaktadır (Gill vd., 2002). Dolayısıyla laktik asit bakterilerinde bulunması istenmeyen bir enzimdir. Çalışmamızdaki tüm izolatlar  $\beta$ -glukuronidaz negatiftir. Benzer sonuçları Nguyen vd., (2005) bildirmiştir. Karakaş-Şen vd., (2018) ise *L. fermentum* ve *L. rhamnosus* izolatlarında düşük seviyede (1 nmol)  $\beta$ -glukuronidaz tespit etmiştir.

LAB'lerinin proteolitik aktivitesi serbest tirozin miktarı baz alınarak hesaplanmıştır. Buna göre en düşük aktivitenin 0,035 mg/ml *L. casei* LAB6.1.A; en yüksek aktivite ise 0,665 mg/ml *L. rhamnosus* LAB1.2.A izolatına ait olduğu görülmüştür (Tablo 3.10). Kıvanç vd., (2011) *L. plantarum* izolatlarının aktivitelerinin 0,04-2,5 mg/ml arasında olduğunu bildirmiştir ve düşük proteolitik aktiviteli izolatlar olarak tanımlamıştır. Buna göre çalışmamızdaki izolatlar da düşük aktiviteye sahiptir. Kefirden izole edilen *L. plantarum* izolatlarının 0,06-0,59 mg/ml, *L. paracasei* izolatının ise 0,1 mg/ml olduğu bildirilmiştir (Kıvanç, 2015). Laktik asit bakterileri diğer bakteri gruplarına göre daha düşük proteolitik özellikte olsa da, gösterdikleri proteolitik aktivite fermente süt ürünlerinin organoleptik özelliklerinin gelişimi için önemlidir (Savijoki vd., 2006).

Hidrojen peroksit laktik asit bakterileri tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerden biridir. Ayrıca oral biyofilmlerde bakteriyel DNA salınımını arttırarak



bakteriler arasında gen alışverişini sağladığı bilinmektedir (Kreth vd., 2009). Çalışmamızda izole edilen laktik asit bakterilerinden en düşük hidrojen peroksit üretimi ( $H_2O_2$ ) 0,056 mg/ml *L. salivarius* MitC8.1.a izolatına; en yüksek üretim miktarı ise 0,961 mg/ml *L. fermentum* MRSC7.1 izolatına aittir (Tablo 3.11). Er vd., (2019) vajinal laktik asit bakterilerinin 0,308-0,863 mg/ml  $H_2O_2$  ürettiğini bildirmiştir. Bozadan izole edilmiş *L. plantarum* izolatlarının  $H_2O_2$  üretimlerinin 0,75-2,18 mg/ml arasında olduğu, kefirde izole edilen *L. plantarum* izolatlarının 0,01-0,21 mg/ml, *L. paracasei* izolatının ise 0,69 mg/ml  $H_2O_2$  ürettiği gösterilmiştir (Kıvanç vd., 2011; Kıvanç vd., 2015). Sookkhee vd., (2001) tetrametilbenzidin ve horseradish peroksidaz içeren besiyerinde mavi renk oluşumuna bağlı olarak laktik asit bakterilerinin  $H_2O_2$  üretimini incelemiştir. *L. paracasei* ve *L. rhamnosus* izolatlarının  $H_2O_2$  üreticisi olduğu bildirilmiştir. Bu da bizim sonuçlarımızla uyumludur.

Laktik asit bakterileri karbonhidrat metabolizması sonucu laktik asit üretmektedir (Kandler, 1983). Oral mikrobiyotadaki laktik asit üretimi patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etki sağlasa da diş çürüğüne neden olduğu bilinmektedir (Harper ve Loesche, 1984; Karpinski ve Szkaradkiewicz, 2013). Çalışmamızda izole edilen LAB'lerinin laktik asit üretimi titrasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Buna göre en düşük laktik asit üretimi %0,306 *L. fermentum* MRSC7.1 izolatına; en yüksek üretimi ise %1,062 *L. casei* LAB6.3.A izolatına aittir (Tablo 3.12). Toptaş vd., (2014) oral laktik asit bakterilerinin laktik asit üretimini incelemişlerdir. Çalışmada en yüksek üreticinin *L. brevis* olduğunu ve optimum üretim koşullarında 72 saat sonunda 45,3 g/l laktik asit ürettiğini göstermiştir.

Oksidatif stres yüksek seviyedeki reaktif oksijen türleri ve düşük antioksidan aktivitesi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmaktadır (Preiser, 2012). Bu reaktif oksijen türlerinin seviyesi vücuttaki radikal yakalayıcıları aştığında hücreler oksidasyondan zarar görmektedir. Vücudun sınırlı antioksidan kapasitesinin artırılması için dışardan desteklenmesi gerekmektedir. Bu sebeple oksidatif stresin kontrolü için diyetle birlikte antioksidan takviye alınması önemlidir (Tang vd., 2017). Çalışmamızda izole edilen LAB'lerinin DPPH ve ABTS serbest radikallerini yakalama aktiviteleri incelenmiştir. DPPH serbest radikali yakalama aktivitesinin kültür süpernatantında (KS) en yüksek değerlerde olduğu görülmüştür. KS aktivitesi en düşük olan (%60,09) izolat *L. rhamnosus* LAB 1.5.1.A; en yüksek (%116,70) *L. rhamnosus* M17 6.1.2 olmuştur. Hücre süspansiyonunda en düşük aktivite (%1,81) LAB 1.4.B; en yüksek aktivite (%92,14) *L.*

*rhamnosus* MRS A2.2 izolatına aittir. Sonike edilmiş hücre süspansiyonunda (SHS) aktivitesi en düşük izolat (%8,60) *L. rhamnosus* LAB 1.4.B; en yüksek aktivite (%68,65) gösteren ise *L. rhamnosus* M17 6.1.2 olmuştur.

Ugantsetseg ve Batjargal (2014) *L. paracasei*, *L. plantarum* izolatlarının hücresiz kültür süpernatantlarının DPPH yakalama aktivitesininin %30,5-38,4 arasında olduğunu bildirmiştir. Ding vd., (2017) *L. plantarum* M111'in hücre süspansiyonunun %17,79, *L. paracasei* S50'nin ise %20,09 aktivite gösterdiğini bildirmiştir. Ji vd., (2015) *L. paracasei* ve *L. casei* izolatlarının hücresiz filtratlarının aktivitesinin %50 ve üzerinde olduğunu göstermiştir. Chooruk vd., (2017) oral laktik asit bakterisi izolatlarının hücre süspansiyonlarının ve sonike edilmiş süspansiyonlarının DPPH yakalama aktivitesinden daha yüksek olduğunu göstermiştir. İzolatların ortalama değerleri: *L. paracasei* %34,65; *L. casei* %29,40; *L. rhamnosus* %28,40, *L. fermentum* %27,2; *L. salivarius* %26,10'dur. Tang vd., (2017) *L. plantarum*'un kültür süpernatantının (%85,57) ve hücre süspansiyonunun (%83,93) yüksek aktiviteye sahipken; sonike edilmiş hücre ekstraktında aktivitenin düştüğünü (%40,42) göstermiştir. Bu sonuçlar çalışmamızda elde edilen bulgular ile uyumludur. Çalışmamızda en yüksek aktivitenin kültür süpernatantından elde edildiği bulgusu, Cao vd., (2018)'nin *L. plantarum* izolatlarının kültür süpernatantının en yüksek aktiviteyi gösterdiğini bildirmesi ile doğrulanmıştır.

ABTS yakalama aktivitesi kültür süpernatantında en düşük olan (%52,58) izolat *L. casei* LAB 6.3.A; en yüksek aktivite (%89,41) gösteren ise *L. rhamnosus* M17 6.1.2'dir. Hücre süpernatantı aktivitesi en düşük (%1,81) izolat *L. rhamnosus* LAB 1.4.B; en yüksek (%91) *L. rhamnosus* MRS A2.2'dir. Sonike edilmiş hücre süspansiyonunda aktivitesi en düşük izolat (%8,60) *L. rhamnosus* LAB 1.4.B; en yüksek aktivite (%90,93) gösteren izolat ise *L. rhamnosus* MRS A2.2 olmuştur. Ji vd., (2015) *L. paracasei* ve *L. casei* izolatlarının hücresiz filtratlarının aktivitesinin %60 ve üzerinde olduğunu göstermiştir. Cao vd., (2018) *L. plantarum* izolatlarının en yüksek (%50) ABTS yakalama aktivitesinin kültür süpernatantında gösterdiğini bildirmiştir. Son vd., (2018) *L. paraplantarum* SC61 ve *L. rhamnosus* GG'nin hücre süspansiyonlarının aktivitesinin sırasıyla %17,32 ve %19,38 olduğunu göstermiştir. Shi vd., (2018) peynirden izole edilen *L. plantarum*, *L. paracasei* izolatlarının kültür süpernatantlarının aktivitesinin %15,38-55,38 arasında değiştiğini bildirmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızda elde edilen sonuçlardan daha düşüktür.

En yüksek DPPH ve ABTS serbest radikali yakalama aktivitesi tüm izolatların kültür süpernatantında görülmüştür. Bu durumun kültürde biriken metabolitlerden

ve/veya mikrobiyal olarak modifiye edilen besiyeri bileşenlerinin izolatların antioksidan aktivitelerini arttırdığı düşünülmüştür. Ayrıca bazı izolatlarda sonike edilmiş hücre süspansiyonun aktivitesinin düşmesi ise laktik asit bakterilerinin antioksidan aktivitesinde hücre yüzey proteinlerinin ve polisakkaritlerinin rol oynamasına bağlanmıştır (Cao vd., 2018).

