T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ESCHERICHIA COLI NISSLE 1917 PROBİYOTİK SUŞUNUN ANTİBİYOTİKLERE KARŞI DUYARLILIK VE ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİK YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI

Youssoufa POUENDİGOUONGOUO

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Şubat -2020

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ESCHERICHIA COLI NISSLE 1917 PROBİYOTİK SUŞUNUN ANTİBİYOTİKLERE KARŞI DUYARLILIK VE ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİK YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI.

Youssoufa POUENDİGOUONGOUO

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Pr. Dr. Yusuf DURAK

2020,VIII+38 Sayfa

Jüri
Pr. Dr. Yusuf DURAK
Pr. Dr. Ali ATEŞ
Pr. Dr. Rüstem DUMAN

Bu çalışmada, "Mutaflor" adıyla piyasada satılan ticari probiyotik ilaçtan izole edilen *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) suşunun kullanılan bazı antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi ve bu suşun diğer bakteri suşları üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Mutaflor isimli probiyotik ürün ticari olarak temin edildi ve bu üründen *Escherichia coli* Nissle 1917 suşu Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında izole ve identifiye edildi. EcN suşunun antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite ise elimizde bulunan patojen standart mikroorganizma suşları, gıda ve kuyu sularından izole edilmiş *E. coli* suşları üzerinde, Kuyu Agar ve Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada elde edilen bulgulara göre *Escherichia coli* Nissle 1917 suşunun denenen ticari antibiyotiklerden erythromycin, penicillin, vankomycin ve rifampin'e dirençli olduğu, kullanılan diğer tüm antibiyotiklere ise duyarlı olduğu saptanmıştır. Çalışılan standart suşlara, gıda ve kuyu sularından elde edilen *E. coli* suşlarına karşı ise herhangi bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir. Kolisinler ve mikrosinler *Escherichia coli*'de bulunan birincil savunma sistemleridir. *E.coli* genellikle bazı mikrosinler üretir ve bu mikrosinler sıklıkla belirli patojenik bakterilerin gelişmesini inhibe etmekten sorumludur. Çalışmamızda antimikrobiyal aktivite görülmemiştir. *Escherichia coli* Nissle 1917'nin probiyotik olarak kullanılmasında patojenik suşların epitel hücrelerine tutunmasını önlemesi gibi daha başka mekanizmalar olduğu belirtilmektedir.

1Anahtar Kelimeler: Antibiyotik, Antimikrobiyal etkinlik, *Escherichia coli* Nissle *1917*, Mutaflor, Probiyotik

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF PROBIOTIC STRAIN *ESCHERICHIA COLI* NISSLE 1917 IN TERMS OF ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Youssoufa POUENDİGOUONGOUO

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOLOGY
Advisor: Prof. Dr. Yusuf DURAK

2020,VIII+38 Pages

Jury
Pr. Dr. Yusuf DURAK
Pr. Dr. Ali ATEŞ
Pr. Dr. Rüstem DUMAN

The aim of this study was to determine the susceptibility of *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) strain isolated from commercial probiotic drug under the name "Mutaflor" and to investigate the antimicrobial activity of this strain on other bacterial strains. The probiotic product, Mutaflor, was commercially availabled and *Escherichia* coli Nissle 1917 strain was isolated and identified from this product in the Microbiology Research Laboratory of the Biology Department of the Faculty of Science, Selçuk University. Kirby-Bauer Disc Diffusion method was used in order to determine the antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* Nissle 1917 strain according to the recommendations of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Antimicrobial activity was determined by using well agar disc diffusion and Kirby-Bauer disc diffusion method on *E. coli* strains isolated from food and well waters and in our pathogen standard microorganism strains. According to the results of our study, *Escherichia coli* Nissle 1917 strain was found to be resistant to erythromycin, penicillin, vancomycin and rifampin, but was sensitive to all other antibiotics used. It was determined that it did not have any antimicrobial activity against standard strains, *E. coli* strains obtained from food and well water. Colicins and microsins are the primary defense systems found in *Escherichia coli*. *E. coli* generally produces certain microsins, which are often responsible for inhibiting the growth of certain pathogenic bacteria. No antimicrobial activity was observed in our study. *Escherichia coli* Nissle 1917 is used as a probiotic, it is stated that there are other mechanisms such as preventing the attachment of pathogenic strains to epithelial cells.

Key Words: Antibiotic, Antimicrobial activity, *Escherichia coli* Nissle 1917, Mutaflor, Probiotic.

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır. Araştırmada, Mutaflordan izole ve identifiye edilen *Escherichia coli Nissle* (*EcN)* bakteri suşunun antibiyotiklere karşı duyarlılık durumları ve antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Laboratuvar çalışmaları S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışma konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren ve her türlü desteği sağlayan danışmanım Sayın Prof. Dr. Yusuf DURAK'a (S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteğini gördüğüm, karşılaştığım zorlukları aşmak için bilgi ve tecrübesinden yararlandığım değerli hocalarım Sayın Arş. Gör. Dr. Erdoğan GÜNEŞ (S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) ve Doç. Dr. Ahmet UYSAL'a (S.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu) en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, daima yanımda olduklarını sevgi ile hissettiren, ömrüm boyunca gurur duyacağım canım aileme sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Youssoufa POUENDİGOUONGOUO
Konya 2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **viii**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **3**

2.1. Escherichia coli. 3
2.1.1. *Escherichia coli Nissle 1917* 4
2.2 Probiyotikler 5
2.2.1 .Bazı probiyotiklerin etki mekanizmaları 6

3. MATERYAL VE YÖNTEM **14**

3.1. Materyal 14
3.1.1. Kullanılan besiyeri 14
3.1.2. Kullanılan boyalar 16
3.1.3. Kullanılan antibiotik diskleri ve duyarlılıkları 16
3.2. Yöntem 18
3.2.1. *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) suşunun identifikasyonu 18
3.2.2. *Escherichia coli Nissle 1917* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi 20
3.2.*3 Escherichia coli Nissle 1917* suşunun Antimikrobiyal Etkinliklerinin Belirlenmesi 21

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **23**

4.1. Escherichia coli Nissle 1917 suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının sonuçları .. 24

4.2 Escherichia coli Nissle 1917 Probiyotik Suşunun Antimikrobiyal Etkinliliği 26
4.3.Tartışma 31

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER **32**

5.1 Sonuçlar 32
5.2 Öneriler 33

KAYNAKLAR **35**

ÖZGEÇMİŞ **39**

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

g/l	: gram/litre
^{O}C	: Santigrad Derece
pH	: hidrojen gücü
ml	: mililitre
mg/l	: miligram/litre
mg/ml	: miligram/ mililitre
µg	: mikrogram
mm	: milimetre
µl	: mikrolitre

Kısaltmalar

EcN	: Escherichia coli Nissle 1917
EMB	: Eosine Metilen Blue
MHA	: Mueller-Hinton Agar
MHI	: Mueller-Hinton Infusion
MEM	: Meropenem
ATM	: Aztreonam
CI	: Ciprofloxacin
OFX	: Ofloxacin
CM	: Gentamicin
AMX	: Amoxicillin
CAZ	: Ceftazidime
CRO	: Ceftriaxon
CTX	:Cefotaxime
AK	: Amikacin
NA	: Nalidixic acid
NOR	: Norfloxacin
IPM	: İmipenem
C	: Chloramphenicol
VA	: Vankomycin
TE	: Tetracycline
RA	: Rifampin
P	: Penicillin
E	: Erythromicin

1. GİRİŞ

İnsan vücudunda birçok organ ve dokuda kolonize olmuş toplam 10^{14} kadar mikroorganizma olduğu tahmin edilmektedir. Bir başka ifadeyle insan vücudundaki mikroorganizma sayısı, insandaki toplam hücre sayısından 10 kat fazladır. Bu mikroorganizmaların büyük çoğunluğunu bakteriler oluşturmakla birlikte, virüsler, funguslar ve birçok ökaryotik mikroorganizma da insan mikrobiyotasında yerini almaktadır. İnsan mikrobiyotasının büyük kısmı başta mide bağırsak sistemi olmak üzere ürogenital sistem ve solunum sisteminde kolonize olmuştur. Mide-bağırsak sistemi mikroorganizmalar için zengin besin öğeleri içermesi nedeniyle kolonizasyon için en uygun ortamı oluşturmaktadır. Bu nedenle kolon, tek başına vücudumuzdaki mikroorganizmaların % 70'inden fazlasını barındırmaktadır. Bağırsak mikrobiyotası; insanlarda, başta beslenme olmak üzere, metabolik, fizyolojik ve immünolojik olarak birçok olayda önemli rol oynamaktadır. Bağırsak mikrobiyotası tüm bu özellikleri nedeniyle ilgi odağı haline gelmiş ve son yıllarda yapılan çok sayıda çalışmanın konusu olmuştur (Elif ve Güzel, 2018).

Escherichia coli, Enterobacteriaceae ailesine ait ve *Escherichia* cinsi içerisinde yer alan bir bakteridir. Probiyotik *Escherichia coli Nissle 1917* (EcN) suşu, patojen olmayan insan kaynaklı bir suş olup ticari preparat olarak mutaflor® (Ardeypharm, Herdecke, Germany) adıyla satılmaktadır. Probiyotik olarak kabul edilen bakterilerin çoğu *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi Gram pozitif cinslere ait olup insan bağırsağı kommensal florası açısından faydalı olarak bilinirler (Boudeau ve ark., 2003).

Faydalı ve probiyotik mikroorganizmalar konusunda yapılan çeşitli araştırmalar ve elde edilen umut verici gelişmeler, probiyotiklerin antibiyotiklere alternatif olabileceğini düşündürmektedir. Antibiyotik kullanımından sonra bağırsak florasının yeniden düzenlenmesi veya diğer bağırsak iltihaplanmalarında kullanılması tavsiye edilmektedir. Laboratuvar testlerinde farklı patojenik enterobakterilere karşı güçlü bir antagonistik aktivite gözlenmiştir. Geçtiğimiz 20 yıldan bu yana *E. coli* suşu Nissle 1917; mikrobiyolojik, biyokimyasal ve moleküler genetik yöntemler yardımı ile çok detaylı olarak incelenmiştir (Sonnenborn, 2016).

Bu suşun herhangi bir virülans faktör göstermediği ve serolojik olarak, O6:K5:H1 serotipine dâhil olduğu belirlenmiştir. Bu suş Almanya ve diğer bazı Avrupa ülkelerinde, çeşitli iltihaplı bağırsak hastalıklarının klinik tedavisinde kullanılan

Mutaflor'un içeriğinde bulunmaktadır. EcN, mikrosin olarak bilinen bakterisidal ürünler üretir. Bu ürünler diyare ile yakından ilişkili mikroorganizmalara karşı etki gösterirler. Bu suşun, patojen mikroorganizmalar ve *Salmonella* serotip *typhimurium* ile enfekte edilen gnotobiyotik domuz yavrularını koruduğu ve onun inhibisyon kapasitesinin, insan bağırsağı üzerindeki adezyon bölgelerinin blokajı veya bakteriyosin üretimi ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Scaldaferri, 2016).

Kolisinler; *E. coli* ve *Enterobacteriaceae* familyasının bazı üyeleri tarafından üretilen klasik bakteriyosinler şeklinde, özellikle *E. coli* ve *E. coli* ile çok benzerlik gösteren bazı suşları inhibe ederler. Kolisinler dar spektrumlu, inhibisyon yapan, temel biyolojik aktivite gösterebilen protein yapısında, plazmid kaynaklı olarak konak hücre tarafından biyosentez yolu ile üretilen bakteriyosit moleküllerdir (Murinda ve ark., 1996).

Bu çalışmada, Mutaflor'dan izole edilen *EcN* suşunun kullanılan bazı antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi ve bu suşun diğer bakteri suşları üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Enterobacteriaceae familyasının patojen ve potansiyel patojen bazı üyeleri, insan ve sıcak kanlı hayvanların gastrointestinal sisteminde çeşitli enfeksiyonlara neden olurlar. Gastrointestinal sistemde ciddi hastalık oluşturan bakteriler başlıca; *Escherichia coli'*nin bazı suşları, *Salmonella ve Shigella'nın* belirli türleri *ve Yersinia entercolitica*'dır. Doğal ortamları insan ve hayvan bağırsaklarıdır. Tipik klinik semptomlarla seyreden hastalıkların (tifo, basilli dizanteri ve veba) etkeni olan bakteriler ve hastahane enfeksiyonlarına (idrar yolu enfeksiyonları, pnömoniler, yara enfeksiyonları, septisemiler) neden olan fırsatçılar da *Enterobacteriaceae* familyasına dahildirler (Winn, 2006).

2.1. Escherichia coli.

Escherichia coli ilk kez 1885 yılında Theodor Escherich tarafında izole edilmiş olup, 1919'da Castellani ve Cahalmer tarafından *Escherichia* cins isminin önerilmesiyle, bu tarihten itibaren *Escherichia coli* olarak adlandırılmıştır. Gram-negatif, fakültatif-anaerop, hafif hareketli, bazen hareketsiz, şekerleri asit ve gaz yaparak parçalayan, laktozu ve mannitolu ayrıştıran bakteriler olup indol, metil kırmızısı testleri olumlu (pozitif), Voges-Proskauer (V) ve Sitrat (C) testleri ise negatiftir. (IMViC + + - -) (Baştürk, 2005). Genellikle *E. coli*'nin üremesi için sıcaklık 18- 44,5°C ve pH 5-8 arasındadır. Bu bakterinin optimal üremesi 37°C, pH 7 ve özellikle 44°C'de üremesi Enterik bakterilerin diğer türlerinden ayırt edilmesini sağlar. Hastahane ortamlarından ve hasta örneklerinden izole edilen *Escherichia coli* suşları genellikle kullanılan antibiyotiklerin çoğuna ve soğuğa oldukça dirençlidirler. 60ºC sıcaklıkta 30 dakika canlı kalabilir ancak dezenfektanlara karşı duyarlıdır (Düğenci, 2014). *Escherichia* cinsinin yedi türü vardır ve bunlar sırası ile; *Escherichia coli, Escherichia adecarboxylata, Escherichia fergusonii, Escherichia hermanii, Escherichia vulneris, Escherichia blattae ve Escherichia alberti*'dır. Brain-Heart (İnfusion) Agar besiyerinde hızlı ürerler. Bazıları tek başına veya çiftler halinde görülmüştür. *E. coli* suşlarının çoğu insanlara karşı zararsız fakat bazı suşları patojeniktir. Amerika'da 1940-1950 tarihleri arasında Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) suşları izole edilmiştir. Bu

suşların yeni ortamlara alışma yeteneğinde olup çeşitli hastalıklara neden oldukları bildirilmiştir (Kostakioti ve Stathopoulos, 2004).

