TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROBİYOTİK ÜRÜN VE PREPARATLARIN *HELICOBACTER PYLORI* VE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

NURTEN TETİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yard. Doç. Dr. PERVİN RAYAMAN

2017-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans

Anabilim Dalı : Farmasötik Mikrobiyoloji

Tez Sahibi : Nurten Tetik

Tez Başlığı : Probiyotik Ürün ve Preparatların *Helicobacter pylori* ve *Staphylococcus aureus* Üzerine Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması

Sınav Yeri : Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilimdalı

Sınav Tarihi : 25/01/2017

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	**Kurumu**	**İmza**
Yrd.Doç.Dr.Pervin Rayaman	Marmara Üniversitesi	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof.Dr.Ümran Soyoğul Gürer	Marmara Üniversitesi	
Doç.Dr.Zuhal Zeybek	İstanbul Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 09/02/2017 tarih ve 30 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Nurten TETİK

TEŞEKKÜR

Öncelikle danışmanlığımı üstlenen ve tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Yard.Doç.Dr.Pervin RAYAMAN'a,

Yüksek lisans eğitimim sırasında ilgi, bilgi ve tecrübeleri ile desteğini esirgemeyen çok değerli Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Ümran SOYOĞUL GÜRER'e

Çalışmam sırasında değerli fikirleriyle her zaman yol gösteren ve desteğini esirgemeyen Sayın Yard. Doç. Dr. Erkan RAYAMAN'a,

Çalışmam sırasında desteğini ve ilgisini esirgemeyen Sayın Yard. Doç. Dr. Burçak GÜRBÜZ'e ve Ecz. Esra DALKILIÇ'a,

Laboratuvarlarını kullanımımıza açan Biyokimya Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Fikriye URAS ve Prof. Dr. Azize ŞENER'e, ölçümlerde yardımcı olan Araş. Gör. Turgut ŞEKERLER'e,

Klinik *Helicobacter pylori'*nin temin edilmesinde yardımlarını esirgemeyen İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Betigül ÖNGEN'e

Klinik *Staphylococcus aureus'un* temin edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarından Doç. Dr. Rıza ADALETİ'ye,

Laboratuvarlarını kullanımımıza açan Temel Bilimler Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Kadir TURAN 'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca dostluklarını, gerektiğinde yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeye yüksek lisans arkadaşlarım Kamile YILDIRIM, Nazan ARSLAN, Bahar KOCA, Tuğçe KOÇOĞLU, Hatice Merve ALTINDAĞ'a ve arkadaşım Biyolog Neslihan CİHANOĞLU'na,

Hayatımın her anında daima yanımda olan ve beni her konuda destekleyen çok kıymetli aileme,

Sonsuz teşekkürler.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SAG-C-YLP-111115-0506 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER **Sayfa No**

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ vi
ŞEKİLLER LİSTESİ..... vviii
TABLOLAR LİSTESİ..... ix
RESİMLER LİSTESİ..... x
1. ÖZET..... 1
2. SUMMARY 2
3. GİRİŞ VE AMAÇ 3
4. GENEL BİLGİLER..... 6
4.1. Probiyotik Tanımı ve Tarihçesi 6
4.2. Probiyotik Olarak Seçilecek Mikroorganizmalarda Aranan Özellikler..... 8
4.3. Probiyotik Mikroorganizmaların Genel Özellikleri 10
4.3.1. Laktik asit bakterileri..... 11
4.3.2. *Bifidobacterium* türleri..... 12
4.3.3. *Lactobacillus* türleri..... 13
4.3.4. *Lactococcus* türleri 14
4.3.5. *Streptococcus* türleri 14
4.3.6. *Leuconostoc* türleri..... 14
4.3.7. *Pediococcus* türleri 15
4.3.8. *Enterococcus* türleri 15
4.3.9. *Bacillus* türleri 15
4.3.10. *Saccharomyces* türleri..... 16
4.4. Probiyotik Bakteriler Tarafından Üretilen Metabolik Ürünler 16
4.4.1. Laktik asit 17
4.4.2. Hidrojen peroksit 18
4.4.3. Diasetil ve asetaldehit..... 19
4.4.4. Karbondioksit 21
4.4.5. Düşük molekül ağırlıklı antimikrobiyal maddeler 22
4.4.5.1. Reuterin..... 22

4.4.5.2. Reuterisiklin 23
4.4.5.3. 2-Pirolidon-5-Karboksilik Asit 23
4.4.6. Bakteriyosin 24
4.5. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması 25
4.5.1. Sınıf I 25
4.5.2. Sınıf II 26
4.5.3. Sınıf III 27
4.5.4. Sınıf IV 27
4.6. Nisin 27
4.7. Probiyotiklerin Etki Mekanizması 29
4.8. Probiyotik Mikroorganizmaların Safra Direnci 32
4.9. Probiyotik Mikroorganizmaların Asit Direnci 33
4.10. Prebiyotikler 33
4.11. *Staphylococcus aureus'*un Genel Özellikleri 35
4.12. *Helicobacter pylori'nin* Genel Özellikleri 37
5. GEREÇ VE YÖNTEM 41
5.1. Gereçler 41
5.1.1. Mikroorganizmalar 41
5.1.1.1. İzole edilen mikroorganizmalar 41
5.1.1.2. Standart mikroorganizmalar 41
5.1.1.3. Klinik mikroorganizmalar 41
5.1.2. Besiyerleri 42
5.1.3. Kimyasal maddeler 43
5.1.4. Kullanılan araç ve gereçler 44
5.1.5. Çözeltiler 44
5.1.6. McFarland standart bulanıklık tüpleri 45
5.2. Yöntemler 45
5.2.1. Suşların temini ve saklanması 45
5.2.2. Mikroorganizmaların saklanması için kullanılan besiyerleri 45
5.2.3. Probiyotik mikroorganizmaların tanımlanması 46
5.2.4. Probiyotik ürünlerden mikroorganizmaların izolasyonu 47
5.2.5. İzolatlarının tanımlanması 48
5.2.5.1. Gram boyama 48

5.2.5.2. Katalaz testi 48
5.2.5.3. Voges-Proskauer testi 49
5.2.5.4. Arjinin hidroliz testi 49
5.2.5.5. Glikozdan gaz üretimi 49
5.2.5.6. İzole edilen mikroorganizmaların MALDI-TOF MS ile tanımlanması 50
5.2.6. İzolatların probiyotik özelliklerinin tespit edilmesi 51
5.2.6.1. Probiyotik bakterilerin farklı pH değerlerinde gelişiminin tespit edilmesi 51
5.2.6.2. Probiyotik bakterilerin farklı safra tuz konsantrasyonlarında gelişiminin tespit edilmesi 52
5.2.6.3. Probiyotik bakterilerin farklı sıcaklıklarda gelişiminin tespit edilmesi 53
5.2.7. Probiyotik bakteri süpernatantın hazırlanması 54
5.2.8. Probiyotik mikroorganizmaların antimikrobiyal aktivitesinin tespit edilmesi 54
5.2.8.1. Spot on lawn yöntemi 54
5.2.8.2. Agar oluk difüzyon yöntemi 55
5.2.8.2.1. Nisinin antibakteriyel aktivitesinin tespit edilmesi 55
6. BULGULAR 57
6.1. Probiyotik Ürünlerden Mikroorganizmaların İzolasyonu 57
6.2. İzolatlarının Tanımlanması 59
6.2.1. Gram boyama 59
6.2.2. Katalaz testi 60
6.2.3. Voges-Proskauer testi 60
6.2.4. Arjin hidroliz testi 61
6.2.5. Glikozdan gaz üretimi 61
6.2.6. İzole edilen mikroorganizmaların MALDI-TOF MS ile tanımlanması 64
6.3. İzolatların Probiyotik Özelliklerinin tespit edilmesi 66
6.3.1. Probiyotik bakterilerin farklı pH değerlerinde gelişiminin tespit edilmesi 66
6.3.2. Probiyotik bakterilerin farklı safra tuz konsantrasyonlarında gelişiminin tespit edilmesi 72
6.3.3. Probiyotik bakterilerin farklı sıcaklıklarda gelişiminin tespit edilmesi 78
6.4. Probiyotik Bakterilerin Antimikrobiyal Aktivitesin Tespit Edilmesi 85
6.4.1. Spot on lawn yöntemi ile antimikrobiyal aktivite tespiti 85
6.4.2. Agar oluk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite tespiti 88
6.4.2.1. Nisinin antimikrobiyal aktivitesinin tespit edilmesi 92

7. TARTIŞMA ve SONUÇ 94
8. KAYNAKLAR..... 101
9. EKLER..... 116

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

ATCC: American Type Culture Collection

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CagA: Cytotoxin-associated gene A

Da: Dalton

FTS: Fizyolojik Tuzlu Su

FAO : Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)

GRAS: Generally Recognized As Safe (Genel olarak güvenilir)

H_2O_2: Hidrojen peroksit

HCl: Hidroklorik Asit

IARC: International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu)

IPW: International Probiotic Workshop (Uluslararası Probiyotik Çalıştayı)

CO_2: Karbondioksit

kDa: Kilodalton

kob: Koloni oluşturan birim

LAB: Laktik Asit Bakterileri

L: Litre

MALDI-TOF MS: Matriks Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

MSSA: Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*

µg: Mikrogram

µL: Mikrolitre

mL: Mililitre

mm: Milimetre

MİK: Minumum inhibitör konsantrasyon

MALT: Mucosa-associated lymphoid tumors

MHA: Mueller Hinton Agar

OD: Optik Dansite

KOH: Potasyum hidroksit

PPI: Proton pompa inhibitörü

cm: Santimetre

NaOH: Sodyum Hidroksit

FDA: U.S. Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)

VacA: Vacuolating cytotoxin gene A

WHO: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER LİSTESİ Sayfa No

Şekil 1: Laktik asit fermentasyonu 12
Şekil 2: Laktoz izomerleri 18
Şekil 3: Hidrojen peroksit reaksiyonu 18
Şekil 4: Hidrojen peroksit molekülünün yapısı 19
Şekil 5: Diasetil molekülünün yapısı 20
Şekil 6: Asetaldehit molekülünün yapısı 21
Şekil 7: Karbondioksit molekülünün yapısı 22
Şekil 8: Nisinin yapısı 28
Şekil 9: Probiyotiklerin etki mekanizması 32
Şekil 10: *Staphylococcus aureus'un* elektron mikroskop görüntüsü 35
Şekil 11: *Helicobacter pylori'*nin elektron mikroskop görüntüsü 38
Şekil 12: Ürenin midedeki yıkımı 39

TABLOLAR LİSTESİ Sayfa No

Tablo 1: Probiyotik mikroorganizmalar 10
Tablo 2: Probiyotik bakteriler tarafından üretilen metabolik ürünler 17
Tablo 3: Klinik mikroorganizmalar 42
Tablo 4: Elde edilen izolatların kaynak, sayı ve gelişim ortamları 58
Tablo 5: MALDI-TOF MS ile tanımlanan probiyotik bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları 62
Tablo 6: MALDI-TOF MS ile tanımlanan tür sonuçları 65
Tablo 7: Probiyotik bakterilerin farklı pH değerlerinde canlılık kontrolü 66
Tablo 8: Probiyotik bakterilerin farklı pH değerlerinde canlılık gelişimi 67
Tablo 9: Probiyotik bakterilerin farklı safra tuz konsatrasyonlarında canlılık kontrolü 72
Tablo 10: Probiyotik bakterilerin farklı safra tuz konsatrasyonlarında gelişimi 73
Tablo 11: Probiyotik bakterilerin farklı sıcaklık değerlerinde canlılık kontrolü 78
Tablo 12: Probiyotik bakterilerin farklı sıcaklık değerlerinde gelişimi 79
Tablo 13: Probiyotik bakterilerin standart (ATCC) ve klinik *S.aureus'*a karşı antibakteriyel aktivite sonuçları 87
Tablo 14: Probiyotik bakteri süpernatantlarının pH değeri ile Colombia agar besiyerinde oluşturdukları hemoliz zonu 89
Tablo 15: Nisin (640µg/mL)'nin *S.aureus* üzerine antibakteriyel aktivitesi 93

RESİMLER LİSTESİ Sayfa No

Resim 1: MALDI-TOF MS ile mikroorganizmaların tanımlanması..... 50
Resim 2: Dilüsyon sonrası MRS agar besiyerinde üreyen koloniler..... 57
Resim 3: Gram boyama yöntemi ile boyanmış izolatların mikroskoptaki görünümü 59
Resim 4: Katalaz testi pozitif ve negatif görünümü 60
Resim 5: Voges-Proskauer testi pozitif ve negatif görünümü..... 60
Resim 6: Arjin hidroliz testi negatif (a) ve pozitif görünümü (b) 61
Resim 7 : Glikozdan gaz oluşturmayan homofermentatif bakteri görünümü 61
Resim 8: MALDI-TOF MS sonuç görünümü 64
Resim 9: MRS agar yüzeyi üzerine yapılan nokta ekim 84
Resim 10: 96 kuyucuklu mikroplak görünümü 84
Resim 11: Probiyotik bakterinin 3 nolu klinik MRSA suşuna karşı antimkrobiyal aktivitesi 85
Resim 12: Probiyotik bakterinlerin 10 nolu klinik MSSA suşuna karşı antimkrobiyal aktivitesi 86
Resim 13: Probiyotik bakterilerin 9 nolu klinik MSSA suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesi 86
Resim 14: Probiyotik bakterinin 9 nolu klinik MSSA suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesi 88
Resim 15: Probiyotik bakteri süpernatantlarının *H.pylori* ATCC 43504'e karşı oluşturdukları zon..... 90
Resim 16: *H.pylori* ekilmemiş Colombia agar besiyerinde probiyotik bakteri süpernatantlarının oluşturdukları hemoliz 90
Resim 17*:* *Helicobacter pylori* kolonilerinin görünümü 91
Resim 18: Gram boyama yöntemi ile boyanmış *H.pylori*'nin mikroskoptaki görünümü 91
Resim 19: Probiyotik bakteri süpernatantlarının 4 nolu klinik MRSA üzerine antimikrobiyal aktivitesi..... 92

Resim 20: Nisin (640µg/mL)‘nin 3 nolu klinik MRSA suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesi ..... .92
Resim 21: Nisin (640µg/mL)‘nin 9 nolu klinik MSSA suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesi 93

Probiyotik Ürün ve Preparatların *Helicobacter pylori* ve *Staphylococcus aureus* Üzerine Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması

Öğrencinin Adı: Nurten Tetik
Danışman: Yard. Doç. Dr. Pervin Rayaman
A**nabilim Dalı:** Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: *Helicobacter pylori* ve *Staphylococcus aureus*'un oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin dezavantajları ve bu antibiyotiklere karşı gelişen direnç giderek artmaktadır. Dolasıyla çalışmamızda farklı ticari preparat, ticari ve doğal probiyotik üründen probiyotik bakteri varlığı tespit edilip bu bakterilerin *H. pylori* ile *S. aureus* üzerine antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda doğal ve ticari probiyotik ürünlerden, eczane preparatlarından probiyotik mikroorganizmalar izole edilip Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrofotometresi (MALDI-TOF MS) ve konvansiyonel yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır. Tanımlanan türlerin farklı tuz, pH ve sıcaklık değerlerine karşı toleransı araştırılmıştır. Bu ortam koşullarına daha çok tolerans gösteren probiyotik bakterilerin agar oluk difüzyon ve Spot on lawn yöntemi kullanılarak antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda yer alan 16 adet probiyotik ürün ve preparattan 15 adet farklı olmak üzere toplamda 27 adet probiyotik bakteri MALDI-TOF ile tanımlanmıştır. Tanımlanan bu bakterilerden 7 adedi farklı olmak üzere 10 adet probiyotik bakteri farklı pH, tuz, sıcaklık koşullarının her üçünde canlı kalmıştır. Ev peynir suyundan izole edilen *Lactobacillus plantarum* 3 nolu klinik MRSA suşuna karşı (45,62 mm/zon) en yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Sonuçlar: Doğal ile ticari probiyotik ürünlerde ve ticari preparatlarda probiyotik bakteri tespit edilmiştir. Bu probiyotik bakterilerin *H. pylori* ve *S. aureus'a* karşı Agar oluk difüzyon yönteminde antimikrobiyal aktivitesinin olmadığı ancak Spot on lawn yönteminde ise *S.aureus'a* karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Probiyotik, antimikrobiyal aktivite, *Helicobacter pylori, Staphylococcus aureus, Lactobacillus spp.*

Investigation of Antimicrobial Activity of Probiotic Products and Preparations on *Helicobacter pylori* and *Staphylococcus aureus*

Student's Name: Nurten Tetik
Advisor: Assist. Prof. Dr. Pervin Rayaman
Department: Pharmaceutical Microbiology

2. SUMMARY

Aim: The disadvantages and the resistance against antibiotics used in the treatment of infections caused by *Helicobacter pylori* and *Staphylococcus aureus* are gradually increasing. Accordingly, in our study, it was aimed to detect probiotic bacteria in various commercial preparations, commercial and natural probiotic products and to investigate the antimicrobial activity of these bacteria against *H. pylori* and *S. aureus*.

Materials and Methods: In our study, probiotic microorganisms were isolated from natural and commercial probiotic products, pharmacy preparations were identifined by using MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) and conventional methods. The tolerance of the identifined species to various salt, pH and temperature values was investigated. The antimicrobial activity of probiotic bacteria which were more tolerant to environmental conditions was investigated by using well diffusion and Spot on lawn methods.

Results: In our study from the 16 probiotic products and preparates, 15 of which were various, totally 27 probiotic bacteria were identified by MALDI-TOF. Moreover, among the 10 identified bacteria 7 were different and remained alive in all of the three different salt, pH and temperature conditions. *Lactobacillus plantarum* isolated from homemade whey showed the highest antimicrobial activity against clinical MRSA strain 3 (45,62 mm/zone).

Conclusion: Probiotic bacteria were detected in natural and commercial probiotic products and commercial preparations. These probiotic bacteria did not show antimicrobial activity against *H. pylori and S. aureus* by the well diffusion method but they showed antimicrobial activity against *S. aureus* by Spot on lawn method.

Key Words: Probiotic, Antimicrobial activity, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus spp.*

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Helicobacter pylori (H. pylori) insan populasyonunun %50'den fazlasının mide mukozasında yer almaktadır. *H.pylori* her ne kadar 19.yy sonunda memeli midesinde gözlenmiş olsa da bu bakteri 1980'lerin başında insan mide biyopsilerinden izole edilip daha sonra sınıflandırılmıştır (Ruggiero, 2014). *H.pylori* enfeksiyonu, kronik gastrit, mide ve duodenal ülser gibi çeşitli gastroduodenal inflamasyonlar ile ilişkilidir. Ayrıca *H.pylori* enfekte hastalarda gözlenen iltihaplanma ile birlikte oksidatif ve nitrosatif stresler gastrik karsinogenezde önemli rol oynamaktadır, *H.pylori*' nin mide lenfomalarının yaklaşık üçte ikisinden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. FDA (Food and Drug Administration) *H.pylori*'yi halk sağlığı üzerine ciddi bir tehdit oluşturacak potansiyel patojen listesine eklemiştir (Iannuccelli ve ark., 2015). WHO (World Health Organization)'nün çalışma grubu olan IARC (International Agency for research on Cancer) 1994 yılında, *H.pylori*'*yi* gastrik kanser için 1. derece risk faktörü olarak tanımlamıştır (Demiray ve Manavoğlu, 2003).

Antibiyotiğe dirençli *H.pylori* suşlarının yaygınlığı, geleneksel *H.pylori* tedavilerinde başarısızlığa neden olmuştur. *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun tedavisinde önerilen birinci basamak tedavi, 7 ile 10 gün süren proton pompa inhibitörün (PPI) içerdiği üçlü tedavidir. Özellikle klaritromisin direnci % 20 ile % 15' in altında olan bölgelerde PPI-klaritromisin-amoksisilin veya metronidazolden oluşan 3'lü tedavi uygulanmaktadır. Metronidazol direncinin % 40'ın altında görüldüğü bölgelerde amoksisilin yerine metronidazolün kullanılabilmesi bir avantaj sağlamaktadır. Ancak tedavinin giderek etkisiz hale gelmesi *H.pylori* eradikasyonu için daha yaygın olan bizmut tuzlarınında yer aldığı dörtlü terapiyi etkin kılmıştır. İkinci basamak tedavide PPI, bizmut, metronidazol ve tetrasiklin ile dörtlü tedavi veya bir antibiyotiği değiştiren üçlü tedavi kullanılmalıdır (Malfertheiner ve ark., 2005; Gatta ve ark., 2005; Fallone ve ark., 2016). *H.pylori* direnç sorununun yanında antibiyotiklerin bulantı, ishal, karın ağrısı, tat bozuklugu gibi yan etkilerden dolayı hastaların ilaçları tolere edememeleri nedeniyle bu tedavi tüm hastalardaki

H.pylori'yi eradike edememektedir. Buna ilaveten yüksek maliyeti nedeniyle *H.pylori* enfeksiyonlarının daha sık görüldügü sosyoekonomik düzeyi düşük olan ailelerde gerekli tedavi yeterli süre ve dozda uygulanamamaktadır (Malfertheiner ve ark., 2005; Kasapoğlu ve Türkay, 2008).

Helicobacter pylori dışında en önemli bakteriyel enfeksiyonlarının bir diğeri de *Staphylococcus aureus*'tur. Alman hekim Anton Rosenbach tarafından ilk kez 1884'te tanımlanan *S.aureus* günümüzde yaygın Metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) nedeniyle tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olmaktadır (Freeman Cook, 2005).

Staphylococcus aureus suşları doku ve organlarda akut ve piyojenik enfeksiyonlara, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına, postoperatif yara enfeksiyonlarına ve bakteriyeminin de yer aldığı geniş bir spektrumda enfeksiyonlara neden olan, özellikle metisiline dirençli suşları ile ciddi hastane enfeksiyonları oluşturan bir etkendir (Çiftci ve ark., 2009).

Metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA), tüm betalaktamlara dirençli olmasının yanı sıra makrolidler, kinolonlar, tetrasiklinler, linkozamidler ve aminoglikozidlere de direnç gösterebilmektedir. Dolayısıyla bu suşların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde güçlükler yaşanmaktadır (Çıkman ve ark., 2015) .

Yaşlanan populasyonda antibiyotik direncinin, kanser ve alerjik hastaların artması çoğu fonksiyonel besin şeklinde olan alternatif tedavi ve korunma yollarının araştırılmasını zorunlu hale getirmiştir. Bu nedenle bu kişilerin tedavi ve korunmasında probiyotiklere yönelim olmuştur (Çoşkun , 2014).

Probiyotik kavramı Rus bilim adamı Metchnikoff'un Bulgar köylülerin uzun yaşamı ile yoğurt tüketimi ve laktik asit bakterileri arasındaki ilişkiyi kurmasına dayanmaktadır (Çoşkun, 2014). Probiyotikler, insan sağlığı üzerinde olumlu etkisi olan canlı mikrobik gıda bileşenleri olarak tanımlanır. FAO ve WHO, probiyotikleri yeterli miktarda alındığında konakçının sağlığına olumlu katkıları olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlamaktadır (Sharma ve ark, 2012; Çoşkun, 2014).

Probiyotikler bağırsaklardaki mikrofloranın doğal dengesini korumaya yardımcı olan bakterilerdir. İnsan sindirim sistemi, zararlı bakterilerin gelişmesini azaltan ve sağlıklı bir sindirim sistemini teşvik eden yaklaşık 400 probiyotik bakteri türü içermektedir (Bhan, 2011).

Probiyotikler, özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* laktoz intoleransının giderilmesinde, viral ile bakteriyel enfeksiyonların önlenmesinde, antibiyotik veya radyoterapi kaynaklı diyare tedavisinde, kandaki kolestrol düzeyinin azaltılmasında ve bunun yanında gösterdikleri antimutajenik, antikarsinojenik etki ile beraber immunmodülasyonda önemli rol almaktadır (Bhan, 2011). Probiyotik olarak kullanılan en yaygın bakteriler Laktik Asit Bakterileri (LAB)'dir. LAB'nin en önemli görevlerinden birisi de, başta laktik asit olmak üzere antimikrobiyal özellik gösteren maddeler sentezleyerek, gıdalarda istenmeyen mikroorganizmaların ve patojenlerin gelişimini önlemektir (Gülseren, 2012).

Günümüzde süt, süt ürünlerinde ve özellikle yoğurtlarda, fermente gıdalarda çok sayıda probiyotik bulunmaktadır. Sağlık üzerine yaraları bilinen bazı *Lactobacillus, Bifidobacterium, Streptococcus, Lactococcus* ve *Saccharomyces* gibi seçilmiş suşlar gıdaların içeriğine dahil edilmiştir (Sharma ve ark, 2012).

Çalışmamızda insanların yüzyıllardır kullandığı yoğurt, kefir ve peynir gibi probiyotik içeren fermente ürünler ile preparatlarının *Helicobacter pylori* ve *Staphylococcus aureus* üzerine antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Probiyotik Tanımı ve Tarihçesi

Probiyotik kelimesi Yunanca ‘’yaşam için’’ anlamına gelen ‘’pros’’ ve ‘’bios’’ kelimelerinde meydana gelmektedir. Probiyotikler tüketilmeleri sonucu gastrointestinal sistemde, ürogenital kanallarda, üst solunum yolunda sağladığı yararlı etkiler ile mikroflora özelliklerini geliştiren tek ya da karışık mikroorganizma kültürü olarak tanımlanmaktadır (Kavas**,** 2007; Klaenhammer ve Kullen, 1999). Metchnikoff bu bakterilerin olumlu etkilerini gözleyen ilk bilim adamıdır. Metchnikoff, Balkan köylülerinin uzun ömürlü olmasını fazla fermente süt ürünleri tüketmelerine ve bunların içerisinde yer alan probiyotik bakterilere bağlamıştır. Metchnikoff’ a göre laktik asit bakterileri ince bağırsağın yapısını ve mikrobiotanın normal aktivitesini geliştirmek için probiyotik olarak kullanılmaktadır (Ouwehand ve Vesterlund, 2004). Probiyotikler farklı araştırmacılar tarafından şu şekilde tanımlanırlar;

1953**’**te Kollath probiyotikleri bitkisel besinlerde bulunan vitaminler, aromatik bileşikler, enzimler ve yaşamsal işlevlerimizde rolü olan diğer bileşikler olarak tanımlamıştır (Çoşkun, 2014).

1954’te “probiyotik” terimini ilk olarak Vergin “Anti- und Probiotika” adlı makalesinde kullanmıştır. Vergin makalesinde probiyotik terimini flora üzerinde yararlı olan patojen olmayan olarak tanımlar (Vergin, 1954; Gürsoy ve Kınık, 2006).

1955’te Kolb antibiyotiklerin istenmeyen etkilerinin probiyotikler ile önlenebildiğini belirtmiştir (Çoşkun, 2014).

1965**’**te Lilly ve Stillwell probiyotikleri bir mikroorganizma tarafından salgılanarak diğer bir mikroorganizmanın çoğalmasını uyaran maddeler anlamında “antibiyotik” zıttı olarak kullanmışlardır (Lilly ve Stillwell, 1965) .

1971'de Sperti probiyotikleri mikroorganizmaların çoğalmasını artıran doku ekstratları olarak tanımlamıştır (Sperti, 1971).

1973' te Fujii ve Cook probiyotikleri konakçıda enfeksiyonlara direnci arttıran fakat in vitro koşullarda mikroorganizmaların çoğalmasını inhibe etmeyen bileşikler olarak tanımlamışlardır (Çoşkun, 2014).

1974'de Parker probiyotikleri bağırsaklarda mikrobiyal dengenin sağlanmasına katkısı olan mikroorganizma veya bileşikler olarak tanımlamıştır (Parker, 1974).

1989'da Fuller probiyotikleri konak hayvanın yararına olacak şekilde intestinal mikrobiyal dengesini iyileştiren canlı mikrobiyal besin katkısı olarak tanımlamıştır (Fuller, 1989; Sullivan ve Nord, 2002).

1992'de Havenaar ve Huis Int'Veld probiyotikleri bir insan veya hayvana uygulandığında endojen floranın özelliklerini geliştirerek sağlık üzerinde olumlu etkileri olan canlı bir mikroorganizma veya çeşitli mikroorganizmaların karışımı olarak tanımlamışlardır (Havenaar ve Huis In't Veld, 1992; Vasiljevic ve Shah, 2008).

1996'da Salminen probiyotikleri konakçının sağlığını ve beslenme durumunu olumlu etkileyen canlı bir mikrobiyal kültür veya kültüre edilmiş süt ürünü olarak tanımlamıştır (Salminen, 1996).

1996'da Schaafsma probiyotikleri temel besleyici özelliklerin ötesinde yeterli miktarda alındığında sağlık üzerinde olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlamıştır (Schaafsma, 1996).

1999'da Salminen ve arkadaşları probiyotikleri konakçının sağlığı ve iyi olma hali üzerinde olumlu etkileri olan canlı mikrobiyal hücre bileşenleri olarak tanımlamıştır (Salminen ve ark., 1999).

2001'da Schrezenmeir ve Vrese probiyotikleri konakçının bir kompartmanında bulunan, mikroflorayı değiştirerek (implantasyon veya kolonizasyonla) konakçıda

olumlu etkiler yapan canlı ve belirli mikroorganizmaları yeterli miktarda içeren bir ürün veya preparat olarak tanımlamışlardır (Schrezenmeir ve Vrese, 2001).

2002'de FAO ve WHO probiyotikleri yeterli miktarlarda alındığında konakçının sağlığına olumlu katkıları olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlamıştır (Çoşkun, 2014). Ayrıca 2002 yılında Birleşik Devletlerdeki FAO/WHO çalışma grubu besinlerde yer alan probiyotiklerin gelişimi ve değerlendirilmesi için yeni bir rehber yayınlamıştır (Messaoudi ve ark., 2013).

Son olarak 2004 yılında Hollanda'da gerçekleşen Ulusararası Probiyotik Çalıştayı'nda (International Probiotic Workshop= IPW) probiyotikler klinik deneyler ile belirli hastalıkları tedavi edici etkileri kanıtlanmış ürünler olarak tanımlanmıştır (Yeşilova ve ark., 2009).

Genellikle tanımlandığı gibi probiyotikler konağa yeterli miktarda verildiklerinde sağlığa yararlı olan canlı mikroorganizmalardır (Messaoudi ve ark., 2013).

4.2. Probiyotik Olarak Seçilecek Mikroorganizmalarda Aranan Özellikler

2002 yılında FAO/WHO göre LAB'nin probiyotik olarak kabul görmesi için aşağıdaki basamaklardan geçmesi gerekmektedir;

1- Probiyotik özellikleri incelenerek mikroorganizmanın türü net olarak bilinmelidir.
2- Probiyotik potansiyelin ölçümü için gastrik asiditeye direnç, safra suyu direnci, mukoza ve epitel dokuya tutunma, antimikrobiyal aktivite, patojenlerin tutunma özelliklerini azaltma, safra tuzu hidrolaz aktivitesi gibi in vitro testler yapılmalıdır. Bu mikroorganizmalar düşük pH ve safra tuzlarından etkilenmeden bağırsakta metabolize olmalıdır. Probiyotik organizmaların en önemli seçim kriterleri mide ve asidik ürünlerde canlı kalabilmeleridir (Sağdıç ve ark, 2004; Yaman ve Esendal, 2004).

3- Antibiyotik direnç yapısının belirlenmesi, bazı metabolik aktivitelerinin belirlenmesi (Örn: safra tuzu dekonjugasyonu) ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalardaki yan etkilerinin incelenmesi gibi gıda güvenlik testleri yapılmalıdır.

4- Hayvanlar ve insanlar kullanılarak in vivo testler yapılmalı ve insanlar üzerinde yapılan sağlam bilimsel kanıtlar ile bir probiyotik kültürün herhangi bir sağlık sorununu giderdiği yönü ispatlanmalıdır (Akman, 2009).

FAO ve WHO' nun 2002 yılında yukarıda verilen özelliklere ilaveten LAB 'ın probiyotik olarak kabul edilmesi için aşağıdaki maddeler de eklenmiştir:

- LAB patojen ve toksik olmamalı (enterotoksin ve sitotoksin yapımı, patojenik adhezyon, hemoliz, antibiyotik direnç geni taşıma dahil) (Gönülateş, 2008).
- LAB konakçıda metabolik aktiviteleri etkileyebilmeli.
- LAB besinler içerisinde yeterli sayıda canlı kalabilmeli, ürünün raf ömrü süresince canlı kalabilmeli.
- LAB yüksek sayılarda canlı mikroorganizma içermeli.
- LAB üretim ile depolama esnasında canlılığını ve aktivitelerini kaybetmemeli (Yaman ve Esendal, 2004).
- LAB immün stimülatör etkiye sahip olmalıdır (Çoşkun, 2014).

Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterobacterium gibi LAB'leri bağırsak mikroflora üyeleri olmalarından dolayı probiyotik ürünlerde yaygın kullanılır. Aynı zamanda bu bakteriler fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılmakta olup GRAS (Genel olarak güvenilir-zararsız kabul edilen) olarak kabul edilmektedir (Uymaz, 2009).