Probiyotik özellikteki LAB'lerinin kommensal mikrobiyota üzerinde etkili olabilmesi için antimikrobiyal madde üretimi ya da rekabet yeteneği ile patojen bakterilere antagonistik etki göstermesi gerekmektedir (Saarela vd., 2000). Laktik asit bakterilerinin ürettikleri bakteriyosinlerin yakın türlere ve bazı Gram negatif türlere karşı da etkili olduğu bildirilmiştir (Naghmouchi vd., 2010; Todorov ve Dicks, 2005). Çalışmamızda izole edilen LAB'lerinin süpernatantlarının pH değerleri 5,6'ya ayarlanarak asiditeye bağlı olarak ortaya çıkabilecek antimikrobiyal etki elimine edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite yine çalışmamızda izole edilen bakteri ve mayalara karşı denenmiştir. Bu amaçla *Staph. epidermidis* BHIC1.2, *S. salivarius* M17A1.2, *S. parasanguinis* LAB8.2.B, *Staph. aureus* KA5.1, *Rothia dentocariosa* KAA7.2, *Neisseria flavescens* KAA1.1.2, *Bacillus subtilis* M176.2(2), *Staph. warneri* M1714.1, *S. mutans* M173.1, *N. perflava* BHIA7.a, *Enterococcus faecium* M179.2.1, *Corynebacterium argentoratense* KA4.1(2), *Candida albicans* MRSA4.1, *Candida tropicalis* BHIC8.2.1, *Cryptococcus laurentii* MRSA4.2, *Candida norvegensis* MitA5.2 numaralı izolatlar seçilmiştir. Ancak LAB süpernatantları seçilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki göstermemiştir. Bu sonuç izole edilen LAB'lerinin bakteriyosin üreticisi olmadığını göstermektedir. Literatürde ağız sağlığı için kullanılacak probiyotiklerin araştırılması çalışmalarında oral patojenler olarak bilinen *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola* ve *S. mutans* kullanılmıştır (Bosch vd., 2011). *S. mutans* dışında diğer türler için gereken anaerobik şartlar sağlanamadığından bu türler çalışmamızda patojen olarak kullanılamamıştır. Bosch vd., (2011) ağız boşluğundan izole edilen 46 adet *L. reuteri* izolatından 34 tanesinin *S. mutans*'a antagonistik etki gösterdiğini bildirmiştir. Başka bir çalışmada *L. paracasei* subsp. *paracasei* ve *L. rhamnosus* izolatlarının filtratlarının ağızdan izole edilen *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *Staph. aureus*, *A. viscosus*, *P. gingivalis*, *C. albicans* ve *C. tropicalis*'e karşı antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Filtratların pH değerleri 7'ye çıkarıldığında ve katalaz uygulaması yapıldığında etkinin %10-20 arasında düştüğü görülmüştür. Bu şekilde etkinin sadece H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve organik asit kaynaklı olmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca *L.*

*paracasei* subsp. *paracasei* D14 izolatının sadece mayalara, *L. paracasei* subsp. *paracasei* N14 ve *L. rhamnosus* L7 izolatlarının ise sadece bakterilere karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Sookhee vd., 2001). Çalışmamızda LAB'lerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üreticisi olduğu fakat seçilen mikroorganizmaların inhibisyonuna yeterli olmadığı görülmüştür.

Probiyotik bakterilerin sahip olması gereken en önemli güvenlik kriterlerinden biri transfer edilebilir antibiyotik direnç genleri taşımamasıdır (FAO/WHO, 2002). Bu genlerin yatay gen transferi ile bakteriler arasında yayılması kullanılan antibiyotiklere karşı bakterilerin direnç geliştirmesine neden olabilmektedir (Saarela vd., 2000). Bu nedenle potansiyel probiyotiklerin antibiyotik duyarlılıklarının incelenmesi gerekmektedir. Bu amaçla mikro dilüsyon ve otomatize yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Disk difüzyon ve gradient difüzyon yöntemleri ise kolay uygulanabilir ve ucuz olmasından dolayı tercih edilmektedir (Jorgensen ve Ferraro, 2009).

Çalışmamızda bakterilerin kanamisin, linezoid, tetrasiklin, sefalotin, ampisilin, eritromisin, klindamisin ve imipenem, metisilin, penisilin, netilmisin, kloramfenikol, okzasilin, streptomisin, amikasin, vankomisin, metronidazol, gentamisin ve sülfometoksazol+trimethoprim olmak üzere toplam 19 antibiyotiğe karşı duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Tablo 3.13). LAB'lerinin tamamının protein sentezi inhibitörleri kloramfenikol, linezoid, tetrasiklin, eritromisin, klindamisine; hücre duvarı sentezi inhibitörleri olan sefalotin, ampisilin ve imipeneme karşı yüksek seviyede duyarlı olduğu görülmüştür. Koll vd., (2008) oral laktik asit bakterilerinde eritromisin, tetrasiklin duyarlılığını bildirmiştir. Eritromisin ve tetrasiklin direnci plazmid ve transpozonlarda taşındığı için bakteriler arasında direncin yayılması olasılığı mevcuttur (Axelsson vd., 1988; Gevers vd., 2003). Bu açıdan çalışmadaki LAB'lerinin güvenli olduğu söylenebilir. Delgado vd., (2005) insan dışkısından izole ettikleri beş *L. rhamnosus* izolatının ikisinde klindamisin direnci tespit etmiştir. Coppola vd., (2005) peynirden izole edilen *L. rhamnosus* izolatlarının imipeneme duyarlı olduğunu bildirmiştir.

Metronidazol ve vankomisine karşı tüm LAB'leri direnç göstermiştir. Aynı sonuçlar Koll vd., (2008) tarafından da gösterilmiştir. Metronidazol direnci *Lactobacillus* cinsinde hidrogenaz aktivitesi olmadığı için cinse özgü doğal bir özelliktir (Church vd., 1999). Vankomisin direncinin de aynı şekilde *Lactobacillus* için doğal bir özellik olduğu gösterilmiştir. Direncin hücre duvarı peptidoglikan öncülerinin sentezinin vankomisinin bağlanmadığı D-alanin ve D-laktat ile sonlanmasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur

(Handwerger vd., 1994). Koll vd., (2008) oral laktik asit bakterilerinde vankomisin ve metronidazol direnci görüldüğünü bildirmiştir.

Çalışmamızda sülfometoksazol+trimethoprim, amikasin, penisilin, metisilin, kanamisin, netilmisin, streptomisin, okzasilin ve gentamisin antibiyotiklerine duyarlılıkların izolatlar arasında değişkenlik gösterdiği görülmektedir. İzolatların büyük çoğunluğunun sülfometoksazol+trimethoprim dirençli olduğu 7 izolatın ise (*L. plantarum* MRSC6.2, MRS C6.1; *L. fermentum* MRSC7.2, MRSC7.1, BHIC7.4; *L. rhamnosus* CA1.4.b; *L. salivarius* MitC8.1.a) düşük oranda (13-18 mm zon çapı) duyarlı olduğu görülmüştür. Rojo-Bezares vd., (2006) şaraptan izole edilen *L. paracasei* izolatlarının sülfometoksazol+trimethoprim dirençli olduğunu göstermiştir.

LAB'lerinin yüksek oranda penisiline duyarlı olduğu, izolatlardan 8 tanesinin (*L. rhamnosus* LAB1.4.B, MRSA3.2; *L. casei* LAB1.3.A; *L. plantarum* MRSC6.2, *L. fermentum* MRSC7.2, MRS C7.3, MRSC7.1; *L. paracasei* LAB6.2.B) dirençli olduğu belirlenmiştir. LAB1.3.A, MRSC7.2, MRS A3.1 izolatlarının düşük seviyede (10-16 mm zon çapı) kanamisine duyarlı olduğu; diğer tüm izolatların ise dirençli olduğu görülmüştür. Benzer şekilde kanamisin direnci D'Aimmo (2007) tarafından bildirilmiştir. Temmerman vd., (2002) probiyotik ürünlerdeki bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarını disk difüzyon yöntemi ile inceledikleri çalışmada izolatların %23'ünün penisiline, %79'unun kanamisine, %8,5'inin kloramfenikole dirençli olduğunu bildirmiştir.

Amikasin (34 izolat, %77,27) netilmisin (27 izolat, %54,54), okzasilin (23 izolat, %52,27) ve gentamisin (27 izolat, %54,54) direncinin izolatlar arasında yaygın olduğu, metisilin (20 izolat, %45,45) ve streptomisin (20 izolat, %45,45) direncinin ise daha düşük olduğu görülmüştür. Bu sonuçlardan farklı olarak Gad vd., (2014) probiyotik ürünlerdeki laktik asit bakterilerinin %17,4'ünde streptomisin direnci, %20,3'ünde penisilin direnci olduğunu bildirmiştir. Bizim sonuçlarımıza benzer olarak Ertekin ve Çon vd., (2014) gıdalardan izole edilen *L. plantarum* ve *L. paracasei* izolatlarının tamamının gentamisin, kanamisin streptomisine dirençli olduğunu göstermiştir. Charteris vd., (1998) 46 laktik asit bakterisi izolatının tamamının amikasin, gentamisin, kanamisin, streptomisin, sülfometoksazol, trimethoprim, metronidazol ve vankomisine dirençli olduğunu, bir *L. casei* izolatında eritromisin ve klindamisin direnci tespit edildiğini bildirmiştir. Aynı çalışmada netilmisin direncinin izolatlar arasında değişkenlik gösterdiği bulunmuştur. Başka bir çalışmada 19 *Lactobacillus* sp. izolatlarının ampisilin,

penisilin, sephalotine duyarlı oldukları fakat okzasiline direnç gösterdikleri bildirilmiştir (Rodriguez-Alonso, 2009).

