ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI BİTKİLERDEN VE ARI SİNDİRİM SİSTEMİNDEN POTANSİYEL PROBİYOTİK FRUKTOFİLİK LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Mehmet BAL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2020

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI BİTKİLERDEN VE ARI SİNDİRİM SİSTEMİNDEN POTANSİYEL PROBİYOTİK FRUKTOFİLİK LAKTİK ASİTBAKTERİLERİNİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Mehmet BAL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Çalışmanın amacı, 8 farklı kaynaktan (arı sindirim sistemi, yer elması meyvesi, fındık yaprağı, üzüm, domates, beyaz dut, armut, kivi) izole edilen ve fruktofilik özellikteki laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanılabilmelerine yönelik niteliklerinin araştırılmasıdır. Söz konusu kaynaklardan izole edilen çok sayıda izolat içerisinden ilk etapta katalaz negatif ve Gram-pozitif reaksiyon veren 10 adet bakteri seçilmiştir. Seçilen bakterilerin ilk aşamada hücre morfolojileri, genotipik özellikleri (RAPD-PZR, 16S rRNA dizileme) belirlenmiştir. Çalışma kapsamına dahil edilmiş fruktofilik özellikteki izolatlar *Enterococcus faecalis* olarak tanımlanmıştır. İlgili izolatların filogenetik analizleri gerçekleştirilmiş ve arı gastrointestinal sisteminden izole edilenler ile farklı bitkisel kaynaklardan izole edilen izolatlar birbirinden ayrı kladlar içerisinde toplanmıştır. Fenotipik ve genotipik karakteristikleri tanımlanan izolatlar daha sonrasında probiyotik özellikleri itibariyle test edilmiştir. Bu bağlamda izolatların asit, pepsin ve pankreatin direnç profilleri çıkartılmıştır. Özellikle, 1, 7, 8 ve A3 kodlu izolatlar yüksek bir direnç profili sergilemiştir. İlgili tez çalışmasında farklı bitkisel kaynaklardan da fruktofilik özellikli laktik asit bakterilerinin izole edilebileceği ve probiyotik potansiyel içerebilecekleri ilk kez gösterilmiştir.

Aralık 2020, 89 sayfa

Anahtar Kelimeler: Fruktofilik laktik asit bakterileri, probiyotik, mikrobiyal tiplendirme, antimikrobiyal, LAB

ABSTRACT

Master Thesis

ANTI ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF POTENTIAL PROBIOTIC FRUCTOPHILIC LACTIC ACID BACTERIA FROM DIFFERENT PLANTS AND BEE DIGESTIVE SYSTEM

Mehmet BAL

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

Supervisor: Prof. Dr. Özlem OSMANAGAOĞLU

The aim of the study is to investigate the probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from 8 different sources (bee digestive system, Jerusalem artichoke fruit, hazelnut leaf, grape, tomato, white mulberry, pear, kiwi) and having fructophilic properties. Among the many isolates isolated from these sources, 10 bacteria that gave catalase negative and Gram-positive reactions were selected in the first stage. Cell morphology, genotypic characteristics (RAPD-PCR, 16S rRNA sequencing) of the selected bacteria were determined later. Fructophilic isolates selected for this study were defined as *Enterococcus faecalis*. Phylogenetic analyzes of the relevant isolates were carried out and those isolated from bee gastrointestinal system and isolates originated from different plant sources were collected in separate clades. Isolates whose phenotypic and genotypic characteristics were defined were then tested for their probiotic properties. In this context, acid, pepsin and pancreatin resistance profiles of the isolates have been evaluated. Especially, 1, 7, 8, and A3 coded isolates displayed high resistance profile against acid and bile. In the thesis, it was revealed that lactic acid bacteria with fructophilic properties and probiotic potential can be isolated from different plant sources for the first time.

December 2020, 89 pages

Key Words: Fructophilic lactic acid bacteria, probiotic, microbial identification, antimicrobial, LAB

TEŞEKKÜR

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

Çalışmalarımda bilgilerini, yardımlarını ve güler yüzlerini hiçbir zaman esirgemeyen sayın Dr. Harun ÖNLÜ' ye (Muş Alparslan Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı),

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

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

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mehmet BAL
Ankara Aralık 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI
ETİK i
ÖZET ii
ABSTRACT iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
ÇİZELGELER DİZİNİ x
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 3
2.1 Probiyotik Bakteriler 3
2.1.1 Probiyotiklerin tanımı ve tarihçesi 3
2.1.2 Probiyotiklerin güvenilirlik ve seçim kriterleri 4
2.1.3 Probiyotiklerin yararlı etkileri 6
2.1.4 Probiyotiklerin etki mekanizması 9
2.1.5 Probiyotiklerin kullanım alanları 11
2.2 Fruktofilik Laktik Asit Bakterileri 12
2.2.1 Tarihsel Gelişim Süreci 14
2.2.2 Biyokimyasal Özellikler 15
2.2.3 Fruktofilik Laktik Asit Bakterilerinin Endüstriyel Uygulamaları 16
2.3 Prebiyotikler 18
2.4 Fonksiyonel Gıdalar 18
2.5 İntestinal Mikroflora 20
3. MATERYAL VE YÖNTEM 21
3.1 MATERYAL 21
3.1.1 Farklı kaynaklardan örneklerin toplanması ve laktik asit bakterisi izolasyonu 21
3.1.2 Tamponlar ve çözeltiler 22
3.1.3 Çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu 22
3.2 Yöntem 22
3.2.1 İzolatların karakteizasyonu 22
3.2.1.1 İzolatların kısmi karakterizasyonu 22
3.2.1.1.1 Basit boyama 23
3.2.1.1.2 Gram boyama 23
3.2.1.1.3 Katalaz testi. 23
3.2.2.1 İzolatların genotipik karakterizasyonu 24
3.2.2.2 Genomik DNA izolasyonu 24
3.2.2.3 Saflık ve miktar tayini 24
3.2.2.4 Agaroz jel elektroforezi. 25
3.2.2.5 İzolatların RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNAs) PZR profillerinin belirlenmesi 25
3.2.2.6 İzolatların 16S rDNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyonu 26
3.2.2.7 16S rDNA dizi analizi 27
3.3 Suşların bakteriyosin üretim özelliklerinin belirlenmesi. 27
3.4 İzole edilen LAB suşlarının bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi 28

3.4.1 Suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi 28
3.4.2 Suşların pH değerlerine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi 29
3.4.3 Suşların pepsine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi 29
3.4.4 Pankreatine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi 30
3.4.5 Safra tuzuna karşı direnç özelliğinin belirlenmesi 30
3.4.6 Suşların hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi 31
3.5 İstatistiksel analizler 31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 32
4.1 Farklı Kaynaklardan Bakterilerin İzolasyonu 32
4.2 İzolatların kısmi karakterizasyonu 33
4.3 İzolatların genotipik karakterizasyonu 35
4.4 Suşların Bakteriyosin Üretim Özellikleri. 41
4.4 Farklı Kaynaklardan İzole Edilen FLAB Suşlarının Bazı Probiyotik Özellikleri 42
4.5.1 Düşük pH değerlerine karşı direnç özellikleri ..... .43
4.5.2 Pepsine karşı direnç 45
4.5.3 Pankreatin direnci 50
4.5.4 Safra tuzu direnci 51
4.5.5 Suşların hemolitik aktiviteleri 55
5.TARTIŞMA 60
KAYNAKLAR 67
EKLER 84
EK 1 Lab ve Hücre Kültürü Gelişimi için Kullanılan Kültür Ortamları 85
EK 2 Kimyasallar 87
ÖZGEÇMİŞ 89

SİMGELER DİZİNİ

g	Gram
kb	Kilobaz
L	Litre
log	Logaritma
M	Molar
mA	Miliamper
Mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
pH	Hidrojen konsantrasyonu logaritması
rpm	Dakikada devir sayısı
sn	Saniye
UV	Ultra viyole
V	Volt
µL	Mikrolitre
µm	Mikromolar
°C	Santigrat (Celcius) derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

bç	Baz çifti
CD	Crohn rahatsızlığı
DH	Dendritik Hücreler
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
EFSA	European Food Safety Authority (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi)
EtBr	Etidyum Bromit
FAO	Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
FLAB	Fruktofilik laktik asit bakterisi
FYP	Fruktoz Maya Peptonu
GİS	Gastrointestinal Sistem
GRAS	Generally Recognized as Safe (Genellikle Güvenli Kabul Edilen)
GUT	Gastroinstestinal boşluklarından
İBH	İnflamatuar Bağırsak Hastalıkları
İEH	İntestinal epitel hücreleri
kob	Koloni oluşturan birim (cfu)
LAB	Laktik asit bakterileri
LPS	Lipopolisakkarit
LTA	Lipoteikoik asit
MAMP	Mikroorganizma kaynaklı moleküler paternler

MRS	De Man Rogosa
PBS	Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
PGN	Peptidoglikan
PRR	Pattern tanıyan reseptörlere
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
rDNA	Ribozomal DNA Ribonükleik Asit
TLR	Toll-like reseptörleri
UC	Ülseratif Kolit
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 LAB'larda şeker metabolizmasındaki elektron akışı ve yolaklar 17
Şekil 4.1 Laktik asit bakterisi izolatlarının Gram reaksiyonları ve hücre morfolojileri . 34
Şekil 4.2 Saflaştırılan genomik DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri 35
Şekil 4.3 Laktik asit bakterisi izolatlarının çoğaltılmış 16s rRNA bölgeleri 36
Şekil 4.4 1 kodlu izolatın BLAST sonuçları 37
Şekil 4.5 6 kodlu izolatın BLAST sonuçları 37
Şekil 4.6 7 kodlu izolatın BLAST sonuçları 38
Şekil 4.7 8 kodlu izolatın BLAST sonuçları 38
Şekil 4.8 9 kodlu izolatın BLAST sonuçları 38
Şekil 4.9 10 kodlu izolatın BLAST sonuçları 39
Şekil 4.10 A1 kodlu izolatın BLAST sonuçları 39
Şekil 4.11 A3 kodlu izolatın BLAST sonuçları 39
Şekil 4.12 A4 kodlu izolatın BLAST sonuçları 40
Şekil 4.13 A6 kodlu izolatın BLAST sonuçları 40
Şekil 4.14 Laktik asit bakterisi izolatlarının filogenetik analiz..... 41
Şekil 4.15 A6 kodlu izolatın pepsin direnç profili 45
Şekil 4.16 A4 kodlu izolatın pepsin direnç profili 46
Şekil 4.17 9 kodlu izolatın pepsin direnç profili 46
Şekil 4.18 8 kodlu izolatın pepsin direnç profili 47
Şekil 4.19 A1 kodlu izolatın pepsin direnç profili 47
Şekil 4.20 1 kodlu izolatın pepsin direnç profili 48
Şekil 4.21 10 kodlu izolatın pepsin direnç profili 48
Şekil 4.22 7 kodlu izolatın pepsin direnç profili 49
Şekil 4.23 6 kodlu izolatın pepsin direnç profili 49
Şekil 4.24 A3 kodlu izolatın pepsin direnç profili 50
Şekil 4.25 1 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci 53
Şekil 4.26 6 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci 54
Şekil 4.27 7 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci 54
Şekil 4.28 8 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci 55
Şekil 4.29 9 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci 55
Şekil 4.30 10 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci 56
Şekil 4.31 A1 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci 56
Şekil 4.32 A3 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci 57
Şekil 4.33 A4 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci 57
Şekil 4.34 A6 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci 58
Şekil 4.35 İzolatların hemolitik aktivite görüntüleri 59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 İzolatların antibiyogram testinde kullanılan antibiyotikler 28
Çizelge 4.1 İlk aşamada izole edilen laktik asit bakterileri ve izolasyon kaynakarı 32
Çizelge 4.2 İzolatların kısmi karakterizasyon sonuçları 33
Çizelge 4.3 Laktik asit izolatlarının saflaştırılan genomik DNAları ve konsantrasyonları 35
Çizelge 4.4 İzolatların 16S rRNA dizilerinin veritabanındaki eşleştirme sonuçları 41
Çizelge 4.5 Laktik asit bakterisi izolatlarının bakteriyosin etkinlikleri 42
Çizelge 4.6 İzole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyogram (disk difüzyon) test Sonuçları 43
Çizelge 4.7 Laktik asit bakterisi izolatlarının pH direnç sonuçları 44
Çizelge 4.8 Laktik asit bakterisi izolatlarının pankreatin direnç sonuçları 51
Çizelge 4.9 1, 6, 7 ve 8 kodlu izolatların safra tuzu direnç profilleri (yüzde; % azalma). 52
Çizelge 4.10 9, 10, A1 ve A3 kodlu izolatların safra tuzu direnç profilleri (yüzde; % azalma) 52
Çizelge 4.11 A4 ve A6 kodlu izolatların safra tuzu direnç profilleri (yüzde; % azalma) 53

1. GİRİŞ

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

Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin (LAB) sağlığa yararlı oldukları inancından ötürü fermente ürünlerde kullanımı, yüzlerce yıl öncesine dayanmaktadır. Yirminci yüzyılın başlarında Elie Metchnikoff, probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterileri üzerinde ilk çalışmaları gerçekleştirmiştir (P.Mackowiak vd 2013). Probiyotik bakterilerden *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Enterococcus*, ayrıca bir maya olan *Saccharomyces cerevisia* gıdalara ilave edilen mikroorganizmalardır. Gıdalarda tüketilmelerini takiben normal floranın bir parçası olan bu mikroorganizmaların sayısı normal flora içerisinde hızla artabilmektedir. Bundan dolayı, bu bakteriler güvenli olarak kabul edilegelmiştir. Ayrıca probiyotiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri birçok hayvan modelli çalışmada ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir (Federico vd. 2010).

LAB'lar gastrointestinal sistem (GİS) florasında doğal olarak bulunmaktadır ve bu özellikleri probiyotik olarak kullanılmalarına imkân vermektedir. Bununla birlikte, bu bakterilerin antimikrobiyal maddeler üretebilmeleri, intestinal mukozaya tutunma becerileri, biyolojik aminleri üretmemeleri, antibiyotik duyarlılık profilleri ve mevcut pankreatik enzimleri tolere edebilme yetenekleri güvenilir probiyotikler olarak kullanılmalarına olanak sağlamaktadır (Rubio vd. 2013). Probiyotiklerin olumlu etkilerini sergileyebilmeleri için GİS'e ulaşan canlı bakteri sayısının yaklaşık 10^{10}kob değerinde olmaları gerekmektedir. Probiyotik suşun GİS'e canlı bir şekilde ulaşabilmesi için mevcut mide asidine, pankreatik enzimlere ve olumsuz çevre koşullarına karşı dirençli olması gerekmektedir. Ayrıca bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kabul edilebilmesi için; patojenik olmaması, genetik olarak kararlı olması, immünomodülatör

etkilere sahip olması, GİS ortam şartlarına dirençli olması, fermantasyon aşamalarındaki işlemlere ve raf ömrü süresince bulunduğu saklama koşullarına dayanıklı olması gibi probiyotik seçim kriterlerine sahip olması gerekmektedir. LAB'lar doğal olarak GİS florasında bulunduklarından ve uzun yıllardır güvenli bir şekilde fermente gıdaların üretiminde kullanıldıklarından dolayı en iyi probiyotik adayları olarak kabul edilmektedirler (Saarela vd. 2000, Vizoso-Pinto vd. 2006). Günümüzde birçok LAB suşunun probiyotik olarak tanımlanmış olmasına ve kullanılıyor olmasına rağmen, ticari amaçlara uygun mikroorganizmaların doğal kaynaklardan izolasyonu, yeni ve daha etkin probiyotiklerin elde edilmesi için en güçlü yaklaşımlardan biridir. Bu nedenle doğal nitelikli yeni ve etkin probiyotik suşların izolasyonu daima önem arz etmektedir.

Bu çalışmada; farklı kaynaklardan (arı sindirim sistemi ve bitki örnekleri) fruktofilik laktik asit bakterileri izole edilerek tanımlanmıştır. Suş düzeyinde tanımlanan bakterilerin probiyotik seçim kriterlerine uygunlukları ve bazı probiyotik özellikleri araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Probiyotik Bakteriler

2.1.1 Probiyotiklerin tanımı ve tarihçesi

Günümüzde mikroorganizmaların diğer mikroorganizmalarla antagonistik ilişkilerinin anlaşılmasına dair yapılan çalışmaların artması sonucunda, bazı hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde antagonistik etkiye sahip mikroorganizmaların kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle doğal olan probiyotikler üzerinde yapılan çalışmalara da aynı oranda ilgi artmaya başlamıştır (Kopp-Hoolihan 2001, Ouwehand vd. 2002, Broussard ve Surawicz 2004, Vanderhoof ve Young 2005, Floch ve Montrose 2005).

Probiyotik terimi 1960'larda yeniden gündeme gelmiştir. Probiyotik kelimesi Latince "pro" ve "bios" kelimelerinden türetilmiş ve "yaşam için" anlamına gelmekte olup uzun yıllardır kullanılan bir kelimedir ve antibiyotik teriminin anlamca karşıtıdır (Gomes ve Malcata 1999).

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

Fuller 1989 yılında, probiyotik terimini daha kabul gören bir hale getirmiş ve probiyotiklerin bireylerin intestinal mikroflorasını koruyan canlı mikrobiyal gıda içerikleri olarak tanımlamıştır (Fuller 1989). FAO ve WHO ise 2002 yılında probiyotikleri, uygun miktarlarda alındıklarında konukçu sağlığı üzerinde olumlu

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

Probiyotik bakteriler farklı maya suşlarını ve bakteriyel suşları içermektedir. Günümüzde birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmaktadır. Probiyotik olarak kullanılan organizmalar içerisinde en önemli grubu LAB'lar oluşturmaktadır (Schaafsma 1996). LAB'ların çok uzun yıllardan beri fermente gıdaların üretiminde kullanılmaları ve bu gıdalarla birlikte tüketilmeleri LAB'ların güvenli (GRAS) kabul edilmeleri sonucunu doğurmuştur (Caplice ve Ray 1992, Wood ve Holzapfel 1995, Wood 1997, Fitzgerald 1999, Abriouel vd. 2012). LAB grubu laktobasil, lökonostok, pediokok, streptokok, laktokok ve bifidobakteri gibi cinsleri içermektedir. LAB'lar gastrointestinal sistem (GİS) florasında doğal olarak bulunmaktadır ve bu özellikleri probiyotik olarak kullanılmalarına daha çok imkân vermektedir (Rubio vd. 2013). Laktik asit bakterileri laktik asit fermantasyonuyla oluşturdukları ürünlerin cinsine göre iki gruba ayrılırlar: homofermentatif laktik asit bakterileri ve heterofermentatif laktik asit bakterileri. Homofermentatif bakteriler (ör: *Lactobacillus acidophilus*) laktik asit üretirken, heterofermentatif bakteriler laktik aside ek olarak, karbondioksit, ethanol veya asetik asit üretmektedirler (Drinan vd. 1976, Prescott vd. 1987, Halkman vd. 1991).

2.1.2 Probiyotiklerin güvenilirlik ve seçim kriterleri

Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmalarda bazı özellikler aranmaktadır. Öncelikle güvenilir olmaları ve kullanıldıkları insan ve hayvanlarda yan etki oluşturmamaları gerekir. Probiyotik bir mikroorganizmanın tanımı için zorunlu kriterler,

LABIP (Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu) tarafından belirlenmiştir (Guarner ve Schaafsma 1998, Ewaschuk ve Dieleman 2006). Buna göre probiyotik potansiyeli taşıyan mikroorganizmalar:

- İnsan orjinli olmalıdır.
- Patojen ve toksijenik özellik içermemelidir.
- Gastrik asit ve safra tuzuna direnç göstermelidir.
- Bağırsak epitel dokularına tutunmalıdır.
- Gastrointestinal sistemde sürekliliğini devam ettirebilmelidir.
- Antimikrobiyal bileşikler üretebilmelidir.
- İmmünomodülatör etkilere sahip olmalıdır.
- Metabolik etki kabiliyeti olmalıdır (kolesterol asimilasyonu, laktaz aktivitesi, vitamin üretimi).
- Patojenlerin reseptörlere tutunmasına engel olmalıdır.
- Genetik olarak kararlı mikroorganizmalar olmalıdır.

Ayrıca probiyotiklerde gıda alerjilerine ve patojenlere karşı immün sistemi güçlendirmesi, aktarılabilir antibiyotik direnç genlerine sahip olmaması ve daha sayılmayan benzer pek çok özellik de aranmaktadır. Probiyotik suşların seçiminde dikkat edilmesi gereken önemli kriter ise, kullanılacak suşun canlı formda hazırlanabilmesi ve gastrointestinal sisteme ulaşana kadar karşılaşmış olduğu koşullar altında canlılığını devam ettirebilmesidir. Kullanılacak suş, gıdalarda ve klinikte kullanılması açısından güvenilir olmalı, intestinal ekosisteme canlı olarak ulaşabilmeli, canlılığını devam ettirmeli, stabilitesini korumalı ve antimikrobiyal maddeler üretebilmeli ayrıca klinik olarak doğrulanmış ve belgelenmiş sağlık üzerinde olumlu etkiler gösterebilmelidir. Probiyotik suşların insan kökenli olmalarının önemi son zamanlarda tartışma konusu olmuştur. Ancak en güncel başarılı probiyotik suşların insan kaynaklı olduğu belirtilmiştir. Doğal olarak GİS florasında bulunnanlar ve uzun yıllardır güvenli bir şekilde fermente gıdaların üretiminde kullanılanlar en iyi probiyotik adayları olarak kabul edilmektedirler (Saarela vd. 2000, Vizoso-Pinto vd. 2006). Pek çok farklı kaynaktan laktik asit bakterisi izole edilebilir. Farklı kaynaklar, farklı profilde mikrobiyotalara sahiptir. Yani farklı kaynaklardan farklı türde laktik asit bakterileri

izole edilebilir. Fermente gıda ürünlerinde genellikle laktokok, laktobasil, pediokok, streptokok ve lökonostok cinsilerine ait laktik asit bakterileri bulunurken, klinik örneklerde ve gaita örneklerinde daha çok enterekoklar, laktobasiller ve bifidobakteriler bulunmaktadır.

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

Probiyotik ürün oluşturmak amacıyla yeni cins ve türlerin seçiminde FAO/WHO tarafından önerilen, uyulması zorunlu güvenlik kriterlerine dikkat edilmesi gerekmektedir. Güvenilir bir probiyotik seçiminde en önemli kriter; suşun tanımlanmış olmasıdır. Bu amaçla DNA-DNA hibridizasyonu veya 16S rRNA dizi analiz teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Probiyotik özellik gösteren bir bakteri, patojen suşlara da sahip bir türün üyesi ise detaylı bir klinik tanının yapılması gerekmektedir. Dikkat edilmesi gereken bir diğer güvenlik kriteri de, antibiyotik direnç genlerini taşıyıp aktarabilen ve intestinal sistemde mukozal yapıya zarar veren suşların probiyotik olarak kullanılmamasıdır (Anonymous 2001).

2.1.3 Probiyotiklerin yararlı etkileri

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

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

Probiyotiklerin antimutajenik, antikarsinojenik, hipokolesterolemik, antihipertansif, anti-osteoporoz ve immünomodülatör etkilerinin de bulunduğu rapor edilmiştir (Chiang ve Pan 2012). Ayrıca probiyotikler; inflammatuar bağırsak hastalıkları, irritabl bağırsak sendromu, kolit, alkolik karaciğer rahatsızlığı, kabızlık semptomlarının azaltılması, kolon, karaciğer ve göğüs kanserleri gibi hastalıkların riskinin azalmasına katkı sağlamaktadır. Crohn rahatsızlığı (CD) ve ülseratif kolit (UC) gibi inflamatuar bağırsak hastalıkları (İBH) intestinal bölgede inflamasyon geliştiren kronik hastalıklardır. Bu hastalıklar gelişmiş ülkelerde artan bir yayılış göstermektedir. Söz konusu hastalıklarda genetik, çevresel ve immünoregülatör faktörlerin yanı sıra enterik mikrobiyotanın da önemli bir rol oynadığı görülmektedir (Prado vd. 2008).

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

Yapılan araştırmalar kanser hastalığı üzerinde beslenmenin önemli bir etken olduğunu göstermektedir (Williams ve Wynder 1996). Buna karşın probiyotik bakterilerle hazırlanan diyetlerin kanser riskini azaltabildiği ispatlanmıştır (Hirayama ve Rafter 1999). Araştırmalar probiyotik bakterilerin bağırsaklarda ve diğer organlarda mutajenik ve genotoksik etkileri engelleyebildiğini ortaya koymuştur (Sanders vd. 1999).

Probiyotiklerin genel olarak bilinen yararlı etkilerinden bazılarını maddeler halinde sıralayacak olursak:

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

Hatakka vd. (2001) araştırmalarında, uzun süreli probiyotik süt kullanımının, gündüz bakım evindeki çocuklarda çok sık görülen solunum yolları ve gastrointestinal enfeksiyonlar üzerindeki etkilerini çift kontrollü denemelerle incelemişlerdir. Araştırmada elde edilen sonuçlara göre *L. rhamnosus* GG katılarak verilen sütü tüketen çocuklarda rotavirüsten kaynaklanan diyarenin şiddetinin azaltıldığı, antibiyotik kullanımından kaynaklanan diyarenin ise önemli ölçüde önlendiği tespit edilmiş, ancak solunum yolu enfeksiyonlarının önlenmesinde, bu suşun daha az etkili olduğu belirlenmiştir. Laktobasiller vajina normal florasının en önemli grubunu oluşturmaktadır (Ocaña vd. 1999). Bu bakterilerin, üretmiş oldukları bakteriyosin, laktik asit ve hidrojen peroksit ile patojenlerin kolonizasyonuna engel oldukları, birçok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır (McFarland ve Elmer 1997, Sönmez vd. 1999, Reid 2000, Çakır ve Çakmakçı 2002).

Probiyotiklerin bütün bu yararlı etkileri arasında laktoz intoleransını düzenleyici etkisi önem taşımaktadır. Laktoz intoleransı probiyotik ürün kullanımı ile tedavi edilebilecek çok önemli bir sağlık sorunudur. Bu sorun laktozun laktaz enzim kompleksi ile parçalanıp sindirilememesi sonucu ortaya çıkan bir bozukluktur. Cerrahi operasyon,

bağırsak düzensizlikleri ve antibiyotik tedavisi gibi faktörler vücudun laktaz üretimini azaltabilmektedir. Laktozu kullanan bakteriler ve oluşturdukları yan ürünler karın krampları, bulantı, diyare ve kusmaya neden olmaktadır. *Lactobacillus, Bifidobacterium* ve *Streptococcus* gibi laktaz pozitif probiyotik bakteri türleri, genellikle pastörize süt ürünlerine ilâve edildiklerinde bu ürünlerdeki laktoz sindirimini arttırmaktadırlar. Bu durum probiyotik olmayan bakteriler tarafından laktozun kullanılması sonucunda açığa çıkabilecek sorınların ortadan kalkmasına yardımcı olabilmektedir (Murray 1998, Sanders 1999, Rolfe 2000).

Probiyotik bakterilerin immünomodülatör potansiyelleri; diyareden alerjiye kadar değişiklik gösteren çeşitli kompleks rahatsızlıklardaki önleyici ve iyileştirici özellikleri açısından giderek artan bir ilgi uyandırmaktadır.

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

2.1.4 Probiyotiklerin etki mekanizması

Probiyotiklerin moleküler mekanizmalarıyla ilgili birçok hipotez, deneysel verilerle desteklenmektedir. Bu mekanizmaların daha iyi anlaşılması farklı klinik verilerin yorumlanmasına yardım edecek ve özel uygulamaları hedefleyen klinik çalışmalar için en uygun probiyotik suşların seçimine yardımcı olacaktır. Probiyotiklerle ilişkili sağlık iddiaları konusundaki endüstriyel ilgi, konakçı probiyotik interaksiyonları üzerindeki moleküler araştırmaları tetikleyen en önemli etkendir. Bu mikroorganizmaların hücre yüzey molekülleri ve hücre dışı komponentleri, konakçıya etkileri açısından çalışılmaktadır. Probiyotiklerin yararlı etkilerinin çoğu GİS'de meydana gelir. GİS bakterileri ile doğrudan etkileşimde bulunan dendritik hücreler (DH) ve intestinal epitel hücreleri (İEH) gibi hücreler Toll-like reseptörleri (TLR) gibi farklı pattern tanıyan reseptörlere (PRR) sahiptir. PRR'ler lipopolisakkarit (LPS), flagellin, lipoteikoik asit

(LTA), peptidoglikan gibi bakteriyel yüzey moleküllerinde ama aynı zamanda bakteriyel DNA'da da meydana gelebilen mikroorganizma kaynaklı moleküler paternleri (MAMP) tanır. Bir MAMP ve PRR arasındaki interaksiyon sonuç olarak İEH'lerde müsin üretimi, sitokin ifadesi veya DH'lerde antijen sunumu için moleküllerde artışa neden olan bir sinyal basamağıyla sonuçlanır. Konakçının spesifik bir hücresinin karşılaşılan bakterilere karşı tepkisi tek bir MAMP-PRR etkileşimiyle değil, birçok MAMP-PRR etkileşimiyle belirlenir. Probiyotik bakteriler, çeşitli MAMP'lar içerdiğinden, bunların kullanımı bu MAMP-PRR etkileşimlerini modüle edebilir ve uyarlayabilir.

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

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

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

1. İnhibe edici maddeler üreterek: Probiyotikler, Gram-pozitif ve Gram-negatif mikroorganizmalar üzerinde etkili birçok madde üretmektedir. Bunlardan bazıları organik asitler, hidrojen peroksit, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddelerdir.