4.3. Probiyotik Mikroorganizmaların Genel Özellikleri

Tablo 1: Probiyotik mikroorganizmalar

***Lactobacillus* türleri**	***Bifidobacterium* türleri**	***Bacillus* türleri**	***Pediococcus* türleri**	***Streptococcus* türleri**	**Digerleri**
Lactobacillus cellobiosus	*Bifidobacterium adolescentis*	*Bacillus coagulans*	*Pediococcus pentosaceus*	*Streptococcus cremoris*	*Leuconostoc mesenteroides*
Lactobacillus acidophilus	*Bifidobacterium infantis*	*Bacillus subtilis*	*Pediococcus cerevisiae*	*Streptococcus diacetylactis*	*Leuconostoc pseudomesenteroides*
Lactobacillus fermentum	*Bifidobacterium thermophilum*	*Bacillus pumilus*	*Pediococcus acidilactici*	*Streptococcus faecium*	*Enterococcus faecium*
Lactobacillus rhamnosus	*Bifidobacterium bifidum*	*Bacillus lentus*		*Streptococcus intermedius*	*Enterococcus faecalis*
Lactobacillus salivarius	*Bifidobacterium longum*	*Bacillus licheniformis*		*Streptococcus thermophilus*	*Enterococcus gallinarum*
Lactobacillus gasseri	*Bifidobacterium breve*	*Bacillus natto*		*Streptococcus salivarius*	*Propionibacterium shermanii*
Lactobacillus helveticus	*Bifidobacterium animalis*	*Bacillus toyoi*		*Streptococcus sabrinus*	*Propionibacterium freudenreichii*
Lactobacillus plantarum		*Bacillus cereus*		*Streptococcus mutans*	*Propionibacterium jensenii*
Lactobacillus reuteri		*Bacillus licheniformis*		*Streptococcus rattus*	*Bacteroides ruminicola*
Lactobacillus delbrueckii		*Bacillus megaterium*		*Streptococcus bovis*	*Bacteroides suis*
Lactobacillus johnsonii					*Bacteroides capillus*
Lactobacillus curvatus					*Bacteroides amylophilus*
Lactobacillus brevis					*Candida glabrata*
Lactobacillus hilgardii					*Saccharomyces boulardii*
Lactobacillus bulgaricus					*Saccharomyces cerevisiae*
Lactobacillus casei					*Aspergillus niger*
Lactobacillus crispatus					*Aspergillus oryzae*
Lactobacillus gallinarum					*Kluyveromyces lactis*
Lactobacillus kefiri					*Lactococcus lactis subsp. lactis*
Lactobacillus paraplantarum					*Lactococcus lactis subsp. cremoris*

(Caramia ve Silvi, 2011; Villoslada ve ark., 2010; O'Grady ve Gibson, 2005; Başoğlu, 2014; Ceyhan ve Alıç, 2012; Williams, 2010; Aftabuddin ve ark., 2013; Çoşkun, 2014)

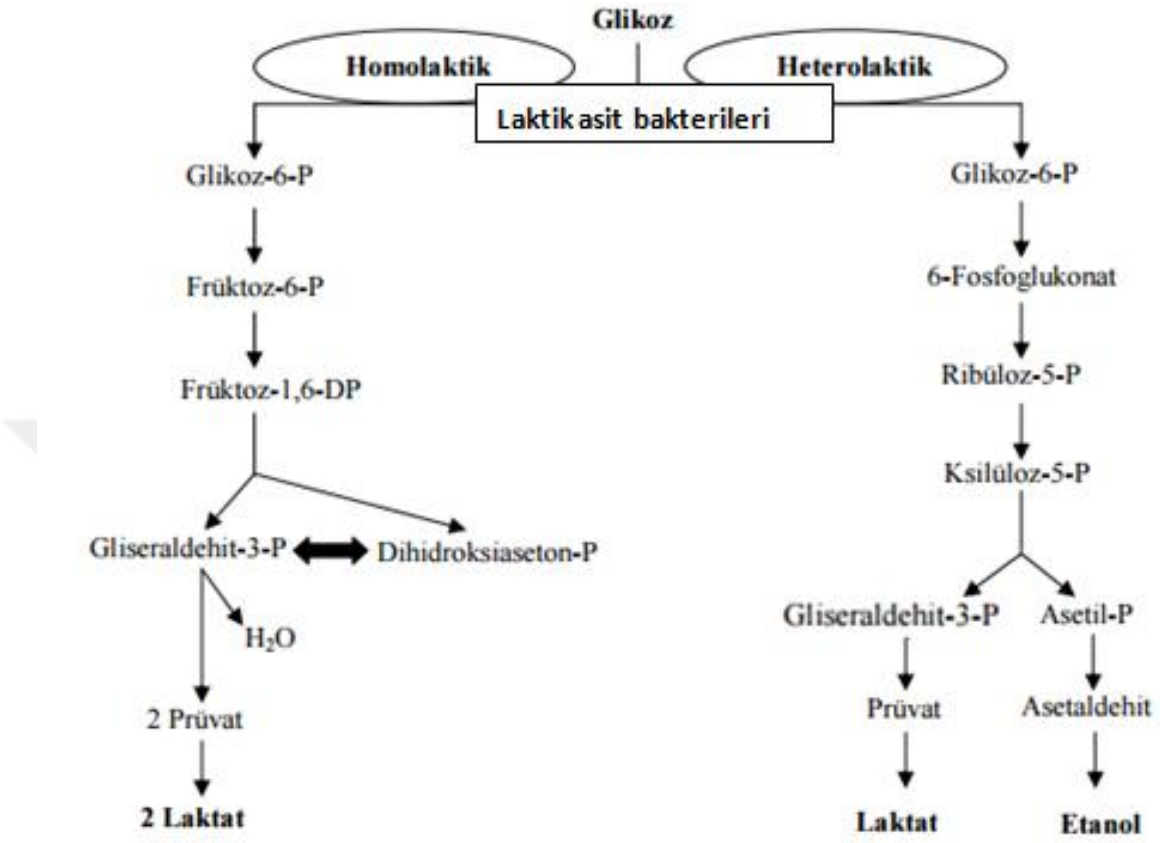
4.3.1. Laktik asit bakterileri

Probiyotikler ilk nitelendirildiği zaman sadece bakterilerden ibaret oldukları biliniyordu, fakat bugün mantarların probiyotikler içerisinde bulunduğu öngörülmektedir (Gönülateş, 2008). Probiyotik bakteriler bağırsak mukozal ve sistemik bağışıklığı düzenleyen, vücudun mukoz membranlarında ve sindirim bölgelerinde kolonize olabilen bakterilerdir (Doğan, 2012).

Probiyotik olarak kullanılan en yaygın LAB *Lactobacillus, Streptococcus, Enterococcus, Leuconostoc, Pediococcus ve Lactococcus* olmak üzere 6 gruba ayrılır (Yürümez, 2011). Bu mikroorganizmalar katalaz negatif olup, süperoksit dismutaz enzimine sahip olmadıkları için oksidaz negatiftirler. Laktik asit bakterileri fermentatif bir yapıya sahiptir ve uygun şartlarda kolay bir şekilde üreyebilmektedirler. LAB'leri fermente etme özelliklerine göre iki gruba ayrılırlar. Glikozu yalnızca laktik asite fermente eden homofermentatif mikroorganizmalar ve bunun yanında diğer ürünlere (asetik asit, etanol, formik asit, karbon dioksit gibi) fermente eden heterofermentatif mikroorganizmalardır. Bu ayırım şekerlerin temel katabolik yollarındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Homofermentatif LAB; şekerleri fruktozdifosfat (FDP) yolu ile fermente ederek saf veya % 90 saflıkta laktik asit üretmektedir. Heterofermentatif LAB, FDP yolunun aldolaz ve trioz-fosfat izomeraz enzimine sahip değillerdir. Bundan dolayı heterofermentatif bakterler FDP yolunu kullanamamaktadır. Glukozun yıkımı pentozfosfat (PP) yolu ile olmakta ve sonuçta laktat ile birlikte yaklaşık eşdeğer miktarda etil alkol ve karbondioksit üretilmektedir (Çon ve Gökalp, 2000) (Şekil 1).

LAB doğada yaygındır ve gıdaların mikrobiyal bozulmalara karşı korumasında, bazı gıdaların üretiminde, olgunlaştırılmasında olumlu rol oynamaları ayrıca antimikrobiyal metabolitler üreterek antagonistik özelliğe sahip olmaları açısından gıda teknolojisinde önemli yer tutmaktadır (Champomier-Verge`s, 2002). LAB'leri antagonistik etkiyi gösterebilmeleri için mide asidi ve safra tuzlarını aşarak

bağırsaklara canlı olarak ulaşabilmeleri ve orada metabolizmaya dâhil olmaları gerekmektedir (Gönülateş, 2008).



Şekil 1: Laktik asit fermentasyonu

(Fitzgerald ve Caplice, 1999)

4.3.2. *Bifidobacterium* türleri

Bifidobacterium türleri *Actinomycetaceae* familyası içinde yer almaktadır. *Bifidobacterium spp.*'ler, insan ve bazı hayvanların kalın bağırsak, ağız ve vajina normal florasında bulunmaktadırlar. *Bifidobacterim* türleri anne sütüyle beslenen infantların feçeslerinden izole edilebilirler. Kolonda bu bakteri popülasyonu yaş ilerleyinceye kadar rölatif olarak sabit kalırken diyet, antibiyotik kullanımı ve stres gibi faktörler nedeni ile zaman zaman sayılarında değişim görülebilir. *Bifidobacterium* türleri gram pozitif, anaerob, hareketsiz, sporsuz, morfolojik olarak

farklı şekillerde görülebilirler. Adlarını, genellikle Y şeklinde ya da bifid formda olmalarından alırlar. Bu türlerin çoğu optimum 36–38 ºC'de üreyebilen ve pH 5–7 ortamda gelişebilen asidofillerdir. Ancak faaliyetleri ve gelişmeleri pH 5 altı ve 8'in üstünde tamamen durmaktadır (Gönülateş, 2008). Bifidobakteriler, fermentasyon sonucu laktik asit ve asetik asit üretebilmektedirler (Doğan, 2012).

4.3.3. *Lactobacillus* türleri

Lactobacillus familyası üyeleri doğada oldukça yaygın olup LAB arasında en geniş yere sahiptir (Yürümez, 2011). Laktobasiller basil ya da kokobasil şeklinde, spor oluşturmayan, mikroaerofilik veya anaerop ortamda gelişme gösterebilen, katalaz ve oksidaz negatif, gram pozitif bakterilerdir. Bazı suşlarında pseudo-katalaz oluştuğu görülmüştür (Demir, 2014).

Lactobacillus türleri süt ürünleri, fermente et, ekşi hamur, sebze, meyve ve içecekler gibi gıdalarda, insan ve hayvanların mukozal membranlarında, bitkilerin ya da bitkisel materyallerin üzerinde, gübreler gibi çok geniş bir habitatta bulunabilmektedirler. Ayrıca bu mikroorganizmaların biyolojik koruyucu olarak da kullanıldığı bildirilmiştir (Yürümez, 2011; Demir, 2014).

Lactobacillus türlerinin optimum gelişme sıcaklığı 30-40 ºC ve pH 5,5–5,8 aralığında olduğu bildirilmektedir. Patojen özellik göstermezler bunun aksine oluşturdukları antibakteriyel özellikteki maddeler ile patojen ve saprofit bakterilerin gelişmesini engelledikleri düşünülmektedir (Gülseren, 2012; Demir, 2014).

Lactobacillus türleri şeker metabolizmasına göre 3'e ayrılır. Bunlar; pentozu fermente edemeyen hekzostan laktik asit oluşturan zorunlu homofermentatifler *(L. acidophilus, L. helveticus, L. delbruecki* vb.), pentozlardan fosfoketolaz yoluyla laktik asit, etanol, format ve asetik asit oluşturan hekzosların hemen hemen tümünü glikoliz yoluyla laktik asite fermente eden fakültatif heterofermentatifler (*L. casei, L. plantarum*) ve hekzostan laktat, etanol (asetik asit), CO_2 üreten zorunlu heterofermentatifler (*L. bifermentas, L. fermentum, L. brevis*)'dir (Karatepe ve ark., 2012).

4.3.4. *Lactococcus* türleri

Lactococcus türleri katalaz negatif, hareketsiz ve spor oluşturmayan, homofermentetif özellikte, optimum gelişme sıcaklıkları 30 ºC olan gram pozitif, bakterilerdir. Ayrıca *Lactococcus* türleri 10 ºC'nin altında ve 45 ºC'nin üstünde gelişemedikleri için streptokoklar ile enterokoklardan ayrılırlar (Yürümez, 2011).

İnsan ve çoğu hayvanın gastrointestinal bölgelerinde, çiğ sütte, fermente süt ürünlerinde en fazla bulunan laktik asit bakterisi *Lactococcus lactis*'tir (Yürümez, 2011; Karatepe ve ark., 2012). *Lactococcus lactis* türleri *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, *Lc. lactis* ssp. *lactis* ve *Lc. lactis* ssp. *hordniae* olmak üzere üç alt türe ayrılır. (Karatepe ve ark., 2012). Peynir, tereyağı, krema, yoğurt gibi fermente süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanılır (Yürümez, 2011). Laktoz fermentasyon yeteneği olmayan *L.lactis subsp.hordniae L.lactis* türünün gıda fermentasyonlarında kullanılmayan tek bir üyesidir (Demir, 2014).

4.3.5. *Streptococcus* türleri

Sferik ya da oval şekilde; tekli, ikili veya değişik uzunlukta zincir veya tetrat formunda bulunabilmektedirler. Gram pozitif, fakültatif anaerob, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif mikroorganizmalardır. Hareketsiz, sporsuz, homofermentatif özelliktedirler. Bu mikroorganizmalar süt ve süt ürünlerinde bulunup yoğurt yapımında kullanılmaktadırlar (Gönülateş, 2008; Karatepe ve ark., 2012).

4.3.6. *Leuconostoc* türleri

Leuconostoc türleri ovoid, kok ya da zincir halinde görünen, optimum gelişme sıcaklıkları 20-30 ºC olan, heterofermantasyon ile glikozu fermente ederek, başlıca D-laktat, etanol ve gaz üreten gram pozitif bakterilerdir (Karatepe ve ark., 2012). Bu bakteri grubu, fermente gıda ürünlerin de tekstür kalitesindeki değişimlerinde ve dekstranın üretimi ile şeker proseslerinde, şarap üretimindeki malolaktik fermantasyon ile bozulmalarda rol oynamaktadır (Yürümez, 2011).

4.3.7. *Pediococcus* türleri

Pediococcus türleri optimum gelişme sıcaklıkları 25-37 ºC olan katalaz negatif, gram pozitif, mikroaerofilik, ikili yada tekli veya kısa zincir, tetrat kok şeklinde, tuza dayanıklı homofermantatif bakterilerdir. Bitkilerde ve bazı fermente ürünlerde (örnegin, turşu, bira, şarap) bulunmaktadır. Geniş bir sıcaklık aralığında gelişmeleri, fazla asit üretmeleri ve tuza dayanıklı olmalarından dolayı gıda mikrobiyolojisinde önemli yer tutar (Yürümez, 2011).

4.3.8. *Enterococcus* türleri

Enterokoklar; tekli, ikili ya da kısa zincirli kokobasil şeklinde, katalaz negatif, gram pozitif, 37 ºC'de optimum gelişme gösteren bakterilerdir. Alfa, beta veya gama hemoliz yeteneğindedirler. Mikroskobik olarak enterekoklar streptokok türlerinden zor ayırt edilirler (Demir, 2014).

Enterokokların birçoğu bakteriyosin üretmektedir (enterosin A, enterosin B, enterosin P, enterosin L50 ve enterosin Q). *E. faecalis* ve *E. faecium* gastrointestinal sisteminin doğal florasında bulunur (Yürümez, 2011). *Enterococcus* türleri insan ve hayvanlarda probiyotik kültür olarak ve peynirlerde starter kültür olarak kullanılmaktadırlar (Demir, 2014).

4.3.9. *Bacillus* türleri

Bu mikroorganizmalar çubuk şeklinde, aerobik, endospor oluşturan gram pozitif bakterilerdir. Besin yetersizliği, aşırı yüksek ya da düşük sıcaklıklar, hipertonik ortam koşullarında spor oluşturmaları probiyotik olarak değerlendirilmelerinde önemli yer tutmaktadır. Hareketsiz haldeki bu sporlar kimyasallara ve ekstrem koşullara karşı dayanıklıdır (Erem ve ark., 2013).

Bacillus türleri pirinç çeltikleri, kuru gıda, deniz suyu, sediman tabakalar, balık, normal flora hatta bala kadar birçok ortamda yer almaktadır (Aftabuddin ve ark., 2013).

4.3.10. *Saccharomyces* türleri

Saccharomyces türleri, mantar ailesine ait olup, başlıca probiyotik mantar, *S. boulardii*'dir. *S.boulardii*, normalde non-patojenik bir mantar olup antibiyotik kullanımına bağlı gelişen diyare tedavisinde kullanılmaktadır. Bu mikroorganizma 4–8 mm boyutlarında, oval veya sferik şekilde morfolojiye sahiptir ve SDA (Sabouraud Dextrose Agar) besiyerinde 37 °C'de üremektedirler (Gönülateş, 2008).

Mayalar kefirin aromasının geliştirilmesinde, fermantasyonunda, etanol ve CO_2 üretiminde önemlidir. Kefir granülleri genellikle laktoz fermente eden mayalara (*Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus, Torula kefir*) ilaveten laktozu fermente etmeyen mayaları (*Saccharomyces cerevisiae)* içermektedir (Karatepe, 2012).

4.4. Probiyotik Bakteriler Tarafından Üretilen Metabolik Ürünler

Antimikrobiyal aktivitesi olan bakteri türleri gıda endüstrisi, tarım ve farmasötik endüstride önemli rol oynamaktadır. Birçok bakteri türü gıda fermantasyonu ve biyokoruyucu olarak litik ajanlar üretmektedir (Tablo 2) (Siamansouri ve ark., 2013).

Laktik asit bakterilerinin üretmiş olduğu antimikrobiyal özellik gösteren maddelerin başında organik asitler gelmektedir. Organik asitleri, hidrojen peroksit, karbondioksit (CO_2), dieasetil ve diğer düşük molekül ağırlıklı maddeler izlemektedir (Gülseren, 2012).

Tablo 2: Probiyotik bakteriler tarafından üretilen metabolik ürünler

Metabolik ürün	**Antagonistik aktivasyon şekli**
Karbondioksit(CO_2)	Dekarboksilasyonu başlatır, membran geçirgenliğini azaltır
Dieasetil	Arjine bağlanan proteinler ile beraber etki gösterir
Hidrojenperoksit(H_2O_2)	Temel proteinleri oksitler
Laktik asit	Hücre içi pH'ı azaltmaktır, membranı ayırır
Bakteriyosin	DNA sentezini, protein sentezini ve membranı etkiler

(Siamansouri ve ark., 2013)

4.4.1. Laktik asit

Laktik asit mikroorganizmaların üzerinde olumsuz etki yapan ve kokusuz, ekşi tatta olan bir organik asittir. Mikroorganizmaların membran yapısını bozarak, hücrenin substrat taşıma özelliğini yok etmektedir. Fermente süt ürünlerinin antimikrobiyal özellikler taşıdığı ve bu özelliklerin ortamda yer alan ve gıdaları mikrobiyal bozulmalara karşı koruyan laktik asit üretimine bağlı olarak gerçekleştiği ve özellikle ince bağırsakta yaşayan gram negatif bakterilere karşı daha etkili olduğu ortaya konulmuştur. Laktik asit bakterileri, laktozun bir kısmını L (+), bir kısmını ise D (-) formunda laktik aside dönüştürmektedirler. Fizyolojik olarak L (+) laktik asit, D (-) laktik asit formunda çok daha iyi metabolize edilmektedir. Yapılan araştırmalar laktik asitin düşük pH'larda antimikrobiyal etki gösterdiği ve gram negatif bakterilerin dış membran geçirgenliğini lipopolisakkaritlerini serbest bırakarak bu mikroorganizmaların ölümüne neden olduğunu göstermiştir. Lactobacillus türlerinin pH'ı 3,2-3,5'e kadar düşürebildiklerinden dolayı asitliğe karşı daha dayanıklı olduğu gerçeğini ortaya koymuştur. Yapılan araştırmalar sonucunda araştırmacılar laktik asit bakterilerinde laktik asit üretiminin cins, tür ve suşlar arasında farlılık gösterdiğini bildirmiştir (Yiğit, 2009).



Şekil 2: Laktoz izomerleri

(Aydınol ve Özcan , 2009)

4.4.2. Hidrojen peroksit

LAB tarafından oluşturulan hidrojen peroksit miktarı, bakterilerin cins, tür ve hatta suşlarına göre farklılık gösterdiği ve pek çok mikroorganizma üzerinde inhibitor etkisine sahip olduğu belirlenmiştir. Örneğin*; L. lactis*'in hidrojen peroksit üretip *E. coli*'nin üremesini durdurduğu bildirilmiştir. Hidrojen peroksit termodinamik bakımdan kararsız bir bileşik olup su ve oksijene ayrışmaktadır (Yiğit, 2009).

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

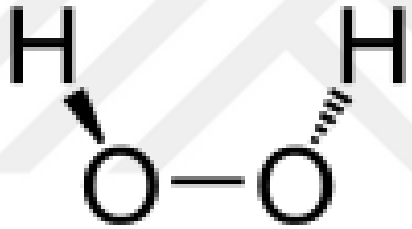
Şekil 3: Hidrojen peroksit reaksiyonu

https://ziraatyapma.blogspot.com.tr/2011/08/hidrojen-peroksit-tam-olarak-nedir.htmln
Erişim tarihi:28 Aralık 2016

LAB'leri oksijen varlığında, flavoprotein yapısında bulunan NADH oksidaz, superoksidaz disoksidaz gibi oksidaz enzimleri etkisi ile hidrojen peroksit (H_2O_2) molekülünü üretebilirler. H_2O_2'in bakterisidal etkisi bakteri hücresi üzerine olan kuvvetli okside etkisinden kaynaklanmakta; hücre proteinlerinin sülfidril grupları ve membran lipidleri okside edilebilmektedir. Aynı zamanda hidrojen peroksitin oluşturduğu bazı reaksiyonlarda O_2 tüketildiğinden anaerob bir ortam oluşmaktadır

ve bu ortam istenmeyen belli başlı mikroorganizmalar için elverişsizdir. H_2O_2 üretimi ürogenital yollardaki kolonizasyon için özellikle önemli olup laktobasiluslar tarafından sağlanmaktadır. Bu tür laktobasillusların bu şekilde kolonizasyonu HIV enfeksiyonunu ve üriner yollardaki enfeksiyonları azaltabilir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

H_2O_2'nin en önemli antimikrobiyal özelliği, hücre içindeki glikoliz reaksiyonunu bloklamasıdır. H_2O_2, glikoz molekülünün taşınmasını, hekzokinaz ve gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz enziminin aktivitesini, onların sülfidril gruplarını bağlaması ile engellemektedir. Bu nedenle Gliseraldehit 3-fosfat enzimi, H_2O_2 için en önemli hedef olmaktadır. H_2O_2' nin gram pozitif ve özellikle LAB üzerinde bakteriostatik etkisi bulunurken, gram negatif bakterilerin ise kolayca yok ettiği bildirilmiştir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).



Şekil 4: Hidrojen peroksit molekülünün yapısı

(https://tr.wikipedia.org/wiki/Hidrojen_peroksit Erişim tarihi: 27 Aralık 2016)

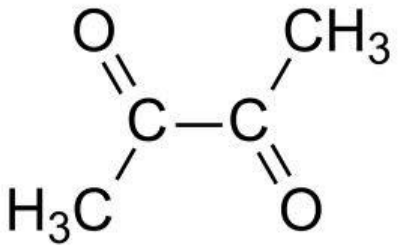
4.4.3. Diasetil ve asetaldehit

Niel ve arkadaşları ilk kez diasetili (2,3-bütandion) tereyağına aroma ve tat veren bileşik olarak tanımlamışlardır. 1927 yılında Lemoigne, diasetil molekülünün *Bacillus spp.*'ye karşı antimikrobiyal özellikte olduğunu bildirmiştir. Diasetil başlıca *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* ve *Streptococcus* tür ve cinsleri tarafından sentezlenmekte olup, diğer mikroorganizmalar tarafından da sentezlenebilmektedir. Heksoz şekeri metabolize edilğinde diasetil molekülü oluşmaktadır. Diasetilin en

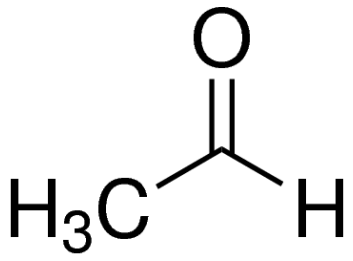
etkili olduğu pH değeri 7 olup, bu maddenin antimikrobiyal özelliği, glikoz, asetat ve Tween 80 varlığında azalmaktadır. Diasetil, gram negatif bakterilerin, mayaların ve küflerin gelişiminin önlenmesinde, gram pozitif bakterilere göre daha etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Diasetil molekülünün gram negatif bakterilerilerin protein yapılarındaki arjinin aminoasiti ile reaksiyona girerek, bu aminoasitin kullanımına engel olduğu belirtilmiştir (Niel, 1929; Gülseren, 2012; Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

Ürünlerin yapımında kullanılan starter kültürlerin faaliyetleri sonucu oluşan bileşikler yoğurt, tereyağı, kefir ve peynir gibi süt ürünlerinin kendine özgü tat ve aromasını meydana getirmektedir. Oumer (2001) inek ve koyun sütü karışımından yarı sert bir İspanyol peyniri olan Hispanico peyniri üretmiştir. Bu peynir üretiminde bakteriyosin üreten destek kültür olarak peynir sütüne farklı oranlarda *E. faecalis* INIA 4 kültürü ilave etmiştir. İlave edilen bu destek kültür starter laktokokların canlılığını, proteoliz seviyesini ve aroma bileşikleri (diasetil ve asetoin) konsantrasyonunu önemli seviyede etkilemiştir (Gürsoy ve Kınık, 2006; Oumer, 2001).

Ticari bitkisel fermantasyon çalışmalarında asetik asidin laktik aside dönüşüm oranı incelenmiştir. Genel olarak toplamda yüksek miktarda asit ureten kültürlerde asetik asidin laktik aside dönüşüm oranı daha düşük bulunmuştur. Dolayısıyla diasetil üretiminin bu mikroorganizmaların gelişimi için temel gereksinim olmadığına karar verilmiştir (Yiğit, 2009)



Şekil 5: Diasetil molekülünün yapısı
https://prezi.com/uiflhnm7zh5l/laktik-asit-bakterileri-tarafindan-uretilen-antimikrobiyal-m/
Erişim tarihi: 18 Aralık 2016)



Şekil 6: Asetaldehit molekülünün yapısı

(http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w200336?lang=en&region=TR Erisim tarihi:18 Aralık 2016)

4.4.4. Karbondioksit

Karbondioksit (CO_2), heksoz şekerinin heterofermentatif laktik asit fermentasyonu sırasında oluşan temel bileşiklerden biri olup, fermentasyon sırasında diğer metabolik reaksiyonlar sonucunda da ortaya çıkmaktadır. CO_2 molekülünün çift yönlü antimikrobiyal etkisi bulunmaktadır. CO_2 molekülü yapısı dolayısıyla antimikrobiyal özellik gösterirken, diğer yandan da anaerobik ortam sağlayarak antimikrobiyal ortam oluşmasına sebep olmaktadır. Genel olarak CO_2 molekülünün etki mekanizması tam olarak açıklanamamakla beraber, enzimatik dekarboksilasyonun inhibe olabileceği belirtilmiştir. Düşük CO_2 konsantrasyonu bazı mikroorganizmaların gelişmesini uyardığı gibi, yüksek konsantrasyondaki CO_2 uygulamaları ise mikroorganizma gelişmesini önlemektedir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004). CO_2 molekülünün bu antimikrobiyal özellikleri dolayısı ile, gıdaların korunmasında, özellikle modifiye atmosfer paketleme (MAP) sistemlerinin başlıca kullanılan bileşeni olarak önemini ortaya koymaktadır. MAP sisteminde, gram negatif bakterilerin gram pozitif bakterilere göre daha hassas olduğu da bilinmektedir (Gülseren, 2012).



Şekil 7: Karbondioksit molekülünün yapısı
(https://tr.wikipedia.org/wiki/Karbondioksit Erişim tarihi: 19 Aralık 2016)

4.4.5. Düşük molekül ağırlıklı antimikrobiyal maddeler

Laktik asit bakterilerinin düşük molekül ağırlığında ve antimikrobiyal özellik gösteren maddeler de sentezlediğini gösteren birçok çalışma mevcuttur. Düşük molekül ağırlığının yanında bu maddeler aynı zamanda başlıca özelliklere de sahiptir;

a-düşük pH'ta aktiftir
b-termostabildir
c-geniş etki spektrumuna sahiptir
d-asetonda çözünürler

Ancak maddeler hakkında sınırlı bilgi mevcuttur ve bazı araştırmacılar bulgularını destekleyememişlerdir.

En iyi tanımlanan düşük molekül ağırlıklı antimikrobiyal madde arasında reuterin, reuterisiklin ve 2-pirolidon-5-karboksilik asit yer almaktadır (Ouwehand ve Vesterlund, 2004) .

4.4.5.1. Reuterin

Lactobacillus reuteri, insan ve birçok hayvan sindirim sisteminde doğal mikrobiyota üyesidir. Bu bakteri glukoz ve gliserol veya gliseraldehit karışımlarının olduğu anaerobik bir ortamda, düşük molekül ağırlıklı antimikrobiyal özellik gösteren reuterin adlı maddeyi üretmektedir. *L.reuteri'* nin log evresinde reuterin

üretilememekte iken durağan fazda reuterin depolanmaya başlamaktadır. Reuterin antibakteriyel, antifungal, antiprotozoal ve antiviral aktivite özelliklerine sahip olup insan hücresinde herhangi bir olumsuz etkisi saptanmamıştır (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

4.4.5.2. Reuterisiklin

Lactobacillus reuteri'nin son zamanlarda bir diğer düşük molekül ağırlıklı antimikrobiyal madde olan reuterisiklin ürettiği saptanmıştır . Reutersiklin 349 Da molekül ağırlığında, negatif yüklü ve yüksek oranda hidrofobik yapıya sahip maddedir. Reutersiklin, hedef hücrelerin hücre zarında por oluşturmamakta ancak proton iyonoforu olarak görev yapmaktadır. Bu maddenin hidrofobik özelliklerinden dolayı, sitoplazmik hücre zarını böldüğü ve pH farkından dolayı hücre zarını parçaladığı bildirilmiştir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

4.4.5.3. 2-Pirolidon-5-Karboksilik Asit

2-Pirolidon-5-Karboksilik Asit (PKA), meyve, sebze ve yeşilliklerde bulunmakla beraber *Lactobacillus casei ssp casei, L.casei ssp. Pseudoplantarum* ve *Streptococcus brevis* tarafından üretilmektedir. PKA ısıya dayanıklı olup (121 ºC'de 20 dakika) aktivitesini pH 2,5'in üzerindeki pH değerlerinde kaybettiği bildirilmiştir. Molekül ağırlığı 129,11 g/mol olup, molekül formülü ise $C_5H_7NO_3$ olarak litaretürde yerini almaktadır. PKA'nın antimikrobiyal aktivitesi aynı konsantrasyondaki laktik asite göre daha fazla olmasına rağmen molekülün antimikrobiyal metabolizması diğer organik asitlerin mekanizmasına benzerlik göstermektedir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

4.4.6. Bakteriyosin

Bakteriyosinler bakteriler tarafından sentezlenen doğal antimikrobiyal maddelerdir (Kurt ve Zorba, 2005). GRAS olarak kabul edilen LAB'i koruyucu kültürler olarak kullanılırlar. Bu bakterilerin yanı sıra bu kültürlerden üretilen bakteriyosinlerin; (i) genel olarak güvenli bulunmaları, (ii) ökaryotik hücrelere karşı toksik olmamaları, (iii) düşük pH ve sıcaklığa karşı tolerans göstermeleri, (iv) gıda kökenli patojen ve çürükçül mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki sergilemeleri, (v) bakterisidal etki mekanizmasının sitoplazmik membranla ilişkili olmalarından dolayı bakteriyosinler de koruyucu olarak kullanılırlar (Gàlvez ve ark., 2007; Dinçer ve ark., 2009). Ayrıca bakteriyosinler renksiz, tatsız ve kokusuz ve doğal olmaları açısından da önemlidir (Kurt ve Zorba, 2005).

Bakteriyosinler antibiyotikler ile benzer aktivite gösterdiklerinden dolayı karıştırılmaktadır. Bakteriyosinler antibiyotik olarak değerlendirilebilir, ancak; (a) Bakteriyosinlerin ribozomal olarak sentezlenmesi (b) Konak hücrelerin bakteriyosinlere bağışıklık kazanması, (c) Etki mekanizmaların antibiyotiklerden farklı olması, (d) Bakteriyosinlerin dar spektrumlu olması ve genellikle kendilerine yakın türlere karşı antimikrobiyal etki göstermeleri antibiyotiklerden ayrılmaktadır (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

Gıdaların korunması için kullanılan bakteriyosinler birkaç şekilde faydalı olabilir;

1) Gıda zehirlenmesinin risklerini azaltmak ,
2) Gıda zincirindeki çapraz kontaminasyonu azaltmak,
3) Gıdaların raf ömrünü uzatmak,
4) Gıdaları ısı değişimi dönemlerinde korumak,
5) Gıdaların bozulması sırasındaki ekonomik kayıpları azaltmak,
6) İlave edilen kimyasal koruyucuların miktarını azaltmak,
7) Olasılıkla ‘’yeni gıdalar’’ alternatif koruma bariyerleri sağlamak ve tüketiciler için taze ve tüketime hazır gıdaları koruyarak tüketicilerin isteklerini karşılamak.

Bakteriyosin üreten LAB'lerinden üretilen fermente gıdaların kullanımı, LAB'lerin saf kültürlerinin, bu bakterilerden elde edilen ekstraktların, saf ya da yarı

saf "antagonistik" metabolitlerinin ortama eklenmesi ile gıdaların korunması sağlanır (Seçkin ve ark, 2010). Bakteriyosinlerin etki mekanizmaları farklılık göstermek ile birlikte genellikle gram pozitif bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterirler (Yıldırım, 2010).