Elde edilen sonuçlar antibiyotiklerin etki mekanizmalarına göre değerlendirildiğinde hücre duvarı sentezi inhibitörleri olan penisilin, metisilin, okzasilin, ampisilin, vankomisin, sephalotin ve imipenem arasında izolatların en fazla direnç gösterdikleri vankomisin (izolatların tamamı), en duyarlı oldukları ise imipenem ve ampisilin (izolatların tamamı) olmuştur. Protein sentezini ribozomun 30S alt ünitesine bağlanarak inhibe eden tetrasiklin, gentamisin, kanamisin, streptomisin, netilmisin, amikasin arasında izolatların en fazla direnç gösterdiği kanamisin (40 izolat, %90,9), tamamının duyarlı olduğu tetrasiklin en duyarlı oldukları antibiyotik olmuştur. Protein sentezini ribozomun 50S alt ünitesine bağlanarak inhibe eden kloramfenikol, klindamisin ve eritromisine ve protein sentezinin başlacını inhibe eden linezoide tamamı duyarlıdır. DNA sentezini inhibe eden metronidazole karşı bütün izolatlar direnç gösterirken folik asit sentezini inhibe eden sülfometoksazol+trimethoprime karşı 36 izolatın (%81,81) dirençli olduğu görülmüştür. Bu bilgiler ışığında laktik asit bakterileri arasında ortaya çıkan antibiyotik duyarlılığının türler ve suşlar arasında değişkenlik gösterdiği görülmüştür.

LAB'lerinin antibakteriyal etkilerinin incelenmesi seçilen *Staphylococcus epidermidis* BHIC1.2, *Staphylococcus aureus* KA5.1 ve *Staphylococcus warneri* M1714.1'de metronidazole direncinin ortak olduğu görülmüştür. Ancak *S. warneri* M1714.1 amikasin, metisilin, streptomisin, okzasilin, gentamisine de direnç göstermiştir. *Streptococcus parasanguinis* LAB8.2.B ve *S. mutans* M173.1 amikasin, metisilin, kanamisin, netilmisin, streptomisin, okzasilin, gentamisin, metronidazole karşı dirençlidir. *S. salivarius* M17A1.2 ise metronidazole dirençliyken diğer antibiyotiklere düşük duyarlılık (8-16 mm) göstermiştir. Sağlıklı çocuklardan izole edilen oral streptokokların antibiyotik direncinin incelendiği bir çalışmada izolatların %16'sında penisilin, %23,2'ünde eritromisin, %25,9'unda gentamisin, %52'sinde ise tetrasiklin direnci saptanmıştır (Rozkiewicz vd., 2006). *Bacillus subtilis* M176.2(2) tüm antibiyotiklere duyarlıdır fakat metronidazole ve klindamisine düşük duyarlılık (8-10 mm) göstermiştir. *Enterococcus faecium* M179.2.1 ise amikasin ve metronidazole dirençlidir. Gentamisin, okzasilin, netilmisin, kanamisin, metisiline ise düşük duyarlılık göstermiştir. *Rothia dentocariosa* KAA7.2 ve *Corynebacterium argentoratense* KA4.1(2) amikasin, metisilin, kanamisin, netilmisin, streptomisin, okzasilin, gentamisin,

ve metronidazole karşı direnç göstermiştir. Literatürde *R. dentocariosa*'nın nadiren endokardite neden olduğu bilgisi mevcuttur. Bir vaka raporunda penisiline duyarlı olduğu bildirilmiştir (Boudewijns vd., 2002). *Neisseria flavescens* KAA1.1.2 ve *N. perflava* tüm antibiyotiklere duyarlıdır. Ancak her iki bakteride de penisiline, kanamisine, streptomisine, klindamisine ve vankomisine düşük duyarlılık gözlenmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada oral *Neisseria subflava* izolatlarının penisiline dirençli olduğu gösterilmiştir (Furuya vd., 2007).

Hemolitik aktivite patojen mikroorganizmalar arasında virulans faktörüdür. Laktik asit bakterilerinin insanlarda probiyotik amaçlı kullanılabilmesi için gereken ön koşullardan biri hemolitik aktiviteye sahip olmamalarıdır (FAO/WHO, 2002). İzolatların hiçbiri hemoliz yapma özelliğine sahip değildir. Benzer sonuç Taheur vd., (2016) tarafından bildirilmiştir.

Mayalar dış çürüklerinin oluşmasında rol oynadıkları ve konağın bağışıklığının baskılandığı durumlarda sistemik hastalıklara da neden oldukları için antifungal duyarlılıklarının araştırılması önem taşımaktadır (Jewtuchowicz vd., 2007). Çalışmamızda izole edilen mayaların ketokanazol, pozakonazol, ıtrakonazol, flukonazol, nistatin, amphoteresin, kaspofungin ve vorikonazol antifungallerine duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Tüm izolatların farklı seviyelerde tüm antifungallere karşı duyarlı oldukları görülmüştür. Maya izolatlarının en duyarlı olduğu antifungal ketokanazol, en az duyarlı oldukları ise ıtrakonazol olmuştur (Tablo 3.15). Daha önce yapılan bir çalışmada oral biyofilmden izole *Candida* sp.'nin en az duyarlı oldukları antifungalın ıtrakonazol ve flukonazol olduğu bildirilmiştir (Aslani vd., 2018). Bu veri bizim sonuçlarımızla örtüşmektedir.

#### **4.3. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Değerlendirilmesi**

Laktik asit bakterileri dışındaki tüm bakteri izolatlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri CRA ve mikrotitrasyon plağı yöntemleri ile belirlenmiştir. Ayrıca mikrotitrasyon plağı yönteminde farklı karbonhidratların biyofilm oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir. CRA yöntemi ilk olarak Freeman vd., (1989) tarafından koagülaz negatif *Staphylococcus* biyofilm üretimini kalitatif olarak belirlenmesini sağlayan bir yöntem olarak tanımlanmıştır. Bu yöntem göre 35 izolat biyofilm üretmezken(-), 28 izolat düşük (+), 34 izolat orta (++) ve 26 izolat yüksek (+++) biyofilm üreticisi olarak değerlendirilmiştir (Tablo 3.16).

Mikrotitrasyon plağı yönteminde ise laktik asit bakterilerinden 12 tanesi laktoz, 9 tanesi sükröz, 8 tanesi fruktoz, 7 tanesi glikoz, 5 tanesi maltoz ve 3 tanesi rafinoz içeren besiyerinde en yüksek biyofilmi oluşturmuştur. Stepanovic vd., (2000) negatif kontrolün optik yoğunluğu baz alarak biyofilm üretim kapasitelerini sınıflandırmıştır. Buna göre *L. paracasei* LAB 7.7 izolatının glikoz dışında tüm şekerlerde düşük aktivite gösterdiği görülmektedir. *L. rhamnosus* 4.1.Y izolatının ise laktozda biyofilm üreticisi olmadığı, maltoz ve rafinoz içeren besiyerinde orta derecede biyofilm ürettiği görülmektedir. *L. plantarum* MRC6.2, *L. fermentum* MRSC8.3, MRSC7.1, MRSC7.2, MRSC8.1 izolatları diğer laktik asit bakterilerinden farklı olarak galaktoz ve glikozda biyofilm üretmemiştir. *L. rhamnosus* LAB1.2.B, LAB1.1.B izolatlarının ise fruktozda biyofilm üreticisi olmadığı belirlenmiştir. Laktik asit bakterilerinin otoagregasyon seviyelerinin yüksek olması biyofilm oluşumundaki ilk basamak olan yüzeye bağlanıp agregat oluşturma özelliklerinin de yüksek olması ile uyumlu bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır.

Patojen bakterilerden 22 tanesi maltoz, 20 tanesi laktoz, 19 tanesi glikoz, 18 tanesi fruktoz, 17 tanesi sükröz, 16 tanesi rafinoz ve 9 tanesi ise galaktoz içeren besiyerinde en yüksek biyofilmi oluşturmuştur. Bakterilerin sükrözlü besiyerinde biyofilm aktiviteleriyle, CRA besiyerindeki biyofilm oluşturma özellikleri karşılaştırıldığında sonuçların örtüştüğü görülmüştür. Torlak vd., (2017) ise *S. aureus* izolatlarının %2 glukoz içeren besiyerinde oluşturdukları biyofilm ile CRA besiyerindeki aktivitelerinin düşük oranda uyumlu olduğunu bildirmiştir.

Maya izolatlarından 10 tanesi rafinoz, 8 tanesi maltoz, 3 tanesi galaktoz, 2 tanesi glikoz ve 2 tanesi fruktoz içeren besiyerinde en yüksek biyofilmi oluşturmuştur (Tablo 3.19). Maya izolatlarının ortalama biyofilm değerleri tüm şekerlerde bakterilerden daha azdır. Mayaların %32'si maltoz, galaktoz, rafinoz, %24'ü glikoz, %4'ü sükröz, fruktoz ve laktoz içeren besiyerinde yüksek derecede biyofilm oluşturmuştur. Bu veriler doğrultusunda oral maya izolatlarının biyofilm üretme kapasitelerinin karbonhidrat kaynağına bağlı olarak değiştiği görülmüştür. Daha önce yapılan bir çalışmada glikoz, sükröz, galaktoz, ksilitol ve maltozun *Candida albicans* MRL3153 izolatının epitel hücrelere adezyonunu etkilediği gösterilmiştir (Samaranayake ve Macfarlane, 1982). Bu çalışmada maltozun diğer şekerlere göre adezyonu daha fazla arttırdığı görülmüştür. Jin vd., (2004) ise *C. albicans*'ın biyofilm üretimine galaktoz ve glikozun etkisini inceledikleri çalışmada glikozun biyofilmin üretimini daha fazla arttırdığını göstermiştir.



Aynı çalışmada tükürüğün ise biyofilm üretimini önemli derecede etkilemediği bildirilmiştir.

#### 4.4. LAB Süpernatantlarının Antiadezyon ve Antibiyofilm Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Laktik asit bakterilerinin süpernatantlarının antiadezyon ve antibiyofilm özellikleri öncelikle mikrotitrasyon plakta incelenmiştir. Bu deneyde yüksek inhibisyon aktivitesi gösteren izolatların aktiviteleri HA diski deneyinde kullanılmıştır. *S. aureus* BHIC1.2'nin adezyonu *L. fermentum* MRSC8.3 haricinde kullanılan tüm süpernatantlar tarafından %25,32-50,26 arasında inhibe edilmiştir. Bu deneyde en fazla antiadezyon aktivitesi gösteren LAB HA diski deneyinde kullanılmıştır. Mikrotitrasyon plağında %50,26 olan aktivite HA diskinde %32,27'ye düşmüştür. HA diskinde canlı bakteri sayısında ise %5,25 oranında düşüş olduğu görülmüştür. Mikrotitrasyon plağında yapılan bir çalışmada *L. plantarum* süpernatantının *S. aureus*'un adezyonunu %40 oranında azalttığı bildirilmiştir (Zamani vd., 2017).