Vücudumuzun çeşitli bölgelerinde ve sistemlerinde yerleşik olan veya yerleşen çeşitli yararlı ve zararsız mikroorganizmaların tümü mikrobiyom olarak adlandırılmaktadır. Elif ve Güzel (2018) trafından yapılan son çalışmalar bize bu mikroorganizma topluluklarının vücudumuzun içinde ve üzerinde bulunan bakteri, mantar, virüs ve diğer bazı ökaryotik mikroorganizmalardan olup, insan sağlığı üzerinde tahmin edilenden daha fazla etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu mikroorganizmalar hem sağlık hem de hastalık anındaki fizyolojik aktiviteleri yüksek oranda etkilemektedirler.

2.1.1. *Escherichia coli Nissle 1917*

*Escherichia coli Nissl*e suşu, ilk kez 1917'de Birinci Dünya Savaşı sırasında bir Alman askerinin dışkısından, Alfred Nissle tarafından izole edilmiştir. Nissle, bu tarihlerde enteropatojen türlerle kontamine olmuş Fibourg bölgesinde kalan askerlerde enfeksiyona bağlı diyareyi beklerken, askerlerin sağlıklı bireyler olduklarını tespit etmiştir. (Sonnenborn, 2016).

2.1.1.1. Mutaflor

Mutaflor, ilk olarak 1917'de izole edilen, *Escherichia coli Nissle 1917* adlı canlı, patojenik olmayan bir bakteri suşundan oluşan bir probiyotiktir. *Escherichia coli Nissle 1917* (Mutaflor) en iyi araştırılmış probiyotik bakterilerin biridir. 1960'lı yıllarda Mutaflor, sağlam ve hasta olan kişilerde kullanılmaya başlanmıştır. Bununla birlikte, kontrollü klinik çalışmalarla sistematik yaklaşım son yıllarda artmıştır. Mutaflorun etki mekanizmalarını araştıran çalışmaların sayısı son yıllarda hızla artarken, yeni klinik çalışmalar eksik kalmıştır. Bazı patojen suşlara karşı Mutaflor ile ilgili klinik çalışmaların çoğu olumlu sonuçlara sahip olsa da, bazen Mutaflor'un beklentileri karşılamadığı da görülmektedir. Çalışmaların çoğu olumlu sonuçlara sahipken, aynı zamanda Mutaflorun beklentileri karşılamadığı çalışmalar da mevcuttur (Tannock ve ark., 2011).

EcN, Alfred Nissle tarafından izole edilen patojenik olmayan Gram negatif bir bakteri türdür. Bakteriyal bir probiyotik olan Mutaflor, birçok sindirim sistemi

rahatsızlıklarında ve ayrıca ishale karşı kullanılmaktadır. Genellikle bu probiyotik, remisyon olan hastaların tedavisi için kullanılmaktadır (Scaldaferri, 2016).

Tüm Dünya'da günümüzde de bakterilerin neden olduğu diyare olguları önemli bir sorundur ve bazen ilk tedavi seçeneği olarak antibiyotikler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bakteriyel direnç riski vardır; Bu nedenle alternatif yöntemlerin geliştirilmesi gerekli görülmektedir. Probiyotik ürünler bu soruna bir çözüm gibi görünmektedir. İn vitro çalışmalar, *EcN* suşunun. *E. coli* ve diğer enterik bakteri suşları ile rekabet edebildiğini göstermiştir. *Escherichia coli* Nissle mikrosin olarak bilinen bakterisidal ürünler üretir. Bu ürünler diyare ile yakından ilişkili mikroorganizmalara karşı etki gösterir. 2016 yılında Pamukkale Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada probiyotik *Escherichia coli* suşu Nissle 1917'nin kökeni, tıbbi tarihi, mikrobiyolojik ve genetik özellikleri, biyolojik aktiviteleri, güvenirliliği ve toksikolojisi her yönü ile özetlenmiştir (Altuntaş ve ark., 2017).

EcN Gram negatif bir bakteri türü olup, O6 grubuna aittir ve serotipi O6:K5:H1'dir: H1 serogrup olarak sınıflandırılır, patojenik olmayanların yanı sıra patojenik suşları içeren diğer O6 serogrup bakterileri ile de ilgilidir. Herhangi bir H serogrup, bakteriyel flagellanın bir ana alt birimi olan flagellin antijeni ile belirlenir (Schultz ve Burton, 2017). Yapılan bir çalışma, *EcN'*nin invivo olarak diğer mikroorganizmalar (patojenik ve patojenik olmayan) *E. coli, Salmonella typhimurium, Candida albicans* ve *Lactobacillus johnsonii* ile birlikteliğinin antagonistik etki göstermesine katkıda bulunduğunu belirtmiştir (Schulze ve ark., 1992; Denou ve ark., 2009).

2.1.1.2 Mikrosinler ve kolisinler

Kolisinler ve mikrosinler *Escherichia coli*'de bulunan birincil savunma sistemleridir (Gillor ve ark., 2004). Mikrosinler (Mcc), filogenetik olarak ilişkili bakteri türlerinin çoğalmasını engelleyen ve *Enterobacteriaceae* familyasının üyeleri olan bazı bakteri suşları tarafından üretilen küçük, antibiyotik niteliğindeki peptitlerdir**.** *E.coli'*nin genellikler bazı mikrosinleri sentezlediği ve bu mikrosinlerin de genellikle belirli patojenik bakterilerin gelişmesini inhibe etmekten sorumlu olduğu bildirilmiştir (Sablé ve ark., 2003).

2.2 Probiyotikler

Belirli miktarlarda alındıklarında, konakçı sağlığı üzerinde olumlu etkilere neden olan mikrobiyal gıda katkıları olarak tanımlanmaktadırlar. 1954 yılında Ferdinand Vergin tarafından probiotica terimi kullanılmıştır. II. Dünya Savaşı'ndan kısa bir süre sonra fizikçi ve diyetisyen olan Alman asıllı Werner Kollath, probiyotikleri "besleyici değerinin yanı sıra sağlığı destekleyici özellikleri de bulunan gıda katkıları" olarak tanımlamıştır. 2001 yılında kabul gören probiyotik tanımında FAO (Gıda ve Tarım Örgütü) /WHO (Dünya Sağlık Örgütü) komite uzmanları "Sadece ağız yoluyla alımı" kısmını tanımlamadan çıkarmış ve Probiyotikleri, yeterli miktarda alındıklarında konakçının sağlığı üzerine olumlu etkide bulunan, patojen olmayan canlı mikroorganizmalar şeklinde tanımlamışlardır (İnanç ve ark., 2005).

Günümüzde sağlık yönünden probiyotik terimi; kullanımlarına bağlı olarak ağız, mide-bağırsak, üst solunum yolu ve ürogenital kanalda yararlı etkiler yaparak konağın sağlığında iyileşmeye neden olan mikroorganizmaları tarif etmektedir. Yine belirli suşlarının kullanımına bağlı olarak probiyotiklerin mide-bağırsak kanalı enfeksiyonlarında iyileştirme, laktoz metabolizmasının arttırılması, bağışıklık sisteminin uyarılması ve enflamatuvar bağırsak hastalığı semptomlarının azaltılması gibi yararları bildirilmiştir.

Direnç; bir bakterinin antimikrobiyal bir ajanın öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı dayanabilme yeteneğidir ve antibiyotik kullanımına bağlı olarak gelişen diyare, bazı durumlarda bozulan konak florasının düzeltilmesi gibi farklı amaçlarla kullanılan probiyotiklerin, hastada tedavi amacı ile kullanılan antibiyotiklere de dirençli olması gerektiği ileri sürülmüştür (Özbek, 1993).

2.2.1 .Bazı probiyotiklerin etki mekanizmaları

Bifidobacterium breve: Antikor sentezi artar. Hücre aracılı (Fagositik ve doğal öldürücü hücrelerin aktivitesi artar) dentritik hücrelerin fenotipi ve fonksiyonu değişir.

- ***Bifidobacterium longum***: Antioksidatif (oksidatif ortamda etkileri artar), Linoleik asid peroksidasyonunu inhibe eder, serbest radikalleri temizlerler
- ***Escherichia coli Nissle 1917***: Patojenik mikroorganizma suşlarının epitel hücrelerine tutunmasını önler.
- ***Enterococcus faecium***: Antimikrobiyal faktörler (organik asitler, hidrojen peroksit ve bacteriosinler) yardımı ile luminal pH'ı düşürür).

Lactobacillus acidophilus: Antioksidatif (oksidatif ortamda yaşamları artar), Linoleik asid peroksidasyonunu inhibe eder, serbest radikalleri temizlerler ***Bifidobacterium lactis***: Oral toleransın uyarılması ve devamlılığını sağlar (Ozden, 2008).

2011 yılında Suudi Arabistan'da kaynak sularından izole edilen *E. coli* suşlarının antibiyotik direnci incelenmiştir. Araştırma sonucunda en dirençli oldukları antibiyotik ampisilin olarak belirlenmiştir (Alzahrani ve Gherbawy, 2011). Yine yapılan başka bir çalışmada, çeşme sularından izole edilen *E. coli* suşlarının antibiyotik direnci incelenmiştir; araştırma sonucunda en yüksek dirençli oldukları antibiyotik ampisilin olarak belirlenirken, en duyarlı oldukları antibiyotik ise Chloramphenicol olarak saptanmıştır (Ozgumus ve ark., 2007).

Deniz suyu ve tatlı su kaynaklarından izole edilen *E. coli* ve *Salmonella* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direncinin araştırıldığı bir çalışmada, deniz suyundan izole edilen *E. coli* ve *Salmonella* suşlarında en yüksek direnç Cefuroxime karşı bulunurken en düşük direnç ise Cefotaxime karşı belirlenmiştir. Tatlı su kaynaklarından izole edilen suşlarda ise en yüksek direnç aynı şekilde Cefuroxime karşı belirlenirken, en düşük direnç ise Gentamicine karşı saptanmıştır.(Harakeh ve ark., 2006).

Antibiyotikler, çocukluk çağında en sık reçete edilen ilaçlardır. Bu antibiyotiklerin çoğunun gereksiz yere kullanılması kronik ishale neden olabilir ve bakteriyel direnç gelişmesinin yanı sıra çeşitli yan etkilere neden olurlar. Bunların yerine sağlık üzerinde yararlı etkileri olan Probiyotiklerin kullanılabilirliği tartışılmıştır (Duman ve Çağlar, 2017).

Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen mikroorganizmaların örneklere göre dağılımı ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinin amaçlandığı bir çalışmada, antibiyotik duyarlılıkları CLSI kriterlerine göre, disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Yapılan çalışmada gram negatif bakterilerin imipeneme olan direncindeki artış oranları dikkati çekerken, *enterobactericeae* ailesi üyesi Gram negatif basiller için imipenemin halen aminoglikozidler ve Ciprofloxacinle birlikte en etkili antibiyotikler arasında olduğu görülmüştür. Sonuçta yoğun bakım ünitelerinde infeksiyonu önleyici tedbirlerin arttırılmasının ve ampirik antibiyotik tedavilerinin aktif izleminin gerekliliği vurgulanmıştır (Çetin ve ark., 2007).

Beta-laktamaz enzim sentezi, Gram-negatif enterik bakteri grubuna ait en önemli antibiyotiklere direnç mekanizmalarından biridir. Beta-laktamazlar, beta-laktam halkasındaki siklik amid bağını keserek hareket ederler. Bu enzimler patojen

organizmalar arasında hızla yayılmaktadır ve antibiyotik direncinin yüksek ve çoklu seviyelerini ölçmek için kullanılan rutin laboratuvar test yöntemlerini belirlemek daha fazla önem kazanmaktadır (Demirpek, 2012).

Yapılan bir çalışmada, *Faecalibacterium prausnitzii* ve *EcN* probiyotiğinin kombinasyonunun, bazı gastrointestinal hastalıkların iyileştirilmesinde önemli bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştır. *F. parausnitzii* ve *EcN* süpernatanlarının bağırsak hücreleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinde tatmin edici sonuçların alındığı belirtilmiştir (Wang ve ark., 2017).

Çocuklarda sıklıkla görülen akut diyare ve antibiyotik kullanımına bağlı diyarenin tedavisinde etkin kullanım potansiyeli taşıyan probiyotik preparatları geliştirilmiştir. Probiyotiklerin bağırsakta intestinal sitemdeki çok önemli rollerinden biri, konağın doğal florasının patojenler için bir bariyer oluşturmasına yardımcı olmasıdır. Günümüzde probiyotik mikroorganizmaların seçiminde, patojen ve etmeni mikroorganizmaları inhibe etme potansiyeli önemli bir kriterdir. Bir kaç antimikrobiyal maddeyi üretmek ya da bağırsak epitel hücrelerine patojen bakterilerin tutunmasını engellemek suretiyle yerine getirmektedir (Uymaz, 2010).