4.5. Bakteriyosinlerin Sınıflandırılması

Klaenhammer 1993'de bakteriyosinleri, molekül büyüklüğüne, kimyasal yapılarına, ısı stabilitelerine ve etki mekanizmalarına göre dört sınıfa ayırmıştır. Bu sınıflandırma Cotter ve arkadaşları tarafında tekrar ele alınmış ve 2005 yılında yayınladıkları makalede bakteriyosinleri iki sınıfta toplanmıştır. Buna göre bakteriyosinler lantionin içeren bakteriyosinler (Lantibiyotikler sınıf I) ve lantionin içermeyen bakteriyosinler (sınıf II) olarak sınıflandırılırken; ısıya dayanıksız murein hidrolazlar (daha önce sınıf III bakteriyosinler olarak adlandırılan) farklı bir kategoride toplanıp bakteriyolizler olarak adlandırılmıştır (Messaoudi ve ark., 2013).

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler 3 ana sınıfta toplanabilir.
I-Lantibiyotikler
II-Isıya dayanıklı küçük peptidler
III- Isıya dayanıksız büyük peptitler

Daha karmaşık yapıya sahip bakteriyosinlerin 4.sınıfı da önerilmiştir ancak bu sınıf genel olarak kabul edilmemektedir. Sınıf I ve II sayıca fazla olduklarından bakteriyosinlerin ana sınıfını oluştururlar ve ticari uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Yıldırım, 2010).

4.5.1. Sınıf I

Sınıf I bakteriyosinleri olarak da adlandırılan lantibiyotikler küçük molekül ağırlıklı (<5 kDa) peptidlerdir. Lantibiyotikler, bir takım dehidrate amino asitlerin yanı sıra doğada normal olarak bulunmayan (örn., Lantiyonin ve b-metil lantiyonin) translasyon sonrası modifiye olan nadir amino asitleri de içerir. Lantibiyotikler

kimyasal yapılarına ve antimikrobiyal aktivitelerine göre tip A ve tip B olarak iki alt gruba ayrılırlar (Ouwehand ve Vesterlund, 2004; Yıldırım, 2010).

Tip A lantibiyotikler; uzamış katyonik peptidler olup 34 aminoasitten meydana gelirler. Bu peptidler genellikle hedef organizmanın membran bütünlüğünü bozarak etki gösterirler. Örneğin; Laktisin 481 ve nisin gibi.

Tip B lantibiyotikler; globuler olup 19 aminoasitten meydana gelirler. Bu peptidler enzim fonksiyonlarını bozarak etki gösterirler. Örneğin; Sinnamisin, mersasidin, ankovenin, aktagardin gibi (Cotter ve ark., 2005; Ouwehand ve Vesterlund, 2004; Yıldırım, 2010).

4.5.2. Sınıf II

Sınıf II bakteriyosinleri de küçük (10kDa) olup genellikle ısıya dayanıklı, lantibiyotik içermeyen membran aktif peptiflerden meydana gelmektedir. Bu sınıfın inhibisyon spektrumu oldukça dardır (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

Sınıf II bakteriyosinleri 3 alt grup altında toplanmaktadır: **Grup IIa** İçerdiği peptid´in N-terminalinde Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys amino asit dizisi yer almaktadır. Grup IIa bakteriyosinleri aktivitesi için çok önemli olan disülfit köprüleriyle bağlı en az iki sisteine sahip sistibiyotiklerdir. Pediosin PA-1, pediosin AcH, sakasin A, mezenterisin Y105, kurvasin A, diversin V41 ve leusin A bu gruba örnek olarak verilebilir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004; Yıldırım, 2010).

Grup IIb bakteriyosinler ise aktivite gösterebilmeleri için iki farklı polipeptite ihtiyaç duyarlar. Örneğin; laktasin F, laktokoksin G ve M .

Grup IIc bakteriyosinler sistein aminoasit dizisi içerir ve aktiviteri için indirgenmiş sistein dizilerine ihtiyaç duyarlar. Örneğin; Asidosin B ve enterosin P (Demir, 2014; Cotter ve ark., 2005).

4.5.3. Sınıf III

Sınıf III bakteriyosinleri büyük (30 kDa) olup ısıya dayanıksız proteinler olarak tanımlanmaktadır. Dolayısıyla bu sınıfta bakteriyosinlerin fizyolojik aktivitelerini taklit edebilen bakteriyolitik hücre dışı enzimler (hemolizin ve muramidazları) bulunmaktadır. Şimdiye kadar sınıf III bakteriyosinleri sadece Laktobasillus ailesinden izole edilmiştir. Ancak bakteriyosinler hakkında fazla bilgi olmadığında bu sınıfa çok fazla bakteriyosin dahil edilmemiştir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

4.5.4. Sınıf IV

Önerilen bu ek sınıf bakteriyosinler aktiviteleri için gerekli olan lipid veya karbonhidrat kısımları olan kompleks bakteriyosinleri içermektedir. Bu sınıf bakteriyosinler doğrusal peptid bakteriyosinler içerip tam olarak saflaştırılmadığından pek kabul edilmeyen bir sınıftır (Ouwehand ve Vesterlund, 2004; Yıldırım, 2010; Demir, 2014).

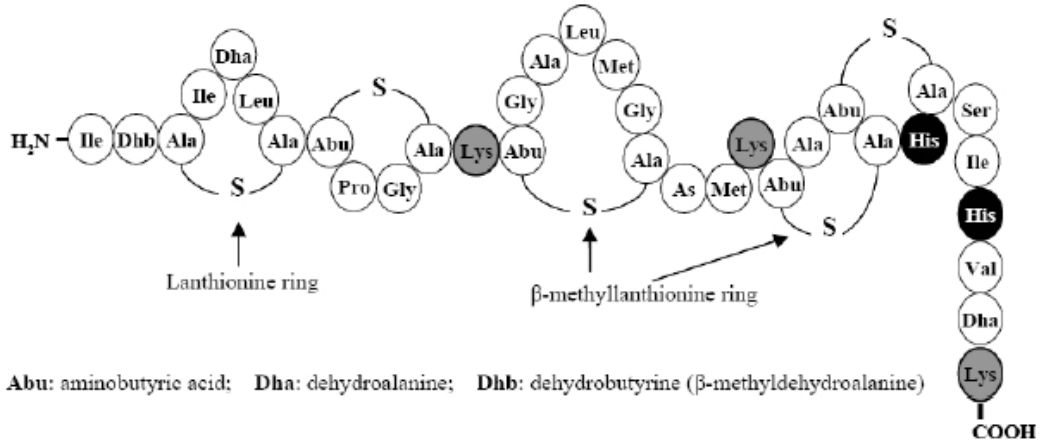
Bir bakteriyosinin tanımlanmasında kullanılan klasik tanımlama dışında yeni bakteriyosin gen kümelerinin tanımlanması için web tabanlı yazılım aracı olan BAGEL kullanılmaktadır (De Jong ve ark., 2006). Bu konuda son güncelleme 21 Ocak 2013 tarihinde yapılmış ve sınıf I bakteriyosinlerin 160, sınıf II bakteriyosinlerin 236, sınıf III bakteriyolizinlerin ise 93 üyeden oluştuğunu göstermiştir. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin en iyi bilinen bakteriyosindir (Demir, 2014).

4.6. Nisin

Rogers 1928 yılında birkaç *Streptococcus lactis* (şimdiki *Lactococcus lactis subsp. lactis*) türünün diğer laktik asit bakterilerini inhibe eden doğal metabolitler ürettiğini keşfetmiştir (Rogers, 1928). Bu metabolit 1947 yılında ilk kez nisin olarak isimlendirilmiştir. 1953 yılında ise ticari olarak İngiltere'de satışa sunulmuş olup günümüzde 50 ülkede nisin kullanımına izin verilmektedir. İçerdiği lantiyonin

köprülerinden dolayı lantibiyotik sınıfında yer almaktadır. Bu aminoasitlerin yer değiştirmesi antimikrobiyal aktiviteyi çok az etkilemekte ancak nisinin nötral pH'da çözünürlüğünü arttırarak daha etkin uygulamalar sağlanmaktadır. Sitoplazma membranı nisin aktivitesi için ana hedeftir (Ouwehand ve Vesterlund, 2004).

Molekül formülü $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ olan nisin 3354.25 Da molekül ağırlığındadır. Yapısında lantiyonin (Lan), 2-3 dehidroksialanin (Dha), 2-3 dehidroksibutirin (Dhb) ve metillantiyonin (Met) gibi amino asitlerin yer aldığı 34 adet amino asit bulunmaktadır. Yapısında yer alan 5 adet farklı halka yapısı nedeni ile Nisin A,B,C, D ve E olarak adlandırılabilinir (Kördikanlıoğlu, 2014). Nisinin yapısındaki 27. aminoasit aspartik asit ise Nisin Z, histidin ise Nisin A olarak isimlendirilir. Gıda koruyucusu olarak kullanılan en uygun ticari nisin preparatı Nisaplin TM olup bunun aktif bileşiği % 2,5 nisin A olup ağırlıklı olarak NaCI (% 77,5) ve yağsız sütten (% 12 protein ve % 6 karbonhidrat) oluşmaktadır (Chen ve Hoover, 2003).



Şekil 8: Nisinin yapısı
(Suganthi ve ark., 2012)

Nisin 1969 yılında Birleşmiş Milletler Gıda ve İlaç Dairesi tarafından, 'GRAS' statüsünde kabul edilmiş olup Dünya Sağlık Örgütü tarafından gıda katkı maddesi olarak onaylanmış tek bakteriyosindir. Bu bakteriyosin 1983 yılında Avrupa gıda katkı maddeleri listesinde E234 olarak numaralandırılmıştır ve 1988 yılında ise

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (USFDA) tarafından peynir üretiminde kullanımına izin verilmiştir (Sudağıdan ve Aydın, 2013).

Nisin membranlarda porlar oluşturup hücre içindeki organellerin dışarı akmasını sağlayarak ve membranlarda Lipid II molekülünün peptidoglikan zincirine birleşmesini engelleyip hücre duvarı sentezini durdurarak etki eder (Hampikyan ve Çolak, 2007).

Bu bakteriyosin süt ve süt ürünleri, konserve ürünleri ve hazır çorbalar da, diş macunu ve sargı bezleri gibi sağlık ürünlerinde kullanılır. Ancak antimikrobiyal ajan olarak kullanımı halen sınırlı düzeydedir. Bu sorunun en temel nedeni ise nisinin üretim maliyetinin yüksek olmasıdır (Kördikanlıoğlu, 2014).

4.7. Probiyotiklerin Etki Mekanizması

Probiyotiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin türe değil, suşa özgü olduğunun bilinmesi çok önemlidir. Belirli bir suş probiyotiklerden beklenen tüm yararlı etkileri sağlamayabilir (Çoşkun, 2014).

Bugüne kadar yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar, probiyotiklerin farklı türlerinin, değişik alanlarda ve birbirinden farklı mekanizmalarla etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bir probiyotiğin gösterdiği laboratuvar ya da klinik etkiyi başka bir probiyotik türünün ya da aynı türün farklı bir suşunun göstermesi beklenmemelidir (Kavas, 2007).

Probiyotiklerin etki mekanizmaları şu şekilde özetlenebilir;

- **İnhibe edici maddeler üreterek:** probiyotik bakteriler asit (laktik asit, asetik asit) ve antimikrobial peptit (bakteriyosin) üreterek patojen bakterilerin üremesini önlerler. Laktik asit, *Helicobacter pylori (H. pylori)* ve diğer gram negatif gastrointestinal sistem patojenlerinin dış membran geçirgenliğini arttırarak diğer

antimikrobiyal maddeler ile birlikte bu patojenleri inhibe edilmesini kolaylaştırmaktadır (Çoşkun, 2014; Kavas, 2007).

- **Tutunma bölgelerini bloke ederek**: patojenlerin intestinal sistemde tutunma bölgelerini bloke ederek yerleşmelerini önlemektedir (Ah**,** 2006; Çakır, 2003).

- **Besin maddeleri için rekabet:** probiyotikler gastrointestinal sistemde patojen mikroorganizmaların kolonizasyonuna karşı en temel savunma mekanizmalarından biri olan ve patojenlerin canlılığını sürdürebilmesi için gerekli olan besin maddelerini tüketerek, onların sistemde uzun süre kalmasını engellemektedirler (Ah, 2006; Kavas, 2007; Çakır, 2003).

- **Toksin reseptörlerinin yıkımı:** yapılan çalışmalarda *Saccharomyces boulardii* türünün proteaz üreterek *C.difficile* A ve B toksinlerinin reseptörlerini tahrip ettiği ve böylece toksin miktarını azalttığı görülmüştür (Çoşkun, 2014; Kavas, 2007).

- **Bağışıklık sistemini güçlendirmesi**: yapılan son çalışmalar probiyotiklerin spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sistemini güçlendirerek intestinal hastalıklara karşı konakçıyı koruduğunu göstermiştir. Bazı *Lactobacil* türlerinin INF- γ ve IL-12 üretimini uyarıp Th1 tip yanıtı destekleyip, Th 2 yanıtı inhibe ederek Th1 / Th2 dengesini sağladıkları bilinmektedir. *L. plantarum* gibi bazı probiyotik türler ise intestinal musin ekspresyonunu arttırarak bağırsak enfeksiyonlarını önlemektedir. Ayrıca hayvan deneylerinde probiyotiklerin lenfosit ve makrofajların fagositik aktivitesini arttırarak immün sistemi güçlendirdiği gösterilmiştir (Kavas, 2007; Çakır, 2003; Ah, 2006).

- **IgA ve sekretuvar komponent yapımında artma:** yapılan çalışmalar laktik asit bakterilerinin Peyer plaklarından anlamlı miktarda Ig A üretiminde artış sağladıklarını göstermiştir. Çocukluk çağındaki ishallerin büyük kısmından sorumlu olan rotaviruslere karşı, IgA sekrete eden hücre sayısında artış sağlayarak etki gösterdiği bilinmektedir (Varan, 2014; Çoşkun, 2014).

- **Peyer plaklarında T hücre aktivitesinin artması:** bazı *Lactobacil* ve *Bifidobacterium* türleri, kostimülator maddelerin üretimi ile CD4-CD8 hücre aktivasyonunda rol alırlar ve T hücre fonksiyonlarını desteklemektedirler (Çoşkun, 2014).

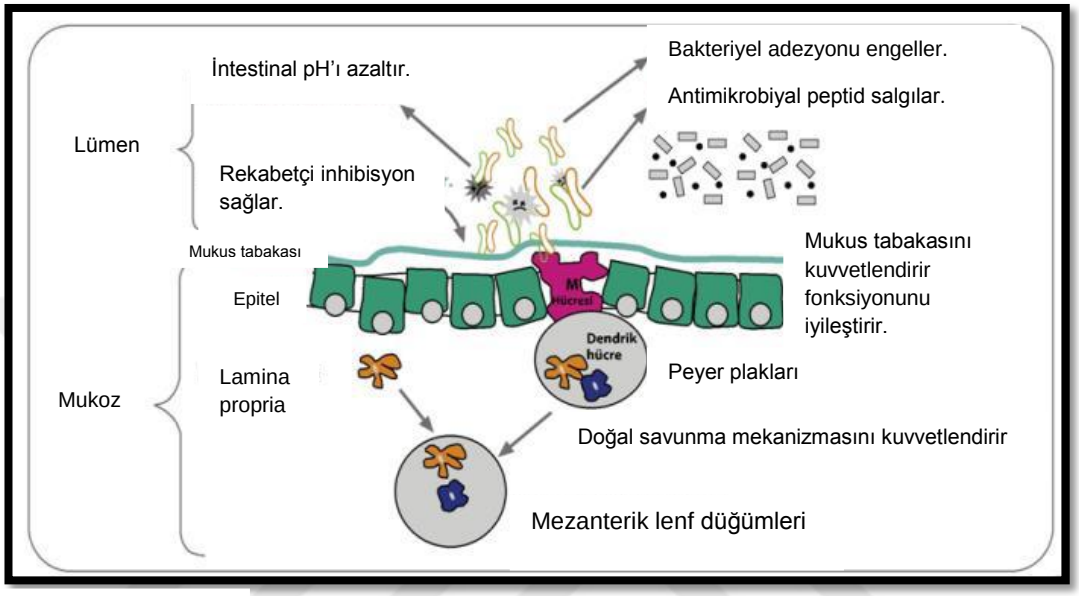
- **Mukozal bariyerin sağlamlaştırılması:** probiyotikler ve GİS'deki diğer kommensal bakteriler, koruyucu bir bariyer olan mukus üretiminin stimulasyonu için intestinal epitelde musin kodlayan genlerin upregulasyonunu sağlamaktadırlar. Böylelikle mukozal sıkı bağlantı (tight junction) proteinlerinin hasarını inhibe edebildikleri gösterilmiştir (Ah, 2006; Çoşkun, 2014).

- **Kanser gelişiminin engellenmesi:** mutasyon ve DNA hasarının azalması, kanser yapan maddelerin (mutajen) etkisizleştirilmesi, kanserli hücre intiharının (apopitoz) hızlanması ve daha birçok mekanizma ile probiyotiklerin kolon kanserini önleyici etkileri açıklanmaktadır. *Lactobacil* ve *Bifidobacterlerin* bir kısmı, prekanserojenlerin kanserojenlere dönüşümünü, β-glukronidaz, azoreduktaz, nitroreduktaz gibi enzimlerin miktarında değişiklik yaparak engellemektedir (Varan, 2014).

- **Safra tuzlarının dekonjugasyon ve sekresyonu:** bazı *Lactobacil* türlerinin safra tuzlarını parçalamasıyla safra tuzlarının karaciğer tarafından emilmesi engellenir. Böylece safra tuzu absorbe edemeyen karaciğerin, safra tuzu sentezlemek için fazla miktarda serum kolesterolünü kullanması sonucunda serumda kolesterol miktarını azaltır (Ah, 2006; Çoşkun, 2014).

- **Laktoz intoleransı (laktozun sindirilememesi) semptom ve bulguların azaltılması:** probiyotik bakterilerin ince bağırsakta safra tuzlarının etkisiyle parçalanması sonucu bakteriyel laktazın serbest kalarak laktozu metabolize ettiği öne sürülmektedir. Fermente süt endüstrisinde kullanılan laktobasiller β-galaktozidaz enzimi ile süt ürünlerindeki laktoz konsantrasyonunu azaltmaktadır (Ah, 2006; Çoşkun, 2014).

- **İnflamasyon ve alerjik yanıtın baskılanması :** atopik dermatit gibi alerjik hastalıkların semptomlarının Th2 aracılı immun yanıt ile baskılanması probiyotiklerin aktivitelerindendir (Çakır, 2003; Kavas, 2007; Çoşkun, 2014).



(Başoğlu, 2014)

Şekil 9: Probiyotiklerin etki mekanizması

4.8. Probiyotik Mikroorganizmaların Safra Direnci

Probiyotik mikroorganizmaların bağırsakta yaşama, gelişme ve etki gösterebilmeleri için gerekli ve önemli özelliklerinden biri safra toleransıdır. Safra organik (safra tuzları, kolesterol, fosfolipitler, bilirubin) ve inorganik (su ve elektrolitler) bileşiklerin sulu bir karışımından oluşur ve gerektiği zaman safra kanalı yolu ile doğrudan karaciğerden onikiparmak bağırsağına geçer. Üst bağırsakta safra 3–5 g/l içerir. Günde 500-700 ml miktarında ince bağırsağa salgılanan safra, bakterilerin büyük oranda lipit ve yağ asidi içeren hücre membranına zarar vererek antimikrobiyal etki göstermektedir. % 0,30 safra konstrasyonu insan safra suyu oranına yakın olması nedeni ile birçok bilimsel çalışmada tercih edilmiştir.

Genellikle, probiyotiklerin seçimindeki safra toleransı çalışmalarında % 0,15 ve % 0,30 konsantrasyonlarında safra tuzunun kullanılması önerilmektedir (Şahin, 2012).

4.9. Probiyotik Mikroorganizmaların Asit Direnci

Probiyotiklerin etkilerini gösterebilmeleri için probiyotik mikroorganizmaların mideden geçerek ince bağırsağa ulaşana kadar kolonize bir şekilde canlı kalmaları gerekmektedir. Bu nedenle probiyotik mikroorganizma seçiminde asitlik direnci önem kazanmaktadır (Şahin, 2012).

4.10. Prebiyotikler

Prebiyotik tarihçesi 50 yılı kapsamaktadır. İlk olarak, 1954 yılında anne sütü içeriğinin (N-asetil-glukozamin) *Bifidobacterium* bakterilerinin çoğalmasını artırdığı saptanmıştır. 1957 yılında Laktuloz ‘’bifudus’’ faktör olarak bildirildi. 1970-1980 yılları arasında ise birkaç sindirilemeyen oligasakkarit ‘’bifudus’’ faktör olarak tanımlanmıştır. İlk kez prebiyotik terimi 1995 yılında Gibson ve Roberfroid tarafından yapılmıştır. Gibson ve Roberfroid ‘’spesifik olarak kolon bakterilerinin bir ya da birkaçının gelişmesini ve aktivitesini arttırarak konakçıda olumlu etkiler gösteren sindirelemeyen besin içeriği’’ olarak prebiyotik teriminin klasik tanımını yapmışlardır (Çoşkun, 2014).

Son yıllarda prebiyotik tanımında bazı değişiklikler yapılmıştır. Uluslararası Bilimsel Probiyotik ve Prebiyotik Dernekleri prebiyotik tanımını spesifik olarak gastrointestinal sistem mikrobiyota bileşimi ve/veya aktivitesinde değişikliklere yol açarak sağlık üzerinde olumlu etkiler gösteren seçici fermente maddeler’’şeklinde yapmışlardır (O’Grady ve Gibson, 2005).

Bağırsak mikroflorasını desteklemenin bir yolu yararlı mikrooorganizmaları doğrudan vermek (probiyotik) iken diğer yolu da prebiyotik kullanarak yapılan düzenlemedir (Çoşkun, 2014).

Prebiyotikler insanda sindirilemezler. Dolayısıyla düşük enerji değerine sahiptirler. Kolona değişikliğe uğramadan ulaşan prebiyotikler, betafruktofuranozidaz enzimi ile bifidobakteriler tarafından hidrolize edilirler.
Prebiyotik özellik taşıyan bileşikler arasında:
- inülin
- laktuloz
- frukto-oligosakkaritler
- galakto-oligosakkaritler
- soya oligosakkaritleri
- izomalto-oligosakkaritler (IMO),
- gluko-oligosakkaritler **(**GOS)
-trans-galakto-oligosakkaritler (TOS),
- ksilo- oligosakkaritler (XOS) sayılabilir (O'Grady ve Gibson, 2005; Ceyhan ve Alıç, 2012).

Prebiyotiklerin kullanımı, probiyotiklerden daha yaygındır. Bir gıda içeriginin bir prebiyotik olarak degerlendirilebilmesi için ;
1. Gastrointestinal sistemin üst kısmında emilimi gerçekleşmeli ve hidroliz işlemine dirençli olmalıdır.
2. Kolonda bulunan laktobasiller ve bifidobakteriler gibi yararlı bakteriler için seçici bir substrat olmalıdır.
3. Kolonik mikroflorayı daha sağlıklı bir komposizyona çevirebilmelidir.
Prebiyotikler, normal bagırsak mikroflorasındaki türlerin gelişimini, dışarıdan alınan türlere göre daha fazla stimüle etmek amacı ile kullanılmaktadır. Prebiyotikler, ısıya dayanıklı olmalı, oksijenden (O_2) etkilenmemeli ve doğal probiyotik florayı desteklemelidir (Uymaz, 2009).

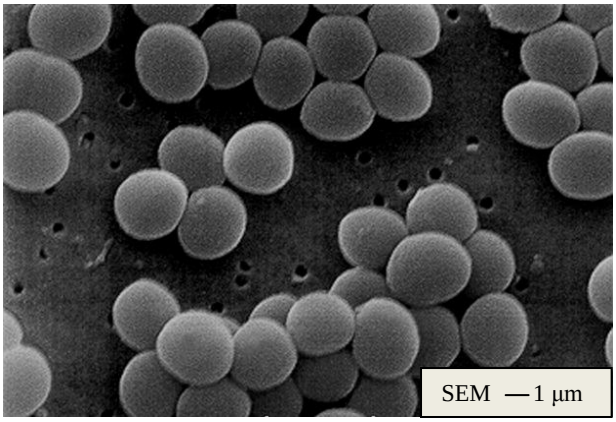
Oligosakkaritler, prebiyotik sınıflandırması için gerekli tüm bu kriterleri karşıladıklarından, en önemli prebiyotik bileşikler olarak kabul edilmektedir. Oligosakkaritler, 2-20 şeker ünitesinden oluşan kısa zincirli polisakkaritlerdir. Bunların bazıları meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunmakta, bir kısmı ise,

polisakkaritlerin (karbohidratlar) hidrolizi ile veya enzimatik yolla üretilmektedir (O'Grady ve Gibson, 2005).

Fruktooligosakkaritlerin ve galaktooligosakkaritlerin, yetişkinlerin bağırsak mikroflorası üzerindeki yararlı etkilerini destekleyen pek çok çalışma bulunmaktadır. Örneğin; Hindiba FOS (chiFOS), bifidogenik etkiye sahip prebiyotik grubunda yer almaktadır. Sindirilemeyen oligosakkaritlerin bu sınıfı, hidrolize dirençli olduğundan, bozulmadan kolona ulaşır ve simbiyotik bakteriler tarafından fermente edilmektedir (Uymaz, 2009).

4.11. *Staphylococcus aureus*'un Genel Özellikleri

Stafilokok 1878'de ilk kez Robert Koch tarafından tanımlanmıştır. Sir Alexander Ogston 1882 yılında *Staphylococcus* terimini kullanmıştır. Anton Rosenbach tarafından ise 1884 yılında *S. aureus* tanımlanmıştır. Bakteri ismini düzensiz kümeler halinde ve üzüm salkımına benzeyen üreme şekilleri nedeniyle eski Yunanca'da üzüm salkımı anlamına gelen "*staphyle*"den almıştır (Bennett ve Monday, 2003). *Staphylococcus* cinsi ilk olarak *Micrococcaceae* ailesi içine dahil edilmiştir ancak moleküler biyoloji ve genetikteki gelişmelerle birlikte, yağ asidi profilleri, hücre duvarı bileşenleri ve 16S ribozomal RNA analizleri sonucu *Staphylococcaeae* ailesi olarak sınıflandırılmıştır (Cunha, 2014).



Şekil 10: *Staphylococcus aureus'un* elektron mikroskop görüntüsü (https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus Erişim tarihi: 20 Aralık 2016).

Staphylococcus aureus, gram pozitif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, hareketsiz, fakültatif anaerob ve spor oluşturmayan bir bakteridir (Bennett ve Monday, 2003). *Staphylococcus aureus* mannitol fermantasyonu yapan, özellikle koagülaz üretimi ile diğer stafilokoklardan ayrılan ve patojenitesi diğer stafilokok türlerinden daha yüksek olan bir türdür. *S.aureus* doku ve organlarda akut ve piyojenik enfeksiyonlara, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına, postoperatif yara enfeksiyonlarına ve bakteriyemiye ayrıca besin zehirlenmesine neden olmaktadır (Koca, 2016; Çiftçi ve ark., 2009).

Staphylococcus aureus varlığı, gıdalarda ve gıdaların işlenmesinde yetersiz hijyen uygulamalarının indikatörü olarak gösterilmekte ve dünya genelinde mide ve bağırsak iltihabının (gastroenterit) ana nedeni olarak bilinmektedir (Valero ve ark., 2009). Bu türe ait bazı suşlar, ısıya dayanıklı ve insanlarda hastalıklara yol açan protein yapısında toksinler üretebilmektedir. Bu suşların ürettikleri metabolitler içinde tüketici sağlığı için en büyük tehlikeyi enterotoksinler oluşturmaktadır (Bennett ve Monday, 2003). *S.aureus*, iki çeşit toksin üretmektedir. Bunlar stafilokokal enterotoksinler (SE) ve toksik şok sendromu toksinleri (TSST-1) şeklindedir (Vasconcelos de Oliveira ve ark., 2010). SE antijenik özellikleri göre 5 serolojik tipe (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) ayrılmıştır ve gıda zehirlenmeleri ile ilişkileri tam olarak açıklanmayan yeni tipleri (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN ve SEO) bildirilmiştir (Erol ve İşeri 2004). En yaygın olanı enterotoksin A'dır. SEA ve SED özellikle gıda zehirlenmelerinden sorumludur (Bostan ve ark., 2006). Stafilokokal gıda zehirlenmelerinde semptomlar, gıda ile vücuda alınan toksin miktarına bağlı olarak genellikle 2-6 saat içerisinde görülmektedir ve en yaygın zehirlenme belirtileri bulantı, kusma, mide krampları ve halsizlik olup daha şiddetli durumlarda baş ağrısı, kas krampları, nabızda ve tansiyonda geçici düşüşler şeklinde görülmektedir (Bennett ve Monday, 2003; Dalkılıç, 2016).

Stafilokokal zehirlenme açısından riskli olan gıdalar et ve et ürünleri, tavuk ve yumurta ürünleri, salatalar (yumurtalı, ton balıklı, tavuklu ve patatesli), makarna, çikolatalı pastalar gibi ürünler, süt ve süt ürünleri olarak sıralanmaktadır (Bennett ve Monday, 2003).

Staphylococcus aureus'un neden olduğu enfeksiyonlarda en büyük sorun antibiyotiklere karşı görülen hızlı direnç gelişimidir. Örneğin; Penisilin G başlangıçta stafilokok enfeksiyonların tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılırken bir süre sonra penisilin G'ye karşı dirençli suşların geliştiği görülmüştür. Aynı şekilde penisilinaza dirençli bir penisilin türevi olan metisilin geliştirilmiş ve enfeksiyonlara karşı kullanıma sunulmuştur fakat iki yıl sonra Metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) suşları izole edilmiştir. Ayrıca Metisiline dirençli *S.aureus* suşlarının birçok antibiyotiğe (eritromisin, klindamisin, klorofenikol, tetrasiklin, trimetoprim-sulfametoksazol, kinolomlar ve aminoglikozit) de karşı direnç oluşturduğu da bildirilmektedir (Özkalp ve Baybek, 2003). Penisilin direnci ve daha sonra ortaya çıkan metisilin gibi yarı sentetik penisilinlere, makrolidlere, tetrasiklinlere ve aminoglizozidlere karşı direnç oluşması stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisin kullanımı ön plana çıkarmıştır. Vankomisin MRSA enfeksiyonların tedavisinde kullanılan en temel ilaçlardan birisi olmasına karşın zamanla bu antibiyotiğe karşı da direnç geliştiği bildirilmiştir. CLSI tarafından Vankomisine Dirençli *S.aureus* (VRSA) olarak, EUCAST tarafından Glikopeptite Dirençli *S.aureus* (GRSA) olarak isimlendirilmiştir (EUCAST, 2013; Garipçin ve Şeker, 2013).

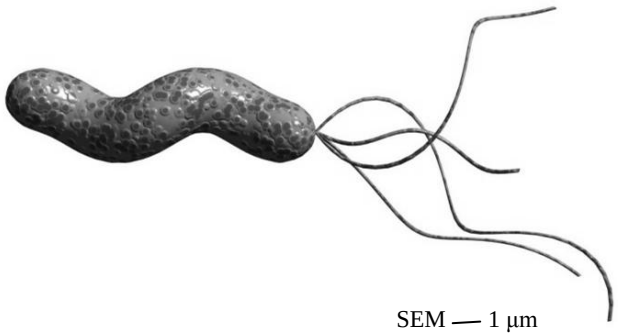
Son zamanlarda MRSA izolatları hastane kaynaklı enfeksiyonların yanı sıra toplum kaynaklı enfeksiyonlara da yol sebep olduğu bilinmektedir (Sowash ve Uhlemann, 2014).

4.12. *Helicobacter pylori'nin* Genel Özellikleri

Helicobacter pylori ilk olarak 1906 yılında Krientiz'in insan mide biyopsilerinden spiral bir mikroorganizma varlığını bildirmesi ile ortaya çıkmıştır (Kim, 2016). Steer ise 1975' te spiral şekilli bu bakterilerin mukus salgılayan mide mukozasına yakın olduğunu ve en azından bir kamçı taşıdığını bildirmiştir. 1979 yılında Avustralya'lı patolog Robin Warren, insan mide biyopsi örneklerini histopatolojik olarak değerlendirerek doku yüzeyindeki mukusta spiral şekilli bakterilerin bulunduğunu gözlemlemiş ve 1982 yılında Barry Marshall ile birlikte in

vitro koşullarda bu mikroorganizmayı üretmişlerdir (Noto ve Peek, 2012; Berstad ve Brandtzaeg, 2003). Bu mikroorganizma mide mukozasındaki değişiklikler nedeni ile fırsatçı patojen olarak kabul edilmiş, mide ülserinin salgılanan asit tarafından oluşturulduğu ve asit salgılanması baskılanırsa ülser yaralarının düzeleceğine inanılmıştır. Ayrıca bu yeni mikroorganizma *Campylobacter* benzeri mikroorganizma olarak değerlendirilmiş ve ilk resmi adı *C.pyloridis* olarak verilmiştir. Ancak bu mikroorganizmanın diğer *Campylobacter* türlerinden taksonomik olarak farklı olduğu düşünülüp yeni bir cins olan *Helicobacter* cinsi ortaya çıkmıştır. *Helicobacter* bu mikroorganizmanın in vitro koşullardaki helikal morfolojisinden kaynaklanmaktadır (Berstad ve Brandtzaeg, 2003)

2005'ten sonra ise *H. pylori*' nin gastrik ile duedenum ülserasyonlar, gastrik adenokarsinom, mukoza ile ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfoması ve midedeki Hodgkin lenfoma dahil farklı gastrointestinal hastalıklar ile ilişki olduğu gözlenmiştir. Dünya Sağlık Örgütü *H.pylori'yi* mide kanseri 1.sınıf karsinojen olarak sınıflandırmış, ayrıca bu mikroorganizma enfeksiyonlara bağlı en sık etyolojik ajan olarak nitelendirilip, dünya kanseri'nin % 5,5 'ini temsil ettiği kabul edilmiştir (Noto ve Peek, 2012). *H. pylori* enfeksiyonu gelişmiş ülkelerde % 20-50; gelişmekte olan ülkelerde % 50-90 oranında yaygındır (Çağdaş ve ark., 2012).