*S. mutans* M173.1'in adezyonu tüm süpernatantlar tarafından yüksek oranda (%62,79-73,42) inhibe edilmiştir. Ancak HA diskinde bu oran %20,98'e düşmüştür. Canlı bakteri sayısı ise %12,02 oranında düşmüştür. Wasfi vd., (2018) *L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. salivarius* izolatlarının *S. mutans*'ın adezyonunu büyük oranda inhibe ettiğini göstermiştir.

*N. perflava* BHI A7.a'nın biyofilm ise %23,94-58,76 oranında inhibe edilmiştir. Bu oran HA diskinde %23,3'e düşmüştür. Canlı hücre sayısında ise %12,43 oranında düşüş görülmüştür. *Neisseria* oral biyofilmde ilk kolonize olan bakterilerden olduğu için adezyonunun engellenmesi önemlidir (Jenkinson ve Lamont, 2005). *S. salivarius* M17A1.2'nin adezyonu %9,91-44,82 oranında inhibe edilmiştir. Ancak HA diskinde bu oran %6,6 oranına düşmüştür. Canlı bakteri sayısı ise %7,74 oranında azalmıştır.

Bu sonuçlara göre test edilen tüm bakterilerin tükürük ile kaplı HA diskinde adezyon aktivitelerinin daha güçlü olduğu görülmektedir. Tükürük glikoproteinleri bakterilerin adezyonunda bir reseptör görevi görmektedir (Huang vd., 2011).

*S. aureus* BHIC1.2'nin mikrotitrasyon plağında oluşturduğu biyofilmin LAB'lerinin süpernatantları tarafından inhibe edilme oranları %45,56-64,21'dir. HA diskinde ise bu oran %44,89 olmuştur. Canlı hücre sayısı ise %24,95 oranında azalmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada *L. fermentum*'un *S. aureus*'un mikrotitrasyon plakta

oluşturduğu biyofilmi inhibe ettiği gösterilmiştir (Melo vd., 2016). Zamani vd., (2017) ise *L. plantarum* süpernatantının %40 oranında antibiyofilm özellik gösterdiğini bildirmiştir.

Çalışmamızdaki LAB'lerinin süpernatantlarının hiçbiri *S. mutans*'a karşı antibiyofilm özelliği göstermemiştir. Çalışmamızın aksine Rossoni vd., *L. fermentum* ve *L. paracasei* suşlarının *S. mutans*'ın HA disklerinde oluşturduğu biyofilm üzerinde inhibisyon etkisi olduğunu, ayrıca canlı hücre sayısında da düşüşe neden olduklarını bildirmiştir (Rossoni vd., 2018).

LAB'lerinin süpernatantları *N. perflava*'nın mikrotitrasyon plağında oluşturduğu biyofilm üzerinde yüksek oranda antibiyofilm aktivitesi göstermiştir. Ancak HA disk üzerinde bu etki görülmemiştir. *S. mutans* gibi ilk kolonizerlerden olan *N. perflava* tükürük proteinlerine bağlanarak biyofilm oluşturmuştur.

*S. salivarius* M17A1.2'nin mikrotitrasyon plağında oluşturduğu biyofilm *L. casei* LAB1.3.1.A tarafından %25 oranında inhibe edilmiştir. Ancak HA diskinde bu oran %75,31'e çıkmıştır. Canlı hücre sayısında ise %31,54 oranında azalma görülmüştür. Bu sonuç diğer bakteri sonuçlarıyla karşılaştırıldığında farklılık göstermektedir.

LAB süpernatantlarının antiadezyon etkisinin EPS nedeniyle hücre yüzeylerinin modifiye olması ve bu şekilde hücrelerin ilk bağlanmayı gerçekleştirememesine bağlı olabileceği düşünülmektedir. İlk bağlanmada görev alan genlerin ifadesinin inhibisyonu ya da azalması da ilk bağlanmayı engellemektedir. Wasfi, vd., (2018) laktik asit süpernatantlarının EPS üretimi, asit toleransı ve çoğunluk algılamada rol alan genlerin ifadelerini azalttığını göstermiştir.

#### **4.5. LAB'lerinin Halitosis Üzerine Etkisi**

Halitosis çalışmalarında anaerobik Gram negatif bakterilerin uçucu kükürt bileşikleri üreticisi olduğu gösterilmiştir. Laktik asit bakterilerinin halitosisi inhibe edici aktivitesinin incelendiği in vitro araştırmalarda da bu anaerobik Gram negatif bakteriler kullanılmıştır (Kang vd., 2006; Lee ve Baek, 2014). Ancak anaerobik bakterilerin gelişmesi için uygun şartlar sağlanmadığı için çalışmamızda *E. faecalis* NA 12.3.2 ve *S. anginosus* NA 2.2.a izolatları kullanılmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada *E. faecalis* ve *S. anginosus* bakterilerinin sistein ve methionin ile zenginleştirilmiş kültür ortamında uçucu kükürt bileşikleri ürettiği bildirildiği için çalışmamızda izole edilen bu türler kullanılmıştır (Yoshida vd., 2009).

Halitosisin klinikte ölçülmesinde duyuşsal analiz standart prosedür olarak kabul edilmektedir (Loesche ve Kazor, 2002). Çalışmamızda da koku analizi duyuşsal olarak yapılmıştır. 5 objektif kişinin değerlendirmelerinin ortalamaları bakterilerin koku skorlarını oluşturmuştur. Buna göre; pozitif kontrolü oluşturan *E. faecalis* NA 12.3.2 ve *S. anginosus* NA 2.2.a izolatlarının kültürünün skoru 3,2 iken MRSC7.1 ve LAB1.4.A laktik asit bakterileri pozitif kontrolden daha kötü koku oluşturmuştur. Pozitif kontrolden daha düşük koku skoruna sahip olan bakteri LAB1.2.A (2,6) olmuştur. Bu sonuç *E. faecalis* NA 12.3.2 ve *S. anginosus* NA 2.2.a izolatlarının ürettiği kötü kokulu bileşiklerin konsantrasyonunun bu laktik asit bakterileri tarafından azaltıldığını ya da laktik asit bakterilerinin kendi kültür kokuları tarafından baskılandığını göstermektedir. Ancak TR146 hücre hattının düşük yoğunlukta gelişmesi bu deneyde etkili olmamasına neden olmuştur.

Yapılan bazı klinik çalışmalarda laktik asit bakterilerinin kükürt bileşiklerinin miktarını azalttığı gösterilmiştir. Probiyotik *S. salivarius* K12 suşunu içeren pastillerin kükürt bileşiklerini azalttığı bildirilmiştir (Masdea vd., 2012). *L. salivarius* WB21 ve ksilitol içeren probiyotik tabletin 14 gün kullanımından sonra halitosis ölçümünde koku skorlarının düştüğü ancak sülfür bileşiklerinde bir azalma olmadığı görülmüştür (Suzuki vd., 2014).

Sonuç olarak; çalışmamızda izole edilen laktik asit bakterisi izolatlarının insan kullanımına yönelik probiyotik olabilmesi için gereken hemolitik özellikte olmama ve insan sağlığına zararlı etkileri olduğu bilinen bazı enzimler yönünden de negatif olmaları güvenlik koşullarını sağladığını göstermiştir. Ancak antibiyotik direnci konusunda laktik asit bakterilerinin doğal olarak dirençli oldukları bilinen metronidazol ve vankomisin gibi antibiyotiklerin dışında izolatların dirençli oldukları ya da düşük duyarlılık gösterdiği antibiyotiklere karşı direncin plazmid ya da transpozonlarla taşınan genler tarafından sağlanıp sağlanmadığı incelenmelidir.

İzolatların gastrointestinal şartlara karşı direnç göstermesi probiyotik olarak kullanılma potansiyelini arttırmaktadır. Bu potansiyeli arttırmak için izolatların sindirim sürecinde ortaya çıkan fenole karşı duyarlılıklarının da ortaya çıkarılması gerekmektedir.

İzolatlar probiyotiklerden beklenen önemli bir özellik olan antibakteriyal özellik göstermemişlerdir. Bu noktada izolatların süpernatantlarının pH'larının değiştirilmeden aktivitelerini değerlendirme gereksinimi ortaya çıkmıştır.

Laktik asit bakterilerinin otoagregasyon ve hidrofobisite özelliklerinin yüksek olması insan vücudunda mukozal hücrelere bağlanma potansiyelini göstermektedir. Ancak bu potansiyel hücre kültüründe yapılacak deneylerle doğrulanmalıdır.

İzolatların tamamının antioksidan aktivite göstermesi ve  $\beta$ -galaktosidaz enzimine sahip olmaları probiyotik olarak kullanılmaları durumunda insan sağlığına katkı sağlayabileceğini göstermiştir. Son yıllarda laktik asit bakterilerinin kolesterol indirgeyici özellikleri ortaya çıkarılmıştır (Guan vd., 2017). İzolatların probiyotik özelliklerine katkı sağlayacak kolesterol indirgeyici özelliklerinin araştırılması planlanmaktadır.

Laktik asit bakterilerinin genel probiyotik özelliklerinin yanı sıra oral probiyotik özellikleri de araştırılmıştır. Diğer probiyotik özellikleri yüksek olan ancak düşük laktik asit üretimine sahip olan bazı izolatların antiadezyon, antibiyofilm ve halitosis üzerine etkileri olduğu görülmüştür. Başlıca çürük etmeni olarak bilinen *S. mutans*'a karşı antiadezyon aktivitesi gösteren izolatların varlığı oral probiyotik potansiyellerini arttırmıştır. Laktik asit bakterileri süspansiyonlarının da HA disklerinde antibiyofilm ve antiadezyon aktivitesi göstereceği düşünülmektedir. Laktik asit bakterilerinin çalışmamızda gösterilen yüksek otoagregasyon ve biyofilm oluşturma kapasitelerinin HA disklerine adezyon rekabetinde avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle bu deneyin ileride yapılması planlanmaktadır.