2008 yılında yapılan bir çalışmada, *EcN* suşunun diyare hastalarından izole edilen patojenik bakterilere karşı in vitro inhibe edici etkisi araştırılmış olup, *EcN*'nin inhibe edici etkisi, 30 *diyaregenik E. coli* suşu, 10 *Salmonella spp,* 10 *Clostridium difficile* ve 10 *Campylobacter spp* dahil olmak üzere diyare ile ilişkili bakterilere karşı değerlendirilmiştir. Mikrosine duyarlı suş *(E. coli* K12 H 5316) kontrol suşu olarak kullanılmıştır. Sonuçta çalışılan suşların hiçbirinde invitro büyüme inhibisyonu görülmediğini, *EcN*'nin farklı bakteriler üzerindeki inhibitör etkinliğinin, büyük olasılıkla invivo ortamda bulunan bazı etkili ve farklı maddelerin varlığına bağlı olduğunu belirtmişlerdir (Dezfulian ve ark., 2009).

EcN, üropatojenik *Escherichia coli* ile yakın ilişkili olmakla birlikte güvenli bir probiyotik türdür.Patojen olan ve olmayan *E.coli* suşları,sahip oldukları genetik bilgi yönünden farklılık gösterdikleri için, bu bilgiler, spesifik virülans özelliklere sahip olmalarına, canlı kalmalarına ve konakta yaşamalarına katkı sağlayabilmektedir. Bu faktörleri belirleyen birimlerin, uygun yatay gen transferleri ile aktarıldığı ve genomlar üzerindeki gen adacıklarında kümelendikleri düşünülmüştür (Grozdanov ve ark., 2004).

2003 yılında yapılan bir çalışmada; patojenik *Escherichia coli* suşu, Crohn hastalığının ileal lezyonlarından izole edilmiştir. Çalışmanın amacı, Patojenik olmayan *EcN* (Mutaflor) suşunun, enflamatuar barsak hastalığının tedavisinde etkili olup

olmadığının incelenmesi ve daha sonra patojenik *Escherichia coli* suşlarını inhibe edip etmediğinin tespit edilmesidir. Sonuçta *EcN*'nin önemli aktiviteler gösterdiği görülmüş ve Crohn hastalığının tedavisinde *EcN* (Mutaflor) suşunun çok etkili olduğu belirlenmiştir (Boudeau ve ark., 2003).

Clostridium perfringens ; gıda zehirlenmesi, nekrotik enterit, gazlı kangren ve bazen de ölüme nedeni olabilen, virülansı yüksek , patojen ve gram (+) bir bakteri türüdür . *EcN'nin C. perfringens'in* çoğalması, toksin üretmesi , biyofilm oluşturma ve inflamatuar sitokin yanıtları üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ve sonuçta *EcN'*in *C. perfringens'i*n in vitro koşullarda birçok patolojik etkisini inhibe edebildiği tespit edilmiştir (Roland ve ark., 2014).

Son yıllarda *EcN,* ülseratif kolit (ÜK) tedavisi için bir tedavi aracı olarak tavsiye edilmiştir. Bu güne kadar bu konuda yeterince çalışma yapılmamıştır. Yapılacak çalışmalarla, probiyotik *EcN'nin* ülseratif kolit tedavisinde daha güvenilir olarak kullanılabilmesi için en son yöntemlerle daha detaylı araştırılmasının gerekli olduğunun altı çizilmiştir (Losurdo ve ark., 2015).

Probiyotik bir bakteri türü olan *EcN*'nin bir bağırsak hastalığı olan enflamasyonun tedavisinde kullanılabildiği, ancak mekanizmasına ilişkin bilgilerin yetersiz olduğu belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmada, *EcN'*nin enflamatuar süreç üzerindeki baskılayıcı mekanizmasını belirlemek için in vitro enflamatuar tepkiler üzerindeki anti-enflamatuar etkisi belirlenmeye çalışılmış ve sonuçta, patojenik olmayan *E. coli Nissle 1917* suşunun insan epitel hücrelerinde doğrudan anti-enflamatuar aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Kamada ve ark., 2008).

Günümüzde *Escherichia coli Nissle 1917* (Mutaflor), en çok çalışılan probiyotik bakteri türlerinden biridir. Probiyotik bakteriler, insan sağlığına katkıda bulunan canlı mikroorganizmalardır. Bu suşlarla ilgili birçok mekanizma bilinmektedir; probiyotik etkileri; sitokinlerin ekspresyonunun indüklenmesini ve IgA ve musinin salgılanmasının artmasını içerir. Ayrıca lenfositleri ve makrofajları aktive ederler ve konak hücrelerine bağlanma ve yayılmayı inhibe ederler (Jacobi ve Malfertheiner, 2011).

Probiyotik bakteri *EcN'*nin oral uygulaması, iltihaplı bağırsak hastalığını iyileştirir, ancak bu suşun etki mekanizması hakkında bilgi yeterli değildir. Verilerimiz şu anda kolitte kullanılan bu probiyotiğin yararına dair daha fazla kanıt sunmaktadır, ancak etkili bir probiyotiğin diğer ilaçlar gibi yan etkileri olabileceğini de hatırlatmaktadır (Olier ve ark., 2012). Genetik ve çevresel faktörler bağırsak

mikrobiyomunu ve mikrobiyal metabolizmayı olumsuz etkileyebilir. Bu çevresel faktörler arasında, antibiyotik tüketimi, bireylerin bağırsak mikrobiyomunu önemli ölçüde değiştirebilir. Ancak Probiyotikler", terapötik etkinliklerinden ziyade koruyucu olarak ifade edilirler ve bu nedenle antibiyotiklerin karşıtı olarak kabul edilirler (Nami ve ark., 2015).

Almanya'da şimdiye kadar görülen en büyük Entero – Hemorajik *Escherichia coli* (EHEC) salgını 2011'de gerçekleşmiştir. Bu salgına O157:H7 olmayan, Shiga-toksinojenik enterohemorajik *E. coli* suşu O104: H4 neden olmuştur. Şu anda, insanlarda EHEC enfeksiyonları için etkili bir tedavi mevcut değildir. Özellikle, antibiyotikler tedavi için endike değildir, çünkü shiga toksin (Stx) üretimini indükleyebilirler, böylece semptomları kötüleştirirler. Bu nedenle alternatif tedavilere bir umut olarak ihtiyaç duyulmaktadır.

Yapılan bir çalışmada probiyotik suşu *EcN* 'nin O157: H7 suşları üzerindeki antagonistik etkilerinin saptandığı test edildi, *EcN*, EHEC suş O104: H4 ve O157: H1 suşları üzerinde çok etkili bir antagonist aktivite sergilediği görülmüştür (Rund ve ark., 2013).

Henker ve ark. (2008)'nin yaptığı çalışmada, 4 günlük ishali bebeklerde ve küçük çocuklarda *EcN* probiyotiklerinin etkinliği test edilmiştir. Probiyotik kullanımı bazı ishal biçimlerini önleyebilir veya iyileştirebilir. Sonuçta küçük çocuklarda kullanılan *EcN*'nin İshalde 4 gün sonra tedaviye katkıda bulunduğu görülmüştür. İn vitro çalışmalar, *EcN* suşunun bazı *E. coli* suşları ve diğer enterobakterilerle rekabet edebildiğini göstermiştir. *EcN,* mikrosinler olarak bilinen bakterisidal ürünler üretir. İshal ile ilişkili mikroorganizmalara karşı etkilidir.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, *EcN'n*in antimutajenik aktivitesi incelenmiştir. Standart mutajenite testleri kullanılarak *EcN'*nin 4-nitrokinolin-1-oksit (NQO), benzo piren ve H_2O_2 gibi iyi bilinen bazı mutajenlere karşı antimutajenik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Sonnenborn ve ark., 2009).

EcN sıvı kültürünün ürettiği mikrosinin *Campylobacter, Salmonella, Clotridium difficile* ve *Escherichia coli* üzerinde inhibisyon etkisi araştırılmış ama bu mikroorganizmalara karşı inhisyon tespit edilememiştir (Dezfulian ve ark., 2009).

EcN ,antibiyotiklerle tedaviye başlamadan önce kullanıldığından, genellikle Gram-negatif enterobakterilere karşı etkili olan ve yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere dirençli değildir, *EcN,* antibiyotiklere karşı dirençten sorumlu olmayan

iki gizli plazmide sahiptir (pMUT1, pMUT2). *EcN s*uşu bir antibiyotik direnç plazmidine sahip değildir. *E. coli'l*erde olduğu gibi *EcN,* klindamisin, eritromisin, metronidazol, penisilin G, rifampin ve vankomisin gibi gram-pozitif bakterilere karşı etkili olan antibiyotiklere doğal direnç gösterirler (Blum-Oehler ve ark., 2003).

Fidan ve Süzme (2016), yapmış oldukları çalışmada *Escherichia coli* bakterisinin antibiyotik duyarlılığının görüntü işleme tekniği ile farklı antibiyotik gruplarının Disk Difüzyon Test'i sırasında bakterilere karşı gösterdiği davranışı zamana göre incelemektir. Bu çalışma sonucunda Disk Difüzyon Yöntemi için daha kısa sürede test sonuçlarına ulaşabileceğini göstermiştir.

Nougayrède ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada mikrosinlerin üretimine ek olarak, *EcN*'nin antimikrobiyal ve antitümör özelliklere sahip heterojen bir molekül grubuna ait maddeler olan peptid hibritlerini sentezleyebilen suşlar içeren *Escherichia coli* alt grubuna ait olduğunu belirtmişlerdir. Günümüzde *EcN* peptidlerinin diğer bakterilere karşı antagonistik etkiye katkıda bulunup bulunmadığı bilinmemektedir.

Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) gibi shiga toksini (Stx) üreten *E. coli (*STEC), insanlarda gıda kaynaklı hastalıkların önde gelen nedenidir. İn vitro çalışmalar, probiyotik *Escherichia coli* suşu Nissle 1917'nin *(EcN)* Stx üretimini etkili bir şekilde önleyebildiğini göstermiştir. Bu deneyi takiben hayatı tehdit eden EHEC suşlarına karşı *EcN* alternatif bir ilaç olabilir. Deneyler, *EcN*'nin sadece fajlara değil, aynı zamanda lambda-fajlara karşı direncinin de ortaya çıktığını göstermiştir. Ayrıca, *EcN'*in fajları etkisizleştirdiğini ve böylece *E. coli* suşlarını koruduğunu da gözlemlemişlerdir. Bu nedenle, lambda fajlarının inaktivasyonu, *EcN'y*e bağlanan lambda fajından kaynaklanırken, stx fajı inaktivasyonuna, *EcN*'nin termostabil proteini aracılık eder. Sonuçta bu, *EcN'*nin EHEC'in neden olduğu hastalıkların önlenmesi ve muhtemelen daha önce enfekte olmuş kişilerin tedavisi için iyi bir aday olduğunu göstermektedir (Bury ve ark., 2018).

EcN, Gram negatif bir bakteridir. *EcN* vankomisine karşı dirençlidir. Vankomisin, glikopeptidler ailesine ait bir antibiyotiktır. Gram negatif bakterilerin hedef yapılarına lipid tabakalarından geçememeleri nedeniyle etkili olamazlar (Öncül, 2010).

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi amacı ile kullanılan antibiyotikler ve kemoterapötikler, mikrobiyal direncin artışına neden olmakta ve yeni tedavi yöntemlerinin gerekliliği sıklıkla ileri sürülmektedir. Yapılan bir çalışmada, *EcN* 'nin yenidoğan bebekler üzerindeki etkilerinin ve sonuçlarının birkaç yıl boyunca izlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için iki grup yenidoğan seçilmiştir.

Birinci grupta *EcN* uygulaması yapılırken, diğer grupta hiçbir uygulama yapılmamıştır. Birkaç yıl sonra incelendiğinde iki grup arasında büyük fark bulunmuştur. *EcN* alan yenidoğanların sadece % 25'inde ishal vakası görülürken, almayanların ise % 66'sında ishal vakası görülmüştür. Çalışma sonuçlarına bakılarak, yenidoğan hastalıklarının ve ishalin profilaksisi ve tedavisi üzerinde *EcN'*nin açık bir şekilde fayda sağladığı belirtilmiştir (Von Buenau ve ark., 2005).

Enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC) O157: H7, hafif ishalden hemorajik kolite, hayatı tehdit eden komplikasyonlara kadar ciddi enfeksiyonlardan sorumlu olan başlıca gıda patojenleridir. Shiga (Stx) toksinleri, *E. coli* O157: H7'nin ana virülans faktörüdür. Bir çalışmada, *E. coli* O157: H7'ye karşı *E. coli Nissle 1917* probiyotik suşu ile profilaktik tedavinin antagonistik etkisi, in vitro ve in vivo olarak incelenmiştir, Probiyotik *EcN*, O157: H7 hastaların sayısını büyük ölçüde düşürdüğü görülmüştür. İn vitro ve in vivo veriler, *EcN* probiyotik suşunun, *E. coli* O157: H7'nin üremesini önlediğini kanıtlamıştır (Ali ve ark., 2017).

Deriu ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada, *EcN*'nin, *Salmonella typhimurium'*un bağırsak kolonizasyonunu ve proinflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu, demir elementinin kullanılabilirliği yönünden rekabet ederek azalttığını göstermektedir.