2. Tutunma bölgelerini bloke ederek: Probiyotikler tutunma bölgeleri için patojenlerle rekabete girerek, intestinal sistemde patojenlerin yerleşmelerini engellemektedirler.
3. Besin maddeleri için rekabet: Probiyotikler patojenler için de gerekli olan besin maddelerini tüketerek, onların sistemde uzun süre kalmasını engellemektedirler.
4. Toksin reseptörlerinin yıkımı: Bu mekanizma hayvanlarda *S. boulardii*' nin intestinal mukozada bulunan *Clostridium difficile*'nin toksin reseptörlerini parçalayarak konakçıyı koruması nedeniyle ortaya atılmıştır (Castagliuola vd. 1999).
5. Bağışıklık sistemini güçlendirmesi: Son yıllarda yapılan çalışmalar probiyotiklerin özgül ve özgül olmayan bağışıklık sistemini güçlendirerek intestinal hastalıklara karşı konakçıyı koruduğunu ortaya koymuştur (Fukushima vd 1998).

2.1.5 Probiyotiklerin kullanım alanları

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

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

Diyare; Probiyotikler günümüzde antibiyotik ilişkili diyareler, enfeksiyöz etkenlere bağlı diyare tedavisinde kullanılmaktadır. Yapılan birçok klinik çalışmada oral olarak

alınan probiyotiklerin, kolonda kolonize olarak patojen mikroorganizmaların sayısını azalttığı ve diyare gelişimini önlediği gösterilmiştir. Enfeksiyöz etkenlere bağlı diyare tedavilerinde de probiyotikler oldukça sık kullanılmaktadır. Özellikle çocuklarda akut enfeksiyöz diyarelerin başlıca sebebi olan rotavirüs enfeksiyonlarında kullanılan *Lactobacillus* GG'in enfeksiyon süresini kısalttığını göstermiştir (Van Niel vd. 2002). Diğer *E. coli* türleri ve *Vibrio cholerae*'ya bağlı ishal tedavilerinde probiyotiklerin etkili olduğu gösterilememiştir. Yetişkin gastroenteritlerinde de probiyotik kullanımının daha az etkili olduğu bilinmektedir (Brown vd. 2004).

İmmün sistem fonksiyonlarının korunması; *L. casei*, *L. acidophilus* ve *B. bifidus*, IgA salınımını arttırarak mukozal immün cevabı kuvvetlendirirler. Çok sayıda çalışmada mitojenlere karşı dalak hücrelerinde T ve B lenfosit çoğalmasını artırdıkları, sitokin cevabını etkiledikleri ve patojenlerin fagositozunu kolaylaştırdıkları gösterilmiştir.

2.2 Fruktofilik Laktik Asit Bakterileri

Fruktofilik laktik asit bakterileri (FLAB), Laktik asit bakterileri (LAB) içerisinde bir alt grup oluşturur. FLAB'lar tercihen substrat olarak fruktozu kullanır, glukozu tam olarak fermente edemezler ve ortamda bulunan piruvat, oksijen, fruktoz ile gelişme ve çoğalmaları önemli ölçüde artar. Bu grup üyeleri daha çok; çiçekler, meyveler, şarap ve kakao çekirdeği gibi fermente gıdalar ve böceklerin gastrointestinal sisteminde bulunur (Endo vd. 2012a, b). FLAB grubu bakterilerin sınıflandırılmasında, *Fructobacillus* spp. ve *Lactobacillus* spp. cinsleri yer almaktadır (Endo vd. 2009). *Fructobacillus* beş türden oluşur: *F. fructosus*, *F. pseudoficulneus*, *F. ficulneus*, *F. durionis* ve *F. tropaeoli* (Endo vd. 2015). *F. fructosus* ve *F. pseudoficulneus*, doğal kaynaklarda en sık tespit edilen türlerdir (Endo vd. 2012b). *Lactobacillus* cinsinden FLAB üyeleri *L. kunkeei*, *L. apinorum* ve *L. florum*'dur (Naveling vd. 2012). Yapılan çalışmalarda, gıdayla alınan ve ısı ile inaktif hale getirilmiş *L. kunkeei'nin* bağırsak peristaltiğini artırdığı ve immünoglobulin A üretimi gibi immunitede yararlı etkilere sahip olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, *B. xylanisolvens*'lerde olduğu gibi, *L. kunkeei*'nin, gıda endüstrisinde ısıl işleme tabi tutulmuş formda kullanılabileceği düşünülmektedir. Gıda endüstrisinde çok

yaygın olarak kullanılan LAB'lar ile olan yakın filogenetik ilişkileri, EFSA tarafından QPS listesine dahil edilmesi olasılığını gündeme getirmiştir (Asama vd. 2012).

Son zamanlarda FLAB açısından bal arıları ve bu arılardan elde edilen ürünler (propolis, arı sütü) ve özellikle tozlaşma sonucu elde edilen ürünler ekolojik önem taşımaktadır. Dünya çapında bir artış olmasına rağmen FAO verilerine göre arı popülasyonunun sıkıntılarla karşı karşıya kalmaları söz konusudur (Aizen and Harder 2009). Bu azalmayı daha iyi anlayabilmek ve önlemek için, simbiyotik ve patojenik etkileşimleri ele alan birçok çalışma incelenmiştir (Vasquez vd. 2012, Kwong ve Moran 2016). Verilere göre, bal arılarının gastrointestinal sisteminde insanlarda dahil olmak üzere hiçbir hayvana benzemeyen bir çekirdek mikrobiyotası içerdiği belirtilmiştir (Vásquez vd. 2008, Kwong ve Moran, 2016). FLAB ve bal arılarının gastrointestinal sistemle güçlü bir ilişkisi olduğu düşünülmekle birlikte bağırsak sisteminde; probiyotik bakterilerle, yabancı antijenler ya da patojenlerin kommensal bir yaşam sürdürmeleri, bu bakterilerin yer değişimini sınırlandırması sonucu bağırsak fonksiyonunun arttığı sonucuna varılmıştır (Vásquez vd. 2008, Vasquez vd. 2012, Endo ve Salminen, 2013). Fruktofilik Laktik Asit bakterileri Fruktoz-Maya ekstratı- Polipepton besi ortamında karbon kaynağı olarak fruktozu kullanarak büyüme eğilimi göstermektedir (Endo vd. 2009). Fruktoz varlığında çok iyi gelişme gösteren FLAB aslında glukoz varlığında çok iyi olmasa da gelişme göstermektedir. Bu durum elektron alıcıları (örn, pirüvat, oksijen) varlığında gerçekleşmektedir (Maeno vd. 2016). FLAB türleri kimyasal özelliklerine göre obligat (zorunlu) ve fakültatif fruktofilik laktik asit bakterileri olarak iki gruba ayrılmaktadırlar (Endo vb. 2009). Zorunlu FLAB; fruktozda iyi büyüme gösterirken, glukoz varlığında da büyümeleri ancak dış elektron alıcıları olduğu müddetçe mümkündür. Bu türler glukozu neredeyse eş molar miktarda laktik asite ve iz miktarda etanole dönüştürür. Etanolün düşük olarak sentezlenmesi, asetaldehit dehidrogenazın bulunmasından ve zayıf alkol dehidrogenez aktivitesinden kaynaklanmaktadır (Endo vd. 2009, Endo vd. 2014). Fakültatif FLAB ise, fruktozlu ortamda iyi gelişme gösterip, glukozlu ortamda da elektron alıcıları olmadığı durumda gecikmeli de olsa büyüme göstermektedirler (Endo vd. 2009). Bu grup genellikle *Lactobacillus florum* ve birkaç *Lactobacillus* biyotipi içermektedir (Endo vd. 2010, Neveling vd. 2012, Mtshali vd. 2012, Kim vd. 2013).

Yeni keşfedilen bir grup olan Fruktofilik laktik asit bakterileri ve bunların ekolojik potansiyelleri araştırma noktasında henüz başlangıç aşamalarındadır. Bu türler, LAB grubuna dahil olduklarından dolayı güvenlik değerlendirmelerinden sonra güvenilir statüsüne dahil olmuşlardır. Onay alındıktan sonra gıda endüstrisi gibi birçok alanda uygulamalara dahil edilebileceklerdir (Filannino vd. 2019)

2.2.1 Tarihsel gelişim süreci

Fructobacillus fructosus ilk olarak Kodama (1956) tarafından tanımlanmış olup suşun hangi çiçekten izole edildiğine yayımlanan makalede yer verilmemiştir. *Lactobacillus fructosus*'un taksonomisi filogenetik özelliklerine bağlı olarak birbiri arasında ilişkisi olan *Leuconostoc ficulneum*, 2002 yılında olgunlaşmış incirden izole edilerek aralarındaki bağıntı tekrar değerlendirilmiştir (Antunes vd. 2002). *Lactobacillus fructosus* daha sonra filogenetik pozisyonuna bağlı olarak *Leuconostoc fructosum* olarak tekrardan sınıflandırılarak her iki türünde glukoz varlığında zayıf büyüme gösterdiği bilgisine varılmıştır. 2005 yılında Malezya'daki baharat çeşitlerinden *Leuconostoc durionis* izole edilmiştir (Leisner vd. 2005). Sonuçlanan raporlara göre *L. durionis*'in glukoz, ksiloz, sukroz ya da fruktozlu ortamda sınırlı oranda büyüme gösterdiği bildirilmiştir. Ancak Endo and Okada (2008)'nın yaptığı çalışmada bu türün fruktozu tercih eden suşlar olduğunu açıklamıştır. *Leuconostoc fructosum, Leuc. durionis, Leuc. ficulneum* ve *Leuc. pseudoficulneum* türlerinden sonra eşsiz morfolojik özelliğe sahip olan yeni bir tür *Fructobacillus* ortaya çıkmıştır (Endo ve Okada, 2008). Bu cinste beşinci tür olan *Fructobacillus tropaeoli, Tropaeolum majus* çiçeğinden izole edilerek karakterize edilmiştir (Endo vd. 2011).

Lactobacillus kunkeei 1998 yılında alkol fermantasyonu ile meydana gelen şaraptan izole edilmiştir (Edwards, 1998). O zamanlarda bu türlerin fruktofilik karakteristiğe sahip olduğu konusunda bildiri yoktu ama biyokimyasal özellikler bakımından taze baldan, çiçeklerden ve şaraptan izole edilen *Lactobacillus kunkeei'*nin 9 farklı suşundan bildirilenlerle benzerlik gösterdiği görülmüştür (Endo vd. 2010). Endo vd. (2010) yaptığı çalışmada çiçeklerden izole edilen *Lactobacillus florum* türünü FLAB olarak tanımlamıştır. *Lactobacillus florum* ilk fakültatif FLAB olarak tanımlanmakta olup

diğer FLAB türlerinden özellik bakımından farklılık göstermektedir (Endo vd. 2009; Endo vd. 2010). Sadece bu türlerde değil adaptasyon şartları farklı olan tüm canlıların biyokimyasal, fizyolojik özelliklerini anlamak için ayrıntılı bir araştırma ve tanımlama yapmak gerekmektedir.

2.2.2 Biyokimyasal özellikler

Fruktofilik Laktik asit bakterileri substrat olarak glukoz yerine fruktozu tercih eden laktik asit bakterilerinin spesifik bir grubudur (Endo vd. 2009). Glukoz genellikle diğer LAB için en iyi substrat olarak kullanılmakta ve bu sayede bu özelliğinden dolayı Fruktofilik laktik asit bakterilerini LAB'dan rahatlıkla ayırt edebilmek mümkündür. FLAB, büyüme özelliklerine göre zorunlu FLAB ve fakültatif FLAB olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Zorunlu FLAB, fruktozlu ortamda iyi büyümekte olup zayıf ta olsa glukoz bulunduran ortamda da gelişme gösterir (Endo vd. 2009). Fakat glukozlu ortamda büyüme gerçekleştirmek istenirse pirüvat veya fruktoz ile besleme yapıldığında aerobik koşullar altında gelişimi teşvik edilmektedir. Sebebi ise glukoz metabolize edildiğinde ortamda elektron alıcısına gereksinim duymasıdır. Bu durumda pirüvat, fruktoz ve oksijen dış elektron alıcısı görevini üstlenmektedir. Diğer LAB'a kıyasla, iki günlük aerobik inkübasyondan sonra koloni çapı 0,1 mm-0,2 mm arasında değişmektedir (Endo vd. 2009; Endo vd. 2011). *Fructobacillus* cinsi ve bütün *L. kunkeei, L. apinorum* türleri zorunlu FLAB olarak sınıflandırılmaktadır (Endo vd. 2018).

Fakültatif FLAB, oksijen veya pirüvat gibi elektron alıcıları mevcut olduğunda obligat Fruktofilik Laktik asit bakterilerine benzer olarak glukoz ve fruktozlu ortamda da gelişme göstermektedirler (Endo vd. 2009). Falültatif FLAB'ın tek tanınan türü *L. florum* olarak bilinmektedir (Endo vd. 2010). FLAB, heterofermantatif laktik asit bakterileri olarak sınıflandırılmakta ve laktat ile beraber kullanıldıkları zaman yan ürün üretmeleri söz konusu olabilmektedir. Zorunlu Fruktofilik laktik asit bakterilerinin diğer heterofermantatif LAB'da farklı olup yan ürün olarak Şekil 1'de görüldüğü üzere CO_2, asetat ve çok az miktarda etanol üretmektedirler (Endo ve Okada, 2008, Endo vd.2009).

Bu durumda etanolün laktata oranı % 5'ten az iken, hemen hemen eşit miktarda laktat ve asetat üretilmektedir. Sebebi ise, zorunlu FLAB'daki alkol/asetaldehit dehidrogenaz geninin silinmesiyle ilişkilendirilmektedir (Endo vd. 2014, Endo vd. 2015, Maeno vd. 2016).

Asetil fosfatın oluşabilmesi için Ksilüloz-5-fosfatın parçalanması gerekmektedir. Oluşan Asetil fosfat, asetil-CoA ve asetaldehit vasıtasıyla etanole dönüşümü sağlanmaktadır. Bu dönüşüm için adhE genini kodlayan adhE proteinine ihtiyaç duyulmaktadır (Koo vd. 2005). Bununla birlikte *Fructobacillus* türlerinin adhE genine sahip olduğuna dair yayınlamış bir veri bulunmamakta ve *Fructobacillus* türlerinin bu eksiklik nedeniyle etanol yerine asetik asit ürettiği bilinmektedir (Endo 2012).

2.2.3 Fruktofilik laktik asit bakterilerinin endüstriyel uygulamaları

Fruktofilik laktik asit bakterileri henüz yeni keşfedilmiş olmasına rağmen endüstriyel potansiyellerinin belirgin özelliklerden dolayı büyük ilgi uyandıracağı düşünülmektedir. Genel anlamda bu ilgiyi iki temel özelliğe dayandırmak mümkündür. Bu durum, fruktozu tercihi olarak kullanıp metabolize etmeleri ve ekolojik konumdaki sıra dışı kolonileşme özellikleriyle ilişkilendirilmektedir (Filannino vd. 2019). Fruktofilik laktik asit bakterileri, fruktanları fruktoza dönüştürebilme yeteneğine sahip olma yanısıra, oluşan fruktozları da metabolize edebilmektedirler. Laktik asit bakterilerinin hücre dışı fruktanaz aktivitesi nadir olarak görülmekte (Loponen ve Ganzle 2018) iken, Gobbetti vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada ekşi hamur fermantasyonu sırasında Fruktofilik laktik asit bakterilerinin aktiviteleri iyi tanımlanmamış olmasına rağmen fruktanları önemli ölçüde hidrolize etmesine katkıda bulunduklarını tespit etmiştir.

FLAB, bitki fermantasyonu sırasında açığa çıkan fenolik asit ve alkaloitler gibi sekonder metabolitleri dönüştürebilme yeteneğine sahiptirler (Şekil 2.1). Bu fonksiyonellik bitki bazlı fermente ürünlerin besin özelliklerini geliştirir. Bitki fermantasyonunda, fenolik bileşenlerin metabolize edilebilmeleri açısından FLAB oldukça büyük öneme sahiptir. Diğer yandan, metabolik faaliyet sonucu oluşan yeni ürünler insan sağlığı için fenolik bileşenlerden daha yararlı olabilmektedir (Filannino

vd. 2016). Genel olarak, fenolik asit ve türevleri yüksek biyolojik aktiviteye sahip olduklarından dolayı fermente edilmiş gıdalarda aromaya katkıda bulunabilmektedirler (Huang vd. 2004).

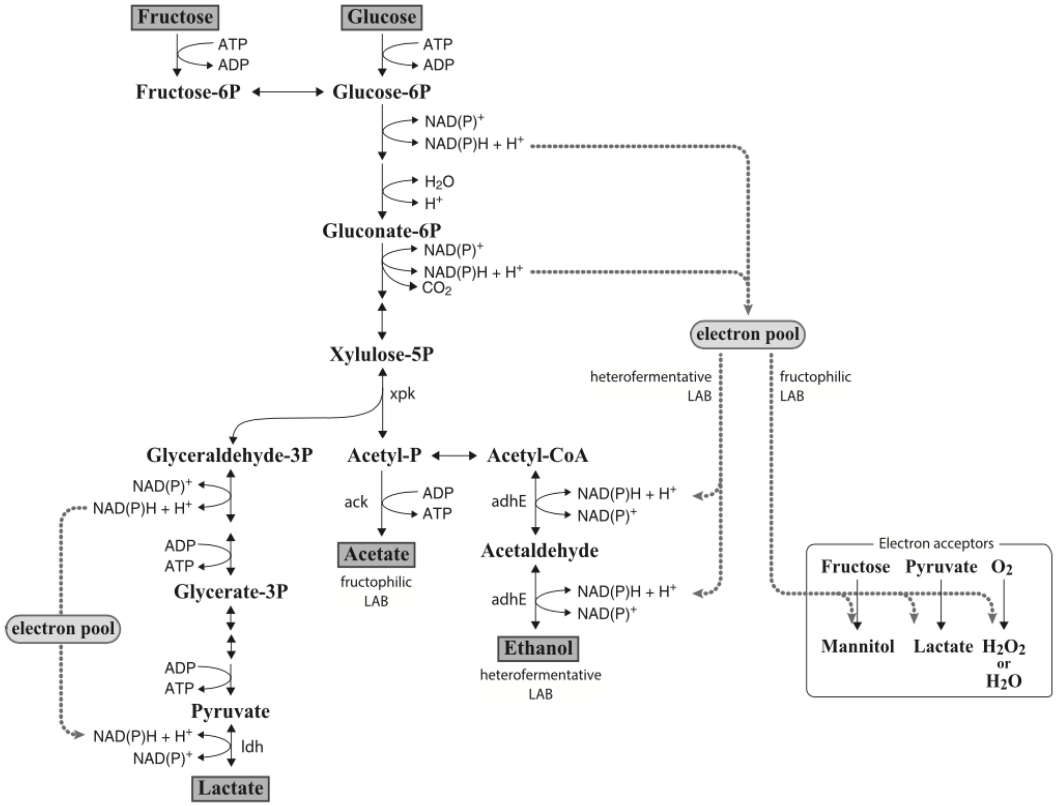


FIG 2 Pathways and electron flows for metabolism of fructose and glucose in typical heterofermentative LAB and obligate FLAB. Dotted lines represent electron flow. xpk, phosphoketolase; ack, acetate kinase; adhE, bifunctional alcohol/acetaldehyde dehydrogenase; ldh, lactate dehydrogenase. Compiled from data previously presented (29).

Şekil 2.1 Obligat FLAB ve tipik heterofermentatif LAB'larda fruktoz ve glukoz metabolizmasındaki elektron akışı ve yolaklar. Noktalı çizgiler elektron akışını, xpk'yi, fosketolaz (ack), asetat kinaz (adhE), iki fonksiyonlu alkol/asetaldehid dehidrojenaz (ldh) ve laktat dehidrojenaz yolaklarını temsil etmektedir.

Fruktofilik laktik asit bakterileri insanlar için probiyotik olabilme ihtimali olabildiğinden kullanımı önerilmiş olup *F. fructosus* bazı suşlarının probiyotik olma özellikleri vurgulanmıştır (Verón vd. 2017). Isı ile öldürülmüş *L. kunkeei* hücrelerinin uygulanmasıyla immunglobulin A sentezini uyardığını, bağırsak hareketlerini artırdığını ve grip virüsünü engellediği gösterilmiştir (Asama vd. 2015). Biyofilm oluşturan *L. kunkeii* suşlarının insanlarda çok çeşitli enfeksiyonlara sebep olan fırsatçı Gram-negatif

patojenlere ve *Pseudomaonas aeruginasa'* ya karşı inhibe edici etkisi olduğu Berríos Vd. (2018) tarafından tespit edilmiştir.

2.3 Prebiyotikler

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

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

2.4 Fonksiyonel Gıdalar

Fonksiyonel gıdalar son yıllarda hayatımızın önemli bir parçası haline gelmiştir. İnsanların fonksiyonel gıdalara yönelmesiyle birlikte endüstriyel anlamda yeni probiyotik/simbiyotik ürünlerin geliştirilmesini içeren çalışmalarda artış hızlı bir artış meydana gelmiştir. Antibiyotikler, hastalıkların tedavisi yanında gıda koruyucusu olarak da yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Günümüzde gerek antibiyotik direnci gelişimi

ve gerekse sağlık üzerinde oluşturduğu olumsuz yan etkiler nedeniyle, antibiyotiklerin kullanımının sınırlandırılması, fonkisyonel gıdalara olan ilgiyi artırmıştır (Collins ve Gibson 1999). Fonksiyonel gıdalar (probiyotik ve prebiyotik) esas olarak, temel besleme işlevi yanında, tüketici sağlığını destekleyen ve immün sistemi güçlendiren gıdalardır (Gibson 1998, Playne vd. 2003).

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

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

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

2.5 İntestinal Mikroflora

İnsan vücudunda, organlarda ve yüzeylerde bulunan toplam mikrobiyal hücre sayısı (10^{13}-10^{14}) ökaryotik hücre sayısının yaklasık 10 katı kadardır (Gorbach vd. 1967). İntestinal flora, oldukça yüksek bir popülasyona, yani 400'den fazla bakteriyal tür içeren bir ekosisteme sahiptir (Luckey ve Floch 1972). Mide-bagırsak sisteminin içeriginde yer alan trilyonlarca mikroorganizma yaklasık 1,5 kg gibi bir kitle degerindedir. Bir başka ifade ile kolonda dıskıda $1x10^{12}$ kob/g bakteri bulunmaktadır. Söz konusu flora üyeleri, bagırsak savunma mekanizmasında önemli rol oynarlar (Collins ve Gibson 1999). Buna ek olarak gastrointestinal flora, patojenlere karsı doğal bir bariyer oluşturarak, immün sistemi ve bagırsak hareketlerini stimüle eder (Hentges 1992). Sindirim sistemindeki mikrobiyal yük ve çesitlilik beslenme sekli, bağışıklık, pH, yaş ve antimikrobiyal bilesenler gibi birçok faktöre baglı olarak degisiklik göstermektedir (Fooks vd. 1999). Sindirim sisteminde bulunan mikroorganizmaların dağılımı mide, duodenal, jejunal, ileal, çekal, kolonik, rektal ve fekal mikroflorada farklılaşmaktadır. Midede çok az mikroorganizma bulunurken bağırsağın sonlarına doğru sayıda artış gözlenmektedir. Mide ve ince bağırsağın büyük bir kısmında kolonizasyon bu bölgedeki asidite yüzünden sınırlıdır. Kalın bağırsaktaki mikroorganizma sayısı 10^{12}'ye kadar yükselmektedir (Ballongue 1993). Sindirim sisteminde bulunan bakteri florasının %90'ı veya daha fazlası *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ve *Bacterioides* cinslerine dahil anaerob bakteriler tarafından olusturulmaktadır. Floranın diger üyeleri; *Enterococcus* ve *Streptococcus* cinsinde yer alan türler ile *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* gibi patojen bakteriler, küfler ve *Candida* cinsi mayalardır (Salminen vd. 1998, Fonden vd. 2000, Dethlefsen vd. 2006).

Probiyotikler, bağırsakların mikrobiyal populasyonunun yararlı etkilerini destekleyen canlı mikroorganizmalardır (Holzapfel ve Schillnger 2002). İnsan intestinal sisteminde laktik asit bakterileri (LAB) doğal olarak bulunduğu için intestinal suslar özellikle ticari amaçla kullanılmak üzere probiyotik olarak geliştirilmektedir (Pinto vd. 2006).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Farklı kaynaklardan örneklerin toplanması ve laktik asit bakteri izolasyonu

Gıda ve arı kaynaklı örneklerden aseptik koşullara dikkat edilerek alınan numuneler, uygun koşullarda laboratuvar ortamına getirilerek aynı gün içerisinde LAB izolasyonu için kullanılmıştır. Ankara ili Kahramankazan ilçesinden toplanan bitki örnekleri aseptik koşullarda, steril kilitli poşetler içerisinde laboratuvara transfer edilmiştir. Bal arılarından izole edilecek bakteri örnekleri için gereken bal arıları, Prof. Dr. İrfan Kandemir'in (Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) katkılarıyla temin edilmiştir.

Laboratuvar ortamında bitki örnekleri steril kaplarda net ağırlıkları 10 g olacak şekilde tartılarak 90 mL steril serum fizyolojik tampon içerisinde, arı gastrointestinal örnekleri 1 g olacak şekilde tartılarak 9 mL steril fizyolojik tampon (SF; % 0,85 NaCl) ilave edilmiştir. SF ile homojenize edilen bu örneklerin 10^{-7} düzeyine kadar seri dilüsyonları hazırlanmış ve bu dilusyonlardan 100'er µL alınarak Fruktoz Yeast Pepton (FYP) agar besiyerine yayma ekim yöntemiyle ekimleri yapılmıştır. Ekim yapılan petriler 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve bu süre sonunda LAB'lara özgü koloni morfolojileri gözetilerek koloniler steril öze yardımı ile seçilmiş, MRS sıvı besiyerine aktarılmış ve 24 saatlik ilave bir inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından izolatların tanımlanması amacına yönelik karakterizasyon testleri yapılmış ve ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere izolatlar stoklanarak -86 °C'de muhafaza edilmiştir. Arı gastrointestinal sistemlerinden laktik asit bakteri izolasyonu içinse, arı gut (barsak) örnekleri laboratuvarda aseptik koşullarda çıkarıldıktan sonra ön zenginleştirme için yukarıda tanımlanan besi ortamlarına transfer edilmiş ve yine daha önce izah edildiği şekliyle inkübasyona kaldırılıp seçici izolasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Farklı koloni morfolojisi içeren koloniler tespit edilerek çizgi ekim tekniğiyle en az üç kere işlemden geçirilerek saflaştırma işlemi teyit edilmiştir.

Bu çalışmada probiyotik özellikleri araştırılmak üzere Ankara ilinin farklı ilçelerinden (Kahramankazan ve Yenimahalle) temin edilen bitki örneklerinden ve bal arısı gastroinstestinal sistemlerinden (GUT) izole edilen 24 adet bakteri örneği öncelikle ön tarama ve karakterizasyon işlemlerinden geçirilmiştir (Gram-boyama, katalaz testi vb.). Fruktofilik bakterilerin izolasyonu için Fructose Yeast Peptone besiyeri kullanılmıştır. İzole edilen ve saflaştırılan bakteriler MRS besi ortamında 18 saat süresince zenginleştirildikten sonra sonra mikrofüj tüplerine alınarak 10.000 rpm'de 90 saniye santrifüj edilmiştir. Daha sonra pelletler 1 mL steril serum fizyolojik (% 0,85 NaCl) ile 2 kez yıkandıktan sonra % 50'lik steril 1 mL gliserol çözeltisinde süspanse edilerek -86 °C'de saklanmıştır (Todorov vd. 1999).

Bu besi ortamına ait ve çalışmanın diğer aşamalarında kullanılan indikatör bakterilerin geliştirildiği diğer besi ortamlarına ait kimyasal bileşenler EK 1'de belirtilmiştir.

3.1.2 Tampon ve çözeltiler

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

3.1.3 Çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu

Çalışma süresince kullanılan tüm cam malzemelerin, pipet uçlarının, tampon, çözelti ve besiyerlerinin sterilizasyonu için otoklav (Nüve, Türkiye) kullanılmıştır (121 °C'de 1.5 atm basıncında 15 dakika).

3.2 Yöntem

3.2.1 İzolatların karakterizasyonu

3.2.1.1 İzolatların kısmi karakterizasyonu

İzolatların morfolojik ve fizyolojik özellikleri incelenmiştir (Lyhs 2002).

3.2.1.1.1 Basit boyama

37 °C'de MRS sıvı besi ortamlarında 18 saat geliştirilen her bir izolattan 5-10 µL alınarak temiz birer lam üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Bu örnekler havada kurutulduktan sonra alevden 3-5 kez geçirilerek fikse edilmiştir. Fikse edilen örneklerin üzerine metilen mavisi (Merck, Darmstadt, Germany) damlatılarak 5 dakika beklenmiş ve ardından distile su ile yıkanan lamlar kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamların üzerine immersiyon yağı damlatılarak bakterilerin hücre morfolojileri 100X büyütmeli ışık mikroskobunda (ZEISS AxioCam MRc5 Imager system) gözlenmiştir.