Halitosis üzerine etkili olduğu görülen izolatın aktivitesinin daha iyi anlaşılabilmesi için uçucu sülfür bileşiklerinin gaz kromatografisi ile ölçülmesi planlanmaktadır.

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde izolatların probiyotik aktivitelerinin yüksek olduğu görülmektedir. Oral probiyotik olarak kullanımı için klinik araştırmalardan elde edilen verilere ve yukarıda bahsedilen ek deneylere ihtiyaç duyulmaktadır. İlerde yapılması planlanan çalışmalar arasında izolatların pastil, sakız ve gargara gibi ürünlerle formülize edilerek ağız sağlığına fayda sağlayacak oral probiyotik ürünler geliştirmek yer almaktadır.

## KAYNAKÇA

- Aas, J. A., Griffen, A. L., Dardis, S. R., Lee, A. M., Olsen, I., Dewhirst, F. E., Leys, E. J., Paster, B. J. (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (4), 1407–1417.
- Addy M. (1986). Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. *Journal of Clinical Periodontology*, 13 (10):957-64.
- Ahn, K. B., Baik, J. E., Park, O. J., Yun, C. H., Han, S. H. (2018). *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid inhibits biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Plos One*, 13 (2): e0192694.
- Akçelik, M., Ayhan, K., Çakır, D., Doğan, H.B., Gürgün, V., Halkman, A., Kaleli, D., Kuleaşan, H., Özkaya, D.F., Tunail, N., Tükel, Ç. (2000). Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Birimi, Ankara, 2. Baskı, 229-275, 514-515.
- Al-Ahmad, A., Ausschill, T. M., Dakhel, R., Wittmer, A., Pelz, K., Heumann, C., Hellwig, E., Arweiler, N. B. (2016). Prevalence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in Caries-Free and Caries-Active Children in Relation to the Oral Microbiota-a Clinical Study. *Clinical Oral Investigations*, 20: 1963–71.
- Allaker, R., Stephen, A. (2017). Use of probiotics and oral health. *Current Oral Health Reports*, 4: 309-318.
- Anderson, A. C., Jonas, D., Huber, I., Karygianni, L., Wölber, J., Hellwig, E., Arweiler, N., Vach, K., Vittmer, A., Al-Ahmad, A. (2015). *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Frontiers in Microbiology*, 6(January), 1534.
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33: 282-291.
- Arora, G., Lee, B. H., Lamoureux, M. (1990). Characterization of Enzyme Profiles of *Lactobacillus casei* Species by a Rapid API ZYM System. *Journal of Dairy Science*, 73 (2): 264-273.

- Arweiler, N. B., Netuschil, L. (2016). The oral microbiota. A. Schwartz (Ed.), *Microbiota of the human body içinde* (45-60). İsviçre: Springer International Publishing.
- Aslani, N., Abastabar, M., Hedayati, M. T., Shokohi, T., Aghili, S. R., Diba, K., Hosseini, T., Bahrami, B., Ebrahimpour, A., Salehi, M., Taheri-Sarvtin, M., Haghani, I., Vafaei Moghaddam, M. (2018). ScienceDirect Molecular Identification and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species Isolated from Dental Plaques. *Journal de Mycologie Medicale*, 28 (3): 433–36.
- Aslım, B. (1994). *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* Bakterilerinin Metabolik ve Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Bazı Fiziksel ve Kimyasal Mutajenlerin Etkisi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Axelsson, L. T., Ahrne, S. E., Anderson, M. C., Stahl, S. R. (1988). Identification and cloning of a plasmid encoded erythromycin resistance determinant from *Lactobacillus reuteri*. *Plasmids*, 20: 171-174.
- Aylıkçı, B. U., Colak, H. (2013). Halitosis: From Diagnosis to Management. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine* 4 (1): 14–23.
- Azas-Braesco, V., Bresson, J. L., Guarner, F., Corthier, G. (2010). Not All Lactic Acid Bacteria Are Probiotics, but Some Are. *British Journal of Nutrition* 103 (7): 1079–81.
- Basavaraju, M., Sisnity, V. S., Palaparthi, R., Addanki, P. K. (2016). Quorum Quenching: Signal Jamming in Dental Plaque Biofilms. *Journal of Dental Sciences*, 11 (4): 349–52.
- Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Wang, Y., Zhang, H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21, 695-701.
- Bassyouni, R. H., Abdel-all, W. S., Fadl, M. G., Abdel-all, S., Kamel, Z. (2012). Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dairy Products in Egypt as a Probiotic. *Life Science Journal*, 9 (4): 2924-2933.
- Bengoa, A. A., Llamas, M. G., Iraporda, C., Duenas, M. T., Abraham, A. G., Garrote, G. L. (2018). Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. *Food Microbiology*, 69: 212–18.

- Biradar, B., Devi P. (2011). Quorum Sensing in Plaque Biofilms: Challenges and Future Prospects. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 12 (6): 479–85.
- Bollen, C. M., Beikler, T. (2012). Halitosis: the multidisciplinary approach. *International Journal of Oral Science*. 4: 55–63.
- Bonifait, L., Chandad, F., Grenier, D. (2009). Probiotics for Oral Health: Myth or Reality? *Journal Canadian Dental Association*, 75 (8): 585–90.
- Bosch, M., Nart, J., Audivert, S., Bonachera, M. A., Alemany, A. S., Fuentes, M. C., Cuñé, J. (2012). Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral health. *Archives of Oral Biology*, 57:(5), 539–49.
- Boudewijns, M., Magerman, K., Verhaegen, V., Debrock, G., Peetermans, W. E., Donkersloot, P., Mewis, A., Peeters, V., Rummens, J. L., Cartuyvels, R. (2002). *Rothia dentocariosa*, endocarditis and mycotic aneurysms: case report and review of the literature. *Clinical Microbiology and Infection*, 9:222-229.
- Bradshaw, D. J., Marsh, P. D., Watson, G. K., Allison, C. (1998). Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infection and Immunity*, 66: 4729-4732.
- Burton, J. P., Chilcott, C. N., Moore, C. J., Speiser, G., Tagg, J. R. (2006). A Preliminary Study of the Effect of Probiotic Streptococcus Salivarius K12 on Oral Malodour Parameters. *Journal of Applied Microbiology*, 100 (4): 754–64.
- Caglar, E., Sandallı, N., Twetman, S., Kavaloğlu, S., Ergeneli, S., Selvi, S. (2005). Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN- 173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontologica Scandinavica*, 63: 317–20.
- Campana, R., Hemert, S., Baffone, W. (2017). Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens*, 9:12.
- Campisi, G., Musciotto, A., Di Fede, O., Di Marco, V., Craxi, A. (2011). Halitosis: Could it be more than mere bad breath? *Internal and Emergency Medicine*. 6: 315–319.
- Cao, Z., Pan, H., Li, S., Shi, C., Wang, S., Wang, F., Ye, P., Jia, J., Ge, G., Lin, Q., Zhao, Z. (2018). In Vitro Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Yunnan De'ang Pickled Tea. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1–10.

- Caufield, P. W., Cutter, G. R., Dasanayake, A. P. (1993). Initial acquisition of mutans streptococci by infants: Evidence for a discrete window of infectivity. *Journal of Dental Research*, 72:37-45.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. (1998). Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. *Journal of Food Protection*, 61 (12): 1636-1643.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. (2000). Effect of conjugated bile salts on antibiotic susceptibility of bile salt-tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolates. *Journal of Food Protection*, 63:1369-1376.
- Chooruk, A. Piwat, S., Teanpaisan, R. (2017). Antioxidant activity of various oral *Lactobacillus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 123: 271-279.
- Church, D. L., Bryant, R. D., Sim, V., Laishley, E. J. (1996). Metronidazole susceptibility and the presence of hydrogenase in pathogenic bacteria. *Anaerobe*, 2: 147–153
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 17 (4): 840-862.
- Collado, M.C., Meriluoto, J., Salminen, S. (2008) Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226, 1065–1073.
- Collado, M. C., Bauerl, C., Perez-Martinez, G. (2012). Defining microbiota for developing new probiotics. *Microbial Ecology in Health & Disease*. 23, 18579.
- Colombo, M., Castilho, N. P. A., Todorov, S. D., Nero, L. A. (2018). Beneficial properties of lactic acid bacteria naturally present in dairy production. *BMC Microbiology*, 18: 219.
- Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., Sorrentino, E. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *EDP Sciences*, 193-201.
- Costa, E. M., Silva, S., Madureira, A. R., Cardelle-Cobas, A., Tavaría, F. K., Pintado, M. M. (2014). A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation in vitro. *Carbohydrate polymers*, 101: 1081–86.
- Çaglar, E., Kavaloglu Cildir, S., Ergeneli, S., Sandalli, N., Twetman, S. (2006). Salivary Mutans Streptococci and Lactobacilli Levels after Ingestion of the Probiotic



- Bacterium *Lactobacillus Reuteri* ATCC 55730 by Straws or Tablets. *Acta Odontologica Scandinavica*, 64 (5): 314–18.
- D'Aimmo, M. R., Modesto, M., Biavati, B. (2007). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*, 115:35-42
- Delgado, S., Florez, A. B., Mayo, B. (2005). Antibiotic Susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Species from the Human Gastrointestinal Tract. *Current Microbiology*, 50:202-207.
- Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C. R., Yu, W. H., Lakshmanan, A., Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192 (19): 5002–5017.
- Diaz, P. I., Hong B. Y., Dupuy, A. K., Strausbaugh, L. D. (2017). Mining the oral mycobiome: Methods, components, and meaning. *Virulence*, 8 (3), 313-323.
- Ding, W., Wang, L., Zhang, J., Ke, W., Zhou, J., Zhu, J., Guo, X., Long, R. (2017). Characterization of antioxidant properties of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented yak milk in the Tibetan Plateau. *Journal of Functional Food*, 35: 481-488.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9), 881–90.
- Donlan, R. M, Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (2):167-93.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S. (2001). In Vitro Selection Criteria for Probiotic Bacteria of Human Origin. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 386–92.
- Er, S., İstanbullu-Tosun, A., Arık, G., Kıvanç, M. (2019). Anticandidal activities of lactic acid bacteria isolated from the vagina. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 49: 375-383.
- Ertekin, Ö., Çon, A. H. (2014). Farklı Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özellikleri. *Akademik Gıda*, 12 (4): 6-16.
- FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group report.

- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42:872-874.
- Furuya, R., Onoye, Y., Kanayama, A., Saika, T., Iyoda, T., Tatewaki, M., Matsuzaki, K., Kobayashi, I., Tanak, M. (2007). Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Neisseria subflava* from the oral cavities of a Japanese population. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 13 (5): 302-304.
- Fuochi, V., Li Volti, G., Furneri, P. M. (2016). Probiotic Properties of *Lactobacillus fermentum* Strains Isolated from Human Oral Samples and Description of their Antibacterial Activity. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 18: 138-149.
- Gad, G. F. M., Abdel-Hamid, A. M., Farag, Z. S. H. (2014). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45 (1): 25-33.
- García-Ruiz, A., Gonzalez de Llano, D., Esteban-Fernandez, A., Requena, T., Bartolome, B., Moreno-Arribas, M. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiology* 44: 220–25.
- Genç, H. (2016). Nar Suyunda Ürün Özelliklerinin Geliştirilmesinde Probiyotik Bakterilerin Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J. *In vitro* conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 8: 125-130.
- Gill, C. I. R., Rowland, I. R. (2002). Diet and cancer: assessing the risk. *British Journal of Nutrition*, 88 (1): 73-87.
- Giraffa, G. (2014). Overview of the ecology and biodiversity of the LAB. Holzappel, B. J. B. Wood (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy içinde* (45-51). UK. John Wiley & Sons.
- Guan, X., Xu, Q., Zheng, Y., Qian, L., Lin, B. (2017). Screening and characterization of lactic acid bacterial strains that produce fermented milk and reduce cholesterol levels. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48: 730-739.
- Gupta, M., Bajaj, B. K. (2018). Functional Characterization of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Kalarei and Development of Probiotic Fermented Oat Flour. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*. 10:654-661.

- Güngör, O. E., Kirzioğlu, M., Kıvanç, M. (2015). Probiotics: Can They Be Used to Improve Oral Health?. *Beneficial Microbes*, 6 (5): 647–56.
- Güngör, Ö. E., Kirzioğlu, Z., Dinçer, E., Kıvanç, M. (2013). Who will win the race in childrens' oral cavities? *Streptococcus mutans* or beneficial lactic acid bacteria. *Beneficial Microbes*, 4 (3): 237–46.
- Handwerger, S., Pucci, M.J., Volk, K. J., Liu, J., Lee, M. S. (1994). Vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate. *Journal of Bacteriology*, 176: 260–264.
- Harper, D. S., Loesche, W. J. (1984). Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. *Archives of Oral Biology*, 29:10.
- Haukioja, A. Probiotics and Oral Health. (2010). *European Journal of Dentistry*. 4: 348-355.
- Heller, D., Helmerhorst, E. J., Gower A. C., Siqueira, W. L., Paster, B. J., Oppenheim, F. G. (2016). Microbial Diversity in the Early In Vivo-Formed Dental Biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 82 (6): 1881-1888.
- Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T., Maeda, N. (2009). Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *Journal of Dental Research*, 88 (11), 982–990.
- Holzapfel, W. H., Wood, B. J. B. (2014). Introduction to the LAB. W. H. Holzapfel, B. J. B. Wood (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* içinde (1-12). UK. John Wiley & Sons
- Huang, R., Li, M., Gregory, R. L. (2011). Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*, 2 (5), 435–444. *Pakistan Journal of Botany*, 40 (2): 867-875.
- Hussain, M., Khan, M. T., Wajid, A., Rasool, S. A. (2008). Technological characterization of indigenous enterococcol population for probiotic potential.
- Iwamoto, T., Suzuki, N., Tanabe, K., Takeshita, T., Hirofuji, T. (2010). Effects of Probiotic *Lactobacillus salivarius* WB21 on Halitosis and Oral Health: An Open-Label Pilot Trial. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 110 (2): 201–8.
- Janda, J. M., Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. 45 (9): 2761-2764.

- Jefferson, K. K. (2004). What Drives Bacteria to Produce a Biofilm? *FEMS microbiology letters*, 236 (2): 163–73.
- Jenkinson, H. F., Lamont, R. J. (2005). Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiology*, 13 (12), 589–595.
- Jewtuchowicz, V. M, Brusca, M. I, Mujica, M. T, Gliosca, L. A., Finkelievich, J. L., Lovannitti, C. A., Rosa, A. C. (2007). Subgingival distribution of yeast and their antifungal susceptibility in immunocompetent subjects with and without dental devices. *Acta odontológica latinoamericana*, 20:17–22.
- Ji, K., Jang, N. Y., Kim Y. T. (2015). Isolation of Lactic Acid Bacteria Showing Antioxidative and Probiotic Activities from Kimchi and Infant Feces. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(9): 1568–77.
- Jin, Y., Samaranayake, L. P., Samaranayake, Y., Yip, H. K. (2004). Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Archives of Oral Biology*, 49: 789-798.
- Jones, C. G. (1997). Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontology 2000*. 15:55-62.
- Jorgensen, J. H., Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Medical Microbiology*, 49:1749-55.
- Kadir, T., Uygun, B., Akyüz, S. (2005). Prevalence of *Candida* species in Turkish children: Relationship between Dietary intake and carriage. *Archives of Oral Biology*. 50: 33–37.
- Kanasi, E., Dewhirst, F. E., Chalmers, N. I., Kent, R., Moore, A., Hughes, C. V., Pradhan, N., Loo, C. Y., Tanner, A. C. R. (2010). Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries. *Caries Research*, 44 (5), 485–497.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49: 209-224.
- Kang, M. S, Kim, B. G, Chung, J., Lee, H. C, Oh, J. S. (2006). Inhibitory effect of *Weissella cibaria* isolates on the production of volatile sulphur compounds. *Journal of Clinical Periodontology*, 33: 226-32.
- Kang, M. S., Oh, J. S., Lee, H. C., Lim, H. S. (2011). Inhibitory Effect of *Lactobacillus reuteri* on Periodontopathic and Cariogenic Bacteria. *Journal of Microbiology*, 49 (2): 193–99.

- Kaplan, J. B. (2010). Biofilm Dispersal Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research*, 89 (3), 205–218.
- Karakaş-Şen, A., Karakaş, E. (2018). Isolation, identification and technological properties of lactic acid bacteria from raw cow milk. *Bioscience Journal*, 34 (2): 385-399.
- Karpinski, T. M., Szkaradkiewicz, A. K. (2013). Microbiology of dental caries. *Journal of Biology and Earth Science*, 3 (1): 21-24.
- Kıvanç, S. A., Arık, G., Akova-Budak, B., Kıvanç, M. (2018). Biofilm forming capacity and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus* spp. with the IcaA / IcaD / Bap genotype isolated from ocular surface of patients with diabetes. *Malawi Medical Journal*, 30 (4): 243–49.
- Kıvanç, M., Yılmaz, M., Çakır, E. (2011). Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. *Turkish Journal of Biology*, 35: 313-324.
- Kıvanç, M., Yapıcı, E. (2015). Kefir as a probiotic dairy beverage: Determination lactic acid bacteria and yeast. *International Journal of Food Engineering*, 1 (1): 55-60.
- Kim, D., Sengupta, A., Niepa, T. H. R., Lee, B. H., Weljie, A., Freitas-Blanco, V. S., Murata, R. M., Stebe, K. J., Lee, D., Koo, H. (2016). *Candida albicans* stimulates *Streptococcus mutans* microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. *Scientific Reports*, 7 (11), 1–14.
- Kolenbrander, P. E., Palmer Jr, R. J., Periasamy, S., Jakubovics, N. S. (2010). Oral Multispecies Biofilm Development. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7): 471–80.
- Koll-Klais, P., Mändar, R., Leibur, E., Marcotte, H., Hammarström, L. Mikelsaar, M. (2005). Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiology and Immunology*. 20 (6):354-61.
- Komiyama, E. Y., Lepesqueur, L. S. S., Yassuda, C. G., Samaranayake, L. P., Parahitiyawa, N. B., Balducci, I., Koga-Ito, C. Y. (2016). *Enterococcus* species in the oral cavity: Prevalence, virulence factors and antimicrobial susceptibility. *PLoS ONE*, 11(9), 1–11.

- Kouidhi, B., Al Qurashi, Y. M. A., Chaieb, K. (2015). Drug Resistance of Bacterial Dental Biofilm and the Potential Use of Natural Compounds as Alternative for Prevention and Treatment. *Microbial Pathogenesis*, 80: 39–49.
- Kouidhi, B., Zmantar, T., Hentati, H., Bakhrouf, A. (2010). Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. *Microbial pathogenesis*, 49 (1–2): 14–22.
- Köll, P., Mändar, R., Marcotte, H., Leibur, E., Mikelsaar, M., Hammarström, L. (2008). Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiology and Immunology*, 23: (2), 139–47.
- König, H., Fröhlich, J. (2017). Lactic Acid Bacteria. König, H., Fröhlich, J., uunden, G. (Ed.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine içinde* (3-41). Springer.
- Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J., Matosic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 981-987.
- Kreth, J., Zhang, Y., Herzberg, M. C. (2008). Streptococcal Antagonism in Oral Biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* Interference with *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 190 (13): 4632–40.
- Kreth, J., Vu, H., Zhang, Y., Herzberg, M. C. (2009). Characterization of Hydrogen Peroxide-Induced DNA Release by *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii*. *Journal of Bacteriology*, 191 (20): 6281-6291.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets brief communication. *Molecular Evolutionary Genetic Analysis*. 33 (7): 1870–74.
- Kuramitsu, H. K., He, X., Lux, R., Anderson H. M., Shi, W. (2007). Interspecies Interactions within Oral Microbial Communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71 (4): 653-670
- Lazarevic, V., Whiteson, K., Huse, S., Hernandez, D., Farinelli, L., Østerås, M., Schrenzel, J., François, P. (2009). Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *Journal of Microbiological Methods* 79: 266–271.