Antimikrobiyal ajanlara maruz kalmayı takiben enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC) tarafından Shiga toksinin salınımı veya artması nedeniyle, antimikrobiyal ajanların EHEC aracılı enfeksiyonlarda rolü tartışmalıdır. Probiyotikler bu nedenle alternatif bir tedavi seçeneği olarak hızla ilgi çekmektedir. İyi bilinen probiyotik suşu *Escherichia coli* Nissle 1917 *(EcN)*'nin, O104: H4 ve O157: H7 serotiplerinin önemli EHEC suşlarına karşı etkisini belirlemek için birkaç kez in vitro olarak test edilmiştir. *EcN* ve EHEC suşunun 4 ve 24 saat boyunca besiyerinde birlikte yetiştirilmesinden sonra, EHEC çoğalması, toksin gen ekspresyonu, Stx miktarı ve sitotoksisite üzerindeki probiyotik etkileri; Gerçek zamanlı kantitatif PCR, Stx-ELISA ve Vero sitotoksisite testleri ile saptanmıştır. Probiyotik EcN; EHEC O104, H4 ve O157 suşlarının üreme yoğunluğunu büyük ölçüde önlediği gözlenmiştir. Probiyotik olmayan *E. coli* suşu MG1655'in EHEC çoğalması üzerine etkisinin olmadığı saptanmıştır. Stx'in ekspresyon seviyesi, özellikle stx2a geni için büyük ölçüde azaldığı, *EcN* ve EHEC kültürlerinin süpernatantlarında Stx konsantrasyonlarının ve sitotoksisitenin önemli inhibisyonunun gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar, *EcN'*nin çoğalma ve Shiga toksini üzerine inhibe edici etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle *EcN*'nin, özellikle EHEC

O104: H4 ve O157: H7'ye karşı kullanmak için terapötik bir aday olarak kabul edilebileceği belirtilmiştir (Mohsin ve ark., 2015).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmamızda Mutaflor isimli probiyotik ürün ticari olarak temin edildi ve bu üründen *Escherichia coli Nissle 1917* suşu, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında izole ve identifiye edilerek araştırıldı

3.1. Materyal

Escherichia coli Nissle 1917 'nin antimikobiyal etkinliğini belirlemek için bazı patojen olan mikrooganizmalar seçilmiştir .Çalışmada, *Candiada albicans ATCC 2655, Escherichia coli ATCC 25922 ,Klebsiella pneumonia ATCC 70603, Pseudomonas ATCC 27853, Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ATCC 43300, Salmonella enteritidis ATCC 13076, Baillus cereus ATCC 11778,, Sarcina lutea ATCC 9341* nolu standart mikroorganizma suşları ile *DSG6, DSG9, DSG26, DSG30, DSG37* (Gıdalardan izole edilen *E. coli* suşları) *,DSS5, DSS6, DSS7, DSS8, DSS10* (Kuyu sularından izole edilen *E.coli* suşları) Konya'da çeşitli gıdalardan ve kuyu sularından izole edilmiş E. coli suşları kullanılmıştır. Bu suşlar Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarından temin edilmiştir.

3.1.1. Kullanılan besiyeri

Brain Heart (İnfusion)Agar (Merck)

Hazırlanışı: Dehidre besiyeri 52,0 g/l olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121^{O}C'de 15 dakika sterilize edildi ve steril petri kutularına 15'er ml döküldü. Sterilizasyon sonrası 25^{O}C'de pH'sı 7,4±0,2' ye ayarlandı. Hazırlanmış besiyeri berrak ve bazen hafif opalesent (meneviş, yanar döner) ve kahverengidir.

Brain Hearth (Infusion) Broth (Merck)

Hazırlanışı: Dehidre besiyeri, 37,0 g/l olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilip, amaca uygun kaplara (tüp, erlen vb.) dağıtıldı ve otoklavda 121 ^{O}C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrası 25^{O}C'de pH'sı 7,4±0,2'ye ayarlandı. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kahverengidir.

Mueller-Hinton Agar (Merck)

Hazırlanışı: Dehidre besiyeri, 34,0 g/l konsantrasyonda damıtık su içinde ısıtılarak eritildi otoklavda 115 ^{O}C'de 10 dakika sterilize edilip, steril petri kutularına 15'er ml dağıtıldı. pH, 25 ^{O}C de 7,4±0,2' ye ayarlandı. Besiyeri berrak, yanar-döner ve sarımsı kahverengindedir.

Eosin Methylene-Blue Agar (Merck)

Hazırlanışı: Dehidre besiyeri, 36,0 g/l olacak şekilde damıtık suda ısıtılarak eritildi ve otoklavda 121^{O}C'de 15 dakika süre ile sterilize edildikten sonra 45-50 ^{O}C'ye soğuduğunda steril petri kutularına 15'er ml olarak dağıtıldı. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kahve-kırmızı renklidir, pH'sı 25 ^{O}C'de 7,0±0,2'ye ayarlandı.

- **Tryptone Bile X-glucuronide Agar (Merck)**

Hazırlanışı: Dehidre besiyeri, 36,6 g/l olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121^{O}C'de 15 dakika sterilize edilip, steril petri kutularına 15'er ml dökülür. Sterilizasyon sonrası hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımtırak renktedir.25 ^{O}C'de pH'sı 7,2±0,2'dir. Buzdolabında ve karanlıkta olmak şartı ile 4 hafta ile saklanabilmektedir**.**

Nutrient Broth (Merck)

Hazırlanışı: Dehidre besiyeri, 8,0 g/l olacak şekilde damıtık su içinde eritildi ve amaca uygun kaplara (tüp, erlen vs.) dağıtıldıktan sonra otoklavda 121^{O}C'de 15 dakika süre ilesterilize edildi. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı- kahve renklidir. 25 oC'de pH'sı 7,0±0,2'ye ayarlandı,

Nutrient Agar (Merck)

Hazırlanışı: Dehidre (Toz) halindeki besiyeri, 20,0 g/l olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritildi, otoklavda 120 ^{O}C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra 45-50 ^{O}C'ye soğutularak, steril edilmiş orta boy petri kutularına 15'er ml olarak dağıtıldı. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renklidır, 25 ^{O}C 'de pH'sı 7,0±0,2' ye ayarlandı.

3.1.2. Kullanılan boyalar.

- Jansiyan moru boya eriyiği
- Lugolun iyot çözeltisi
- Kristal viyole

3.1.3. Kullanılan antibiotik diskleri

Çalışmada *EcN* suşunun antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için Meropenem 10 µg, Aztreonam 30 µg, Ciprofloxacin 5 µg, Ofloxacin 5 µg, Gentamicin 10 µg. Amoxicillin acid 30 µg, Ceftazidime 30 µg, Ceftriaxon 30 µg, Cefotaxime 30 µg, Amikacin 30 µg, Nalidixic acid 30 µg, Norfloxacin 10 µg, Chloramphenicol 30 µg, Nitrofurantoin 300 µg, Vankomycin 30 µg, Tetracycline 30 µg, Rifampin 5 µg, Penicillin 10 µg, Erythromycin 15 µg ve Imipenem 10µ antibiyotik ticari diskleri kullanılmıştır

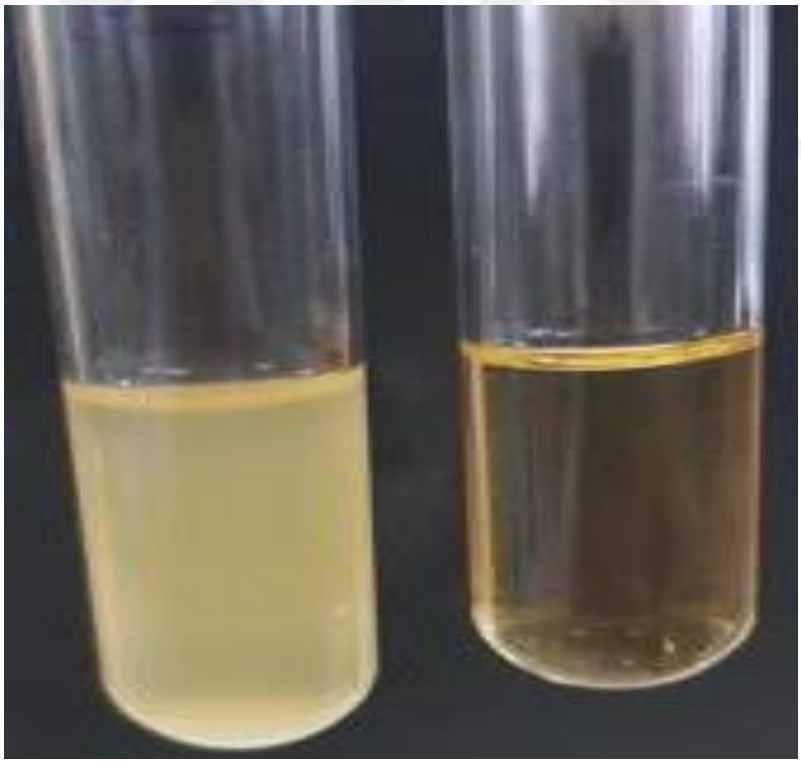
Çizelge 3.1. Kullanılan antibiyotik disklerine ait zon çapları ve duyarlılık durumları (CLSI, 2008).

Antibiyotikler	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Meropenem (MEM) 10 µg.	**≥ 23**	**20–22**	**≤ 19**
Aztreonam, (ATM) 30 µg.	**≥ 21**	**18–20**	**≤ 17**
Ciprofloxacin (CIP) 5 µg.	**≥ 21**	**16–20**	**≤ 15**
Ofloxacin (OFX)5 µg.	**≥ 16**	**13–15**	**≤ 12**
Gentamicin (CN) 10 µg.	**≥ 15**	**13–14**	**≤ 12**
Amoxicillin (AMX) 30µg.	**≥ 18**	**14–17**	**≤ 13**
Ceftazidime (CAZ) 30 µg.	**≥ 21**	**18–20**	**≤ 17**
Ceftriaxon (CRO) 30 µg.	**≥ 25**	**22–24**	**≤ 21**
Cefotaxime (CTX) 30 µg.	**≥ 26**	**23–25**	**≤ 22**
Amikacin (AN) 30 µg.	**≥ 17**	**15–16**	**≤ 14**
Nalidixic acid (NA) 30 µg.	**≥ 19**	**14–18**	**≤ 13**
Norfloxacin (NOR) 10µg	**≥ 17**	**13–16**	**≤ 12**
Chloramphenicol (C)30µg	**≥ 18**	**13–17**	**≤ 12**
Nitrofurantoin (F) 300µg	**≥ 17**	**15–16**	**≤ 14**
Vankomycin (VA) 30µg.	**≥21**	**18-20**	**≤ 17**
Tetracycline (TE) 30 µg.	**≥15**	**12-14**	**≤ 11**
Rifampin (RA) 5 µg.	**≥20**	**17-19**	**≤ 16**
Penicillin (P)10 µg.	**≥22**	**10-21**	**≤11**
Erythromycin (E) 15µg.	**≥23**	**14-22**	**≤13**
Imipenem (IPM) 10µg	**≥23**	**20-22**	**≤19**

3.2. Yöntem

3.2.1. *Escherichia coli* Nissle1917 (EcN) suşunun identifikasyonu

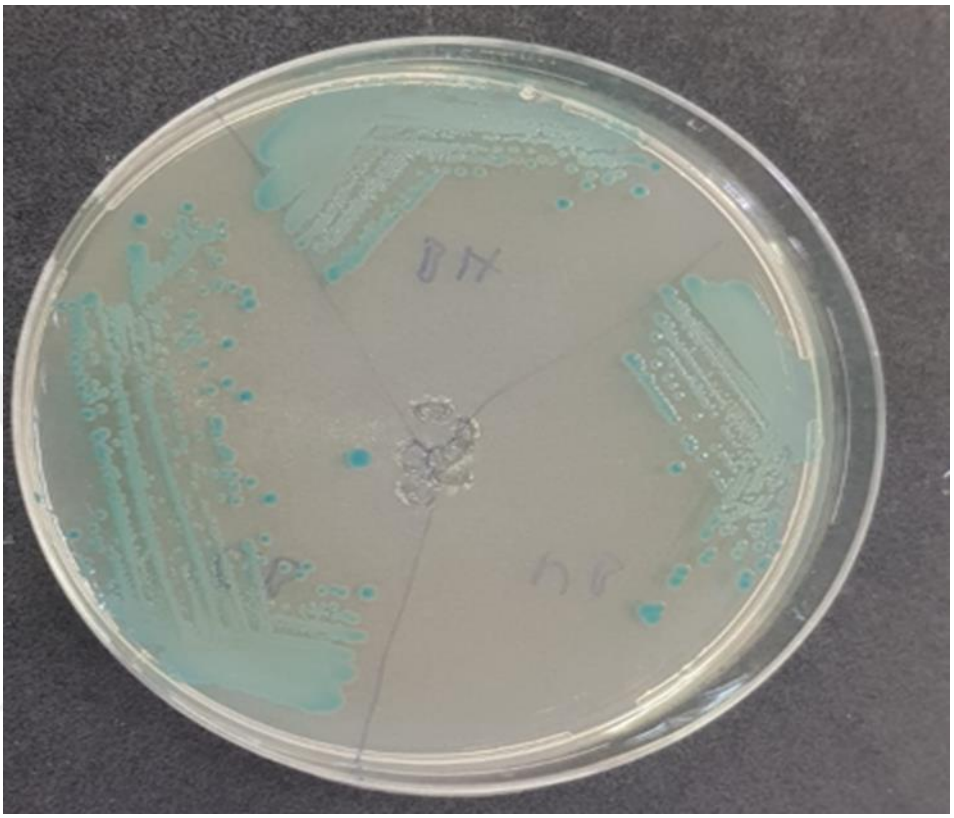
Mutaflor isimli probiyotik ürün ticari olarak temin edildi ve bu üründen *Escherichia coli* Nissle 1917 suşu, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında izole ve identifiye edilmeye çalışılmıştır. Bunun için Mutaflor kapsülleri steril ortamda ve şartlarda açılarak zenginleştirilmiş besiyeri olan Brain Heart Infusion Broth besiyerine inoküle edilerek içerisindeki suşun canlandırılması sağlanmıştır.