3.2.1.1.2 Gram boyama

37 °C'de 18 saat geliştirilen kültürler basit boyamada belirtildiği gibi temiz lamların üzerinde hazırlanmıştır. Daha sonra Gram kristal viyole solüsyonu (Sigma, Gram Boyama Kiti, İsviçre) ile 1 dakika muamele edilen lamlar çeşme suyuyla yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra Gram iyodin solüsyonu (Sigma, Gram Boyama Kiti, İsviçre) damlatılarak 1 dakika beklenmiş ve ardından çeşme suyu ile tekrar yıkanan lamlar dekolorizer solüsyonu (Sigma, Gram Boyama Kiti, İsviçre) ile 30 saniye dekolorize edilmiştir. Son olarak Gram safranin solüsyonu (Sigma, Gram Boyama Kiti, İsviçre) ile 1 dakika muamele edilen lamlar çeşme suyu ile yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. İmmersiyon yağı damlatılan lamların reaksiyon sonuçları 100X büyütmeli ışık mikroskobunda (ZEISS AxioCam MRc5 Imager system) gözlenmiştir. Mavimsi mor bir renk oluşumu var ise kültürler Gram-pozitif, pembemsi kırmızı renk oluşumunda ise kültürler Gram-negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.1.1.3 Katalaz testi

Katalaz testi için, MRS agar ortamına çizgi ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat geliştirilen kolonilerin üzerine H_2O_2 (Merck, Darmstadt, Germany) damlatılmış ve yüzeyde hava kabarcıkları şekline O_2 çıkışının olup olmadığı gözlemlenmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak *Bacillus subtilis* ATCC 21332 suşu kullanılmıştır (Harrigan ve McCance 1976). Gaz çıkışı gözlemlenen izolatlar katalaz-pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.1 İzolatların genotipik karakterizasyonu

İzolatların genotipik karakterizasyonunun belirlenebilmesi için öncelikle farklı primerlerle RAPD-PZR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) profilleri çıkartılmış ve her izolat için bu profiller karşılaştırılmıştır. Farklı profil gösterdiği gözlemlenen izolatlar için ise 16S rDNA dizi analizi yapılarak izolatların genotipik karakterizasyonu tamamlanmıştır.

3.2.2.2 Genomik DNA izolasyonu

DNA izolasyonu; bakterilerin lize edilmesi, proteinlerin uzaklaştırılması, DNA'nın çöktürülmesi ve temizlenmesi aşamalarından oluşmaktadır. DNA izolasyon yöntemi için 37 °C'de 'de 18 saat geliştirilen aktif kültürlerden 1,5 mL alınarak 13200 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Aynı işlem aynı tüplerin içerisine aynı kültürü ekleyerek birer kez daha tekrarlanmıştır. Elde edilen pelletlerden genomik DNA izolasyonu PureLink™ Microbiome DNA Purification Kiti (A29790) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.3 Saflık ve miktar tayini

İzole edilen DNA numunelerinin saflık ve miktar tayinleri NANODROP (Wilmington, USA) spektrofotometrede (2 µL DNA ile) 3 paralel okuma yapılıp bu değerlerin ortalaması alınarak belirlenmiştir. DNA numunelerinin okunması için kontrol olarak PZR suyu kullanılarak 260 nm, 280 nm, 260 nm/280 nm, 260/230 nm değerleri ölçülmüş ve DNA numunelerinin konsantrasyonları ng/µL olarak belirlenmiştir (Sambrook ve Russell 2001). DNA örneklerinin saflıklarının kontrolü için belirlenen OD260/OD280 değeri 1,8 değerine yakın ise numune mümkün mertebe saf olarak kabul edilmiştir. Daha yüksek değerler için RNA, daha düşük değerler içinse protein ve fenolik bileşik kontaminasyonu olduğu dikkate alınmıştır.

3.2.2.4 Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi için % 1,5'lik jel hazırlanmıştır. Agaroz jelin hazırlanması için öncelikle 1,5 gr agaroz 100 mL 1X Tris-Borik asit-EDTA (Merck, Almanya) elektroforez tampon içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak çözülmüştür. Sıcaklığı yaklaşık 40 °C'ye kadar indirilen jele % 2'lik Etidyum bromit (10 mg/ml) çözeltisinden 2 µL eklenmiş ve homojen bir karışım sağlandıktan sonra elektroforez plakalarına aktarılıp, taraklar yerleştirilmiş ve jelin polimerizasyonu için beklenmiştir. Bu süre sonunda elektroforez tanklarına, jelin yüzeyini kapatacak şekilde "tampon çözelti" (1xTBE) ilave edilmiştir. Ardından taraklar ortamdan uzaklaştırılarak jel yükleme kuyucuklarının oluşumu sağlanmıştır. Agaroz jelde yürütülecek olan PZR ürünlerine yükleme boyası (brom fenol blue; 1:6) eklenerek mikropipet yardımı ile jel kuyucuklarına yükleme yapılmıştır. Elektroforez 100 V'de (400 mA) yükleme boyası jeli terk edene kadar gerçekleştirilmiştir. Yükleme boyası jeli terk ettikten sonra voltaj kesilmiş ve agaroz jel Kodak Jel Görüntüleme (Gel Logic 200 Imaging System, Birleşik Devletler) cihazına yerleştirilerek 365 nm dalga boyunda UV ışık altında incelenmiş ve fotoğraf çekimleri gerçekleştirilmiştir. PZR ürününün markörü olarak 100 bç–10 kb ticari markör (BIO BASIC INC. Kanada) kullanılmıştır. Bahsedilen agaroz jel elektroforez yöntemi çalışmada hem 16S rDNA bölgesinin PZR ürünü, hem de RAPD-PZR ürününü yürütmek için aynı şekilde uygulanmıştır.

3.2.2.5 İzolatların RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) PZR profillerinin belirlenmesi

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

Çalışmada genomik DNA'lar üzerinde farklı bölgelere bağlanacak ve rastgele seçilmiş olup ticari olarak sağlanan OPA6 (5'-CAGGCCCTTC-3'), OPA7 (5'-GAAACGGGTG-3'), OPA8 (5'-GTGACGTAGG-3') ve OPA9 (5'-AGCCAGCGAA-

3') primerleri kullanılmıştır. Bu amaç için 200 µL'lik PZR tüpüne son hacim 25 µL olacak şekilde sırasıyla 11,875 µL PZR suyu, 5 µL standart Taq buffer (NEB, Birleşik Krallık), 2,5 µL 25 mM $MgCl_2$ (NEB, Birleşik Krallık), 0,5 µL 10 mM deoksinükleotidtrifosfat (dNTP, Promega, USA), 3 µL 10 mM primer (her reaksiyon için farklı bir primer kullanılır), 0,125 µL standart Taq DNA polimeraz enzimi (NEB, Birleşik Krallık) ve son olarak da 2 µL kalıp DNA eklenmiştir. PZR işlemi Gradient PCR Thermocycler/Eppendorf' cihazında gerçekleştirilmiştir. PZR tüpleri cihaza yerleştirilerek 94 °C'de 5 dakika ön denatürasyonun ardından bir döngüsü 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 35 °C'de 1 dakika primer bağlanması ve 68 °C'de 1 dakika 45 saniye uzama basamaklarından oluşan toplam 35 döngü içeren bir protokol izlenmiştir. Son olarak 68 °C'de 7 dakika ilave uzama basamağı uygulanmıştır.

3.2.2.6 İzolatların 16S rDNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyonu

16S rRNA yöntemi ile bakterilerin tanımlanması; DNA izolasyonu, izole edilen DNA'nın saflık ve miktar tayini, 27F ileri (5'-3') ve 1492R geri (3'-5') primerleri kullanılarak izole edilen uygun saflık ve miktardaki DNA'nın PZR'de çoğaltılması, çoğaltılan DNA'nın baz dizi sırasının belirlenmesi ve bu sıranın, veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait baz dizi sıraları ile karşılaştırılarak isimlendirilmesi aşamalarından oluşmaktadır (Sanger vd. 1977, Lane vd. 1985, Saitou ve Nei 1987, Edwards vd. 1989, Wang vd. 1996, Müller 2000, Roy vd. 2000, Escalante vd. 2001, Roy vd. 2001, Sambrook ve Russell 2001, Yeung vd. 2002).

Çalışmada genomik DNA'lar üzerinde hedef bölgelere bağlanacak 27F ve 1492R primerleri kullanılmıştır. Bu amaç için 200 µL'lik PZR tüpüne son hacim 25 µL olacak şekilde sırasıyla 13,875 µL PZR suyu, 5 µL standart Taq buffer (NEB, Birleşik Krallık), 2,5 µL 25 mM $MgCl_2$ (NEB, Birleşik Krallık), 0,5 µL 10 mM deoksinükleotidtrifosfat (dNTP, Promega, USA), 0,5'er µL 10 mM primerler (her reaksiyon için farklı bir primer kullanılır), 0,125 µL standart Taq DNA polimeraz enzimi (NEB, Birleşik Krallık) ve son olarak da 2 µL kalıp DNA eklenmiştir. PZR işlemi Gradient PCR Thermocycler/Eppendorf' cihazında gerçekleştirilmiştir. PZR tüpleri cihaza yerleştirilerek 94 °C'de 5 dakika ön denatürasyonun ardından bir döngüsü 94 °C'de 30

saniye denatürasyon, 35 °C'de 1 dakika primer bağlanması ve 68 °C'de 1 dakika 45 saniye uzama basamaklarından oluşan toplam 35 döngü içeren bir protokol izlenmiştir. Son olarak 68 °C'de 7 dakika ilave uzama basamağı uygulanmıştır.

3.2.2.7 16S rDNA dizi analizi

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

3.3 Suşların bakteriyosin üretim özelliklerinin belirlenmesi

Suşların bakteriyosin üretimlerini belirlemek amacıyla 37 °C'de 18 saat geliştirilen kültürlerden 1 mL alınarak 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar pH değerleri 7'ye ayarlanıp 0,22µm çaplı (Milex, Milipore, Fransa) filtrelerden geçirildikten sonra 100 °C'de 5 dakika kaynatılarak antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılmıştır. Uygun besiyerlerinde 18 saat geliştirilen indikatör bakteriler ve patojen suşlar % 0,1 oranında olacak şekilde 5 mL yarı-katı besiyerine (% 0,75) eklenmiştir. Katı besiyerine indikatörlerin bulunduğu yarı-katı besiyeri yayılmıştır. Bakteriyosin aktivitesine sahip olup olmadığına bakılmak istenen örneklerden 5 µL olacak şekilde nokta ekim ile ekim yapılmıştır. Petriler 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. 18 saat sonucunda inhibisyon zonu olup olmadığı kontrol edilmiştir (Bhunia vd. 1987). Zon oluşumunun görüldüğü suşlar bakteriyosin pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.4 İzole edilen LAB suşlarının bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi

Çalışma kapsamında probiyotik özellikleri belirlenmek istenen suşların *in vitro* denemeleri gerçekleştirilmiştir. *In vitro* denemeler ile suşların antibiyotik duyarlılık seviyeleri, pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzlarına direnç özellikleri ve hemolitik aktiviteleri belirlenmiştir.

3.4.1 Antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi

Suşların antibiyotik dirençlilikleri EFSA (European Food Safety Authority) tarafından belirlenmiş olan 9 farklı antibiyotiğin kullanımı ile disk diffüzyon yöntemine göre yapılmıştır (Çizelge 3.3). İzolatlar 18 saat süresince MRS agar besiyerinde geliştirildikten sonra koloniler steril öze aracılığı ile toplanmış ve serum fizyolojik içerisnde süspanse edilerek 0,5 McFarland standardı esas alınarak yoğunlukları ayarlanmıştır. Standardize edilen süspansiyonlar eküvyon çubukları ile yine MRS agar besiyerlerine inoküle edilmiştir. Çizelge 3.3'te belirtilen antibiyotik diskleri petrilere uygun mesafelerde yerleştirildikten sonra petriler 37°C'de 18 saat süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından antibiyotik diskleri etrafında oluşan zonların çapı mm olarak ölçülmüştür (Wilkins vd. 1972).

Çizelge 3.3 İzolatların antibiyogram testinde kullanılan antibiyotikler

Antibiyotik adı	Antibiyotik kısaltması	Konsantrasyon	Grubu
Rifampisin	RIF	5 μg	Rifamisin
Daptomisin	DAP	30 μg	Lipopeptit
Trimetoprim-sulfametoksazol	SXT	25 μg	Diğer
Siprofloksasin	CIP	5 μg	Florokinolon
Penisilin	PEN	10 U	Penisilin
Amikasin	AMK	30 μg	Aminoglukozit
Eritromisin	E	5 μg	Makrolid

3.4.2 Düşük pH değerlerine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi

Probiyotiklerin bağırsaklara ulaşabilme yeteneğini belirlemek için mide sıvısına benzer bir pH ortamı oluşturulmaya çalışılmıştır. Böylece suşların midenin asidik ortamından geçerek bağırsaklara ulaşabilme yeteneği gözlemlenmiştir. Aktif kültürlerden MRS besiyerine % 1 oranında aktifleştirme yapılmış ve 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda 1 mL aktif kültür alınmış ve 12000 rpm' de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırılmıştır. PBS (pH 7,4) ile çökelti 2 kere yıkanmıştır. Sonrasında PBS tamponu 5 M HCl ile pH' sı 1.0, 2.0 ve 3.0 olacak şekilde ayarlanmış ve bu pelletlere pH' sı ayarlanmış olan tamponlardan 1'er mL ilave edilerek vortekslenmiş, 37 °C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Kontrol için pH değeri 7,4 olan PBS kullanılmıştır. İnkübasyonun 0., 1., 2. ve 3.saatlerinde örneklerden numune alarak seri dilüsyon işlemi yapılmış ve MRS katı besiyerlerine ekimler 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. Örneklerin 37 °C'de 48 saat inkübasyonunun sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, log/kob olarak değerleri hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006). Sayım sonuçları kontrol gruplarından elde sonuçlar gözetilerek kıyaslanmış ve logaritmik azalma hesaplanmıştır. Kontrol grubu olarak pH 7,4'lük tamponda belirtilen sürelerde muamele edilmiş örneklerden sayım gerçekleştirilmiştir.

3.4.3 Pepsine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi

Suşların pepsine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi amacıyla 3 mg/mL pepsin (Merck, Almanya) içeren ve pH 2,0 ve pH 3,0 olan PBS tamponu ile çalışılmıştır. Aktif bakteri kültüründen 1 mL alınarak 12000 rpm' de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından iki kez PBS (pH 7,4) ile yıkanmıştır. Pepsin içeren PBS (pH 2,0 ve pH 3,0) tamponları ile çözülerek 37 °C'de 3 saat inkübasyonun ardından 0., 1., 2. ve 3. saatin sonunda örneklerden numune alınarak bunların seri dilüsyonlarının sonunda MRS katı ortama yayma ekim 3 paralel olarak yapılmıştır. Kontrol olarak pH 7,4 olan PBS kullanılmıştır. Örneklerin 37 °C'de 48 saat inkübasyonunun sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, log/kob olarak değerler hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006). Sayım sonuçları kontrol gruplarından elde sonuçlar gözetilerek kıyaslanmış ve logaritmik azalma hesaplanmıştır.

Kontrol grubu olarak pH 7,4'lük tamponda belirtilen sürelerde muamele edilmiş örneklerden sayım gerçekleştirilmiştir. Logaritmik azalma [(1-10^{-LR}) x 100)] formülüne göre hesaplanmıştır (LR; kontrol grubuna göre logaritmik azalma).

3.4.4 Pankreatine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi

Suşların pankreatine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi amacıyla 1 mg/mL pankreatin (Merck, Almanya) içeren ve pH değeri 8,0'a ayarlanmış PBS tamponları ile çalışılmıştır. Aktif bakteri kültüründen 1 mL alınarak 12000 rpm' de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından iki kez PBS (pH 7,4) ile yıkanmıştır. Daha sonra pankreatin içeren pH 8,0 değerine ayarlanmış PBS tamponunda çözülmüştür. 37 °C'de 4 saat inkübasyonun ardından 0. ve 4. saatin sonunda örneklerden numune alınarak seri dilüsyonlarının yapılmasıyla MRS katı ortama yayma ekim 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak pH 7,4 olan PBS kullanılmıştır. Örneklerin 37 °C'de 24 saat inkübasyonunun sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, log/kob olarak değerler hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006). Logaritmik azalma yüzdesi daha önce açıklandığı şekliyle yapılmıştır.

3.4.5 Safra tuzuna karşı direnç özelliğinin belirlenmesi

Suşların safra tuzuna karşı direnç özelliğinin belirlenmesi amacıyla % 0,3, % 0,5 ve % 1,0 oranında safra tuzu (Merck, Almanya) içeren MRS sıvı besiyerleri kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak safra tuzu içermeyen MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. Aktif bakteri kültürlerinden 1 mL alınarak 12000 rpm' de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından pelletler iki kez PBS (pH 7,4) ile yıkanmıştır. Safra tuzu (% 0,3, % 0,5 ve % 1,0) içeren MRS sıvı besiyerlerinde çözülerek 37 °C'de 4 saat inkübasyonun ardından 0. ve 4. saatte örnekler alınmış ve seri dilüsyonlar yapılarak MRS katı ortamına yayma ekim yapılmıştır. Örneklerin 37 °C'de 48 saat inkübasyonunun sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, log/kob olarak değerler hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006). Logaritmik azalma yüzdesi daha önce açıklandığı şekliyle yapılmıştır.

3.4.6 Suşların hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi

Hemolitik aktiviteleri belirlenmek istenen suşlar 37 °C'de 18 saat geliştirildikten sonra % 5 koyun kanı içeren Colombia agara (bioMerieux, Inc., Fransa) çizgi ekim yapılmıştır. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ve *E. coli* ATCC 25295 kontrol olarak kullanılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra koloniler etrafında berrak zon oluşturanlar β-hemolitik, parlak yeşil zon oluşturan koloniler α-hemolitik ve zon oluşturmayanlar ise γ-hemolitik olarak değerlendirilmiştir (Maragkoudakis vd. 2006).

3.5 İstatistiksel analizler

İstatiksel analizler için SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) istatiksel analiz programı kullanılmıştır. Varyansın tek yönlü analizi olan ANOVA, Tukey posthoc testi ve bağımsız T-testi kullanılarak veriler değerlendirilmiştir. Tüm istatistiksel analizlerde $p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Farklı kaynaklardan örneklerin toplanması ve laktik asit bakterisi izolasyonu

Araştırmada başlangıç olarak Ankara ili Kahramankazan ilçesi çevresinden eylül ayı başlarında toplanan bitkiler ve Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi kampüsündeki arı kovanlarının bal arılarından elde edilen izolatlar kullanılmıştır.

İzole edilen bakterilere laboratuvar çalışmaları sırasında verilen kodlar ve izolasyon kaynakları Çizelge 4.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1 Tez kapsamında ilk aşamada izole edilen laktik asit bakterileri ve izolasyon kaynakları

İzolasyon Kaynağı	Tür	İzolat Kodu
BİTKİ	Domates	1
BİTKİ	Domates	2
BİTKİ	Armut	3
BİTKİ	Armut	4
BİTKİ	Armut	5
BİTKİ	Dut	6
BİTKİ	Yer Elması	7
BİTKİ	Yer Elması	8
BİTKİ	Yer Elması	9
BİTKİ	Yer Elması	10
BİTKİ	Elma	11
BİTKİ	Elma	12
BİTKİ	Elma	13
BİTKİ	Kivi	14
BİTKİ	Kivi	15
BİTKİ	Kivi	16
BİTKİ	Kivi	17
BİTKİ	Üzüm	18
BİTKİ	Üzüm	19
BİTKİ	Üzüm	20
ARI	Bal Arısı	A1
ARI	Bal Arısı	A3
ARI	Bal Arısı	A4
ARI	Bal Arısı	A5
ARI	Bal Arısı	A6

4.2 İzolatların kısmi karakterizasyonu

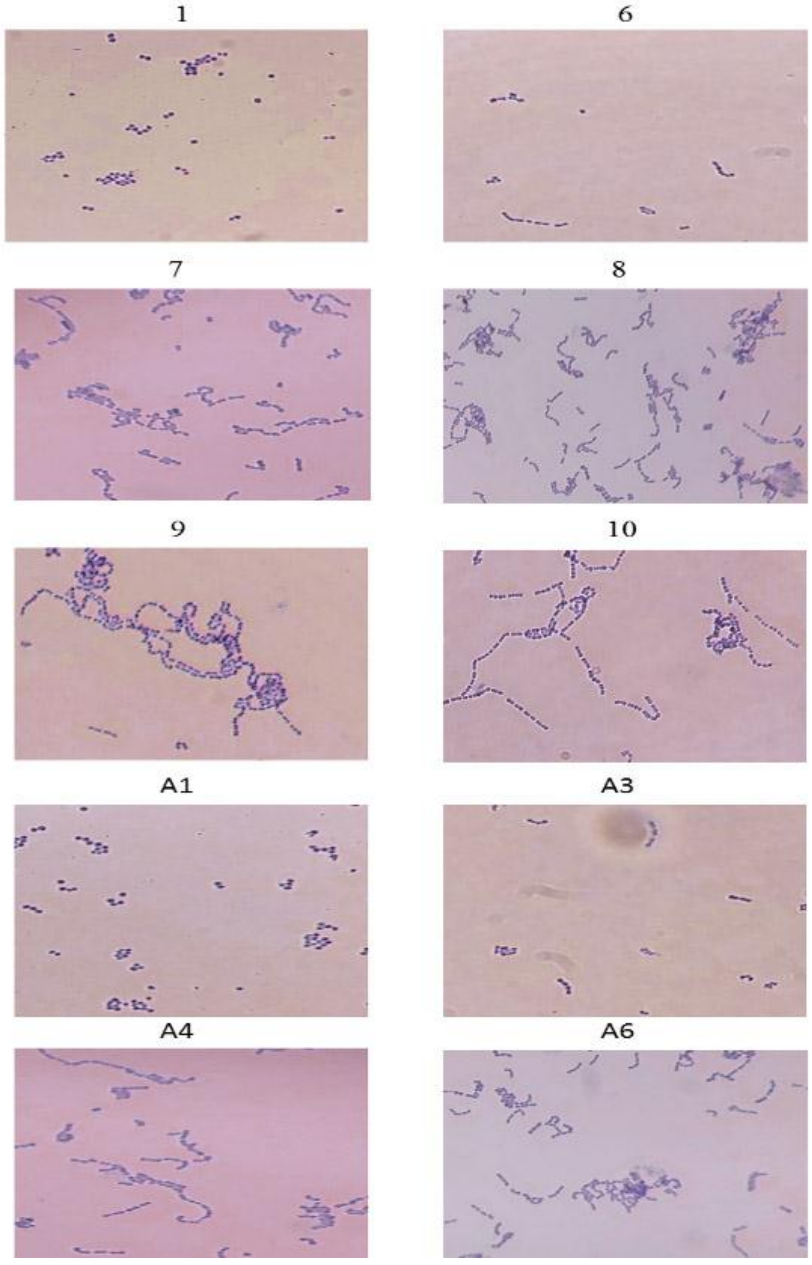
İzolatların kısmi karakterizasyonunda ilk etapta Gram reaksiyon sonuçları, katalaz testi sonuçları ve hücre morfolojileri belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 İzolatların kısmi karakterizasyon sonuçları

İzolat Kodu	Kaynağı	Türü	Katalaz Testi	Morfoloji	Gram Boyama
1	Bitki	Domates	-	kok	Pozitif
2	Bitki	Domates	+	basil	Negatif
3	Bitki	Armut	+	basil	Negatif
4	Bitki	Armut	+	kok	Negatif
5	Bitki	Armut	+	basil	Negatif
6	Bitki	Dut	-	kok	Pozitif
7	Bitki	Yer Elması	-	kok	Pozitif
8	Bitki	Yer Elması	-	kok	Pozitif
9	Bitki	Yer Elması	-	kok	Pozitif
10	Bitki	Yer Elması	-	kok	Pozitif
11	Bitki	Elma	+	basil	Negatif
12	Bitki	Elma	+	basil	Negatif
13	Bitki	Elma	+	kok	Negatif
14	Bitki	Kivi	+	kok	Negatif
15	Bitki	Kivi	+	basil	Negatif
16	Bitki	Kivi	+	kok	Negatif
17	Bitki	Kivi	+	kok	Negatif
18	Bitki	Üzüm	+	kok	Negatif
19	Bitki	Üzüm	+	kok	Negatif
20	Bitki	Üzüm	+	kok	Negatif
A1	Arı	Bal Arısı	-	kok	Pozitif
A3	Arı	Bal Arısı	-	kok	Pozitif
A4	Arı	Bal Arısı	-	kok	Pozitif
A6	Arı	Bal Arısı	-	kok	Pozitif

İlk kısmi karakterizasyon işlemlerinden sonra 24 adet izolat içerisinden yalnızca 10 adet fruktofilik laktik asit bakterisi izolatı seçilmiştir. Bu izolatlar sırasıyla, 1, 6, 7, 8, 9, 10, A1, A3, A4 ve A6 numaraları izolatlardır. Zira bu izolatlar Gram boyanma reaksiyonları itibariyle pozitiftir. Ayrıca katalaz test sonuçları negatiftir. Söz konusu karakteristikler laktik asit bakterilerinin ön seçimleri için kritik öneme haizdir. Seçilen tüm izolatların hücre morfolojisi kok şeklindedir.

Gram boyanma sonuçlarına ait görseller Şekil 4.1'de verilmiştir. İlgili görsel izolat kodları ile gösterilmiştir. Görselden de anlaşılacağı üzere, sonraki çalışmalara dahil edilen söz konusu izolatların hepsinde hücre morfolojisi kok şeklinde ve reaksiyon sonucu Gram-pozitiftir.



Şekil 4.1 Seçimleri gerçekleştirilen laktik asit bakterisi izolatlarının Gram boyanma reaksiyonları ve hücre morfolojileri

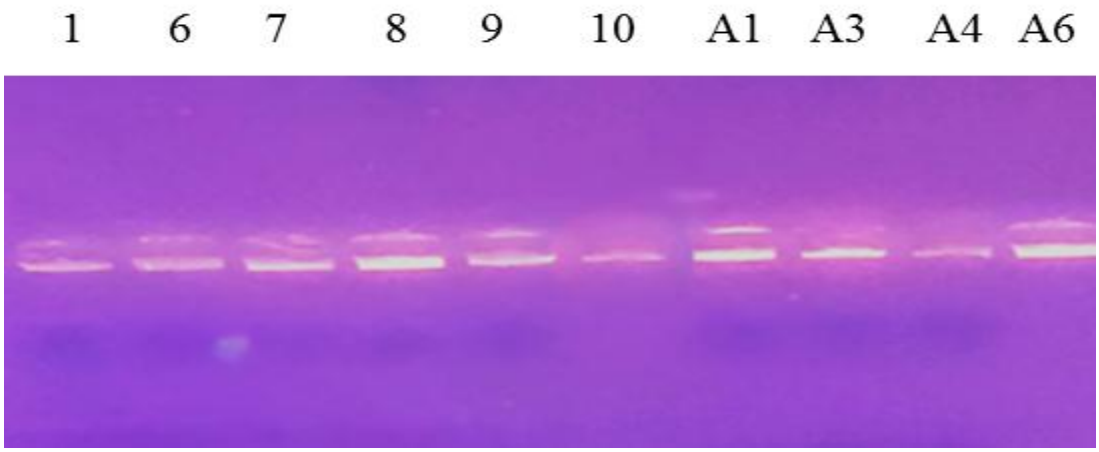
4.3 İzolatların genotipik karakterizasyonu

10 adet izolatın PureLink^{TM}Microbiome DNA Purification Kiti ile izolasyonu gerçekleştirildikten sonra ilk olarak NanoDrop cihazı ile konsantrasyonları ve saflıkları kontrol edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Laktik asit izolatlarının saflaştırılan genomik DNA'ları ve konsantrasyonları

İzolat kodu	A260nm/A280nm	Konsantrasyon (ng/µL)
1	1,87	215
6	2,02	317
7	2,15	425
8	1,77	347
9	1,85	541
10	2,01	124
A1	1,74	177
A3	2,09	241
A4	1,98	325
A6	1,87	402

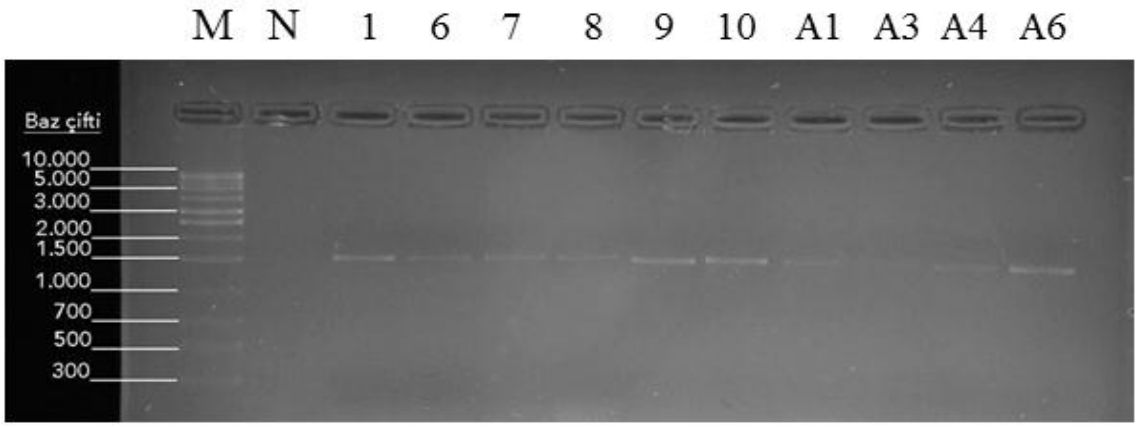
Genomik DNA saflaştırma işleminden ve NanoDrop cihazı ile ölçüm işleminden sonra ilgili genomik DNA'lar agaroz jel elektroforezinde de koşturulup analiz edilmiştir (Şekil 4.2)



Şekil 4.2 Saflaştırılan genomik DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri

Çalışmaya dahil edilen laktik asit bakterileri arasındaki genotipik polimorfizmi açıklığa kavuşturmak adına örneklere RAPD-PZR işlemi uygulanmıştır. Polimorfik DNA'nın tespiti için literatürde laktik asit bakterileri için önerilen OPA6, OPA7, OPA8 ve OPA9 primerleri tercih edilmiştir. Ancak söz konusu primer setleri ile polimorfik bir DNA elde etmek ve reaksiyonlardan sonuç almak mümkün olmamıştır.