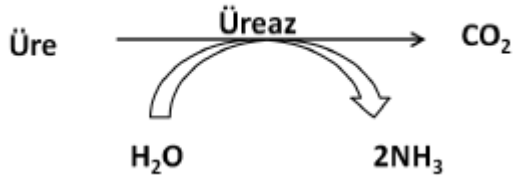


Şekil 11: *Helicobacter pylori'*nin elektron mikroskop görüntüsü
(http://www.helico.com/ Erişim tarihi: 20 Aralık 2016)

H. pylori kısa virgül veya spiral şeklinde görülen, yuvarlak uçlu, boyu 2,5-5,0 µm, eni 0,5-1,0 µm olan, hareketli, kapsülsüz ve spor oluşturmayan, zorunlu

mikroaerofilik, gram negatif bir bakteridir. *Helicobacter* türleri sahip oldukları 30 mikron uzunluğunda ve 2,5 nm kalınlığında 4–6 adet unipolar kamçı bulunmaktadır ve bu kamçıları sayesinde oldukça hareketlidir (Berstad ve Brandtzaeg, 2003). Dış yüzünde kalın bir glikokaliks tabakası bulunan *H.pylori* in-vitro şartlara son derece duyarlı bir mikroorganizmadır. Bu mikroorganizma kuruluk, güneş ışığı, düşük nem oranı gibi çevresel şartlarda kısa sürede inaktive olmaktadır. *H. pylori* çeşitli maddeler ilave edilmiş kanlı agarda 37 ºC'de nemin % 98 olduğu mikroaerofilik ortamda 3-5 günde 1-2 mm çapında yuvarlak, konveks ve saydam koloniler meydana getirmektedir. Kanlı agarda zayıf hemoliz oluşmasından dolayı koloniler etrafında gri bir zon görülebilir. Bakteri kültürü zor elde edilmekte olup, bekletilmiş at, koyun ve insan kanı ilaveli (% 5'lik) Brucella agar, Mueller-Hinton, Columbia agar, Beyin kalp infüzyon agar (BHIA) gibi besiyerleri *H. pylori* için ideal besiyerleridir (Kim, 2016). *H. pylori*; hidrojenaz, katalaz, oksidaz ve üreaz enzimlerine sahiptir.

Bu mikroorganizma üreaz enzimi sentezleyerek midedeki asit ortamda yaşayabilir. *H. pylori* üreaz enzimi ile üreyi amonyak ve karbondioksite parçalayarak bazik ortam oluşturur bakteri çevresinde asidi nötralize eder bu şekilde mide asidinin etkilerinden kendini korumaktadır (Şekil 11). Bu nedenle üreaz enziminin mide kolonizasyonunda önemli bir faktör olduğu vurgulanmaktadır (Fleming, 2007).



Şekil 12: Ürenin midedeki yıkımı
(Akgüç, 2011)

Helicobacter pylori' nin neden olduğu enfeksiyonun eradikasyonunda 3'lü tedavi olan klaritromisin ve amoksisilin ya da metronidazol ile birlikte proton pompa inhibitörü veya ranitidin bizmut sitratı kullanılır (Çağdaş ve ark., 2012).

Helicobacter pylori enfeksiyonunun tedavisinde birinci basamakta çift doz proton pompa inhibitörü (PPİ), amoksisilin (A) ve klaritromisin (K) veya metranidazol (M) içeren iki antibiyotikten oluşan üçlü tedavi önerilmektedir. Son 10 yılda bu tedavinin etkinliğinin azaldığı gözlenmiştir, bunun ana nedeni de klaritromisini karşı direnç artışıdır. Konvansiyonel 3'lü tedavinin eradikasyon oranını etkileyen faktörler antibiyotik direnci, *H.pylori*'nin gastrik mukoza membranındaki kolonize olma yoğunluğu ve CagA ile VacA'nın virülans faktörleridir. Son 20 yılda klaritromisinin bakteriyal kaynaklı solunum sistemi enfeksiyonları tedavisinde kullanıldığı ve tüm dünyada eridikasyon oranındaki azalma gözlenmiştir (Lee, 2016). Klaritsomisin direnci olan bölgelerde ikinci basamak tedavi olan PPI, bizmut, metronidazol ve tetrasiklin içeren 4'lü tedavi önerilmektedir. Fakat 4'lü tedavi de benzer sonuçlar görülmektedir. (Özer ve ark., 2004; Mégraud, 2012).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Mikroorganizmalar

5.1.1.1. İzole edilen mikroorganizmalar

Probiyotik ürün ve preparatlardan izole edilen mikroorganizmalar in vitro koşullarda *S.aureus* ve *H.pylori* üzerine antimikrobiyal aktivite tespitinde kullanılmıştır.

5.1.1.2. Standart mikroorganizmalar

Helicobacter pylori ATCC 43504

Escherichia coli ATCC 11229

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356

Lactobacillus sakei ATCC 15521

Staphylococcus aureus ATCC 25925

5.1.1.3. Klinik mikroorganizmalar

Çalışmamızda Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilen 10 adet klinik *S.aureus* izolatı ve İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edilen 6 adet klinik *H.pylori* izolatı kullanılmıştır (Tablo 3). Çalışma için gereken etik kurul raporu 05.12.2016 tarihli ve 142 protokol nolu karar ile ''Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'' tarafından verilmiştir (Ek 1).

Tablo 3: Klinik mikroorganizmalar

Klinik bakteriler	**İzole edildiği kaynak**
MRSA 1	Kan
MRSA 2	Trekeal aspirat
MRSA 3	Trekeal aspirat
MRSA 4	Yara
MRSA 5	Yara
MSSA 6	Trekeal aspirat
MSSA 7	Boğaz
MSSA 8	Yara
MSSA 9	Yara
MSSA 10	Trekeal aspirat
H.pylori 1	Mide
H.pylori 2	Mide
H.pylori 3	Mide
H.pylori 4	Mide
H.pylori 5	Mide
H.pylori 6	Mide

5.1.2. Besiyerleri

Colombia Agar % 5 Sheep Blood	Liofilchem
Brain Heart Infusion Broth (BHI)	LABM
Mueller Hinton Agar (MHA)	LABM
Tryptic Soy Agar (TSA)	LABM
Tryptic Soy Broth (TSB)	LABM
Helicobacter pylori Agar	Liofilchem

Reddy Agar	HiMedia
De Man Rogosa Sharpe (M.R.S.) Agar	LABM
De Man Rogosa SharpeBroth (M.R.S.) Broth	LABM
MR-VP Broth	Liofilchem
Skim Milk	LABM
Urea Agar Base	Biolab
Ürea	Merck

5.1.3. Kimyasal maddeler

Anaerop Gas pack	Mitsubishi
Mikroaerofilik Gas pack	Mitsubishi
Anaerop indikatör	Mitsubishi
Vitek MS-CHA(Yellow)	Biomerieux
Katalaz	Merck Calbıochem 219001
Proteinase K from *Tritirachium album*	P2308 Sigma-Aldrich
Nisin	N5764- Sigma
Safra tuzu	Fluka
Gliserol	Merck
Kristal viyolet	Merck
Etil alkol (% 96)	Labkim
Bazik fuksin	SİgmA
Asit-fenik kristali (fenol kristali)	Merck
H_2O_2 (% 36)	Merck
HCI	Merck
KOH	Sigma
% 1'lik N,N,N′,N′-Tetramethyl-p-phenylenediamine	Sigma
1-Naftol	Merck
Siprofloksasin	Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti

5.1.4. Kullanılan araç ve gereçler

Anaerobik jar	Oxoid
Kaba terazi (0,1g)	Kern
Hassas terazi (0,0001 g)	Precisa XB220A
Mikroskop	Olympus CX21
Derin dondurucu	Beko D9459NM
İnkübatör	Binder BD 115
Laminar flow	Esco Class II Type A2
Otoklav	Hirayama HV-50L
Vortex	IK Minishaker
Pastör fırını	Electro-Mag
Buzdolabı	Arçelik AR 5034
Distile su cihazı	GFL
Dondurucu -80	ARCTIKO
UV-Visible Spektrofotometre	HELİOS
Soğutmalı santrifüj	Beckman
Mikroplak okuyucu	Epoch
Mikropipetler	Brand 0,5-5 µL / 100 µL
Su banyosu	Nüve ST 402
Pastör pipeti	LP
Lam	Isolab
Enjektörler (2,5mL, 5mL, 10 mL)	Tıbset
Mınısart Enj.Filtre (0.22-0.45 µm)	Sartorius
Petri kutuları	Isolab
Otomatik pipet uçları	Isolab
96 kuyucuklu steril mikroplak (F tabanlı)	Corning

5.1.5. Çözeltiler

1 N HCl

% 3’lik Hidrojen peroksit

Fizyolojik tuzlu su (FTS)

% 20’lik gliserol çözeltisi

α-Naftol çözeltisi

% 40’ lık KOH çözeltisi

5.1.6. McFarland standart bulanıklık tüpleri

Standart bulanıklık elde etmek için laboratuvarımızda hazırlanan McFarland 2 standart tüpü esas alınmış olup; 0,2 mL % 1,175 $BaCl_2.2H_2O$’ya 9,8 mL % 1 H_2SO_4 ilave edilerek ve McFarland 0,5 standart tüpü; 0,5 mL % 1,175’lik $BaCl_2.2H_2O$’ya 99,5 mL % 1 H_2SO_4 ilave edilerek hazırlanmıştır (UMS AMD-TP-02 Sürüm 1, 2014).

5.2. Yöntemler

5.2.1. Suşların temini ve saklanması

Probiyotik bakteriler % 20 gliserol içeren Mann Rogosa Sharpe (MRS) broth’da, Haydarpaşa Numune Hastanesi Laboratuvarından temin edilen klinik *S. aureus* suşları % 20 gliserol içeren Tryptic Soy Broth (TSB)’da -20 ºC’de, İstanbul Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edilen klinik *H. pylori* suşları % 20 gliserol içeren Brain Heart Infusion (BHI) broth’da -80 ºC’de saklanmıştır.

5.2.2. Mikroorganizmaların saklanması için kullanılan besiyerleri

% 20 Gliserol içeren Tryptic Soy Broth (TSB)

TSB	3g
Gliserol	20ml
Distile su	80ml

Hazırlanan karışım 1,5 mL olarak ependorflara aktarılarak, 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

% 20 Gliserol içeren De Man-Rogosa Sharpe (MRS) Broth

MRS Broth	5,5g
Gliserol	20ml
Distile su	80ml

Hazırlanan karışım 1,5 mL olarak ependorflara aktarılarak, 121 ºC'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

% 20 Gliserol içeren Brain Heart Infusion (BHI) Broth

BHI	3,7g
Gliserol	20ml
Distile su	80ml

Hazırlanan karışım 1,5mL olarak ependorflara aktarılarak, 121 ºC' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Diğer besiyerleri

Mueller Hinton Agar (MHA), Tryptic Soy Agar (TSA), De Man-Rogosa Sharpe (MRS) Agar, Tryptic Soy Broth (TSB), De Man-Rogosa Sharpe (MRS) Broth, Reddy Agar besiyerleri üreticinin talimatlarına uygun olarak hazırlanmış ve steril edilmiştir.

5.2.3. Probiyotik mikroorganizmaların tanımlanması

Probiyotik mikroorganizmaların tanımlanmasında Gram boyama, katalaz testi, glikozdan gaz oluşturma, arjinin hidrolizi, farklı sıcaklık ve pH değerlerinde, farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme gibi testler uygulanmıştır.

5.2.4. Probiyotik ürünlerden mikroorganizmaların izolasyonu

Çalışmamızda kullanılacak probiyotik ürünler market ve eczanelerden temin edilmiş ve Anabilim Dalımızın laboratuvarında analiz edilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız doğal probiyotik ürünler; ev ürünü olarak yoğurt, peynir ve turşu suyu ile kefir, ticari ürün olarak sade ile meyveli kefir, meyveli yoğurt, peynir suyu ve eczane preparatı olarak 5 farklı firmaya ait probiyotik ürün kullanılmıştır.

Probiyotik ürünlerden eczane preparatların prospektusundaki günlük kullanım dozu dikkate alınarak, ev ve market ürünleri de dahil olmak üzere toplam 16 adet probiyotik ürünün fizyolojik tuzlu su (FTS) içeren tüplerde 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} olmak üzere seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlardan 100 µL alınarak MRS Agar yüzeyine drigalski spatülü ile yayılmış ve tüm petriler anaerob ile aerob koşullarda 37 °C'de ve mikroaerofilik koşullarda 39 °C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süreci tamamlandıktan sonra petrilerden; tek düşen ve morfolojik olarak birbirinden farklı olan koloniler öze yardımıyla alınarak başka bir petriye çizgi ekim yöntemiyle aktarılmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen izolatlar saflaştırılıncaya kadar pasajlanmıştır.

Saflaştırılan izolatların ilk olarak morfolojik ve biyokimyasal özellikleri Gram boyama, katalaz, glikozdan gaz üretimi, arjinin hidrolizi ve Voges Proskauer testleri ile belirlendi. Daha sonra taze kültürlerin MALDI- TOF MS'de tanımlamaları yapılmıştır. Tanımlanan bu izolatlar antimikrobiyal aktivite deneyinde kullanılmak üzere % 20 gliserol içeren MRS Broth içerisinde – 20 ºC'de saklanmıştır (Durak ve ark., 2015; Tuncer ve ark., 2008).

5.2.5. İzolatlarının tanımlanması

5.2.5.1. Gram boyama

İzolatların Gram boyanma özelliklerinin tespiti için; katı besiyerinde bulunan kolonilerden öze ile yaklaşık bir toplu iğne başı büyüklüğünde alınıp, aseptik şartlarda fizyolojik tuzlu su (FTS) damlatılmış lam üzerinde süspanse edilerek lam yüzeyine yayılmıştır. Lam önce havada kurutulup, sonra bek alevinden 3 kez geçirilerek tespit edilmiştir. Daha sonra preparatın üzerine kristal viyole boyası damlatılıp 2 dakika beklenmiş ve su ile yıkanarak kristal viyole uzaklaştırılmıştır. Preparatın üzerine, lugol çözeltisi damlatılarak 2 dakika bekletilip, su ile yıkanarak lugol çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Daha sonra % 96' lık etil alkol çözeltisi damlatılarak 30 saniye renksizleştirme işlemi yapılmıştır. Ardından su ile yıkanarak zıt boya olarak sulu fuksin damlatılmış ve 1 dakika bekletildikten sonra preparat tekrar su ile yıkanarak havada kendi halinde kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra preparata immersiyon yağı damlatılıp 100'luk objektif ile incelenmiş ve mor olarak boyanan gram (+) bakteriler daha sonraki tanımlama aşamaları için çalışmaya dahil edilmiştir (Tunalı, 2014; Harrigan ve McCance 1966).

5.2.5.2. Katalaz testi

MRS agar besiyerinde üretilmiş bakteri kolonilerinden alınarak lam üzerine yayılmış ve üzerine % 3 hidrojen peroksit damlatıldıktan sonra hızlı bir şekilde meydana gelen gaz kabarcıkların oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir ancak gaz kabarcığı görülmeyen kültürler katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir. Katalaz testinde pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213, negatif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 kullanılmıştır (Tunalı, 2014; Harrigan ve McCance 1966).

5.2.5.3. Voges-Proskauer testi

Voges-Proskauer testi için bakteri izolatı MR-VP Broth besiyerine inoküle edildikten sonra 37 ºC'de 2 gün inkübe edilmiş ve bu sürenin sonunda tüplerin üzerine α-naftol (6 g α-naftol/100 ml % 95'lik etanol) ve KOH (16 g KOH/100 ml saf su) çözeltisi ilave edilerek kuvvetlice çalkalanıp (20 saniye) tüplerde 5 dakika içinde renk değişimi olup olmadığı izlenmiştir. Kırmızı renk oluşumu görülen tüpler pozitif olarak, renk değişimi görülmeyen ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

Voges-Proskauer testinde pozitif kontrol olarak *Klebsiella pneumoniae* negatif kontrol olarak *Escherichia coli* kullanılmıştır (Tunalı, 2014).

5.2.5.4. Arjinin hidroliz testi

İzolatların arjininden amonyak oluşturma özelliklerinin saptanması amacı ile Reddy agar kullanılmıştır. Arjininden amonyak oluşturan kolonilerde gelişen asitlik, amonyak oluşumu ile nötralize edilmekte ve asitliğin neden oldugu sarı renk kaybolmaktadır. Arjininden amonyak oluşturmayan izolatlar ise, asitlik indikatör boya rengini (menekşe) sarıya çevirmekte ve inkübasyon boyunca besiyerin rengi değişmemektedir. Bu doğrultuda; çalışmamızdaki tüm izolatlar Reddy agara inoküle edildikten sonra inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi dolduktan sonra besiyerinde sarı ve mor renginin gözlenmesi negatif, besiyerinde mor renk ile birlikte koloni etrafında zon görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Reddy ve ark., 1972).

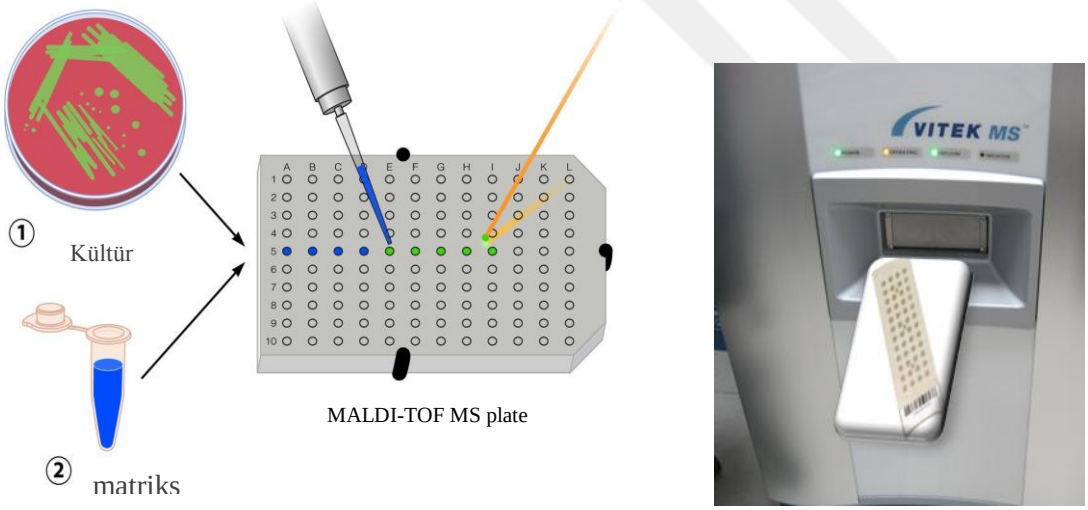
5.2.5.5. Glikozdan gaz üretimi

Laktik asit bakterilerinin heterofermentatif veya homofermentatif olup olmadıklarını belirlemek amacı ile glukozdan gaz üretimleri araştırılmıştır. Ters çevrilmiş Durham tüpleri içeren glikoz fosfat broth besiyerine 24 saatlik kültürlerden inoküle edilmiş ve 37 ºC'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası

Durham tüpleri içerisinde gaz görülen kültürler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Facklam ve ark., 2002).

5.2.5.6. İzole edilen mikroorganizmaların MALDI-TOF MS (Matriks Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) ile tanımlanması

MRS Agardaki taze kültürlerden steril öze ile tek koloni alınarak slide'lara yayılmış ve üzerine 0,9 µL VITEK MS CHCA (matriks solüsyonu) ilave edilerek kurumaya bırakılmıştır. Kontrol suşu olarak *E.coli* kullanılmıştır. Daha sonra slide'lar MALDI-TOF MS cihazında okutulmuştur. MALDI-TOF MS ile tanımlama sonucu tüm ürünlerden toplamda 27 adet saf kültür tanımlanmıştır. Bu bakterilerin farklı pH, sıcaklık ve farklı konsantrasyonda safra tuzu içeren MRS Brothdaki gelişimleri incelenmiştir.



Resim 1: MALDI-TOF MS ile mikroorganizmaların tanımlanması
(Clark ve ark., 2013)

5.2.6. İzolatların probiyotik özelliklerinin tespit edilmesi

5.2.6.1. Probiyotik bakterilerin farklı pH değerlerinde gelişiminin tespit edilmesi

Probiyotik bakteriler iki kez art arda MRS Broth'a pasaj yapılarak üredikleri ortam ve sıcaklıklarda aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerin optik yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm'de 0,60 ± 0,02' ye ayarlanmıştır.

OD değerleri ayarlanan bakterilerden besiyeri hacminin % 2 oranında (60 µl) alınarak 1N HCI ve 1N KOH ile ayarlanan pH'ları 1.5, 2, 3.2 olan 3ml' lik MRS Broth içeren tüplere inoküle edilmiştir. Hazırlanan tüplerden düz tabanlı 96 kuyucuklu mikroplak kuyucuklarıın her birine 200 µl dağıtılmıştır.

Daha sonra mikroplaklar 37 °C'de anaerop, aerop ve 39 ºC'de mikroaerofilik koşullarda 24, 48, 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuktan 5 µL alınıp MRS agar üzerine nokta ekim yapılmıştır ve petriler inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca mikroplaklar mikroplak okuyucada 630nm'de optik yoğunlukları ölçülerek OD_2 olarak kaydedilmiştir.

Kontrol olarak her bir bakteri kendi üreme koşullarında pH 6,4±2 olan MRS broth besiyeri içerisinde inkübasyona bırakılıp 24, 48, 72 saat sonra mikroplak okuyucuda 630 nm'de optik yoğunluk ölçülerek OD_1 olarak kaydedilmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin kontrole göre farklı pH ortamındaki gelişimleri aşağıda yer alan formül kullanılarak belirlenmiştir. Bu ortamlarda bakterilerin canlı kalıp kalmaması nokta ekim sonucuna göre belirlenmiştir (Goderska ve Czarnecki, 2007).

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_1} \times 100$$

OD_1: Kontrol

OD_2: Suşların farklı pH ortamlarında gelişme oranı

5.2.6.2. Probiyotik bakterilerin farklı safra tuz konsantrasyonlarında gelişiminin tespit edilmesi

Probiyotik bakteriler iki kez art arda MRS Broth'a pasaj yapılarak üredikleri ortam ve sıcaklıklarda aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerin optik yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm'de 0,60 ± 0,02'ye ayarlanmıştır.

OD değerleri ayarlanan bakterilerden besiyeri hacminin % 2 oranında (60 µl) alınarak % 0,15, % 0,30, % 1' lik safra tuzu içeren 3ml'lik MRS Broth içeren tüplere inoküle edilmiştir. Hazırlanan tüplerden düz tabanlı 96 kuyucuklu mikroplak kuyucuklarına 200 µL dağıtılmıştır. Daha sonra mikroplaklar 37 °C'de anaerop, aerop ve 39 ºC'de mikroaerofilik koşullarda 24, 48, 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuktan 5 µL alınıp MRS agar üzerine nokta ekim yapılmıştır ve petriler inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca mikroplaklar mikroplak okuyucada 630nm'de optik yoğunlukları ölçülerek OD_2 olarak kaydedilmiştir.

Kontrol olarak her bir bakteri safra tuzu içermeyen MRS broth besiyeri içerisinde inkübasyona bırakılıp 24, 48, 72 saat sonra mikroplak okuyuca da 630 nm de optik yoğunluk ölçülerek OD_1 olarak kaydedilmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin kontrole göre farklı safta tuz ortamındaki gelişimleri aşağıda yer alan formül kullanılarak belirlenmiştir. Bu ortamlarda bakterilerin canlı kalıp kalmaması nokta ekim sonucuna göre belirlenmiştir (Goderska ve Czarnecki, 2007).

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_1} \times 100$$

OD_1: Kontrol

OD_2: Suşların farklı pH ortamlarında gelişme oranı

5.2.6.3. Probiyotik bakterilerin farklı sıcaklıklarda gelişimlerinin tespit edilmesi

Probiyotik bakteriler iki kez art arda MRS Broth'a pasaj yapılarak üredikleri ortam ve sıcaklıklarda aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerin optik yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm'de 0,60 ± 0,02' ye ayarlanmıştır.

OD değerleri ayarlanan bakterilerden besiyeri hacminin % 2 oranında (60 µl) alınarak 4 °C, 22 ºC ve 45 °C sıcaklıklara karşı toleransını belirlemek üzere 3 adet 3ml'lik MRS Broth besiyeri içeren tüplere inoküle edilmiştir. Hazırlanan tüplerden düz tabanlı, 96 kuyucuklu mikroplak kuyucuklarına 200 µL dağıtılmıştır. Daha sonra mikroplaklar 4 °C, 22 °C ve 45 °C'de anaerop, aerop ve mikroaerofilik koşullarda 24, 48, 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuktan 5 µL alınıp MRS agar üzerine nokta ekim yapılmıştır ve petriler inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca mikroplaklar mikroplak okuyucada 630nm'de optik yoğunlukları ölçülerek OD_2 olarak kaydedilmiştir.

Kontrol olarak her bir bakteri ürediği koşullarda inkübasyona bırakılıp 24, 48, 72 saat sonra mikroplak okuyucuda 630 nm'de optik yoğunluk ölçülerek OD_1 olarak kaydedilmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin kontrole göre farklı sıcaklık ortamındaki gelişimleri aşağıda yer alan formül kullanılarak belirlenmiştir. Bu ortamlarda bakterilerin canlı kalıp kalmaması nokta ekim sonucuna göre belirlenmiştir (Goderska ve Czarnecki, 2007).

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_1} \times 100$$

OD_1: Kontrol

OD_2: Suşların farklı pH ortamlarında gelişme oranı

5.2.7. Probiyotik bakteri süpernatantın hazırlanması

Probiyotik bakterilerin inokülum düzeyi % 1 v/v olacak şekilde 10 mL' lik tüplerde 5 mL MRS Broth besiyeri içeren tüplere ekimler yapılarak 37 ºC' de 18 saat 2 kez alt kültürleri alınmıştır. İnkübasyon sonunda bakteri içeren MRS broth besiyeri falkon tüplere aktarılmıştır. Daha sonra bu falkon tüpler 4°C de 4500 rpm'de 30 dakika santrüfüj edilerek hücreler çöktürülmüş ve elde edilen üst faz 0.22 µm lik filtreden geçirilip steril edilerek agar oluk difüzyon yönteminde kullanılmıştır (Hassan ve ark., 2011).

5.2.8. Probiyotik mikroorganizmaların antimikrobiyal aktivitesinin tespit edilmesi

5.2.8.1. Spot on lawn yöntemi

Laktik asit bakterilerine ait izolatlardan farklı pH, tuz, sıcaklık koşullarının her üçünde de canlı kalan 10 adet probiyotik bakterinin klinik *Staphylococcus aureus* mikroorganizmaları üzerine antimikrobiyal etkisi öncelikle Spot on lawn testi ile belirlenmiştir. İzolatlar MRS Broth besiyerinde iki kez aktifleştirildikten sonra (37 °C'de aerop ve anaerop, 39 °C'de mikoaerofilik ortamda 24 saat) 15mL MRS Agar besiyerine her bir aktif kültürden 5 µl alınarak nokta ekimi yapılmıştır. Petriler 24 saat inkübasyona bırakılarak koloni oluşumu sağlanmıştır. Test mikroorganizması olarak kullanılan *Staphylococcus aureus* suşlarının 18-24 saatlik kültürlerinden McFarland 0,5 bulanıklık standardına eşdeğer süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlardan 50 µL alınarak 5 mL yumuşak agar içeren TSA (% 0,7 agar) tüplerine aktarılmış ve vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra karışım laktik asit bakteri izolatlarının kolonileri üzerine dökülmüş ve katılaşması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Petriler 37 °C'de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu oluşan inhibisyon zonlarının çapları dijital kumpas ile mm olarak ölçülüp kaydedilmiştir. Tüm deneyler 2 tekrarlı olarak

gerçekleştirilmiştir (Altuntaş ve ark., 2010; Hassan ve ark., 2011; Vijayakumar ve Muriana, 2015).

5.2.8.2. Agar oluk difüzyon yöntemi

Farklı pH, tuz, sıcaklık koşullarının her üçünde de canlı kalan 10 adet probiyotik bakterinin *S.aureus ve H.pylori* üzerine antimikrobiyal aktivitesinin tespit edilmesi için agar oluk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Hazırlanan probiyotik bakteri süpernatantların pH'ı pH metre kullanılarak ölçülmüş ve tekrar 0,22 µm lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Daha sonra McFarland 2 bulanıklık standardına eşdeğer *H.pylori* süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan *H.pylori* süspansiyonlarından 0,1 mL alınarak Columbia agar yüzeyine steril eküvyon yardımı ile yayılmıştır**.** McFarland 0,5 bulanıklık standardına eşdeğer hazırlanan *S.aureus* süspansiyonlarından 0,1 mL alınıp 40-45 ºC'ye soğutulmuş olan 25 mL MHA içerisine ilave edilerek iyice çalkalandıktan sonra 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 4 ± 0,5 mm kalınlığında dökülmüştür**.** Daha sonra petrilerde 2,5 cm aralıklarla steril punch kullanılarak 6 mm çapında oluklar açılmış ve her bir oluğa supernatanttan ve kontrollerden 50 µL konulmuştur. Petriler *H.pylori* için 37 ºC' de mikroaerofilik koşullarda 4 gün, *S.aureus* için 37 ºC' de aerobik koşullarda 1 gün inkübe edilmiş ve oluşan inhibisyon zonlarının çapı bir kumpas yardımı ile mm cinsinden ölçülmüştür. Tüm deneyler 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir Pozitif kontrol olarak siprofloksasin (200 µg/mL), negatif kontrol olarak steril distile su kullanılmıştır (Boyanova ve ark., 2008; Mattana ve ark., 2010; EUCAST, 2014).

5.2.8.2.1. Nisinin antibakteriyel aktivitesinin tespit edilmesi

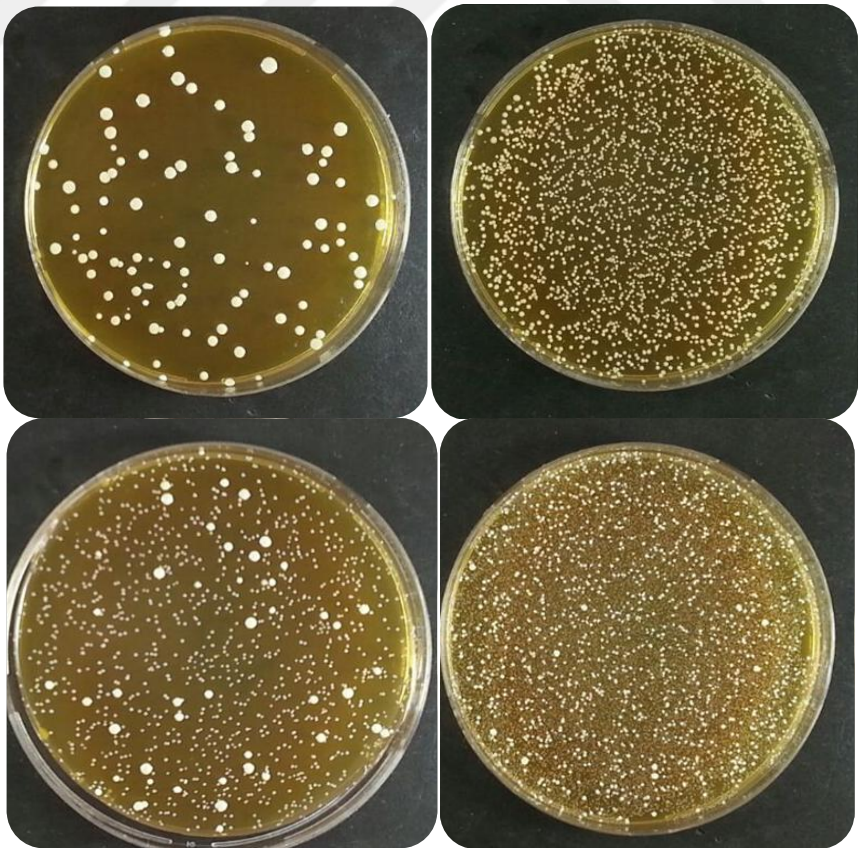
McFarland 0,5 bulanıklık standardına eşdeğer hazırlanan *S.aureus* süspansiyonlarından 0,1 mL alınıp 40-45 ºC'ye soğutulmuş olan 25 mL MHA içerisine ilave edilerek iyice çalkalandıktan sonra 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 4 ± 0,5 mm kalınlığında dökülmüştür. McFarland 2 bulanıklık standardına

eşdeğer hazırlanan *H.pylori* süspansiyonlarından 0,1 mL alınarak Columbia agar yüzeyine steril eküvyon yardımı ile yayılmıştır. Bakteri süspansiyonu yapılan petrilerde 2,5 cm çapında aralıklarla steril punch kullanılarak 6 mm çapında oluklar açılarak ve her bir oluğa 50 µL nisin (640 µg/mL) ve nisin (1280 µg/mL) çözeltisinden konulmuştur. Daha sonra *S.aureus* için petriler aerop koşullarda 37 ºC'de 1 gün, *H.pylori* için 37 °C' de mikroaerofilik koşullarda 4 gün inkübe edilmiş ve oluşan inhibisyon zonlarının çapları dijital kumpas ile mm olarak ölçülüp kaydedilmiştir. Tüm deneyler 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (CLSI, 2006; Boyanova ve ark., 2008; Mattana ve ark., 2010).