Şekil.3.2.1. *EcN* Suşunun Brain Heart Infusion Broth besiyerinde üreme görüntüsü

- **TBX besiyeri ekimi**

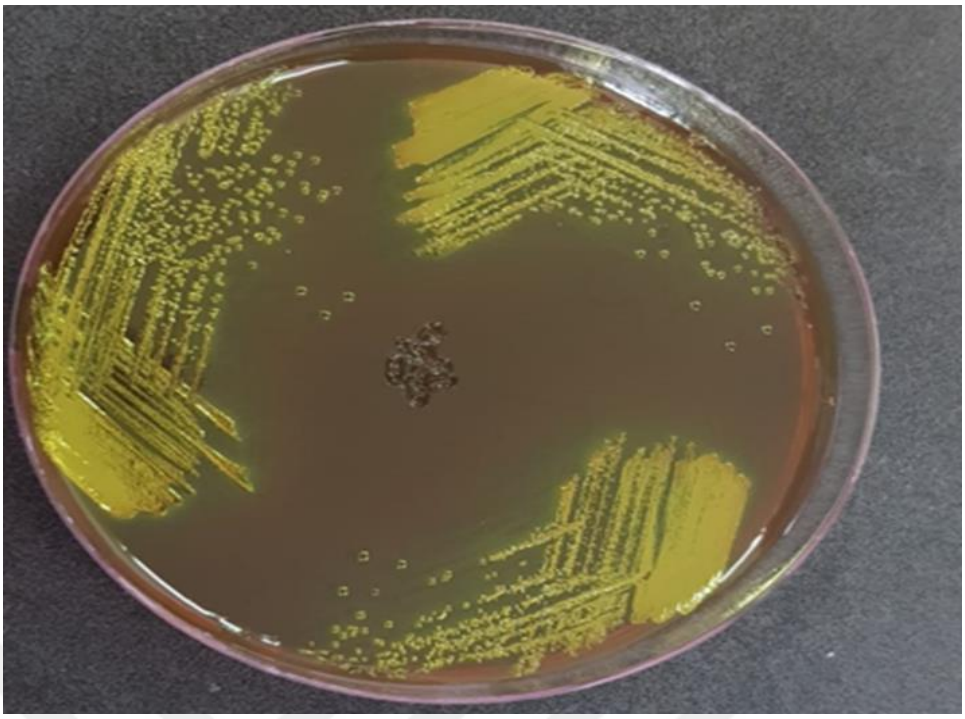
TBX besiyerine azaltma metodu ile transfer ekimi yapıldı. Plaklar önce 35°C'de 4 saat inkübe edildikten sonra, 44 ºC'de 20 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Besiyerinde gelişen ve mavi-yeşil renk gösteren koloniler *E.coli* suşu olarak teşhis edilmiş oldu.



Şekil.3.2.2. TBX besiyerinde gelişen ve mavi-yeşil renk gösteren *EcN* suşunun koloni görünümleri.

- **EMB besiyeri ekimi**

Brain Hearth İnfüzyon besiyerinde gelişen kültürden, halka öze yardımı ile EMB agar besiyerine azaltma metoduyla ekim yapılmıştır. Bu besiyerinde gelişme gösteren ve metalik parlaklıktaki yeşil röfleli koloniler *E. coli* olarak tanımlanmıştır.

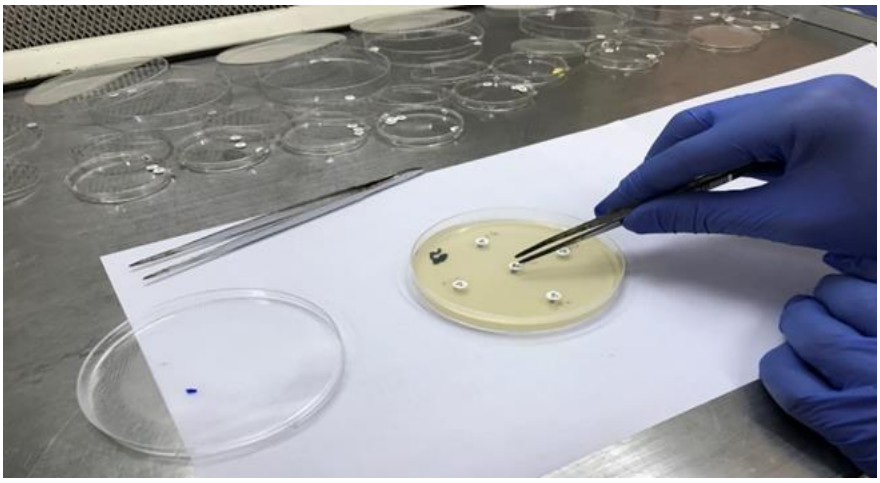


Şekil.3.2.3. EMB agar besiyerinde *E. coli* suşunun metalik parlaklıktaki yeşil röfleli kolonileri

3.2.2. *Escherichia coli Nissle 1917* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi.

- **Disk difüzyon yöntemi**

Escherichia coli Nissle 1917 (*EcN*) suşunun antibiyotiklere karşı duyarlık durumu, kuru disk difüzyon yöntemi (Kirby-Bauer) ile araştırılmıştır. Bakteri suşu hücre yoğunluğu, CLSI önerileri doğrultusunda 24 saatlik bakteri kültürünün % 0,9'luk NaCl içinde hazırlanan süspansiyonu 0,5 McFarland (1×10^8 koloni oluşturan birim (kob)/ml) tüp bulanıklığına ayarlanmış ve petri kaplarında, 4 mm kalınlığındaki Mueller-Hinton Agar besiyeri yüzeyine eküvyon yardımıyla yayılarak ekilmiştir. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra antibiyotik diskleri belli mesafelerde yerleştirilmiştir. Mueller-Hinton Agar besiyerinde 37°C de 24 saatlik inkübasyondan sonra disklerin çevresinde oluşan zon çapları ölçülmüş ve suşun kullanılan antibiyotiklere duyarlı, orta duyarlı veya dirençli olup olmadığı belirlenmiştir (CLSI, 2008).



Şekil.3.2.4. Muller hinton agar üzerinde antibiyotik disklerinin yerleştirilmesi

3.2.*3 Escherichia coli Nissle 1917* suşunun Antimikrobiyal Etkinliklerinin Belirlenmesi

Escherichia coli Nissle 1917'nin antagonistik etkisini belirlemek için laboratuvarımızda bulunan *Candiada albicans, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa, Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA), Salmonella enteritidis, Baillus cereus Sarcina lutea* suşları ve DSG6, DSG9, DSG26, DSG30, DSG37, DSS5, DSS6 DSS7, DSS8, DSS10 nolu çeşitli gıdalardan ve kuyu sularından izole edilmiş *E. coli* suşları; öncelikle stoktan çıkarılarak canlandırılmıştır, saflık kontrolü yapılıp daha sonra testlerde kullanılmıştır, Nutrient Broth besiyerinde 37 ^{o}C'de etüvde 24 saat süre ile çoğaltıldı (Kıvanç ve Erikçi, 2018). Antimikrobiyal aktivite için Kuyu Agar Disk Difüzyon ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemleri kullanılmıştır. Bunun için agar yüzeyine denenecek olan standart suşun 24 saatlik taze kültüründen Mc Farland bulanıklığına göre yoğunluğu ayarlanmıştır ($1x10^{8}$ Kob/ml). Daha sonra hazırlanan standart suş kültürü agar yüzeyine eküvyon çubuk yardımı ile homojen olarak yayılmış ve agar yüzeyine 10 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Kuyucukların diplerini doldurmak için 15 µl steril nutrient agar ilave edildi. Agar katılaştıktan sonra önceden hazırlanmış 18-24 saatlik *EcN* bakteri kültüründe bulunan sıvı bakteri kültürü 10 µl, 20 µl ve 50 µl olarak açılan bu kuyucuklara ilave edildi. 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda çukurların etrafında inhibisyon zonları ölçüldü (Dezfulian ve ark., 2009). Antimikrobiyal aktivite olup olmadığını daha net belirlemek için farklı modifikasyonlar uygulanmıştır. Bunun için *EcN* bakteri kültürü 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiş her süre sonunda bu kültürler santrifüj edilip elde edilen süpernatant

10 kat ve 20 kat yoğunlaştırılarak her kuyucuğa bu kültürlerden 100 µl olacak şekilde ilave edilmiştir ve inkübasyona bırakılmıştır. Denenen diğer bir yöntemde ise 24,48 ve 72 saat sonlarında kültür ultrasonikatörle parçalanmış daha sonra santrifüj yapılıp elde edilen süpernatant 10 ve 20 kat yoğunlaştırılıp kullanılmıştır. Bir gecelik inkübasyon sonucu zon çapı oluşup oluşmadığı gözlemlenmiştir.

Kirby-Bauer disk difüzyon yönteminde ise; agar yüzeyine denenecek olan standart suşun 24 saatlik taze kültüründen Mc Farland bulanıklığına göre yoğunluğu ayarlanmıştır ($1x10^8$ Kob/ml). Daha sonra hazırlanan standart suş kültürü agar yüzeyine eküvyon çubuk yardımı ile homojen olarak yayılmıştır. Boş disklere *EcN* kültürü, besiyeri, santrifüj edildikten sonra 10 ve 20 kat yoğunlaştırılmış süpernatantlardan 20'şer µl emdirilerek belli mesafelerde besiyeri yüzeyine yerleştirilmiştir. Daha sonra bir gecelik inkübasyona bırakılarak zon çapı oluşup oluşmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.2.6 ve 3.2.7).



Şekil 3.2.5. *EcN'*nin *Klebsiella pneumoniae* suşuna karşı kuyu agar yöntemi ile antimikrobiyal aktivite görünümleri.



Şekil 3.2.6. *EcN*'nin *Bacillus cereus* suşuna karşı kuyu agar yöntemi ile antimikrobiyal aktivite görünümleri.

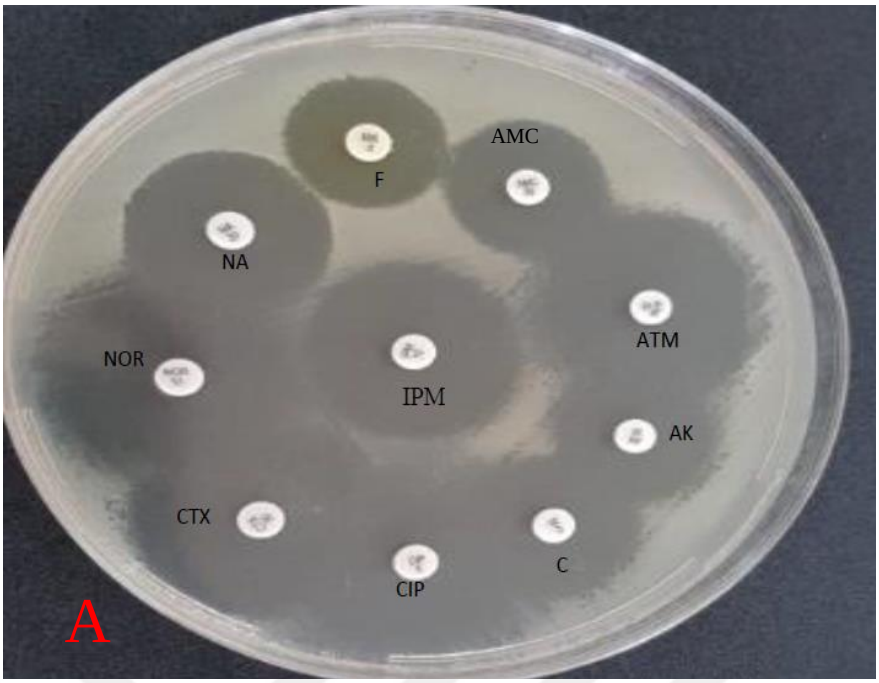
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Escherichia coli Nissle 1917 suşunun antibiyotik duyarlılıklarının sonuçları

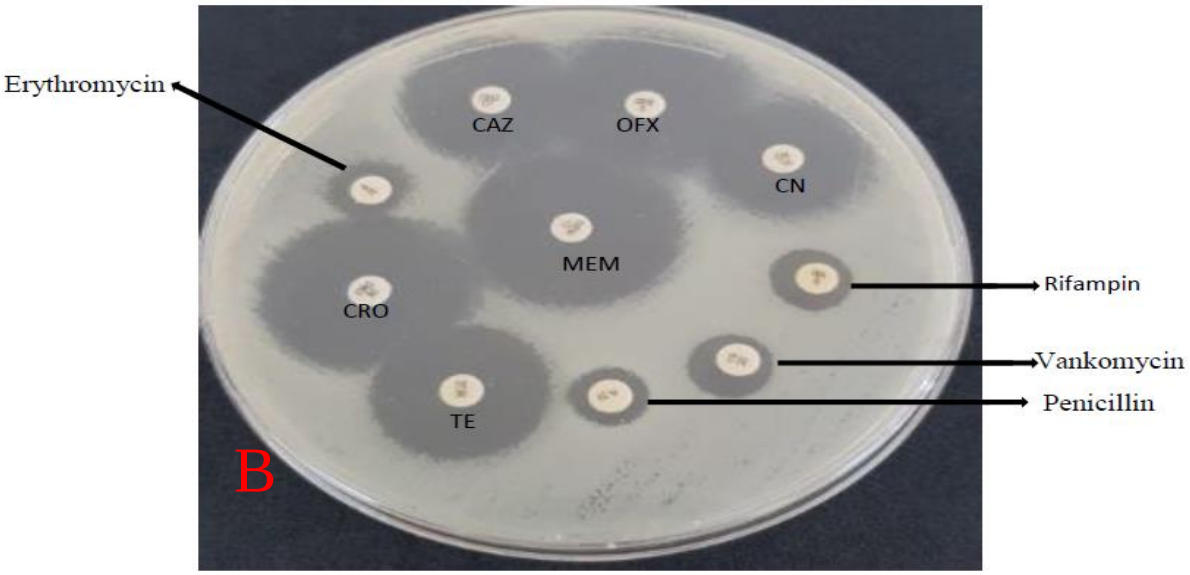
Yaptığımız çalışmada *Escherichia coli* Nissle 1917 suşunun kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlık ve dirençliliğini tespit etmek için disk difüzyon yöntemi (Kirby-Bauer) kullanıldı. İnkübasyondan sonra zon çapları ölçüldü (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *Escherichia coli* Nissle 1917 suşunun kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlılık durumu