Çalışma kapsamındaki laktik asit bakterilerinin tür düzeyinde tiplendirilmesi için öncelikle uygun 27F ve 1492R primerleri ile 16S rRNA bölgeleri PZR ile çoğaltılmıştır. 16S rRNA bölgesi prokaryotik tür tayininde önemli bir moleküler markördür ve laktik asit bakterisi grubuna dahil türlerin tespiti için de sıklıkla tercih edilmektedir. Şekil 4.3'te 10 izolata ait çoğaltılmış yaklaşık 1500 bp büyüklüğünde PZR ürünleri görülmektedir. Agaroz jel görüntüsüne bakıldığında hedef bölgeye özgül tek bir ürünün başarıyla çoğaltıldığı anlaşılmaktadır.

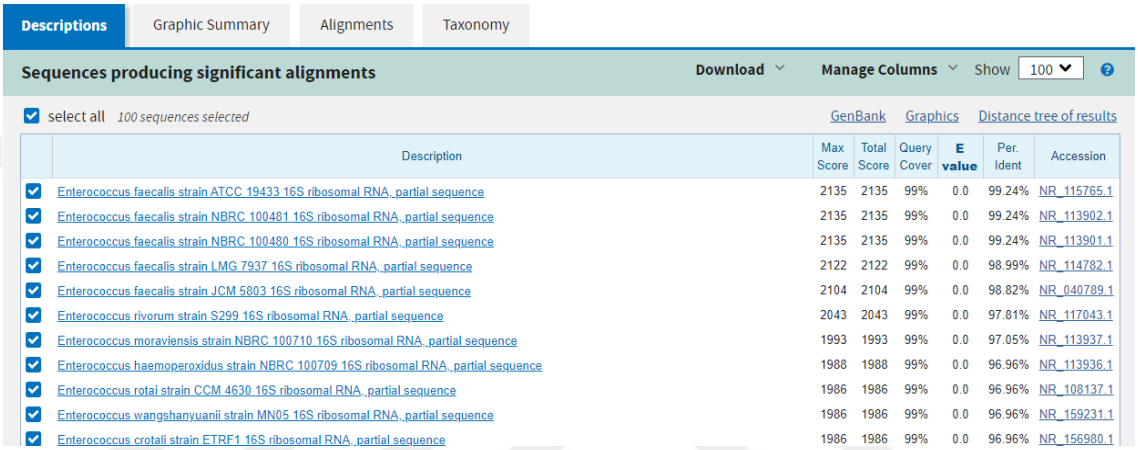


Şekil 4.3 Laktik asit bakterisi izolatlarının çoğaltılmış 16s rRNA bölgeleri

1. kuyu M; markör, 2. kuyu N; negatif kontrol, 3. kuyu. 1, 6, 7, 8, 9, 10, A1, A3, A4, A6 kodlu laktik asit bakterisi izolatları

Çoğaltılan 16 rRNA PZR ürünleri saflaştırılmak ve dizi analizine tabi tutulmak üzere MacroGene firmasına gönderilmiştir. Dizileme işlemi geleneksel Sanger dizileme metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Firma hizmetinden sonra temin edilen dizileme sonuçları ilk aşamada BioEdit programı aracılığıyla kaliteleri itibariyle incelenmiştir. Bu bağlamda sinyali zayıf olan nükleotid dizileri 5' ve 3' bölgelerinden trimlenmiştir. Dizileme işlemi çift yönlü gerçekleştirilmiştir (Forward; ileri, Reverse; geri). Diziler

ilgili yazılım ile işlendikten sonra “fasta” formatında kaydedilmiştir. Kaydedilen dosyalar daha sonrasında Mega yazılımı aracılığıyla analiz edilmiştir. Reverse (geri) diziler Mega yazılımında “reverse complement” konutu ile işlenmiştir. Daha sonrasında Forward dizi ile “reverse complement” fonksiyonu ile dönüştürülen reverse dizi birleştirilmiştir. Birleştirilen dizi son olarak NCBI veri tabanında “Nucleotide “Database” üzerindeki 16 S rRNA dizileri eşleştirilerek en yüksek “query” skorları ile karşılaştırılması sonucunda tür tiplendirmesi yapılmıştır (Şekil 4.4 - Şekil 4.13).



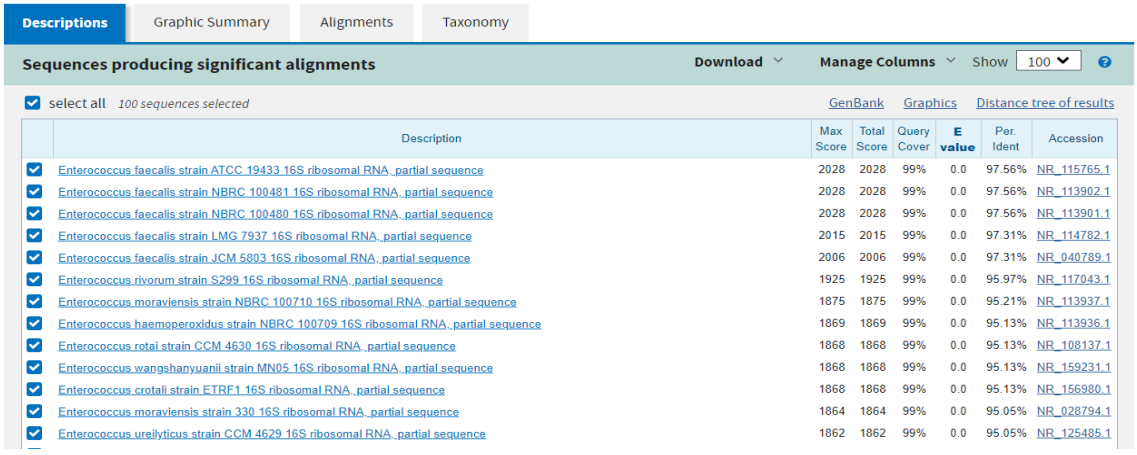
Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Manage Columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA, partial sequence	2135	2135	99%	0.0	99.24%	NR_115765.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100481 16S ribosomal RNA, partial sequence	2135	2135	99%	0.0	99.24%	NR_113902.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA, partial sequence	2135	2135	99%	0.0	99.24%	NR_113901.1
Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA, partial sequence	2122	2122	99%	0.0	98.99%	NR_114782.1
Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA, partial sequence	2104	2104	99%	0.0	98.82%	NR_040789.1
Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA, partial sequence	2043	2043	99%	0.0	97.81%	NR_117043.1
Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA, partial sequence	1993	1993	99%	0.0	97.05%	NR_113937.1
Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA, partial sequence	1988	1988	99%	0.0	96.96%	NR_113936.1
Enterococcus rotai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA, partial sequence	1986	1986	99%	0.0	96.96%	NR_108137.1
Enterococcus wangshanyuanii strain MN05 16S ribosomal RNA, partial sequence	1986	1986	99%	0.0	96.96%	NR_159231.1
Enterococcus crotali strain ETRF1 16S ribosomal RNA, partial sequence	1986	1986	99%	0.0	96.96%	NR_156980.1

Şekil 4.4 1 kodlu izolatın BLAST sonuçları



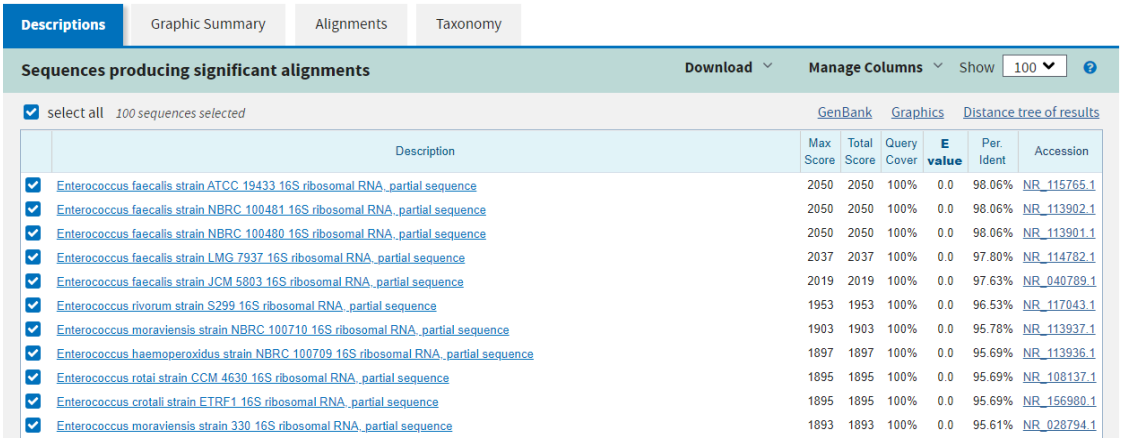
Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Manage Columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA, partial sequence	2028	2028	99%	0.0	97.56%	NR_115765.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100481 16S ribosomal RNA, partial sequence	2028	2028	99%	0.0	97.56%	NR_113902.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA, partial sequence	2028	2028	99%	0.0	97.56%	NR_113901.1
Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA, partial sequence	2015	2015	99%	0.0	97.31%	NR_114782.1
Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA, partial sequence	2006	2006	99%	0.0	97.31%	NR_040789.1
Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA, partial sequence	1925	1925	99%	0.0	95.97%	NR_117043.1
Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA, partial sequence	1875	1875	99%	0.0	95.21%	NR_113937.1
Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA, partial sequence	1869	1869	99%	0.0	95.13%	NR_113936.1
Enterococcus rotai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA, partial sequence	1868	1868	99%	0.0	95.13%	NR_108137.1
Enterococcus wangshanyuanii strain MN05 16S ribosomal RNA, partial sequence	1868	1868	99%	0.0	95.13%	NR_159231.1
Enterococcus crotali strain ETRF1 16S ribosomal RNA, partial sequence	1868	1868	99%	0.0	95.13%	NR_156980.1
Enterococcus moraviensis strain 330 16S ribosomal RNA, partial sequence	1864	1864	99%	0.0	95.05%	NR_028794.1
Enterococcus ureilyticus strain CCM 4629 16S ribosomal RNA, partial sequence	1862	1862	99%	0.0	95.05%	NR_125485.1

Şekil 4.5 6 kodlu izolatın BLAST sonuçları



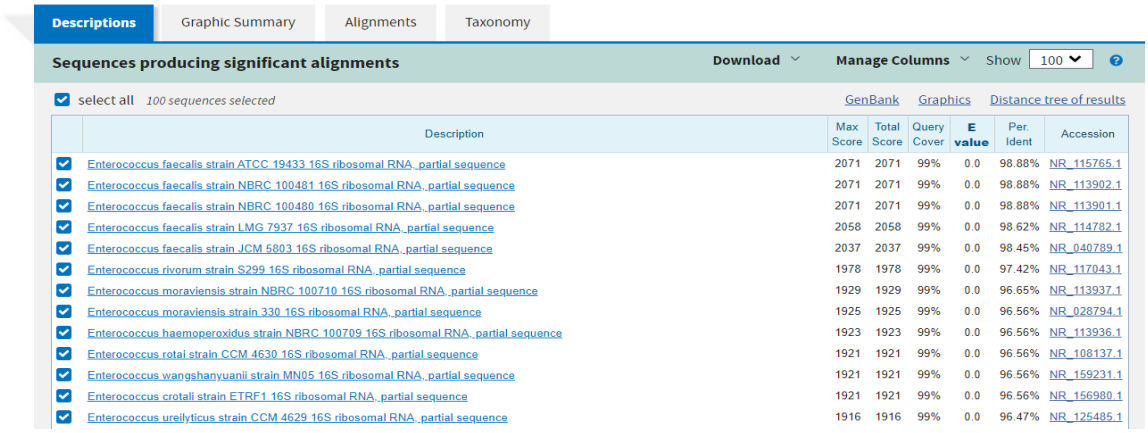
Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Manage Columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA, partial sequence	2050	2050	100%	0.0	98.06%	NR_115765.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100481 16S ribosomal RNA, partial sequence	2050	2050	100%	0.0	98.06%	NR_113902.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA, partial sequence	2050	2050	100%	0.0	98.06%	NR_113901.1
Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA, partial sequence	2037	2037	100%	0.0	97.80%	NR_114782.1
Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA, partial sequence	2019	2019	100%	0.0	97.63%	NR_040789.1
Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA, partial sequence	1953	1953	100%	0.0	96.53%	NR_117043.1
Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA, partial sequence	1903	1903	100%	0.0	95.78%	NR_113937.1
Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA, partial sequence	1897	1897	100%	0.0	95.69%	NR_113936.1
Enterococcus rotai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA, partial sequence	1895	1895	100%	0.0	95.69%	NR_108137.1
Enterococcus crotali strain ETRF1 16S ribosomal RNA, partial sequence	1895	1895	100%	0.0	95.69%	NR_156980.1
Enterococcus moraviensis strain 330 16S ribosomal RNA, partial sequence	1893	1893	100%	0.0	95.61%	NR_028794.1

Şekil 4.6 7 kodlu izolatın BLAST sonuçları



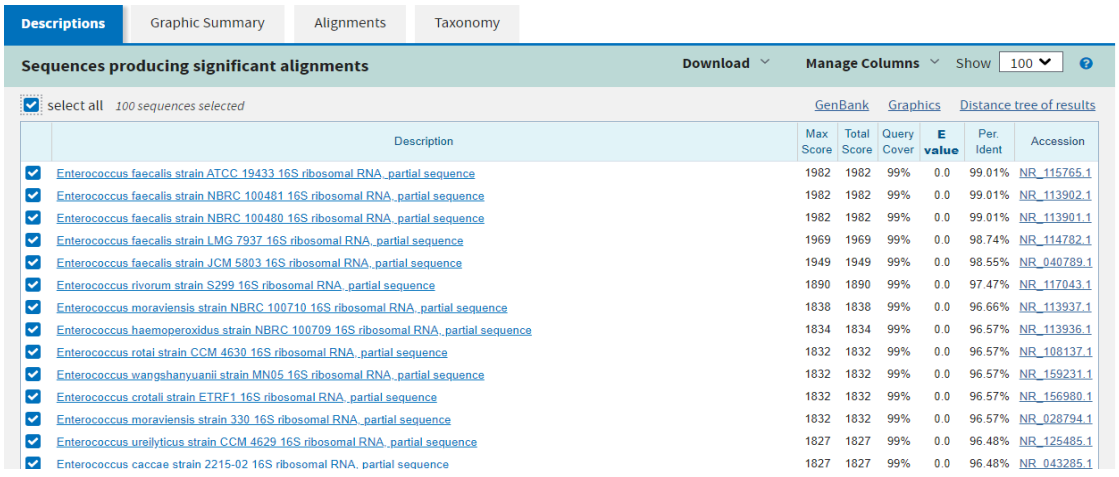
Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Manage Columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA, partial sequence	2071	2071	99%	0.0	98.88%	NR_115765.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100481 16S ribosomal RNA, partial sequence	2071	2071	99%	0.0	98.88%	NR_113902.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA, partial sequence	2071	2071	99%	0.0	98.88%	NR_113901.1
Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA, partial sequence	2058	2058	99%	0.0	98.62%	NR_114782.1
Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA, partial sequence	2037	2037	99%	0.0	98.45%	NR_040789.1
Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA, partial sequence	1978	1978	99%	0.0	97.42%	NR_117043.1
Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA, partial sequence	1929	1929	99%	0.0	96.65%	NR_113937.1
Enterococcus moraviensis strain 330 16S ribosomal RNA, partial sequence	1925	1925	99%	0.0	96.56%	NR_028794.1
Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA, partial sequence	1923	1923	99%	0.0	96.56%	NR_113936.1
Enterococcus rotai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA, partial sequence	1921	1921	99%	0.0	96.56%	NR_108137.1
Enterococcus wangshanyuanii strain MN05 16S ribosomal RNA, partial sequence	1921	1921	99%	0.0	96.56%	NR_159231.1
Enterococcus crotali strain ETRF1 16S ribosomal RNA, partial sequence	1921	1921	99%	0.0	96.56%	NR_156980.1
Enterococcus ureilyticus strain CCM 4629 16S ribosomal RNA, partial sequence	1916	1916	99%	0.0	96.47%	NR_125485.1

Şekil 4.7 8 kodlu izolatın BLAST sonuçları



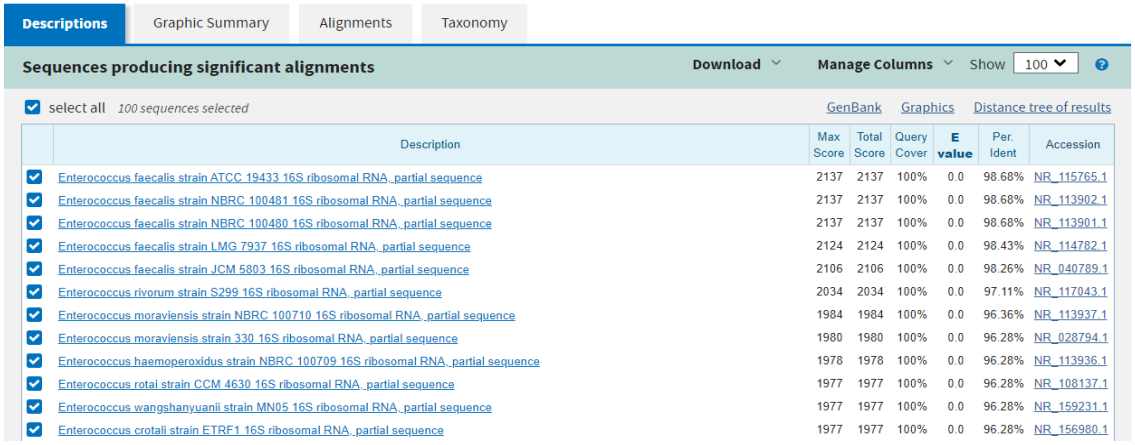
Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Manage Columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA, partial sequence	1982	1982	99%	0.0	99.01%	NR_115765.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100481 16S ribosomal RNA, partial sequence	1982	1982	99%	0.0	99.01%	NR_113902.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA, partial sequence	1982	1982	99%	0.0	99.01%	NR_113901.1
Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA, partial sequence	1969	1969	99%	0.0	98.74%	NR_114782.1
Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA, partial sequence	1949	1949	99%	0.0	98.55%	NR_040789.1
Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA, partial sequence	1890	1890	99%	0.0	97.47%	NR_117043.1
Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA, partial sequence	1838	1838	99%	0.0	96.66%	NR_113937.1
Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA, partial sequence	1834	1834	99%	0.0	96.57%	NR_113936.1
Enterococcus rotai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA, partial sequence	1832	1832	99%	0.0	96.57%	NR_108137.1
Enterococcus wangshanyuanii strain MN05 16S ribosomal RNA, partial sequence	1832	1832	99%	0.0	96.57%	NR_159231.1
Enterococcus crotali strain ETRF1 16S ribosomal RNA, partial sequence	1832	1832	99%	0.0	96.57%	NR_156980.1
Enterococcus moraviensis strain 330 16S ribosomal RNA, partial sequence	1832	1832	99%	0.0	96.57%	NR_028794.1
Enterococcus ureilyticus strain CCM 4629 16S ribosomal RNA, partial sequence	1827	1827	99%	0.0	96.48%	NR_125485.1
Enterococcus caccae strain 2215-02 16S ribosomal RNA, partial sequence	1827	1827	99%	0.0	96.48%	NR_043285.1

Şekil 4.8 9 kodlu izolatın BLAST sonuçları



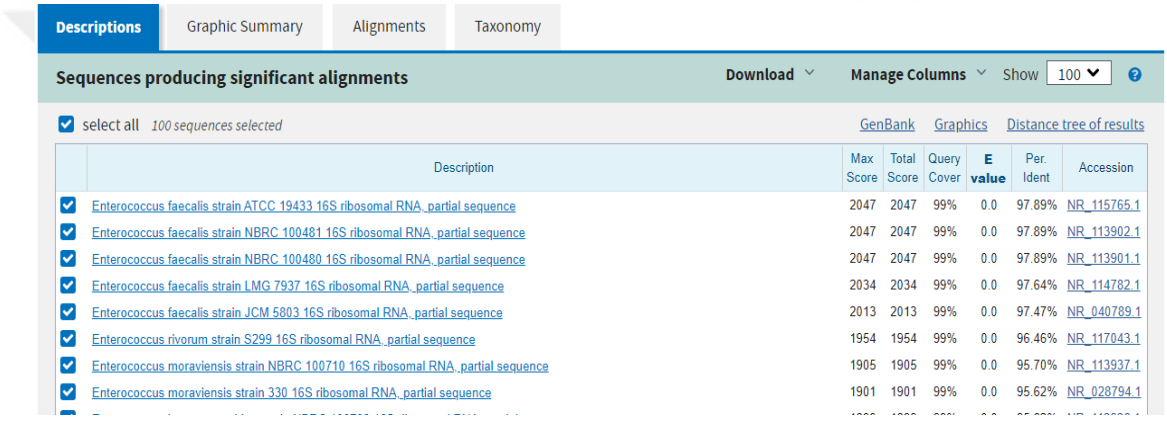
Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Manage Columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA, partial sequence	2137	2137	100%	0.0	98.68%	NR_115765.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100481 16S ribosomal RNA, partial sequence	2137	2137	100%	0.0	98.68%	NR_113902.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA, partial sequence	2137	2137	100%	0.0	98.68%	NR_113901.1
Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA, partial sequence	2124	2124	100%	0.0	98.43%	NR_114782.1
Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA, partial sequence	2106	2106	100%	0.0	98.26%	NR_040789.1
Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA, partial sequence	2034	2034	100%	0.0	97.11%	NR_117043.1
Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA, partial sequence	1984	1984	100%	0.0	96.36%	NR_113937.1
Enterococcus moraviensis strain 330 16S ribosomal RNA, partial sequence	1980	1980	100%	0.0	96.28%	NR_028794.1
Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA, partial sequence	1978	1978	100%	0.0	96.28%	NR_113936.1
Enterococcus rotai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA, partial sequence	1977	1977	100%	0.0	96.28%	NR_108137.1
Enterococcus wangshanyuanii strain MN05 16S ribosomal RNA, partial sequence	1977	1977	100%	0.0	96.28%	NR_159231.1
Enterococcus crotali strain ETRF1 16S ribosomal RNA, partial sequence	1977	1977	100%	0.0	96.28%	NR_156980.1

Şekil 4.9 10 kodlu izolatın BLAST sonuçları



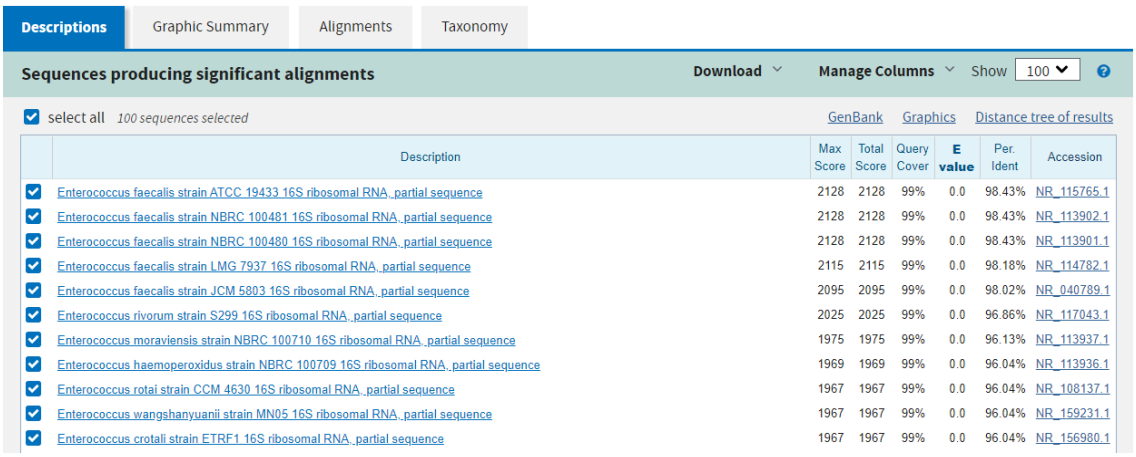
Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Manage Columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA, partial sequence	2047	2047	99%	0.0	97.89%	NR_115765.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100481 16S ribosomal RNA, partial sequence	2047	2047	99%	0.0	97.89%	NR_113902.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA, partial sequence	2047	2047	99%	0.0	97.89%	NR_113901.1
Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA, partial sequence	2034	2034	99%	0.0	97.64%	NR_114782.1
Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA, partial sequence	2013	2013	99%	0.0	97.47%	NR_040789.1
Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA, partial sequence	1954	1954	99%	0.0	96.46%	NR_117043.1
Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA, partial sequence	1905	1905	99%	0.0	95.70%	NR_113937.1
Enterococcus moraviensis strain 330 16S ribosomal RNA, partial sequence	1901	1901	99%	0.0	95.62%	NR_028794.1

Şekil 4.10 A1 kodlu izolatın BLAST sonuçları



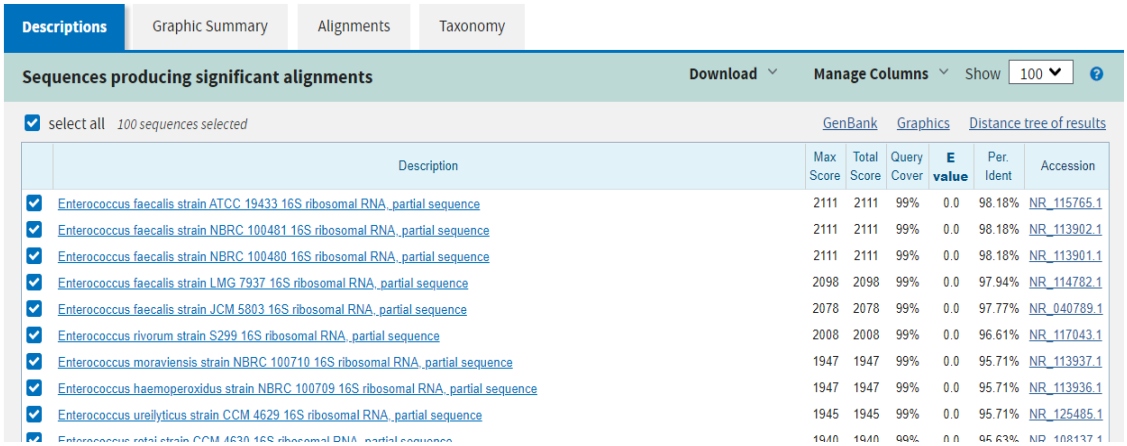
Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Manage Columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA, partial sequence	2128	2128	99%	0.0	98.43%	NR_115765.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100481 16S ribosomal RNA, partial sequence	2128	2128	99%	0.0	98.43%	NR_113902.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA, partial sequence	2128	2128	99%	0.0	98.43%	NR_113901.1
Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA, partial sequence	2115	2115	99%	0.0	98.18%	NR_114782.1
Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA, partial sequence	2095	2095	99%	0.0	98.02%	NR_040789.1
Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA, partial sequence	2025	2025	99%	0.0	96.86%	NR_117043.1
Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA, partial sequence	1975	1975	99%	0.0	96.13%	NR_113937.1
Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA, partial sequence	1969	1969	99%	0.0	96.04%	NR_113936.1
Enterococcus rotai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA, partial sequence	1967	1967	99%	0.0	96.04%	NR_108137.1
Enterococcus wangshanyuanii strain MN05 16S ribosomal RNA, partial sequence	1967	1967	99%	0.0	96.04%	NR_159231.1
Enterococcus crotali strain ETRF1 16S ribosomal RNA, partial sequence	1967	1967	99%	0.0	96.04%	NR_156980.1

Şekil 4.11 A3 kodlu izolatın BLAST sonuçları



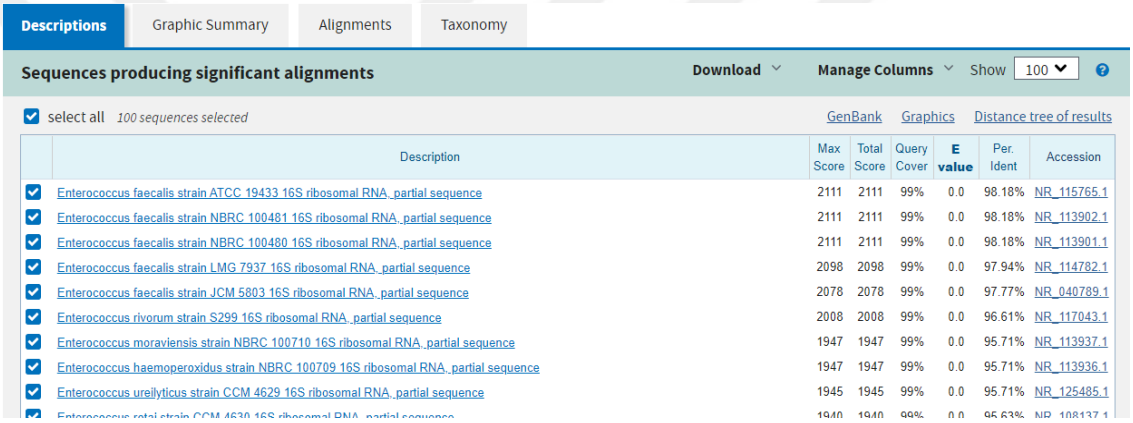
Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Manage Columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA, partial sequence	2111	2111	99%	0.0	98.18%	NR_115765.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100481 16S ribosomal RNA, partial sequence	2111	2111	99%	0.0	98.18%	NR_113902.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA, partial sequence	2111	2111	99%	0.0	98.18%	NR_113901.1
Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA, partial sequence	2098	2098	99%	0.0	97.94%	NR_114782.1
Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA, partial sequence	2078	2078	99%	0.0	97.77%	NR_040789.1
Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA, partial sequence	2008	2008	99%	0.0	96.61%	NR_117043.1
Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA, partial sequence	1947	1947	99%	0.0	95.71%	NR_113937.1
Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA, partial sequence	1947	1947	99%	0.0	95.71%	NR_113936.1
Enterococcus ureilyticus strain CCM 4629 16S ribosomal RNA, partial sequence	1945	1945	99%	0.0	95.71%	NR_125485.1
Enterococcus retai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA, partial sequence	1940	1940	99%	0.0	95.63%	NR_108137.1

Şekil 4.12 A4 kodlu izolatın BLAST sonuçları



Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Manage Columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Enterococcus faecalis strain ATCC 19433 16S ribosomal RNA, partial sequence	2111	2111	99%	0.0	98.18%	NR_115765.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100481 16S ribosomal RNA, partial sequence	2111	2111	99%	0.0	98.18%	NR_113902.1
Enterococcus faecalis strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA, partial sequence	2111	2111	99%	0.0	98.18%	NR_113901.1
Enterococcus faecalis strain LMG 7937 16S ribosomal RNA, partial sequence	2098	2098	99%	0.0	97.94%	NR_114782.1
Enterococcus faecalis strain JCM 5803 16S ribosomal RNA, partial sequence	2078	2078	99%	0.0	97.77%	NR_040789.1
Enterococcus rivorum strain S299 16S ribosomal RNA, partial sequence	2008	2008	99%	0.0	96.61%	NR_117043.1
Enterococcus moraviensis strain NBRC 100710 16S ribosomal RNA, partial sequence	1947	1947	99%	0.0	95.71%	NR_113937.1
Enterococcus haemoperoxidus strain NBRC 100709 16S ribosomal RNA, partial sequence	1947	1947	99%	0.0	95.71%	NR_113936.1
Enterococcus ureilyticus strain CCM 4629 16S ribosomal RNA, partial sequence	1945	1945	99%	0.0	95.71%	NR_125485.1
Enterococcus retai strain CCM 4630 16S ribosomal RNA, partial sequence	1940	1940	99%	0.0	95.63%	NR_108137.1

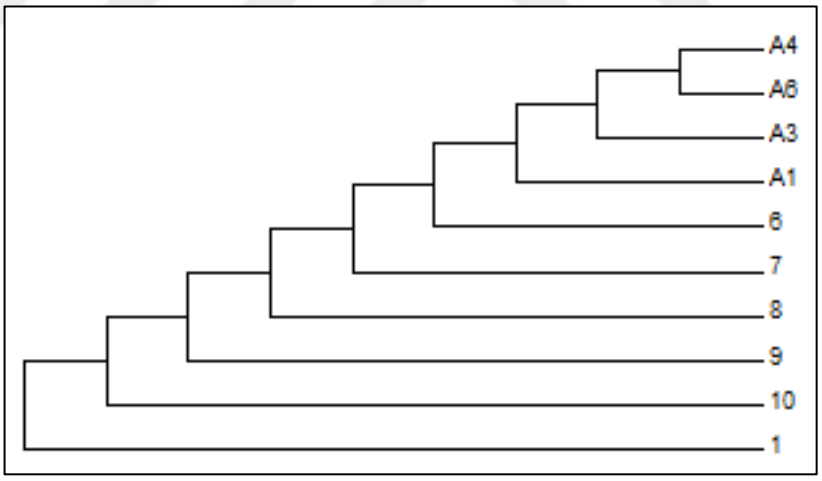
Şekil 4.13 A6 kodlu izolatın BLAST sonuçları

Nükleotid veritabanındaki 16S rRNA dizi eşleştirmelerine göre elde edilen tür sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4 İzolatların 16S rRNA dizilerinin veritabanındaki eşleştirme sonuçları

İzolat kodu	Tür adı
1	*Enterococcus faecalis*
6	*Enterococcus faecalis*
7	*Enterococcus faecalis*
8	*Enterococcus faecalis*
9	*Enterococcus faecalis*
10	*Enterococcus faecalis*
A1	*Enterococcus faecalis*
A3	*Enterococcus faecalis*
A4	*Enterococcus faecalis*
A6	*Enterococcus faecalis*

Dizi bilgilerine göre söz konusu izolatların "maximum likehood" prensibine göre filogenetik analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda arı gastrointestinal sisteminden izole edilen laktik asit bakterisi izolatları ile bitkisel orijinli laktik asit bakterisi izolatlarının ayrı kümeler halinde ayrıştığı net bir şekilde gözlenmektedir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 Laktik asit bakterisi izolatlarının filogenetik analizi

4.4 Suşların Bakteriyosin Üretim Özellikleri

İlişkili yöntemde izah edildiği haliyle hazırlanan laktik asit bakterisi süpernatantları belirtildiği şekliyle indikatör suş kültürleri üzerine uygulandıktan sonra muhtemel antimikrobiyel etkinlik sonuçları gözlenmiştir (Çizelge 4.5). Nötralize edilen

süpernatant içeriklerinde antimikrobiyel etkinlik saptanması dolaylı yolda peptit tabanlı bir bileşenin etkinliğine işaret etmektedir (bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri bileşen). Tez kapsamındaki hiçbir izolatta test edilen indikatör suş üzerinde antimikrobiyal etkinlik saptanmamıştır.

Çizelge 4.5 Laktik asit bakterisi izolatlarının bakteriyosin etkinlikleri

İzolat kodları	**İndikatör suşlar**				
	Listeria sp.	*Pediococcus acidilactici*	*Salmonella* sp.	*E. coli* ATCC 25922	*E. coli* O157:H7
1	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
A1	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-
A4	-	-	-	-	-
A6	-	-	-	-	-

"-"herhangi bir antimikrobiyel etkinlik olmadığına işaret etmektedir.

4.5 Farklı Kaynaklardan İzole Edilen LAB Suşlarının Bazı Probiyotik Özellikleri

CLSI tarafından *Enterococcus* cinsine yönelik tavsiye edilen antibiyotikler ve referans değerlerine bağlı olarak belirlenen duyarlılık profilleri Çizelge 4.6'da verilmiştir. Tüm izolatların duyarlı olduğu tek antibiyotik yalnızca sulfakzometaksazol olarak belirlenmiştir. A4 izolatı penisilin antibiyotiğine duyarlıyken A3 izolatı, ayrıca siprofloksasin antibiyotiğine karşı duyarlı olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.6 İzole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyogram (disk difüzyon) test sonuçları

İzolat Kodu	Rifampisin	Daptomisin	Amikasin	Penisilin	Sulfakzometaksazol	Eritromisin	Siprofloksasin
1	13 mm (R)	9 mm (R)	11 mm (R)	25 mm (S)	21 mm (S)	16 mm (I)	18 mm (I)
6	19 mm (I)	9 mm (R)	12 mm (R)	24 mm (S)	20 mm (S)	19 mm (I)	17 mm (I)
7	10 mm (R)	9 mm (R)	11 mm (R)	9 mm (R)	20 mm (S)	18 mm (I)	19 mm (I)
8	12 mm (R)	9 mm (R)	10 mm (R)	22 mm (S)	20 mm (S)	16 mm (I)	17 mm (I)
9	11 mm (R)	9 mm (R)	9 mm (R)	9 mm (R)	17 mm (S)	18 mm (I)	20 mm (I)
10	10 mm (R)	9 mm (R)	9 mm (R)	9 mm (R)	18 mm (S)	16 mm (I)	17 mm (I)
A1	18 mm (I)	9 mm (R)	10 mm (R)	9 mm (R)	18 mm (S)	17 mm (I)	12 mm (I)
A3	12 mm (R)	9 mm (R)	12 mm (R)	26 mm (S)	20 mm (S)	16 mm (I)	24 mm (S)
A4	12 mm (R)	9 mm (R)	15 mm (I)	21 mm (S)	18 mm (S)	15 mm (I)	19 mm (I)
A6	18 mm (I)	9 mm (R)	13 mm (R)	9 mm (R)	21 mm (S)	20 mm (I)	18 mm (I)

4.5.1 Düşük pH değerlerine (asitliliğe) karşı direnç

Bir suşun probiyotik özellik gösterebilmesi için sindirim sisteminden geçerken midenin 1-4 arasında değişen düşük pH'sına karşı dirençli olması gerekmektedir. Midede kalma süresi 3 saat olduğu için suşların düşük pH seviyelerinde 3 saat süreyle canlılık değişimi gözlemlenmiştir (Dunne vd. 2001, Vinderola ve Reinheimer 2003). Bu bağlamda pH 1.0, 2.0 ve 3.0 ayarlanmış tampon çözeltiler içersinde muamele edilen izolatlardan 0., 1. ve 3. saatlerde örnekler alınarak koloni sayımı gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.7). Sonuçlar logaritmik ölçekte koloni sayım sonuçları şeklinde verilmiştir.

Çizelge 4.7 Laktik asit bakterisi izolatlarının pH direnç sonuçları

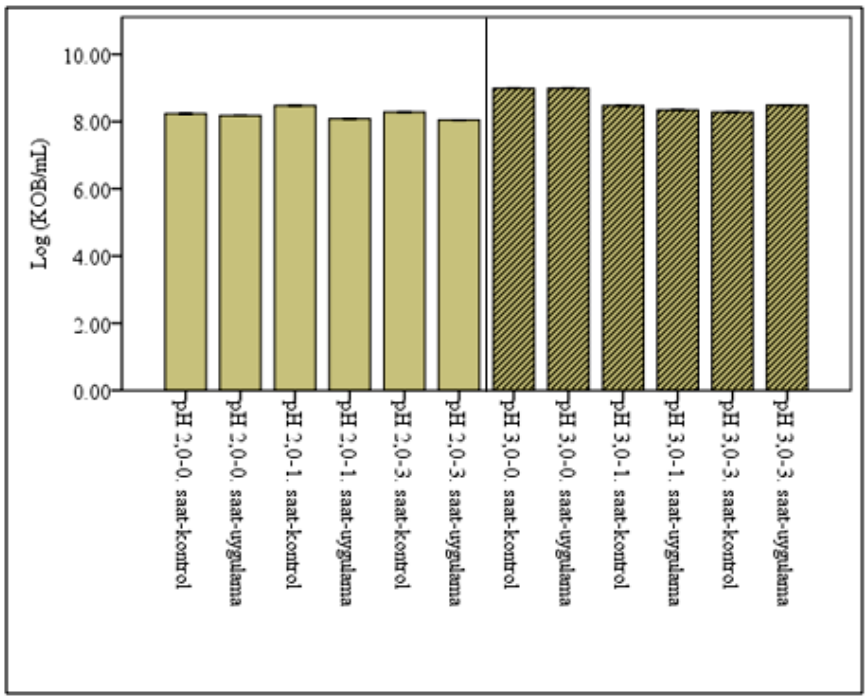
pH 1.0						
İzolat kodu	**0. saat**		**1. saat**		**3. saat**	
	Kontrol (KOB/mL)	**Uygulama (KOB/mL)**	**Kontrol (KOB/mL)**		**Kontrol (KOB/mL)**	**Uygulama (KOB/mL)**
1	8.15±0.004	7.02±0.017	7.12±0.002	0	6.01±0.005	0
6	8.26±0.006	6.97±0.001	7.32±0.002	0	6.12±0.007	0
7	8.24±0.004	6.95±0.001	7.26±0.004	0	6.28±0.003	0
8	8.35±0.005	7.15±0.006	7.26±0.002	0	6.12±0.002	0
9	8.23±0.005	7.61±0.006	7.33±0.002	0	6.28±0.003	0
10	8.23±0.005	7.99±0.0	7.26±0.004	0	6.26±0.004	0
A1	8.37±0.002	6.76±0.001	7.23±0.004	0	6.12±0.005	0
A3	8.33±0.003	6.95±0.0	7.43±0.002	0	6.12±0.003	0
A4	8.28±0.005	7.04±0.006	7.26±0.001	0	6.23±0.003	0
A6	8,18±0,004	7,59±0,577	7,48±0,002	0	6,28±0,001	0
pH 2.0						
İzolat kodu	**0. saat**		**1. saat**		**3. saat**	
	Kontrol (KOB/mL)	**Uygulama (KOB/mL)**	**Kontrol (KOB/mL)**	**Uygulama (KOB/mL)**	**Kontrol (KOB/mL)**	**Uygulama (KOB/mL)**
1	8.15±0.002	7.02±0.015	7.12±0.0	0	6.00±0.0	0
6	8.26±0.003	6.97±0.0	7.32±0.001	0	6.12±0.0	0
7	8.23±0.005	6.95±0.001	7.26±0.004	0	6.28±0.001	0
8	8.35±0.002	7.15±0.0	7.25±0.003	0	6.12±0.002	0
9	8.23±0.004	7.60±0.001	7.33±0.002	0	6.28±0.001	0
10	8.23±0.004	7.99±0.001	7.26±0.003	0	6.26±0.003	0
A1	8.36±0.0	6.76±0.001	7.23±0.003	0	6.12±0.005	0
A3	8.32±0.001	6.95±0.001	7.43±0.002	0	6.12±0.002	0
A4	8.28±0.001	7.01±0.005	7.26±0.001	0	6.24±0.001	0
A6	8.18±0.004	7.26±0.001	7.48±0.001	0	6.28±0.001	0
pH 3.0						
İzolat kodu	**0. saat**		**1. saat**		**3. saat**	
	Kontrol (KOB/mL)	**Uygulama (KOB/mL)**	**Kontrol (KOB/mL)**		**Kontrol (KOB/mL)**	**Uygulama (KOB/mL)**
1	9.21±0.003	9.21±0.002	9.12±0.002	9.12±0.005	8.01±0.002	8.38±0.001
6	9.18±0.002	9.18±0.003	8.33±0.001	8.97±0.0	8.12±0.002	*7.26±0.001
7	9.18±0.002	9.18±0.002	9.28±0.001	9.28±0.001	8.26±0.002	7.21±0.002
8	9.01±0.002	9.01±0.002	8.26±0.003	8.48±0.001	8.26±0.002	8.23±0.001
9	8.98±0.001	8.98±0.0	8.33±0.001	0	8.28±0.001	0
10	9.12±0.002	9.12±0.004	8.30±0.001	8.99±0.0	8.26±0.003	8.93±0.0
A1	8.91±0.0	8.91±0.0	8.23±0.004	8.73±0.0	8.23±0.001	8.08±0.002
A3	9.12±0.002	9.12±0.002	8.43±0.002	8.28±0.002	8.12±0.004	*8.93±0.001
A4	9.23±0.001	9.23±0.003	8.26±0.001	0	9.26±0.001	0
A6	8.99±0.0	8.99±0.0	8.48±0.001	0	8.28±0.001	0

*Belirtilen saatlerdeki kontrol grupları ile test grupları arasındaki anlamlı farka işaret etmektedir ($p < 0,05$, Tukey's Test).

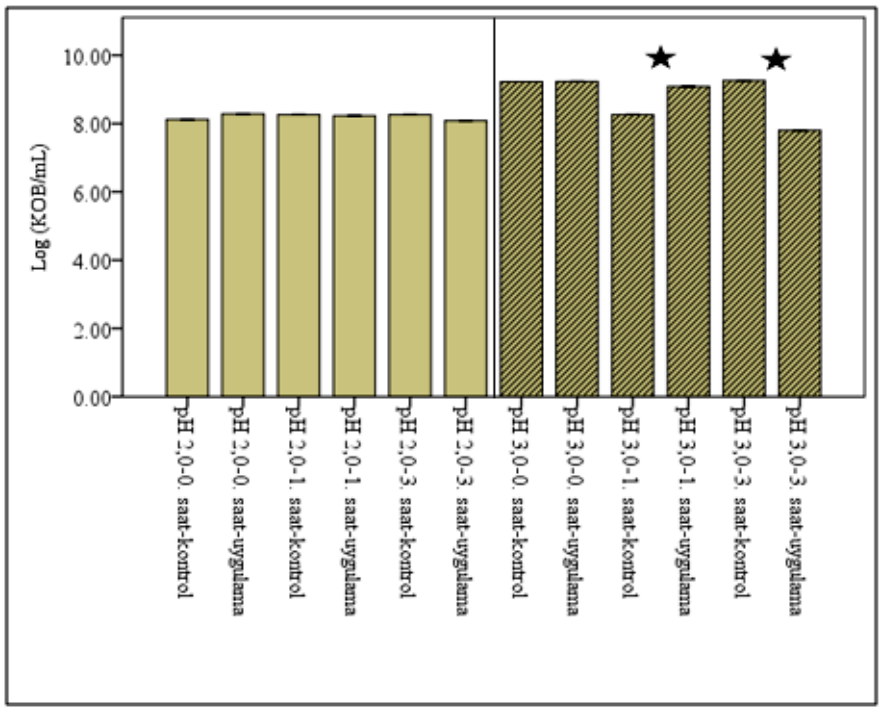
Çizelge 4.7'deki koloni oluşturan birim sayılardan da anlaşılacağı üzere çalışma kapsamına alınan tüm laktik asit bakterilerinde pH 1.0 ve 2.0'de hiçbir surette asit toleransı gözlenmemiştir. Ancak pH 3.0'te 9, A4 ve A6 kodlu izolatlar dışında geriye kalan 7 adet izolatta 3. saatin sonunda asit tolerasnsının devam ettiği görülmektedir. Söz konusu uygulamada 6 ve A3 kodlu izolatlar dışında kontrol grupları ile test grupları arasında anlamlı düzeyde bir fark saptanmamıştır ($p < 0,05$; Tukey's Test).

4.5.2 Pepsin direnci

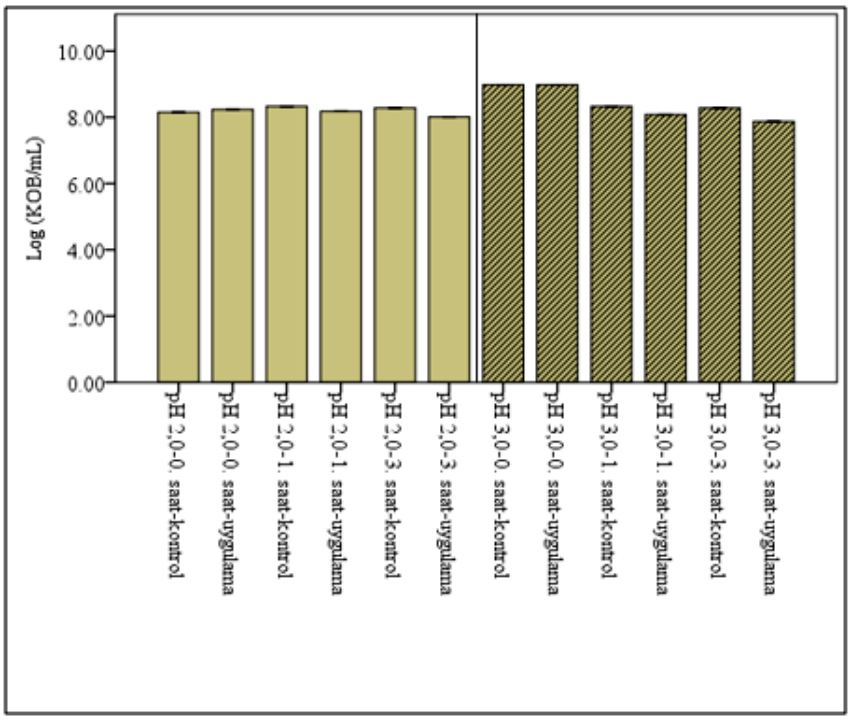
pH 2,0 ve 3,0'deki pepsin uygulamasının amacı sindirim sistemine ulaşan mikroorganizmaların gastrik koşullara direnç düzeylerinin *in vitro* olarak belirlenmesidir (Maragkoudakis vd. 2006). Asit tolerasından farklı olarak mide içeriğini *in vitro* koşullarda daha iyi simüle edebilmek maksadıyla pepsin içeriğiyle modifiye edilmiş ve pH 2.0 ve 3.0'e ayarlanmış tamponlarda Laktik Asit Bakterisi izolatları farklı sürelerde (1 ve 3 saat) muamele edilmiştir (Şekil 4.15-4.24). Sonuçlar logaritmik ölçekte koloni sayım sonuçları şeklinde verilmiştir.



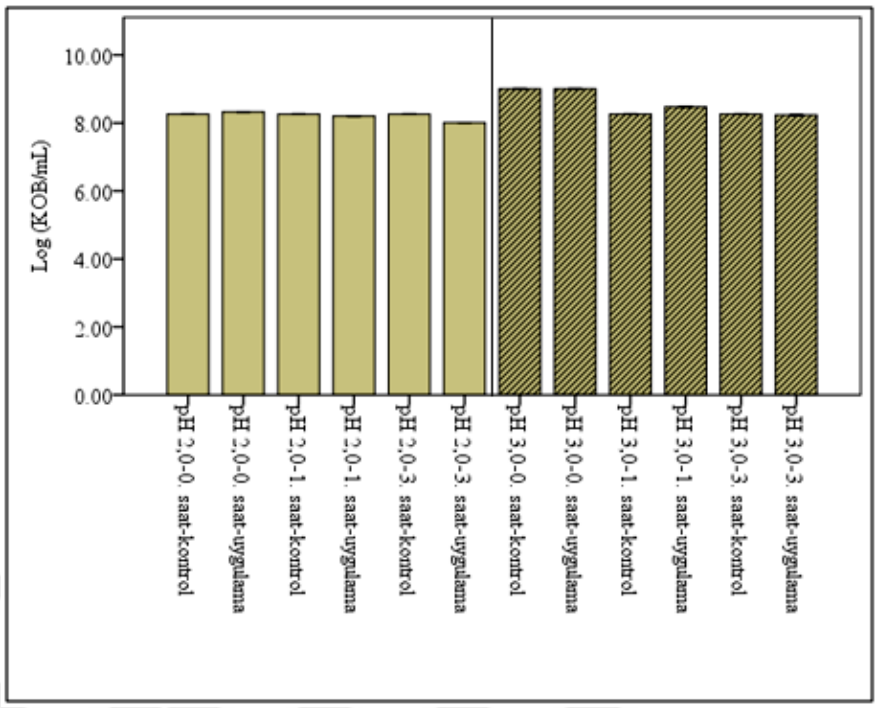
Şekil 4.15 A6 kodlu izolatın pepsin direnç profili



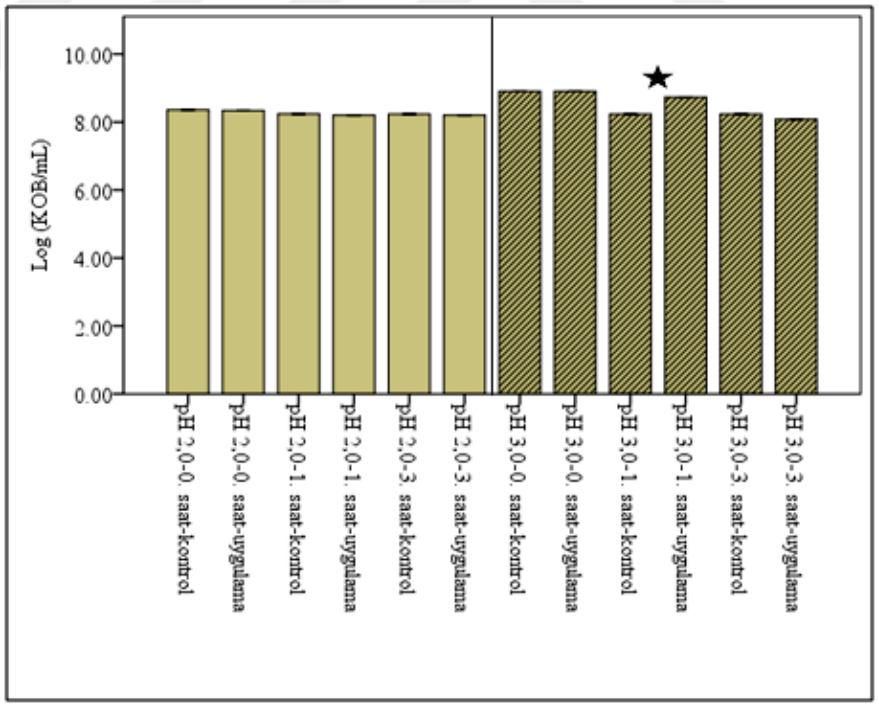
Şekil 4.16 A4 kodlu izolatın pepsin direnç profili. *Kontrol ve test grubu arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0,05$; Karşılaştırmalı T Testi)



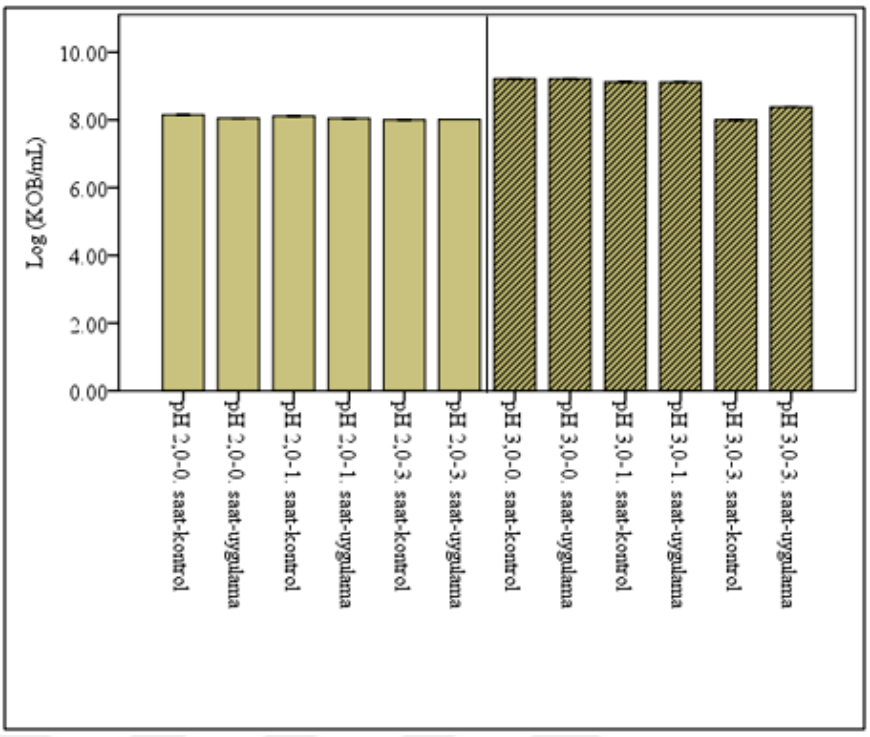
Şekil 4.17 9 kodlu izolatın pepsin direnç profili.



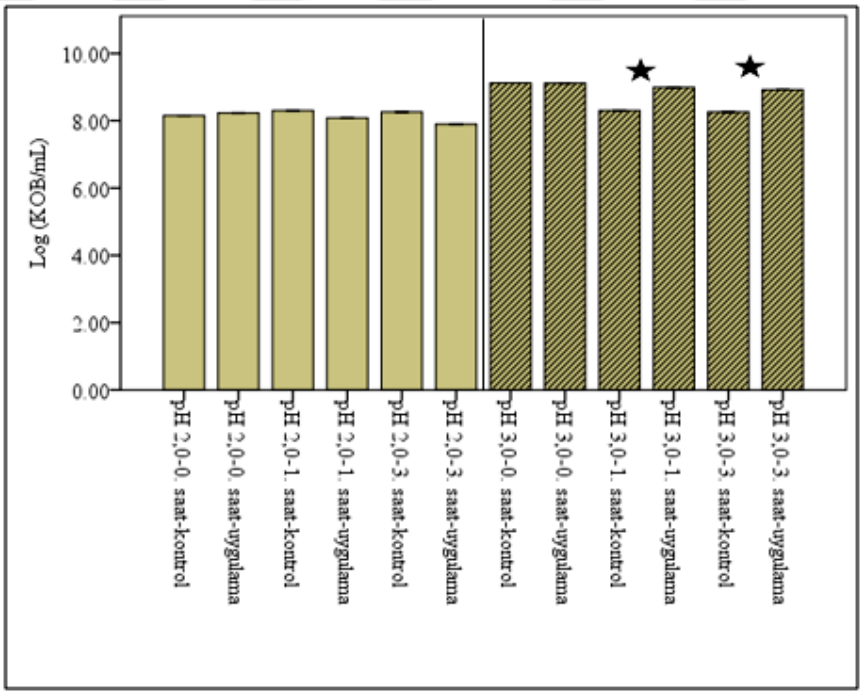
Şekil 4.18 8 kodlu izolatın pepsin direnç profili.



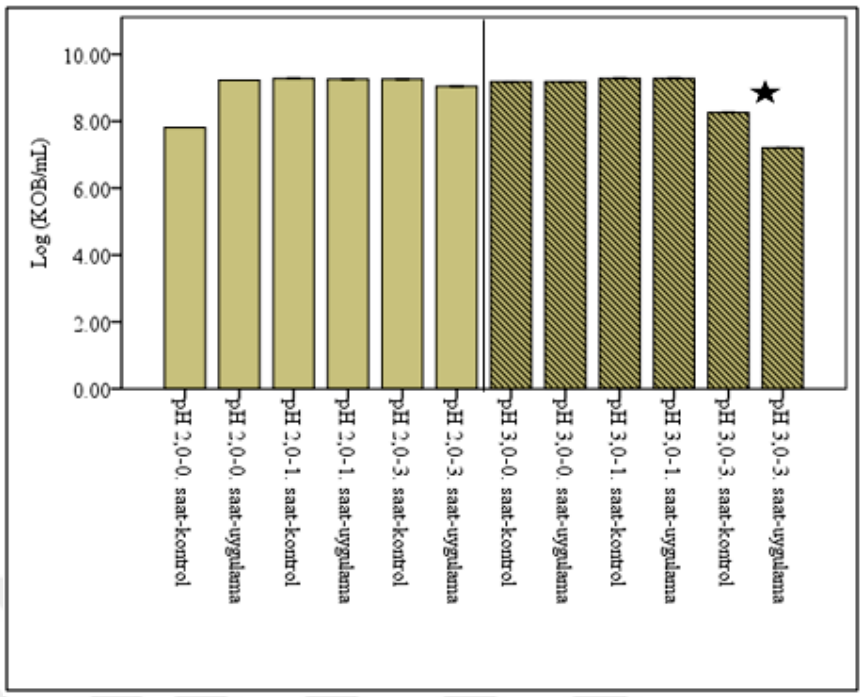
Şekil 4.19 A1 kodlu izolatın pepsin direnç profili. *Kontrol ve test grubu arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0,05$; Karşılaştırmalı T Testi)



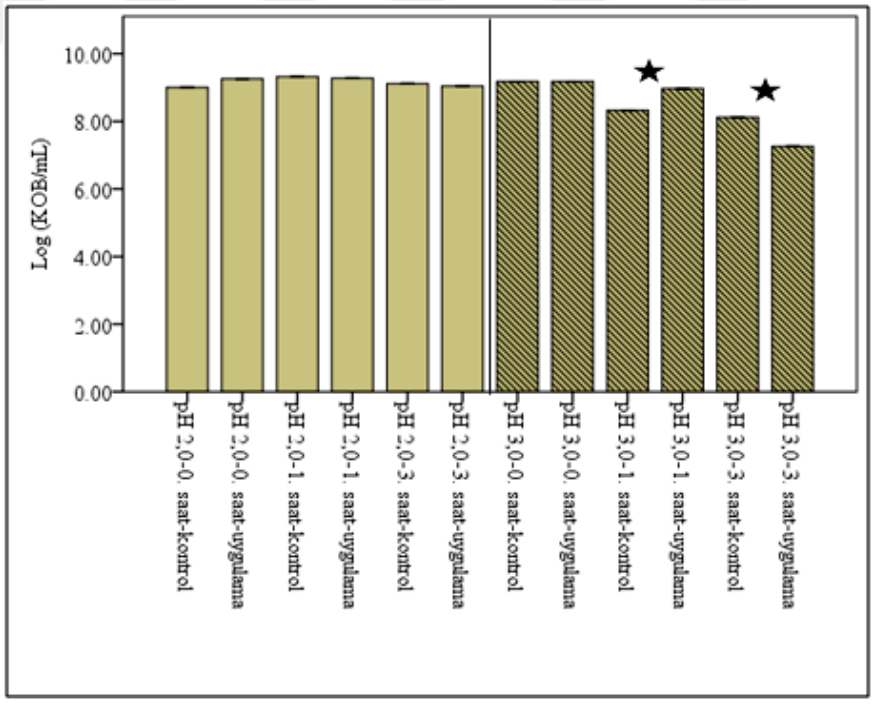
Şekil 4.20 1 kodlu izolatın pepsin direnç profili



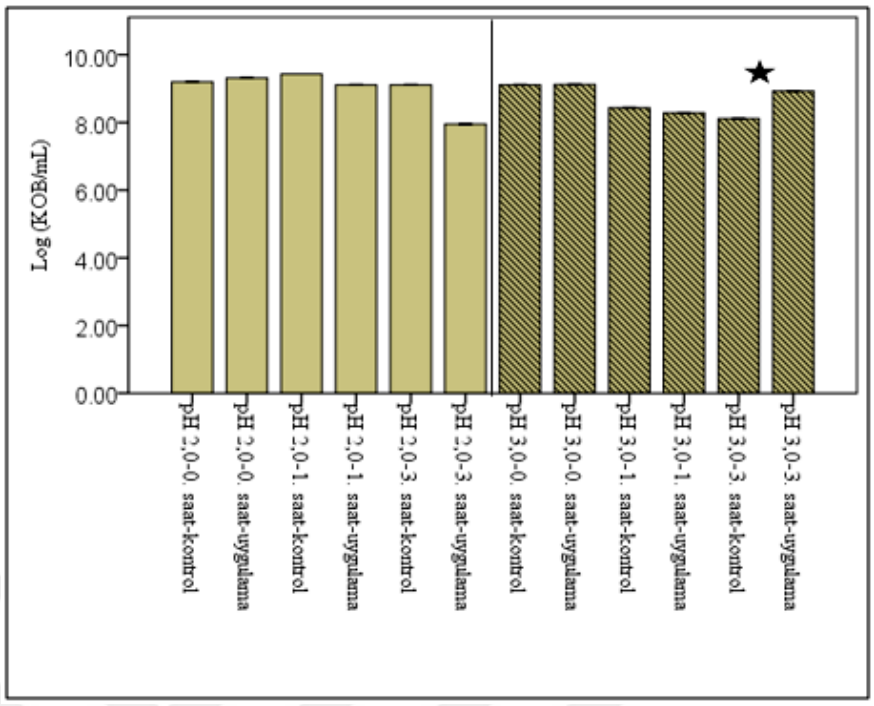
Şekil 4.21 10 kodlu izolatın pepsin direnç profili. *Kontrol ve test grubu arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0,05$; Karşılaştırmalı T Testi)



Şekil 4.22 7 kodlu izolatın pepsin direnç profili. *Kontrol ve test grubu arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0,05$; Karşılaştırmalı T Testi)



Şekil 4.23 6 kodlu izolatın pepsin direnç profili. *Kontrol ve test grubu arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0,05$; Karşılaştırmalı T Testi)



Şekil 4.24 A3 kodlu izolatın pepsin direnç profili. *Kontrol ve test grubu arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0,05$; Karşılaştırmalı T Testi)

4.5.3 Pankreatin direnci

İzolatların pankreatine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi amacıyla 1 mg/mL pankreatin içeren ve pH değeri 8,0'a ayarlanmış PBS tamponlarında 4. Saat süresince muamele edilmiş kültürlerden örnek alınarak koloni sayımı gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.8). Sayım işlemi 3 paralel halinde gerçekleştirilmiştir (A, B, C). Kontrol gruplarından elde edilen koloni sayım sonuçları ile pankreatin uygulamasına maruz bırakılan test gruplarından elde edilen sayım sonuçları arasında herhangi bir fark saptanmamıştır. Sonuçlar logaritmik ölçekte koloni sayım sonuçları şeklinde verilmiştir.

Çizelge 4.8 Laktik asit bakterisi izolatlarının pankreatin direnç sonuçları (KOB/mL)

	0. saat						4. saat					
	Kontrol (KOB/mL)			Pankreatin (KOB/mL)			Kontrol (KOB/mL)			Pankreatin (KOB/mL)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	8,8	8,9	8,8	8,8	9,1	9,0	9,2	9,1	9,1	9,6	9,6	9,6
A6	8,7	8,8	8,9	9,0	9,0	9,0	9,4	9,3	9,4	9,8	9,7	9,8
A3	8,9	8,8	8,9	9,0	9,1	9,1	9,4	9,4	9,4	9,4	9,5	9,4
A4	9,2	9,1	9,3	8,9	9,2	9,0	9,1	9,3	9,2	9,6	9,6	9,6
A1	9,1	9,2	9,4	9,2	9,1	9,2	8,3	8,2	8,1	8,1	8,1	8,1
10	9,4	9,0	9,1	9,6	9,6	9,6	8,8	8,9	8,9	9,6	9,7	9,6
8	9,7	9,8	9,8	9,8	9,7	9,8	9,2	9,0	9,2	9,6	9,7	9,7
7	9,5	9,8	9,6	9,8	9,8	9,8	9,1	9,2	9,3	9,6	9,7	9,7
6	9,8	9,7	9,8	9,8	9,9	9,9	9,3	9,2	9,3	9,6	9,7	9,7
9	9,9	9,8	9,8	9,8	9,7	9,8	9,2	9,2	9,1	9,7	9,6	9,7

4.5.4 Safra tuzu direnci

Tez kapsamındaki laktik asit bakterileri üç farklı konsantrasyonda safra tuzu içeriğine maruz bırakılmıştır (1 ve 4 saat). Bakterilerin safra tuzuna olan direnç profilleri Çizelge 4.9-4.11'de ve Şekil 4.25-4.34'te verilmiştir. Sonuçlar kontrol gruplarındaki sayım sonuçları referans alınarak koloni sayımındaki yüzde azalmalar şeklinde verilmiştir. Tüm izolatlarda artan safra tuzu konsantrasyonlarında ve temas sürelerinde anlamlı düzeyde bakteri canlılığında azalma gözlenmektedir. 1, 6 ve 8 numaralı izolatlar dışında geriye kalan tüm izolatlarda 4. saat sonunda ve % 1,0'lık safra tuzu konsantrasyonunda dahi önemli düzeyde canlılığın muhafaza edilebildiği dikkat çekmektedir (Çizelge 4.9). Çizelgelerde izole edilen laktik asit bakterilerinin belirtilen temas sürelerinde safra tuzuna karşı olan dirençleri ayrıca kontrol grupları ile kıyaslanması neticesinde canlılıklarındaki yüzde (%) azalma şeklinde ifade edilmiştir.

Çizelge 4.9 1, 6, 7 ve 8 kodlu izolatların safra tuzu direnç profilleri (yüzde; % azalma)

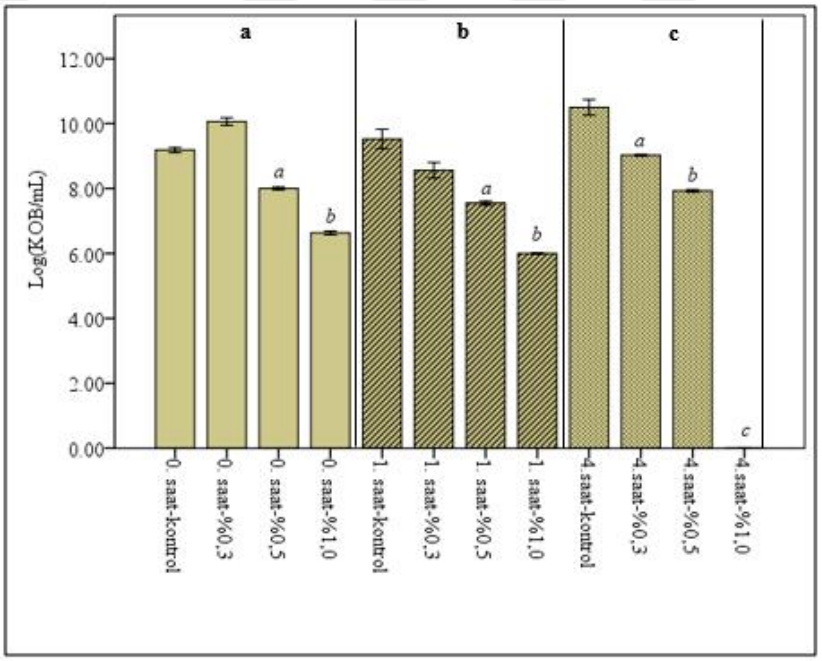
1			**6**		
0. saat-% 0,3	**0. saat-% 0,5**	**0. saat-% 1,0**	**0. saat-% 0,3**	**0. saat-% 0,5**	**0. saat-% 1,0**
7.89	98.08	99.65	0.00	95.00	99.73
0.00	87.91	97.42	0.00	91.23	99.69
0.00	97.19	99.45	0.00	93.33	99.74
1. saat-% 0,3	**1. saat-% 0,5**	**1. saat-% 1,0**	**1. saat-% 0,3**	**1. saat-% 0,5**	**1. saat-% 1,0**
0.00	99.47	99.99	90.27	99.34	99.98
0.00	96.32	99.89	87.38	98.04	99.94
0.00	96.34	99.94	89.48	99.05	99.97
4. saat-% 0,3	**4. saat-% 0,5**	**4. saat-% 1,0**	**4. saat-% 0,3**	**4. saat-% 0,5**	**4. saat-% 1,0**
97.34	99.70	100.00	93.67	99.46	100.00
99.47	99.87	100.00	98.09	99.83	100.00
99.07	99.84	100.00	96.83	99.78	100.00
7			**8**		
0. saat-% 0,3	**0. saat-% 0,5**	**0. saat-% 1,0**	**0. saat-% 0,3**	**0. saat-% 0,5**	**0. saat-% 1,0**
0.00	96.70	99.69	92.80	93.33	99.78
0.00	89.43	99.21	14.11	79.82	99.53
0.00	94.64	99.57	65.08	88.78	99.69
1. saat-% 0,3	**1. saat-% 0,5**	**1. saat-% 1,0**	**1. saat-% 0,3**	**1. saat-% 0,5**	**1. saat-% 1,0**
0.00	96.70	99.69	4.77	94.69	99.30
0.00	89.43	99.21	50.44	93.13	99.79
0.00	94.64	99.57	0.00	90.79	99.45
4. saat-% 0,3	**4. saat-% 0,5**	**4. saat-% 1,0**	**4. saat-% 0,3**	**4. saat-% 0,5**	**4. saat-% 1,0**
98.68	98.56	99.99	0.00	97.71	100.00
97.05	96.52	99.97	50.42	99.50	100.00
98.09	97.62	99.98	66.95	99.70	100.00

Çizelge 4.10 9, 10, A1 ve A3 kodlu izolatların safra tuzu direnç profilleri (yüzde; % azalma)

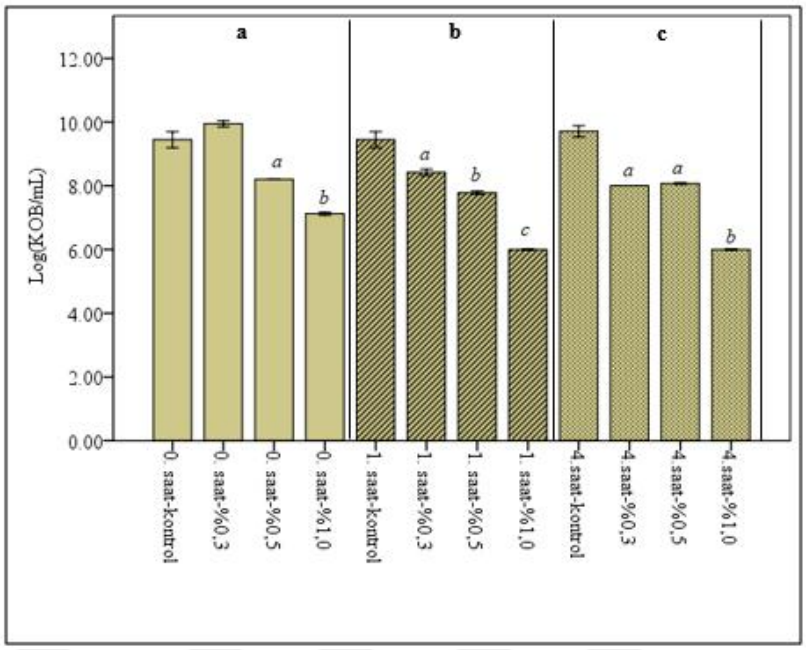
9			**10**		
0. saat-% 0,3	**0. saat-% 0,5**	**0. saat-% 1,0**	**0. saat-% 0,3**	**0. saat-% 0,5**	**0. saat-% 1,0**
68.95	80.44	99.61	92.90	90.07	99.57
30.00	74.00	99.40	87.41	62.86	98.11
54.40	76.74	99.54	92.92	80.89	98.51
1. saat-% 0,3	**1. saat-% 0,5**	**1. saat-% 1,0**	**1. saat-% 0,3**	**1. saat-% 0,5**	**1. saat-% 1,0**
66.50	97.65	99.95	90.11	98.97	99.97
88.22	95.70	99.94	81.42	97.85	99.96
79.01	96.90	99.95	88.11	98.93	99.97
4. saat-% 0,3	**4. saat-% 0,5**	**4. saat-% 1,0**	**4. saat-% 0,3**	**4. saat-% 0,5**	**4. saat-% 1,0**
97.85	99.45	99.99	98.01	99.73	99.98
99.92	99.91	100.00	97.87	99.67	99.95
99.59	99.86	100.00	98.10	99.70	99.97
A1			**A3**		
0. saat-% 0,3	**0. saat-% 0,5**	**0. saat-% 1,0**	**0. saat-% 0,3**	**0. saat-% 0,5**	**0. saat-% 1,0**
0.00	58.00	82.00	0.00	92.55	99.00
0.00	93.03	96.85	0.00	89.24	97.81
0.00	58.00	82.00	0.00	90.79	98.55
1. saat-% 0,3	**1. saat-% 0,5**	**1. saat-% 1,0**	**1. saat-% 0,3**	**1. saat-% 0,5**	**1. saat-% 1,0**
0.00	85.00	89.00	74.99	91.04	99.83
0.00	92.48	99.00	0.00	52.11	99.00
0.00	92.48	96.99	43.36	83.72	99.58
4. saat-% 0,3	**4. saat-% 0,5**	**4. saat-% 1,0**	**4. saat-% 0,3**	**4. saat-% 0,5**	**4. saat-% 1,0**
63.52	98.45	99.91	99.15	99.49	100.00
0.00	91.96	99.75	98.81	99.57	100.00
43.50	96.04	99.86	98.92	99.48	100.00

Çizelge 4.11 A4 ve A6 kodlu izolatların safra tuzu direnç profilleri (yüzde; % azalma)

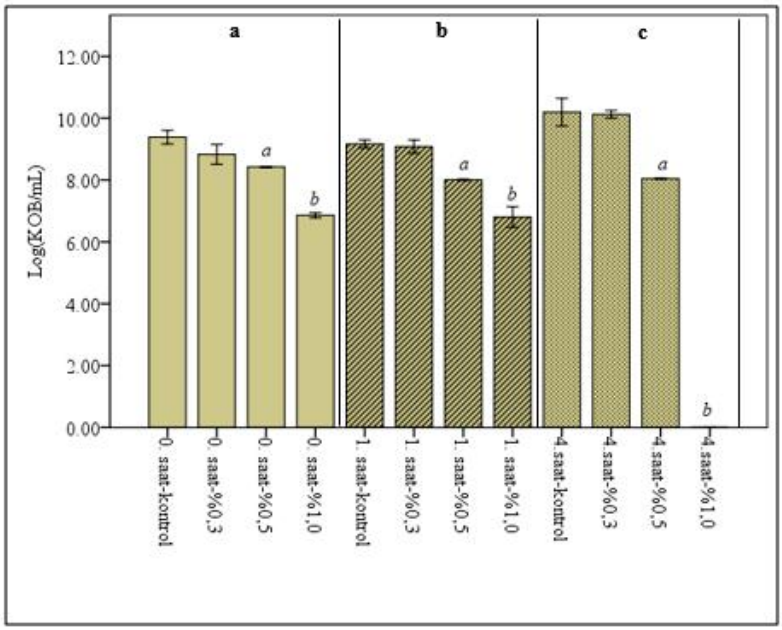
A4			A6		
0. saat-% 0,3	**0. saat-% 0,5**	**0. saat-% 1,0**	**0. saat-% 0,3**	**0. saat-% 0,5**	**0. saat-% 1,0**
42.16	96.17	98.84	0.00	74.70	97.99
0.00	93.01	97.71	0.00	97.79	99.68
20.38	94.11	98.21	0.00	79.58	97.76
1. saat-% 0,3	**1. saat-% 0,5**	**1. saat-% 1,0**	**1. saat-% 0,3**	**1. saat-% 0,5**	**1. saat-% 1,0**
0.00	81.76	99.54	0.00	93.59	99.97
0.00	83.85	99.77	89.81	93.14	99.98
0.00	83.03	99.67	32.18	92.61	99.98
4. saat-% 0,3	**4. saat-% 0,5**	**4. saat-% 1,0**	**4. saat-% 0,3**	**4. saat-% 0,5**	**4. saat-% 1,0**
98.93	99.71	100.00	0.00	93.59	99.97
98.03	99.11	100.00	89.81	93.14	99.98
99.48	99.57	100.00	32.18	92.61	99.98



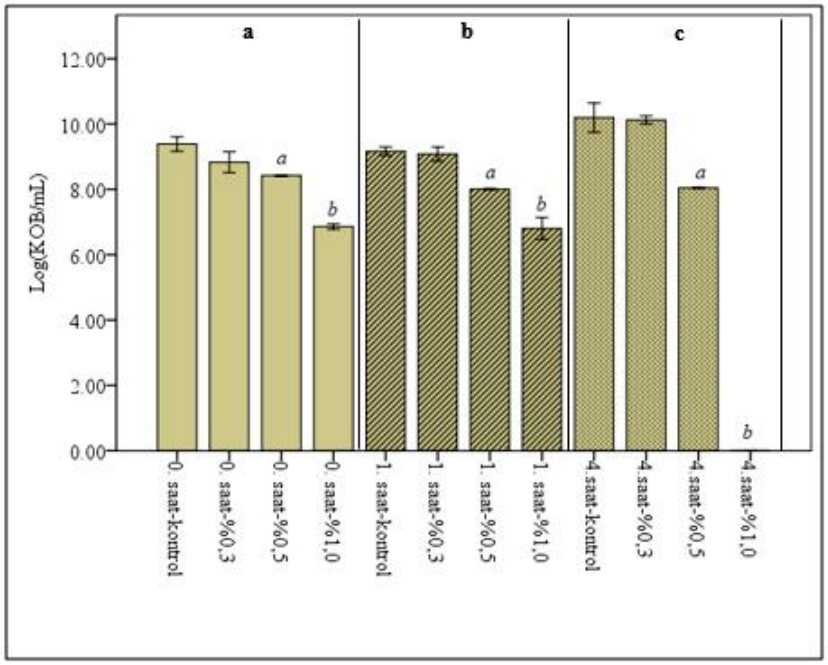
Şekil 4.25 1 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci. Harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0.05$; Tukey Testi) **a)** İnkübasyon başlangıcı (0. saat) **b)** 1. saat **c)** 4. saat



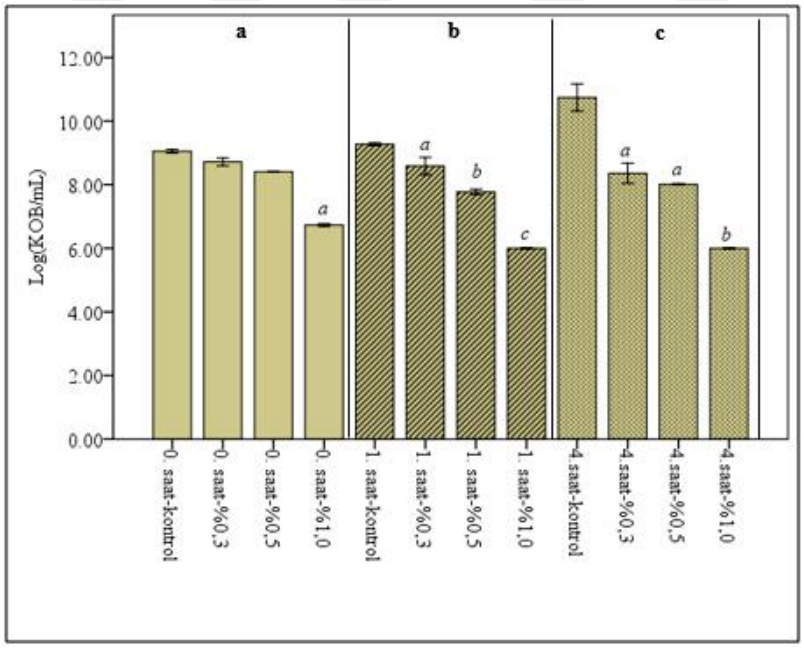
Şekil 4.26 6 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci. Harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0.05$; Tukey Testi) **a)** İnkübasyon başlangıcı (0. saat) **b)** 1. saat **c)** 4. Saat



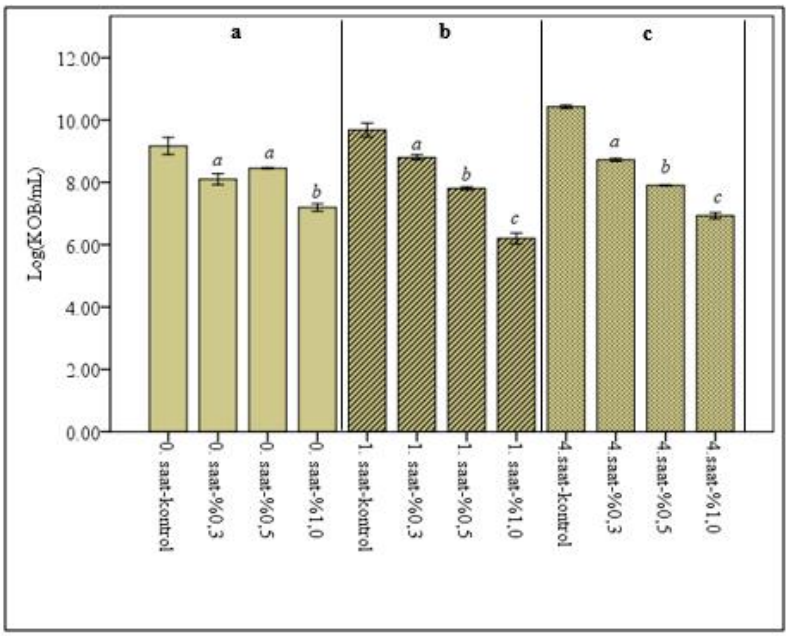
Şekil 4.27 7 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci. Harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0.05$; Tukey Testi) **a)** İnkübasyon başlangıcı (0. saat) **b)** 1. saat **c)** 4. saat



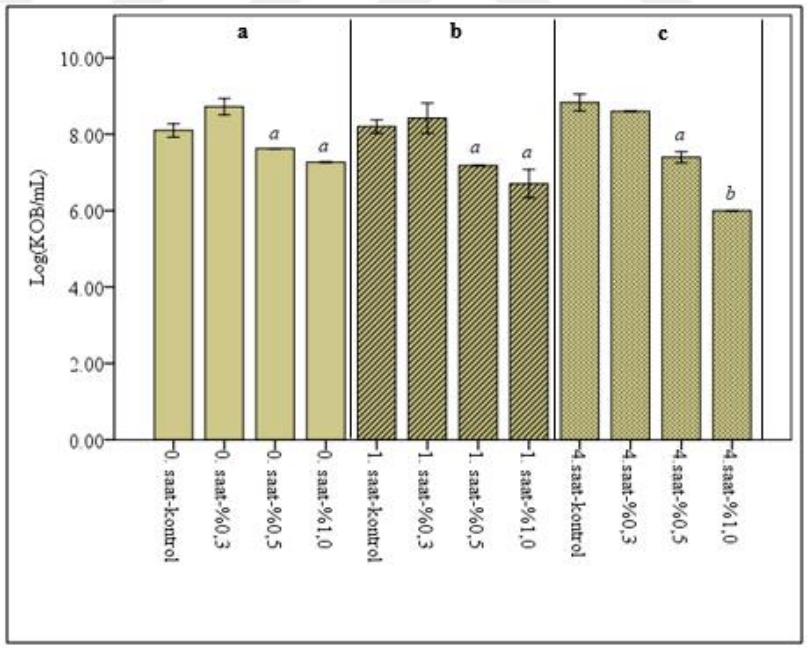
Şekil 4.28 8 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci. Harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0.05$; Tukey Testi) **a)** İnkübasyon başlangıcı (0. saat) **b)** 1. saat **c)** 4. saat



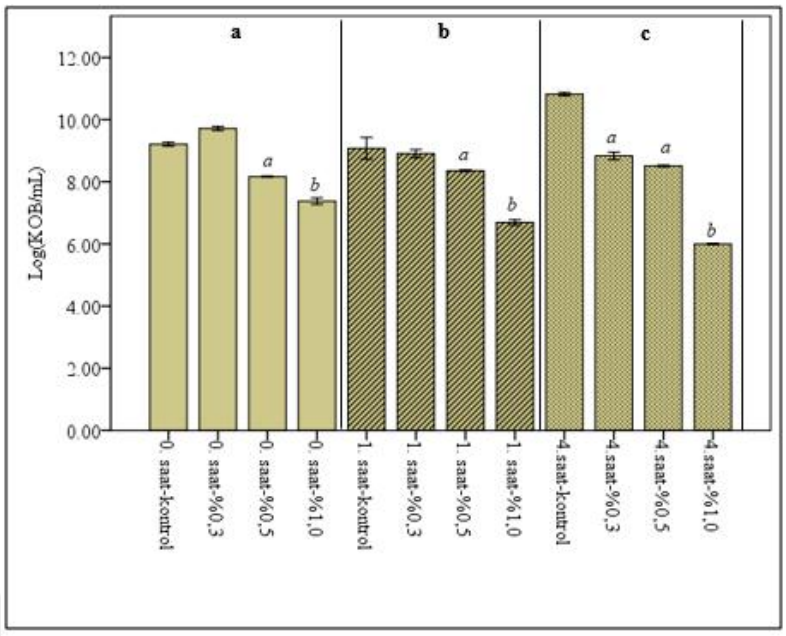
Şekil 4.29 9 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci. Harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0.05$; Tukey Testi) **a)** İnkübasyon başlangıcı (0. saat) **b)** 1. saat **c)** 4. saat



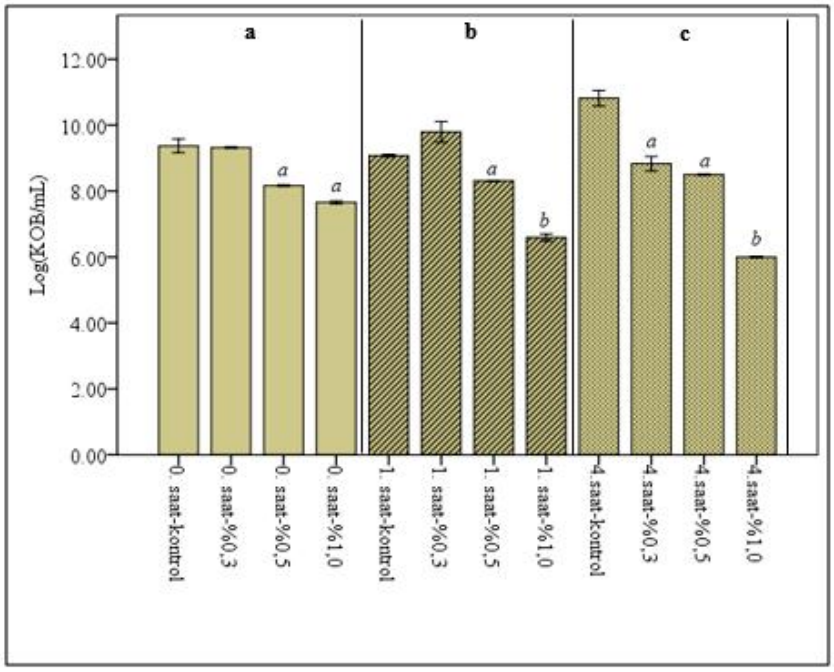
Şekil 4.30 10 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci. Harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0.05$; Tukey Testi) **a)** İnkübasyon başlangıcı (0. saat) **b)** 1. saat **c)** 4. Saat



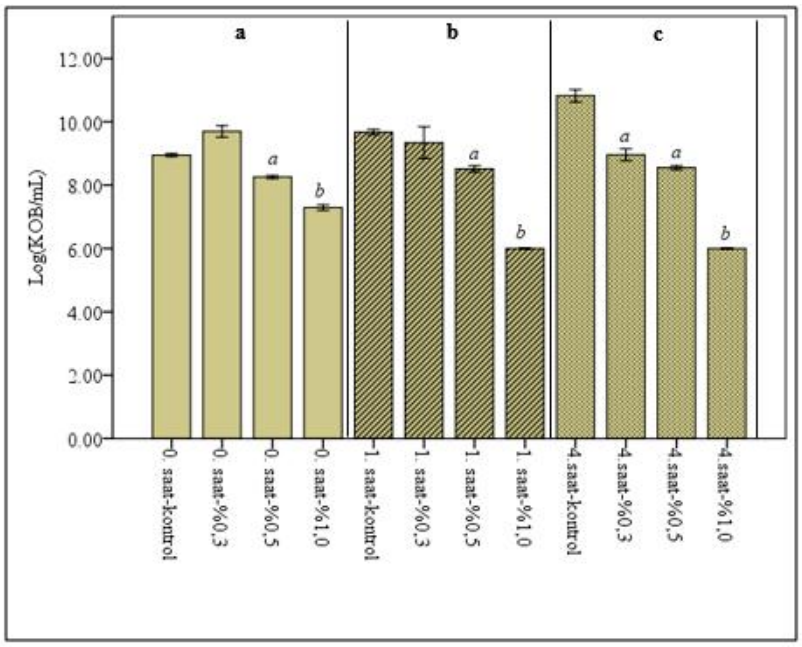
Şekil 4.31 A1 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci. Harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0.05$; Tukey Testi) **a)** İnkübasyon başlangıcı (0. saat) **b)** 1. saat **c)** 4. saat



Şekil 4.32 A3 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci. Harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0.05$; Tukey Testi) **a)** İnkübasyon başlangıcı (0. saat) **b)** 1. saat **c)** 4. Saat



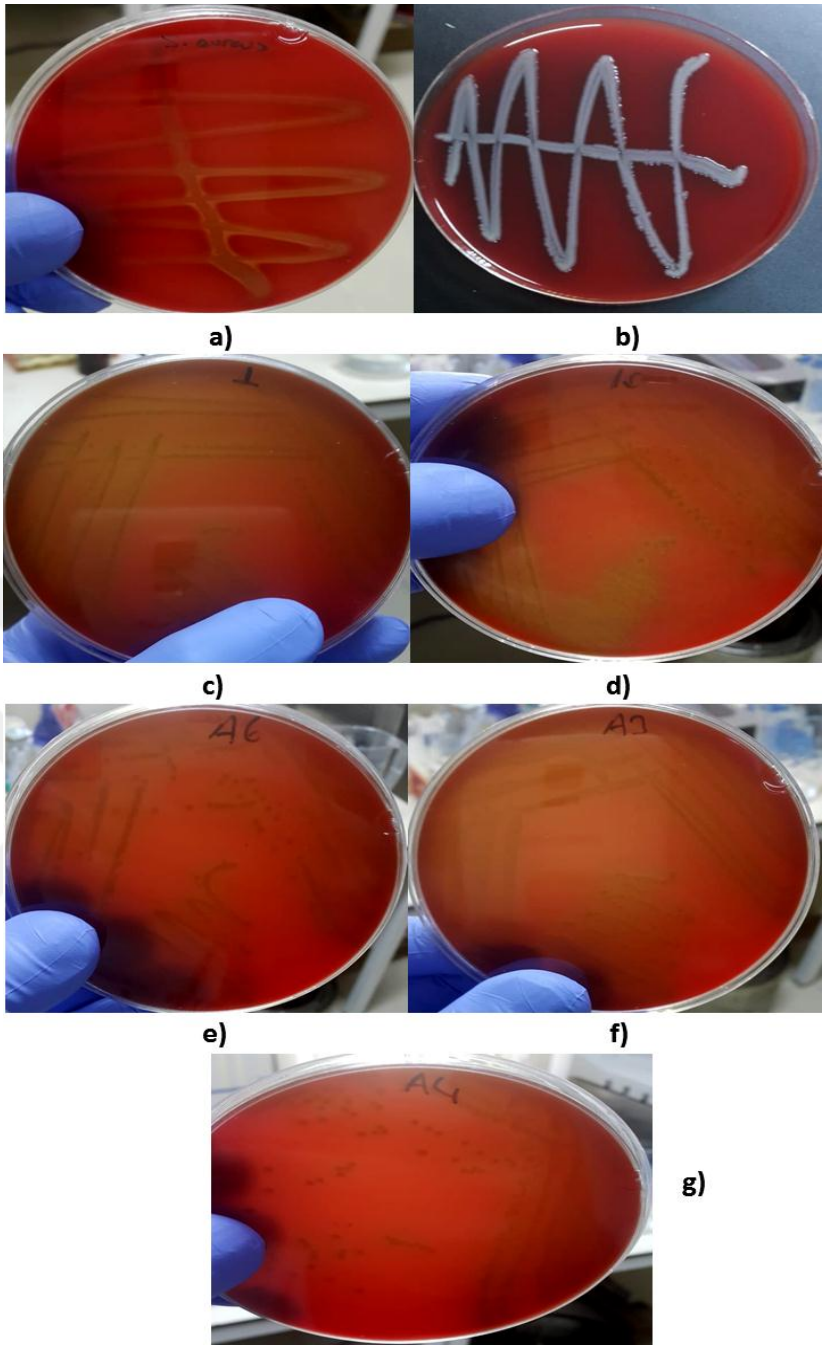
Şekil 4.33 A4 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci. Harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0.05$; Tukey Testi) **a)** İnkübasyon başlangıcı (0. saat) **b)** 1. saat **c)** 4. Saat



Şekil 4.34 A6 kodlu izolatın farklı konsantrasyonda safra tuzlarına olan direnci. Harfler ortalamalar arasındaki farkın anlamlı olduğuna işaret etmektedir ($p < 0.05$; Tukey Testi) **a)** İnkübasyon başlangıcı (0. saat) **b)** 1. saat **c)** 4. saat

4.5.5 Suşların hemolitik aktiviteleri

İzole edilen laktik asit bakterilerinin bazılarının hemolitik aktivite sonuçları Şekil 4.35'te verilmiştir. Çalışma kapsamındaki tüm izolatlar kanlı agar besiyerinde alfa (α) hemolitik aktivite içermektedir.



Şekil 4.35 **a)** *Staphylococcus aureus* beta (β) hemolitik aktivite **b)** *Eschrichia coli* non-hemolitik aktivite **c)** 1 kodlu izolat **d)** 10 kodlu izolat **e)** A6 kodlu izolat **f)** A3 kodlu izolat **g)** A4 kodlu izolat (Kodları verilen tüm laktik asit bakterileri alfa (α) hemolitik aktivite içermektedir.

5. TARTIŞMA

Probiyotikler uygun miktarda uygulanmaları halinde konakçısına fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Laktik asit bakterileri ve bifidobakteriler insan gastrointestinal kanalında en sık rastlanılan bakterilerdir ve ticari probiyotiklerin önemli bir kısmını temsil etmektedirler. Antimikrobiyal aktivite, patojenlerin uzaklaştırılması ya da inhibe edilmesi, intestinal epitel bariyer fonksiyonun güçlendirilmesi, sindirimi güç besinsel bileşenlerin sindirilmesi ve immünomodülasyon insan sağlığı için ticari maksatla kullanılan probiyotiklerin çok sayıda faydalarından başlıcalarıdır. FAO/WHO tarafından sağlanan rehberlerdeki değerlendirmeler aday bir mikroorganizmanın probiyotik olarak değerlendirilmesi için asgari kriterleri sunmalıdır. Probiyotik potansiyelleri olan adayların üst gastrointestinal kanal simüle eden bir çevreye maruz bırakılmaları halinde canlı kalabilmeleri, mukus ya da intestinal epitel hücrelere tutunabilmeleri ve immün sistemi modüle edebilmeleri sıklıkla test edilen nitelikleridir (Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization, 2001; Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization; 2002; Resta-Lenert ve Barrett, 2003; Smits vd., 2005; Baken vd., 2006; He vd., 2008; Lebeer vd., 2010; Evrard vd., 2011).

Gram-pozitif, fakültatitf anaerob laktik asit bakterisi olan *E. faecalis* insan kommensal florasının yaygın bir üyesidir, fakat dualistik doğasından ötürü insan sağlığı açısından da risk teşkil edebileceği de mutlak surette gündeme gelmelidir. *E. faecalis*'in bazı suşları çoklu ilaç dirençliliği sergileyen fırsatçı patojenler olup birçok nozokomiyal enfeksiyonda sıklıkla izole edilebilmektedir (Linden ve Miller, 1999; Franz vd., 2003; Foulquie vd., 2006; Fisher ve Phillips, 2009). Ancak bazı suşlarının bilinen bu endişe verici niteliklerinin yanı sıra bazı probiyotik özellikli *E. faecalis* suşlarının da ticari olarak kullanımları bir hayli yaygındır. Örneğin ticari kullanımı olan bazı probiyotik özellikli *E. faecalis* suşlarının bağırsağı kolonize edebilme ve konakçıda immün yanıtı teşvik etmesi gibi güçlü özellikleri bulunmaktadır. Yukarıda bahsi geçen çift yönlü tartışmalardan ötürü aday *E. faecalis* suşlarının starter kültür ya da probiyotik olarak değerlendirilebilmeleri için diğer laktik asit bakterilerine nispeten daha dikkatli bir şekilde ele alınmaları gerekmektedir. Ancak FAO/WHO'dan farklı olarak EFSA,

virülans özellik gösteren ve göstermeyen *E. faecalis* suşlarının ayrımlarındaki güçlüklerden ötürü bu suşları Güvenliğin Nitelikli İhtimali'ne (QPS) yönelik mikroorganizmaların listesine dahil etmemektedir (European Food Safety Authority, Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents, 2010).

Virulanslık özelliği olan enterokoklar çoklu ilaç dirençliliği ile ilişkili determinantları ve adhezinler, invazinler ve hemolizinler gibi virulanslık faktörlerini taşıyabilmektedir. Enterokokların söz konusu bu özellikleri onları gıdalarda kullanımlarını ve probiyotik olarak değerlendirilmelerini kısıtlamaktadır. Bazı geleneksel fermente gıdalardan ve sebzelerden izole edilen doğal flora üyesi enterokoklarda da virulans faktörlerine rastlanabildiği rapor edilmektedir. Genel olarak tartışma konusu olan virulans faktörlerine *E. faecalis*'te *E. faecium*'a nispeten daha fazla rastlanmaktadır (Willems vd., 2001; Leavis vd., 2004). *Enterococcus* probiyotikleri genellikle gıdalarda starter kültür olarak kullanılmaz ancak gıda takviyesi olarak kullanılabilmektedir. Bu niteliklere sahip suşların irritable bağırsak sendromu, diyare ya da antibiyotik ilişkili diyare gibi tablolarının iyileştirilmesinde, kolestrol düzeyinin düşürülmesinde ve immün regülasyon gibi etkilerinin gözlemlenebilmesi için yüksek sayılarda tüketilmesi gerekmektedir. Ayrıca takviye olarak alınan probiyotik özellikli enterokokların bağırsak mikroflorasında bulunan kommensal enterokoklar ile de sinerjetik etkileşimlere girdiği bilinmektedir (Gaggia vd., 2010).

Yukarıda bahsi geçen literatür tartışmalarına istinaden, ilgili tez çalışmasında farklı bitkisel kaynaklardan ve arı gastrointestinal sisteminden izole edilip tanımlanan *E. faecalis* suşlarının da probiyotik potansiyellerini saptamak adına mutlak surette avantajlı ve dezavantajlı yönleri birlikte ele alınmalıdır. Söz konusu izolatlarda her ne kadar kayda değer ölçüde asit, pepsin ve pankreatin direnci gözlense de, ilgili suşlarda ilave bazı antibiyotik dirençlilik profilleri, muhtemel virulans faktörleri ve bu faktörlerle ilişkili olabilecek hareketli genetik elementler ilave araştırmalarla aydınlatılmalıdır.

Gram-pozitif koklar 1980'lerin sonuna dek streptokok olarak tanımlanmıştır. 1993 yılında bu grup Devriese vd. tarafından (1993) *Streptococcus, Lactococcus* ve *Enterococcus* olarak üç cins altında sınıflandırılmıştır. Güncel olarak *Enterococcus*'un

tanımlanmış 37 türü bulunmaktadır (Devriese vd., 2003; Franz ve Holzapfel, 2006). Bu 37 tür, 16S rRNA dizi analizleri esas alınarak 7 temel tür grubunda sınıflandırılmaktadır. *Lactobacillus* ve *Streptococcus*'tan sonra *Enterococcus* laktik asit bakterilerinin üçüncü büyük grubunu oluşturmaktadır. Enterokoklar, toprak, yüzey suları, okyanus suları, kanalizasyon, bitki yüzeyleri ve insan-hayvan gastrointestinal kanalı gibi birçok habitatta bulunmaktadır (Franz vd., 1999). Söz konusu habitatların yanı sıra enterokoklar, geleneksel fermente bitkisel ürünlerden de sıklıkla izole edilebilmektedir. Asiditeye ve safra tuzlarına karşı diğer birçok laktik asit bakterisi cinsine kıyasla daha toleranslı olmalarından kaynaklı olarak da özellikle zeytin gibi yüksek tuzlu ve asitli bitkisel gıdaların fermente edilmesinde tercih edilmektedirler. Yüksek tuz ve asit direnci enterokokların kullanıldığı fermente gıdalarda baskın grup olmasına olanak sağlamaktadır (Randazzo vd., 2004). Tez çalışmasında da bu gibi özellikleri itibariyle değerlendiren *E. faecalis* izolatrında söz konusu potansiyellerin anlaşılması itibariyle ileri çalışmaların tasarlanabilmesi de son derece muhtemeldir.

Bir laktik asit bekterisinin probiyotik olarak tanımlanabilmesi için en başta sergilemesi gereken özellikler şunlardır: (i) konakçıya karşı patojenik özellikler göstermemelidir, (ii) transfer edilebilir antibiyotik dirençlilik determinantlarını ihtiva etmemelidir, (iii) düşük pH'ya ve pakreatine dirençli olmalıdır, (iv) intestinal mukusa tutunmalı ve mukusu kolonize edebilmelidir, (v) avantajlı gelişim karakteristiklerine sahip olmalı ve depolama koşullarında uzun süre hayatta kalabilmelidir, (vi) antimikrobiyal bileşenler üretmelidir, (vii) bağırsaktaki patojenlere karşı inhibe edici özellik göstermelidir ve (viii) son olarak immün yanıtı regüle edebilecek bir potansiyel gösterebilmelidir (Tuomola vd., 2001; Ouwehand vd., 2002).

Laktik asit bakterilerinin gastrointestinal sistem koşullarına olan direnç potansiyellerini değerlendirmek için, tez kapsamında bitkisel örneklerden ve arı gastrointestinal sisteminden izole edilip tanımlanan izolatların mide asitliğine, pepsine, safra tuzuna ve pankreatine olan toleransları test edilmiştir.

Bazı laktik asit bakterileri yakın türler ve birçok patojen üzerinde etkili olabilen birtakım antimikrobiyal bileşenler de üretmektedir. Bakteriyosinler, başta Gram-

pozitifler olmak üzere birçok gıda patojeni ve gıda bozulmalarına neden olan mikroorganizmalar üzerinde antagonistik etki göstermektedir (Knoll vd., 2008; Macwana ve Muriana, 2012). Tüketicilerin doğal ürünlerdeki artan taleplerine ve gıda kaynaklı hastalıkların yüksek maliyetinden ötürü gıda koruyucusu olarak kullanılabilecek bileşenlere artan ihtiyaç her daim güncelliğini korumaktadır. Bakteriyosinler kimyasal gıda koruyucularının yerini alabilecek en güçlü adaylardır (Casaus vd., 1997; Macwana ve Muriana, 2012).

Diğer laktik asit bakterilerinde olduğu gibi enterokokların birçoğu gıda kaynaklı hastalıkların engellenebilmesi için potansiyel antimikrobiyal bileşenler salgılamaktadır (Franz vd., 2011; Saris, 2014). Birçok *Enterococcus* üyesi ribozomal olarak sentezlenen *Listeria* da dahil olmak üzere birçok gıda patojeni üzerinde etkili olabilen en az bir bakteriyosin üretmektedir (Nes vd., 2014). Cotter vd. (2005) sınıflandırma anlayışına göre, birçok enterosin sınıf II bakteriyosin olup modifiye edilmemiş ve ısı stabil olarak tanımlanmaktadır. Bu sınıf, yüksek anti-*Listeria* aktivitesi içeren pediyosin benzeri bakteriyosinleri (sınıf IIa) iki peptidli bakteriyosinleri (sınıf IIb), halkasal bakteriyosinleri (sınıf IIc) ve non-pediyosin modifiye edilmemiş bakteriyosinleri de (sınıf IId) içermektedir. Enterokokların neden bu nitelikte antimikrobiyal peptidler üretttiği bilinmese de, ürettikleri bakteriyosinlerin bazı çevrelerde seçici bir rekabet avantajı ve zorlu koşullarda hayatta kalabilmeye olanak sağladığı aşikardır (Dobson vd., 2012). Kommineni vd. (2015) bağırsak komensal üyeleri olan *Enterococccus* üyelerince salgılanan bakteriyosinlerin vankomisin dirençli *Enterococcus* üyelerinin fare mikrobiyotasındaki sayısını azalttığını bulgulamıştır. Yine bir başka çalışmada bakteriyosin kodlayan pPD1 plazmidini ifade eden *E. faecalis*'in fare gastrointestinal sisteminde komensal *Enterococcus* üyelerine kısa sürede baskın geldiği saptanmıştır (Kommineni vd., 2015). Literatürde vurgulanan söz konusu nitelikleri itibariyle *Enteroccous* üyeleri, özellikle bakteriyosin üretim kabiliyetlerinden hareketle, intestinal enfeksiyonların engellenmesinde ve tedavi edimesinde umut vadeden laktik asit bakterileri olarak düşünülmektedir. Bu sebepten yüksek probiyotik özellik gösteren *Enterococcus* üyelerinin mutlak surette gastrointestinal sistem koşulları altında antimikrobiyal etkinlik kapasitelerinin de test edilmesi önem arz etmektedir. Ayrıca ticari olarak kullanımı olan yalnızca iki adet *Enterococcus* suşunun da bu bağlamda

bilinen herhangi bir bakteriyosini üretemediği de dikkate değer bir durumdur (Vimont vd., 2017). *Enterococcus* üyelerinin salgıladığı bakteriyosinler kanatlılarda sistemik karaciğer ve dalak enfeksiyonuna neden olan *Salmonella*'nın sayısını 100.000 kata kadar da azaltabilmektedir (Svetoch vd., 2008).

Boş bir insan midesinin doğal pH'sı ortalama 1.5'tir. Öğün sonrası bu değer, intestinal kanala istenmeyen bakterilerin girişini ve hayatta kalmalarını engellemek adına pH 5-6'ya dek yükselebilmektedir. Probiyotik bakterilerin ideal katkılarına konakçılarına gösterebilmeleri için bahsi geçen tüm bu zorlu koşullara karşı kabul edilebilir düzeyde tolerans göstermeleri gerekmektedir. Bu bağlamda mide asitliliğine karşı potansiyel bir probiyotiğin toleransının test edilebilmesi için pH 1-5 arasındaki değerlerin test edilmesi uygun görülmektedir (Huang ve Adams, 2004). pH 2,0'ye karşı probiyotik bir adayın tolerans gösterebilmesi, onun söz konusu özellik itibariyle iyi bir aday olduğuna işarettir (Huang ve Adams, 2004; Klingberg ve Budde, 2006; Paramithiotis vd., 2006). Probiyotiklerin gastrik ve ince bağırsak kanallarından geçerken konakçının aynı zamanda pepsin ve pankreatin içeriklerine de dirençli olması beklenen özelliklerdir. Tez çalışması kapsamında asit dirençlilikleri itibariyle değerlendirilen 10 adet izolatın hemen hepsinde, 9, A4 ve A6 kodlu izolatlar haricinde, asit dirençliliğine yönelik beklenen sonuçlar alınamamıştır (Çizelge 4.7). Ancak bahsi geçen izolatların pH 3,0'da kayda değer ölçüde hayatta kalma oranları saptanmıştır.

Probiyotik potansiyelleri değerlendirilen aday bir bakteride safra tuzlarına olan direnç son derece önemli bir karakteristiktir (Luo vd., 2012). % 0,15-% 0,3 safra tuzlarına karşı gösterilen direnç insan kullanımı için bir probiyotik adayın belirlenmesinde yeterli görülmektedir (Gilliland vd., 1984). Tez kapsamında üç farklı safra tuzu konsantrasyonunda (% 0,3-0,5-1,0) izole edilen laktik asit bakterileri test edilmiştir. Safra tuzu direnci test edilen potansiyel bir probiyotik bakterinin % 0,3'lük safra tuzu konsantrasyonunda dahi canlılıkta % 50'lik azalma bile test edilen bakterinin iyi bir aday olduğunu söz konusu kriter dahilinde göstermektedir (Mathara vd., 2008). Yüksek safra tuzu toleransı görülen potansiyel probiyotiklerde aynı zamanda yüksek düzeyde safra tuzu hidrolaz enzim aktivitesi de görülmektedir (Ahn vd., 2003). Tez çalışmasında bitkisel kaynaklardan izole edilen 1, 7, 8 ve arı gastrointestinal sisteminden izole edilen

A3, A6 kodlu izolatlarda safra tuzlarına karşı önemli ölçüde tolerans saptanmıştır (Çizelge 4.9-4.11). Söz konusu kabiliyetleri itibariyle bu izolatlar yine birer probiyotik adayı olarak karşımıza çıkmaktadır.

Probiyotik potansiyelleri olan laktik asit bakterilerinin değerlendirilmesinde öncelikle kriterlerden biri olan hemolitik aktivite tayinidir. Probiyotik potansiyeli olan bir bakterinin bu bağlamda bütünüyle kabul edilebilir olması için non-hemolitik özellik göstermesi beklenmektedir. Birçok araştırmacı probiyotiklerin güvenilir kullanım olanaklarının tartışıldığı noktada kati surette hemolitik aktivite görülmemesi gerektiği hususunda fikir birliğine varmaktadır (Bujnakova vd., 2017; Nami vd., 2018; Mangia vd., 2019; Tarrah vd., 2019): Zira hemolitik aktivite aynı zamanda bir virülenslik özelliğidir (FAO/WHO 2006).

Ancak söz konusu değerlendirmelerde başka araştırmacılarca kabul edilmeyen virülenslik özelliği β-hemolitik aktivitedir. Zira bazı fermente ürünlerin işlenmesinde istifade edilen *Enterococcus* cinsine üye suşların α-hemolitik aktivite içermesine karşın geleneksel ürünlerin işlenmesinde tercih edilebildiği de görülmektedir (Nami vd., 2019). Hemolitik aktivitenin eksikliği (non-hemolitik aktivite ve α-hemolitik aktivite) probiyotik suşların seçilmesinde öncelikle dikkate alınması gereken özelliklerden biridir (FAO/WHO 2006). Hatta birçok probiyotik suşu bulunan *P. pentosaceus*'ta sıklıkla α-hemolitik aktiviteye rastlanabilmektedir (Riebel ve Washington, 1990; Colaninno, 2008). Benzer şekilde probiyotik özellik gösteren bazı *Leuconostoc* ve *Pediococcus* suşlarında da α-hemolize rastlanmaktadır.

Tez çalışmasında arı gastrointestinal sistemi laktik asit bakterisi izolatlarının ve bitki orijinli fruktofilik laktik asit bakterisi izolatlarının α-hemolitik özellik göstermesi hemolitik aktivite özelliği itibariyle probiyotik potansiyelinin olabildiğini göstermektedir (Şekil 4.35).

Fruktofilik laktik asit bakterileri, laktik asit bakterilerinin özel bir grubu olup gelişmeleri için glukoz yerine fruktoz tercih etmektedir (Endo vd., 2009). Bu bakteriler, çiçek ve meyve gibi fruktozca zengin bitkisel kaynaklardan sıklıkla izole

edilebilmektedir. *Fructobacillus* spp. ve *Lactobacillus kunkei* bu grubun en önemli temsilcileridir (Endo vd., 2010; Endo vd., 2011). Bu grubun üyelerine aynı zamanda çiçekle beslenen ve diyetleri fruktozca zengin arı, meyve sineği ve karınca gibi canlıların gastrointestinal sistemlerinde de rastlanmaktadır (Taochan vd., 2010; He vd., 2011; Koch ve Schmid-Hempel, 2011). Fruktofilik laktik asit bakterilerine, özellikle fruktofilik *Enterococcus* türlerine yönelik literatürde oldukça kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Janashia vd., 2016). Janashia vd. (2016) tarafından yürütülen çalışmada *Apis mellifera* türünün bağırsak mikrobiyatasından *Enterococcus* cinsine üye fruktofilik türlerin izole edilebildiği görülmektedir. Çalışma kapsamındaki A1, A3, A4 ve A6 kodlu izolatlar da arı mikrobiyotası orijinli fruktofilik laktik asit bakterileri olarak tanımlanmıştır. İlgili çalışmada ayrıca literatürden bağımsız ve ilk kez katkı sağlayacak mahiyetteki bir diğer bulgu fruktofilik laktik asit bakterilerinin çok çeşitte bitkisel kaynaklardan izole edilebildiğinin gösterilmesidir.

KAYNAKLAR

Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fuentes, M.A.F., Pérez-Pulido, R. and Gálvez, A. 2012. Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. Food Microbiology. 32; 308-316.

Ahn, Y. T., Kim, G. B., Lim, K. S., Baek, Y. J., & Kim, H. U. (2003). Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. International Dairy Journal, 13(4), 303-311.

Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A. M. A., Takagi, A. and Koga, Y. 1998. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by he oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. Amer. J. Gastroenterol., 93; 2097-2101.

Aizen, M. A. & Harder, L. D. 2009. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. Curr Biol, 19, 915-8.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. L. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25 (17); 3389- 3402.

Anonymous. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO/WHO, 34 p., Argentina.

Anonymous. 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.

Anonymous. 2002b. Guidelines for the evaluation of probiotics in foods, Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food.

Anonymous. 2008. Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. EFSA J. 732; 1-15.

Antunes, A., Rainey, F. A., Nobre, M. F., Schumann, P., Ferreira, A. M., Ramos, A., Santos, H. & DA, C. M. S. 2002. *Leuconostoc ficulneum sp*. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from a ripe fig, and reclassification of *Lactobacillus*

fructosus as *Leuconostoc fructosum* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 647-655.

Asama, T., Arima, T. H., Gomi, T., Keishi, T., Tani, H., Kimura, Y., Tatefuji, T. & Hashimoto, K. 2015. *Lactobacillus kunkeei* YB 38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. Journal of applied microbiology, 119, 818- 826.

Baken KA, Ezendam J, Gremmer ER, et al. (2006) Evaluation of immunomodulation by *Lactobacillus casei* Shirota: immune function, autoimmunity and gene expression. Int J Food Microbiol 112, 8–18.

Ballongue, J. 1993. Bifidobacteria and probiotic action. In: Lactic acid bakteria, Seppo Sliminen and Atte von Wright (eds.), pp. 357-428. Marcel Dekker, Inc., New York.

Bengmark, S. 2003. Use of some pre-, pro- and synbiotics in critically ill patients. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 17; 833-848.

Berrios, P., Fuentes, J., Salas, D., Carreno, A., Aldea, P., Fernadez, F. & Trombert, A. 2018. Inhibitory effect of biofilm-forming *Lactobacillus kunkeei* strains against virulent Pseudomonas aeruginosa in vitro and in honeycomb moth (Galleria mellonella) infection model. Beneficial microbes, 9, 257-268.

Bhunia, A.K., Johnson, M.C. and Ray, B. 1987. Prufication, characterization and microbial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. Journal of Applied Bacteriology, 65; 261-268.

Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C. and Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici* H. Applied and Enviromental Microbiology. 57; 1265-1268.

Bron, P.A. vd. 2013. Cell surface-associated compounds of probiotic lactobacilli sustain the strain-specificity dogma. Current Opinion in Microbiology. 16;262–269

Brown, A.C. and Valiere, A. 2004. Probiotics and medical nutrition therapy. Nutr Clin Care. 7(2): 56-68.

Bujnakova, D.; Strakova, E. Safety, probiotic and technological properties of Lactobacilli isolated from unpasteurised ovine and caprine cheeses. Ann. Microbiol. 2017, 67, 813–826.

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

Casaus, P.; Nilsen, T.; Cintas, L.M.; Nes, I.F.; Hernandez, P.E.; Holo, H. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 1997, *143 Pt 7*, 2287–2294.

Castagliuola, L., Riegler, M. F., Valenick, L., LaMont, J. T. and Pathoulakis, C. 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficle* toxins A and B in human colonic mucosa. Infect. Immun., 67; 302-307.

Chiang, S.S. and Pan, T.M. 2012. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. paracasei NTU 101 and its fermented products. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93; 903-916.

Colaninno, P. M. (2008). 5 Identification of Gram-Positive Organisms. Practical Handbook of, 53.

Collins, M.D. and Gibson, G.R. 1999. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. American Journal of Clinical Nutrition, 69; 1052-1057.

Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat. Rev. Microbiol. 3, 777–788. doi: 10.1038/nrmicro1273

Çakır, İ., Karahan, A. G. ve Çakmakçı, M. L. 2002. Probiyotikler ve etki mekanizmaları. Gıda Mühendisliği Dergisi, 6 (12); 15-19.

Daly, C. and Davis, R., 1998. The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health. Agric. Food Sci. Finland 7; 219–250.

Dethlefsen, L., Eckburg, P. B., Bik, E. M. and Relman, D. A. 2006. Assembly of the human intestinal microbiota. Trends in Ecology and Evolution, 21; 517-523.

Devriese, L.A., Pot, B., Collins, M.D., 1993. Phenotypic identification of the genus Enterococcus and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. Journal of Applied Bacteriology 75, 399–408.

Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2012). Bacteriocin production: A probiotic trait? Appl. Environ. Microbiol. 78, 1–6. doi: 10.1128/aem.05576-11

Drinan, D.F., Tobin, S., and Cogan, T.M. 1976. Citric acid metabolism in hetero and homofermentative lactic acid bacteria, Appl. Envir. Microbiol. Vol. 31(4); 481-486.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F. and Collins, J. K. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings. Am. J. Nutr., 73; 386S-392S.

Edwards, U., Rogall, T., Blöcer, H., Emde, M. and Böttger, E. C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Research, 17 (19); 7843-7853.

Endo, A. & Okada, S. 2008. Reclassification of the genus Leuconostoc and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol, 58, 2195-205.

Endo, A. & Salmınen, S. 2013. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. Syst Appl Microbiol, 36, 444-8.

Endo, A. 2012. Fructophilic lactic acid bacteria inhabit fructose-rich niches in nature. Microb Ecol Health Dis, 23.

Endo, A., Futagawa-Endo, Y. & Dicks, L. M. 2009. Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. Syst Appl Microbiol, 32, 593-600.

Endo, A., Futagawa-Endo, Y., & Dicks, L. M. (2009). Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. Systematic and Applied Microbiology, 32(8), 593-600.

Endo, A., Futagawa-Endo, Y., Sakamoto, M., Kitahara, M. & Dicks, L. M. 2010. *Lactobacillus florum sp*. nov., a fructophilic species isolated from flowers. Int J Syst Evol Microbiol, 60, 2478-82.

Endo, A., Irisawa, T., Futagawa-Endo, Y., Sonomoto, K., Itoh, K., Takano, K., Dicks, L. M. (2011). *Fructobacillus tropaeoli sp*. nov., a fructophilic lactic acid

bacterium isolated from a flower. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 61(4), 898-902.

Endo, A., Irisawa, T., Futagawa-Endo, Y., Sonomoto, K., Itoh, K., Takano, K., Okada, S. & Dıcks, L. M. 2011. *Fructobacillus tropaeoli sp.* nov., a fructophilic lactic acid bacterium isolated from a flower. Int J Syst Evol Microbiol, 61, 898-902.

Endo, A., Maeno, S., Tanızawa, Y., Kneifel, W., Arıta, M., Dıcks, L. & Salmınen, S. 2018. Fructophilic Lactic Acid Bacteria, a Unique Group of Fructose- Fermenting Microbes. Appl Environ Microbiol, 84.

Endo, A., Tanaka, N., Oıkawa, Y., Okada, S. & Dıcks, L. 2014. Fructophilic Characteristics of *Fructobacillus spp*. may be due to the Absence of an Alcohol/Acetaldehyde Dehydrogenase Gene (adhE). Current Microbiology, 68, 531- 535.

Endo, A., Tanızawa, Y., Tanaka, N., Maeno, S., kumar, H., Shıwa, Y., Okada, S., Yoshıkawa, H., Dıcks, L., Nakagawa, J. & Arıta, M. 2015. Comparative genomics of *Fructobacillus spp*. and *Leuconostoc spp*. reveals niche- specific evolution of *Fructobacillus spp*. BMC Genomics, 16, 1117.

Escalante, A., Wacher, C. and Farrés, A. 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. Int. J. Food Microbiol., 64; 21-31.

European Food Safety Authority (2010) Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2010 update): FSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). http://www.efsa.europa. eu/fr/scdocs/doc/1944.pdf (accessed January 2012).

Evrard B, Coudeyras S, Dosgilbert A, et al. (2011) Dosedependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus Lcr35*. PLoS One 6, e18735.

Ewaschuk, J.B. and Dieleman, L.A. 2006. Probiotics and prebiotics in choronic inflammatory bowel diseases. World Journal of Gastroenterology, 12; 5941- 5950.

Famularo, G., Moretti, S., Marcellini, S., De Simone, D. 1997. Stimulation of immunity by probiotics. "Fuller, R.(ed), Probiotics 2: Applications and Practical Aspects"

Federico, Lara-V., İlloslada, Mônica., Olivares and Jordi Xaus. 2010. Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics.

Filannıno, P., Dı Cagno, R., Addante, R., Pontonıo, E. & Gobbettı, M. 2016. Metabolism of Fructophilic Lactic Acid Bacteria Isolated from the *Apis mellifera* L. Bee Gut: Phenolic Acids as External Electron Acceptors. Appl Environ Microbiol, 82, 6899-6911.

Filannıno, P., DI Cagno, R., Tlaıs, A. Z. A., Cantatore, V. & Gobbettı, M. 2019. Fructose-rich niches traced the evolution of lactic acid bacteria toward fructophilic species. Crit Rev Microbiol, 1-17.

Fisher K & Phillips C (2009) The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology 155, 1749–1757.

Floch, M.H. 2005 Montrose D.C. Use of probiotics in humans; an analysis of the literature. Gastroenterol. Clin. North Am. 34; 547-570.

Fonden, R., Mogensen, G., Tanaka, R. and Salminen, S. 2000. Effect of culture containing dairy products on intestinal microflora, human nutrition and health current knowledge and future perspectives. Bulletin IDF, 352; 5.

Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization (2001) Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, a joint FAO/WHO expert consultation. Cordoba, Argentina, 1–4 October 2001. http:// www.who.int/foodsafety/publications/ fs_management/en/ probiotics.pdf (accessed January 2012).

Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_ management/en/probiotic_guidelines.pdf (accessed January 2012).

Fooks, L.J., Rycroft, C.E. and Gibson, G.R. 1999. Methods for assessing the potential of prebiotics and probiotics. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 2 (6); 481-484.

Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C. and Joly, B. 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei* subsp. rhamnosus: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. Res. Microbiol., 152; 167–173.

Foulquie Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, et al. (2006) The role and application of *Enterococci* in food and health. Int J Food Microbiol 106, 1–24.

Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, et al. (2003) *Enterococci* in foods – a conundrum for food safety. Int J Food Microbiol 88, 105–122.

Franz, C. M. A. P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., and Gálvez, A. (2011). *Enterococci* as probiotics and their implications in food safety. Int. J. Food Microbiol. 151, 125–140. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014

Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., 2006. The *enterococci*. In: Motarjemi, Y., Adams, M. (Eds.), Emerging Foodborne Pathogens. Woodhead Publishing, pp. 557–613.

Fukushima, Y., Kawata, Y., Hara, H., Terada, A. and Mitsuoka, T. 1998. Effect of probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. Int. J. Food Microbiol., 42; 39-44.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66 (5); 365-378.

Fuller, R. and Gibson, G.R. 1998. Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health. Clinical Microbiology and Infection, 4 (9); 477-480.

Gibson, G.R. 1998. Dietary modulation of the human gut microflora using probiotics. British Journal of Nutrition, 80; 209-212.

Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microflora introducing the concept of probiotics. Journal of Nutrition, 125; 1401-1412.

Gilliland, S. E., Staley, T. E., & Bush, L. J. (1984). Importance of bile tolerance of Lactobacillus acidophilus used as a dietary adjunct. Journal of dairy science, 67(12), 3045-3051.

Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. 1999. *Bifidobacterium spp*. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutic properties relevant for use as probiotics. Trends Food Sci. Technol. 10; 139

Gorbach, S.L., Nahas, L. and Lerner, P.I. 1967. Studies of intestinal microflora. Effects of diet, age and periodic sampling on numbers of faecal microorganisms in man. Gastroenterology, 53; 845-855.

Guarner, F. and Schaafsma, G. J. 1998. Probiotics. Int. J. Food Microbiol., 39; 237-238.

Halkman, K. 1991. Tarım Mikrobiyolojisi, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Yayınları, Ankara. Vol. 1214; 82.

Harrigan, W. F. and McCance, M. E. 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology.

Hatakka, K., Savilahti, E., Pönkä, A., Meurman, J. H., Poussa, T., Näse, L., Saxelin, M. and

He T, Priebe MG, Zhong Y, et al. (2008) Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. J Appl Microbiol 104, 595–604.

He, H., Chen, Y., Zhang, Y., Wei, C. (2011). Bacteria associated with gut lumen of Camponotus japonicus Mayr. Environmental Entomology, 40(6), 1405-1409.

Hentges, D.J. 1992. Gut flora and disease resistance. In: Fuller, R. (Ed.), Probiotics. Chapman and Hall, Cambridge, pp. 87-110.

Hirayama, K. and Rafter, J. 1999. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention: mechanistic consideration. Antonie van Leeuwenhock, 76; 391- 394.

Holzapfel, W.H. and Schillinger, U. 2002. Introduction to pre-and probiotics. Food Research International, 35 (2-3); 109-116.

Huang, J., DE Pauluis, T. & May, J. M. 2004. Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA. hy926 endothelial cells. The Journal of nutritional biochemistry, 15, 722-729.

Huang, Y., & Adams, M. C. (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. International Journal of Food Microbiology, *91*(3), 253-260.

Isolauri, E. 2001. Probiotics in the prevention and treatment of allergic disease. Pediatr. Allergy Immunol. 12; 56-59.

Janashia, I., Carminati, D., Rossetti, L., Zago, M., Fornasari, M. E., Haertlé, T., Giraffa, G. (2016). Characterization of fructophilic lactic microbiota of Apis mellifera from the Caucasus Mountains. Annals of Microbiology, 66(4), 1387-1395.

Kabir, A. M. A., Aiba, Y., Takagi, A., Kamiya, S., Miwa, T. and Koga, Y. 1997. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by *lactobacilli* in a gnotobiotic murine model. Gut, 41; 49-55.

Kiebling, G., Schneider, J. ve Jahreis, G. 2002. Long term consumption of fermented diary products over 6 months increases HDL cholesterol. European Journal of Clinical Nutrition, 56; 843-849.

Kim, E. B., Tyler, C. A., Kopit, L. M. & Marco, M. L. 2013. Draft Genome Sequence of Fructophilic *Lactobacillus florum*. Genome Announc, 1.

Kim, H.J., Camilleri, M. and McKinzie, S. 2003. A randomized controlled trial of probiotic, VSL#3, on gut transit and symptoms in diarrhoea-predominant irritable bowel

Klingberg, T. D., & Budde, B. B. (2006). The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. International journal of food microbiology, 109(1-2), 157-159.

Knoll, C.; Divol, B.; du Toit, M. Genetic screening of lactic acid bacteria of oenological origin for bacteriocin-encoding genes. Food Microbiol. 2008, *25*, 983–991.

Koch, H., & Schmid-Hempel, P. (2011). Bacterial communities in central European bumblebees: low diversity and high specificity. Microbial Ecology, *62*(1), 121-133.

Kommineni, S., Bretl, D. J., Lam, V., Chakraborty, R., Hayward, M., Simpson, P., et al. (2015). Bacteriocin production augments niche competition by *Enterococci* in the mammalian gastrointestinal tract. Nature 526, 719–722. doi: 10.1038/nature15524

Koo, O. K., Jeong, D. W., Lee, J. M., Kim, M. J., Lee, J. H., Chang, H. C., Kim, J. H. & Lee, H. J. 2005. Cloning and characterization of the bifunctional alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (adhE) in *Leuconostoc mesenteroides* isolated from kimchi. Biotechnol Lett, 27, 505-10.

Kopp-Hoolihan L. 2001 Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. J. Am. Diet Assoc. 101; 229-238.

Korpela, R. 2001. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. British Microbiology Journal, 322; 1-5.

Kwong, W. K. & Moran, N. A. 2016. Gut microbial communities of social bees. Nat Rev Microbiol, 14, 374-84.

Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L. and Pace, N. R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82; 6955-6959.

Laurens-Hattingh, A. and Viljoen, B. C. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. Int. Dairy J., 11; 1-17.

Leavis, H., Top, J., Shankar, N., Borgen, K., Bonten, M., van Embden, J., Willems, R.J.L., 2004. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. Journal of Bacteriology 186, 672–682.

Lebeer S, Vanderleyden J & De Keersmaecker SC (2010) Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. Nat Rev Microbiol 8, 171–184.

Leisner, J. J., Vancaynet, M., Van Der Meulen, R., Lefebvre K., Engelbeen, K., Hoste B., Laursen, B. G., Bay, L., Rusul, G., De Vuyst, L. & Swings, J. 2005. *Leuconostoc durionis sp*. nov., a heterofermenter with no detectable gas production from glucose. Int J Syst Evol Microbiol, 55, 1267- 70.

Leroy, F., De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci. Technol. 15; 67-78.

Lilly, M. D. And Stillwell, R. H. 1965. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. Science. Vol.147. 3659

Luckey, T.D. and Floch, M.A. 1972. Introduction to intestinal microbiology. American Journal of Clinical Nutrition, 25; 1291-1295.

Luo, Y., Ma, B. C., Zou, L. K., Cheng, J. G., Cai, Y. H., Kang, J. P., & Xiao, J. J. (2012). Identification and characterization of lactic acid bacteria from forest musk deer feces. African Journal of Microbiology Research, 6(29), 5871-5881.

Lyhs, U. 2002. Lactic acid bacteria associated with spoilage of fish pucts. PhD Thesis, Academic Dissertation, University of Helsinki, Finland.

Mackowiak, P.A, 2013. Probiotics, the Intestinal Microbiome and the Quest for Long Life. Front Public Health. 2013; 1 :52.

Mackay, A.D., Taylor, M.B., Kibbler, C.C. and Hamilton-Miller, J.M.T. 1999. *Lactobacillus endocarditis* caused by a probiotic organism. Clin. Microbiol. Infect. 5; 290–292.

Macwana, S.J.; Muriana, P.M. A “bacteriocin pcr array” for identification of bacteriocin-related structural genes in lactic acid bacteria. J. Microbiol. Methods 2012, 88, 197–204.

Maeno, S., Tanızawa, Y., Kanesakı, Y., Kubota, E., Kumar, H., Dıcks, L., Salmınen, S., Nakagawa, J., Arıta, M. & Endo, A. 2016. Genomic characterization of a fructophilic bee symbiont *Lactobacillus kunkeei* reveals its niche- specific adaptation. Syst Appl Microbiol, 39, 516-526.

Mangia, N.P.; Saliba, L.; Deiana, P. Functional and safety characterization of autochthonous *Lactobacillus paracasei* FS103 isolated from sheep cheese and its survival in sheep and cow fermented milks during cold storage. Ann. Microbiol. 2019, 69, 161–170.

Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. Int. Dairy J. 16; 189-199.

Mathara, J. M., Schillinger, U., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., Guigas, C., Franz, C., & Holzapfel, W. H. (2008). Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. *Current Microbiology*, *56*(4), 315-321.

McFarland, L.V. and Elmer, G.W. 1997. Pharmaceutical probiotics for the treatment of anaerobic and other infections. Anaerobe, 3; 73-78.

McNaught, C. E. and MacFie, J. 2001. Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. Nutrition Research 21; 343–353.

Michetti, P., Dorta, G., Wiesel, P. H., Brassart, D., Verdu, E., Herranz, M., Felley, C., Porta, N., Rouvet, M., Blum, A. L. and Corthésy-Theulaz, I. 1999. Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. Digestion, 60; 203-209.

Mtshalı, P. S., Dıvol, B. & Du Toıt, M. 2012. Identification and characterization of *Lactobacillus florum* strains isolated from South African grape and wine samples. Int J Food Microbiol, 153, 106-13.

Murray, F. 1998. Acidophilus and Your Health: The beneficial microorganisms that aid digestion and fight disease. Keats Publishing, Inc., 46 p. New Canaan, Connecticut.

Müller, M.R.A. 2000. Characterization of the microbial ecosystem of cereal fermentation using molecular biological methods. Ph.D. Thesis, 145 p., Technischen Universität München.

Nami, Y., Vaseghi Bakhshayesh, R., Mohammadzadeh Jalaly, H., Lotfi, H., Eslami, S., & Hejazi, M. A. (2019). Probiotic properties of Enterococcus isolated from artisanal dairy products. Frontiers in microbiology, 10, 300.

Nami, Y.; Haghshenas, B.; Bakhshayesh, R.V.; Jalaly, H.M.; Lotfi, H.; Eslami, S.; Hejazi, M.A. Novel autochthonous *lactobacilli* with probiotic aptitudes as a main starter culture for probiotic fermented milk. LWT-Food Sci. Technol. 2018, 98, 85–93.

Nes, I. F., Diep, D. B., and Ike, Y. (2014). "Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control," in *Enterococci*: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection, eds M. Gilmore, D. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar (Boston, MA: Massachusetts Eye and Ear Infirmary).

Nevelıng, D. P., Endo, A. & Dıcks, L. M. 2012. Fructophilic Lactobacillus kunkeei and *Lactobacillus brevis* isolated from fresh flowers, bees and bee-hives. Curr Microbiol, 65, 507-15.

O'Mahony, L., McCarthy, J. and Kelly, P. 2005. Lactobacillus and Bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. Gastroenterology. 128(3); 541-551.

Obermeier, F., Kojouharoff, G., Hans, W., Schölmerich, J., Gross,V. and Falk, W. 1999. İnterferongamma (IFN-γ) and tumour necrosis factor (TNF) induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS) induced colitis in mice. Clin Exp Immunol. 116; 238-245.

Ocaña, S.V., Holgado, A.A. P.R. and Nader-Macìas, M. E. 1999. Selection of vaginal H2O2-generating Lactobacillus species for probiotic use. Curr. Microbiol., 38; 279-284.

Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. In Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications (pp. 279-289). Springer, Dordrecht.

Ouwehand, A., Salminen, S. and Isolauri, E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie van Leeuwenhoek.82; 279-289.

Paramithiotis, S., Gioulatos, S., Tsakalidou, E., & Kalantzopoulos, G. (2006). Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. Process Biochemistry, 4*1*(12), 2429-2433.

Paulsen IT, Banerjei L, Myers GS, et al. (2003) Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Science 299, 2071–2074.

Penner, R., Fedorak, R.N. and Madsen, K.L. 2005. Probiotics and nutraceuticals: non medicinal treatments of gastrointestinal diseases. Curr Opin Pharmacol. 5(6); 596-603.

Pinto, M.G.V., Franz, C.M.A.P., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. 2006. *Lactobacillus spp*. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. International Journal of Food Microbiology, 109; 205-214.

Playne, M.J., Bennett, L.E. and Smithers, G.W. 2003. Functional diary foods and ingredients. Australian Journal of Dairy Technology, 58; 242-264.

Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A. and Soccol, C.R. 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. Food Res. Int. 41 (2); 111-123.

Prescott, C.S. and Dunn, G.C. 1987. Industrial Microbiology, Published on Distributors, Delhi, India, pp 882.

Randazzo, C.L., Restuccia, C., Romano, A.D., Caggia, C., 2004. Lactobacillus casei, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. International Journal of Food Microbiology 90, 9–14.

Rastall, R., Gibson, G.R., Gill, H.S., Guarner, F., Klaenhammer, T.R., Pot, B., Reid, G., Rowland, I.R. and Sanders, M.E. 2005. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enchence human health: An overview of enabling science and potential applications. FEMS Microbiology Ecology, 52; 145-152.

Rautio, M., Jousimies-Somer, H., Kauma, H., Pietarinen, I., Saxelin, M., Tynkkynen, S. and Koskela, M. 1999. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. Clin. Infect. Dis. 28; 1160- 1161.

Ray, B. 1992. The need for food biopreservation. In: Ray, B., Daeschel, M. (Eds.), Food Biopreservatives of Microbial Origin. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp; 1- 23.

Reid, G. 2000. In vitro testing of Lactobacillus acidophilus NCFMTM as a possible probiotic for the urogenital tract. Int. Dairy J., 10; 415-419.

Resta-Lenert S & Barrett KE (2003) Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). Gut 52, 988–997.

Riebel, W. J., & Washington, J. A. (1990). Clinical and microbiologic characteristics of pediococci. Journal of clinical microbiology, *28*(6), 1348-1355.

Rolfe, R.D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. J. Nutr.(Supplement), 130; 396-402.

Roy, D., Sirois, S. and Vincent, D. 2001. Molecular discrimination of lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. Current Microbiology, 42; 282-289.

Roy, D., Ward, P., Vincent, D. and Mondou, F. 2000. Molecular identification of potentially probiotic lactobacilli. Current Microbiology, 40; 40-46.

Rubio, R., Jofré, A., Martín, B., Aymerich, T. and Garriga, M. 2013. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. Food Microbiology. doi: 10.1016/j.fm.2013.07.015.

Rycroft, C.E., Fooks, L.J. and Gibson, G.R. 1999. Methods for assessing the potential of prebiotics and probiotics. Current Opinion in Clinical Nutrition and metabolic Care.

Saarela, M., Lahteenmaki, L., Crittenden, R., Salminen, S. and Mattila-Sandholm, T. 2002. Gut bacteria and health foods the European perspective. Int. J. Food Microbiol. 78; 99-117.

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J. and Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology 84 (3); 197-215.

Sahm DF, Kissinger J, Gilmore MS, et al. (1989) In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 33, 1588–1591.

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4; 406-425.

Salminen, S. 1999. Probiotics: Scientific support for use. Food Technol., 53; 66.

Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D. and de Vos, W.M., vd. 1998. Demonstration of safety of probiotics - a review. Int. J. Food Microbiol. 44; 93-106.

Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fonde´n, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.-E. and Mattila-Sandholm, T. 1998b. Demonstration of safety of probiotics - a review. Int. J. Food Microbiol. 44; 93-106

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, New York.

Sanders, M.E. 1999. Probiotics. Food Technology, 53; 67-77.

Sanders, M.E. 2003. Probiotics: considerations for human health. Nutr. Rev. 61; 91-99.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl.Acad. Sci. USA., 74 (12); 5463-5467.

Saris, P. E. (2014). "Biopreservation by lactic acid bacteria," in Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments, ed. Taylor & Francis Group (Boca Raton, FL: CRC Press), 86.

Schaafsma, G. 1996. State of the art concerning probiotic strains in milk products. IDF Nutrition Newsletter. 5; 23–24.

Smits HH, Engering A, van der Kleij D, et al. (2005) Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. J Allergy Clin Immunol 115, 1260–1267.

Sönmez, N., Çakmakçı, M.L., Karahan, A.G. ve Çakır, İ. 1999. Probiyotik Kullanımı ve Ülke Şartlarında Geliştirilmesi. SDÜ Basımevi, 134 s., Isparta.

Sullivan, A. and Nord, C.E. 2005. Probiotics and gastrointestinal diseases. J. of Int. Medicine, 257; 78-92.

Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Borzenkov, V. N., ... & Siragusa, G. R. (2008). Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(6), 1942-1948.

Tang, Y. W., Ellis, N. M., Hopkins, M. K., Smith D. H., Dodge, D. and Persing, D. H. 1998. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of

unusual aerobic pathogenic Gram-negative bacilli. Journal of Clinical Microbiology, 36 (12); 3674-3679.

Tarrah, A.; da Silva Duarte, V.; de Castilhos, J.; Pakroo, S.; Junior, W.J.F.L.; Luchese, R.H.; Guerra, A.F.; Rossi, R.C.; Ziegler, D.R.; Corich, V. Probiotic potential and biofilm inhibitory activity of *Lactobacillus casei* group strains isolated from infant feces. J. Funct. Foods. 2019, 54, 489–497.

Thaochan, N., Drew, R. A. I., Hughes, J. M., Vijaysegaran, S., & Chinajariyawong, A. (2010). Alimentary tract bacteria isolated and identified with API-20E and molecular cloning techniques from Australian tropical fruit flies, *Bactrocera cacuminata* and B. tryoni. Journal of Insect Science, 10(1), 131.

Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J.M., Ivanova, I. and Dousset, X. 1999. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. Inter. J. of Food Microbiol., 48; 167-177.

Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., & Salminen, S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. The American journal of clinical nutrition, 73(2), 393s-398s.

Van Niel, C.W., Feudtner, C., Garrison, M.M. and Christakis, D.A. 2002. Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. Pediatrics. 109(4); 678-684.

Vanderhoof, J.A. and Young, R.J. 2005. Pediatric applications of probiotics. Gastroenterol. Clin. North Am. 34; 451-463.

Vásquez, A., Olofsson, T. C. & Sammataro, D. 2008. A scientific note on the lactic acid bacterial flora in honeybees in the USA – A comparison with bees from Sweden. Apidologie, 40, 26-28.

Verón, H. E., Dı Rısıo, H. D., Isla, M. I. & Torres, S. 2017. Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from Opuntia ficus-indica fruits that grow in Northwest Argentina. LWT, 84, 231-240.

Vimont, A., Fernandez, B., Hammami, R., Ababsa, A., Daba, H., & Fliss, I. (2017). Bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* LCW 44: a high potential probiotic candidate from raw camel milk. Frontiers in microbiology, 8, 865.

Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Research International, 36; 895-904.

Vizoso-Pinto, M.G., Franz, C., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. 2006. *Lactobacillus spp.* with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. International Journal of Food Microbiology 109; 205–214.

Wang, R.F., Cao, W.W. and Cerniglia, C.E. 1996. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. Appl. Environ. Microbiol., 62 (4); 1242-1247.

Wassenaar, T.M. and Klein, G. 2008. Safety aspects and implications of regulation of probiotic bacteria in food and food supplements. Journal of Food Protection, 71(8); 1734-1741.

Wilkins, T.D., Holdeman, L.V., Abramson, I.J. and Moore, W.E.C. 1972. Standardized single-disc method for antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1(6); 451-459.

Willems, R.J., Homan, W., Top, J., van Santen-Verheuvel, M., Tribe, D., Manzioros, X., Gaillard, C., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Mascini, E.M., van Kregten, E., van Embden, J.D., Bonten, M.J., 2001. Variant esp gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. Lancet 357, 802.

Williams, G.M. and Wynder, E.L. 1996. Diet and cancer: A synopsis of causes and prevention strategies. In "Nutrition and Cancer Prevention," ed. R.R. Watson and S.I. Mufti, pp. 1–23. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Wood, B.J.B. 1997. Microbiology of Fermented Foods. Blackie Academic & Professional, London.

Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic & Professional, London.

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

EKLER

EK 1 Lab ve Hücre Kültürü Gelişimi için Kullanılan Kültür Ortamları

EK 2 Kimyasallar

EK 1 Lab ve Hücre Kültürü Gelişimi için Kullanılan Kültür Ortamları

FYP Besiyeri

Bileşen	**Miktar(g/l)**
Fruktoz	10
Et Ekstratı	20
Pepton	5
Sodyum asetat	2
Maya ekstratı	10
Tween 80	0.5
$MgSO_4.7H2$	0.2
$MnSO_4 4H20$	0.1
Demir sülfat	0.1
Soydum azid	0.5
Sodyum klorit	0.1

100 ml'de 4,8gr hazır besiyeri içeriği çözülerek hazırlanmıştır. Sterilizasyon işlemi 121°C'de 15 dk yapılmıştır.

MRS Besiyeri

Bileşen	**Miktar(g/l)**
Glukoz	20
Et Ekstratı	8
Pepton	10
Sodyum asetat	5
Maya ekstratı	4
Tween 80	1
$MgSO_4.7H2$	0.2
$MnSO_4 4H20$	0.04
K_2HPO_4	0.2

Dehidre besiyeri 52,2g/l olacak şekilde damıtık su içinde eritilirek hazırlanmıştır. Sterilizasyon işlemi 121°C'de 15 dk yapılmıştır.

EK 2 Kimyasallar

Kimyasal Adı	**Marka**
0.22 ve 0.45 -mikron por çaplı membran filtre	Sartorius, France
FYP	Merck, Germany
Boyalar	Sigma, Germany

ETİDYUM BROMİT ÇÖZELTİSİ

İçerik	% g
Etidyum bromit	1.0
Distile su	100 ml

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

SPHEROBLAST TAMPONU

İçerik	% g
Sükroz	10
Lizozim	2
RNaz A	0,4

25 mM Tris (pH: 8,4)

25 mM EDTA (pH: 8)

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

N3 TAMPONU

İçerik	% mL
5 M Sodyum asetat	60
Asetik asit	11,5
Distile su	28,5

LİZİS TAMPON 1

% 5 SDS çözeltisi

LİZİS TAMPON 2

5 M NaCl çözeltisi

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mehmet BAL

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Tarihi : 19.09.1986

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Halide Edip Lisesi (2003)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji (2008)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı, (Aralık 2020)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Kansuk Lab San Tic AŞ. (Ürün Müdürü) 2010 -