- Lee, S. H., Baek, D. H. (2014). Effects of *Streptococcus thermophilus* on volatile sulfur compounds produced by *Porphyromonas gingivalis*. *Archives of Oral Biology*, 59: 1205-1210.
- Leung, V., Dufour, D., Lévesque, C. M. (2015). Death and survival in *Streptococcus mutans*: differing outcomes of a quorum-sensing signaling peptide. *Frontiers in Microbiology*, 6 (OCT): 1–6.
- Lin, X., Chen, X., Chen, Y., Jiang, W., Chen, H. (2015). The effect of five probiotic lactobacilli strains on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Oral Diseases*, 21 (1): 128–134.
- Loesche, W., Kazor, C. (2002). Microbiology and treatment of halitosis. *Periodontology 2000*, 28: 256-279.
- Ma, C., Chen, F., Zhang, Y., Sun, X., Tong, P., Si, Y., Zheng, S. (2015). Comparison of oral microbial profiles between children with severe early childhood caries and caries-free children using the human oral microbe identification microarray. *PLoS ONE*, 10 (3): 1–12.
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulous, G., Pot, B., Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16: 189-199.
- Marsh, P. D., Percival, R. S. (2006). The Oral Microflora-Friend or Foe? Can We Decide? *International Dental Journal*, 56 (4): 233–39.
- Marsh, P. D. (2000) Role of the Oral Microflora in Health, *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12 (3), 130-137.
- Marsh, P. D., Zaura, E. (2017). Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 44, 12–22.
- Marsh, P. D., Moter, A., Devine D. A. (2011). Dental Plaque Biofilms: Communities, Conflict and Control. *Periodontology 2000*, 55 (1): 16–35.
- Marsh, P. D. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, 149 (2): 279–94.
- Masdea, L., Kulik, E. M., Hauser-Gerspach, I., Ramseier, A. M., Flippi, A., Waltimo, T. (2012). Antimicrobial activity of *Streptococcus salivarius* K12 on bacteria involved in oral malodour. *Archives of Oral Biology*, 57 (8): 1041-1047.

- Melo, T. A., Santos, T. F., Almeida, M. E., Junior, L.A.G.F., Andrade, E. F., Rezende, R. P., Marques, L. M., Romano, C. C. (2016). Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. *BMC Microbiology*, 16:250.
- Menon, A. M. (2016). Implications of Probiotics on Oral Health: Past-to-Present. *Journal of Dental Research and Review*, 3 (1): 36.
- Merritt, J., Qi, F. (2012). The mutacins of *Streptococcus mutans*: regulation and ecology. *Molecular Oral Microbiology*, 27 (2): 57–69.
- Meurman, J. H., Stamatova, I. (2011). Lactic Acid Bacteria in Oral Health. Lahtinen (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects içinde* (1-15). USA. CRC Press.
- Meurman, J. H., Antila, H., Salminen, S. (1994). Recovery of lactobacillus strain GG (ATCC 53103) from saliva of healthy volunteers after consumption of yoghurt prepared with the bacterium. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 7 (6), 295–298.
- Monteagudo-Mera, A., Caro, I., Rodriguez-Aparicio, B., Rua, J., Ferrero, M. A., Garcia-Armesto, M. R. (2011). Characterization of certain bacterial strains for potential use as starter or probiotic cultures in dairy products. *Journal of Food Protection*, 74 (8): 1379-1386.
- Moore, L.V.H., Moore, W.E.C., Riley, C., Brooks, C., Burmeister, J.A., Smibert, R.M. (1993). Periodontal microflora of HIV positive subjects with gingivitis or adult periodontitis. *Journal of Periodontology*, 64: 48-56.
- Mumcu, Z. N. (1997). Kefirden İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Plazmit DNA'larının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Naghmouchi, K., Drider, D., Baah, J., Teather, R. (2010). Nisin A and Polymyxin B as Synergistic Inhibitors of Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2 (2): 98-103.
- Nase, L., Hatakka, K., Savilahti, E. (2001). Effect of longterm consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk children. *Caries Research*, 35: 412–20
- Nguyen, T. D. T., Kang, J. H., Lee, M. S. (2007). Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal of Food Microbiology*.



- Ohara-Nemoto, Y., Haraga, H., Kimura, S., Nemoto, T. K. (2008). Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal-oral trafficking of the bacteria. *Journal of Medical Microbiology*, 57 (1), 95–99.
- Olsen, I., Tribble, G. D., Fiehn, N. E., Wang, B. Y. (2013). Bacterial sex in dental plaque. *Journal of Oral Microbiology*, 5 (2013), 1–9.
- Percival, R. S., Challacombe, S. J., Marsh, P. D. (1991). Age-related microbiological changes in the salivary and plaque microflora of healthy adults. *Journal of Medical Microbiology*, 35 (1), 5–11.
- Piwat, S., Sophatha, B., Teanpaisan, R. (2015). An assessment of adhesion, aggregation and surface charges of *Lactobacillus* strains derived from the human oral cavity. *Letters in Applied Microbiology*, 61: 98-105.
- Pratten, J., Wilson, M., Spratt, D. A. (2003). Characterization of in vitro oral bacterial biofilms by traditional and molecular methods. *Oral Microbiology and Immunology*. 18: 45-49.
- Rajaprabu, M., Siddharthan, N., Poongothai, E., Manikandan, P., Hemalatha, N. (2018). Isolation of the oral aerobic and anaerobic flora in dental caries patients. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (1):104–108.
- Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F., Jespersen, L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiology*, 36: 22-29.
- Ren, W., Xun, Z., Wang, Z., Zhang, Q., Liu, X., Zheng, H., Zhang, Q., Zhang, Y., Zhang, L., Wu, C., Zheng, S., Qin, N., Dusko S., Xu, T., Chen, T., Chen, F. (2016). Tongue Coating and the Salivary Microbial Communities Vary in Children with Halitosis. *Scientific Reports*, 6:24481.
- Reyes-Nava, L. A., Garduño-Siciliano, L., Estrada-de los Santos, P., Hernández-Sánchez, H., A. Arauz, J., Muriel, P., Rivera-Espinoza, Y. (2016). Use of bile acids as a selection strategy for lactobacillus strains with probiotic potential. *Journal of Food & Nutritional Disorders*, 5:1.
- Riccia, D. N, Bizzini, F., Perilli, M. G, Polimeni, A., Trinchieri, V., Amicosante, G. (2007). Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* (CD2) on periodontal disease. *Oral Diseases*, 13: 376-85.

- Rodríguez-Alonso, P., Fernández-Otero, C., Centeno, J. A., Garabal, J. I. (2009). Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria and *Micrococcaceae/Staphylococcaceae* Isolates from Artisanal Raw Milk Cheese, and Potential Implications on Cheese Making. *Food Microbiology and Safety*, 74 (6):284-293.
- Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., Torres C. (2006). Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 234-240.
- Rossoni, R. D., Velloso, M. S., Barros, P. P. vd. (2018). Inhibitory effect of probiotic *Lactobacillus* supernatants from the oral cavity on *Streptococcus mutans* biofilms. *Microbial Pathogenesis*, 123 (7): 361–67.
- Rozkiewicz, D., Daniluk, T., Sciepek, M., Zaremba, M. L., Cylwick-Rokicka, D., Luczaj-Cepowicz, E., Milewska, R., Marczuk-Kolada, G., Stokowska, W. (2006). Prevalence rate and antibiotic susceptibility of oral viridans group streptococci (VGS) in healthy children population. *Europe PMC*, 51 (1): 191-195.
- Samaranayake, L., MacFarlane, T. W. (1982). The effect of dietary carbohydrates candida albicans to epithelial cells on the in-vitro adhesion of Candida albicans to epithelial cells. *Journal of Medical Microbiology*, 15:511-517.
- Seneviratne, C. J., Zhang, C. F., Samaranayake, L. P. (2011). Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chinese Journal of Dental Research*, 14 (2): 87-94.
- Saarela, M. Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. 84: 197-215.
- Samot, J., Lebreton, J., Badet, C. (2011). Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes. *Clinical Microbiology*, 17:69-72.
- Sampaio-Maia, B., Monteiro-Silva, F., (2014). Acquisition and maturation of oral microbiome throughout childhood: An update. *Dental Research Journal*, 11 (3), 291–301.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 394-406.
- Sedgley, C. M., Lennan, S. L., Clewell, D. B. (2004). Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiology and Immunology*, 19(2), 95–101.

- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., Roy, N. C. (2013). The Role of Cell Surface Architecture of Lactobacilli in Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract. *Mediators of Inflammation*, 2013: 1-16
- Servin, A. L., Coconnier, M. H. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17 (5): 741-754.
- Shi, Y., Cui, X., Gu, S., Yan, X., Li, R., Xia, S., Chen, H., Ge, J. (2018). Antioxidative and Probiotic Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Artisanal Milk Cheese from Northeast China. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*,
- Shimauchi, H., Mayanagi, G., Nakaya, S., Minamibuchi, M., Ito, Y., Yamaki, K., Hirata, H. (2008). Improvement of Periodontal Condition by Probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Journal of Clinical Periodontology*, 35 (10): 897–905.
- Shimazaki, Y., Shirota, T., Uchida, K., Yonemoto, K., Kiyohara, Y., Iida, M., Saito, T., Yamashita, Y. (2008). Intake of dairy products and periodontal disease: The Hisayama Study. *Journal of Periodontology*. 79-1.
- Signoretto, C., Burlacchini, G., Faccioni, F., Zanderigo, M., Bozzola, N., Canepari, P. (2009). Support for the role of *Candida* spp. in extensive caries lesions of children. *New Microbiologica*, 32: 101-107.
- Smith, A. J., Robertson, D., Tang, M. K., Jackson, M. S., MacKenzie, D., Bagg, J. (2003). *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: A three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. *British Dental Journal*, 195 (12), 701–703.
- Sookkhee, S., Chulasiri, M., Prachyabrued, W. (2001). Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. 90 (2):172-9
- Son, S. H., Yang, S. J., Jeon, H. L., Yu, H. S., Lee, N. K., Park, Y. S., Paik, H. D. (2018). Antioxidant and immunostimulatory effect of potential probiotic *Lactobacillus paraplantarum* SC61 isolated from Korean traditional fermented food, jangajji. *Microbial Pathogenesis*, 125: 486-492.
- Srivastava, B., Bhatia, H. P., Chaudhary, V., Aggarwai, A., Singh, A. K., Gupta, N. (2012). Comparative evaluation of oral *Candida albicans* carriage in children

- with and without dental caries: A microbiological in vivo study. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 5 (2): 108-112.
- Steinberg, D. Dental Chatter: Bacterial Cross-Talk in the Biofilm of the Oral Cavity. *Israel Journal of Chemistry*, 56: 273-281.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40: 175-179.
- Strahinic, I., Busarcevic, M., Pavlica, D., Milasin, J., Golic, N., Topisirovic, L. (2007). Molecular and biochemical characterizations of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. *Oral Microbiology and Immunology*, 22: 111-117.
- Suzuki, N., Yoneda, M., Tanake, K., Fujimoto, A., Iha, K., Seno, K., Yamada, K., Iwamoto, T., Masuo, Y., Hirofuji, T. (2014). *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets for the treatment of oral malodor: a double-blind, randomized, placebo-controlled. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 117:462–470
- Taheur, B. F., Kouidhi, B., Fdhila, K., Elabed, H., Ben Slama, R., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., Chaieb, K. (2016). Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 97: 213–220.
- Takahashi, N. (2005). Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *International Congress Series*, 1284, 103–112.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, Đ., Bursalıoğlu, M., Ođultekin, R. (1989). 3. ve 4. Sınıf Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu, Anadolu Üniversitesi, Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, No. 74, Eskişehir, 23-25, 240.
- Tandon, V., Arora, V., Yadav, V., Singh, V., Punia, H., Agrawal, S., Gupta, V. (2015). Concept of Probiotics in Dentistry. *Int J Dent Med Res*, 1 (6): 206-209.
- Tanner, A. C. R., Mathney, J. M. J., Kent, R. L., Chalmers, N. L., Hughes, C. V., Loo, C. Y., Pradhan, N., Kanasi, E., Hwang, J., Dahlan, M. A., Papadopolou, E., Dewhirst, F. E. (2011). Cultivable Anaerobic Microbiota of Severe Early Childhood Caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (4): 1464–74.
- Tang, W., Xing, Z., Li, C., Wang, J., Wang, Y. (2017). Molecular mechanisms and in vitro antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* MA2. *Food Chemistry*, 221: 1642–1649.

- Toptaş, Y., Akca, G., Çabuk, A. (2014). Lactic acid production by *Lactobacillus brevis* isolated from oral microbiota. *IUFS Journal of Biology*, 73 (1): 1-7.
- Torlak, E., Korkut, E., Uncu, A. T., Şener, Y. (2017). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolates from a dental clinic in Konya, Turkey. *Journal of Infection and Public Health*, 10:809-813.
- Tuo, Y., Yu, H., Ai, L., Wu, Z., Guo, B., Chen, W. (2013) Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science*, 96, 4252–4257.
- Velsko, I. M., Shaddox, L. M. (2018). Consistent and Reproducible Long-Term in Vitro Growth of Health and Disease- Associated Oral Subgingival Biofilms. *BMC Microbiology*, 18-70.
- Verma, D., Garg, P. K., Dubey, A. K. (2018). Insights of the human oral microbiome. *Archives of Microbiology*. 200: 525-540.
- Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z., Li, L. (2017). The Human Microbiota in Health and Disease. (2017). *Engineering*, 3: 71-82.
- Wasfi, R., Abd El-Rahman, O. A., Zafer, M. M., Ashour, H. M. (2018). Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22 (3): 1972–83.
- Wright, A. V., Axelsson, L. (2012). Lactic acid bacteria: An introduction. S. Lahtinen (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* içinde (1-15). USA. CRC Press
- Wu, C. C., Lin, C. T., Wu, C. Y., Peng, W. S., Lee, M. J., Tsai, Y. C. (2014). Inhibitory effect of *Lactobacillus salivarius* on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Molecular Oral Microbiology*. 30: 16-26.
- Xiao, M., Fan, X., Chen, X. X., Wang, H., Zhang, L., Xu, Z. P., Kudinha, T., Kong, F., Xu, Y. C. (2016). Misidentification of a rare species, *Cryptococcus laurentii*, by commonly used commercial biochemical methods and matrix assisted laser desorption Ionization–time of flight mass spectrometry systems: challenges for clinical mycology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 54 (1): 226-229.
- Xu, H., Jeong, H.S., Lee, H.Y. Ahn, J. (2009) Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in Applied Microbiology*, 49: 434–442.

- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J., (2002). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 81:1 – 10
- Todorov, S. D., Dicks, L. M. T. (2005). *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*. 36:2-3.
- Uugantsetseg, E., Batjargal, B. (2014). Antioxidant Activity of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Mongolian Airag. *Mongolian Journal of Chemistry* 15(41): 73–78.
- Van Rijkom, H. M, Truin, G. J, Van 'T Hof, Ma. (1996). A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *Journal of Dental Research*, 75: 790-5.
- Vilcacundo, R., Mendez, P., Reyes, W., Romero, H., Pinto, A., Carrillo, W. (2018). Antibacterial Activity of Hen Egg White Lysozyme Denatured by Thermal and Chemical Treatments. *Scientia Pharmaceutica*. 86: 48, 1-17.
- Yoshida, A., Yoshimura, M., Ohara, N., Yoshimura, S., Nagashima, S., Takehara, T., Nakayamai, K. (2009). Hydrogen Sulfide Production From Cysteine and Homocysteine by Periodontal and Oral Bacteria. *Journal of Periodontology*, 80 (11): 1845-1851.
- Zakaria Gomaa, E. (2013). Antimicrobial and Anti-Adhesive Properties of Biosurfactant Produced by Lactobacilli Isolates, Biofilm Formation and Aggregation Ability. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59 (6): 425–36.
- Zamani, H., Rahbar, S., Garakoui, S. R., Sahebi, A. A., Jafari H. (2017). Antibiofilm potential of *Lactobacillus plantarum* spp. cell free supernatant (CFS) against multidrug resistant bacterial pathogens. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 3 (2): 39–44.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı :** Gizem ARIK

**Yabancı Dil :** İngilizce (ÜDS: 70)

**Doğum Yeri ve Yılı :** Zonguldak/1987

**E-Posta :** garik@eskisehir.edu.tr/gizemarik1@gmail.com

### **Eğitim ve Mesleki Geçmişi:**

#### **Eğitim**

- Yüksek Lisans-2012, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü
- Lisans-2009, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

#### **Mesleki Geçmişi**

- 2009-2011, Öğrenci İşçi, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı

### **Yayınları ve/veya Bilimsel Sanatsal Faaliyetleri:**

#### **Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler**

- Yılmaz Cankılıç, M., Arık, G. (2016), Analysis of cyanobacterial diversity of some hot springs in Afyonkarahisar, Turkey. *Applied Ecology and Environmental Research*, 14(2): 463-484.
- Kıvanç, S. A., Arık, G., Akova Budak, B., Kıvanç, M. (2018), Biofilm forming capacity and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus* spp. with the *icaA/icaD/bap* genotype isolated from ocular surface of patients with diabetes, *Malawi Medical Journal*, 30(4): 243-249.
- Er, S., İstanbullu Tosun, A., Arık, G., Kıvanç, M. (2018). Anticandidal activities of lactic acid bacteria isolated from the vagina. *Turkish Journal of Medical Science*, doi:10.3906/sag-1709-143.

### **Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler**

- Arık, G., Yılmaz Sarıözlü, N. (2011), Determining of Antimicrobial Activity of Actinomycetes Isolated from Different Soil Samples The 4th Congress of European Microbiologists (FEMS), Geneva, İsviçre, 26-30 Haziran (poster sunumu)
- Arık, G., Yılmaz, M. (2011), Identification of Thermophilic Cyanobacteria Isolates Obtained from Afyonkarahisar City-TURKEY IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology BioMicroWorld , Malaga-İspanya, 14-16 Eylül (poster sunumu)
- Berikten, D., Hoşgün, E. Z., Arık, G., Yılmaz, Y., Bozan, B., Kivanç, M. (2013), Screening of White Rot Fungal Species for Their Capacity to Increase Enzymatic Hydrolysis of Hazelnut Shell, V. International Conference Environmental, Industrial and Applied Microbiology, Madrid, İspanya 2-4 Ekim (poster sunumu).
- Arık, G., Kivanç, M. (2015), In vitro investigation of biofilm formation capacity of oral lactic acid bacteria isolates on different carbohydrates, World Congress on Beneficial Microbes: Food, Pharma, Aqua & Beverages Industry Valensiya, İspanya (poster sunumu)

### **Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler**

- Derya Berikten, Emir Zafer Hoşgün, Gizem Arık, Berrin Bozan, Merih Kivanç, 2014, Bazı Mikrofungus Türlerinin Selüloz ve Ksilanaz Aktivitelerinin Araştırılması, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, 23-27 Haziran (poster sunumu).

### **Görev Alınan Projeler**

- Afyon ve Kütahya bölgesindeki bazı termal kaynakların sianobakteri biyoçeşitliliğinin belirlenmesi. BAP-Genel Amaçlı Projeler-Proje Numarası: 1002F85- Araştırmacı (Tamamlandı)
- Üst çene bölgesinde mini vida destekli ortodontik apareyler ile yapılan tedaviler sonrasında çıkarılan mini vidaların mikrobiyolojik olarak değerlendirilmesi. BAP-Genel Amaçlı Projeler-Proje Numarası: 1710F535-Araştırmacı (Devam Ediyor)