Antibiyotikler	Ölçülen zon çapı (mm)	Duyarlılık durumu
CTX	33	**Duyarlı**
AMX	23	**Duyarlı**
ATM	32	**Duyarlı**
CRO	32	**Duyarlı**
CAZ	38	**Duyarlı**
MEM	34	**Duyarlı**
CIP	31	**Duyarlı**
OFX	30	**Duyarlı**
CN	23	**Duyarlı**
TE	25	**Duyarlı**
Ak	24	**Duyarlı**
NA	26	**Duyarlı**
NOR	30	**Duyarlı**
IPM	30	**Duyarlı**
C	25	**Duyarlı**
F	20	**Duyarlı**
E	10	**Dirençli**
P	09	**Dirençli**
VA	12	**Dirençli**
RA	11	**Dirençli**



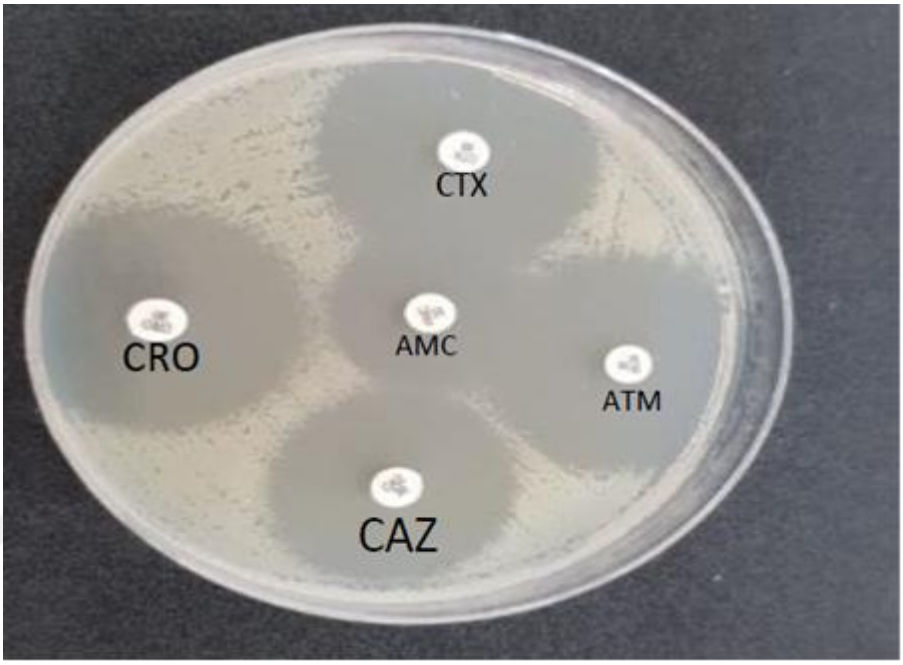
Şekil 4.1.1. Disk difüzyon yöntemi ile incelenen *EcN* Susunun antibiyotiklere duyarlılık ve dirençlilik görünümü



Şekil 4.1.2 Disk difüzyon yöntemi ile incelenen *EcN* suşunun antibiyotiklere duyarlılık ve dirençlilik görünümü

Yaptığımız çalışmada elde edilen bulgulara göre *Escherichia coli* Nissle 1917 suşunun denenen ticari antibiyotiklerden erythromycin (E), penicillin (P), vankomycin (VA) ve rifampin (RA)'ne dirençli olduğu, kullanılan diğer tüm antibiyotiklere ise duyarlı olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.1).

Ayrıca çalışmamızda *Escherichia coli* Nissle 1917 probiyotik suşunun Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz (GSBL) pozitif olup olmadığı çift disk sinerji yöntemiyle çalışılmış olup, çalışılan suşun GSBL negatif olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1.3)

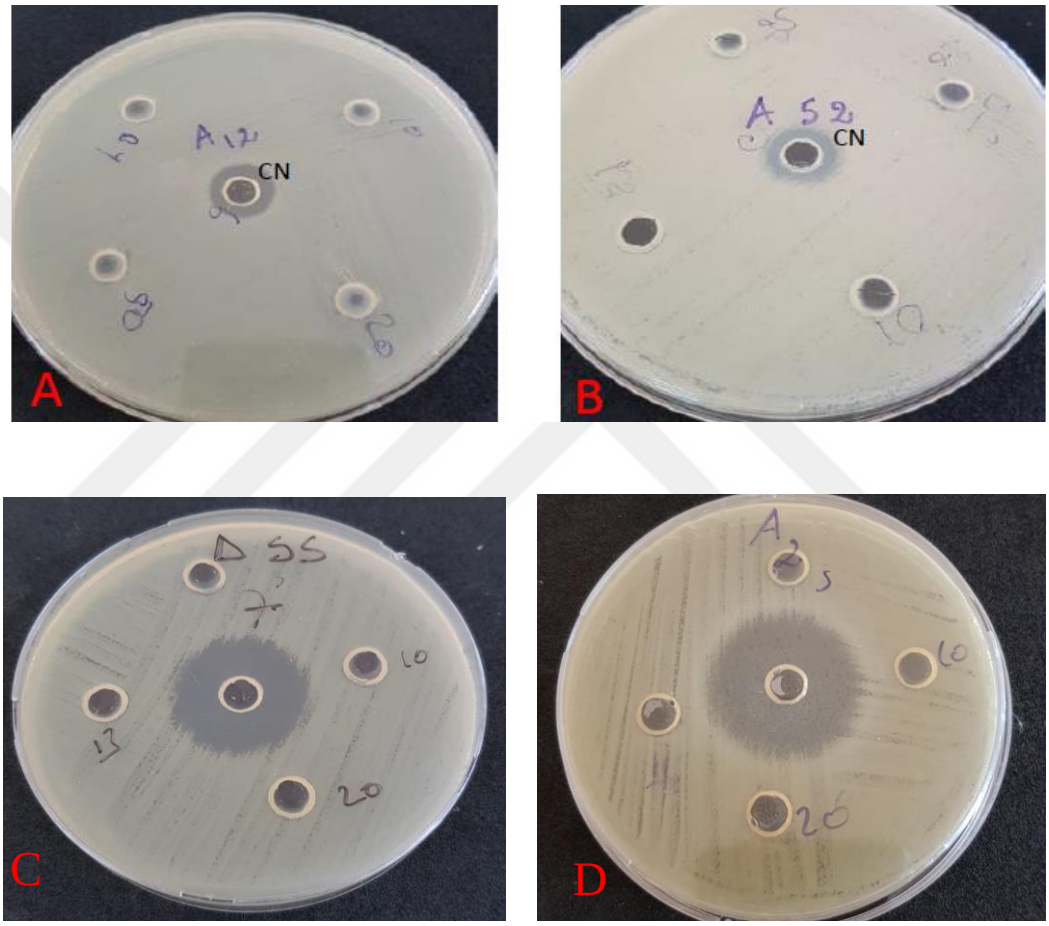


Şekil 4.1.3. Çift Disk Sinerji yöntemi ile incelenen EcN Susunun GSBL negatif durumu

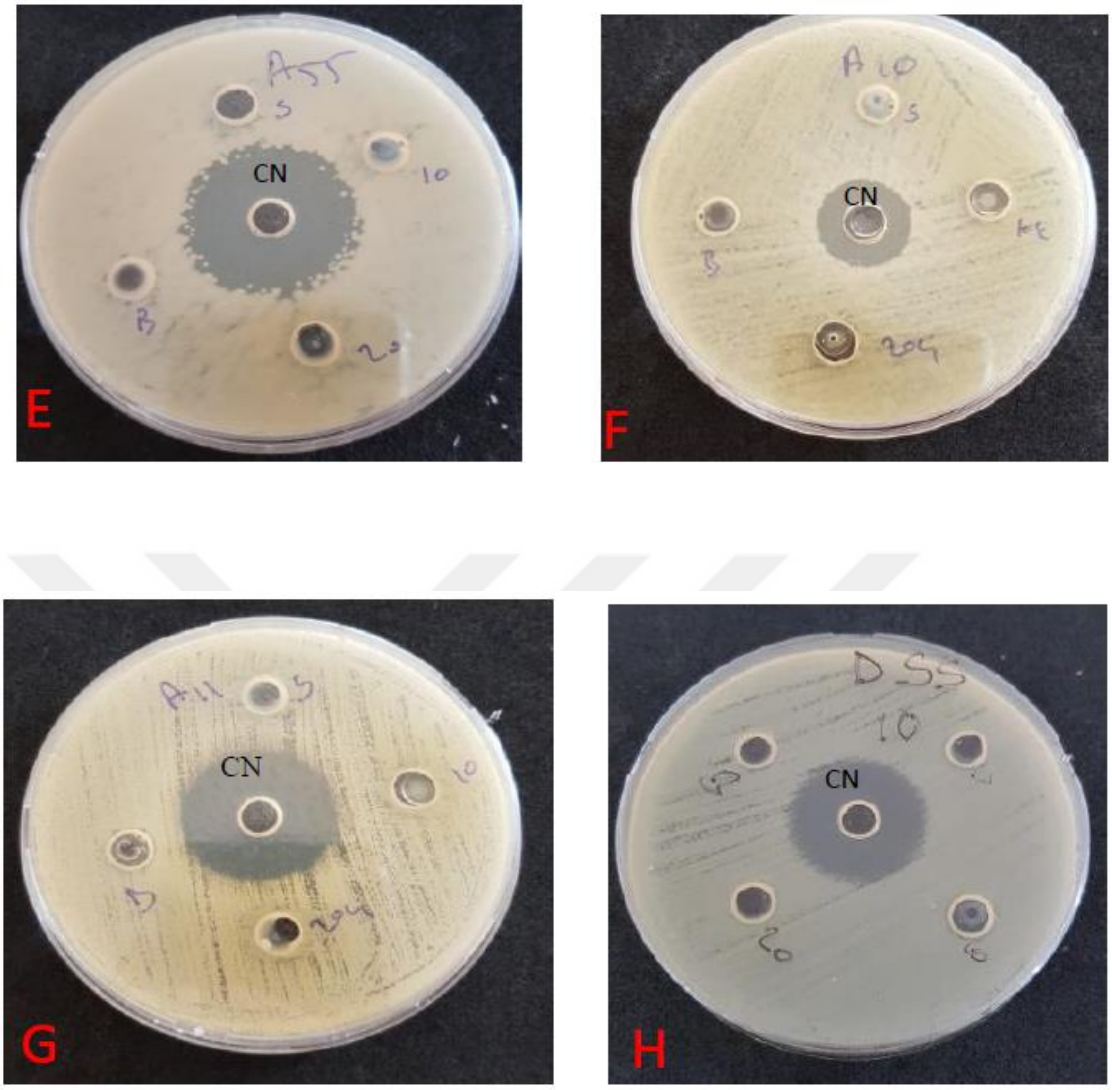
4.2 Escherichia coli Nissle 1917 Probiyotik Suşunun Antimikrobiyal Etkinliliği

Escherichia coli nissle 1917 probiyotik suşunun antimikrobiyal etkinliğini tespit emek için Kuyu Agar ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak 8 standart test suşu *(Candiada albicans ATCC 2655, Escherichia coli ATCC 25922 ,Klebsiella pneumonia ATCC 70603, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ATCC 43300, Salmonella enteritidis ATCC 13076, Baillus cereus ATCC 11778, Sarcina, lutea ATCC 9341)* ve 10 adet Konya'daki çeşitli gıdalar ve kuyu sularından izole edilmiş *Escherichia coli suşları* (DSG6, DSG9, DSG26, DSG30, DSG37 ,DSS5, DSS6 DSS7, DSS8,DSS10) kullanılmıştır.

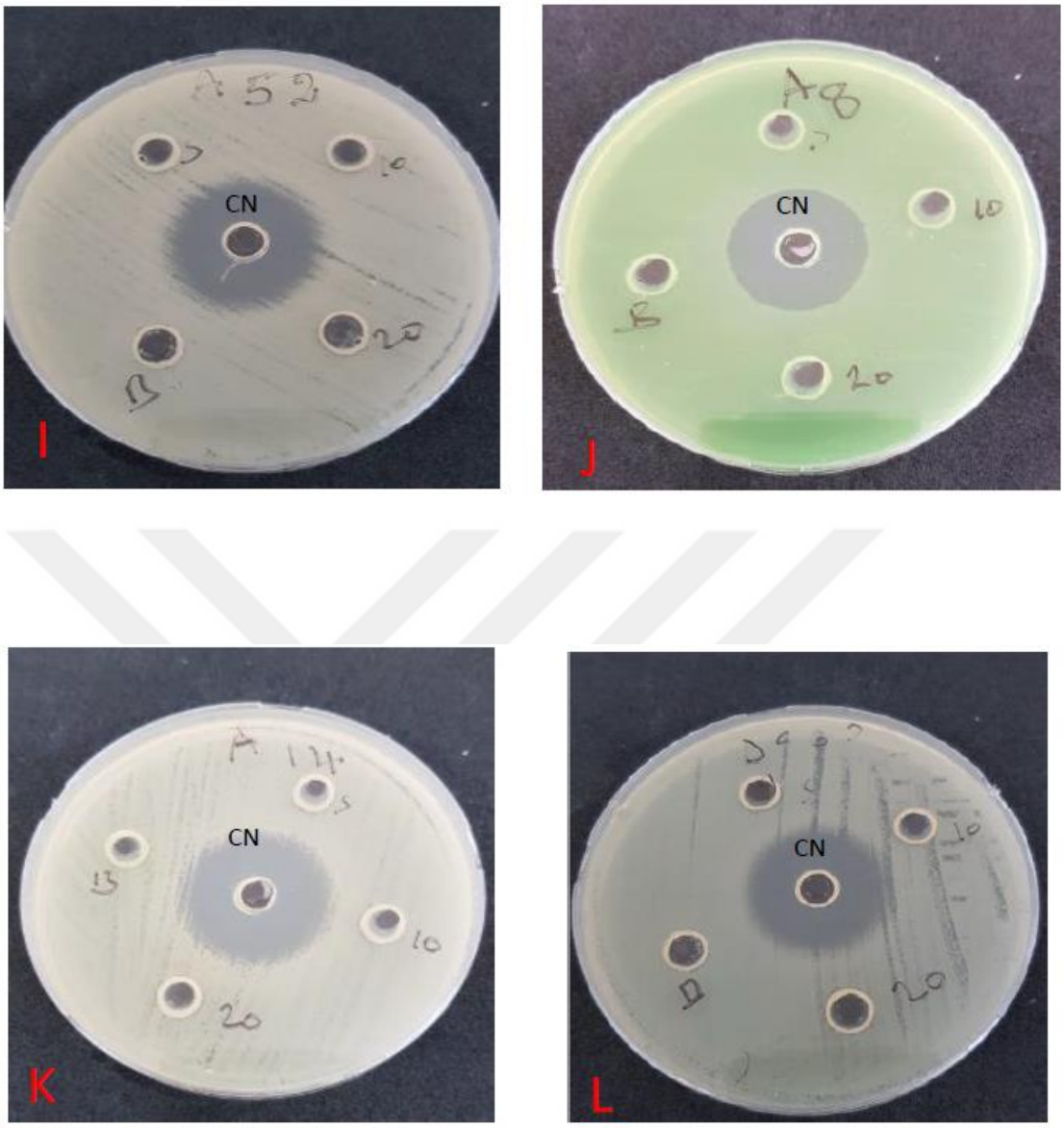
Yapılan tüm denemelerden elde edilen bulgulara göre *Escherichia coli* Nissle 1917 probiyotik suşunun kullanılan standart bakteri suşları ve çeşitli gıdalar ve kuyu sularından elde edilen *Escherichia coli* suşlarına karşı ne Kuyu Agar ne de Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemlerinde herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediği saptanmıştır.