6. BULGULAR

6.1. Probiyotik Ürünlerden Mikroorganizmaların İzolasyonu

Çalışmamızda 5 adet ticari preparat, 7 adet ticari probiyotik ürün ve 4 adet doğal farklı probiyotik ürün olmak üzere toplamda 16 probiyotik üründen laktik asit bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. MRS agar üzerinde küçük, mat, krem ya da beyaz renkteki laktik asit bakterisi olma olasılığı taşıyan koloniler seçilerek saflaştırma yapılmıştır.Yapılan çalışma sonucunda toplamda 77 adet mikroorganizma izole edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen izolatlardan 5 tanesi ev kefiri, 3 tanesi ev yoğurt suyu, 9 tanesi ev peynir suyu, 3 tanesi ev turşu suyuna ve 6 tanesi P.1 firması, 11 tanesi P.2 firması, 8 tanesi P.3 firması, 2 tanesi P.4 firması, 5 tanesi P.5 firmasına, ait eczane preparatı ile 7 tanesi T.1 firması, 4 tanesi T.2 firması, 2 tanesi T.3 firması 3 tanesi T.4 firması, 2 tanesi T.5 firması, 4 tanesi T.6 firması, 3 tanesi T.7 firmasına ait ticari üründür.



Resim 2: Dilüsyon sonrası MRS agar besiyerinde üreyen koloniler

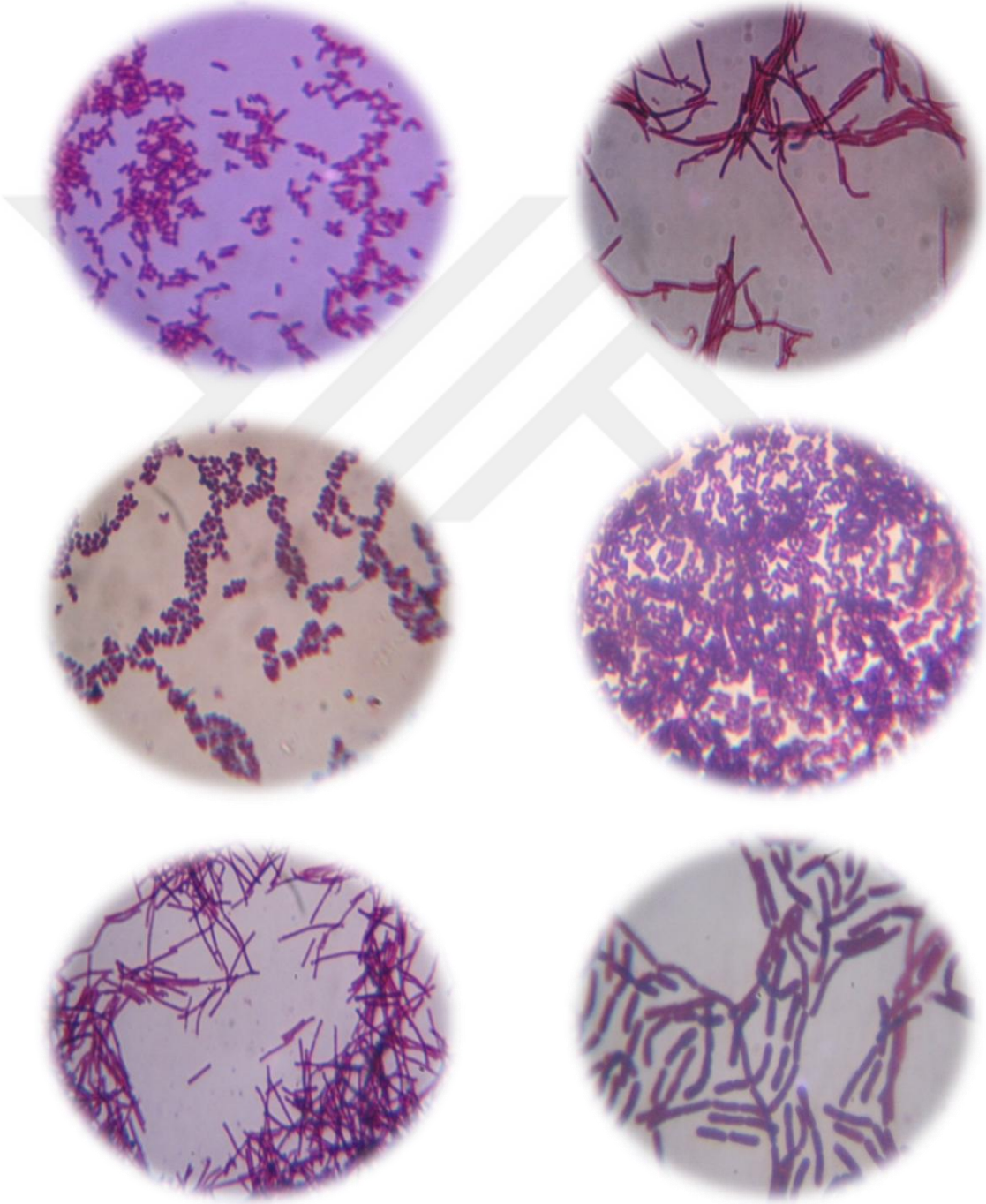
Tablo 4: Elde edilen izolatların kaynak, sayı ve gelişim ortamları

	İzolat kaynağı	İzolat sayısı	Gelişim koşulları		
			MRS Agar 37 ºC Aerop	**MRS Agar 37 °C Anaerop**	**MRS Agar 39 °C Mikroaerofilik**
1	Ev kefiri	5	2	3	-
2	Ev peynir suyu	9	2	7	-
3	Ev yoğurdu	3	-	3	-
4	Ev turşu suyu	3	3	-	-
5	P.1 firması preparat	6	2	3	1
6	P.2 firması preparat	11	6	4	1
7	P.3 firması preparat	8	3	3	2
8	P.4 firması preparat	2	-	1	1
9	P.5 firması preparat	5	3	2	-
10	T.1 firması ticari ürün	7	3	4	-
11	T.2 firması ticari ürün	4	2	2	-
12	T.3 firması ticari ürün	2	1	1	
13	T.4 firması sade kefir	3	1	2	-
14	T.5 firması peynir suyu	2	1	1	-
15	T.6 firması meyveli kefir	4	2	2	-
16	T.7 firması meyveli yogurt	3	2	1	-

6.2. İzolatlarının Tanımlanması

6.2.1. Gram boyama

De de Man Rogosa Sharpe (MRS) agarda üreyen koloniler Gram boyama ile boyanmış ve bunlardan gram pozitif 77 adet mikroorganizma çalışmamıza dahil edilmiştir (Resim 3).



Resim 3: Gram boyama yöntemi ile boyanmış izolatların mikroskoptaki görünümü (1000x)

6.2.2. Katalaz testi

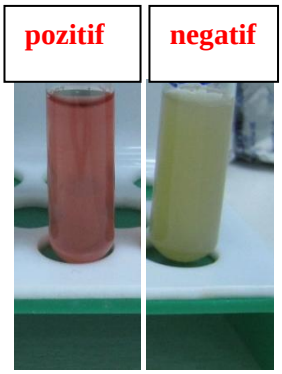
Çalışmamızda yer alan tüm izolatlara katalaz testi uygulanmış ve bu izolatların 5 tanesinin katalaz pozitif, 72 tanesinin katalaz negatif olduğu saptanmıştır.



Resim 4: Katalaz testi pozitif ve negatif görünümü

6.2.3. Voges-Proskauer testi

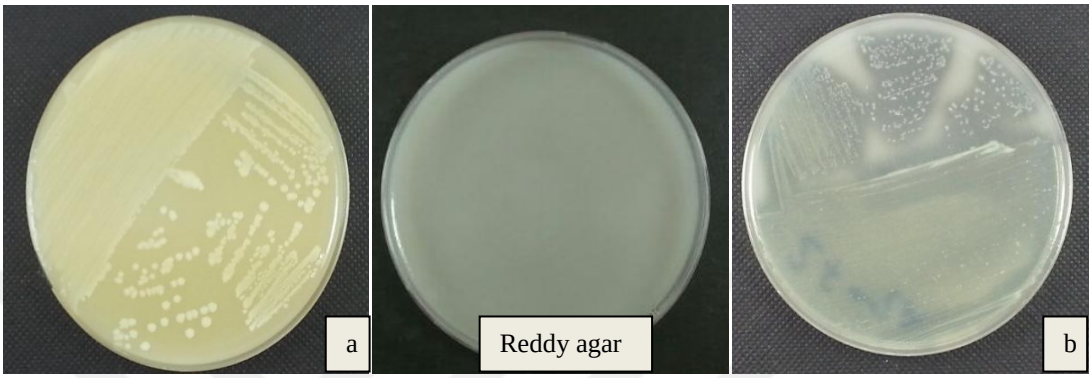
Çalışmamızda yer alan tüm izolatlara Voges- Proskauer testi uygulanmış ve tüm izolatların voges-proskauer negatif olduğu saptanmıştır.



Resim 5: Voges-Proskauer testi pozitif ve negatif görünümü

6.2.4. Arjin hidroliz testi

Çalışmamızda yer alan tüm izolatlar arjin hidroliz testi için Reddy agara ekilmiştir. Ekim sonrası 35 izolatın arjin pozitif ve 42 izolatın arjin negatif olduğu saptanmıştır.



Resim 6: Arjin hidroliz testi negatif (a) ve pozitif görünümü (b)

6.2.5. Glikozdan gaz üretimi

Çalışmamızda yer alan tüm izolatların glikozdan gaz üretimi araştırılmış ve tüm izolatların glikozdan gaz oluşturmadığı (homofermantatif) saptanmıştır.



Resim 7 : Glikozdan gaz oluşturmayan homofermentatif bakteri görünümü

Tablo 5: MALDI-TOF MS ile tanımlanan probiyotik bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları

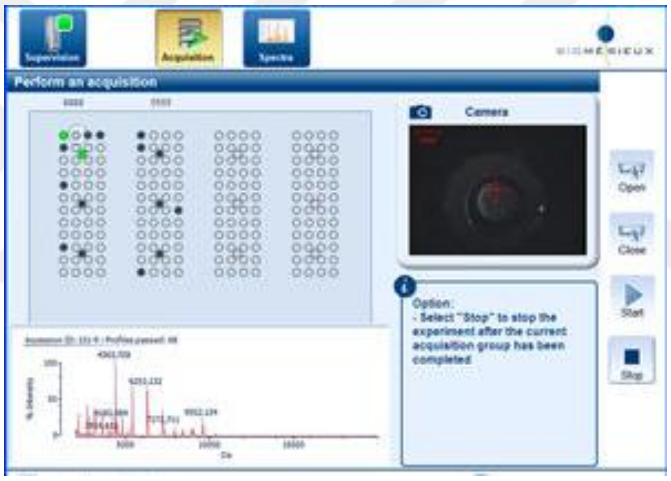
No	İzolat kodu	Bakteriler	Gram boyama	Katalaz	Arjin hidroliz	Voges Proskauer	Glikozdan gaz üretimi	Üreme ortamı	İzole edilen kaynak
1	1a- A1	*L. kefiri 1*	Gram (+) basil	-	-	-	-	37 ° C anaerob	Ev kefiri
2	2f-2A	*L.rhamnosus*	Gram (+) basil	-	+	-	-	37 ° C anaerob	P.1 firması preparat
3	3a-A	*L. helveticus*	Gram (+) basil	-	-	-	-	37 ° C anaerob	T.2 firması ticari ürün
4	1d-3A	*L.paraplantarum*	Gram (+) basil	-	+	-	-	37 ° C anaerob	Ev peynir suyu
5	1c-2.2.A	*L. plantarum*	Gram (+) basil	-	+	-	-	37 ° C anaerob	Ev peynir suyu
6	1d-3A	*L.pseudomesenteroides*	Gram (+) kok	-	+	-	-	37 ° C anaerob	Ev peynir suyu
7	3d-4A	*L. lactis ssp.lactis*	Gram (+) kok	-	+	-	-	37 ° C anaerob	T.1 firması ticari ürün
8	2b-1A	*E. faecium*	Gram (+) kokobasil	-	-	-	-	37 ° C anaerob	P.2 firması preparat
9	2a-2A	*L. plantarum*	Gram (+) basil	-	+	-	-	37 ° C anaerob	P.3 firması preparat
10	1b-2A	*L. delbrueckii*	Gram (+) basil	-	-	-	-	37 ° C anaerob	Ev yogurdu
11	3b-1A	*Bifidobacterium spp*	Gram (+) basil	-	-	-	-	37 ° C anaerob	T.4 firması sade kefir
12	1d-2A	*L. curvatus*	Gram (+) basil	-	-	-	-	37 ° C anaerob	Ev peynir suyu
13	3a-1	*L.pseudomesenteroides*	Gram (+) kok	-	-	-	-	37 ° C aerob	T.2 firması ticari ürün
14	1e-2	*B. pumilus*	Gram (+) basil	+	+	-	-	37 ° C aerob	Ev turşu suyu

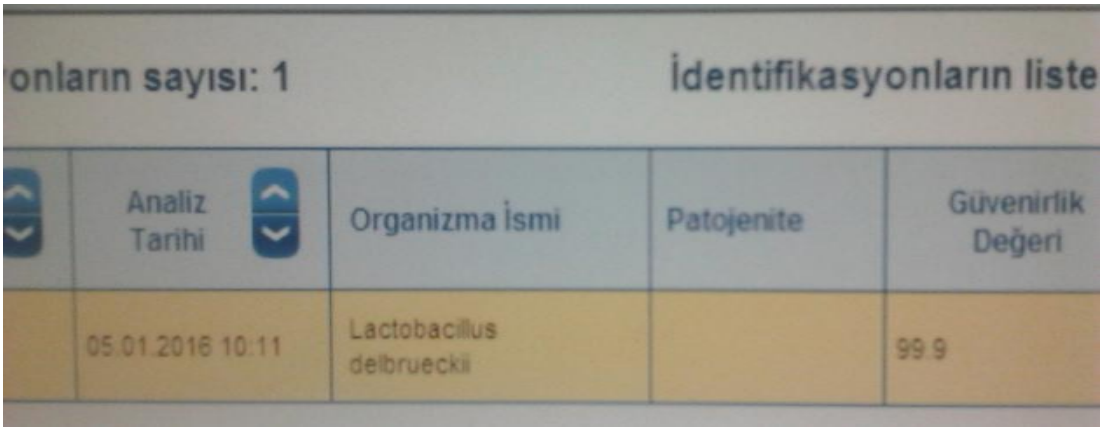
Tablo 5: MALDI-TOF MS ile tanımlanan probiyotik bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları (devamı)

15	1c-1.1.2	*E. gallinarum*	Gram (+) kokobasil	-	+	-	-	37 ° C aerob	Ev peynir suyu
16	1e 3	*B. megaterium*	Gram (+) basil	+	+	-	-	37 ° C aerob	Ev turşu suyu
17	3d-1	*L.pseudomesenteroides*	Gram (+) kok	-	-	-	-	37 ° C aerob	T.1 firması ticari ürün
18	1a-2.1	*L. kefiri 2*	Gram (+) basil	-	+	-	-	37 ° C aerob	Ev kefiri
19	2b-6	*L. rhamnosus*	Gram (+) basil	-	+	-	-	37 ° C aerob	P.2 firması preparat
20	2b-3	*E. faecium*	Gram (+)kokobasil	-	-	-	-	37 ° C aerob	P.2 firması preparat
21	1d-3	*L. paraplantarum*	Gram (+) basil	-	-	-	-	37 ° C aerob	Ev peynir suyu
22	3b	*L.pseudomesenteroides*	Gram (+) kokobasil	-	-	-	-	37 ° C aerob	T.4 firması sade kefir
23	3c-2	*L. lactis ssp. lactis*	Gram(+) kok	-	+	-	-	37 ° C aerob	T.6 firması meyveli kefir
24	3e-1	*L. lactis ssp. lactis*	Gram(+) kok	-	+	-	-	37 ° C aerob	T.7 firması meyveli yoğurt
25	2e-M	*S. salivarius ssp. thermophilus*	Gram (+) kokobasil	-	-	-	-	39 ºC mikroaerofilik	P.4 firması preparat
26	2b-M	*E. faecium*	Gram (+)kokobasil	-	-	-	-	39 ºC mikroaerofilik	P.2 firması preparat
27	2a-2M	*E. faecium*	Gram (+)kokobasil	-	-	-	-	39 ºC mikroaerofilik	P.3 firması preparat

6.2.6. İzole edilen mikroorganizmaların MALDI-TOF MS ile tanımlanması

İzole edilen 77 izolat MRS agara pasaj yapılarak 24 saatlik kültürler MALDI-TOF MS da tanımlanmıştır. MALDI-TOF sonucu güvenirlik değeri % 90 ve üzeri olan 15 adet farklı olmak üzere toplamda 27 adet tek tür tanımlanmıştır (Tablo 6). Bunlardan 2 adeti *Lactobacillus kefiri,* 2 adeti *Lactobacillus rhamnosus,* 1 adeti *Lactobacillus helveticus,* 2 adeti *Lactobacillus paraplantarum* , 2 adeti *Lactobacillus plantarum,* 1 adeti *Lactobacillus delbruecki,* 1 adeti *Bifidobacterium spp* , 1 adeti *Lactobacillus curvatus,* 4 adeti *Leuconostoc pseudomesenteroides,* 1 adeti *Bacillus pumilus,* 1 adeti *Enterococcus gallinarum,* 1 adeti *Bacillus megaterium,* 3 adeti *Lactococcus lactis ssp. lactis,* 1 adeti *Streptococcus salivarus ssp. thermophilus,* 4 adeti *Enterococcus faecium 'tir.*





Resim 8: MALDI-TOF MS sonuç görünümü

Tablo 6: MALDI-TOF MS ile tanımlanan tür sonuçları

	İzolat kodu	İzole edilen kaynak	MALDI-TOF MS ile tanımlanan tür	Güvenirlik değeri
1	1a- A1	Ev kefiri 1	*Lactobacillus kefiri 1*	99,9
2	2f-2A	P.1 firması preparat	*Lactobacillus rhamnosus*	99,9
3	3a-A	T.2 firması ticari ürün	*Lactobacillus helveticus*	99,1
4	1d-3A	Ev peynir suyu	*Lactobacillus paraplantarum*	99,9
5	1c-2.2.A	Ev peynir suyu	*Lactobacillus plantarum*	99,9
6	1d-3A	Ev peynir suyu	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	99,9
7	3d-4A	P.5 firması ticari ürün	*Lactococcus lactis ssp.lactis*	99,9
8	2b-1A	P.2 firması preparat	*Enterococcus faecium*	99,9
9	2a-2A	P.3 firması preparat	*Lactobacillus plantarum*	99,9
10	1b-2A	Ev yoğurdu	*Lactobacillus delbruecki*	99,9
11	3b-1A	T.4 firması sade kefir	*Bifidobacterium spp*	92,1
12	1d-2A	Ev peynir suyu	*Lactobacillus curvatus*	99,9
13	3a-1	T.2 firması ticari ürün	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	99,9
14	1e-2	Ev turşu suyu	*Bacillus pumilus*	99,9
15	1c-1.1.2	Ev peynir suyu	*Enterococcus gallinarum*	98,4
16	1e 3	Ev turşu suyu	*Bacillus megaterium*	99,9
17	3d-1	T.1 firması ticari ürün	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	99,9
18	1a-2.1	Ev kefiri 2	*Lactobacillus kefiri 2*	99,9
19	2b-6	P.2 firması preparat	*Lactobacillus rhamnosus*	99,9
20	2b-3	P.2 firması preparat	*Enterococcus faecium*	99,9
21	1d-3	Ev peynir suyu	*Lactobacillus paraplantarum*	99,9
22	3b	T.4 firması sade kefir	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	97,9
23	3c-2	T.6 firması meyveli kefir	*Lactococcus lactis ssp. lactis*	99,9
24	3e-1	T.7 firması meyveli yoğurt	*Lactococcus lactis ssp. lactis*	99,9
25	2e-M	P.4 firması preparat	*Streptococcus salivarus ssp. thermophilus*	99,9
26	2b-M	P.2 firması preparat	*Enterococcus faecium*	99,9
27	2a-2M	P.3 firması preparat	*Enterococcus faecium*	99,9

6.3. İzolatların Probiyotik Özelliklerinin Tespit edilmesi

6.3.1. Probiyotik bakterilerin farklı pH değerlerinde gelişiminin tespit edilmesi

MALDI TOF MS ile tanımlanan 27 adet probiyotik bakterinin farklı pH değerlerinde (pH 1,5, pH 2, pH 3,2) gelişimleri incelenmiş olup MRS agar yüzeyi üzerine nokta ekim ile canlılıkları kontrol edilmiştir (Tablo 7, Tablo 8).

Tablo 7: Probiyotik bakterilerin farklı pH değerlerinde (pH 1,5, pH 2, pH 3,2) canlılık kontrolü

	İzolat kodu	**Bakteriler**	**pH 1.5**	**pH 2**	**pH 3.2**
			24.48.72. saat	24.48.72. Saat	24.48.72. saat
1	1a- A1	*Lactobacillus kefiri 1*	- - -	- - -	+ + +
2	2f-2A	*Lactobacillus rhamnosus*	- - -	- - -	+ + +
3	3a-A	*Lactobacillus helveticus*	- - -	- - -	- - -
4	1d-3A	*Lactobacillus paraplantarum*	- - -	- - -	- - -
5	1c-2.2.A	*Lactobacillus plantarum*	- - -	- - -	+ + +
6	1d-3A	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	- - -	- - -	- - -
7	3d-4A	*Lactococcus lactis ssp.lactis*	- - -	- - -	- - -
8	2b-1A	*Enterococcus faecium*	- - -	- - -	- - -
9	2a-2A	*Lactobacillus plantarum*	- - -	- - -	+ + +
10	1b-2A	*Lactobacillus delbrueckii*	- - -	- - -	- - -
11	3b-1A	*Bifidobacterium spp*	- - -	- - -	+ + +
12	1d-2A	*Lactobacillus curvatus*	- - -	- - -	- - -
13	3a-1	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	- - -	- - -	- - -
14	1e-2	*Bacillus pumilus*	- - -	- - -	- - -
15	1c-1.1.2	*Enterococcus gallinarum*	- - -	- - -	+ + +
16	1e 3	*Bacillus megaterium*	- - -	- - -	+ + +
17	3d-1	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	- - -	- - -	- - -
18	1a-2.1	*Lactobacillus kefiri 2*	- - -	- - -	+ + +
19	2b-6	*Lactobacillus rhamnosus*	- - -	- - -	+ + +
20	2b-3	*Enterococcus faecium*	- - -	- - -	- - -
21	1d-3	*Lactobacillus paraplantarum*	- - -	- - -	- - -
22	3b	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	- - -	- - -	- - -
23	3c-2	*Lactococcus lactis ssp. lactis*	- - -	- - -	- - -
24	3e-1	*Lactococcus lactis ssp. lactis*	- - -	- - -	- - -
25	2e-M	*Streptococcus salivarus ssp. thermophilus*	- - -	- - -	- - -
26	2b-M	*Enterococcus faecium*	- - -	- - -	- - -
27	2a-2M	*Enterococcus faecium*	- - -	- - -	+ + +

(+): üreme var (-): üreme yok

Tablo 8: Probiyotik bakterilerin farklı pH değerlerinde (pH 1,5, pH 2, pH 3,2) canlılık gelişimi

	Bakteriler İzolat kodu	saat	pH 1,5 OD_2	pH 1,5 % inhibisyon	pH 2 OD_2	pH 2 % inhibisyon	pH 3,2 OD_2	pH 3,2 % inhibisyon	OD_1 Kontrol
1	*Lactobacillus kefiri 1* 1a- A1	0.	0,078±0,001		0,073±0,003		0,068±0,002		0,108
		24.	0,078±0,003	92,221	0,073±0,001	92,751	0,072±0,003	92,850	1,007
		48.	0,084±0,004	91,683	0,074±0,002	92,640	0,075±0,007	92,607	1,010
		72.	0,085±0,002	90,155	0,075±0,001	91,240	0,064±0,001	92,597	0,860
2	*Lactobacillus rhamnosus* 2f -2A	0.	0,081±0,003		0,077±0,001		0,075±0,001		0,111
		24.	0,088±0,008	93,641	0,076±0,002	94,552	0,068±0,001	95,104	1,389
		48.	0,081±0,003	93,581	0,072±0,002	94,317	0,075±0,006	94,081	1,267
		72.	0,083±0,008	92,050	0,073±0,001	93,040	0,067±0,002	93,614	1,044
3	*Lactobacillus helveticus* 3a-A	0.	0,082±0,002		0,076±0,003		0,073±0,005		0,110
		24.	0,080±0,001	83,263	0,064±0,008	86,625	0,072±0,006	84,804	0,476
		48.	0,078±0,003	93,282	0,067±0,002	94,200	0,073±0,005	93,741	1,161
		72.	0,086±0,000	90,995	0,076±0,004	92,077	0,069±0,001	92,740	0,955
4	*Lactobacillus paraplantarum* 1d-3A	0.	0,077±0,001		0,073±0,005		0,071±0,001		0,103
		24.	0,081±0,003	-4,762	0,075±0,001	3,030	0,071±0,001	8,225	0,077
		48.	0,079±0,001	25,786	0,074±0,002	29,874	0,070±0,002	33,962	0,106
		72.	0,082±0,001	91,799	0,075±0,000	92,530	0,068±0,001	93,227	1,004
5	*Lactobacillus plantarum* 1c-2.2 A	0.	0,081±0,005		0,077±0,001		0,070±0,002		0,110
		24.	0,082±0,002	93,720	0,076±0,002	94,228	0,073±0,001	94,406	1,311
		48.	0,078±0,005	94,360	0,074±0,002	94,649	0,066±0,001	95,252	1,383
		72.	0,083±0,001	93,355	0,074±0,001	94,078	0,073±0,002	94,132	1,244

Tablo 8: Probiyotik bakterilerin farklı pH değerlerinde (pH 1,5, pH 2, pH 3,2) canlılık gelişimi (devamı)

6	*Leuconostoc pseudomesenteroides* 1d-3A	0.	0,079±0,002		0,073±0,002		0,073±0,003		0,112
		24.	0,082±0,003	82,917	0,078±0,001	83,750	0,072±0,001	85,069	0,480
		48.	0,078±0,003	91,781	0,077±0,004	91,921	0,069±0,003	92,694	0,949
		72.	0,082±0,002	86,366	0,073±0,003	87,869	0,065±0,004	89,204	0,599
7	*Lactococcus lactis ssp.lactis* 3d-4A	0.	0,071±0,003		0,075±0,003		0,076±0,002		0,107
		24.	0,066±0,003	77,815	0,070±0,014	76,464	0,076±0,001	74,212	0,296
		48.	0,073±0,003	85,602	0,071±0,003	85,996	0,078±0,007	84,615	0,507
		72.	0,082±0,002	85,003	0,071±0,001	87,007	0,071±0,002	87,067	0,549
8	*Enterococcus faecium* 2b-1 A	0.	0,078±0,001		0,063±0,004		0,058±0,001		0,087
		24.	0,082±0,002	92,322	0,080±0,007	92,509	0,072±0,002	93,227	1,068
		48.	0,081±0,003	91,580	0,074±0,001	92,276	0,072±0,003	92,484	0,958
		72.	0,079±0,004	91,948	0,073±0,002	92,528	0,067±0,001	93,108	0,977
9	*Lactobacillus plantarum* 2a-A2	0.	0,068±0,006		0,063±0,001		0,075±0,002		0,111
		24.	0,086±0,009	94,289	0,078±0,004	94,800	0,076±0,006	94,933	1,500
		48.	0,086±0,002	94,491	0,081±0,006	94,832	0,075±0,002	95,174	1,561
		72.	0,081±0,002	95,045	0,073±0,002	95,536	0,072±0,002	95,577	1,628
10	*Lactobacillus delbrueckii* 1b-A2	0.	0,065±0,001		0,067±0,002		0,077±0,004		0,080
		24.	0,081±0,002	92,559	0,077±0,003	92,925	0,080±0,006	92,711	1,093
		48.	0,081±0,006	66,938	0,076±0,002	69,241	0,073±0,002	70,190	0,246
		72.	0,082±0,002	80,523	0,076±0,001	82,027	0,071±0,002	83,135	0,421
11	*Bifidoacterium spp* 3b-1A	0.	0,078±0,002		0,072±0,004		0,073±0,001		0,108
		24.	0,084±0,001	92,513	0,078±0,001	93,078	0,074±0,003	93,434	1,122
		48.	0,087±0,001	94,351	0,069±0,003	95,515	0,063±0,001	95,903	1,546
		72.	0,077±0,001	95,002	0,067±0,006	95,654	0,074±0,004	95,176	1,534

Tablo 8: Probiyotik bakterilerin farklı pH değerlerinde (pH 1,5, pH 2, pH 3,2) canlılık gelişimi (devamı)

		0.	0,077±0,002		0,072±0,001		0,076±0,001		0,116
12	*Lactobacillus curvatus*	24.	0,070±0,002	93,269	0,076±0,004	92,689	0,072±0,001	93,011	1,035
	1d-A2	48.	0,074±0,001	48,122	0,073±0,001	48,357	0,070±0,001	50,469	0,142
		72.	0,084±0,001	84,994	0,079±0,002	86,002	0,076±0,004	86,536	0,562
		0.	0,072±0,004		0,07±0,002		0,076±0,003		0,100
13	*Leuconostoc*	24.	0,071±0,009	93,914	0,076±0,001	93,544	0,072±0,010	93,857	1,172
	pseudomesenteroides	48.	0,089±0,007	91,871	0,077±0,006	92,994	0,075±0,006	93,176	1,099
	3a -1	72.	0,086±0,003	91,739	0,083±0,007	92,028	0,068±0,001	93,410	1,037
		0.	0,077±0,003		0,073±0,004		0,074±0,001		0,108
14	*Bacillus pumilus*	24.	0,078±0,002	93,339	0,073±0,001	93,766	0,070±0,005	94,051	1,171
	1e-2	48.	0,093±0,007	91,756	0,079±0,004	93,001	0,069±0,005	93,832	1,124
		72.	0,084±0,002	92,122	0,076±0,002	92,812	0,068±0,004	93,566	1,062
		0.	0,076±0,002		0,072±0,002		0,068±0,002		0,08
15	*Enterococcus gallinarum*	24.	0,076±0,002	79,859	0,074±0,001	80,475	0,071±0,002	81,179	0,379
	1c-1.1.2	48.	0,086±0,011	94,437	0,076±0,006	95,106	0,060±0,003	96,141	1,546
		72.	0,085±0,003	94,562	0,080±0,004	94,903	0,070±0,003	95,500	1,563
		0.	0,070±0,008		0,069±0,004		0,073±0,002		0,105
16	*Bacillus megaterium*	24.	0,080±0,001	65,072	0,069±0,001	70,145	0,064±0,001	72,029	0,230
	1e-3	48.	0,082±0,009	43,991	0,072±0,004	51,247	0,067±0,001	54,649	0,147
		72.	0,085±0,002	40,376	0,077±0,001	45,540	0,061±0,006	57,277	0,142
		0.	0,073±0,001		0,062±0,002		0,076±0,008		0,111
17	*Leuconostoc*	24.	0,077±0,004	87,473	0,073±0,002	88,072	0,068±0,001	88,834	0,612
	pseudomesenteroides	48.	0,082±0,004	86,434	0,073±0,002	87,818	0,063±0,002	89,480	0,602
	3d 1	72.	0,083±0,002	81,357	0,073±0,002	83,669	0,066±0,002	85,235	0,447
		0.	0,074±0,001		0,068±0,001		0,071±0,004		0,111
18	*Lactobacillus kefiri 2*	24.	0,078±0,001	71,306	0,072±0,001	73,626	0,062±0,002	77,411	0,273
	1a-2.1	48.	0,086±0,008	88,580	0,072±0,003	90,432	0,069±0,004	90,873	0,756
		72.	0,071±0,004	84,855	0,073±0,001	84,572	0,062±0,002	86,766	0,471

Tablo 8: Probiyotik bakterilerin farklı pH değerlerinde (pH 1,5, pH 2, pH 3,2) canlılık gelişimi (devamı)

		0.	0,073±0,002		0,066±0,003		0,063±0,003		0,106
19	*Lactobacillus rhamnosus* 2b-6	24.	0,079±0,004	94,828	0,074±0,003	95,157	0,071±0,002	95,354	1,521
		48.	0,083±0,004	94,935	0,068±0,003	95,833	0,071±0,003	95,629	1,632
		72.	0,085±0,004	94,378	0,070±0,003	95,370	0,073±0,002	95,194	1,512
		0.	0,092±0,002		0,065±0,001		0,068±0,001		0,108
20	*Enterococcus faecium* 2b-3	24.	0,085±0,002	92,835	0,080±0,001	93,311	0,070±0,001	94,151	1,191
		48.	0,089±0,004	91,886	0,080±0,003	92,704	0,072±0,002	93,491	1,101
		72.	0,089±0,002	91,682	0,078±0,007	92,683	0,066±0,002	93,840	1,066
		0.	0,068±0,002		0,071±0,001		0,068±0,005		0,099
21	*Lactobacillus paraplantarum* 1d-3	24.	0,082±0,001	75,811	0,076±0,001	77,679	0,064±0,002	81,023	0,339
		48.	0,084±0,003	89,091	0,075±0,005	90,303	0,065±0,002	91,558	0,77
		72.	0,080±0,006	95,701	0,061±0,002	96,690	0,070±0,003	96,222	1,853
		0.	0,063±0,003		0,075±0,001		0,073±0,001		0,113
22	*Leuconostoc pseudomesenteroides* 3b	24.	0,085±0,002	27,011	0,076±0,001	34,770	0,067±0,006	42,529	0,116
		48.	0,086±0,003	25,507	0,076±0,003	33,623	0,074±0,003	35,652	0,115
		72.	0,086±0,003	22,523	0,069±0,005	38,138	0,072±0,003	35,135	0,111
		0.	0,076±0,003		0,067±0,005		0,068±0,001		0,112
23	*Lactococcus lactis ssp.lactis* 3c-2	24.	0,083±0,003	27,826	0,074±0,002	35,942	0,070±0,001	38,841	0,115
		48.	0,084±0,002	92,364	0,076±0,001	93,091	0,061±0,007	94,424	1,1
		72.	0,079±0,008	55,556	0,075±0,004	57,815	0,070±0,002	60,452	0,177
		0.	0,075±0,001		0,061±0,001		0,067±0,001		0,105
24	*Lactococcus lactis ssp. lactis* 3e-1	24.	0,081±0,001	27,027	0,073±0,002	34,234	0,068±0,001	39,039	0,111
		48.	0,084±0,002	92,442	0,076±0,000	93,135	0,067±0,000	93,948	1,107
		72.	0,084±0,007	23,636	0,072±0,002	34,848	0,059±0,002	46,667	0,11

Tablo 8: Probiyotik bakterilerin farklı pH değerlerinde (pH 1,5, pH 2, pH 3,2) canlılık gelişimi (devamı)

		0.	0,080±0,001		0,071±0,003		0,069±0,002		0,109
		24.	0,083±0,001	67,192	0,068±0,005	73,228	0,072±0,003	71,522	0,254
25	*Streptococcus salivarus ssp. thermophilus* 2e M	48.	0,088±0,003	91,388	0,079±0,001	92,272	0,073±0,002	92,862	1,018
		72.	0,092±0,002	90,698	0,082±0,001	91,743	0,071±0,003	92,821	0,989
		0.	0,078±0,002		0,061±0,001		0,064±0,002		0.108
26	*Enterococcus faecium 2b-M*	24.	0,086±0,001	87,972	0,077±0,001	89,277	0,068±0,002	90,536	0,715
		48.	0,088±0,002	91,911	0,070±0,006	93,590	0,072±0,002	93,437	1,092
		72.	0,090±0,002	91,405	0,081±0,002	92,325	0,074±0,002	92,991	1,051
		0.	0,080±0,003		0,072±0,002		0,073±0,001		0,108
27	*Enterococcus faecium 2a-2M*	24.	0,085±0,002	94,050	0,079±0,001	94,425	0,073±0,010	94,847	1,423
		48.	0,087±0,002	94,437	0,080±0,002	94,883	0,074±0,003	95,308	1,57
		72.	0,091±0,003	94,116	0,081±0,003	94,744	0,075±0,010	95,133	1,541

Ürün ve preparatlardan izole edilen bakterilerin pH 1,5, pH 2 ve pH 3,2 olan besiyeri ortamlarında kontrole göre yoğunluklarının düşük ve yüzde inhibisyonunun yüksek olduğu ayrıca pH 3,2 olan ortam dışındaki ortamlarda bakterilerin canlı kalamadığı saptanmıştır. pH 3,2 olan ortamda hücre yoğunluklarının 0. saate göre büyük bir artış göstermediği görülmüştür fakat nokta ekim sonucunda *L.kefiri 1* (1a-1A), *L.rhamnosus* (2f-2A), *L.plantarum* (1c-2.2.A), *L.plantarum* (2a-2A), *Bifidobacterium* spp.(3b-1A), *E.gallinarum* (1c-1.1.2), *B.megaterium* (1e-3), *L.kefiri 2* (1a-2.1), *L.rhamnosus* (2b-6), *E.faecium* (2a-2M) suşlarının canlı kaldığı saptanmıştır. Bu durum probiyotik bakteri seçiminde temel kriter olarak alınmıştır (Tablo 7, Tablo 8).

6.3.2.Probiyotik bakterilerin farklı safra tuz konsantrasyonlarında gelişiminin tespit edilmesi

MALDI TOF MS ile tanımlanan 27 adet probiyotik bakterinin farklı safra tuz konsantrasyonlarında (% 0,15, % 0,30, % 1) gelişimleri incelenmiş olup nokta ekim ile canlılıkları kontrol edilmiştir (Tablo 9, Tablo 10).

Tablo 9: Probiyotik bakterilerin farklı safra tuz konsatrasyonlarında (% 1, % 0,30, % 0,15) canlılık kontrolü

	İzolat kodu	**Bakteriler**	**Tuz %0,15** 24.48.72. saat	**Tuz % 0,30** 24.48.72. Saat	**Tuz % 1** 24.48.72. saat
1	1a-1A	*Lactobacillus kefiri 1*	+ + +	+ + +	- - -
2	2f-2A	*Lactobacillus rhamnosus*	+ + +	+ + +	+ + +
3	3a-A	*Lactobacillus helveticus*	+ + +	+ + +	+ + +
4	1d-3A	*Lactobacillus paraplantarum*	+ + +	+ + +	+ + +
5	1c-2.2.A	*Lactobacillus plantarum*	+ + +	+ + +	+ + +
6	1d-3A	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	+ + +	+ + +	+ + +
7	3d-4A	*Lactococcus lactis ssp.lactis*	+ + +	+ + +	+ + +
8	2b-1A	*Enterococcus faecium*	+ + +	+ + +	+ + +
9	2a-2A	*Lactobacillus plantarum*	+ + +	+ + +	+ + +
10	1b-2A	*Lactobacillus delbrueckii*	- - -	- - -	- - -
11	3b-1A	*Bifidobacterium spp*	+ + +	+ + +	- - -
12	1d-2A	*Lactobacillus curvatus*	+ + +	- - -	- - -
13	3a-1	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	+ + +	+ + +	- - -
14	1e-2	*Bacillus pumilus*	+ - -	+ - -	- - -
15	1c-1.1.2	*Enterococcus gallinarum*	+ + -	+ - -	- - -
16	1e 3	*Bacillus megaterium*	- - -	- - -	- - -
17	3d-1	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	- - -	- - -	- - -
18	1a-2.1	*Lactobacillus kefiri 2*	+ + +	+ - -	- - -
19	2b-6	*Lactobacillus rhamnosus*	+ + +	+ + +	- - -
20	2b-3	*Enterococcus faecium*	+ + -	+ + -	- - -
21	1d-3	*Lactobacillus paraplantarum*	- - -	- - -	- - -
22	3b	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	- - -	- - -	- - -
23	3c-2	*Lactococcus lactis ssp. lactis*	- - -	- - -	- - -
24	3e-1	*Lactococcus lactis ssp. lactis*	- - -	- - -	- - -
25	2e-M	*Streptococcus salivarus ssp. thermophilus*	- - -	- - -	- - -
26	2b-M	*Enterococcus faecium*	+ + +	+ + +	- - -
27	2a-2M	*Enterococcus faecium*	+ + +	+ + +	- - -

(+): üreme var (-): üreme yok

Tablo 10: Probiyotik bakterilerin farklı safra tuz konsatrasyonlarında (% 1, % 0,30, % 0,15) gelişimi

	Bakteriler / İzolat kodu	saat	Tuz % 1		Tuz % 0,30		Tuz % 0,15		OD_1 Kontrol
			OD_2	% inhibisyon	OD_2	% inhibisyon	OD_2	% inhibisyon	
1	*Lactobacillus kefiri 1* 1a- A1	0.	0,724± 0,032		0,183±0,071		0,118±0,042		0,126
		24.	0,686±0,117	21,651	0,937±0,067	-7,002	1,298±0,053	-48,135	0,876
		48.	0,477±0,018	43,389	0,786±0,050	6,690	1,275±0,048	-51,465	0,842
		72.	0,446±0,032	50,481	0,615±0,034	31,630	1,227±0,024	-36,333	0,900
2	*Lactobacillus rhamnosus* 2f -2A	0.	0,321±0,021		0,141±0,020		0,117±0,022		0,126
		24.	0,891±0,069	36,922	1,284±0,027	9,065	1,363±0,046	3,494	1,412
		48.	0,732±0,097	51,320	1,272±0,019	15,369	1,288±0,033	14,327	1,503
		72.	0,621±0,139	60,188	0,812±0,309	47,915	1,261±0,024	19,093	1,559
3	*Lactobacillus helveticus* 3a-A	0.	0,171±0,012		0,299±0,024		0,117±0,021		0,126
		24.	0,831±0,013	-439,610	0,871±0,047	-465,801	1,350±0,086	-776,623	0,154
		48.	0,850±0,110	23,873	0,885±0,031	20,770	1,267±0,019	-13,399	1,117
		72.	0,912±0,087	16,895	0,852±0,071	22,334	1,254±0,020	-14,342	1,097
4	*Lactobacillus paraplantarum* 1d-3A	0.	0,769±0,010		0,179±0,012		0,119±0,016		0,125
		24.	0,832±0,034	14,227	0,984±0,038	-1,443	1,214±0,027	-25,120	0,970
		48.	0,799±0,097	38,795	0,963±0,184	26,263	1,171±0,026	10,337	1,306
		72.	0,568±0,074	52,588	0,757±0,172	36,784	1,174±0,016	1,976	1,198
5	*Lactobacillus plantarum* 1c-2.2 A	0.	0,514±0,071		0,327±0,074		0,119±0,057		0,126
		24.	0,680±0,042	48,314	1,102±0,016	16,172	1,364±0,022	-3,701	1,315
		48.	0,871±0,095	40,892	1,222±0,038	17,017	1,298±0,040	11,903	1,473
		72.	0,843±0,042	39,613	0,986±0,109	29,394	1,264±0,035	9,456	1,396

Tablo 10: Probiyotik bakterilerin farklı safra tuz konsatrasyonlarında (% 1, % 0,30, % 0,15) gelişimi (devamı)

		0.	0,175±0,025		0,217±0,026		0,118±0,016		0,124
6	*Leuconostoc pseudomesenteroides* 1d-3A	24.	0,978±0,021	-19,959	1,045±0,020	-28,262	1,420±0,033	-74,233	0,815
		48.	1,091±0,022	-11,066	1,068±0,032	-8,792	1,310±0,008	-33,401	0,982
		72.	0,845±0,075	3,058	0,950±0,096	-8,907	1,272±0,021	-45,910	0,872
		0.	0,401±0,019		0,172±0,022		0,116±0,010		0,144
7	*Lactococcus lactis ssp.lactis* 3d-4A	24.	1,044±0,024	-55,771	1,068±0,012	-59,403	1,385±0,003	-106,667	0,670
		48.	0,834±0,064	-23,788	0,995±0,045	-47,626	1,325±0,023	-96,538	0,674
		72.	0,572±0,208	16,448	0,839±0,218	-22,482	1,284±0,013	-87,494	0,685
		0.	0,576±0,003		0,163±0,029		0,114±0,004		0,132
8	*Enterococcus faecium* 2b-1 A	24.	1,229±0,024	-5,556	1,073±0,097	7,789	1,263±0,013	-8,477	1,164
		48.	0,953±0,080	9,465	1,106±0,056	-5,033	1,218±0,022	-15,638	1,053
		72.	0,949±0,125	8,630	0,892±0,070	14,116	1,209±0,002	-16,362	1,039
		0.	0,447±0,009		0,129±0,016		0,122±0,022		0,119
9	*Lactobacillus plantarum* 2a-A2	24.	0,929±0,010	36,846	1,134±0,006	22,887	0,914±0,203	37,888	1,471
		48.	1,084±0,071	29,221	0,940±0,037	38,664	1,177±0,076	23,194	1,532
		72.	0,937±0,074	43,370	0,803±0,099	51,431	1,180±0,057	28,638	1,654
		0.	0,401±0,003		0,140±0,011		0,115±0,031		0,124
10	*Lactobacillus delbrueckii* 1b-A2	24.	0,777±0,072	34,789	1,101±0,013	7,529	1,058±0,052	11,167	1,191
		48.	0,487±0,091	53,186	0,958±0,121	7,973	1,109±0,072	-6,532	1,041
		72.	0,545±0,052	50,915	0,669±0,004	39,784	1,131±0,052	-1,770	1,111
		0.	0,227±0,004		0,134±0,009		0,121±0,002		0,123
11	*Bifidoacterium spp* 3b-1A	24.	0,768±0,012	-224,051	1,129±0,009	-376,371	1,300±0,018	-448,523	0,237
		48.	0,820±0,025	-27,183	1,098±0,017	-70,181	1,275±0,033	-97,726	0,645
		72.	0,809±0,035	-7,867	0,767±0,121	-2,311	1,259±0,055	-67,822	0,750

Tablo 10: Probiyotik bakterilerin farklı safra tuz konsatrasyonlarında (% 1, % 0,30, % 0,15) gelişimi (devamı)

		0.	0,347±0,061		0,185±0,018		0,347±0,024		0,121
12	*Lactobacillus curvatus*	24.	0,691±0,075	-11,452	0,940±0,037	-51,613	1,281±0,013	-106,559	0,620
	1d-A2	48.	0,654±0,047	38,993	0,936±0,042	12,718	1,220±0,026	-13,806	1,072
		72.	0,887±0,376	15,475	0,786±0,041	25,103	1,174±0,054	-11,948	1,049
		0.	0,542±0,007		0,195±0,010		0,116±0,017		0,123
13	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	24.	0,272±0,037	71,333	0,642±0,028	32,386	0,842±0,067	11,404	0,950
	3a -1	48.	1,060±0,130	6,743	0,891±0,026	21,665	0,879±0,040	22,691	1,137
		72.	0,929±0,024	13,711	0,862±0,023	19,963	0,900±0,077	16,465	1,077
		0.	0,424±0,023		0,392±0,014		0,117±0,034		0,122
14	*Bacillus pumilus*	24.	0,258±0,022	75,040	0,547±0,018	47,182	0,762±0,045	26,345	1,035
	1e-2	48.	0,519±0,075	2,747	0,554±0,043	-3,683	0,833±0,019	-55,930	0,534
		72.	0,895±0,042	-77,162	0,481±0,016	4,818	0,764±0,112	-51,221	0,505
		0.	0,283±0,028		0,249±0,033		0,116±0,031		0,122
15	*Enterococcus gallinarum*	24.	0,839±0,204	-33,652	0,520±0,049	17,144	0,508±0,032	19,108	0,628
	1c-1.1.2	48.	1,188±0,095	25,631	0,540±0,050	66,166	0,410±0,248	74,306	1,597
		72.	1,215±0,099	25,869	0,564±0,027	65,589	0,444±0,237	72,890	1,639
		0.	0,495±0,005		0,254±0,007		0,117±0,008		0,121
16	*Bacillus megaterium*	24.	0,265±0,083	4,898	0,476±0,037	-70,490	0,839±0,129	-200,597	0,279
	1e-3	48.	0,774±0,131	-139,732	0,515±0,028	-59,546	0,851±0,016	-163,571	0,323
		72.	0,573±0,047	44,989	0,516±0,073	50,400	0,786±0,101	24,528	1,041
		0.	0,227±0,007		0,135±0,008		0,116±0,014		0,123
17	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	24.	0,532±0,057	-41,867	0,543±0,028	-44,711	0,758±0,086	-102,044	0,375
	3d 1	48.	0,556±0,086	41,012	0,579±0,035	38,500	0,705±0,115	25,159	0,942
		72.	0,816±0,038	-99,918	0,556±0,035	-36,356	0,844±0,039	-106,863	0,408

Tablo 10: Probiyotik bakterilerin farklı safra tuz konsatrasyonlarında (% 1, % 0,30, % 0,15) gelişimi (devamı)

		0.	0,320±0,045		0,293±0,038		0,120±0,026		0,129
18	*Lactobacillus kefiri 2*	24.	0,702±0,447	-85,802	0,577±0,011	-52,734	0,779±0,135	-106,173	0,378
	1a-2.1	48.	0,894±0,036	22,693	0,605±0,042	47,693	0,609±0,048	47,290	1,156
		72.	0,819±0,070	21,206	0,613±0,050	41,001	0,800±0,110	23,035	1,039
		0.	0,445±0,008		0,213±0,021		0,117±0,008		0,126
19	*Lactobacillus rhamnosus*	24.	0,412±0,109	73,712	0,593±0,025	62,154	0,814±0,042	48,020	1,566
	2b-6	48.	0,650±0,049	58,541	0,599±0,036	61,795	0,575±0,035	63,284	1,567
		72.	1,160±0,178	25,784	0,657±0,016	57,944	0,736±0,184	52,890	1,563
		0.	0,261±0,008		0,205±0,022		0,115±0,014		0,128
20	*Enterococcus faecium*	24.	0,497±0,117	52,317	0,586±0,025	43,784	0,770±0,084	26,206	1,043
	2b-3	48.	0,725±0,086	36,707	0,671±0,038	41,449	0,775±0,017	32,403	1,146
		72.	0,775±0,020	33,074	0,734±0,066	36,644	0,872±0,056	24,669	1,158
		0.	0,532±0,065		0,180±0,023		0,115±0,011		0,115
21	*Lactobacillus paraplantarum*	24.	0,615±0,138	12,565	0,486±0,026	30,868	0,665±0,042	5,358	0,703
	1d-3	48.	0,392±0,067	53,126	0,479±0,028	42,732	0,813±0,024	2,907	0,837
		72.	0,291±0,119	66,667	0,424±0,044	51,487	0,836±0,034	4,348	0,874
		0.	0,209±0,003		0,182±0,022		0,121±0,007		0,124
22	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	24.	0,548±0,043	38,326	0,497±0,050	44,069	0,833±0,004	6,156	0,888
	3b	48.	0,777±0,175	3,076	0,539±0,054	32,751	0,947±0,018	-18,038	0,802
		72.	0,400±0,229	57,447	0,488±0,023	48,050	0,977±0,041	-3,901	0,940
		0.	0,311±0,003		0,164±0,004		0,115±0,003		0,125
23	*Lactococcus lactis ssp.lactis*	24.	0,739±0,078	27,935	0,582±0,014	43,220	0,834±0,045	18,602	1,025
	3c-2	48.	0,945±0,036	-13,993	0,625±0,050	24,608	0,851±0,054	-2,654	0,829
		72.	0,784±0,092	-105,148	0,550±0,025	-43,979	0,965±0,027	-152,618	0,382

Tablo 10: Probiyotik bakterilerin farklı safra tuz konsatrasyonlarında (% 1, % 0,30, % 0,15) gelişimi (devamı)

		0.	0,284±0,070		0,134±0,045		0,117±0,066		0,126
24	*Lactococcus lactis ssp. lactis*	24.	0,662±0,173	-7,522	0,502±0,029	18,561	0,728±0,068	-18,236	0,616
	3e-1	48.	0,678±0,289	8,993	0,484±0,049	35,078	0,983±0,122	-31,902	0,745
		72.	0,670±0,305	12,804	0,482±0,022	37,240	0,965±0,028	-25,694	0,768
		0.	0,197±0,010		0,203±0,020		0,120±0,053		0,125
25	*Streptococcus salivarus ssp.*	24.	0,650±0,034	6,205	0,768±0,028	-10,823	1,225±0,030	-76,768	0,693
	thermophilus	48.	0,736±0,072	-7,132	0,789±0,041	-14,896	1,277±0,020	-85,881	0,687
	2e M	72.	0,568±0,028	17,008	0,708±0,031	-3,558	1,269±0,038	-85,478	0,684
		0.	0,570±0,006		0,184±0,024		0,117±0,026		0,128
26	*Enterococcus faecium*	24.	1,230±0,023	-18,237	0,899±0,049	13,526	1,196±0,026	-15,032	1,040
	2b-M	48.	1,016±0,100	4,182	1,134±0,084	-6,950	1,302±0,051	-22,862	1,060
		72.	1,044±0,077	3,005	1,163±0,025	-8,055	1,309±0,064	-21,685	1,076
		0.	0,624±0,063		0,158±0,068		0,117±0,078		0,124
27	*Enterococcus faecium*	24.	0,989±0,045	35,799	0,959±0,100	37,789	1,078±0,062	30,045	1,541
	2a-2M	48.	1,231±0,079	22,362	0,913±0,068	42,413	1,185±0,086	25,284	1,586
		72.	1,126±0,069	29,998	0,874±0,027	45,681	1,161±0,069	27,823	1,609

Ürün ve preparatlardan izole edilen bakterilerin genel olarak % 1, % 0,30 ve % 0,15 safra tuzu içeren besiyeri ortamında OD_2 değerleri kontrol (OD_1) değerlerine göre düşük olduğu görülmüştür. Bakterilerin üç farklı oranda safra tuzu içeren besiyerindeki gelişimleri incelendiğinde yoğunlukları en yüksek % 0,15 safta tuzu içeren ortamda olduğu saptanmıştır. Ayrıca nokta ekim sonuçlarına göre izole edilen bakterilerin en fazla sayıda canlılıklarını koruduğu ortam % 0,15 safra tuzu içeren ortam olduğu gözlenmiştir. Tuz oranı % 1 olan besiyerinde ise *L.rhamnosus* (2f-2A), *L.helveticus* (3a-A), *L.paraplantarum* (1d-3A), *L.plantarum* (1c-2.2.A), *L.pseudomesenteroides* (1d-3A), *L.lactis ssp.lactis* (3d-4A), *E.faecium* (2b-1A), *L.plantarum* (2a-2A) dışındaki suşların OD değerlerinde 0.saate göre artış olmasına rağmen canlı kalmadığı bulunmuştur. Ayrıca *L.kefiri* (1a-1A), *L.rhamnosus* (2f-2A), *L.helveticus* (3a-A), *L.paraplantarum* (1d-3A), *L.plantarum* (1c-2.2.A), *L.pseudomesenteroides* (1d-3A), *L.lactis ssp.lactis* (3d-4A), *E.faecium* (2b-1A), *L.plantarum* (2a-2A) suşların her üç tuz ortamında canlı kaldığı saptanmıştır (Tablo 9, Tablo 10).

6.3.3. Probiyotik bakterilerin farklı sıcaklıklarda gelişimlerinin tespit edilmesi

MALDI TOF MS ile tanımlanan 27 adet probiyotik bakterinin farklı sıcaklık değerlerinde (4ºC, 22ºC, 45ºC) gelişimleri incelenmiş olup nokta ekim ile canlılıkları kontrol edilmiştir (Tablo 11, Tablo 12).

Tablo 11: Probiyotik bakterilerin farklı sıcaklık değerlerinde (4 ºC, 22 ºC, 44 ºC) canlılık kontrolü

	İzolat kodu	**Bakteriler**	**Sıcaklık 4 ºC**			**Sıcaklık 22 ºC**			**Sıcaklık 45 ºC**		
			24.48.72. Saat			24.48.72. Saat			24.48.72. saat		
1	1a-1A	*Lactobacillus kefiri 1*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2	2f-2A	*Lactobacillus rhamnosus*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
3	3a-A	*Lactobacillus helveticus*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
4	1d-3A	*Lactobacillus paraplantarum*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
5	1c-2.2.A	*Lactobacillus plantarum*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
6	1d-3A	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
7	3d-4A	*Lactococcus lactis ssp.lactis*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	2b-1A	*Enterococcus faecium*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	2a-2A	*Lactobacillus plantarum*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	1b-2A	*Lactobacillus delbrueckii*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	3b-1A	*Bifidobacterium spp*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
12	1d-2A	*Lactobacillus curvatus*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
13	3a-1	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	1e-2	*Bacillus pumilus*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	1c-1.1.2	*Enterococcus gallinarum*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	1e 3	*Bacillus megaterium*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	3d-1	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	1a-2.1	*Lactobacillus kefiri 2*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
19	2b-6	*Lactobacillus rhamnosus*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	2b-3	*Enterococcus faecium*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	1d-3	*Lactobacillus paraplantarum*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
22	3b	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
23	3c-2	*Lactococcus lactis ssp. lactis*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	3e-1	*Lactococcus lactis ssp. lactis*	-	-	-	+	+	+	+	+	+
25	2e-M	*Streptococcus salivarus ssp. thermophilus*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	2b-M	*Enterococcus faecium*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	2a-2M	*Enterococcus faecium*	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+): üreme var (-): üreme yok

Tablo 12: Probiyotik bakterilerin farklı sıcaklık değerlerinde (4 ºC, 22 ºC, 44 ºC) gelişimi

	Bakteriler / İzolat kodu	saat	Sıcaklık 4 ºC		Sıcaklık 22 ºC		Sıcaklık 45 ºC		OD_1 Kontrol
			OD_2	% inhibisyon	OD_2	% inhibisyon	OD_2	% inhibisyon	
		0.	0,112±0,002		0,112±0,002		0,112±0,002		0,112
1	*Lactobacillus kefiri1*	24.	0,109±0,004	89,143	0,106±0,002	89,441	0,109 ±0,012	89,176	1,007
	1a- A1	48.	0,108±0,003	89,307	0,140±0,046	86,106	0,740 ±0,535	26,766	1,010
		72.	0,110±0,003	87,248	0,591±0,284	31,318	1,003 ±0,028	-16,589	0,860
2	*Lactobacillus rhamnosus*	0.	0,109±0,001		0,109±0,001		0,109±0,001		0,109
	2f -2A	24.	0,082±0,003	94,072	0,106±0,003	92,393	1,429 ±0,034	-2,904	1,389
		48.	0,104±0,003	91,818	0,625±0,211	50,697	1,397 ±0,057	-10,287	1,267
		72.	0,108±0,001	89,687	1,173±0,140	-12,356	1,307 ±0,109	-25,223	1,044
3	*Lactobacillus helveticus*	0.	0,112±0,003		0,112±0,003		0,112±0,003		0,112
	3a-A	24.	0,106±0,002	77,801	0,103±0,002	78,291	0,696 ±0,023	-46,289	0,476
		48.	0,108±0,002	90,726	0,253±0,134	78,208	0,848 ±0,042	26,988	1,161
		72.	0,109±0,007	88,621	0,841±0,241	11,902	0,881 ±0,016	7,749	0,955
4	*Lactobacillus paraplantarum*	0.	0,101±0,002		0,101±0,002		0,101±0,002		0,101
	1d-3A	24.	0,100±0,004	-29,437	0,107±0,001	-39,394	0,444 ±0,317	-476,62	0,077
		48.	0,101±0,002	5,031	0,108±0,004	-1,572	0,714 ±0,200	-573,89	0,106
		72.	0,089±0,013	91,135	0,953±0,207	5,080	0,766 ±0,024	23,705	1,004
5	*Lactobacillus plantarum*	0.	0,103±0,001		0,103±0,001		0,103±0,001		0,103
	1c-2.2 A	24.	0,103±0,001	92,143	0,103±0,002	92,118	0,822 ±0,141	37,325	1,311
		48.	0,103±0,002	92,577	0,764±0,150	44,734	1,098 ±0,015	20,631	1,383
		72.	0,081±0,005	93,516	1,401±0,024	-12,621	0,884 ±0,150	28,966	1,244

Tablo 12: Probiyotik bakterilerin farklı sıcaklık değerlerinde (4 ºC, 22 ºC, 44 ºC) gelişimi (devamı)

		0.	0,105±0,002		0,105±0,002		0,105±0,002		0,105
6	*Leuconostoc*	24.	0,104±0,002	78,403	0,104±0,002	78,333	0,556 ±0,116	-15,764	0,480
	pseudomesenteroides	48.	0,103±0,002	89,182	0,118±0,004	87,601	0,680 ±0,086	28,311	0,949
	1d-3A	72.	0,103±0,001	82,860	1,030±0,134	-72,009	0,731 ±0,037	-22,037	0,599
		0.	0,096±0,003		0,096±0,003		0,096±0,003		0,096
7	*Lactococcus lactis ssp.lactis*	24.	0,092±0,003	68,806	0,254±0,040	14,189	0,963 ±0,060	-225,22	0,296
	3d-4A	48.	0,104±0,001	79,421	0,491±0,066	3,156	1,095 ±0,012	-115,91	0,507
		72.	0,067±0,007	87,857	0,492±0,006	10,383	0,993 ±0,041	-80,935	0,549
		0.	0,105±0,003		0,105±0,003		0,105±0,003		0,105
8	*Enterococcus faecium*	24.	0,104±0,007	90,293	0,407±0,050	61,860	0,950 ±0,042	11,017	1,068
	2b-1 A	48.	0,111±0,001	88,448	1,039±0,019	-8,420	1,065 ±0,009	-11,169	0,958
		72.	0,108±0,002	88,980	1,039±0,016	-6,312	0,991 ±0,019	-1,467	0,977
		0.	0,106±0,002		0,106±0,002		0,106±0,002		0,106
9	*Lactobacillus plantarum*	24.	0,104±0,002	93,067	0,113±0,003	92,467	0,624 ±0,176	58,378	1,500
	2a-A2	48.	0,096±0,012	93,829	0,814±0,069	47,833	0,339 ±0,098	78,283	1,561
		72.	0,071±0,009	95,639	1,477±0,054	9,296	0,485 ±0,209	70,188	1,628
		0.	0,105±0,001		0,105±0,001		0,105±0,001		0,105
10	*Lactobacillus delbrueckii*	24.	0,105±0,001	91,212	0,096±0,008	91,968	0,927 ±0,166	22,194	1,191
	1b-A2	48.	0,094±0,004	90,970	0,117±0,010	88,793	1,092 ±0,036	-4,899	1,041
		72.	0,074±0,006	93,369	0,863±0,011	22,322	1,074 ±0,082	3,330	1,111
		0.	0,105±0,004		0,105±0,004		0,105±0,004		0,105
11	*Bifidoacterium spp*	24.	0,091±0,008	91,860	0,114±0,007	89,869	0,596 ±0,199	46,910	1,122
	3b-1A	48.	0,104±0,001	93,295	0,111±0,001	92,820	1,020 ±0,069	34,045	1,546
		72.	0,107±0,002	93,003	0,923±0,063	39,809	0,952 ±0,060	37,918	1,534

Tablo 12: Probiyotik bakterilerin farklı sıcaklık değerlerinde (4 ºC, 22 ºC, 44 ºC) gelişimi (devamı)

		0.	0,110±0,002		0,110±0,002		0,110±0,002		0,110
12	*Lactobacillus curvatus*	24.	0,102±0,002	90,145	0,110±0,003	89,404	0,670 ±0,511	35,233	1,035
	1d-A2	48.	0,107±0,002	24,648	0,497±0,292	-250,235	1,076 ±0,017	-657,51	0,142
		72.	0,093±0,003	83,511	1,055±0,385	-87,722	0,843 ±0,320	-50,059	0,562
13		0.	0,107±0,002		0,107±0,002		0,107±0,002		0,107
	Leuconostoc	24.	0,104±0,002	89,018	0,446±0,033	53,018	0,817 ±0,068	14,035	0,950
	pseudomesenteroides	48.	0,109±0,001	90,413	1,102±0,013	3,108	0,877 ±0,066	22,897	1,137
	3a -1	72.	0,111±0,004	89,725	0,977±0,021	9,285	0,752 ±0,186	30,176	1,077
		0.	0,109±0,001		0,109±0,001		0,109±0,001		0,109
14	*Bacillus pumilus*	24.	0,106±0,005	89,726	0,157±0,009	84,799	1,202 ±0,026	-16,135	1,035
	1e-2	48.	0,107±0,005	80,025	0,422±0,081	21,036	1,079 ±0,024	-102,06	0,534
		72.	0,102±0,004	79,802	0,582±0,166	-15,182	1,151 ±0,082	-127,92	0,505
		0.	0,105±0,004		0,105±0,004		0,105±0,004		0,105
15	*Enterococcus gallinarum*	24.	0,110±0,007	71,064	0,105±0,002	72,208	1,015 ±0,067	-167,81	0,379
	1c-1.1.2	48.	0,104±0,005	93,295	0,111±0,002	92,842	1,197 ±0,013	22,553	1,546
		72.	0,096±0,004	93,879	0,545±0,087	65,110	1,179 ±0,022	24,589	1,563
		0.	0,111±0,004		0,111±0,004		0,111±0,004		0,111
16	*Bacillus megaterium*	24.	0,110±0,005	52,174	0,115±0,004	50,000	0,895 ±0,302	-289,13	0,230
	1e-3	48.	0,110±0,004	25,170	0,536±0,260	-264,626	0,974 ±0,033	-562,81	0,147
		72.	0,105±0,006	26,291	0,983±0,028	-592,019	0,898 ±0,102	-532,62	0,142
		0.	0,104±0,002		0,104±0,002		0,104±0,002		0,104
17	*Leuconostoc*	24.	0,097±0,002	74,044	0,127±0,006	66,222	0,108 ±0,002	71,289	0,375
	pseudomesenteroides	48.	0,084±0,007	91,118	0,854±0,046	9,377	1,057 ±0,317	-12,208	0,942
	3d 1	72.	0,082±0,008	79,820	0,890±0.022	-118,137	0,895 ±0,136	-119,36	0,408

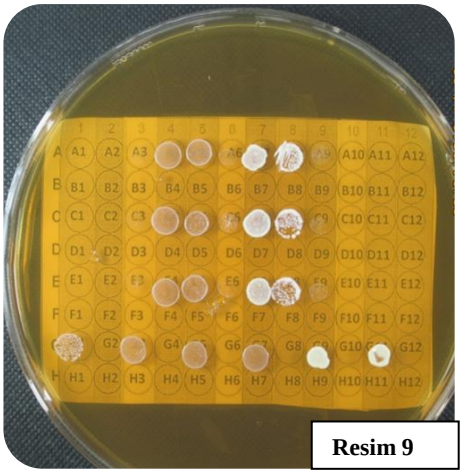
Tablo 12: Probiyotik bakterilerin farklı sıcaklık değerlerinde (4 ºC, 22 ºC, 44 ºC) gelişimi (devamı)

		0.	0,109±0,003		0,109±0,003		0,109±0,003		0,109
18	*Lactobacillus kefiri 2*	24.	0,104±0,002	61,905	0,128±0,003	53,236	0,962 ±0,138	-252,25	0,273
	1a-2.1	48.	0,112±0,001	85,229	0,316±0,071	58,157	1,016 ±0,090	-34,347	0,756
		72.	0,123±0,012	73,885	0,881±0,293	-87,120	0,932 ±0,045	-97,948	0,471
		0.	0,109±0,003		0,109±0,003		0,109±0,003		0,109
19	*Lactobacillus rhamnosus*	24.	0,110±0,001	92,997	0,126±0,002	91,933	1,403 ±0,026	10,387	1,566
	2b-6	48.	0,108±0,002	93,087	0,647±0,100	58,690	1,434 ±0,079	8,509	1,567
		72.	0,113±0,006	92,770	1,398±0,049	10,557	1,389 ±0,063	11,111	1,563
		0.	0,104±0,002		0,104±0,002		0,104±0,002		0,104
20	*Enterococcus faecium*	24.	0,107±0,001	89,709	0,626±0,073	39,981	1,020 ±0,064	2,173	1,043
	2b-3	48.	0,113±0,003	90,140	1,077±0,029	6,021	0,963 ±0,070	15,998	1,146
		72.	0,111±0,005	90,386	0,996±0,011	14,018	0,992 ±0,107	14,335	1,158
		0.	0,103±0,001		0,103±0,001		0,103±0,001		0,103
21	*Lactobacillus paraplantarum*	24.	0,109±0,009	67,945	0,103±0,004	69,518	1,039 ±0,093	-206,49	0,339
	1d-3	48.	0,095±0,006	87,706	0,546±0,104	29,048	0,826 ±0,071	-7,229	0,770
		72.	0,102±0,002	94,513	0,915±0,087	50,603	0,916 ±0,085	50,549	1,853
		0.	0,092±0,005		0,092±0,005		0,092±0,005		0,092
22	*Leuconostoc*	24.	0,099±0,001	88,814	0,110±0,002	87,650	1,112 ±0,043	-25,263	0,888
	pseudomesenteroides	48.	0,090±0,017	88,778	0,131±0,035	83,666	0,866 ±0,037	-7,980	0,802
	3b	72.	0,099±0,001	89,504	0,756±0,100	19,539	1,018 ±0,032	-8,333	0,940
		0.	0,103±0,002		0,103±0,002		0,103±0,002		0,103
23	*Lactococcus lactis ssp.lactis*	24.	0,104±0,002	89,821	0,565±0,027	44,846	1,077 ±0,025	-5,041	1,025
	3c-2	48.	0,102±0,002	87,736	0,610±0,007	26,377	0,940 ±0,118	-13,349	0,829
		72.	0,101±0,002	73,647	0,563±0,021	-47,382	0,858 ±0,141	-124,60	0,382

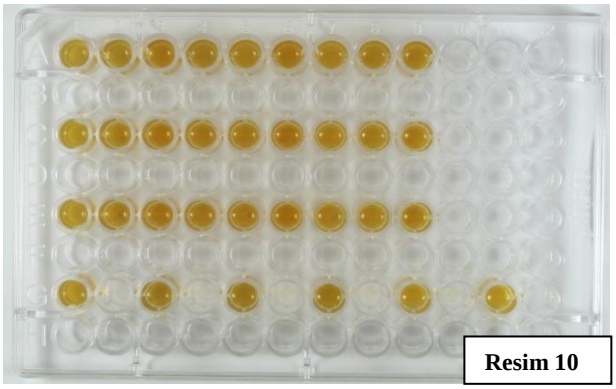
Tablo 12: Probiyotik bakterilerin farklı sıcaklık değerlerinde (4 ºC, 22 ºC, 44 ºC) gelişimi (devamı)

		0.	0,105±0,001		0,105±0,001		0,105±0,001		0,105
24	*Lactococcus lactis ssp. lactis* 3e-1	24.	0,080±0,002	28,228	0,105±0,003	5,105	0,934 ±0,062	-741,44	0,111
		48.	0,103±0,002	90,726	0,386±0,090	65,131	0,837 ±0,059	24,360	1,107
		72.	0,103±0,003	6,667	0,430±0,138	-290,606	0,678 ±0,063	-516,06	0,110
		0.	0,085±0,003		0,085±0,003		0,085±0,003		0,085
25	*Streptococcus salivarus ssp. thermophilus* 2e M	24.	0,107±0,001	84,512	0,100±0,013	85,570	0,946 ±0,081	-36,460	0,693
		48.	0,107±0,002	84,425	0,164±0,027	76,177	0,878 ±0,054	-27,851	0,687
		72.	0,101±0,001	85,234	0,198±0,017	71,053	0,872 ±0,049	-27,485	0,684
		0.	0,108±0,002		0,108±0,002		0,108±0,002		0,108
26	*Enterococcus faecium 2b-M*	24.	0,112±0,010	89,263	0,257±0,027	75,256	0,965 ±0,124	7,212	1,040
		48.	0,112±0,009	89,403	0,495±0,042	53,302	0,701 ±0,228	33,868	1,060
		72.	0,104±0,006	90,366	0,626±0,039	41,791	1,000 ±0,042	7,032	1,076
		0.	0,111±0,003		0,111±0,003		0,111±0,003		0,111
27	*Enterococcus faecium 2a-2M*	24.	0,119±0,009	91,614	0,129±0,004	90,958	1,410 ±0,043	0,914	1,423
		48.	0,112±0,004	92,866	0,356±0,007	77,304	1,416 ±0,007	9,788	1,570
		72.	0,100±0,003	93,511	1,255±0,035	18,559	1,481 ±0,083	3,894	1,541

Ürün ve preparatlardan izole edilen bakterilerin sıcaklık değerleri 4 ºC, 22 ºC ve 45 ºC olan ortamlarda kontrole göre OD değerleri genel olarak düşüktür. Ancak 45 ºC' de *L.rhamnosus* (2f-2A), *Lactococcus lactis ssp.lactis* (3d-4A), *B.megaterium* (1e-3), *L.kefiri* (1a-2.1), *L.pseudomesenteroides* (3b), *S.salivarus ssp.thermophilus* (2e-M) suşlarının kontrol grubuna göre OD değerlerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Nokta ekim sonucuna göre sıcaklık değeri 22 ºC ve 45 ºC olan ortamlarda probiyotik bakterilerin tümünün canlı kaldığı görülmüştür (Tablo 11, Tablo 12).



Resim 9



Resim 10

Resim 9: MRS agar yüzeyi üzerine yapılan nokta ekim (5 µL)

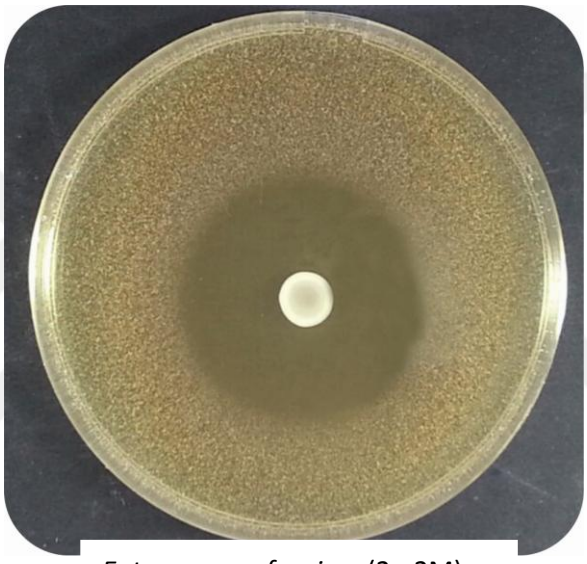
Resim 10: 96 kuyucuklu mikroplak görünümü

Çalışmamızda tanımlanan 27 türden farklı pH, tuz, sıcaklık koşullarının her üçünde de canlı kalan 7'si farklı olmak üzere 10 tür tespit edilmiştir. Bu bakteriler *Lactobacillus rhamnosus* (P.2 firması preparat), *Enterococcus gallinarum* (ev peynir suyu), *Lactobacillus kefiri 1* (ev kefiri), *Bacillus megaterium* (ev turşu suyu), *Lactobacillus kefiri* 2 (ev kefiri), *Lactobacillus rhamnosus* (P.1 firması preparat), *Lactobacillus plantarum* (ev peynir suyu), *Lactobacillus plantarum* (P.3 firması preparat), *Bifidobacterium spp* (T.4 firması sade kefir), *Enterococcus faecium* (P.3 firması preparat)'dur. Bu probiyotik bakteriler antimikrobiyal aktivite testi için çalışmaya dahil edilmiştir.

6.4. Probiyotik Bakterilerin Antimikrobiyal Aktivite Tespiti

6.4.1. Spot on lawn yöntemi ile antimikrobiyal aktivite tespiti

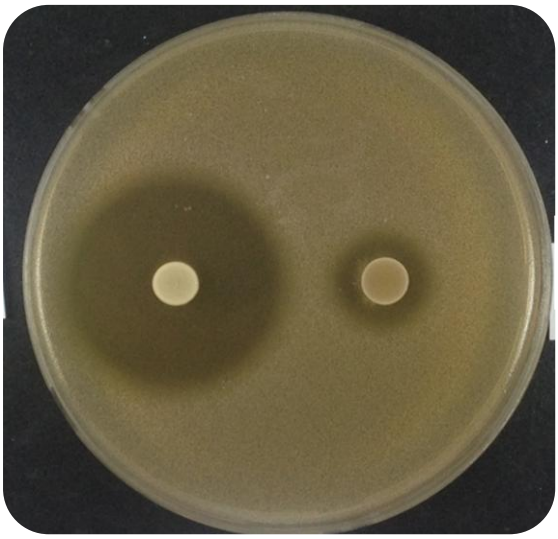
Probiyotik bakterilerin antimikrobiyal aktivite testinde; en yüksek etkiyi ev peynir suyundan izole edilen *Lactobacillus plantarum'*un 3 nolu klinik MRSA suşuna karşı gösterdiği bulunmuştur (45,62 mm/zon). Ancak ev turşu suyundan izole edilen *Bacillus megaterium'*un klinik ve standart *S.aureus'*a karşı etkisiz olduğu saptanmıştır (Tablo 13).



Enterococcus faecium (2a-2M)

Resim 11: Probiyotik bakterinin 3 nolu klinik MRSA 3 suşuna karşı antimkrobiyal aktivitesi

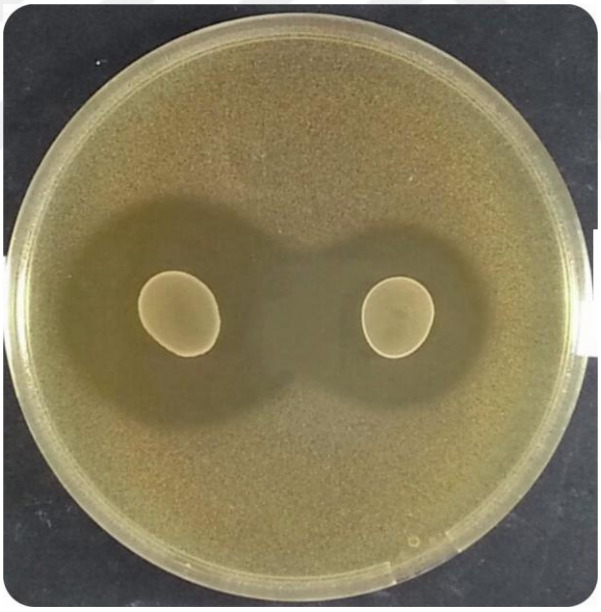
Lactobacillus rhamnosus (2f-2A)



Lactobacillus kefiri 1 (1a-1A)

Resim 12: Probiyotik bakterinlerin 10 nolu klinik MSSA suşuna karşı antimkrobiyal aktivitesi

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356



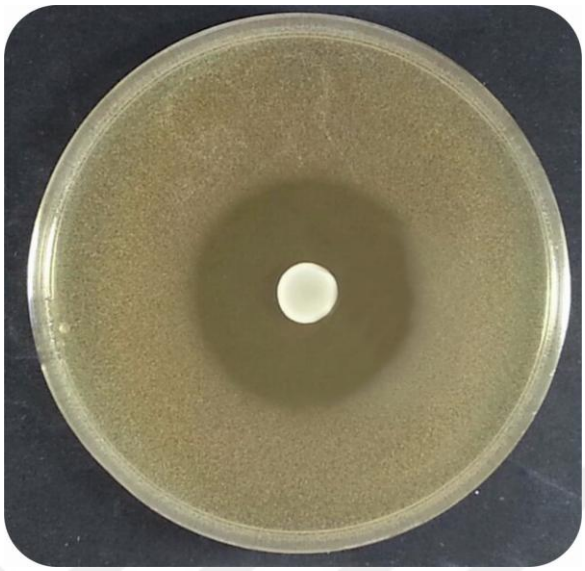
Bifidobacterium (3b-1A)

Resim 13: Probiyotik bakterilerin 9 nolu klinik MSSA suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesi

Tablo 13: Probiyotik bakterilerin standart (ATCC) ve klinik *S.aureus* suşlarına karşı antibakteriyel aktivite sonuçları (İnhibisyon zon çapı,mm). Nokta ekimlerin çapı çıkarılmıştır

Bateriler	***L.rhamnosus* 2b-6**	***E. gallinarum* 1c.1.1.2**	***L.sakei* ATCC 15521**	***L.kefiri 2* 1a-2.1**	***B.megaterium* 1e-3**	***L.kefiri 1* 1a-1A**	***L. rhamnosus* 2f-2A**	***L. plantarum* 1c-2.2.A**	***L. plantarum* 2a-2A**	***Bifidobacterium ssp.* 3b-1A**	***E. faecium* 2a-2M**	***L.acidophilus* ATCC 4356**
MRSA 1	23,26	22,45	19,06	4,78	-	13,47	25,44	24,37	22,75	12,67	27,48	19,66
MRSA 2	24,53	23,99	24,45	8,51	-	15,97	29,59	29,66	29,79	13,74	27,99	19,89
MRSA 3	34,56	26,7	37,49	7,78	-	18,98	31,64	45,62	28,09	18,18	30,71	22,45
MRSA 4	18,28	21,11	20,69	3,5	-	8,52	22,92	24,25	19,44	12,04	26,88	26,35
MRSA 5	23,66	17,6	18,55	1,75	-	9,18	21,11	26	26,79	14,71	26,07	16,29
MSSA 6	29,55	20,8	21,68	6,28	-	12,64	21,05	32,54	26,43	17,13	26,64	14,7
MSSA 7	14,39	18,80	15,21	5,1	-	4,32	23,53	22,57	29,35	4,83	22,01	15,39
MSSA 8	34	25,81	29,14	-	-	5,87	26,21	26,39	34,63	18,36	32,3	26,15
MSSA 9	19,83	18,14	19,5	3,21	-	12,28	24,86	29,58	23,01	15,12	25,83	21,49
MSSA 10	20,06	27,46	20,64	8,26	-	3,68	24,08	25,45	24,81	18,70	19,90	11,04
***S.aureus* ATCC 29213**	20,97	25,8	29,09	-	-	3,67	23,99	25,73	21,58	16,21	21,24	18,55
***S.aureus* ATCC 25925**	27,54	28,25	28,09	10,57	-	10,47	32,18	32,77	32,36	25,21	32,47	28,5

(-): etkisiz



Enterococcus faecium
(2a-2M)

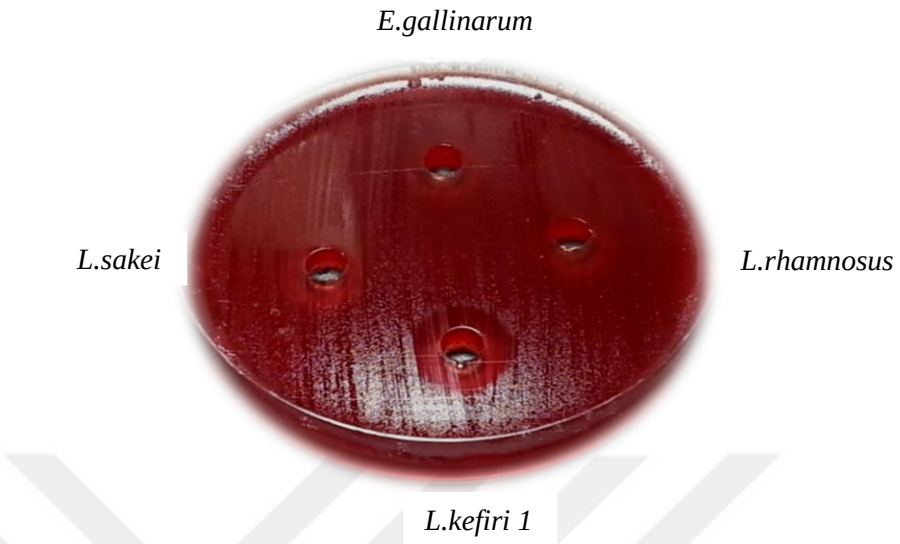
Resim 14: Probiyotik bakterinin 9 nolu klinik MSSA suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesi

6.4.2. Agar oluk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite tespiti

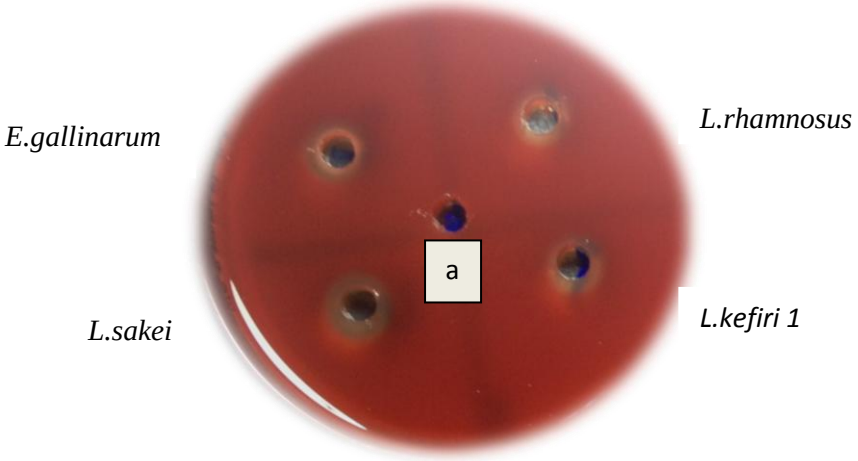
Probiyotik bakterilerin agar oluk difüzyon yöntemi ile *S.aureus* ve *H.pylori* suşları üzerine antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış ancak herhangi bir etki görülmemiştir. Probiyotik bakteri süpernatantlarının pH değerlerinin düşük olması *H.pylori'* nin üretiminde kullanılan Colombia agar'ın oluk etrafında hemoliz zonunun oluşmasına neden olmuştur (Tablo 14). Aynı yöntem kullanılarak siprofloksasinin *H.pylori* suşlarına karşı 46,10 mm (600 µg/mL) ve *S.aureus* suşlarına karşı 24,17 mm (100 µg/mL) zon oluşturduğu saptanmıştır.

Tablo 14: Probiyotik bakteri süpernatantlarının pH değeri ile Colombia agar besiyerinde oluşturdukları hemoliz zonu (mm)

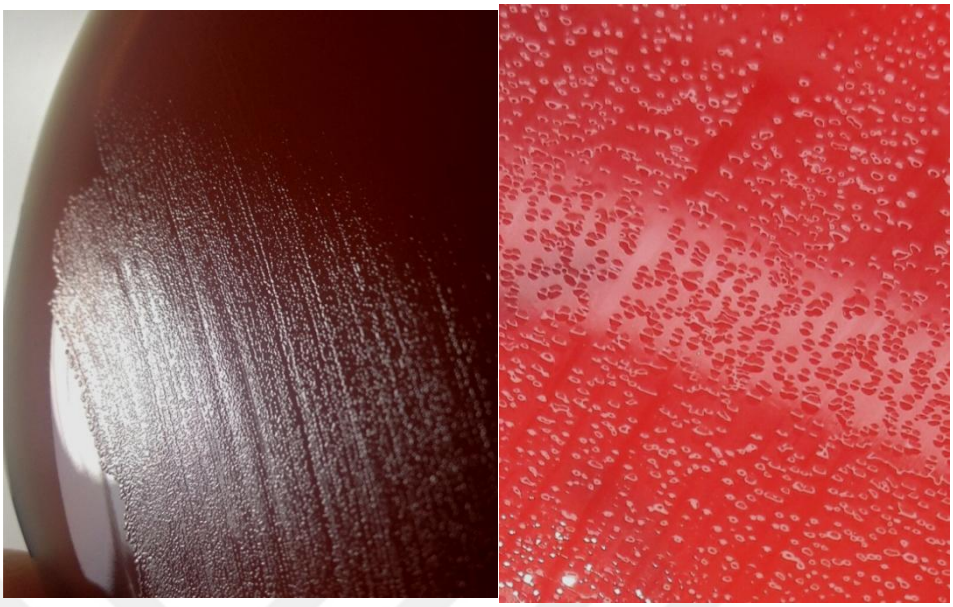
Probiyotik Bakteriler	Süpernatant pH değeri	Hemoliz zonu
Lactobacillus rhamnosus (P.2 firması preparat)	4,01	10,11
Enterococcus gallinarum (ev peynir suyu)	3,89	10,46
Lactobacillus kefiri 1 (ev kefiri)	6,35	11,28
Bacillus megaterium (ev turşu suyu)	5,31	11,08
***Lactobacillus kefiri* 2** (ev kefiri)	6,14	10,97
Lactobacillus rhamnosus (P.1 firması preparat)	3,86	10,25
Lactobacillus plantarum (ev peynir suyu)	3,86	10,93
Lactobacillus plantarum (P.3 firması preparat)	3,87	12,77
Bifidobacterium ssp. (T.4 firması sade kefir)	4,79	11,46
Enterococcus faecium (P.3 firması preparat)	3,85	11,55
Lactobacillus acidophilus ATCC 4356	4,27	10,28
Lactobacillus sakei ATCC 15521	6,40	10,04



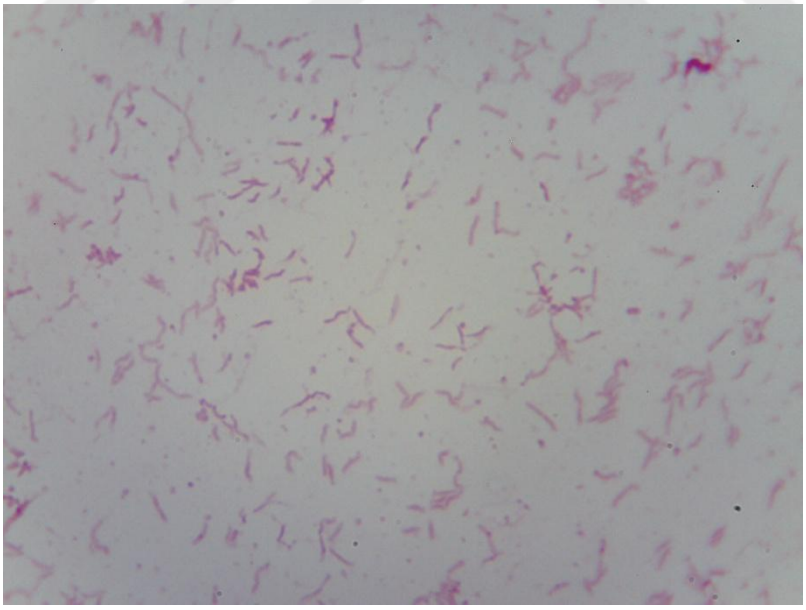
Resim 15: Probiyotik bakteri süpernatantlarının *H.pylori* ATCC 43504'e karşı oluşturdukları zon



Resim 16: *H.pylori* ekilmemiş Colombia agar besiyerinde probiyotik bakteri süpernatantlarının oluşturdukları hemoliz
(a) süpernatant konulmamış boş oluk



Resim 17*:* *Helicobacter pylori* kolonilerinin görünümü (Columbia agar)



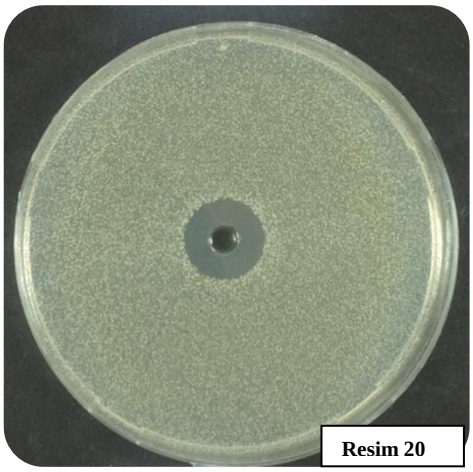
Resim 18: Gram boyama yöntemi ile boyanmış *H.pylori*'nin mikroskoptaki görünümü (1000x)



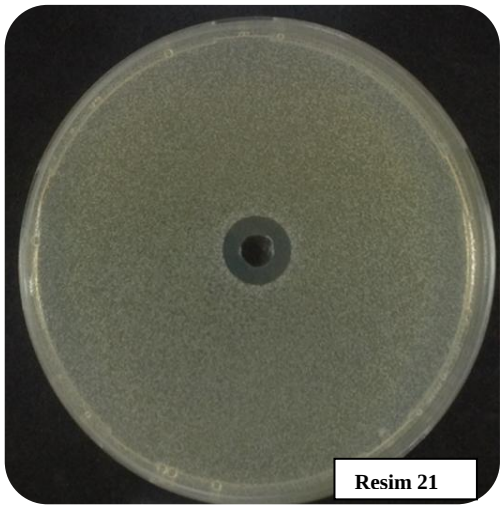
Resim 19: Probiyotik bakteri süpernatantlarının 4 nolu klinik MRSA suş üzerine antimikrobiyal aktivitesi

6.4.2.1. Nisinin antimikrobiyal aktivitesinin tespit edilmesi

Nisin 640 µg/mL konsantrasyonunun *S.aureus* suşlarının tümüne etkili olduğu saptanmıştır (Tablo 15). Ancak aynı konsantrasyon ile beraber 1280 µg/mL konsantrasyonundaki nisinin da *H.pylori* suşlarına karşı etkisiz olduğu tespit edilmiştir.



Resim 20: Nisin (640µg/mL)'nin 3 nolu klinik MRSA suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesi



Resim 21: Nisin (640µg/mL)'nin 9 nolu klinik MSSA suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesi

Tablo 15: Nisin (640 µg/mL)'nin *S.aureus* üzerine antibakteriyel aktivitesi
(Oluk çapı / 6mm, zon çapı/mm)

Bakteriler	**Zon çapı**
S.aureus 1	12,74
S.aureus 2	13,29
S.aureus 3	14,04
S.aureus 4	7,14
S.aureus 5	6,58
S.aureus 6	9,45
S.aureus 7	8,35
S.aureus 8	10,71
S.aureus 9	10,87
S.aureus 10	8,48
S.aureus ATCC 25925	10,78

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç geliştirmeleri, antibiyotiklerin ekolojik zararları ve maliyetlerinin artması araştırmacıları antienfeksiyöz özellikleri ile insan sağlığını olumlu yönde etkileyen probiyotiklerin kullanımı üzerine odaklamıştır (Başoğlu, 2014; Gürsoy ve Kınık, 2006).

Avrupa, Japonya ve diğer Uzakdoğu ülkelerinde probiyotik içerikli ürünler yaygın olarak kullanılmaktadır (Lee ve Salmınen, 2009). Bu probiyotik ürünlerden "farmasötikaller" olarak da bilinen preparatlar konakçı sağlığı üzerine olumlu etkileri olan mikroorganizma, çeşitli enzim, vitamin ve aroma bileşenleri ile desteklenerek kapsül veya tablet haline getirilmiş ürünlerdir. Bu tablet veya kapsüller, hastalıkların tedavisinde ilaç yerine kullanılamamakta, ancak sağlık destekleyici ürünler olarak satılmaktadır (Rolfe, 2000; Ouwehand ve Vesterlund 1999). Probiyotik ürünlerde bulunan canlı mikroorganizmalar biyolojik orjinli gıda katkı maddeleri ve enzimler ile birlikte 1980'lerden beri gıdalarda yer almakta ve Avrupa Birliği tarafından kontrol edilmektedir (Lim ve Tan, 2009).

Laktik asit bakterileri probiyotiklerin sık kullanılan örnekleridir (Lim ve Tan, 2009). Çalışmamızda 5 adet ticari preparat, 7 adet ticari probiyotik ürün ve 4 adet doğal farklı probiyotik üründen Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrofotometresi (MALDI-TOF MS) ve konvansiyonel yöntemler kullanılarak tanımladığımız mikroorganizmalar Başoğlu (2014) ve Çoşkun (2014) tarafından belirtilen probiyotik mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Durak ve arkadaşları (2015) ticari yoğurtlardan *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus,* İşleroğlu ve arkadaşları (2008) yöresel peynirlerden *Enterococcus faecalis,* Zheng ve arkadaşları (2013) kefir örneklerinden *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus kefiri,* Angelakis ve arkadaşları (2011) yoğurt ve probiyotik ürünlerden *Lactobacillus casei, Lactococcus lactis, Bifidobacterium animalis, Lactobacillus delbrueckii* ve *Streptococcus thermophilus* izole etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da

yer alan süt ürünlerinde ve eczane preparatlarında belirlenen probiyotik mikroorganizmalar yukarıda belirtilen araştırmacıların çalışmalarında tanımlanan mikroorganizmalar ile örtüşmektedir.

Safra toleransı probiyotik bakterilerin ince bağırsakta yaşama, gelişme ve etki gösterebilmeleri için gerekli ve önemli özelliklerinden sayılmaktadır. Probiyotik bakterilerin mide-bağırsak yolunda canlılıklarını sürdürüp, ortamda kolonize olabilmeleri için midenin asidik pH' larına (2,5-3,5) ve bağırsağın safralı ortamına tolerans gösterebilmeleri bu bakterilerin önemli özelliklerindendir. Birçok bilimsel çalışmada insan safra suyu oranına yakın olan % 0,30 safra konstrasyonu tercih edilmektedir (Şahin, 2012). Dolayısıyla çalışmamızda probiyotik bakterilerin canlılıkları pH değerleri 1.5, 2, 3.2 ile % 0,15, % 0,30, % 1'lik safra tuzu içeren ortamlarda araştırılmıştır. Çalışmamız sonucunda probiyotik bakterilerin her 3 farklı safra tuzu (% 0,15, % 0,30, %1) ortamında ve sadece pH 3,2'de canlılıklarını sürdürdüğü tespit edilmiştir.

Bilindiği gibi probiyotik bakteriler organik asit, hidrojen peroksit (H_2O_2), diasetil ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler ile bozulmaya sebep olan organizmaları ve gıda kaynaklı patojenleri inhibe etmektedirler (Siamansouri ve ark., 2013).

Nisin Dünya Sağlık Örgütü tarafından gıda katkı maddesi olarak onaylanmış tek bakteriyosindir. Bunun yanında nisin insanlar için tamamen güvenli bir katkı maddesi olması, vücuda alındıktan sonra sindirim enzimleri tarafından inaktif hale gelebilmesi ve yüksek miktarlarda kullanımının toksik etki göstermemesi açısından büyük önem taşımaktadır (Hampikyan ve Çolak, 2007; Sudağıdan ve Aydın, 2013).

Döşler ve Gürler yapmış oldukları çalışmalarında nisinin hastalardan enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA), metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve *Enterococcus faecalis* suşları üzerine tek başına ve sık kullanılan antibiyotikler ile kombinasyon halindeki in vitro etkilerini

araştırmışlardır. Araştırmacılar nisinin metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'a karşı etkili bulmuşlardır (Döşler ve Gürler, 2006). Bizim çalışmamızda da nisin hem MRSA, hem MSSA suşları üzerine inhibitör etki göstermiştir.

Helicobacter pylori ve *Staphylococcus aureus*'un oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan mevcut ilaçların dezavantajları ve kullanılan antimikrobiyal ilaçlara karşı giderek artan direnç araştırmacıları alternatif tedavi yöntemleri üzerine odaklamıştır. Böylece antibiyotiklere alternatif olan bileşiklerin kullanımı tedavinin etkinliğini artırabilirken ilaç yan etkilerini de belli düzeye kadar azaltabileceği düşünülmektedir (Ruggiero, 2014).

Schillinger ve Lucke yapmış oldukları çalışmada; et ve et ürünlerinden izole ettikleri 19 adet *L.sakei,* 3 adet *L.plantarum* ve 1 adet *L.curvatus* suşların *Lactobacillus* ve *Listeria monocytogenes* mikroorganizmalarına karşı antibakteriyel etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar Spot on lawn yönteminde 19 adet *L.sakei* suşunun indikatör mikroorganizmalara karşı inhibisyon zonu oluşturduğunu fakat agar oluk difüzyon yönteminde 19 adet *L.sakei* suşunun sadece 6'sının inhibisyon zonu oluşturduğunu bildirmişlerdir (Schillinger ve Lucke, 1989).

Özdemir ve arkadaşları çalışmalarında; fermente sucuktan izole ettikleri farklı laktobasil türlerinin *L.monocytogenes* ile *S.aureus'*a karşı antimikrobiyal etkilerini Spot on lawn ve agar oluk difüzyon testlerini kullanarak araştırmışlardır. Araştırmacılar *Lactobasillus* türlerinin indikatör mikroorganizmalara karşı oluşturdukları antibakteriyel etkinin hem indikatör mikroorganizmalara, hem de Spot on lawn ve agar oluk difüzyon testlerine göre değişkenlik gösterdiğini ve antibakteriyel etkinin Spot on lawn testinde daha fazla olduğunu saptamışlardır. Özdemir ve arkadaşları çalışmalarında yer alan *L.sakei*'nin bazı suşlarının *L.monocytogenes*' e karşı Spot on lawn testinde inhibisyon zonu oluşturmasına karşın aynı suşların oluk difüzyon testinde inhibisyon zonu oluşturmadığını bildirmişlerdir (Özdemir ve ark., 2002).

Altuntaş ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada; çiğ süt ve peynir örneklerinden LAB izolasyonu yaparak Spot on lawn ve agar oluk difüzyon testleri ile patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal özellik gösteren yerel suşları belirlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda Spot on lawn testinde inhibitör etkiye sahip olan LAB izolatlarından 6 adedinin *L.monocytogenes*'e karşı, 7 adedinin *S. aureus*'a karşı, 25 adedinin ise her ikisine karşı inhibitör etkiye sahip olduğu, agar oluk difüzyon deneyi sonucunda ise 7 adet suşun *L.monocytogenes'*e karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Altuntaş ve ark., 2010).

Özkalp çig sütlerden izole ettiği 50 adet laktokok suşunun 23 farklı gram negatif ve gram pozitif bakteriye karşı antibakteriyel etkinliklerini araştırmıştır. Araştırmacı yaptığı çalışma sonucunda laktokok suşlarının *S.aureus* üzerine etkisiz olduğunu bildirmiştir (Özkalp, 2006) .

İşleroğlu ve arkadaşları yöresel bir peynirden *Enterococcus faecalis* izole edip indikatör mikroorganizmalara karşı inhibitör aktivite gösterenleri belirlemiştir. Hücre içermeyen steril *E.faecalis* süpernatantının *L.plantarum, E.faecalis, E.faecium* ve *L.monocytogenes* karşı inhibitör aktiviteye sahip oldugunu fakat *E.coli, S.aureus* ve *B.cereus*'a karşı etkili olmadığını saptamışlardır (İşleroğlu ve ark., 2008).

Bilindiği gibi *H.pylori* kanser ile ilişkilendirilen tek bakteridir (Ruggiero, 2014). *H.pylori*' nin oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı gelişen dirençten ve antibiyotiklerin yan etkilerinden dolayı standart tedavi olan üçlü tedavi uygulanmaktadır fakat tedavinin etkinliği giderek azalmaktadır. Özellikle klaritromisin direncinin % 15-20 olduğu bölgelerde eradikasyon başarısı % 80'nin altına düşmektedir. *H.pylori* enfeksiyonunun klinik öneminin ve tedavideki başarısızlığı yeni tedavi yöntemlerin gelişmesini etkili kılmıştır (Kasapoğlu ve Türkay, 2008)

Tongtawee ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *H.pylori* enfeksiyonu bulunan hastaları 2 gruba ayırmıştır. Birinci gruba (n=96) sadece antibiyotik + plasebo, ikinci gruba (n=98) kullanılan antibiyotikler ile birlikte *Lactobacillus delbrueckii* ve *Streptococcus thermophillus*'un içerdiği yoğurt ile 3'lü tedavi uygulamışlardır.

Sonuç olarak probiyotik yoğurtların hastalarda *H.pylori* eradikasyon oranını arttırdığını saptamışlardır (Tongtawee ve ark., 2015).

Cats ve arkadaşları yapmış olduğu çalışmada *Lactobacillus casei'*nin in vitro ortamda *H.pylori* karşı inhibibe edici etkisini araştırmışlardır. Araştırmacıların yapmış oldukları çalışma sonucunda *L.casei'*nin filtreden geçirilerek steril edilen süpernatantında *H.pylori'*ye karşı bir etki saptanmamış iken *L.casei* kültürünün bu mikroorganizmaya karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Cats ve ark., 2003).

Boyanova ve arkadaşları 6 adet *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus'un* agar oluk difüzyon yöntemi ile 30 adet *H.pylori* suşuna karşı antimikrobiyal aktivitesini araştırmıştır. Araştırmacılar düşük pH'daki *Lactobacillus* kültürlerinin *H.pylori* suşlarını % 40 ile % 86,7 oranında inhibe ettiğini fakat aynı kültürlerin pH nötr (6,4-7,7) edildiğinde *H.pylori* suşlarını % 16,7 ile % 66,7 oranında inhibe ettiğini saptamışlardır (Boyanova, 2008).

Sgouras ve arkadaşları *L.casei* suşunun in vitro koşullarda *H.pylori* üzerine inhibitör etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar agar oluk difüzyon yöntemi ile *L. casei* suşunun *H.pylori*'ye karşı inhibitör etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Ancak *L. casei* kültüründen hazırlanan canlı hücre içermeyen süpernatantı üreaz aktivitesini anlamlı düzeyde azaltmasına rağmen *H.pylori*'ye karşı etkili bulunmamıştır. Araştırmacılar *H.pylori* suşunun inhibe edilmesi için *L.casei* suşunun canlı olması gerektiğini ileri sürmektedirler (Sgouras ve ark., 2004).

İnsanlar ve hayvanlar üzerine yapılan çalışmalarda probiyotik mikroorganizmaların *H.pylori*'yi ortadan kaldıramadığını ancak bakteriyel yükü ve inflamasyonu azalttığı saptanmıştır (Vasiljevic ve Shah, 2008).

Literatürde çeşitli probiyotik bakterilerin *H.pylori'*nin gelişimini inhibe ettiği ve neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kulanılan antibiyotiklerin yan etkilerini hafiflettiğini gösteren çalışmaların yer almasına rağmen, daha fazla in vitro ve in vivo çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamız sonucunda

probiyotiklerin etkinliğinin probiyotik bakteri türüne göre değil suşa ve yönteme göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak;

1- Çalışmamızda yer alan 16 adet probiyotik ürün ve preparattan 15 adet farklı olmak üzere toplamda 27 adet bakteri MALDI-TOF ile tanımlanmıştır. Bu mikroorganizmalar *Lactobacillus kefiri, Lactococcus lactis subsp. lactis, Lactobacillus delbrueckii, Enterococcus gallinarum, Lactobacillus plantarum, Streptococcus infantarius ssp. infantarius, Lactobacillus curvatus, Leuconostoc mesenteroides, Leuconostoc pseudomesenteroides, Lactobacillus paraplantarum, Bacillus pumilus, Bacillus megaterium, Enterococcus faecium, Lactobacillus rhamnosus, Bifidobacterium spp.*'dur.

2- Çalışmamızın sonucunda; Nisin (640 µg/mL) metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) ve metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) ile ATCC 25925 *S.aureus* olmak üzere tüm *S.aureus* suşlarına karşı etki göstermiştir. Nisinin en yüksek antibakteriyel etkiyi 3 nolu klinik MRSA suşuna (14,04 mm/zon) en düşük etkiyi 5 nolu klinik MRSA suşuna (6,58 mm/zon) karşı gösterdiği belirlenmiştir.

3- Çalışmamızda izole edilen probiyotik mikroorganizmaların süpernatantları agar oluk difüzyon yöntemi kullanılarak MSSA ve MRSA suşlarına karşı antimikrobiyal etkisi araştırılmış ancak herhangi bir inhibisyon zonu tespit edilmemiş iken bu mikroorganizmaların kültürleri Spot on lawn yöntemi ile *S.aureus* suşlarına karşı inhibisyon zonu oluştuğu saptanmıştır. Bilindiği gibi süpernatantlar, santrifügasyon ve filtrasyon işlemleri ile hazırlanıp canlı mikroorganizma içermemektedir ancak probiyotiğin metabolik ürünlerinden oluşmaktadır. Probiyotik mikroorganizmaların agar oluk difüzyon deneyinde süpernatantta etki görülmemesi ancak bakteri ile direkt muamele edildiğinde etkili olması probiyotik bakterilerin antimikrobiyal etkisini göstermesi için canlı olması gerektiğini düşündürmektedir.

4- Çalışmamızda aynı şekilde probiyotik bakterilerin klinik *H.pylori* üzerinde de agar oluk difüzyon yöntemi kullanılarak antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış fakat oluk etrafında inhibisyon zonu tespit edilmiştir. Probiyotik ürün ve preparatlardan izole edilen probiyotik bakterilerin süpernatantların pH değerleri 3,85-6,40 arasındadır. Bu asidik ortam *H.pylori*'nin üretilmesinde kullanılan Colombia agarda hemolize yol açmaktadır. Böylelikle oluk etrafında ölçülen zon besiyeri zonu ile aynı olduğu ve yalancı inhibisyon zonu olduğu anlaşılmıştır. Çalışmamızda *H.pylori* % 0,7 agar içeren BHI besiyerinde gelişmediği için Spot on lawn yöntemi *H.pylori* için uygulanamamıştır.

8. KAYNAKLAR

Aftabuddin S, Abul Kashem M, Abdul Kader M, Nurul Azim Sikder M, Abdul Hakim M. Use of *Streptomyces fradiae* and *Bacillus megaterium* as probiotics in the experimental culture of tiger shrimp *Penaeus monodon.* Aacl Bioflux. 2013; 6 :3.

Ah UV. Identification of *Bifidobacterium thermophilum* rbl67 isolated from baby faeces and partial purification of its bacteriocin. Swıss Federal Instıtute of Technology Zurıch, 2006, Doctoral Thesis, Zurich (Danışman: Prof. Dr. C Lacroix).

Akgüç M., *Helicobacter pylori*'de caga antikoru'nun serumdan *in vitro* tespiti için rekombinant bir caga antijeninin üretilmesi. A.Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü, 2011, Yüksek Lisans Tezi, Ankara (Danışman: Prof. Dr. AM. Bozdayı).

Akman E. Bazı laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin incelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2009, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. N Aran).

Altuntaş EG, Ayhan K, Okcu G, Erkanlı K, Balcı MH, Sonakın ŞS. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktiviteleri. GIDA. 2010;35 (3) : 197-203.

Angelakis E, Henry MM, Raoult D. Rapid and accurate bacterial ıdentification in probiotics and yoghurts by MALDI-TOF Mass Spectrometry Sgouras. Journal of Food Science. 2011;76:8.

Aydınol P, Özcan T. Peynirlerde kalsiyum laktat (Ca-Laktat) kristalizasyonu. U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi. 2009; 23(1): 81-91 .

Başoğlu MT. Probiyotikler. Izm Univ Med J. 2014; 3:37-40.

Bennett RW, Monday SR. *Staphylococcus aureus*. In: Miliotis MD, Bier JW, eds. International Handbook of Foodborne Pathogens. New York: Marcel Dekker Inc; 2003, p:53-72.

Berstad AE, Brandtzaeg P. *Helicobacter pylori.* In: Miliotis MD, Bier JW, eds. International Handbook of Foodborne Pathogens. New York: Marcel Dekker Inc; 2003, p:206-223.

Ganguly NK, Bhattacharya SK, Sesikeran B, Nair GB, Ramakrishna BS, Sachdev HPS, Batish VK, Kanagasabapathy AS, Vasantha Muthuswamy, Kathuria SC, Katoch VM, Satyanarayana K, Toteja GS, Manju Rahi, Spriha Rao, Bhan MK, Rajesh Kapur, Hemalatha R. Guidelines for evaluatıon of probiotics in food. Indian J Med Res. 2011;134:22-5.

Bostan K, Çetin Ö, Büyükünal SK, Ergün Ö. The presence of *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins in ready-to-cook meatballs and white pickled Cheese. J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ. 2006; 32 (3): 31-39.

Boyanova L, Stephanova-Kondratenko M, Mitov I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* strains: preliminary report. J Appl Microbiol. 2008;48:579–584.

Caramia G, Silvi S. Probiotics: from the ancient wisdom to the actual therapeutical and nutraceutical perspective. In: Malago JJ, Koninkx JFJG, Logar RM, eds. Probiotic Bacteria and Enteric Infections. New York: Springer Dordrecht Heidelberg; 2011, p:3-37.

Cats A, Kuıpers EJ, Bosschaert MAR, Pot RGJ, Vandenbrouckegrauls– Grauls CMJE, Kusters JG. Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei*-containing milk drink in *Helicobacter pylori*-colonized subjects. Aliment Pharmacol Ther. 2003; 17: 429–435.

Ceyhan N, Alıç H. Bağırsak mikroflorası ve probiyotikler. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi. 2012;5 (1): 107-113.

Champomier-Verge`s MC, Maguin E, Mistou MY, Anglade P, Chich JF. Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. J Chromatography B. 2002: 329–342.

Chen H, Hoover DG. Bacteriocins and their food applications. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2003;2: 82-100.

Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clin Infect Dis. 2013; 26(3): 547–603.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Aerob üreyen bakteriler için dilüsyon yöntemleri ile antimikrobik duyarlılık testleri; onaylanmış standart. 7.Basım M7-A7. Ankara : Bilimsel Tıp Yayınevi; 2006, p:12-13.

Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology. 2005; 3: 777-788.

Cunha MLRS. The genus *Staphylococcus*. In: Cunha MLRS, eds. *Staphylococcus aureus* and coagulase- negative staphylococci virulance, antimicrobial resistance and molecular epidemiology. New York: Nova; 2014, p:61-90.

Çağdaş U, Otağ F, Tezcan S, Sezgin O, Aslan G, Emekdaş G. Mide biyopsi örneklerinden *Helicobacter pylori*'nin tanımlanması ve antimikrobiyal direncinin araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2012; 46(3): 398-409.

Çakır İ. Laktobasillus ve Bifidobakterlerde bazı probiyotik özelliklerin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2003, Ankara (Danışman: Prof. Dr. ML Çakmakçı).

Çıkman A, Aydın M, Gülhan B, Parlak M, Gültepe B, Kalaycı Y, Bayındır Bilmen F, Solmaz S, Özekinci T. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarının antibiyotik direnci ve azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması: çok merkezli bir çalışma. Mikrobiyol Bul. 2015; 49 (2): 240-248.

Çiftçi İH, Altındiş M, Çetinkaya Z, Aşık G, Aktepe OC. Klinik örneklerden izole edilen Stafilokoklarda mecA varlığının araştırılması. The Medical Journal of Kocatepe. 2009; 10: 17-20.

Çon AH, Gökalp HY. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal metabolitleri ve etki şekilleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2000;30:180-190.

Çoşkun T. Prebiyotikler. In: Kara A, Çoşkun T, eds. Teoriden kliniğe prebiyotikler ve probiyotikler. İstanbul: Ömür Matbaacılık A.Ş.; 2014, P:36-56.

Çoşkun T. Probiyotikler. In: Kara A, Çoşkun T eds. Teoriden kliniğe prebiyotikler ve probiyotikler. İstanbul : Ömür Matbaacılık A.Ş.; 2014, P:56-70.

Dalkılıç E. Klinik *Staphylococcus aureus* izolatlarında metisilin, makrolid-linkozamid-streptoframin b ve vankomisin direncinin araştırılması. M. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2016, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Ü Soyoğul Gürer).

De Jong A, Van Hijum SAFT, Bijlsma JJE, Kok J, Kuipers OP. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. Nucleic Acids Res. 2006;34:273-279.

Demir E. Fermente süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinde bakteriyosin üretiminin karakterizasyonu. Adnan Menderes Üniversitesi. Fen Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2014, Aydın (Tez Danısmanı: Doç. Dr. G Başbülbül).

Demiray M, Manavoğlu O. *Helicobacter pylori* ve gastrik karsinogenez. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2003;29 (2) :29-33.

Dinçer E, Kıvanç M, Karaca H. Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri ve bakteriyosinler. Gıda. 2009;20: 1-8 .

Doğan M. Probiyotik bakterilerin gastrointestinal sistemdeki etki mekanizması. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi. 2012; 7: 20-27.

Döşler S, Gürler B. Antimikrobik etkili katyonik peptitlerin tek başına ve kombinasyon halindeki etkilerinin araştırılması. ANKEM Derg. 2006;20(3):173-179.

Durak Y, Uysal A, Aladağ MO, Akın D. Ticari yoğurt örneklerinden canlı laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve sayımı. SUFEFD. 2015;41:83-88.

Erem F, Küçükçetin A, Certel M. *Bacillus* türlerinin probiyotik olarak değerlendirilmesi. Gıda. 2013: 38 (4): 247-254.

Erol İ, İşeri Ö. Stafilokokal enterotoksinler. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2004; 51, 239-245.

EUCAST Klinik ve/veya epidemiyolojik önemi olan direnç mekanizmaları ve direnç özelliklerini saptama kılavuzu, 2013.

EUCAST Antimikrobik duyarlılık testine yönelik disk difüzyon yöntemi Sürüm 3.0 Ocak 2014.

Facklam RR, Sahm DS, Teıxeıra LM. Standart Laboratory Methods for Identifyig and Growing Enterococci. In: Manual of Clinical Microbiology. ASM Press. 2002.

Fallone AC, Chiba N, Veldhuyzen van Zanten S, Fischbach L, Gisbert JP, Hunt RH, Jones NL, Render C, Leontiadis GL, Moayyedi P, Marshall JK. The toronto

consensus for the treatment of *Helicobacter pylori* infection in adults. Gastroenterology. 2016;151:51–69.

Fitzgerald GF, Caplice E. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. Int J Food Microbiol. 1999;50:131-149.

Fleming SL. *H. pylori*: Its Biology and ıts survival in the stomach. In: Fleming SL, eds. *Helicobacter pylori*. New York : Chelsea House; 2007, p: 43-54.

Freeman Cook L, Freeman Cook K, eds. *Staphylococcus aureus* infections. 1st ed. United States of America: Chelsea House Publıshers. 2005, p: 89-102.

Fuller R. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol.1989;66:365–78.

Gàlvez A, Abriouel H, Lòpez Rl, Omar NB. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. Int J Food Microbiol. 2007; 120: 51-70.

Garipçin M, Şeker E. İnsanlarda ve hayvanlarda metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) infeksiyonları. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi. 2013;11(1):44-60.

Gatta L, Zullo A, Perna F, Rıccı C, De Francesco V, Tampıerı A, Bernabuccı V, Cavına M, Hassan C, Ierardı E, Morını S, Vaıra D. A 10-day levofloxacin-based triple therapy in patients who have failed two eradication courses. Aliment Pharmacol Ther. 2005; 22: 45–49.

Goderska K ve Czarnecki Z. Characterization of selected strains from *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. African J Microbiol Biol Res. 2007; 1 (6) : 065-078.

Gönülateş N. Kefirin insanlar üzerindeki immünomodülatör etkilerinin araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi. Sağlık Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008, Isparta (Danışman: Doç. Dr. AK Adiloğlu).

Gülseren G. Boza kaynaklı laktik asit bakterilerinin laktik asit miktarlarının ve *Staphylococcus aureus* üzerine antimikrobiyal etkinin belirlenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. ZD Heperkan).

Gürsoy O, Kınık Ö. Peynir teknolojisinde enterokoklar –II: koruyucu ve probiyotik kültür olarak kullanımları. Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg. 2006; 43 (3):91-100.

Gürsoy O, Kınık Ö. Probiyotik bakterilerin klinik uygulamalarında yeni gelişmeler-I. Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg. 2006;43(1):181-188.

Hampikyan H, Çolak H. Nisin ve gıdalardaki antimikrobiyal etkisi. Kor Hek. 2007; 6 (2): 142-147.

Harrigan WF, McCance ME. Laboratory methods in microbiology. New York: Academic Press; 1966, p: 8-65.

Hassan M, Javadzadeh Y, Lotfipour F, Badomchi R. Determination of comparative minimum inhibitory concentration (MIC) of bacteriocins produced by enterococci for selected isolates of multi-antibiotic resistant *Enterococcus* spp. Adv Pharm Bull. 2011;1(2):75-79.

Havenaar R, Huis In't Veld MJH. Probiotics: a general view. In: Wood BJB eds. Lactic acid bacteria in health and disease. Amsterdam:Elsevier Applied Science Publishers, 1992, p:151-170.

Iannuccelli V, Maretti E, Montorsi M, Rustichelli C, Sacchetti F, Leo E. Gastroretentive montmorillonite-tetracycline nanoclay for the treatment of *Helicobacter pylori* infection. Int J Pharm. 2015;493:295–304.

İşleroğlu H, Yıldırım Z, Yıldırım M. Yöresel peynirden antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı. GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi. 2008; 25:1-6.

Karatepe P, Yalçın H, Patır B, Aydın I. Kefir ve kefirin mikrobiyolojisi. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR. 2012; 10: 1-10.

Kasapoğlu B, Türkay C. *Helicobacter pylori*'de tedavi ve direnç. Güncel gastroenteloji dergisi. 2008;12 (3):141-145.

Kavas TS. Probiyotik mikroorganizmaların gastrointestinal sistem uyumluluğu ve enterik patojenlere etkisi. Pamukkale Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık Tezi, 2007, Denizli (Tez Danışmanı: Prof. Dr. H Turgut).

Kim J. Culture**.** In: Kim N, eds. *Helicobacter pylori*. Singapore: Springer Science; 2016, p:129-135.

Kim N. Serology. In: Kim N, eds. *Helicobacter pylori*. Singapore: Springer Science ; 2016, p:113-119.

Klaenhammer RT, Kulen JM. Selection and design of probiotics. Int J Food Microbiol. 1999; 50:45-57.

Koca B. Ortak yaşam alanlarından izole edilen stafilokok suşlarının, antibiyotiklere duyarlılıkları ve virulans faktörleri. Marmara Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2016, İstanbul (Danışman: Yrd. Doç. Dr. E Rayaman).

Kördikanlıoğlu B. *Lactococcus Lactis*'te solunumun hemin ile teşvik edildiği yarı kesikli fermentasyon sisteminde nisin üretiminin optimizasyonu. Pamukkale Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2014, Denizli (Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ö Şimşek).

Kurt Ş, Zorba Ö. Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanım olanakları. Yyü Vet Fak Derg. 2005;16 (1):77-83.

Lee JY. Triple Therapy. In: Kim N, eds. *Helicobacter pylori*. Singapore: Springer Science. 2016, p:427-437.

Lee YK, Salmınen S. Handbook of probiotics and prebiotics. New Jersey: John Wiley & Sons. 2 st ed.2009, p:257-259.

Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. Science.1965;147:747–8.

Lim A, Tan HM. Animal Probiotics. In: Lee YK, Salmınen S, eds. Handbook of probiotics and prebiotics. New Jersey :John Wiley & Sons.2 st ed.2009, p:123-177.

Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* ınfection. Usıness Brıefing: European Gastroenterology Revıew. 2005.

Mattana CM, Satorres SE, Sosa A, Fusco M, Alcaráz LE. Antibacterial activity of extracts of *Acacıa aroma* against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus.* Brazilian J Microbiol. 2010;41: 581-587.

Mégraud F. The challenge of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: the comeback of bismuth-based quadruple therapy. Ther Adv Gastroenterol. 2012;5(2) :103–109.

Messaoudi S, Manai M, Kergourlay G, Prévost H, Connil N, Chobert Jm, Dousset X. *Lactobacillus salivarius*: bacteriocin and probiotic activity. Food Microbiol. 2013; 296-304.

Metchnikoff E. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: W. Heinemann, eds. The prolongation of life: Optimistic studies. London: 1907, p: 161-183.

Niel CB, Kluyver AJ. Derx HG. U¨ ber das Butteraroma. Biochem Z. 1929; 210:234–251.

Noto JM, Peek Jr RM. *Helicobacter pylori* : an overview. In: Houghton J, eds. Helicobacter Species, Methods and Protocols. London: Humana Press; 2012, p: 7-11.

O'grady B, Gibson Gr. Microbiota of the human gut. In: Tamime A. Probiotic dairy products. first published. UK: Blackwell Publishing Ltd; 2005, P:1-16.(1.5.8).

Oumer A, Gaya P, Fernandez-Garsia E, Mariaca R, Gadre S, Medina M, Nunez M. Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin producing adjunct culture. J. Dairy Research . 2001;68: 117-1219.

Ouwehand AC, Vesterlund S. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S, eds. Lactic Acid Bacteria. Third Edition. New York: Marcel Dekker; 2004, P: 375-397.

Özdemir H, Küplülü Ö, Çelik HT. Türk Fermente sucuğundan izole edilen laktobasillerin antibakteriyel etkilerinin saptanması. GIDA. 2002; 27(6): 539-544.

Özer B, Serin E, Coşar A, Kayaselçuk F, Gür G, Yılmaz U, Boyacıoğlu S. *Helicobacter pylori* eradikasyon tedavisinde lansoprozol, klaritromisin ve amoksisilin ile ranitidin bizmut sitrat, lansoprozol, klaritromisin ve amoksisilin

rejimlerinin etkinliğinin karşılaştırılması. Akademik Gastroenteroloji Dergisi, 2004; 3 (3): 125-128.

Özkalp B, Baybek H. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları. Genel Tıp Derg. 2003;13:2.

Özkalp B. Doğal Tip *Lactococcus lactis* suşlarının endüstriyel starter kültür potansiyellerinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi . Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006, Ankara (Tez Danışmanı: Prof. Dr. M Akçelik).

Reddy MS, Vedamuthu ER, Washam CJ, Reınbold GW. Associative growth studies in three-strain mixtures of lactic Streptococcil. Applıed Microbiology. 1972; 24(6):953-957.

Rolfe RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. J. Nutr. 2000;130:396-402.

Rogers L. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. J. Bacteriology 1928;16:321–325.

Ruggiero P. Use of probiotics in the fight against *Helicobacter pylori*. World J Gastrointest Pathophysiol. 2014; 5(4): 384-391.

Sgouras D, Maragkoudakis P, Petraki K, Martinez-Gonzalez B, Eriotou E, Michopoulos S, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E, Mentis A. In vitro and ın vivo ınhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain shirota. Applied and environmental microbiology. 2004;70:518–526.

Sağdıç O, Küçüköner E, Özçelik S. Probiyotik ve prebiyotiklerin fonksiyonel özellikleri. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg. 2004;3-4:221-228.

Salminen S. Uniqueness of probiotic strains. IDF Nutr News Lett.1996;5:16–8.

Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK. Probiotics: How should they be defined? Trends Food Sci. Technol. 1999;10: 107–110.

Schaafsma G. State of art concerning probiotic strains in milk products. IDF Nutr News Lett 1996;5:23–4.

Schıllınger U, Lucke FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. Appl Environ Microbiol. 1989;5(8):1901-1906.

Schrezenmeir J, Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics approaching a definition. Am J Clin Nutr. 2001;73:361–4.

Seçkin AK, Tosun H, Aritürk R. Biyokorumanın süt endüstrisinde kullanım olanakları. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi. 2010; 5(3):36-46.

Sharma S, Agarwal N, Verma P. Probiotics: the emissaries of health from microbial world. Journal of Applied Pharmaceutical Science 02. 2012;01:138-143.

Siamansouri M, Mozaffari S, Alikhani F. Bacteriocins and lactic acid bacteria. Journal of Biology And Today's World. 2013;2: 227-234.

Sowash MG, Uhlemann AC. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* case studies. In: Ji Y, eds. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols. 2 nd ed. London: Springer; 2014, p: 25-26.

Sudağıdan M, Aydın A. Lizozim ve nisinin gıda kaynaklı *Staphylococcus aureus* suşlarında gelişim ve biyofilm oluşumu üzerine etkileri. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg. 2013; 39 (2), 254-263.

Suganthi V, Selvarajan E, Subathradevi C, Mohanasrinivasan V. Lantibiotic nisin: natural preservative from *Lactococcus lactis*. International Research Journal of Pharmacy. 2012; 3 (1): 13-19.

Sullivan A, Nord CE. The place of probiotics in human intestinal infections. Int J Antimicrob Agents. 2002; 20 (5): 313-9.

Sperti GS. Probiotics. West Point, CT: Avi Publishing Co, 1971.

Şahin N. Hayvan kaynaklı *Lactobacillus* türlerinin bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi. Gazi Üniversitesi . Fen Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2012, Ankara (Tez Danısmanı: Doç. Dr. ZN Yüksekdağ).

Tongtawee T, Dechsukhum C, Leeanansaksiri W, Kaewpitoon S, Kaewpitoon N, Loyd RA, Matrakool L, Panpimanmas S. Effect of pretreatment with *Lactobacillus delbrueckii* and *Streptococcus thermophillus* on tailored triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a prospective randomized controlled clinical trial. APJCP. 2015; 16: 4885- 4890.

Tunalı Y. Farmasötik mikrobiyoloji uygulamaları. Star Ajans Ltd. Şti. 2.Baskı,2014.

Tuncer Y, Özden B, Akçelik M. Tulum peynirlerinden izole edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YBML9 ve YBML21 suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin kısmi karakterizasyonları. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2008; 12-(2):141-148.

Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS). Mcfarland baryum sülfat bulanıklık standartı hazırlanması. AMD Testleri Test Prosedürleri AMD-TP-02 Sürüm 1, 2014.

Uymaz B. Probiyotik Özellik taşıyan gıda ve insan kaynaklı laktobasillerin izolasyonu tanımlanması ve bakteriyosin üretim yeteneklerinin karakterizasyonu.

Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2009, Ankara (Danışman: Prof. Dr. M Akçelik).

Valero A, Pérez-Rodríguez F, Carrasco E, Fuentes-Alventosa JM, García-Gimeno RM, Zurera G. Modelling the growth boundries of *Staphylococcus aureus*: effect of temperature, pH and water activity. Int J Food Microbiol. 2009; 133:186-194.

Varan A. Probiyotikler ve kanser. In: Kara A, Çoşkun T, eds. Teoriden kliniğe prebiyotikler ve probiyotikler. İstanbul : Ömür Matbaacılık A.Ş.; 2014, P:363-366.

Vasconcelos de Oliveira CE, Stamford TLM, Neto NJG, de Souza, EL. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. Int J Food Microbiol. 2010;137, 312-316.

Vasiljevic T, Shah N.P. Probiotics from metchnikoff to bioactives. International Dairy Journal. 2008;18:714– 728.

Vergin F. Antibiotics and probiotics. Hippokrates. 1954;28-25(4):116-9.

Vijayakumar PP, Muriana PM. A microplate growth ınhibition assay for screening bacteriocins against *Listeria monocytogenes* to differentiate their mode-of-action. Biomolecules. 2015;5:1178-1194.

Yaman F, Esendal Ö. Balıklarda probiyotik kullanımı. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. 2004;2 (6):1-18.

Yeşilova Y, Sula B, Yavuz E, Uçmak D. Probiyotikler. J Kartal TR. 2010;21(1):49-56.

Yıldırım R. Nisin Üreticisi *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis* Ll27 suşunun beyaz peynirde *Listeria monocytogenes'*in gelişiminin engellenmesi üzerine etkisi. Ankara

Üniversitesi. Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2010, Ankara (Danışman: Prof. Dr. M Akçelik).

Yiğit T. Süt ve süt ürünlerinden probiyotik bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması. Anadolu Universitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü,Yüksek Lisans Tezi, 2009, Eskişehir (Danışman: Prof. Dr. M Kıvanç).

Yürümez E. Gayta örneklerinden izole edilen bazı laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2011, Ankara (Danışman: Prof. Dr. ÖA Osmanagaoglu).

Parker RB. Probiotics, the other half of the antibiotic story. Anim Nutr Health. 1974;29:4–8.

Zheng X, Lyu L, Mei Z. *Lactobacillus*-containing probiotic supplementation increases *Helicobacter pylori* eradication rate: Evidence from a meta-analysis. Rev Esp Enferm Dig. 2013; 105: 445-453.

9. EKLER

EK 1

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer

<u>Ulusal Bildiriler</u>

Nurten TETİK , Pervin RAYAMAN, Erkan RAYAMAN, Rıza ADALETİ, Ümran SOYOĞUL GÜRER. Probiyotik Ürün ve Preparatların *Helicobacter pylori* ve *Staphylococcus aureus* Üzerine Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması, Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültes, (Poster Bildiri), Gıda, Metabolizma & Sağlık: Biyoaktif Bileşenler ve Doğal Katkılar Kongresi, 28 Kasım 2016, İstanbul Teknik Üniversitesi Ayazağa Kampüsü Süleyman Demirel Kültür Merkezi, İstanbul, Türkiye.

Nurten TETİK , Pervin RAYAMAN, Erkan RAYAMAN, Rıza ADALETİ, Ümran SOYOĞUL GÜRER. Probiyotik Ürün ve Preparatlardan Probiyotik Bakterilerin İzolasyonu ve Tanımlanması, Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, (Poster Bildiri), I.Ulusal Marmara Eczacılık Kongresi, 3-5 Kasım 2016, Caddebostan Kültür Merkezi, İstanbul, Türkiye.

EK 2

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Etik Kurulu

PROJENİN ADI: Probiyotik Ürün ve Preparatların Antibiyotikler ile Kombinasyonlarının Helicobacter Pylori ve Staphylococcus Aureus Üzerine Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Yrd.Doç.Dr. Pervin RAYAMAN
PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR: Nurten TETİK
ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI: 05.12.2016-142

Sayın Yrd.Doç.Dr. Pervin RAYAMAN

142 protokol nolu "Probiyotik Ürün ve Preparatların Helicobacter Pylori ve Staphylococcus Aureus Üzerine Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması" isimli projeniz Enstitümüz Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve etik yönden uygunluğuna karar verilmiştir.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Komisyon Başkanı

Yrd.Doç.Dr. Pınar MEGA TİBER

Prof. Dr. Dilşad SAVE

Prof.Dr. Hülya AŞÇI

Prof.Dr. Tuğba TUNALI AKBAY

Prof.Dr. Nefise BAHÇECİK

Doç.Dr.Oya ORUN

Doç.Dr. Hakkı ARIKAN

Doç.Dr.Gürkan SERT

Yrd.Doç.Dr. Betül OKUYAN

Yrd.Doç.Dr. M. Ümit UĞURLU

Yrd.Doç.Dr.İlkşan DEMİRBÜKEN

Av. Funda IŞIK ÖZCAN

Marmara Üniversitesi Göztepe Kampüsü Sağlık Bilimleri Enstitüsü 34688 Kadıköy / İSTANBUL
0 (216) 414 44 23/12 (Faks)
0 (216) 414 44 23
Ayrıntılı bilgi için Süleyman TÜRKMENOĞLU
sağlik.ogrenci@marmara.edu.tr
http://saglik.marmara.edu.tr

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Nurten	**Soyadı**	Tetik
Doğum Yeri	Küçükçekmece	**Doğum Tarihi**	20.01.1990
Uyruğu	T.C.	**Tel**	0542 394 62 44
E-mail	nurten_tetk@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi	2017
Lisans	Bülent Ecevit Üniversitesi	2013
Lise	Küçükçekmece Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi

Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
Biyoloji öğretmenliği	Fener Bahçe Anadolu Lisesi	15.02.2014-20.06.2014
Stajyer	Bülent Ecevit Üniversitesi Doku Kültürü Laboratuar	01.11.2012-01.06.2013
Stajyer	Masaryk Üniversitesi, İmmünoloji Ve Hayvan Fizyoloji Labaratuar	01.11.2012-01.06.2013
Stajyer	Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuar	02.08.2010-25.08.2010
Stajyer	Yedikule Göğüs Hastanesi, Biyokimya Laboratuar	23.06.2010-15.07.2010

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	iyi	orta	orta

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	70,67063	69,80261	61,83462

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

*****Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.