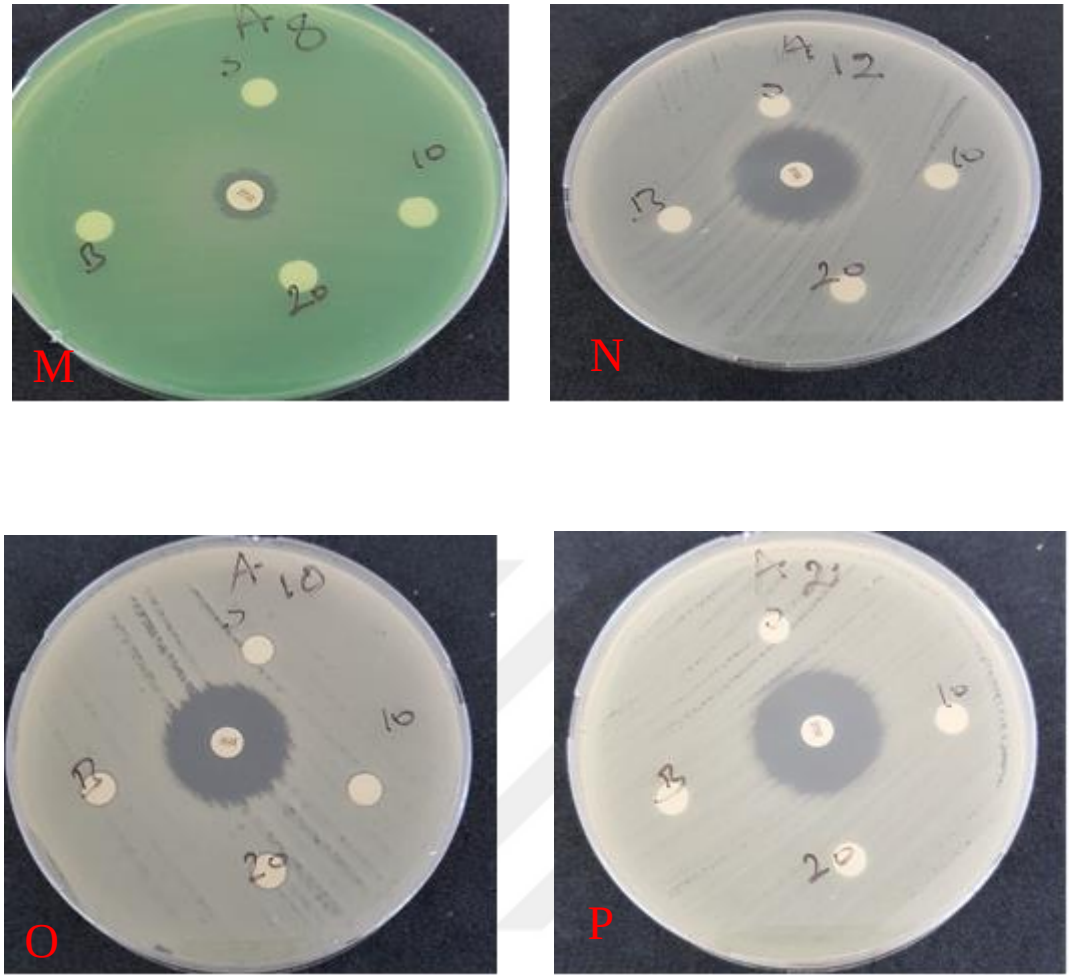
Şekil 4.2.1: 24 saatlik *EcN* probiyotik bakteri suşu kültüründen 10 µl, 20 µl ve 50 µl kullanılarak yapılan denemeye ait bazı plakların görünümü **A:** *Salmonella enteritidis* B: *Candida albicans* C*:* DSS 7 D:*Escherichia coli* 25922. CN: Gentamicin . B: Besiyeri.



Şekil 4.2.2: 72 saatlik *EcN* probiyotik bakteri suşu kültüründen santrifüj yapılarak elde edilen süpernatantın 10 ve 20 kat yoğunlaştırılıp kullanılarak yapılan denemeye ait bazı plakların görümü. E: *Bacillus cereus* F: *Klebsiella peneumoniae* G: Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* H: DSS 10 nolu suş .CN: Gentamicin. B: Besiyeri.



Şekil 4.2.3: 72 saatlik *EcN* probiyotik bakteri suşu kültürünün ultrasonikatörle parçalanıp daha sonra santrifüj edilerek elde edilen süpernatantın 10 kat ve 20 kat yoğunlaştırılarak kullanılan denemeya ait bazı plakların görünümü I: *Bacillus cereus* J: *Pseudomonas aeruginosa* .K: *Sarcina lutea* H: DSS 8 nolu suş CN: Gentamicin. B: Besiyeri.



Şekil 4.2.3. 24 saatlik *EcN* probiyotik bakteri suşu kültüründen santrifüj yapılarak elde edilen süpernatantın 10 ve 20 kat yoğunlaştırılıp disk difüyon yöntemiyle yapılan denemeye ait bazı plakların görümü. M:Pseudomonas aeruginosa N: Salmonella enteritidis O: Klebsiella peneumoniae P: Escherichia coli. CN: Gentamicin. B: Besiyeri.

4.3.Tartışma

Alfred Nissle, aşağı yukarı bir yüzyıl önce, *Escherichia coli'nın* bazı suşlarının çeşitli mide- bağırsak hastalıkları nedeni ile çok acı çeken hastaları iyileştirdiğini keşfetti. O zamandan bu yana , bu suşlardan biri sıklıkla probiyotik *E.coli* olarak araştırmalarda ve insanlardaki çeşitli mide-bağırsak rahatsızlıklarının giderilmesinde kullanılmaktadır. Bu suşun geleceği, günümüzde antibiyotiklere dirençli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisindeki başarısına bağlıdır (Sonnenborn, 2016)

(Tawfiq, 2019) idrar yolu enfeksiyonlarından izole ve identifiye ettikleri toplam 100 *E.coli* suşunun 15 farklı antibiyotiğe karşı direnç durumlarını ve Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) üretimlerini araştırmışlardır.Suşların meropenem'e % 100 oranında duyarlı olduğu , ofloxacin'e ise % 73 oranında dirençli bulundukları, GSBL oranları da (-) ve (+) olarak sırası ile % 51 ve % 49 şeklinde görülmüştür.Uysal ve ark. (2018), idrar yolu enfeksiyonlarından izole ettikleri 97 adet *E.coli* suşunu fenotipik çeşitlilik, 16 antibiyotiğe karşı duyarlılık ve GSBL özelliği yönünden araştırmışlardır. Tüm suşların amikasin ve meropenem'e duyarlı bulunduğu, cefalothin'e ise % 54.6 oranında dirençli oldukları belirtilmiştir. Çalışmamızda *EcN* probiyotik suşunun denenen antibiyotiklerden erythromycin,penicillin, vankomycin ve rifampin'e dirençli olduğu, kullanılan diğer tüm antibiyotiklere ise duyarlı olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.1, Şekil 4.1.2). Suşun GSBL yönünden pozitif olup olmadığı, çift disk sinerji yöntemi ile incelenmiş ve GSBL (-) olduğu görülmüştür (Şekil 4.1.3). *EcN* 'nın Meropenem'e duyarlılık açısından Tawfiq (2019)'nın belirlediği sonuca % 100 oranında benzerlik gösterdiği fakat ofloxacin'e duyarlı olması ile farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Amikacin ve Meropenem'e karşı duyarlılığı, Uysal ve ark. (2018)'ın çalışma sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. GSBL (-) olmaları, beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç mekanizmalarından birine sahip olmamaları anlamına gelmektedir. *EcN'*nın vankomycin'e direnç göstermesi , bu antibiyotiğin gram negatif bakterilerin hedef yapılarına, lipit tabakalarından geçememeleri nedeni ile ortaya çıkmaktadır (Sonnenborn ve Schulze, 2009; Öncül, 2010; Altuntaş ve ark., 2017)'.nın *EcN*'nin antibiyotik direnci olmayan iki gizli plazmide sahip olduğunu (pMUT1, pMUT2), bununla birlikte diğer *E.coli* suşlarının sahip oldukları klindamycin,eritromycin,metronidazol,penicillinG, rifampicin ve vankomycin antibiyotiklerine karşı doğal direnç gösterdiklerini belirtmişlerdir.

(Dezfulian ve ark., 2008; Altuntaş ve ark., 2017)'nın *EcN* sıvı kültüründen elde ettikleri 10 µl süpernatant'ın salmonella spp., Clostridium difficile, Campylobacter spp. ve E.coli K12 H5316' ya karşı inhibisyon etkisini araştırdığını, *E.coli* K12 H5316 üzerinde 13 mm çapında inhibisyon zonunu gözlerken, diğer mikroorganizmalara karşı inhibisyonun belirlenmediğini bildirmişlerdir.Çalışmamızda, *EcN'*nin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacı ile kuyu agar ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemleri kullanılarak 8 adet standart mikroorganizma test suşu ve 10 adet gıda ve su kaynaklı E.coli suşları kullanılmıştır. Elde edilen bulgular, *EcN'*nin antimikrobiyal aktivite göstermediği ve Dezfulian ve ark. (2008)'nın bulguları ile bazı benzerlikler ve farklılar gösterdiği saptamıştır (Şekil 4.2.1). *EcN'*nin en iyi bilinen etki şeklinin, bağırsak patojenlerine karşı antagonistik aktivitesi olduğu, bu aktivitenin de mikrosinler gibi spesifik antimikrobiyal maddelerin üretımından kaynaklı olabileceği fakat EcN'nin mikrosin üretmeyen izogenik mutantının, ebeveyin *EcN* suşu kadar patojenik bakterilere karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Dezfulian ve ark., 2008).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Yaptığımız çalışmada "Mutaflor" isimli probiyotik ilaçdan *EcN* bakteri suşu izole edilmiştir. Bu suşun antibiyotiklere duyarlılık durumu ve bazı patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etkinlikleri incelenmiştir. Duyarlık durumunu 20 farklı antibiyotik kullanılarak (Meropenem, Aztreonam, Ciprofloxacin, Ofloxacin, Gentamicin. Amoxicillin kalvulanik acid, Ceftazidime, Ceftriaxon, Cefotaxime, Amikacin, Nalidixic acid, Norfloxacin, Chloramphenicol, Nitrofurantoin, Vankomycin, Tetracycline, Rifampin, Penicillin, Erythromycin. Imipenem) Disk Difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Oluşan zon çapları ayrı ayrı ölçülmüş ve sonuçlar Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) yöntemine göre değerlendirilmiştir. Yaptığımız çalışmada elde edilen bulgulara göre *Escherichia coli* Nissle 1917 suşunun denenen ticari antibiyotiklerden erythromycin (E), penicillin (P), vankomycin (VA) ve rifampin

(RA)'ne dirençli olduğu, kullanılan diğer tüm antibiyotiklere ise duyarlı olduğu saptanmıştır

*EcN'*nin antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi için Kuyu Agar Difüzyon ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle; *Candiada albicans* ATCC 2655, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 70603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Sarcina lutea* ATCC 9341 nolu standart mikroorganizma suşları ve DSG6, DSG9, DSG26, DSG30, DSG37 nolu çeşitli gıda ve DSS5, DSS6, DSS7, DSS8 ve DSS10 nolu kuyu sularından izole edilmiş *E. coli* suşları çalışılmıştır. Yapılan tüm denemelerde her iki yöntemde de *EcN* suşunun kullanılan mikroorganizmalara karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediği sonucuna varılmıştır.

5.2 Öneriler

Escherichia coli bakteri türü, insanlar ve sıcak kanlı hayvanların mide-bağırsak sistemlerinde normal mikrobiyal flora elemanı olarak yer almaktadırlar. Sulara ve gıdalara bulaşmaları, bu ortamların patojen ve potansiyel patojenler açısından çok önemli sağlık problemlerine neden olabilecekleri için, fekal kirlenme indikatörü olarak kabul edilirler.*EcN* suşu ise patojen olmayan ve taşıdığı özellikler nedeni ile probiyotik bir bakteri suşu olarak kabul edilmektedir. Günümüzde bu *EcN* probiyotik suşu, insanların ve hayvanların mide - bağırsak sistemlerinde fonksiyon bozukluğuna neden olan birçok hatalığın tedavisinde antibiyotiklere alternatif olarak kullanılmaktadır (Altuntaş ve ark., 2017).

EcN'nin patojen bakterilere karşı invitro ve invivo etkinliği çeşitli araştırıcılar tarafından detaylı olarak incelenmiştir. Bu probiyotik suşun etkinliği colisin, mikrosin ve benzeri antimikrobiyal maddelerle sağlanmasının yanısıra, başka diğer çeşitli mekanizmalarla da sağlandığı görüşü ağırlık kazanmıştır. Bu nedenle, invitro çalışmalarda mikrosin aktivitesinin negatif olması, suşun invivo ortamda da etkisiz olabileceği anlamına gelmemelidir.

*EcN'n*in bağırsaklardaki epitel hücrelerine güçlü bağlanması, yayılmacı özellikteki patojen bakterilerin bağlanmasını engelleyebildiği belirtilmiştir. *EcN'*nin bağırsak epitel hücrelerine bağlanması sonucunda, patojen olmayan bakterilerin in-vivo ortamda biyofilm oluşturarak, patojen mikroorganizmaların epitel hücre yüzeylerine erişimlerinin engellendiği ileri sürülmüştür (Dezfulian ve ark., 2008).

EcN, mide bağırsak hastalıklarının önlenmesi ve tedavisi amacı ile başta Almanya olmak üzere diğer Avrupa birliği ülkeleri ile diğer birçok ülkede , akut ve kronik hastalık dönemlerinde, antibiyotiklere alternatif olarak Mutaflor® adı ile kullanılmaktadır. *EcN'*nın bazı antibiyotiklere karşı doğal dirençli olarak belirlenmesi, mide-bağırsak sistemindeki duyarlı bazı bakteri suşlarına bu direnci aktarma olasılığı oldukça düşük olarak değerlendirilmiştir. Enfeksiyon hastalıklarının etkeni olan çeşitli mikroorganizmaların, tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklere karşı yüksek oranlarda direnç göstermeleri, insan ve hayvan sağlığı açısından yakın gelecekte çok büyük bir tehlikeye işaret etmektedir. Bu tehlikeye karşı probiyotiklerin alternatif olabilme potansiyelleri sıklıkla gündeme getirilmektedir.

Çalışmamız sonucunda ve güncel literatürler ışığında, *EcN*'nin ülkemizde de güvenle kullanılabileceği, çeşitli ortamlardan patojen olmayan *E.coli*'nin alt tiplerinin izole ve identifiye edildikten sonra, DNA dizi analizleri ile mevcut olan probiyotik özellikteki *E.coli* suşlarından bazı fenotipik ve genotipik farklılıklarının ortaya çıkarılabileceği, bu suşların patentlerinin alınarak ilaç fabrikalarında probiyotik preparat olarak üretilmesi sonucunda önemli ekonomik kazanımlara kapı aralayabileceği inancındayız.

KAYNAKLAR

Ali, S. H., Al-Jobori, K. M. ve Al-Mossawei, M. T., 2017, Impact of probiotic strain of the non-pathogenic Escherichia coli "Nissle1917" on gene expression of shiga toxin E. coli O157:H7 In vitro and In vivo, *Bioscience Research*, 14 (4), 1064-1073.

Altuntaş, S., Korukluoğlu, M. ve Altuntaş, V., 2017, Probiotic Escherichia coli Strain Nissle 1917, *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, 23 (7), 933-940.

Alzahrani, A. M. ve Gherbawy, Y. A., 2011, Antibiotic resistance in Escherichia coli strains isolated from water springs in Al-Ahsa Region, 5 (2), 123-130.

Baştürk, S., 2005, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa ve Acinetobacter baumannii suşlarında çeşitli kinolon grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarının araştırılması.

Blum-Oehler, G., Oswald, S., Eiteljörge, K., Sonnenborn, U., Schulze, J., Kruis, W. ve Hacker, 2003, Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 in fecal samples, 154 (1), 59-66.

Boudeau, J., Glasser, A. L., Julien, S., Colombel, J. F. ve Darfeuille-Michaud, A., 2003, Inhibitory effect of probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent–invasive E. coli strains isolated from patients with Crohn's disease, 18 (1), 45-56.

Bury, S., Soundararajan, M., Bharti, R., von Bunau, R. ve Forstner, 2018, The Probiotic Escherichia coli Strain Nissle 1917 Combats Lambdoid Bacteriophages stx and lambda, *Front Microbiol*, 9, 929.

CLSI, 2008, Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları onsekizinci bilgi eki, *Antimikrobik*, 28, 1.

Çetin, E. S., Kaya, S., Pakbaş, İ. ve Demirci, M., 2007, Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları.

Demirpek, U., 2012, Antimikrobiyal duyarlılık testleri, http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf, 49.

Denou, E., Rezzonico, E., Panoff, J.-M., Arigoni, F. ve Brüssow, H., 2009, A Mesocosm of Lactobacillus johnsonii, Bifidobacterium longum, and Escherichia coli in the Mouse Gut, 28 (8), 413-422.

Deriu, E., Liu, J. Z., Pezeshki, M., Edwards, R. A., Ochoa, R. J., Contreras, H., Libby, S. J., Fang, F. C. ve Raffatellu, M., 2013, Probiotic bacteria reduce salmonella typhimurium intestinal colonization by competing for iron, 14 (1), 26-37.

Dezfulian, A., Ardekani, A., Aslani, M. M., Dabiri, H. ve Zali, M. R., 2008, Influence of the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 on the growth of different pathogenic bacteria isolated from patients with diarrhea, 1 (3), 113-117.

Dezfulian, A., zadeh Ardekani, A. M., Aslani, M. M., Dabiri, H. ve Zali, M. R., 2009, Influence of the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 on the growth of different pathogenic bacteria isolated from patients with diarrhea, 1 (3).

Duman, M. ve Çağlar, A., 2017, Antibiyotiğe bağlı ishallerde probiyotiğin önemi, 7 (1), 1-7.

Düğenci, S. T., 2014, Bazı Gram Negatif Bakterilerin Bakteriyosin Üretimlerinin Araştırılması.

Elif, S., demir, ve Güzel, Ç. B., 2018, İnsan bağırsak mikrobiyotasinve önemi *Türk Farmakope Dergisi 2018*, 73-97.

Fidan, U. ve Süzme, N. Ö., 2016, Escherichia Coli Bakterisinin Antibiyotik Duyarlılığının Görüntü İşleme Teknikleriyle Belirlenmesi, 16 (1), 186-191.

Gillor, O., Kirkup, B. C. ve Riley, M., 2004, Colicins and microcins: the next generation antimicrobials, 54 (18), 129-146.

Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J. ve Dobrindt, U., 2004, Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917, 186 (16), 5432-5441.

Harakeh, S., Yassine, H. ve El-Fadel, M., 2006, Antimicrobial-resistant patterns of Escherichia coli and Salmonella strains in the aquatic Lebanese environments, 143 (2), 269-277.

Henker, J., Laass, M. W., Blokhin, B. M., Maydannik, V. G., Bolbot, Y. K., Elze, M., Wolff, C., Schreiner, A. ve Schulze, J., 2008, Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 versus placebo for treating diarrhea of greater than 4 days duration in infants and toddlers, 27 (6), 494-499.

İnanç, N., Şahin, H. ve Çiçek, B., 2005, Probiyotik ve prebiyotiklerin sağlık üzerine etkileri.

Jacobi, C. A. ve Malfertheiner, P., 2011, Escherichia coli Nissle 1917 (Mutaflor): new insights into an old probiotic bacterium, 29 (6), 600-607.

Kamada, N., Maeda, K., Inoue, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Hong, K. S., Yamada, T., Watanabe, N., Tsuchimoto, K. ve Ogata, 2008, Nonpathogenic Escherichia coli strain Nissle 1917 inhibits signal transduction in intestinal epithelial cells, 76 (1), 214-220.

Kıvanç, M. ve Erikçi, Ş. Y., 2018, Sofralık Fermente Zeytinlerden (Olea europaea L.) İzole edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin ve Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi, *Anadolu University Journal of Science and Technology C- Life Sciences and Biotechnology*, 7 (1), 41-51.

Kostakioti, M. ve Stathopoulos, 2004, Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic Escherichia coli strain, 72 (10), 5548-5554.

Losurdo, G., Iannone, A., Contaldo, A., Ierardi, E., Di Leo, A. ve Principi, M., 2015, Escherichia coli nissle 1917 in ulcerative colitis treatment: systematic review and meta-analysis, 24 (4), 499-505.

Mohsin, M., Guenther, S., Schierack, P., Tedin, K. ve Wieler, L. H., 2015, Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 reduces growth, Shiga toxin expression, release and thus cytotoxicity of enterohemorrhagic Escherichia coli, *Int J Med Microbiol*, 305 (1), 20-26.

Murinda, S. E., Roberts, R. F. ve Wilson, R. A., 1996, Evaluation of colicins for inhibitory activity against diarrheagenic Escherichia coli strains, including serotype O157: H7, 62 (9), 3196-3202.

Nami, Y., Haghshenas, B., Abdullah, N., Barzegari, A., Radiah, D. ve Rosli, 2015, Probiotics or antibiotics: future challenges in medicine, 64 (2), 137-146.

Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U. ve Oswald, E., 2006, Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells, 313 (5788), 848-851.

Olier, M., Marcq, I., Salvador-Cartier, C., Secher, T., Dobrindt, U., Boury, M., Bacquié, V., Penary, M. ve Gaultier, 2012, Genotoxicity of Escherichia coli Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity, 3 (6), 501-509.

Ozden, A., 2008, İnflamatuvar Barsak Hastalığında Probiyotiklerin Yeri, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Ankara*, 12 (2), 124.

Ozgumus, O. B., Celik-Sevim, E., Alpay-Karaoglu, S., Sandalli, C. ve Sevim, A., 2007, Molecular characterization of antibiotic resistant Escherichia coli strains isolated from tap and spring waters in a coastal region in Turkey, 45 (5), 379-387.

Öncül, O., 2010, Vankomisin ve Teikoplanin Hikayesi, *ANKEM Dergisi*, 24 (2), 101-109.

Özbek, B., 1993, Probiyotikler: Biyolojik Terapi Probiotics: Biological Therapy.

Roland, K. L., Kong, Q., Jiang, Y., Curtiss, R., III ve Wolf, A., 2014, Multiple effects of Escherichia coli Nissle 1917 on growth, biofilm formation, and inflammation cytokines profile of Clostridium perfringens type A strain CP4, *Pathogens and Disease*, 70 (3), 390-400.

Rund, S. A., Rohde, H., Sonnenborn, U. ve Oelschlaeger, T. A., 2013, Antagonistic effects of probiotic Escherichia coli Nissle 1917 on EHEC strains of serotype O104: H4 and O157: H7, 303 (1), 1-8.

Sablé, S., Duarte, M., Bravo, D., Lanneluc, I., Pons, A., Cottenceau, G. ve Moreno, 2003, Wild-type Escherichia coli producing microcins B17, D93, J25, and L; cloning of genes for microcin L production and immunity, 49 (5), 357-361.

Scaldaferri, F., 2016, Role and mechanisms of action of Escherichia coli Nissle 1917 in the maintenance of remission in ulcerative colitis patients: an update, 22 (24), 5505.

Schultz, M. ve Burton, J. P., 2017, Escherichia coli Nissle 1917, In: The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology, Eds, p. 59-69.

Schulze, J., Lorenz, A. ve Mandel, L., 1992, Colonisation of Escherichia coli in different gnotobiotic animal models, 5, 4-5.

Sonnenborn, U., Janosch, D., Dubbert, S., Stroff, T. ve Schulze, 2009, P320-Antimutagenic activity of the probiotic E. coli strain Nissle 1917, 1 (3), S136.

Sonnenborn, U. ve Schulze, J., 2009, The non-pathogenic Escherichia coli strain Nissle 1917 – features of a versatile probiotic, *Microbial Ecology in Health and Disease*, 21 (3-4), 122-158.

Sonnenborn, U., 2016, Escherichia coli strain Nissle 1917-from bench to bedside and back: history of a special Escherichia coli strain with probiotic properties, *FEMS Microbiol Lett*, 363 (19).

Tannock, G. W., Tiong, S., Priest, P., Munro, K., Taylor, C., Richardson, A. ve Schultz, M., 2011, Testing probiotic strain Escherichia coli Nissle 1917 (Mutaflor) for its ability to reduce carriage of multidrug-resistant E. coli by elderly residents in long-term care facilities, 60 (3), 366-370.

Tawfıq, M., 2019, Üriner Sistem Kaynaklı Escherıchıa Colı Suşlarının Antibiyotik Dirençlilikleri Ve Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üretimlerinin Araştırılması, Yüksek lisans tezi, *Selcuk*, Konya.

Uymaz, B., 2010, Probiyotikler ve Kullanım Alanları, 16 (1).

Uysal, A., Gunes, E., Arslan, E. ve Durak, Y., 2018, Characterızatıon Of Uropathogenıc Escherıchıa Colı Straıns: Antıbıotıc Resıstance Patterns, Detectıon Of Esbl Genes And Interactıons By Lytıc Phages

27 (1), 402-414.

Von Buenau, R., Jaekel, L., Schubotz, E., Schwarz, S., Stroff, T. ve Krueger, M., 2005, Escherichia coli strain Nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhea, 88 (1), 317-323.

Wang, H., Jatmiko, Y. D., Bastian, S. E., Mashtoub, S., Howarth, G. S. ve cancer, 2017, Effects of supernatants from Escherichia coli Nissle 1917 and Faecalibacterium prausnitzii on intestinal epithelial cells and a rat model of 5-fluorouracil-induced mucositis, 69 (2), 307-318.

Winn, W. C., 2006, Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, Lippincott williams & wilkins, p.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	:	Youssoufa POUENDİGOUONGOUO
Uyruğu	:	KAMERUN
Doğum Yeri ve Tarihi	:	31/03/1994 Foumban
Telefon	:	05346954789
Faks	:	
e-mail	:	youssouf2013fadil@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: FOUMBAN OUEST	2011
Üniversite	: UNİVERSİTY OF NGAOUNDERE	2014
Yüksek Lisans	: SELÇUK ÜNİVERSİTESİ	2020
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER : FRANSIZCA

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR