

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI



PROBİYOTİKLERİN BAZI ÖNEMLİ İNSAN PATOJENLERİNE KARŞI ANTİVİRÜLAN ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif YAPRAK

Danışman

Prof. Dr. Nizami DURAN

HATAY-2019

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**PROBİYOTİKLERİN BAZI ÖNEMLİ İNSAN PATOJENLERİNE KARŞI
ANTİVİRÜLAN ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elif YAPRAK

Danışman

Prof. Dr. Nizami DURAN

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
18YL085 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY-2019

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**PROBİYOTİKLERİN BAZI ÖNEMLİ İNSAN PATOJENLERİNE KARŞI
ANTİVİRÜLAN ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

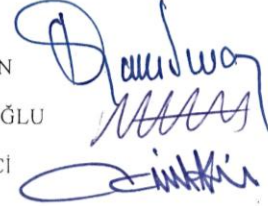
Elif YAPRAK

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 30 /12 / 2019 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri Başkanı: Prof. Dr. Nizami DURAN

Üye : Doç.Dr. Meral MİRALOĞLU

Üye : Doç.Dr. Cemil KÜREKÇİ



Bu tez, Enstitümüz Mikrobiyoloji (Tıp) Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

30/12/2019

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimim bütün aşamalarında ilgisini esirgmeden tecrübeleriyle bana destek olan, tez konumum belirlenmesi, araştırma çalışmaları ve yazım aşamasında özenle davranıp bilgisini ve anlayışını benden esirgmeden en büyük göstergesi olan bilimsel çalışmalarıyla bana yol gösterici olan çok kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nizami DURAN' a,

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. Burçin ÖZER' e, Sayın Prof.Dr.Özkan ARSLANTAŞ' a ve Sayın Doç.Dr.Cemil KÜREKÇİ' ye,

Eğitimim süresince yaşadığım zorluklarda her türlü yardım ve fedakarlığı göstererek bana destek olan aynı zamanda tez çalışmalarım da emeği geçen değerli arkadaşlarım Sayın Emine HAMŞUOĞLU' na, Sayın Emrah AY' a, Sayın Sibel DAĞLI' ya, Sayın Funda ÇİMEN AÇIKGÜL' e ve Sayın Mücella BAYIRLI' ya,

Tez sürecimde bana yardımcı olan Sayın Dr. Ali ATEŞ' e, Sayın İpek YILMAZ olmak üzere tüm mikrobiyoloji asistanları, doktora ve yüksek lisans eğitimi alan arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında olduğu kadar eğitimim konusunda da aynı özenle davranıp beni bugüne kadar yetiştiren, zorlu günlerimde bana sonsuz anlayış ve sabır göstererek desteğiyle, sevgisiyle bana güç kaynağı olan canım babam Osman YAPRAK' a, canım annem Filiz YAPRAK' a ve canımın iki diğer yarısı kardeşlerim Dr. Mustafa YAPRAK ve Dr. Murat YAPRAK' a,

Üzerimde çok büyük emekleri olan sevgili anneannem Menevşe DENİZ, sevgili dedem Osman DENİZ, sevgili babaannem (merhum) Dudu YAPRAK' a,

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Probiyotik Mikroorganizmaların Tanımı ve Tarihçesi.....	6
2.2. Probiyotik Mikroorganizmalar ve Özellikleri	7
2.2.1. Lactobacillus cinsi Probiyotik Mikroorganizmalar	9
2.2.2. Diğer Probiyotik Mikroorganizmalar	11
2.3. Probiyotiklerin Mikroorganizmaların Biyoaktif Metabolitleri (Postbiyotikler).....	13
2.4. Probiyotik Mikroorganizmaların Etki Mekanizması.....	14
2.5. Probiyotiklerin Konak Sağlığı Üzerindeki Etkileri	16
2.5.1. Patojenlerle rekabet.....	16
2.5.2. pH' ı Düşürme Kapasitesi	17
2.5.3. Bakteriyosin Üretimi.....	18
2.5.4. Hidrojen Peroksit Üretimi	19
2.5.5. Adezyon Bölgesinde Patojenlerle Rekabet	19
2.5.6. Bağışıklığın Uyarılması	19
2.6. Probiyotik Gıda Kaynakları	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Araç ve Gereçler	22
3.2. Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri.....	23
3.2.1. MRS Agar	24
3.2.2. Kanlı Agar.....	24
3.2.3. Eosin Metilen-Blue Agar	24
3.2.4. Müeller Hinton Agar	24
3.2.5. Triptik Soy Broth (Saklama Besiyeri).....	25

3.2.6. Fosfat Buffer Tamponu (PBS)	25
3.3. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar	25
3.3.1. Probiyotik Mikroorganizmalar	26
3.3.2. Biyoaktif Metabolitlerin Eldesi	27
3.3.3. Patojen Mikroorganizmalar	28
3.3.4. Patojen Örneklerin Toplanması ve Kültivasyon	28
3.4. Hücre Kültür Çalışmaları	30
3.4.1. RPMI-1640 Besiyeri	30
3.4.2. Versen-Tripsin Hazırlanması	30
3.4.3. PBS hazırlanması	30
3.4.4. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Tayini	31
3.4.5. Hücre Sayımı	31
3.4.6. Hücre Kültürü	31
3.4.7. Hücre Pasajları	32
3.4.8. Dondurma Solüsyonlarının Hazırlanması ve Hücrelerin Dondurulması	33
3.4.9. Biyoaktif Metabolit Dozunun Belirlenmesi	33
3.4.10. MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] Yöntemi	34
3.5. Biyofilm Testleri	35
3.6. Virus ve Hücre Hattı	35
3.6.1. Standard İlaçlar	36
3.6.2. Aktivite Çalışmaları	36
3.6.3. Virus Titrasyonu	37
3.7. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ	74
6.1. Sonuçlar	74
6.2. Öneriler	76
7. KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Probiyotik Mikroorganizmalar	27
Şekil 3.2. Patojen Mikroorganizmalar	29
Şekil 4.1. <i>L. casei</i> ' nin biyoaktif metabolitlerinin <i>S. aureus</i> üremesi üzerindeki etkisi.	39
Şekil 4.2. <i>L. bulgaricus</i> ' un biyoaktif metabolitlerinin <i>S.aureus</i> üremesi üzerindeki etkisi.	40
Şekil 4.3. <i>E. faecium</i> ' un biyoaktif metabolitlerinin <i>S.aureus</i> üremesi üzerindeki etkisi.	41
Şekil 4.4. <i>S. thermophilus</i> ' un biyoaktif metabolitlerinin <i>S. aureus</i> üremesi üzerindeki etkisi.	42
Şekil 4.5. <i>L. casei</i> ' nin biyoaktif metabolitlerinin <i>E. coli</i> üremesi üzerindeki etkisi.	43
Şekil 4.6. <i>L. bulgaricus</i> ' un biyoaktif metabolitlerinin <i>E. coli</i> üremesi üzerindeki etkisi.	44
Şekil 4.7. <i>E. faecium</i> ' un biyoaktif metabolitlerinin <i>E. coli</i> üremesi üzerindeki etkisi.	45
Şekil 4.8. <i>S. thermophilus</i> ' un biyoaktif metabolitlerinin <i>E. coli</i> üremesi üzerindeki etkisi.	46
Şekil 4.9. <i>L. casei</i> ' nin biyoaktif metabolitlerinin <i>P. aeruginosa</i> üremesi üzerindeki etkisi.	47
Şekil 4.10. <i>L. bulgaricus</i> ' un biyoaktif metabolitlerinin <i>P. aeruginosa</i> üremesi üzerindeki etkisi.	48
Şekil 4.11. <i>E. faecium</i> ' un biyoaktif metabolitlerinin <i>P. aeruginosa</i> üremesi üzerindeki etkisi.	49
Şekil 4.12. <i>S. thermophilus</i> ' un biyoaktif metabolitlerinin <i>P. aeruginosa</i> üremesi üzerindeki etkisi.	50
Şekil 4.13. <i>L. casei</i> ' nin biyoaktif metabolitlerinin <i>P. mirabilis</i> üremesi üzerindeki etkisi.	51
Şekil 4.14. <i>L. bulgaricus</i> ' un biyoaktif metabolitlerinin <i>P. mirabilis</i> üremesi üzerindeki etkisi.	52
Şekil 4.15. <i>E. faecium</i> ' un biyoaktif metabolitlerinin <i>P. mirabilis</i> üremesi üzerindeki etkisi.	53
Şekil 4.16. <i>S. thermophilus</i> ' un biyoaktif metabolitlerinin <i>P. mirabilis</i> üremesi üzerindeki etkisi.	54
Şekil 4.17. <i>L. casei</i> ' nin Vero hücre hattı üzerinde non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.	55
Şekil 4.18. <i>L. bulgaricus</i> ' un Vero hücre hattı üzerinde non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.	56
Şekil 4.19. <i>E. faecium</i> ' un Vero hücre hattı üzerinde non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.	57
Şekil 4.20. <i>S. thermophilus</i> ' un Vero hücre hattı üzerinde non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.	57
Şekil 4.21. Probiyotik mikroorganizmaların H1N1' in üç farklı enfektif dozuna karşı antiviral etkinliğinin Oseltamivir ile kıyaslanması.	58
Şekil 4.22. Probiyotik mikroorganizmaların <i>S. aureus</i> kökenleri üzerinde slime oluşumu üzerine inhibitör etkisi.	59
Şekil 4.23. Probiyotik mikroorganizmaların <i>P. aeruginosa</i> kökenleri üzerinde hareket üzerine inhibitör etkisi. ..	60
Şekil 4.24. Probiyotik mikroorganizmaların <i>E.coli</i> kökenleri üzerinde hareket üzerine inhibitör etkisi.	61
Şekil 4.25. Probiyotik mikroorganizmaların <i>P.mirabilis</i> kökenleri üzerinde hareket üzerine inhibitör etkisi.	62

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
°C	Derece santigrad
CO ₂	: Karbon dioksit
DE	: Dehidrokostuslakton
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FBS	: Fetal Dana Serum
FDA	Gıda ve İlaç Kurumu
IC	: İnhibitör Konsantrasyonu
IU	: International unit
KCl	: Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
mM	: Mikro molar
MTT	: 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür
Na ₂ HPO ₄	: Sodyum hidrojen fosfat
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	: Disodyum hidrojen fosfat dodecahydrate
NaCl	: Sodyum klorür
NaHCO ₃	: Sodyum bikarbonat
NaOH	: Sodyum hidroksit
PBS	: Fosfat Tuz Solüsyonu
µm	: Mikrometre

ÖZET

Probiyotiklerin Bazı Önemli İnsan Patojenlerine Karşı Antivirulan Etkinliklerinin Araştırılması

Probiyotik mikroorganizmalar konak direncinin artırılması ve patojen mikroorganizmalarla mücadelede özellikle son yıllarda üzerinde önemle durulan konular arasında yer almaktadır. Doğal ürünler sağlıklı hücreler üzerinde düşük toksik etkilerinden dolayı son derece yoğun çalışmaların yapıldığı ürünlerdir. Probiyotik mikroorganizmaların gerek enzim ve salgılarıyla ve gerekse de patojenler için oluşturduğu bariyer görevi sebebiyle konak savunmasında önemli görevleri bulunmaktadır. İnsanlarda ciddi hastalıklara yola açan bakteriler arasında *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* ilk akla gelenlerdendir. Bunun yanında viral etkenlerden influenza viruslar da hem kolay ve hızlı yayılımı hem de ciddi morbidite ve mortalite etkenleri arasında sayılması açısından son derece önemli patojen mikroorganizmalardandır. Gerek bu bakteriyel patojenlerin ve gerekse de influenza virusların tedavisinde hala önemli problemler mevcuttur. İlaç direnci ve mevcut ilaçların yetersizlikleri sebebiyle bu mikroorganizma etkenleriyle mücadelede konak savunmasının artırılması ya da yeni aktif molekül arayışları yoğun olarak devam etmektedir. Biz bu çalışmada önemli probiyotik bakteriler arasında yer alan *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Enterococcus faecium* ve *Streptococcus thermophiles* biyoaktif metabolitlerinin *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve influenza virus (H1N1)' ye karşı antimikrobiyal etkisi ile bazı virülans faktörleri üzerindeki (slime ve hareketlilik) araştırmayı amaçladık. Çalışmada probiyotik mikroorganizmaların RPMI-1640 ortamında hazırlanan kültür filtratları kullanıldı. Probiyotik mikroorganizmaların biyoaktif metabolitlerinin sağlıklı hücreler üzerinde non-toksik konsantrasyonları belirlenerek, aktivite çalışmaları bu konsantrasyonlar içerisinde gerçekleştirildi. Bu amaçla Vero hücre hattı kullanıldı. Biyoaktif metabolitlerin sitotoksikite testleri MTT yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmada elde edilen veriler standart ilaçlarla kıyaslamalı olarak değerlendirildi. Biyoaktif metabolitlerin influenza virusa karşı etkinlik çalışmaları IC₅₀ değerleri hesaplanarak değerlendirildi. Çalışmalarda *L. casei*, *L. bulgaricus*, *E. faecium* ve *S. thermophilus* biyoaktif metabolitlerinin *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *P. mirabilis* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinlikleri değerlendirildiğinde en etkili probiyotik mikroorganizmanın *L. casei* olduğu tespit edilmiştir. Probiyotik mikroorganizma biyoaktif metabolitlerinin Oseltamivir ile kıyaslandığında Oseltamivir kadar güçlü etkinlik göstermese de dikkate değer ölçüde viral üremeyi inhibe edici etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Özellikle probiyotik mikroorganizmalar arasından *L. casei*' nin antimikrobiyal etkinliklerinde olduğu gibi antiviral etkiliğinin de oldukça güçlü olduğu tespit edilmiştir. Deneylerde *L. casei* biyoaktif metabolitleri ile muamelesi sonucunda % 41.7' sinde slime üretiminin negatifleştiği tespit edilmiştir. Probiyotik mikroorganizmaların patojen virülans faktörlerinden hareket

üzerindeki etkinliklerin araştırıldığı deneylerde de dört probiyotik mikroorganizmanın da hareket üzerinde etkinliklerinin olduğu, en yüksek etkinliğe sahip probiyotığın ise *L. casei* olduğu tespit edilmiştir. *L. casei* kökenlerin % 25' inin hareket yeteneğini ortadan kaldırdığı görülürken, *L. bulgaricus*, *E. faecium* ve *S. thermophilus*' un ise *P. aeruginosa* kökenlerinin % 8.3' ünün hareket yeteneğini ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir. Önemli insan patojenleri olan *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* ve *E. coli* gibi insanlarda ciddi morbidite ve mortalite sebebi olan mikroorganizmaların infeksiyonlarının tedavisinde veya patojen mikroorganizmaların virulanslılığının azaltılmasında ve patojen mikroorganizmalara karşı konak savunmasında probiyotik mikroorganizmaların (*L. casei*, *L. bulgaricus*, *E. faecium* ve *S. thermophilus*) insan sağlığının iyileştirilmesinde son derece faydalı mikroorganizmalar olduğu tespit edilmiştir. Hem bu tür mikroorganizmaların oluşturduğu infeksiyonların tedavisinde yardımcı preperatlar olarak, hem de konak immunitesinin güçlendirilmesinde bu probiyotik mikroorganizmaları içeren besin takviyelerinin kullanılmalarını önermekteyiz.

Anahtar kelimeler: Probiyotik mikroorganizma, influenza virus, bakteri, biyoaktif metabolit, direnç.

ABSTRACT

Investigation of Antivirulent Activities of Probiotics Against Some Important Human Pathogens

Probiotic microorganisms are among the issues that have been emphasized in increasing host resistance and combating pathogenic microorganisms, especially in recent years. Natural products are very intensive studies due to their low toxic effects on healthy cells. Probiotic microorganisms have important roles in host defense, both by their enzymes and secretions, and by their barrier function for pathogens. Among the bacteria that cause serious diseases in humans, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* are among the first microorganisms that come to mind. In addition, influenza viruses, one of the viral agents, are among the most important pathogenic agents due to their easy and rapid spread as well as serious morbidity and mortality factors. Currently, there are still significant problems in the treatment of both these bacterial pathogens and influenza viruses. Due to drug resistance and insufficiency of existing drugs, increasing host defense or searching for new active molecules in the fight against these microorganism agents continues intensively. The aim of this study was to investigate the bioactive metabolites of bacteria, which are among the important probiotic bacteria, on some virulence factors against *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and influenza virus (H1N1) the presence of effects. In the study, culture filtrates of probiotic microorganisms prepared in RPMI-1640 medium were used. Non-toxic concentrations of bioactive metabolites of probiotic microorganisms on healthy cells were determined. Activity studies were performed within these concentrations. For this purpose, Vero cell line was used. Cytotoxicity tests of bioactive metabolites were performed using MTT method. The data obtained from the study were evaluated in comparison with standard drugs. The data obtained from the study were evaluated in comparison with standard drugs. Efficacy studies of the bioactive metabolites against influenza virus were evaluated by calculating IC₅₀ values. Antimicrobial activity of *L. casei*, *L. bulgaricus*, *E. faecium* and *S. thermophilus* bioactive metabolites against *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *P. mirabilis* isolates were evaluated in the studies. It was found that the most effective probiotic microorganism was *L. casei*. Probiotic microorganism bioactive metabolites, compared with Oseltamivir, showed significant viral inhibition effects, although not as potent as Oseltamivir. Especially among probiotic microorganisms, it has been found that *L. casei* has a very strong antiviral activity as well as antimicrobial activity. In the experiments, it was determined that slime production decreased % 41.7 as a result of the treatment of *S. aureus* strains with *L. casei* bioactive metabolites. In the experiments investigating the activity of probiotic microorganisms on movement from pathogen virulence factors, it was determined that all four probiotic microorganisms had activity on the motility of bacteria. It was found that the probiotic having the highest activity was *L. casei*. The bioactive metabolites of *L. casei* abolished the mobility of *P. aeruginosa* in % 25 of the strains. The bioactive metabolites of *L. bulgaricus*, *E. faecium* and *S. thermophilus* eliminated the mobility of *P. aeruginosa* strains by

% 8.3. Probiotic microorganisms (*L. casei*, *L. bulgaricus*, *E. faecium* and *S. thermophilus*) have been found to be extremely useful microorganisms in improving human health for treatment of infections of microorganisms that cause serious morbidity and mortality in humans such as *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* and *E. coli*, which are important human pathogens, or reduction of virulence of pathogenic microorganisms and host defense against pathogenic microorganisms. We recommend the use of nutritional supplements containing these probiotic microorganisms, both as adjuvants in the treatment of infections caused by such microorganisms, and in strengthening host immunity.

Key words: Probiotic microorganism, influenza virus, bacteria, bioactive metabolite, resistance.



1. GİRİŞ

İnsan gastrointestinal sistemi (GIS) yalnızca sindirim işlevini sağlamamakta, aynı zamanda barsak epitelyal homeostazisine, doğuştan gelen bağışıklığa da katkıda bulunarak karmaşık bir mikroorganizma ekosistemi tarafından kolonize edilmektedir (Markowiak ve Slizewska 2017). Barsak mikroflorası konağı enfeksiyonlara karşı koruduğu ve vücudun homeostazisini sağlaması bakımından oldukça önemlidir (Parolin ve ark. 2015). Son yıllarda barsak mikroflorasının değerinin kavranması, sağlıklı yaşamayı teşvik ve sürdürmek için probiyotik kullanımının önemini arttırmaktadır (Upadhyay ve Moudgal 2012).

Probiyotiklerin kullanımı, düzenli bir diyetin parçası olarak yoğurt, peynir ve fermente gıdalar şeklinde alımı ile binlerce yıl öncesine dayanmaktadır. Bununla birlikte, probiyotiklerin sağlık açısından yararı ilk olarak Rus Nobel ödüllü Elie Metchnikoff tarafından keşfedilmiştir. Canlı mikroorganizmaların enfeksiyonların tedavisi ve önlenmesinde kullanılmasının bilimsel temelini oluşturarak barsak sağlığının ve yaşam süresinin uzamasının laktik asit bakterileri (LAB) içeren ekşi süt tüketimi ile mümkün olabileceğini ileri sürmüştür (Anukam ve Reid 2007).

Günümüzde sık kullanılan probiyotik bakteriler arasında; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobakteriler* ile patojen olmayan *Enterokoklar*, *Streptokoklar*, *Bacillus* ve *Saccharomyces boulardii* gibi mayalar bulunmaktadır (Abatenh ve Gizaw 2018). GIS' e kolonize olan bu mikroorganizmalar, antimikrobiyal madde üretimi, barsak patojenlerinin neden olduğu enfeksiyonları önlenmesi, normal bir immünolojik yanıtın modüle edilmesi ve konağın metabolik aktivitelerini düzenleme gibi çok sayıda önemli işlevlere sahiptir (Maria ve ark. 2013, Markowiak ve Slizewska 2017). Etkileri doz ve uygulama yoluna bağlı olarak değişmektedir. Probiyotikler ile yapılan mikrobiyolojik müdahalelerin belirli hedefleri, vücuttaki mikrobiyal topluluk yapısını, kompozisyonunu ve işlevini dengelemek veya iyileştirmek, yeniden oluşturmak olabilmektedir (Anandharaj ve Sivasankari 2014).

Probiyotik mikroorganizmaların önemli biyoaktif metabolik ürünler salgıladığı da bilinmektedir. Defensinler gibi antimikrobiyal peptitlerin ekspresyonunu indükleyerek mukozal bariyer fonksiyonunu arttırabilmektedirler (Wehkamp ve ark. 2004). Patojenlerin üremesini, bakteriyosinler ve reuterin gibi başka bir antimikrobiyal peptitler sınıfı salgılayarak inhibe etmektedirler (De Vuyst ve ark. 2007, Spinler ve ark. 2008).

Günümüzde hastalıkların ve metabolik bozuklukların tedavisinde veya önlenmesinde insan sağlığını iyileştirici, konak immun sistemini güçlendirici uygulamalar olarak büyük bir potansiyele sahip probiyotik mikroorganizmalar arasında *Laktobasiller* bulunmaktadır. *Lactobacillus* türleri en önemli probiyotiklerdir ve bu mikroorganizmaları içeren süt ürünlerinin tüketimi bu açıdan son derece büyük önem taşımaktadır (Nakayama 2014). LAB' i, barsak mikrobiyotasının bozulması ile ilişkili hastalıklarda profilaktik veya terapötik olarak kullanım potansiyeline sahiptirler (Divyashri ve ark. 2015). Bu etkiyi organik asit üretimi yoluyla asidik bir ortam oluşturarak patojenlerin üremesini inhibe ederek göstermektedirler (Enrica ve Simona 2016). Özellikle, *Lactobacillus* türlerinin influenza dahil çeşitli bulaşıcı hastalıklara karşı etkileri aktif olarak araştırılmıştır (Youn ve ark. 2012).

LAB' i içerisinde 200' den fazla *Lactobacillus* türü bulunmaktadır (Aryana ve Olson 2017). *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* gibi *Lactobacillus* içerisinde en yaygın araştırılan ve uygulanan probiyotik türleridir (Divyashri ve ark. 2015). *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, Gram pozitif bir bakteridir. Laktik asit üreten, yoğurda lezzetini ve dokusal özelliklerini veren bir yoğurt başlangıç kültürüdür (Curry ve ark. 2003) *S. thermophilus* ise laktoz içeren besi ortamlarında üremeye ve laktik asit oluşturmaya son derece uyarlanmış termofilik laktik asit bakterisidir. Bu iki türün süte yüksek düzeyde adaptasyonları ve düşük pH değerlerine dirençleri nedeniyle, yoğurt primer yaşam alanlarını oluşturmaktadır (Delley ve Germont 2002). *L. casei* ise, barsak mikrobiyotasını düzenlemesi, konak immun sistemi güçlendirmesi gibi probiyotik özellikleri yanında antitümöral etkinlik, antiproliferatif ve pro-apoptotik özelliklere sahip olması bakımından en önemli probiyotik mikroorganizmalar arasında bulunmaktadır (Tiptiri-Kourpeti ve ark. 2016).

Enterokok cinsi içinde yer alan *E. faecium* ve *E. faecalis*, insan barsağında bulunan iki baskın probiyotik mikroorganizma türü olarak bildirilmektedir (Bhardwaj ve ark. 2009). Peynir gibi gıda ürünlerinde “starter” kültürler olarak yaygın kullanılmaktadır (Gaggia ve ark. 2010). Probiyotik *Enterococcus* türleri çeşitli gastrointestinal hastalıkların tedavisinde kullanılabilir. *E. faecium*' un oral yoldan verilmesi barsak mikroflorasını etkilemekte ve bağışıklık fonksiyonlarını modüle etmektedir (Sun ve ark. 2010, Chen ve ark. 2014).

Son yıllarda probiyotik mikroorganizmaların özellikle infeksiyöz hastalık etkinliklerine karşı araştırıldığı çalışmalara sık rastlanmaktadır. Çoğu infeksiyon etkenine karşı kullanılan antibiyotik ve antivirallere karşı gelişen direnç ve sınırlı etkinlik doğal ürünler üzerinde yeni aktif bileşen arayışlarını da beraberinde getirmektedir. İnsanlarda bakteriyel infeksiyonlarda direnç oldukça önemlidir. Özellikle ciddi nozokomiyel etkenler arasında gösterilen *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *P. mirabilis* ve *E. coli* mevcut antimikrobiyellere karşı kolayca dirençli hale gelebilmektedir. Bu sebeple bu tip mikroorganizmalarla antibiyotiksiz mücadele yollarının aranması veya bulunması büyük önem taşımaktadır. Yine aşısı ve antiviral ilaç mevcudiyetine rağmen influenza viruslarda da düşük aşı başarısı ve ilaç etkinliği sebebiyle influenza virus infeksiyonları oldukça ciddi bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir.

Gram pozitif mikroorganizmalar arasında bulunan önemli patojen bakterilerden biri olan *S. aureus* insanlarda önemli infeksiyon etkenlerindendir. İnsan nüfusunun yaklaşık %30'u bu patojen ile kolonizedir. Özellikle insanların burun deliklerinin ön kısmına kolonizasyon yapımlarıyla karakteristiktirler (Wertheim ve ark. 2005). Basit yüzeysel infeksiyonlardan apse, pnömoni ve sepsis dahil olmak üzere hayatı tehdit eden ciddi enfeksiyonlara da sebep olabilmektedirler (Tong ve ark. 2015). Son yıllarda bu mikroorganizmaya karşı artan ilaç direnci ve slime üretimi gibi mikroorganizmanın sahip olduğu virülans faktörleri sebebiyle bu patojenin insanlarda meydana getirdiği enfeksiyonlar önemli bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir (DSÖ 2014). *S. aureus*' un bir konağa adaptasyonu konağın fizyolojik durumu ve bağışıklık sistemiyle, bakterilerin maruz kaldığı çevresel faktörlerle doğrudan ilişkilidir (Herron-Olson ve ark. 2007).

Bir diğerk önemli insan patojeni Gram negatif basil olan *P. mirabilis*' tir. Swarming tarzı hareketi, yüksek düzeyde üreaz enzimi üretimi ile dikkat çeken oldukça virülan bir mikroorganizmadır (Adeolu ve ark. 2016). Toprak, su kaynakları ve kanalizasyon dahil olmak üzere çok çeşitli ortamlarda bulunabilir, bunun yanında, insan ve hayvanların GIS üyesidir. Yara, göz, GIS ve idrar yolları dahil olmak üzere, çoğunlukla kateter ilişkili idrar yolu enfeksiyonlarına (mesane ve böbrek taşı (ürolitiazis)) yol açmaktadır (Armbruster ve Mobley 2012). Bu mikroorganizma komplike üriner sistem enfeksiyonları bakteriyemi ve sepsisin de önemli etkenidir (Kim ve ark. 2003).

Non-fermentatif bir mikroorganizma olan *P. aeruginosa* en önemli hastane enfeksiyon etkenlerinden biri olup, son yıllarda hastanelerden izole edilen kökenlerde yüksek ilaç direnci bulunmaktadır. İnsanlarda akut ve kronik enfeksiyonlara yol açmaktadır (Jacome ve ark. 2012). Mikroorganizmanın biyofilm başta olmak üzere konağın durumunu ağırlaştıran çeşitli virülans faktörleri bulunmaktadır. Virülan suşlarla oluşan enfeksiyonlar ciddi morbidite ve mortalite sebebidirler. Kronik ve kalıcı bir enfeksiyon kaynağı olan biyofilm ile, bağışıklık sistemine ve antibiyotiklere karşı güçlü bir direnç göstermektedirler (Wei ve Ma 2013).

İnsan ve hayvan GIS üyesi olan *E. coli* ise Enterobacteriaceae ailesinin üyesi olan Gram negatif bir bakteridir. *E. coli* vücutta özellikle alt barsakta kolonize olabilmekte ve fekal oral yoldan bulaşabilmektedir. Bakterinin patojen suşları idrar yolu enfeksiyonlarının en önemli sebebidir. Hem kadınlarda hem erkeklerde başta üriner enfeksiyonlar olmak üzere yara enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları, osteomyelit, menenjit gibi çeşitli enfeksiyonlara yol açmaktadır. En önemli nozokomiyal hastane enfeksiyonları arasında gösterilen *E.coli*' de artan ilaç direnci ciddi bir küresel sorundur (Croten ve Finlay 2010).

İnfluenza viruslar ise orthomyxoviridae ailesinde yer alan endemi veya pandemilere kadar değişen geniş yelpazade solunum yolu enfeksiyon etkenleridir. İnfluenza viruslar ciddi morbidite ve mortalite sebebi viral patojenler arasında yer almaktadır. Dünyada en önemli ölüm sebepleri arasında gösterilen infuleza virusları ülkemizde de her yıl binlerce insanın ölümüne sebep olmaktadır (Eyer ve Hruska 2013, Vemula ve ark. 2013).

Biz bu çalışmada önemli probiyotik mikroorganizmalardan *L. bulgaricus*, *L. casei*, *E. faecium* ve *S. thermophilus*’ un biyoaktif metabolik ürünlerinin insanlarda ciddi morbidite ve mortalite etkenleri arasında yer alan *S. aureus*, *P.aeruginosa*, *P. mirabilis* ve *E. coli*’ ye karşı antimikrobiyal etkinlikleri ile bazı bakteriyel virülans faktörleri (slime üretim ve motilite) zerindeki etkinliklerinin araştırılmasını amaçladık. Çalışmada ayrıca probiyotik mikroorganizmaların biyoaktif metabolitlerinin influenza A (H1N1)’ ya karşı antiviral etkinliğinin varlığının araştırılması da amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Probiyotik Mikroorganizmaların Tanımı ve Tarihçesi

Probiyotikler, insanlar ve hayvanlar için faydalı etkileşimlerle ilişkili mikroorganizmaların isimlendirilmesinde kullanılan Yunancada “pro bios” kelimelerinden köken alan “yaşam için” anlamına gelmektedir (Bagchi 2014). Probiyotiklerin tarihi, insanlık tarihi ile başlamıştır. Yunanlılar ve Romalılar peynir ve fermente süt ürünleri gibi besinlerin kullanımını özellikle çocuklar ve iyileşmekte olan hastalar için tavsiye etmişlerdir. Probiyotikler yeterli miktarlarda alındığında konak sağlığına yarar sağlayan, barsak mikrobiyal dengesine katkıda bulunan ve ayrıca besinsel üstünlüklere sahip zararsız, canlı normal flora/mikroorganizmaları ifade etmektedir (Carlos ve ark. 2010).

Probiyotik terimi ilk olarak Lilly ve Stillwell (1965) tarafından “bir diğerinin büyümesini teşvik eden bir mikroorganizma tarafından salgılanan maddeleri” tanımlamak için kullanılmıştır. Bu tanım Parker tarafından (1974) 'barsak mikrobiyal dengesine katkıda bulunan mikroorganizmalar ve maddeler' olduğunu öne sürerek geliştirilmiştir. Charteris ve ark. (1997) “alındığında belirli bir patolojik durumun önlenmesinde ve tedavisinde pozitif bir etkiye sahip olabilecek mikroorganizmalar” olarak tanımlamışlardır. Salminen ve ark. (1998) “sağlığa yararlı canlı bakteri içeren yiyecekler” olarak tanımlarken, Marteau ve ark. (2001) “sağlık ve refah üzerinde yararlı bir etkiye sahip olan mikrobiyal hücre preparatları veya mikrobiyal hücrelerin bileşenleri” olarak tanımlamışlardır. Bazı modern tanımlar, daha kesin olarak probiyotiklerin önleyici veya terapötik etkilerinden bahsetmektedir. Son olarak, bazı gastrointestinal hastalıkların tedavisinde probiyotiklerin etkili olduğu tespit edildiğinden probiyotiklerin terapötik ajan olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir. Yıllar boyunca “probiyotik” teriminin birtakım tanımları kullanılmış ancak Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) (2002) probiyotikleri “yeterli miktarda uygulandığında konak sağlığına yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar” şeklinde tanımlamaktadır.

2.2.Probiyotik Mikroorganizmalar ve Özellikleri

Probiyotikler, yeterli titrede alındığında konağın mikrobiyotasını değiştiren ve konakta faydalı etkileri sergileyen canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Shida ve Nanno 2008). Probiyotiklerin barsak sağlığını düzeltmek amacıyla uzun yıllardan beri kullanımı önerilmektedir. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ile DSÖ probiyotik suşları “gıdaların bir parçası olarak yeterli miktarda tüketildiğinde, konağa sağlık açısından faydası olan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır. Probiyotik mikroorganizmalar non-patojenik ve güvenli mikroorganizmalar olarak kabul edilmektedir (Servin ve Coconnier 2003).

Probiyotik mikroorganizmalar çok sayıda doğal substrattan izole edilebilmekte ve karakterize edilebilmektedir. Son yıllarda güçlü/etkili suş kaynakları artmakta ve hala artmaya devam etmektedir (Adel ve Sari 2017). Probiyotik mikroorganizmalar genellikle aktif canlı kültürler içeren preparatlar olarak tüketilmekte ve doğal yaşamdan izole edilmiş *Lactobacillus*, *Lactococcus* veya *Bifidobakteriler* gibi bakterileri içermektedirler ancak *Enterobacter*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve bazı maya suşları da son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu grup içinde sınıflandırılan önemli mikroorganizmalardandır (Bongaerts ve Severijnen 2016).

Probiyotik mikroorganizmalar arasında Laktik asit bakterileri (LAB), büyük bir probiyotik bakteri grubu olarak kabul edilmektedir. LAB genellikle sitokromlardan yoksun ve anaerobik koşulları tercih eden Gram-pozitif mikroorganizmalardır. Ancak ana ürün olarak laktik asit üreten aerotolerant, müşkülpesent, aside dirençli ve fermantif mikroorganizmalardır. LAB üyeleri genellikle karbonhidrat metabolizmaları temelinde iki gruba ayrılır. *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* ve bazı *Laktobasillerden* oluşan homofermentatif grup, karbon kaynağını esas olarak laktik aside dönüştürmek için Embden-Meyerhof-Parnas (glikolitik) yolunu kullanmaktadırlar. Homofermentatiflerin aksine, heterofermentatif bakteriler glikozdan fosfoketolaz yolundan eşmolar miktarlarda laktat, CO₂, etanol veya asetat üretmektedirler. Bu grubun üyeleri arasında *Leuconostoc*, *Weissella* ve bazı *Lactobacilli* cinsleri sayılabilir (Vasiljevic ve Shah 2008).

Probiyotikler farklı çalışma sonuçlarına göre, etkileyici potansiyel özelliklere sahiptir. Probiyotik olarak bir türün kullanılması ve seçilmesinde dikkate alınması gereken kriterler güvenlik, işlevsel ve teknolojik özellikleridir (Abatenh ve ark. 2018). DSÖ, FAO ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA)'nın önerisine göre, seçim sürecinde probiyotik türler güvenlik, işlevsellik ve aynı zamanda teknolojik faydaları ile ilgili kriterlerini karşılamalıdır (Markowiak and Slizewska 2017).

Bir suşun güvenliği, kökeni, patojen kültürlerle ilişkisinin olmaması ve antibiyotik direnç profili ile tanımlanmaktadır. İşlevsel yönlerini, GIS' de canlı kalmaları ve immünomodülatör etkileri tanımlamaktadır. Üretim teknolojisi ile ilgili gereklilikleri; depolama ve dağıtım süreçlerinde özelliklerini sürdürebilmeleri ve koruyabilmeleridir (Lee 2009). Bu özelliklerine ek olarak, insan kaynaklı olmalı, patojen ve toksik olmamalı, anti-kanserojen ve anti-mutajenik aktiviteye sahip olmalı, hastalıklara karşı direnci artırarak konak üzerinde yararlı bir etki oluşturabilmeli, düşük pH ve organik asitlere direnç gibi barsak koşullarında canlı kalabilmeli, barsak motilitesini arttırabilmeli, barsak mikrobiyotasını onarma ve yenileme gücüne ve patojen olmama durumunun dengelenmesi ile patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterebilmeli, patojen adezyonu ve kolonizasyonunun önlenmesinin yanı sıra patojenlerin rekabetçi dışlanması, başarılı immün modülasyonu için mukozal ve epitel yüzeylere adezyon gibi önemli özelliklere sahip olmalıdır (Manoj ve ark. 2012, Maria ve ark. 2013, Anandharaj ve Sivasankari 2014, Divya 2016, Monica ve ark. 2016, Mohammad Kazemve ark. 2017).

LAB suşları, barsak fonksiyonlarının ve barsak epitel bariyerinin güçlendirilmesi, alerjilerin azaltılması, patojenlere karşı antagonizm, B vitaminleri (özellikle folik asit) üretimi, bağışık yanıt stimülasyonu ve laktoz intoleransı semptomlarının azalması gibi insan sağlığına yarar sağlayabilen probiyotik özellikler sunmaktadırlar (Patel ve Lin 2010, Enujiugha ve Badejo 2017). Özellikle *Lactobacillus* cinsinin türleri yararlı mikrobiyota örnekleri olarak, antimikrobiyal, antioksidan, bağışıklık modüle edici ve opioid/opioid antagonist peptitleri ürettiği de gösterilmiştir (LeBlanc ve LeBlanc 2014, Enrica ve Simona 2016). Etkileri suşa özgü metabolik özelliklere, sunulan moleküllere ve salgılanan bileşenlere bağlıdır. Bu

özelliklerin belirli bir probiyotik suşunda kombinasyonu, spesifik probiyotik etkisini ve bunun sonucunda, belirli bir hastalığın önlenmesi ve/veya tedavisi için etkili uygulamasını belirlemektedir (Walsh ve ark. 2014).

2.2.1. *Lactobacillus* Cinsi Probiyotik Mikroorganizmalar

Lactobacillus, en yaygın probiyotik türdür (Tandee 2013). Genel olarak; Gram pozitif, sporsuz, anaerobik, glukozu fermente eden, doğada yaygın olarak bulunan insanlarda ağız boşluğunun ve sindirim kanalının önemli yerleşenleri arasında bulunan gastrointestinal mikrofloranın önemli bir parçasını oluşturan mikroorganizmalardır (Hammes ve Vogel 1995, Divyashri ve ark. 2015). Ayrıca meyve ve sebzelerden çeşitli doğal fermente ürünlere kadar gıda ürünlerinde bulunmaktadır (Owusu-Kwarteng ve ark. 2015). Fermente ürünlerdeki uzun kullanım geçmişi, Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından GRAS (genel olarak güvenilir) olarak tanınmasını ve EFSA (2016) tarafından toplanan QPS (nitelikli güvenlik varsayım) listesinde yer almasını sağlamıştır.

Laktoz fermentasyonu yapan *Lactobacillus* türleri gibi bakteriyel probiyotikler fermentatiftirler. Glikoz, homofermentatif olayla laktik aside veya heterofermentatif olayla eşdeğer miktarda laktik asit, CO₂ ve etanole (ve/veya asetik asit) fermente edilmektedir. Bu nedenle, bazı patojen organizmaların yerleşmesi ve çoğalması için ortam elverişsiz hale gelmektedir (Macfarlane ve Cummings 2002).

L. bulgaricus, barsağın biyolojik bariyerini oluşturmak için barsak mukozasına sıkıca bağlanan ve barsak mikroflorası dengesini korumaya yardımcı olan gastrointestinal sistemdeki baskın probiyotik suşlardan biridir (Conway ve ark. 1987). *L. bulgaricus*, çeşitli sağlık yararları ve endüstriyel uygulamalardaki rolü nedeniyle en önemli LAB' den biri olarak kabul edilmektedir (Gouesbet ve ark. 2002). Metchnikoff' un ünlü eserinde bahsettiği bu bakteriler, daha sonra *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* olarak bilinen 'Bulgar Basillus' dur (Michaylova ve ark. 2007).

L. bulgaricus süt ürünleri, bitkiler ve insan barsağı gibi çeşitli ekolojik nişlerde sıklıkla bulunan patojenik olmayan, laktik asit üreten, Gram pozitif çubuk şeklinde bir bakteridir. (Karami ve ark. 2017, Dawlal ve ark. 2019). Özellikle yoğurt ve bazı peynirler olmak üzere fermente ürünlerin, üretiminde yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. Yoğurt fermentasyonu sırasında *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* arasında metabolit değişimiyle simbiyotik bir ilişki meydana gelmektedir (Sieuwerts ve ark. 2010). *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* tarafından üretilen pirüvik asit, formik asit, folik asit ve uzun zincirli yağ asitlerini kolayca kullanabilirken, *L. bulgaricus* tarafından üretilen peptitler, serbest amino asitler ve putresin *S. thermophilus*' un büyümesini uyarmaktadır (Sieuwerts ve ark. 2008, Kaneko ve ark. 2014). Çeşitli alışmalar, yoğurt bakterilerinin az miktarda tüketimini kolorektal kanser, soğuk algnlığı ve inflamatuvar barsak hastalığı riskiyle ilişkilendirmiştir (Makino ve ark. 2010).

L. casei ise yaygın olarak kullanılan bir probiyotik türdür (Tandee 2013). *L. casei* ilk olarak 1971' de yeni bir tür olarak önerilmiştir (Hansen ve Lessel, 1971). Ancak bu tür ilk olarak 1996' da araştırılmıştır (Dicks ve ark. 1996). *L. casei*, Gram pozitif, patojenik olmayan bir laktik asit bakterisi ve insan mikrobiyotasının doğal üyesidir (Tiptiri-Kourpeti ve ark. 2016). Karbonhidratların fermentasyon ürünü olarak laktik asit üreter ve fermente gıdaların hazırlanmasında asit üreten bir başlangıç kültürü olarak kullanılır (Kimoto-Nira ve ark. 2012). *L. casei*, peynir, şarap, turşu gibi besinlerde, insan ve hayvanların üreme ve gastrointestinal yolları gibi çeşitli çevresel habitatlarda bulunmaktadır (Hill ve ark. 2018).

L. casei suşlarının barsaktaki mikrobiyotayı değiştirdiği ve konak immün yanıtını etkilediği gösterilmiştir (Aktas 2015). Bir besin takviyesi olarak *L. casei*' nin barsak mikrobiyal dengesinde, artrit ve tip 1 diyabette iyileşmelere yol açtığı gösterilmiştir (Sharma ve Devi 2014, So ve ark. 2008, Teanpaisan ve ark. 2009). Ayrıca lösemi ve karaciğer kanserinde, büyüme inhibisyonu ile anti-kanser etkilerinin olduğu gösterilmiştir. (Katayama 1990, Han ve ark. 2013). Buna ek olarak, tüketildiğinde konağa yarar sağlayabilen birçok biyoaktif metabolit ürettikleri bulunmuştur (Dietrich ve ark. 2014).

2.2.2. Diğer Probiyotik Mikroorganizmalar

Probiyotik terimi, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi LAB ile daha fazla ilgili olsa da araştırılmamış diğer mikroorganizmalar da mevcuttur (Barbosa ve ark 2005). Yeni üyeleri tanımlamak için probiyotik potansiyeli olan diğer mikroorganizmalar probiyotik tür olabilmesi açısından değerlendirilmektedir (Hanchi ve ark. 2018).

LAB arasında *S. thermophilus*, süt endüstrisinde büyük ekonomik öneme sahip olan geleneksel bir süt başlangıç bakterisidir (Hu ve ark. 2018, Alexandraki ve ark. 2019). *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* ile birlikte yogurt, kefir, peynir gibi (örneğin mozzarella, süzme peynir ve kaşar) fermente süt ürünlerinin üretiminde yaygın olarak kullanılan bir mikroorganizmadır. (Wu ve ark. 2014, Chandan ve ark. 2017, Li ve ark. 2018). Esas olarak komensal ve patojenik türlerden oluşan *Streptococcus* cinsinde FDA (2007)' ya göre GRAS statüsü ve EFSA (2007)' ya göre QPS statüsü verilen tek türdür. *S. thermophilus*, *Streptococcaceae* familyasına ve *Lactobacillales* takımına ait, Gram pozitif, patojenik olmayan, homofermentatif fakültatif bir anaerob bir bakteridir (Vitetta ve ark. 2019).

S. thermophilus, laktik asit üreterek sütün pH' ının hızla azaltılmasında önemli bir rol oynamakta ve fermente gıdalara lezzet vermektedir. Bazı *S. thermophilus* suşlarının fermente süt ürünlerinin dokusunu ve viskozitesini artıracak ekzopolisakkaritler (EPS) ürettiği de bilinmektedir. (Zisu ve ark. 2003).

Süt fermantasyonundaki temel özelliği, hızlı asitleme ve diğer mikroorganizmaların inhibisyonuna neden olan laktik asit üretimidir. *S. thermophilus* tarafından üretilen asetaldehit ve ekzopolisakkaritler gibi ikincil metabolitler. son ürünün lezzetini ve dokusunu güçlü bir şekilde etkilediğinden dolayı da önemlidir. Ayrıca, probiyotik olarak tanımlanan *S. thermophilus* suşları, insanlar tarafından tüketildiğinde çeşitli sağlık yararlarına katkıda bulunmaktadır (Wasilewska ve ark. 2018, Evivie ve ark. 2019).

Enterokoklar LAB' lerinin bir üyesidir, Ağız, cilt ve GIS dahil olmak üzere insanla ilişkili mikrobiyotanın bir parçasını oluşturmaktadırlar (Laukova ve ark. 2017). Gram pozitif, spor oluşturmeyan, katalaz negatif, oksidaz negatif koklardır ve tek, çift veya zincirler halinde bulunmaktadır (Fisher ve Phillips 2009).

Patojen potansiyellerine rağmen kommensal *Enterokoklar*, insanlarda probiyotik olarak onlarca yıldır güvenle kullanıldıkları kanıtlandığı gibi, genellikle düşük seviyelerde virülans etki göstermektedirler (Arias ve Murray 2012). Ancak moleküler biyolojideki son gelişmeler ise, *Enterokok* gıda suşlarının güvenli olduğunu, virülans ve antimikrobiyal direnç genleri taşıyan nozokomiyal suşlardan ayırt edilebildiğini göstermiştir (Montealegre ve ark. 2016).

Enterococcus cinsi fermente gıdalarda en yaygın tür olan *E. faecium* ve *Enterococcus faecalis* ile 20' den fazla tür içermektedir (Lebreton ve ark. 2014). *Enterokok* suşlarının, özellikle *E. faecium*' un probiyotik özelliklerini değerlendirmek için birçok çalışma yapılmıştır (Hanchi ve ark. 2018).

E. faecium, *Enterococcus* türleri arasında ticari probiyotiklerde en çok kullanılan *Enterokok* türüdür (Maia ve ark. 2001). *Enterokok* probiyotikleri, irritabl barsak sendromu semptomlarının ve antibiyotik kaynaklı ishalin hafifletilmesi ve farklı fonksiyonel ve kronik barsak hastalıklarının önlenmesi gibi bazı insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde ve/veya önlenmesinde kullanılabilmektedir (Bybee ve ark. 2011). Ayrıca, bazı *Enterokoklar* antikanserojen, hipokolesterolemik ve bağışıklık düzenleyici etki göstermektedirler (Avram-Hananel ve ark. 2010). Antimikrobiyal ve probiyotik rollerini destekleyen bir dizi patojene karşı aktiviteye sahip antimikrobiyal peptitler de üretmektedirler (Ramiah ve ark. 2009).

2.3.Probiyotik Mikroorganizmaların Biyoaktif Metabolitleri (Postbiyotikler)

Canlı mikroorganizmaların yokluğunda bakteriyel ürünlerin, sinyal yollarında ve bariyer fonksiyonlarında canlı organizmalara benzer etkilere sahip olabileceği son verilerde gösterilmektedir. Bu bakteri ürünleri genellikle postbiyotikler olarak tanımlanmakta ve konakta biyolojik aktiviteye sahip probiyotik mikroorganizmalar tarafından cansız bakteriyel ürünler ya da biyoaktif metabolik ürünler olarak tanımlanabilmektedir (Patel and Denning 2013).

Genellikle postbiyotikler; bakteriyosinler, organik asitler, etanol, diasetil, asetaldehitler ve hidrojen peroksit gibi bakteriyel biyoaktif metabolik yan ürünleri içermektedir. Belirli sıcaklıkta canlılığını kaybeden probiyotiklerin konakta biyolojik aktivite gösterebilen önemli bakteri yapılarını tutabildiği de bildirilmiştir (Islam 2016). Bu biyoaktif metabolik ürünler patojen mikroorganizmalara karşı geniş çapta inhibe edici özelliğe sahiptir ve bu nedenle antibiyotiklere alternatif olarak kullanılabilmektedir. Postbiyotikler toksik ve patojen değildir, cansız bakteriyel ürünler veya probiyotiklerin biyoaktif metabolik yan ürünleri olarak memeli enzimleri tarafından hidrolize dirençlidir (Ooi ve ark. 2015). Probiyotik metabolitler probiyotik suşuna bağlı farklılıklarla ilk olarak barsak epitel hücrelerinde ve sonrasında bağışıklık hücrelerinde etkili olan anti-inflamatuar ve antioksidan aktiviteye sahiptir (De Marco ve ark. 2018).

Bakteriyosinler, enterik patojenler dahil olmak üzere diğer bakterilerin büyümesini inhibe edebilen ısıya dayanıklı antibakteriyel peptitlerdir (Gareau ve ark. 2010, Do Carmo ve ark. 2018). Az sayıda bakteriyosin, doğal antibakteriyel özellikleri ile birlikte anti-viral ve anti-mantar özellikleri de sergilemektedir. (Juturu ve Wu 2018). Hidrojen peroksit ise, bakterisidal serbest radikallerin (süperoksit ve hidroksil) üretiminin öncüsü olabilir, bu da DNA hasarına ve membran lipidlerinin membran geçirgenliğini arttıran peroksidasyonuna yol açmaktadır (Aminnezhad ve ark. 2015). Kısa zincirli yağ asitleri, bir çok bakteriyel enzimin ifadesinde ve barsaktaki yabancı bileşimlerin ve kanserojenlerin metabolizmasında zorunlu olan kolon lümeninde uygun pH' ın sürdürülmesine yardımcıdır (Kareem ve ark. 2014).

2.4. Probiyotik Mikroorganizmaların Etki Mekanizması

Son zamanlarda probiyotik kültürlerin seçimi, özellikleri, kullanım alanları ve sağlık üzerindeki etkileri konusunda çok çeşitli çalışmalara rastlamak mümkündür. Çalışmalarda probiyotiklerin insanlar üzerinde çok sayıda önemli işlevlerinin olduğu bildirilmiştir. En önemli işlevinin, konağın normal fonksiyonu için gerekli olan flora üyeleri ile patojenler arasında dengeyi sağlayarak konak mikrobiyotasının gelişimi üzerindeki etkisi olduğu bildirilmektedir. Probiyotik mikroorganizmaların en önemli işlevleri arasında konakta antibiyotik tedavisinden sonra doğal mikrobiyotanın restorasyonu için gerekli olduğudur. Probiyotik mikroorganizmaların bir diğer önemli fonksiyonlarından biri de kontamine gıda alımına bağlı ve ortamdaki kaynaklanan patojenik barsak bakterilerine karşı konağı korumasıdır. Probiyotik mikroorganizmaların, önemli insan patojenleri arasında sayılan *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *E.coli*, çeşitli *Shigella* türleri, *Staphylococcus* gibi patojenik bakterilerin üreme ve gelişmeleri üzerinde inhibitör etki gösterdikleri yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Schachtsiek ve ark. 2004, JimmySaint-Cyr ve ark. 2017, Carter ve ark. 2017, Chingwaru ve Vidmar 2017, Hussain ve ark. 2017).

Bazı çalışmalarda probiyotik mikroorganizmaların konağın sindirim sistemi üzerinde ve gıda alerjilerinin tedavisinde etkili olup, fungal patojenlere karşı ve ayrıca karyojenik mikroorganizmalara karşı da koruyucu aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir. Bunun yanında, probiyotik mikroorganizmaların immünolojik sistemin etkinliğini, vitamin ve mineral bileşiklerinin emilimini arttırdığı ve organik asitler ve amino asitlerin oluşumuna da katkı sağladıkları yapılan çalışmalar arasında bulunmaktadır. Probiyotik mikroorganizmaların konak için çeşitli reaksiyonlarda rol alan esteraz, lipaz, ko-enzim A, NAD ve NADP gibi enzim üretimini gerçekleştirebildikleri de bildirilmiştir. Bazı probiyotik mikroorganizmaların metabolik ürünlerinin antimikrobiyel (asidofilin, bacitracin, laktacin), anti-kanserojen etkilerinin olduğu da bildirilmiştir (Pompei ve ark. 2007, Gu ve ark. 2015, Li ve Gu 2016).

Yapılan çalışmalarda probiyotik mikroorganizmaların aşğıdaki dört mekanizmayı kullanarak aktivite gösterdikleri belirlenmiştir.

- (1) Antimikrobiyal maddelerin üretimi yoluyla antagonizm,
- (2) Epitelyuma adezyon için patojenlerle rekabet,
- (3) Konağın immünomodölasyonu,
- (4) Bakteriyel toksin üretiminin inhibisyonu (Isolauri ve ark. 2001, Vandenberg ve ark. 1993).

Probiyotik mikroorganizmaların immünolojik stimölasyonu; immünoglobulin üretiminin artması, makrofajların ve lenfositlerin aktivitesinin artması ve γ -interferon üretiminin uyarılması ile kendini göstermektedir. Probiyotikler doğal ve kazanılmış immünite üzerinde konak reseptörlerini metabolik ürünler, hücre duvarı komponentleri ve DNA yapılarını tanıyarak gerçekleştirmektedir. Yapılan çalışmalarda laktik asit bakterilerinin hücre duvarının bileşenlerinin makrofajların aktivitesini tetiklediğı bildirilmiştir. Aktive olan makrofajlar serbest oksijen radikallerinin ve lizozomal enzimlerin üretimiyle mikroorganizmaları hızla yok edebilmektedirler. Probiyotik bakteriler ayrıca gastrointestinal sistemin immünokompetan hücreleri tarafından sitokin üretimini uyarabilmektedir. Diğer yandan mayaların immünolojik aktivitesi, hücre duvarlarında glukanların varlığı ile ilişkili olup, bu bileşikler retikölendotelyal sistem cevabını uyarmaktadırlar (Marteau ve Shanahan 2003, Oelschlaeger 2010).

Probiyotik mikroorganizmaların toksin aracılı etkinlik gösteren mikroorganizmaların toksin üretimini inaktive ederek veya toksin inaktivasyonuna madde salınımıyla etkili oldukları bildirilmiştir. Probiyotik mikroorganizmaların bu etkileriyle konak detoksifikasyonu yaptığı, adsorpsiyon ile bazı toksinleri hücre duvarlarına bağlayarak konakta toksinlerin barsak emilimini azaltabildiğı de gösterilmiştir. Aynı zamanda mikotoksinlerin (aflatoksin gibi) probiyotik mikroorganizmalar tarafından metabolize edilebildikleri de bildirilmiştir (McCormick 2013, Nikbakht Nasrabadi ve ark. 2013).

Bununla birlikte, tüm probiyotik mikroorganizmaları detoksifiye edici özelliklere haiz olmadığı da bildirilmiştir. Bazı probiyotik mikroorganizmaların diyarede etkinliğinin konağı toksinlerden koruma yetenekleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, probiyotik mikroorganizmaların toksin üretimine yol açan metabolik reaksiyonları azaltmasıyla, aynı zamanda doğal enzimler, vitaminler ve antimikrobiyal maddelerin üretimine yol açan yolların uyarılması ile de ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Oelschlaeger 2010). Probiyotiklerin yararlı etki göstermesi genellikle etki mekanizmalarına bağlıdır. Bu mekanizmalar, enfeksiyonların profilaksisinde, tedavisinde ve konağın barsak mikrobiyotasının dengesinin korunmasında önemlidir (Lebeer ve ark. 2008).

2.5.Probiyotiklerin Konak Sağlığı Üzerindeki Etkileri

2.5.1. Patojenlerle rekabet

Probiyotik mikroorganizmalar besin maddeleri için bulundukları alanda patojen mikroorganizmalar ile bir rekabet içerisindedirler. Bu özellikleriyle patojen mikroorganizmaların epitelyal ve mukozal yüzeylere adezyonuna engel olarak etkinlik göstermektedirler. Patojenlerin epitelyal invazyonunun inhibisyonu, antimikrobiyal maddelerin üretimi ve/veya mukozal bağışıklığın uyarılması dahil olmak üzere probiyotik mikroorganizmaların konakta sağlık açısından önemli mekanizmaları aktive ettiği bilinmektedir (Servin ve Coconnier 2003).

Probiyotik suşların, hareket mekanizmalarından biri olarak co-agregasyon kabiliyeti, patojen bakterilerin kolonileşmesini önleyen koruyucu bir bariyer oluşmasını sağlayabilmektedir (Schachtsiek 2004). Probiyotik bakteriler, epitel hücrelerine yapışabilmekte patojenleri bloke edebilmektedir böylece konağın patojen mikroorganizmalara karşı korunmasında ve konak immunitésinin güçlendirilmesine katkı sağlamaktadırlar (Scott ve ark. 2015).

Probiyotiklerin anti-patojenik aktivite uyguladığı bir diğer mekanizma, hem uygun besin maddeleri ve büyüme için hem de patojen bağlama ve reseptör alanları için rekabet etmektir (Figueroa-Gonzalez ve ark. 2011). Anti-patojenik aktivite, klasik antibiyotiklerin aksine barsak mikrobiyotasının karmaşık popülasyon bileşimindeki bozulmayı veya değişikliği engellediği için probiyotiklerin en yararlı etkilerinden biri olarak kabul edilmektedir. Probiyotikler asetik, propiyonik, bütirik ve laktik asit gibi kısa zincirli yağ asitleri (SCFAs), bakteriyosinler, etanol, organik asitler, diasetil, asetaldehitler, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peptitler gibi çok çeşitli anti-patojenik üretmesiyle patojenleri inhibe etmektedir (Tejero-Sarinena ve ark. 2013, Islam 2016). LAB' ine ait çoklu probiyotik suşlar tarafından heterofermentatif yollardan organik asitlerin üretimi esas olarak Gram negatif patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteden sorumludur (Lukic ve ark. 2018).

2.5.2. pH' yı Düşürme Kapasitesi

Probiyotik bakteriler, özellikle *Lactobacilli* suşları, lokal pH' ı düşüren asetik, laktik ve propiyonik asit üretmekte ve çok çeşitli Gram negatif patojenik bakterilerin üremesi inhibe etmektedir. Bununla birlikte, diğer *Lactobacilli* suşlarının antibakteriyel etkileri, laktik asit ve diğer bilinmeyen *Lactobacillus* türevi bakterisidal maddelerin pH' a bağlı mekanizma ile kombinasyonunun bir sonucu olabilmektedir (Vanderpool ve ark. 2008).

Laktobasilin antimikrobiyal etkisi öncelikle, laktik asit, asetik asit, propiyonik asit ve bazen hidrojen peroksit, bakteriyosinler ve antimikrobiyal peptitlerin (AMP' ler) değişken bir etki aralığına sahip organik asitlerin üretimiyle bağlantılıdır (Cortes Zavaleta ve ark. 2014, Gemechu 2015). Bu asitler hücre zarı ile etkileşime girebilmekte ve hücre içi asitleşmeye ve protein denatürasyonuna neden olabilmektedir. Laktik asidin antibakteriyel etkisi bakteriyel sitoplazmik zarıda indüklenen fizyolojik ve morfolojik değişikliklerden kaynaklanmakta, bu da sitoplazmik içeriklerin sızmasına neden olmaktadır (Wang ve ark. 2015).

2.5.3. Bakteriyosin Üretimi

LAB tarafından üretilen bakteriyosinler üç ana grupta incelenbilir; lantibiyotikler en fazla belgelenmiş ve endüstriyel olarak faydalanılan üründür. Gruplar, lantibiyotikler (Sınıf I), non-lantibiyotikler, düşük ısıya dayanıklı peptitler (Sınıf II) ve yüksek ısıya duyarlı proteindir (Sınıf III) (O’Sullivan 2002).

Çalışmalar, bu probiyotik sentezi antibakteriyel maddelerin, patojenlerin üremesini inhibe etmek için etkilerini tek başına veya sinerjik olarak sergilediklerini göstermektedir. *Lactococcus lactis* gibi Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen iki bileşenli lantibiyotikler küçük antimikrobiyal peptitlerdir. Bu peptitlerin, bakteri hücre duvarının lipit II bileşenini hedefleyerek patojenleri inhibe etmek için nanomolar konsantrasyonlarda aktif oldukları tespit edilmiştir. Lantibiyotikler ribozomal olarak sentezlendiklerinden ve bölgeye yönelik mutajenez için uygun olduğundan, ileri antibakteriyel fonksiyonlara sahip yeni peptitlerin üretimi için biyolojik şablonlar olarak hizmet etme potansiyeline sahiptirler. Lantiyonin içermeyen diğer bakteriyosinler, *Lactobacilli* tarafından üretilen küçük antimikrobiyal peptitlerdir (Vanderpool ve ark. 2008).

LAB’ den türetilen bakteriyosinlerin mitoz sırasında bakteriyel zar bütünlüğünü ve septum oluşumunu hedeflediği de bilinmektedir (Cavera ve ark. 2015). Gram pozitif ve Gram negatif patojen bakterilerinin inhibisyonu da dahil olmak üzere *Laktobasilin* yararlı etkileri birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Song ve ark. 2014, Zhu ve ark. 2014). *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *Salmonella* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların kontrolünde *Laktobasilin* terapötik rolü bildirilmiştir (Aminnezhad ve ark. 2015). *Enterokok* bakteriyosinleri, Gram negatif ve Gram pozitif gıda kaynaklı patojenler dahil olmak üzere geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteleri ile tanınmaktadırlar (Laukova ve ark. 2017). Ayrıca, bazı bakteriyosinler antifungal ve/veya antiviral aktiviteye sahiptir ve bazı durumlarda endosporları inhibe edebilmektedirler. Bu özellikler bakteriyosinjenik *Enterococcus* suşlarının gıda, insan ve hayvan sağlığı uygulamaları için önemli tür olarak gösterilmesinin nedenini oluşturmaktadır (Grande Burgos ve ark. 2014).

2.5.4. Hidrojen Peroksit Üretimi

Hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimi, LAB'nin inhibe edici aktivitesini açıklamak için yaygın olarak kabul gören bir hipotezdir (Charlier ve ark. 2009). Bir çalışmada hidrojen peroksit üretme kabiliyeti nedeniyle seçilen bir *Lactobacillus lactis* suşunu incelenmiş, *L. casei* Shirota veya *L. acidophilus* YIT 0070, *E. coli* 0157: H7' nin üremesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Servin ve Coconnier 2003).

LAB tarafından üretilen hidrojen peroksitin patojen mikroorganizmalara karşı güçlü bir antagonizm oluşturduğu bildirilmiştir. Ayrıca *S. aureus* inhibisyonundaki potansiyel rolü de gösterilmiştir. (Vasiljevic ve Shah 2008).

2.5.5. Adezyon Bölgesinde Patojenlerle Rekabet

Probiyotik mikroorganizmaların önemli faydalı etkilerinden bir kısmı, rekabetçi dışlama adı verilen bir fenomen ile *Salmonella* gibi patojenik bakterilerin adezyonunu engellemeye dayanmaktadır. Probiyotik bakteriler patojen-reseptör veya toksin-reseptör etkileşimlerine müdahale ederek bu etkileşimi bozmaktadırlar. Gastrointestinal sistemdeki probiyotikler hem patojenlerin hem de toksinlerinin barsak epiteline yapışmasını azaltmaktadır (Vanderpool 2008).

2.5.6. Bağışıklığın Uyarılması

Barsak mukoza zarı potansiyel olarak zararlı antijenlerin ve mikroorganizmaların dışlanması ve ortadan kaldırılmasında önemli bir rol oynamakta ve aynı zamanda besinlerin seçici emilimini sağlamaktadır (Herich ve Levkut 2002).

Probiyotiklerin bir bağışıklık tepkisini uyatabileceğinin keşfi, gözlemlenen probiyotik etkilerin bazıları için bilimsel bir temel sağlamaktadır. *L. casei* uygulamasının *P. aeruginosa*' ya karşı dolaşan antikorların üretiminde bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Önceki çalışmalar bazı *Laktobasillerin* immüno-güçlendirici olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Perdigon ve ark. 2001).

Patojenleri doğrudan etkileyen antipatojenik biyoaktif bileşikler üretmenin yanı sıra, probiyotikler ayrıca ince barsak ve barsak epitel hücrelerinin kriptolarında Paneth hücrelerini de içeren birkaç hücre tipinde üretilen katyonik anti-mikrobiyal peptitler olan defesinlerin üretilmesiyle ilgili yolu uyarmak veya aktifleştirmek gibi konak antipatojenik savunma yollarını uyarmaktadır (Figuerola-Gonzalez ve ark. 2011). Probiyotik bakterilerin epitel hücreleri veya M hücreleri veya Dendritik hücreler ile etkileşimi, bakterilerin veya bileşenlerinin internalizasyona neden olur. Bu etkileşim, IL-6' nın epitel hücreler tarafından salınmasını ve TNF- α ve IFN- γ ' yi üretmek için makrofajları ve dendritik hücreleri uyarır. Mast hücreleri ve aynı zamanda IL-6 ve TGF- β ile birlikte B lenfositlerin yüzeyinde IgM' den IgA' ya T-independent değişimini indükleyen sitokin IL-4' ü üretmek için uyarılır, böylece IgA üretimini artırırlar. IL-6, IgA ve B lenfositlerinin klonal genişlemesini desteklemektedir. IgE' nin azalmış sekresyonu ve IgM, IgG gibi antikorların üretiminde de ilişkili bir artış vardır. Th1 hücreleri, fagositozu ve mikrobiyal patojenlerin yıkımını, virusları ve tümörleri öldürmek için makrofajları, doğal öldürücü hücreleri ve sitotoksik T-lenfositleri uyaran IFN- γ , TNF- α ve IL-2 gibi pro-inflamatuar sitokinler üretir (Galdeano ve ark. 2007). Bu etki bulaşıcı hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde önemli bir rol oynar (Oelschlaeger 2010).

2.6.Probiyotik Gıda Kaynakları

Beslenme, gastrointestinal sistemde mikroorganizmaların kolonizasyonunu düzenlemede ana faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Ranadheera ve ark. 2010). Barsak florasında faydalı mikrop popülasyonunun pozitif dengesini oluşturmak için probiyotik mikroorganizmalar içeren düzenli gıda tüketimi önerilmektedir (Lloyd-Price ve ark. 2016).

Konakta bakteriyel bir infeksiyon durumunda antibiyotiklerin kullanılmasıyla florada azalan, yok edilen veya flora dengesinin bozulduğu durumlarda probiyotik mikroorganizmaları içeren besin maddelerinin tüketiminin arttırılması oldukça büyük önem taşımaktadır (Pamer 2016).

Probiyotik mikroorganizmalar süt ürünlerinde bol miktarda bulunabildiği gibi bazı gıda ürünlerinin tüketimiyle de alınabilmektedir (Anandharaj ve Sivasankari 2014). Günümüzde probiyotik mikroorganizmaların en kolay alındığı en çok tüketilen süt ürünlerinden biri yoğurttur. Yoğurt dünya genelinde ve binlerce yıllık tarihi ile yaygın olarak tüketilen fermente bir süt ürünüdür. Yoğurt, probiyotiklerin alınması için ideal bir taşıyıcı olarak karakterize edilmiştir (Prasanna ve ark. 2018, Sidira ve ark. 2014, Sidira ve ark. 2017, Aryana ve Olson 2017).

Probiyotikler uzun süre canlı kalabilen ve çok yönlü özelliklerinden dolayı fermantasyon işleminin bir bileşeni olarak uygun aşamada gıdalar, baharatlar ve içecekler içerisine katılmaktadır (Ravinder ve ark. 2012). Probiyotik hücrelerin gıda ürünleri aracılığıyla tüketilmesi aslında en popüler yaklaşımdır. Probiyotik mikroorganizmalar genellikle yiyecek kalıplarına eklenerek kurutulmuş veya derin dondurulmuş formda kültür konsantresi olarak bulunmaktadır (Moro ve ark. 2013, Stefania ve Marco 2017). Yaş grubu aralığına göre uygulanan farklı mekanizma yolları vardır. Kapsül veya probiyotik gıda şeklinde ağızdan alınabilmektedirler. Süt bazlı ürünler olmasına rağmen diğer süt ürünü olmayan ürünlerin probiyotiklerin taşınmasında temel taşıyıcı olduğu öne sürülmektedir (Ravinder ve ark. 2012).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Araç ve Gereçler

- Etüv
- Karbondioksitli inkübatör (Heal Force HF90, Çin)
- Santrifüj (NF 048; Nüve, Türkiye)
- Otomatik pipetler (Discovery, Transferpette, Almanya)
- Benmari (Gesellschaft Für Labortechnik, Almanya)
- Hassas terazi (Ohaus Corp., NJ USA)
- Bidistile su cihazı (Elix Essential 10 UV,Almanya)
- İnverted mikroskop (Soif, Çin)
- Klas II güvenlik kabini (Heal Force , Çin)
- Soğutmalı santrifüj (NF 048; Nüve, Türkiye)
- Derin dondurucu (-20 °C) (Hotpoint Ariston, İngiltire-İtalya)
- Derin dondurucu (Nüve, Almanya)
- Buzdolabı (Indesit TN 5 FNF-İtalya)
- Otoklav (Nuve OT 90L, Almanya)
- Pastör fırını (Therma Elaction Led GmbH, Almanya)
- Işık mikroskobu (Soif, Çin)
- Thoma lam (Isolab, Almanya)
- Düz tabanlı mikropleytler (12, 24, 48 ve 96' lık) (TPP, Europe/Switzerland)
- Kültür kapları (Greiner Bio-One GmbH, Germany)
- Falkon santrifüj tüpleri (Fıratmed, Türkiye)
- Isıtıcı/karıştırıcı (Dathan Scientific, Kore)
- Mc farland cihazı (İtalya)

3.2.Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri

- MRS Agar
- Kanlı agar
- EMB Agar
- Mueller-Hinton Agar
- Triptik Soy Broth
- Sıvı Buyyon
- RPMI-1640 besiyeri (Sigma, ABD)
- Fetal bovin serum (Capricorn Scientific, Güney Amerika)
- Tripsin enzimi (Biological Industries, İsrail)
- Dimetil sülfoksit (Merck KGaA, Almanya)
- Fosfat tuz solüsyonu (PBS)
- Etil Alkol (Merck, Almanya)
- Tripan mavisi (Sigma, ABD)
- Potasyum dihidrojen fosfat, KH_2PO_4 (Sigma, ABD)
- Proteinaz K (Sigma, ABD)
- Potasyum klorür, KCl (Sigma, ABD)
- Sodyum hidrojen fosfat, Na_2HPO_4 (Sigma, ABD)
- Sodyum klorür, NaCl (Sigma, ABD)
- Sodyum Bikarbonat, NaHCO_3 (Sigma, ABD)
- Titriplex III (Versen, Merck, Almanya)
- Disodyum hidrojen fosfat dodecahydrate, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Almanya)

3.2.1. MRS Agar

Ticari olarak toz halde temin edilen MRS (de Man Rogosa Sharpe) agardan 68.2 gr tartılarak bidistile su ile 1000 ml' ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildikten sonra 9 cm çapında steril petri plaklarına döküldü.

3.2.2. Kanlı Agar

Ticari olarak toz halinde temin edilen kanlı agardan (biEOMrieux, Fransa) 40 gr tartılarak bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Sterilizasyon işleminden sonra 45-50°C' ye kadar soğutuldu. İçerisine % 5.0 (v/v) oranında, steril şartlarda alınmış koyun kanı ilave edilip karıştırıldıktan sonra petri kutularına dağıtıldı.

3.2.3. Eosin Metilen-Blue Agar

Ticari olarak toz halde temin edilen EMB (Eosin Metilen-Blue) agardan 36 gr tartılarak bidistile su ile 1000 ml' ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildikten sonra 9 cm çapında steril petri plaklarına döküldü.

3.2.4. Müeller Hinton Agar

Ticari olarak toz halde temin edilen Müeller Hinton agardan 34 gr tartılarak bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildikten sonra 9 cm çapında steril petri plaklarına döküldü.

3.2.5. Triptik Soy Broth (Saklama Besiyeri)

Ticari olarak temin edilen TSB besiyeri (Tryptic Soy Broth, Merck Almanya)'den 3 gr tartılarak bidistile su ile 100 ml' ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Sterilazyondan sonra oda ısısında 30 dk bekletilen besiyerine 25 ml gliserol eklendi. Daha sonra 1' er ml olarak eppendorf tüplere porsiyonlanarak bakteri izolatlarının derin dondurucuda saklanması için kullanıldı.

3.2.6. Fosfat Buffer Tamponu (PBS)

- 8.0 gr NaCl
- 0.2 gr KCl
- 1.15 gr Na₂HPO₄
- 0.2 gr KH₂PO₄

tartılarak distile su ile 1000 ml' ye tamamlandı. pH' ı 7.2 olacak şekilde ayarlandıktan sonra +4°C' de kaldırılarak kullanıma hazır halde muhafaza edildi.

3.3.Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Probiyotik Mikroorganizmalar

- L. bulgaricus,*
- L. casei,*
- E. faecium,*
- S. thermophiles*

Bakteriyel Patojenler

P.aeruginosa,

S. aureus,

P. mirabilis,

E. coli

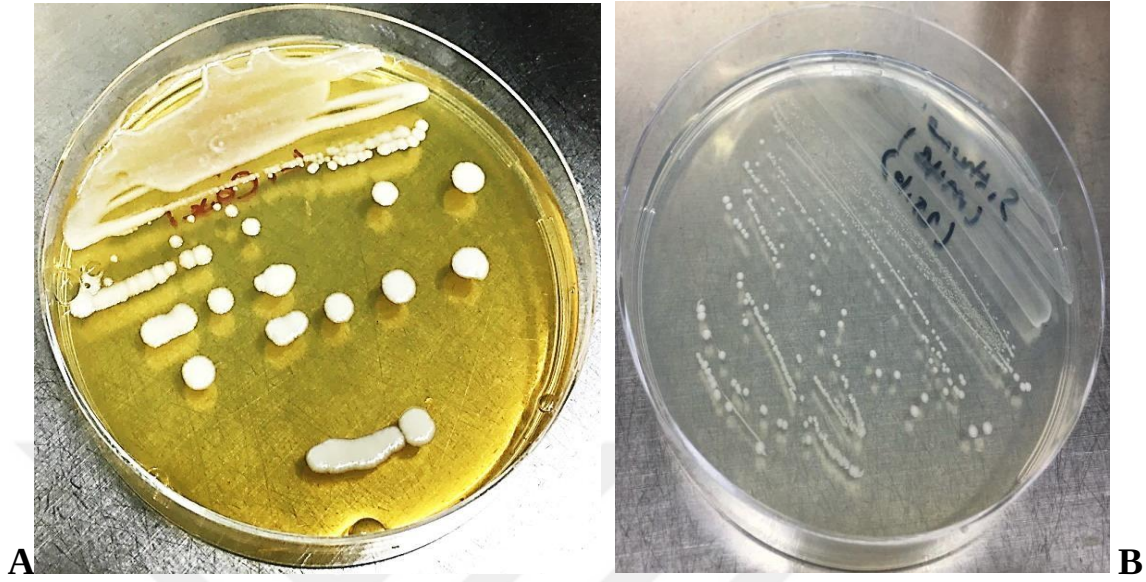
Viral Patojen

H1N1 (influenza A viral suşu)

3.3.1. Probiyotik Mikroorganizmalar

Çalışmada *L. casei*, *L. bulgaricus*, *E. faceum* ve *S. thermophilus* suşları Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezinden temin edildi. Liyofilize halde laboratuvara getirilen suşlar, Triptik Soy Broth besiyeri içinde çözülerek % 5 karbondioksitli inkübatörde 48 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bakteri suşları 100' er µl alınarak MRS ve Müeller Hinton agara pasajlandı. Pasajı takiben inkübasyonun 24. saatinde kolonilerden Gram boyama ve biyokimyasal testler yardımıyla bakteri suş verifikasyonu yapıldı.

Ayrıca bu mikroorganizmaların tür tayinlerinin doğrulanması biyokimyasal testler ve otomatize kültür sistemi (Vitek-2) yardımıyla da yapıldı.



Şekil 3.1. Probiyotik Mikroorganizmalar

A: *Lactobasillus casei* liyofilize suşunun hemen ve 4 saat sonrasında MRS agara ekimi sonucu 24 saatlik inkübasyon sonrası koloni morfolojisi.

B: *Streptococcus thermophilus* liyofilize suşunun hemen ve 4 saat sonrasında Müeller Hinton agara ekimi sonucu 24 saatlik inkübasyon sonrası koloni morfolojisi.

3.3.2. Biyoaktif Metabolitlerin Eldesi

Her bir mikroorganizma 500 ml TSB besiyeri içine saf kültür örneğinden bir öze yardımıyla alınarak inoküle edildi. Kapağı sıkıca kapatılmayan kültür kabı % 5 CO₂' li inkübatörde 72 saat süreyle inkübe edildi. Inkübasyon sonunda 50 ml' lik cam santrifüj tüplerine alınan örnekler 4000 rpm' de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar toplandı.

Bu işlem sonunda 0.22 nm' lik por çaplı nitroselüloz membranlardan süzülerek filtre edilen numuneler biyoaktif metabolit olarak çalışmalarda kullanıldı.

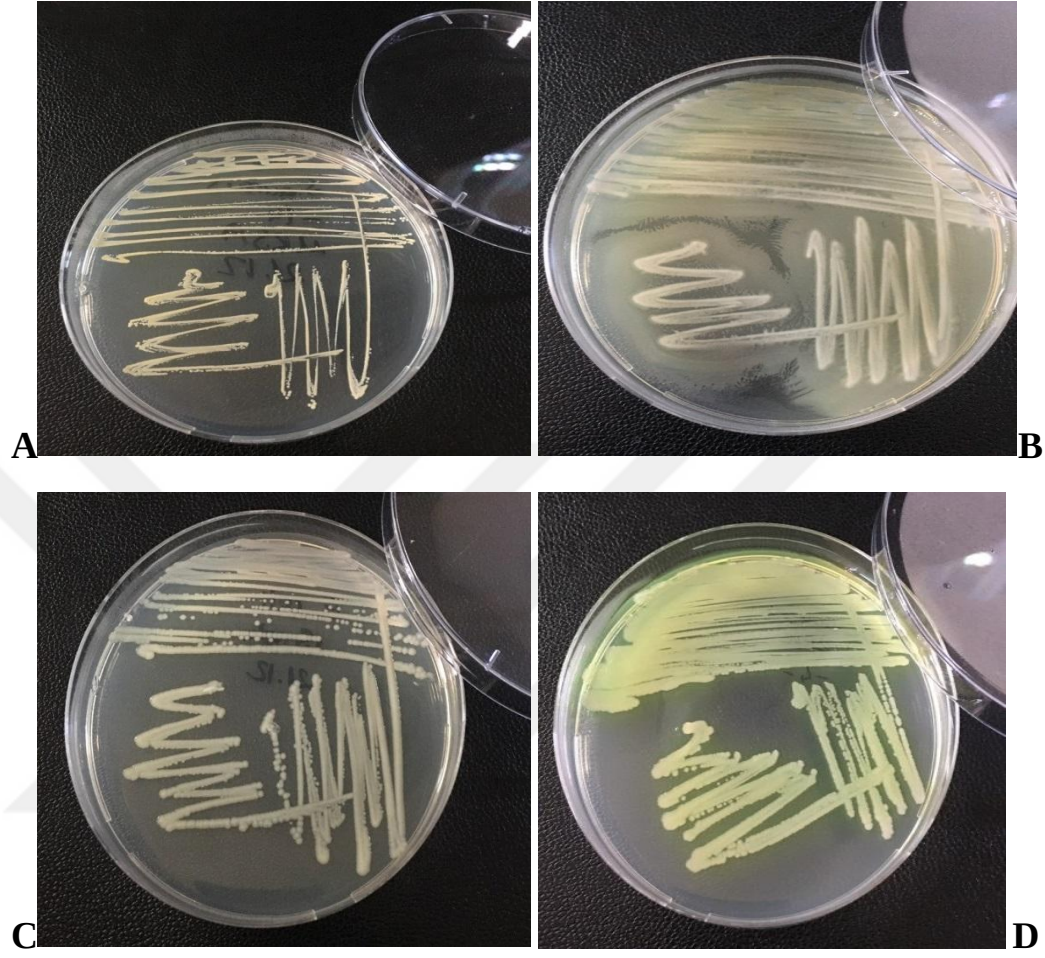
3.3.3. Patojen Mikroorganizmalar

Test edilecek insan patojenleri klinik örneklerden izole edilmiştir. Çalışmada biyoaktif metabolitlerin her bir mikroorganizma ile 1., 2., 3. ve 4. saat muameleleri yapılarak, bakteri koloni sayımları (cfu/ml) yapıldı.

Bunun yanında, biyoaktif metabolitlerin *S. aureus* kökenleri üzerinde slime üretimi üzerindeki etkisi ile *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* kökenlerinde motilite üzerindeki etkinlikleri değerlendirildi.

3.3.4. Patojen Örneklerin Toplanması ve Kültivasyon

Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen örnekler % 5 koyun kanlı agar, EMB ve Müeller Hinton besiyerlerine inoküle edilerek 37 °C’ de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İzole edilen mikroorganizmaların identifikasyonu, Gram boyama, katalaz testi, plazma koagülaz testi, oksidaz ayırıcı ve biyokimyasal reaksiyonlar temeline dayanan otomatize Vitek-2 sistemi ile identifiye edildi. Gram pozitif bakterilerin tiplendirilmesinde Gram boyamayı takiben katalaz ve plazma koagülaz testleri kullanılırken, Gram negatif bakterilerin identifikasyonu otomatize sistem yardımıyla yapıldı. Tiplendirilen izolatlar istenilen örnek sayısına ulaşıncaya kadar içerisinde % 20 oranında gliserol bulunan buyyonda -70 °C’ de muhafaza edildi.



Şekil 3.2. Patojen Mikroorganizmalar

A: *Staphylococcus aureus* patojen suşunun Müeller Hinton agara ekimi sonucu 24 saatlik inkübasyon sonrası koloni morfolojisi.

B: *Proteus mirabilis* patojen suşunun Müeller Hinton agara ekimi sonucu 24 saatlik inkübasyon sonrası koloni morfolojisi

C: *Escherichia coli* patojen suşunun Müeller Hinton agara ekimi sonucu 24 saatlik inkübasyon sonrası koloni morfolojisi

D: *Pseudomonas aeruginosa* patojen suşunun Müeller Hinton agara ekimi sonucu 24 saatlik inkübasyon sonrası koloni morfolojisi

3.4.Hücre Kültür Çalışmaları

3.4.1. RPMI-1640 Besiyeri

Ticari olarak satın alınan toz haldeki besiyerinden 1 lt hazırlamak için 22 gr besiyerine 2 gr sodyum bikarbonat (NaHCO_3) tartıldı. Erlenmayer içine konulan tartılan maddelerin üzerine bidistile su konularak total hacim 1 litreye tamamlandı. Erlenmayerin ağzı kapatılarak ısıtıcı karıştırıcıda 30 dk karıştırıldı. Sterilizasyon işlemi 0.22 μm por çaplı membran filtreler filtre sistemine yerleştirilerek otoklavize edildi. Sonra sterilize edilen filtrelerden hazırlanan çözelti filtre edilerek steril edildi.

3.4.2. Versen-Tripsin Hazırlanması

Bu amaçla 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 2.37 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0.2 gr KH_2PO_4 , 1 gr titriplex III (Versen) ve 1.25 gr tripsin hassas terazi ile tartılarak erlenmayere konuldu, bidistile su ile 1 lt'ye tamamlanarak karıştırıcıda 30 dk kimyasal maddelerin çözülmeleri sağlandı. Sterilizasyon işlemi 0.22 μm por çaplı membran filtreler filtre sistemine yerleştirilerek otoklavize edildi. Sonra sterilize edilen filtrelerden hazırlanan çözelti filtre edilerek steril edildi.

3.4.3. PBS hazırlanması

Bu amaçla 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 2.37 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ve 0.2 gr KH_2PO_4 hassas terazi ile tartıldı ve distile ile 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 30 dk karıştırıldı. Sonra sterilizasyon işlemi 0.22 μm por çaplı membran filtreler filtre sistemine yerleştirilerek otoklavize edildi. Sonra sterilize edilen filtrelerden hazırlanan çözelti filtre edilerek steril edildi.

3.4.4. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Tayini

Hücre canlılığının belirlenmesi için tripan Mavisi ile boyama yöntemi kullanıldı. Canlılıkları tespit edilmesi istenilen hücreler tripan mavisi boyası ile muamele edildiklerinde boyanın ölü hücrelerin membran bütünlüklerinin bozulması nedeniyle hücreleri boyaması esasına dayanmaktadır. Hücre kültürleri pasajları ve hücre sayımları sırasında tripan mavisi ile muamele edilen hücrelerin mikroskopik incelemesinde mavi renkte boyanan hücreler ölü olarak, boyanmamış hücreler canlı olarak hesaplandı. Tripan mavisi boyası PBS içinde son konsantrasyonda % 1 boya olacak şekilde hazırlandı. Tripsinizasyon çözeltisi ile hücre kültür kabı yüzeyinden kaldırılan hücreler boya ile hücre solüsyonun 1:1 olacak şekilde süspanse edilerek oda ısısında 15 dakika inkübasyonu takiben ışık mikroskobu ile incelenerek hücre canlılığı tayini yapıldı.

3.4.5. Hücre Sayımı

Gerek sitotoksikite ve gerekse de antiviral aktivite testleri sırasında hücre kültürü çalışmalarında canlı hücre hesabı Thoma lamı yardımıyla gerçekleştirildi. Thoma camı lameli hücre sayımı yapılmadan önce lamel destek kanallarına yapıştırıldı. Thoma lamında lam lamel arasındaki örnek çukuruna hücre süspansiyonu kanal boşluğundan verilerek (yaklaşık 10 µl) hücre canlılık sayımları gerçekleştirildi.

3.4.6. Hücre Kültürü

Probiyotik mikroorganizmaların biyoaktif metabolitlerinin non-toksik konsantrasyonlarının tespiti için sağlıklı hücre hattı (Vero hücre hattı) kullanıldı. Vero hücre hattı Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Hücre Kültürü Laboratuvarı kültür koleksiyonundan mevcuttu. Stok kültürler kriobanktan alınarak 37 C' ye önceden getirilmiş su banyosunda tutularak çözüldü. Daha sonra hücreler içerisinde % 10 fetal dana serumu ve antibiyotikli hücre kültür besiyerinde % 5 CO₂' li inkübatörde 37 °C' de, 100, 250 ve 500 ml' lik tek kullanımlık kültür kaplarında kùltive edildi.

3.4.7. Hücre Pasajları

Kùltive edilen hücreleri değerdendirmeleri gùnlük olarak inverted mikroskopla yapılarak, hücrelerin kùltür kabı yüzeyinin % 70-80 nispetinde kaplamasını takiben hücreler kùltür kabı yüzeyinden tripsinizasyon solüsyonu ile kaldırılarak farklı kùltür kaplarına pasaj işlemleri gerçekleştirildi. Bu amaç için kùltür kaplarındaki besiyeri boşaltılarak tripsinizasyon solüsyonu eklenmeden öce hücreler PBS (fostat tampon solüsyonu) ile iki kez yıkandı. Takiben PBS de kùltür kaplarından uzaklaştırılarak hücrelerin yapıştıkları yüzeyden kaldırılması için kùltür kabına kabın % 1' i nispetinde tripsinizasyon çözeltisi (Trypsin-EDTA) konularak, enzim aktivasyonunu yükseltmek için tripsinizasyon solüsyonu içeren kùltür kapları 37 C'de 10 dk. inkübasyona bırakıldı. Kùltür kabı yüzeyinden hücrelerin kaldırılmasını takiben santrifüj tüplerine aktararak 1500 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek hücreler toplandı.

Santrifügasyon işlemi soğutmalı santrifüjde aynı süre ve devirde yapılarak hücreler üzerindeki tripsinizasyon solüsyonu uzaklaştırıldı. Sonrasında santrifüj tüpündeki hücreler PBS ile resüspanse edilerek eser miktarda hücrelerde kalabilecek tripsin rezidüleri de ortamdan uzaklaştırıldı. Sonra hücre pelleti üzerine bir miktar besiyeri konarak hücreler süspanse edilerek Thoma lamında sayımları gerçekleştirildi. Deneylerde hücre yoğunluğu 1×10^6 hücre olacak şekilde üretme besiyerleri içine inoküle edilerek pasajlama işlemleri tamamlandı. Pasajlanan hücrelerin inkübasyonu yukarıda açıklandığı şartlarda gerçekleştirilmiştir.

3.4.8. Dondurma Solüsyonlarının Hazırlanması ve Hücrelerin Dondurulması

Hücre kültürü çalışmalarında pasajlanarak çoğaltılan hücreler kontaminasyon riskene karşı sürekli stoklanarak çalışılmıştır. Pasaj işlemini müteakip tripsinizasyon çözeltisi ile toplanan hücreler 1500 rpm’ de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, hücreler PBS ile resüspanse edilerek tekrar aynı şartlarda santrifüj edilerek yıkandı. Sonra hücreler Thoma lamında sayılarak ml’ de 1×10^6 hücre olacak şekilde içerisinde % 10 fetal dana serumu, % 10 DMSO bulunan RPMI-1640 besiyeri 1’er ml olacak şekilde porsiyonlanarak, kademeli dondurma işlemi gerçekleştirildi (Duran ve ark. 2000).

3.4.9. Biyoaktif Metabolit Dozunun Belirlenmesi

Probiyotik mikroorganizmalardan elde edilen biyoaktif metabolitlerin uygun dozlarının belirlenebilmesi için düz tabanlı 96 kuyucuklu mikroyokluklar kullanıldı. Mikroplaklarda hücre kontrol ve besiyeri kontrol kuyucukları ayrıldıktan sonra biyoaktif metabolitlerin farklı konsantrasyonlarının (0.975, 1.95, 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.4, 124.8, 250 µl/ml) etkinliklerini değerlendirebilmek amacıyla bu konsantrasyonlardaki biyoaktif komponentler Vero hücrelerinin üretildikleri besiyerlerine katılarak hücre kültürlerinin inkübasyonları yukarıda belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

Hücreler 24 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid) analiz yöntemi ile sitotoksikite durumu tespiti yapıldı.

3.4.10. MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] Yöntemi

Çalışmada biyoaktif metabolitlerin sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik konsantrasyonları bir kalorimetrik ve kantitatif yöntem olan MTT yöntemi ile belirlendi. MTT analizi, hücrelerde enzimatik aktivitenin değerlendirildiği enzimatik aktivitenin kolorimetrik ölçümüne dayanan bir yöntemdir (McGahon ve ark. 1995, Mosmann ve ark. 1983).

Bu yöntemde etkinliği araştırılacak olan herhangi bir etken madde ya da bileşiğin hücreler üzerindeki sitotoksik ya da proliferatif etkilerinin varlığı değerlendirilebilmektedir. Çalışmamızda *L. bulgaricus*, *L. casei*, *E. faecium* ve *S. thermophilus*' un metabolik ürünlerinin Vero hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin varlığı değerlendirildi. MTT boyası ile değişen konsantrasyonlarda inkübe edilen Vero hücrelerinde meydana gelen renk değişiminin kolorimetrik olarak belirlenmesi ile toksisite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yöntemde meydana gelen renk değişimi sarı ile renklendirilmiş formazon tuzlarının aktif hücre mitokondrilerinde tetrazolyum tuzunun azalması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Oluşan renk değişikliği spektrofotometrik olarak ölçülerek kantitasyon yapılmıştır. Biyoaktif metabolitlerin spektrofotometrede okunan absorbans değeri metabolik olarak aktivitelerinin belirlenebilmesi ile orantılı olarak elde edilmiştir.

MTT çalışması için düztabanlı 96' lık pleytlere 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde içerisinde % 1 fetal dana serumu bulunan RPMI-1640 besiyerinde hazırlanarak herbir kuyucuğa inoküle edildi. Mikroplakların pleyt tabanlarını adezyonu için 6 saat inkübe edildi (37 °C ve % 5 CO₂' li ortamda). Bu yolla inkübe edilen hücrelerde metabolik aktivitenin üst düzeylere erişimi sağlandı.

Bu süre içerisinde biyolojik aktif komponentlerin seri dilüsyonları hazırlanarak (250 µl/ml' den 0.975 µl/ml konsantrasyona kadar) adezyon yapan hücrelerin üzerine bu hazırlanan herbir dilüsyondan 4 kuyucuğa olmak üzere eklendi.

Deneylerde en az dörder kuyucuk olmak üzere hücre kontrol ve besiyeri kontrol grupları da standartlar açısından aynı anda çalışılmıştır. Biyoaktif metabolitlerin hücreler

üzerindeki etkisini görebilmek amacıyla 1 gece 37 °C'de % 5 karbondioksitli inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda her kuyucuğa 10 µl MTT eklenerek pleytler 4 saat için aynı şartlarda inkübe edildi. Absorbans ölçümleri spektrofotometre 570 nm'de gerçekleştirildi. Proliferasyon biyoaktif metabolitlerle muamele edilen kuyucuklardaki hücrelerin kontrol grubu hücrelerine oranı olarak ifade edildi. IC₅₀ değerleri SPSS programı (SPSS, Inc, Chicago) kullanılarak hesaplandı.

3.5.Biyofilm Testleri

Çalışmada biyofilm oluşumu tespiti için kongo red agar yöntemi kullanılmıştır. Bu testler Freeman ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntemle göre çalışılmıştır (1989). Kongo kırmızılı besiyeri litrede 50 gr sakkaroz, 37 gr BHI (Brain Heart Infusion) Agar ve 0.8 gr Kongo kırmızısı içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bakteri suşları kongo kırmızılı agara ekim yapıldıktan 24 saat süre ile inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonucunda, siyah koloni oluşturan suşların slime üretimi pozitif olarak kabul edilirken kırmızımtrak veya pembemsi renkli koloni oluşturan suşlar ise slime negatif olarak değerlendirilmiştir (Duran ve ark. 2010).

3.6.Virus ve Hücre Hattı

Çalışma influenza A virusun H1N1 suşu kullanıldı. Virus suşları Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Kültür koleksiyonunda daha önceki çalışmalarımızdan kullanılan ve sonrasında stoklanan suşlar arasından seçildi. Virus kökeni -80 °C'den çözüldükten sonra çoğaltılması için MDCK (Madin-Darby canine kidney) hücre hattında çoğaltıldı. Hücre hattı içerisinde %10 nispetinde dana serumu bulunan RPMI-1640 besiyeri kullanılarak pasajlandı. İnkübasyon ısısı ve koşulları hücre üretilmesi alt başlığında anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

Hücre kültürleri % 80 nispetinde kültür kabı yüzeyini kapladığında, kültür kaplarından besiyeri alınarak hücre yüzeyi PBS ile yıkanarak H1N1 virus suşu ile infekte edildi. Viral absorpsiyon için 37 °C’ de 1 saat bekletildikten sonra, kültür kabı içerisine serum içermeyen besiyeri (sadece RPMI-1640) ile inkübasyona bırakıldı.

Günlük olarak inverted mikroskopta incelenerek viral üremenin varlığı sitopatolojik değişimler takip edilerek gerçekleştirildi.

Deneylerde virus kökenlerinin 1, 10, ve 100xTCID₅₀ (Tissue Culture of Infectious Dose) infektif dozdaki virus kökenleri kullanıldı. Viral kültür pleytleri 37° C’ de % 5 karbondioksitli inkübatörde gerçekleştirildi.

3.6.1. Standard İlaçlar

Çalışmada standart ilaç olarak Osetalmivir (Roche) kullanıldı. Osetalmivir DMSO (dimetil sülfoksit) ile çözülerek (0.1, 0.5, 1, 5 ve 10 nM) kullanıldı.

3.6.2. Aktivite Çalışmaları

Çalışmada öncelikle, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *E. faceum* ve *S. thermophilus*’ un biyoaktif metabolitlerinin toksik olmayan konsantrasyonları Vero hücre hattında belirlendi. Antiviral aktivite çalışmaları bu önceden belirlenmiş toksik olmayan konsantrasyonlarla gerçekleştirildi. Sitotoksik etkiyi belirlemeye yönelik çalışmalar MTT metodu ile gerçekleştirildi. Biyoaktif metabolitlerin influenza virus (H1N1)’ ye karşı antiviral etkisini araştırmak için, hücre kültürleri, ml başına 1x10⁵ hücre içerecek şekilde hazırlandı. Hücre adezyonu için 6 saatlik inkübasyonun ardından, farklı konsantrasyonlarda probiyotik

bakterilerin biyoaktif metabolitleri farklı konsantrasyonlarda (0.975, 1.95, 3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.4, 124.8, 250 µl/ml) kültür ortamlarına eklendi. Kontrol grubu olarak içerisinde biyoaktif metabolit bulunmayan kültürler deney grubu ile aynı zamanda inkübasyona bırakıldı. Biyoaktif metabolit içermeyen kültürler negatif kontrol olarak, osetalmivir ise (0.1, 0.5, 1, 5 ve 10 nM) pozitif kontrol olarak seçildi. Bütün deneyler 3 kopya halinde 2 kez yapıldı. İnkübasyondan sonra, hücreler % 0.25 tripsinizasyon solüsyonu ile kültür kaplarından kaldırılarak santrifüj tüplerine alındı. Hücreler, soğutmalı santrifüjde (+4 °C' de) 1500 rpm' de 10 dakika santrifüj ile toplandı ve hücre canlılığının tespiti yapıldı.

3.6.3. Virus Titrasyonu

MDCK hücrelerinde çoğaltılan virus suşu re-aktive edildikten sonra virus titrasyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla hücreler 1×10^5 hücre/ml olacak yoğunlukta hazırlanarak 96 kuyucuklu kültür plaklarına inoküle edildi. Daha sonra 24 saat süreyle % 5 CO₂ içeren nemlendirilmiş bir atmosferde 37 °C'de inkübe edildi. Virus stoklarının seri dilüsyonları hazırlandı ve hücreler bu dilüsyonlara göre enfekte edildi. Bu koşullarda en az 72 saat süreyle inkübe edildi. Viral üreme sitopatolojik etki varlığına göre değerlendirildi. Yüzde elli doku kültürü enfektif dozu (TCID₅₀) daha önce Reed ve Münch (1938) tarafından tarif edildiği gibi hesaplandı.

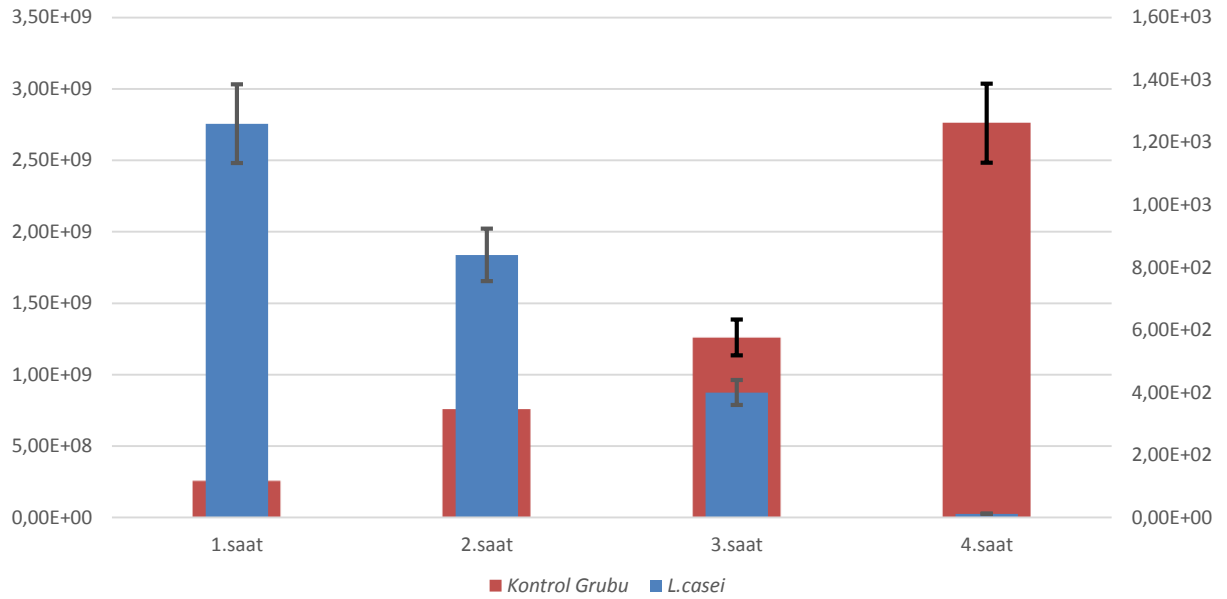
3.7.İstatistiksel Analiz

Tüm dataların istatistiksel analizlerinde chi-square testi kullanıldı. İstatistiksel analizler SPSS program kullanılarak gerçekleştirildi (Statistical Package for Social Sciences for Windows software, Chicago, ABD).

4. BULGULAR

Çalışmada öncelikle probiyotik mikroorganizmaların (*L. casei*, *L. bulgaricus*, *E. faecium* ve *S. thermophilus*) önemli bakteriyel insan patojenleri (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *P. mirabilis*) ile influenza virus (H1N1)' a karşı antibakteriyel ve antiviral etkinlikleri araştırılmıştır.

Bunun yanında, probiyotik mikroorganizma biyoaktif metabolitlerinin slime üreten *S. aureus* kökenleri üzerinde slime üretimi üzerinde etkisi ile *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *P. mirabilis* kökenleri üzerinde de hareket (swarming hareketi) üzerindeki etkilerinin varlığı araştırılmıştır.

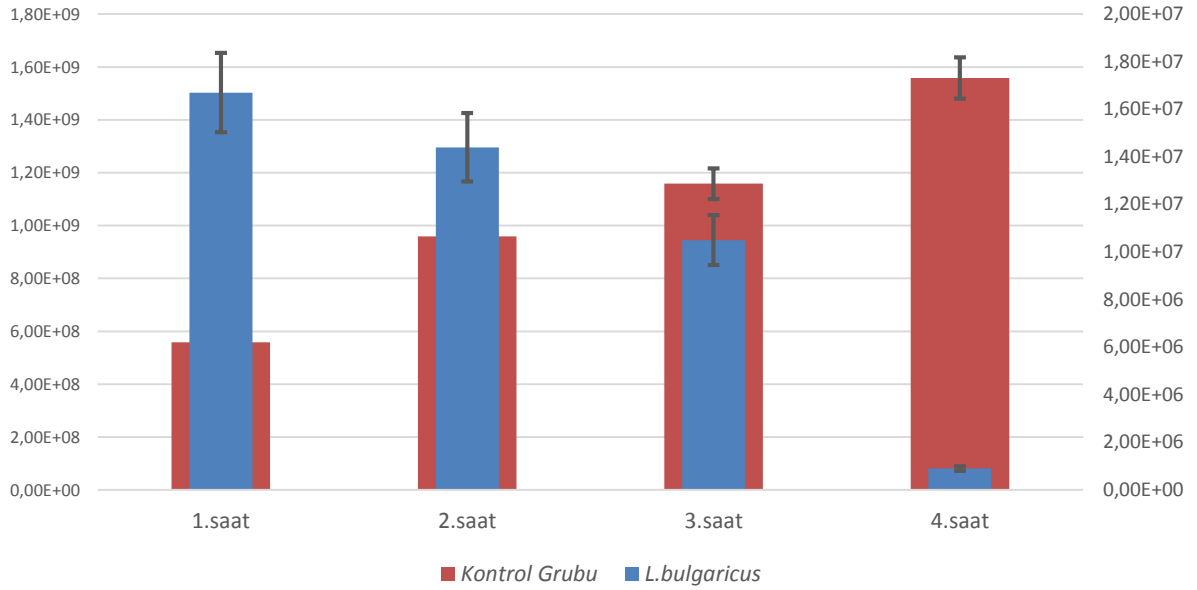


Şekil 4.1. *L. casei*' nin biyoaktif metabolitlerinin *S. aureus* üremesi üzerindeki etkisi.

L. casei' nin biyoaktif metabolitlerinin *S. aureus* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinlikleri Şekil 4.1' de görülmektedir. Şekilde *S. aureus*' un, probiyotik mikroorganizmalardan *L. casei* sekonder biyoaktif metabolitleriyle muamele edilmesinin birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerinde mikroorganizmanın üremesi üzerindeki etkileri verilmiştir. Probiyotik mikroorganizmalardan *L. casei* metabolitlerini birinci saatten itibaren *S. aureus* kökenlerinin üremesini istatistiksel olarak anlamlı derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir.

L. casei metabolitleriyle muamele edilen *S. aureus* kökenleri ile, metabolitlere maruz bırakılmadan inkübe edilen (kontrol grubu) *S. aureus* kökenlerinin istatistiksel olarak kıyaslaması zamana göre aşağıda verilmiştir.

- 1. saatte;
L. casei&Kontrol grubu: $P < 0.001$
- 2. saatte;
L. casei&Kontrol grubu: $P < 0.001$
- 3. saatte;
L. casei&Kontrol grubu: $P < 0.001$
- 4. saatte;
L. casei&Kontrol grubu: $P < 0.000$



Şekil 4.2. *L. bulgaricus*' un biyoaktif metabolitlerinin *S. aureus* üremesi üzerindeki etkisi.

Şekil 4.2' de *L. bulgaricus*' un biyoaktif metabolitlerinin *S. aureus* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinlikleri görülmektedir. Şekilde sekonder biyoaktif metabolitlerle muamele edilen *S. aureus*' un birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerinde mikroorganizmanın üremesi üzerindeki etkileri verilmiştir. Probiyotik mikroorganizmalardan *L. bulgaricus*' un metabolitlerinin birinci saatten itibaren *S. aureus* kökenlerinin üremesini istatistiksel olarak anlamlı derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir.

L. bulgaricus metabolitleriyle muamele edilen *S. aureus* kökenleri ile metabolitlere maruz bırakılmadan inkübe edilen (kontrol grubu) *S. aureus* kökenlerinin istatistiksel olarak kıyaslaması zamana göre aşağıda verilmiştir.

1. saatte;

L. bulgaricus&Kontrol grubu: $P < 0.05$

2. saatte;

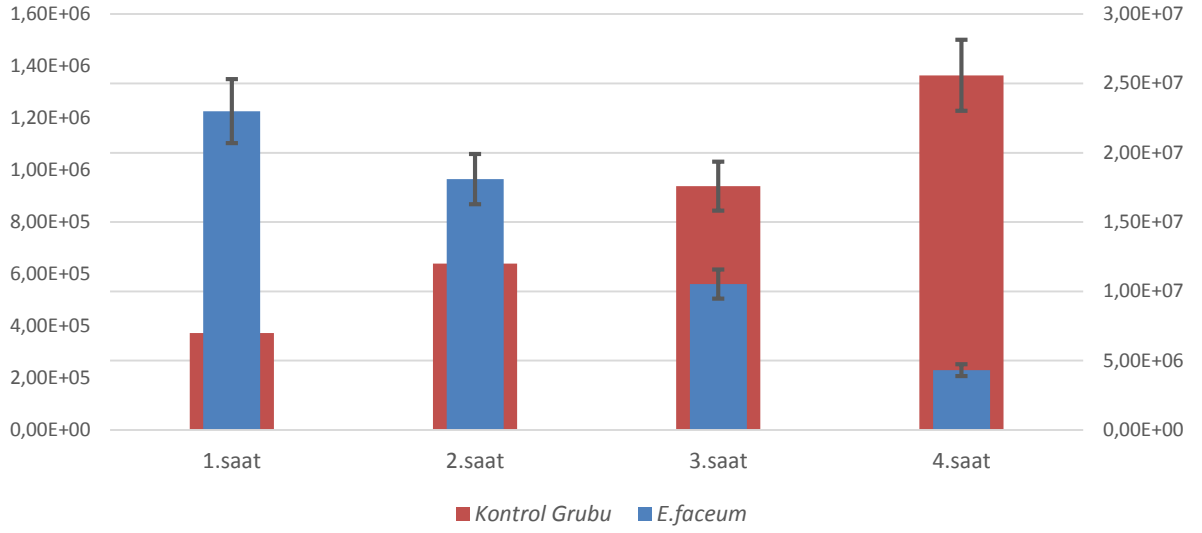
L. bulgaricus&Kontrol grubu: $P < 0.001$

3. saatte;

L. bulgaricus&Kontrol grubu: $P < 0.001$

4. saatte;

L. bulgaricus&Kontrol grubu: $P > 0.000$



Şekil 4.3. *E. faecium*' un biyoaktif metabolitlerinin *S. aureus* üremesi üzerindeki etkisi.

Şekil 4.3' de *E. faecium*' un biyoaktif metabolitlerinin *S. aureus* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinlikleri görülmektedir. Çalışmada *E. faecium* suşlarının sekonder biyoaktif metabolitlerle muamele edilmesinin birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerinde mikroorganizmanın üremesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Probiyotik mikroorganizmlardan *E. faecium* metabolitlerinin birinci saatten itibaren *S. aureus* kökenlerinin üremesini istatistiksel olarak anlamlı derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir. Çalışmada biyoaktif metabolitlerin inhibitör etkisinin süre ile doğrudan ilişkili olarak arttığı tespit edilmiştir.

E. faecium' un metabolitleriyle muamele edilen *S. aureus* kökenleri ile, metabolitlere maruz bırakılmadan inkübe edilen (kontrol grubu) *S. aureus* kökenlerinin istatistiksel olarak kıyaslaması zamana göre aşağıda verilmiştir.

1.saatte;

E. faecium&Kontrol grubu: $P < 0.05$

2.saatte;

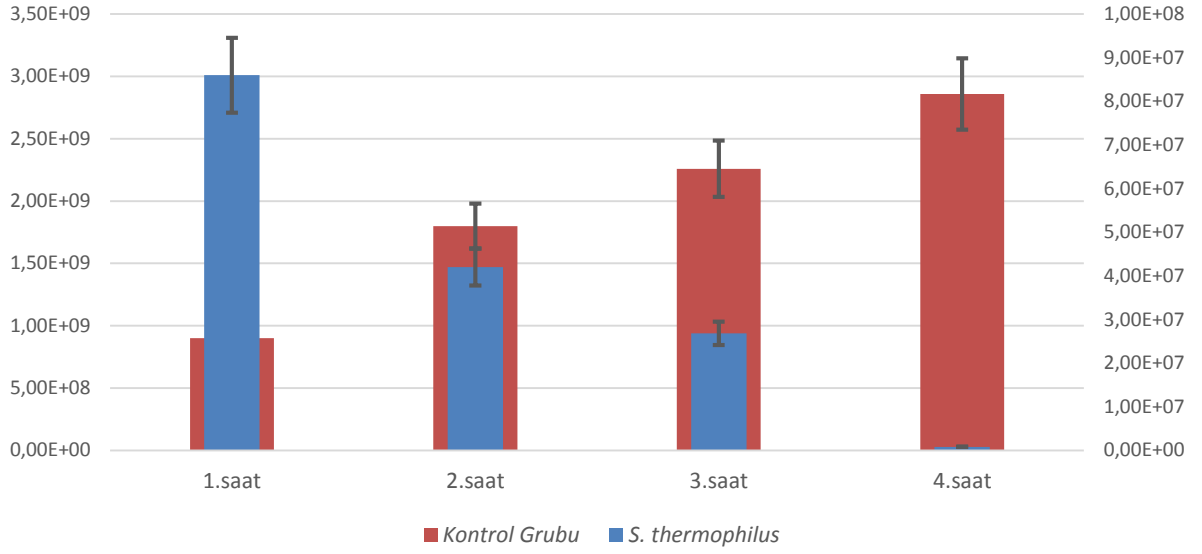
E. faecium&Kontrol grubu: $P < 0.001$

3.saatte;

E. faecium&Kontrol grubu: $P < 0.001$

4.saatte;

E. faecium&Kontrol grubu: $P > 0.000$

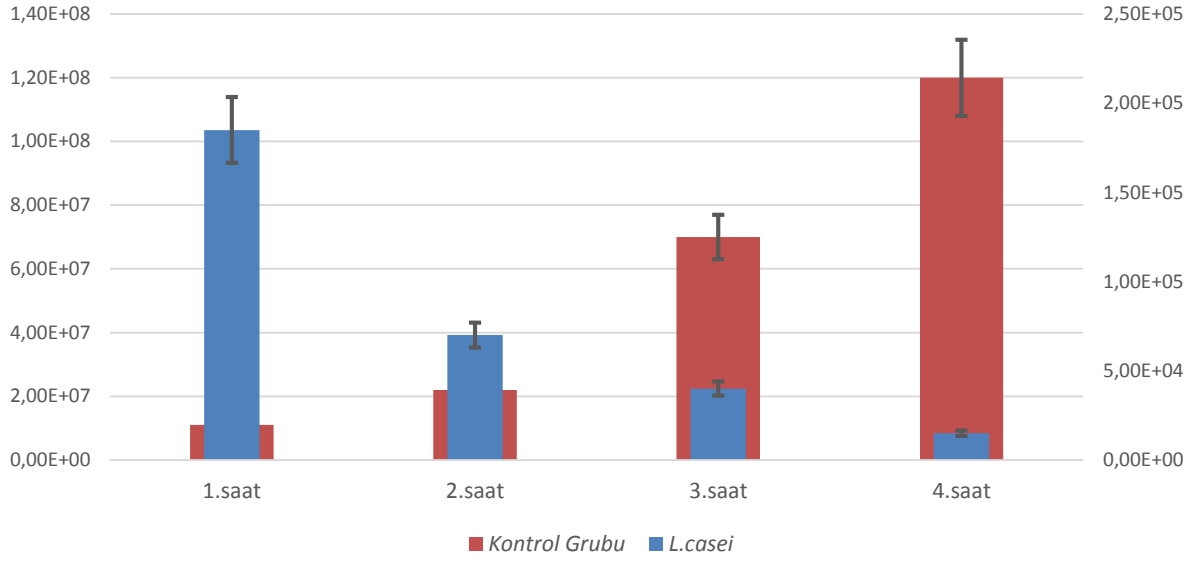


Şekil 4.4. *S. thermophilus*' un biyoaktif metabolitlerinin *S. aureus* üremesi üzerindeki etkisi.

Şekil 4.4' de ise probiyotik mikroorganizmalardan sonuncusu olan *S. thermophilus*' un biyoaktif metabolitlerinin *S. thermophilus* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinlikleri görülmektedir. Sekonder biyoaktif metabolitlerle muamele edilen *S. thermophilus* kökenleri inkübasyonun birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerinde bakteri üremesi üzerindeki etkisinin giderek arttığı, yani zaman ilişkili bir inhibisyon varlığı gözlenmiştir. Çalışmada *S. thermophilus* metabolitlerinin birinci saatten itibaren *S. aureus* kökenlerinin üremesini istatistiksel olarak anlamlı derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir.

S. thermophilus' un metabolitleriyle muamele edilen *S. aureus* kökenleri ile, metabolitlere maruz bırakılmadan inkübe edilen (kontrol grubu) *S. aureus* kökenlerinin istatistiksel olarak kıyaslaması zamana göre aşağıda verilmiştir.

- 1. saatte;
S. thermophilus&Kontrol grubu: $P < 0.05$
- 2. saatte;
S. thermophilus&Kontrol grubu: $P < 0.001$
- 3. saatte;
S. thermophilus&Kontrol grubu: $P < 0.000$
- 4. saatte;
S. thermophilus&Kontrol grubu: $P > 0.000$

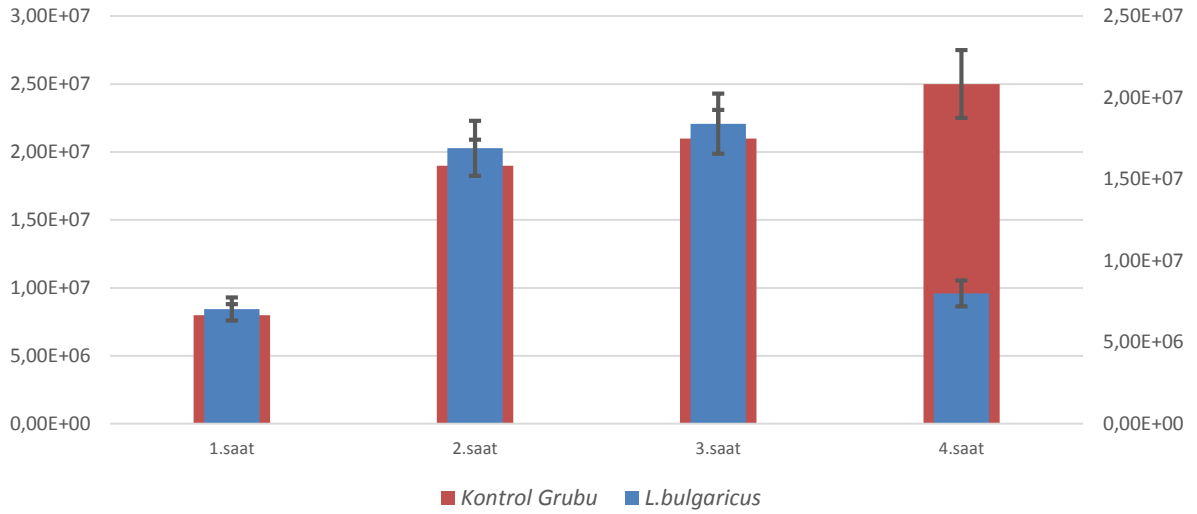


Şekil 4.5. *L. casei*' nin biyoaktif metabolitlerinin *E. coli* üremesi üzerindeki etkisi.

Şekil 4.5' de görüldüğü gibi bu grup deneylerde probiyotik mikroorganizma metabolitlerinin *E. coli* kökenleri üzerindeki etkinlikleri değerlendirilmiştir. *L. casei*' nin biyoaktif metabolitlerinin *E. coli* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliğinin araştırıldığı deneylerde *E. coli* kökenlerinin biyoaktif metabolitlerle muamele edilmesinin birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerinde mikroorganizmanın üremesi üzerindeki etkileri görülmektedir. Probiyotik mikroorganizmalardan *L. casei*' nin metabolitlerinin birinci saatten itibaren *E. coli* kökenlerinin üremesini istatistiksel olarak anlamlı derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu anlamlı etkinin 4 saat muamele ile oldukça anlamlı olarak tespit edildiği görülmektedir.

L. casei' nin metabolitleriyle muamele edilen *E. coli* kökenleri ile, metabolitlere maruz bırakılmadan inkübe edilen (kontrol grubu) *E. coli* kökenlerinin istatistiksel olarak kıyaslaması zamana göre aşağıda verilmiştir.

- 1. saatte;
L. casei&Kontrol grubu: $P < 0.05$
- 2. saatte;
L. casei&Kontrol grubu: $P < 0.001$
- 3. saatte;
L. casei&Kontrol grubu: $P < 0.000$
- 4. saatte;
L. casei&Kontrol grubu: $P > 0.000$



Şekil 4.6. *L. bulgaricus*' un biyoaktif metabolitlerinin *E. coli* üremesi üzerindeki etkisi.

Şekil 4.6'da ise *L. bulgaricus*' un biyoaktif metabolitlerinin *E. coli* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinlikleri görülmektedir. Şekilden de anlaşılabacağı gibi *E. coli* kökenlerinin sekonder biyoaktif metabolitlerle muamele edilmesinin birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerinde mikroorganizmanın üremesi üzerindeki etkileri verilmiştir. Probiyotik mikroorganizmalardan *L. bulgaricus* metabolitleri ile muamele edilen *E. coli* kökenlerinin sayısında birinci, ikinci ve üçüncü saat sonunda istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık tespit edilmezken, dördüncü saat sonunda metabolitlerin *E. coli* kökenlerinin üremesini istatistiksel olarak anlamlı derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir.

L. bulgaricus' un metabolitleriyle muamele edilen *E. coli* kökenleri ile, metabolitlere maruz bırakılmadan inkübe edilen (kontrol grubu) *E. coli* kökenlerinin istatistiksel olarak kıyaslaması zamana göre aşağıda verilmiştir.

1. saatte;

L. bulgaricus&Kontrol grubu: $P>0.05$

2. saatte;

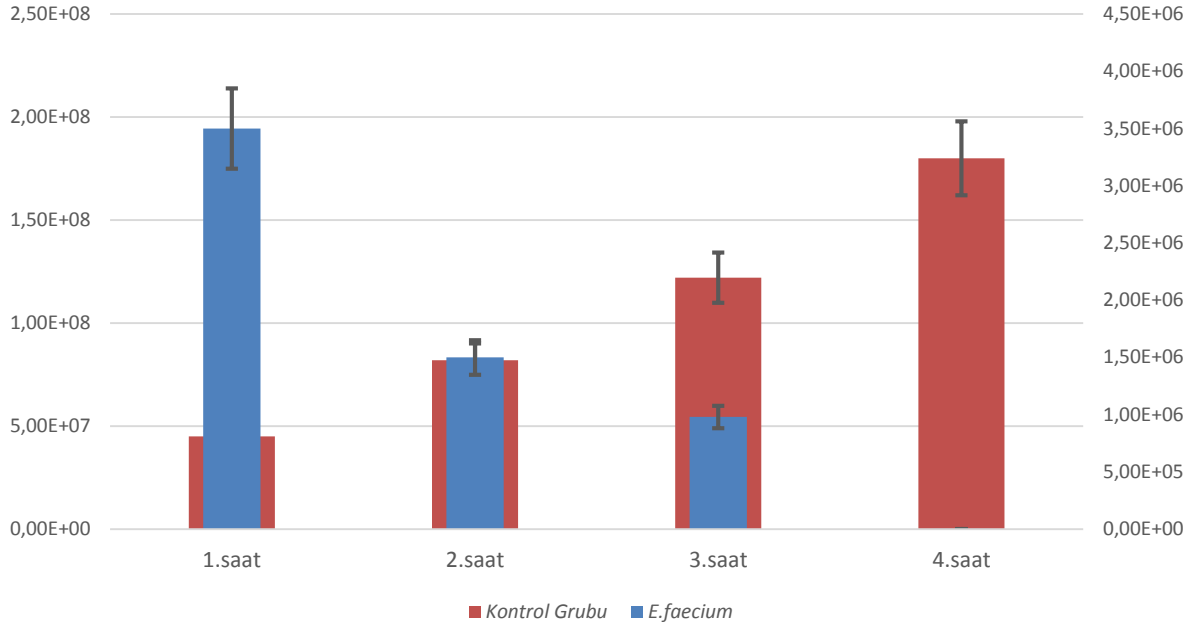
L. bulgaricus&Kontrol grubu: $P>0.05$

3. saatte;

L. bulgaricus&Kontrol grubu: $P>0.05$

4. saatte;

L. bulgaricus&Kontrol grubu: $P<0.05$



Şekil 4.7. *E. faecium*' un biyoaktif metabolitlerinin *E. coli* üremesi üzerindeki etkisi.

Şekil 4.7' de *E. faecium*' un biyoaktif metabolitlerinin *E. coli* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinlikleri görülmektedir. Şekilden de anlaşılabacağı gibi sekonder biyoaktif metabolitlerle muamele edilen *E.coli* kökenlerinin inkübasyonun 1.saati sonunda bakteri üremesi üzerinden anlamlı derecede inhibitor etki göstermezken, 2. ve 3.saat sonunda anlamlı hücre üremesi üzerinden istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma meydana geldiği, bu azalmanın 4.saat sonunda ise daha da belirginleştiği tespit edilmiştir.

E. faecium' un metabolitleriyle muamele edilen *E. coli* kökenleri ile, metabolitlere maruz bırakılmadan inkübe edilen (kontrol grubu) *E. coli* kökenlerinin istatistiksel olarak kıyaslaması zamana göre aşağıda verilmiştir.

1.saatte;

E. faecium&Kontrol grubu: $P>0.05$

2.saatte;

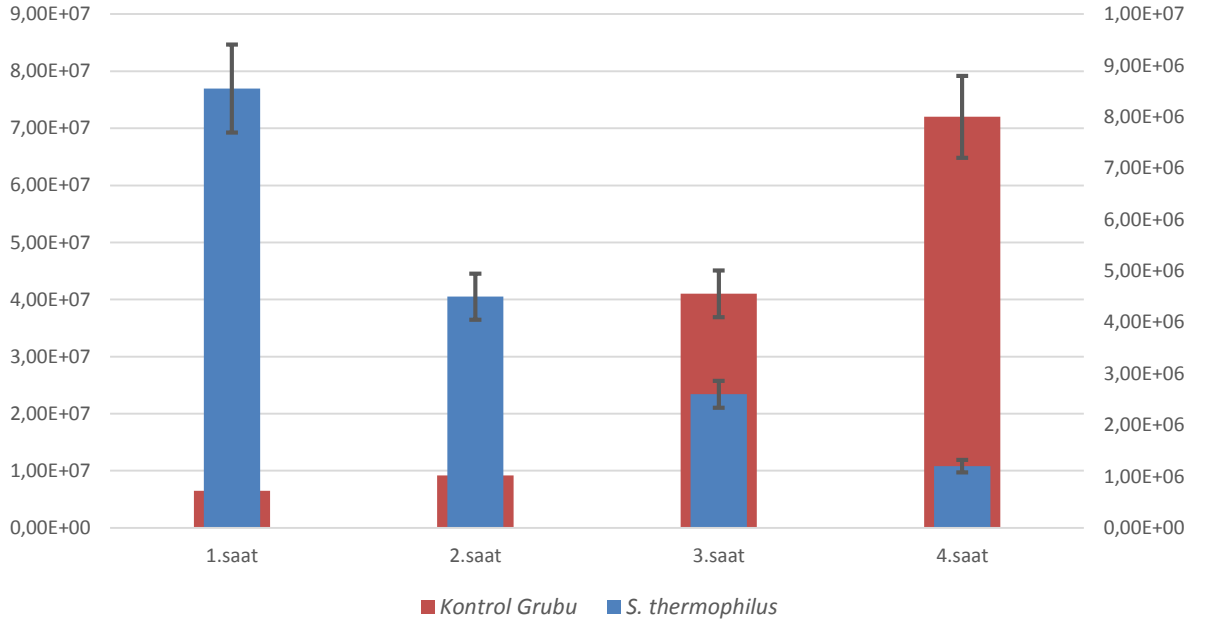
E. faecium&Kontrol grubu: $P<0.05$

3.saatte;

E. faecium&Kontrol grubu: $P<0.05$

4.saatte;

E. faecium&Kontrol grubu: $P<0.01$



Şekil 4.8. *S. thermophilus*' un biyoaktif metabolitlerinin *E. coli* üremesi üzerindeki etkisi.

Şekil 4.8' de *S. thermophilus*' un biyoaktif metabolitlerinin *E. coli* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinlikleri görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi metabolitlerle muamele edilen hücrelerin sayısında 1.ve 2. saat sonunda istatistiksel açıdan anlamlı bir azalama meydana gelmez iken, 3. ve 4. saat sonunda metabolitlerin bakteri hücreleri üzerinde inhibitör etkisinin anlamlı düzeyde meydana geldiği tespit edilmiştir.

S. thermophilus' un metabolitleriyle muamele edilen *E. coli* kökenleri ile, metabolitlere maruz bırakılmadan inkübe edilen (kontrol grubu) *E. coli* kökenlerinin istatistiksel olarak kıyaslaması zamana göre aşağıda verilmiştir.

1.saatte;

S. thermophilus&Kontrol grubu: $P>0.05$

2.saatte;

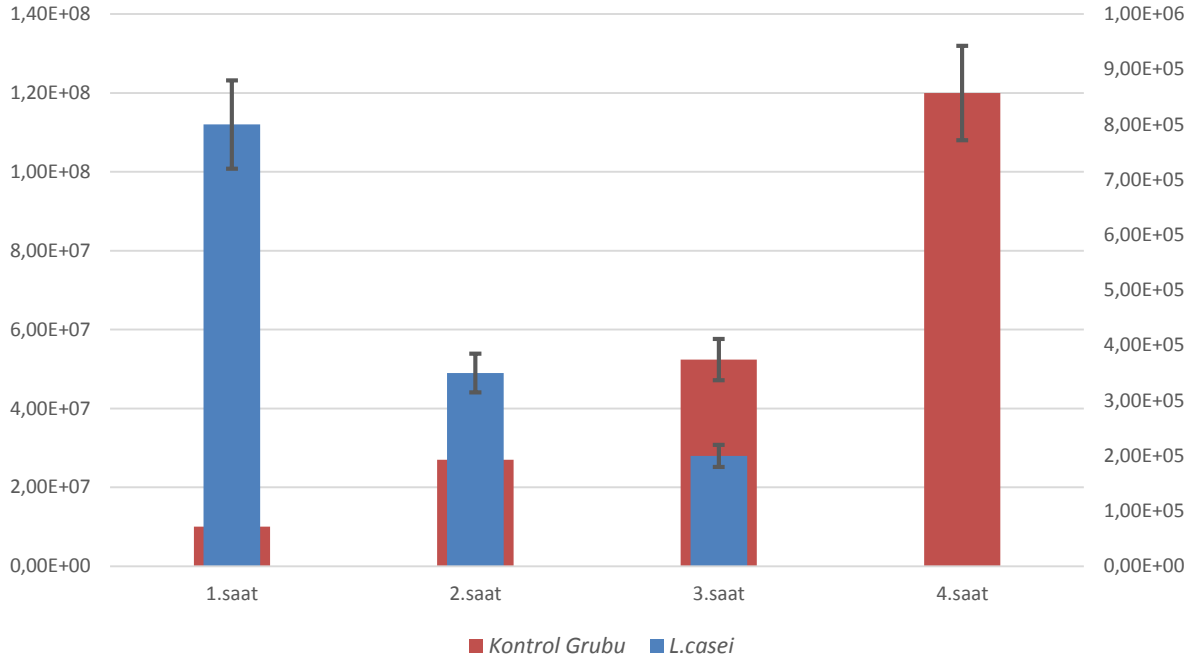
S. thermophilus&Kontrol grubu: $P>0.05$

3.saatte;

S. thermophilus&Kontrol grubu: $P<0.05$

4.saatte;

S. thermophilus&Kontrol grubu: $P<0.05$



Şekil 4.9. *L. casei*' nin biyoaktif metabolitlerinin *P. aeruginosa* üremesi üzerindeki etkisi.

Şekil 4.9' de *L. casei*' nin biyoaktif metabolitlerinin *P. aeruginosa* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinlikleri görülmektedir. Şekilde sekonder biyoaktif metabolitlerle muamele edilmesinin birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerinde mikroorganizmanın üremesi üzerindeki etkileri verilmiştir. Probiyotik mikroorganizmlardan *L. casei*' nin metabolitlerinin birinci saatten itibaren *P. aeruginosa* kökenlerinin üremesini istatistiksel olarak anlamlı derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir.

L. casei' nin metabolitleriyle muamele edilen *P. aeruginosa* kökenleri ile, metabolitlere maruz bırakılmadan inkübe edilen (kontrol grubu) *P. aeruginosa* kökenlerinin istatistiksel olarak kıyaslaması zamana göre aşağıda verilmiştir.

1. saatte;

L. casei&Kontrol grubu: $P < 0.05$

2. saatte;

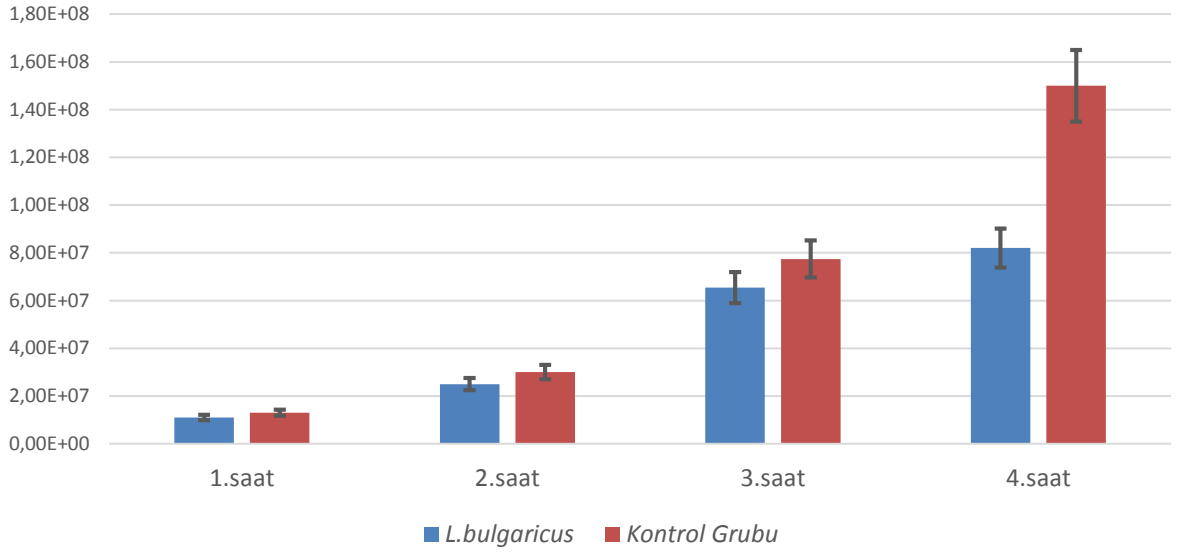
L. casei&Kontrol grubu: $P < 0.001$

3. saatte;

L. casei&Kontrol grubu: $P < 0.0001$

4. saatte;

L. casei&Kontrol grubu: $P < 0.000$

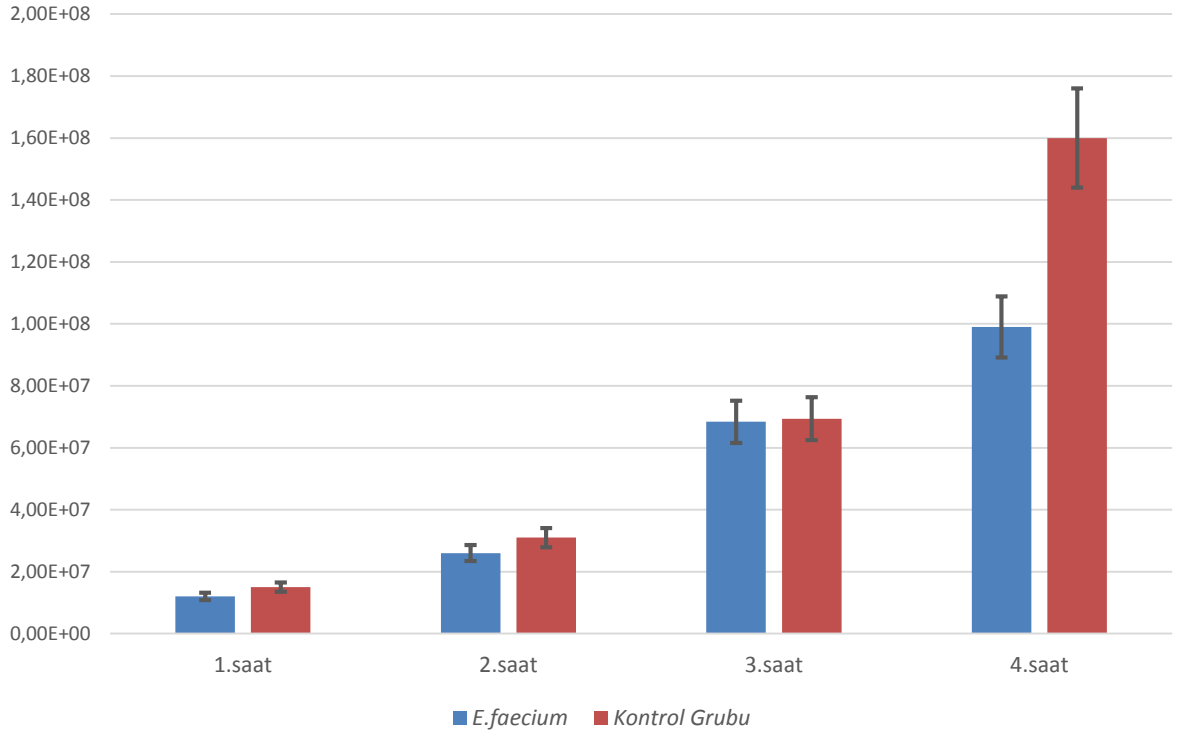


Şekil 4.10. *L. bulgaricus*' un biyoaktif metabolitlerinin *P. aeruginosa* üremesi üzerindeki etkisi.

Şekil 4.10'de *L. bulgaricus*' un biyoaktif metabolitlerinin *P. aeruginosa* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinlikleri görülmektedir. Şekilde sekonder biyoaktif metabolitlerle muamele edilmesinin birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerinde mikroorganizmanın üremesi üzerindeki etkileri verilmiştir. Probiyotik mikroorganizmlardan *L. bulgaricus*' un metabolitleri birinci, ikinci ve üçüncü saatte *P. aeruginosa* kökenleri üzerinde anlamlı bir inhibitör etki göstermezken, biyoaktif metabolitlerle 4 saat muamele edildikten sonra hücre sayımı yapıldığında *P. aeruginosa* sayısında anlamlı bir azalmanın meydana geldiği tespit edilmiştir.

L. bulgaricus' un metabolitleriyle muamele edilen *P. aeruginosa* kökenleri ile, metabolitlere maruz bırakılmadan inkübe edilen (kontrol grubu) *P. aeruginosa* kökenlerinin istatistiksel olarak kıyaslaması zamana göre aşağıda verilmiştir.

- 1. saatte;
L. bulgaricus&Kontrol grubu: $P > 0.05$
- 2. saatte;
L. bulgaricus&Kontrol grubu: $P > 0.05$
- 3. saatte;
L. bulgaricus&Kontrol grubu: $P > 0.05$
- 4. saatte;
L. bulgaricus&Kontrol grubu: $P < 0.05$

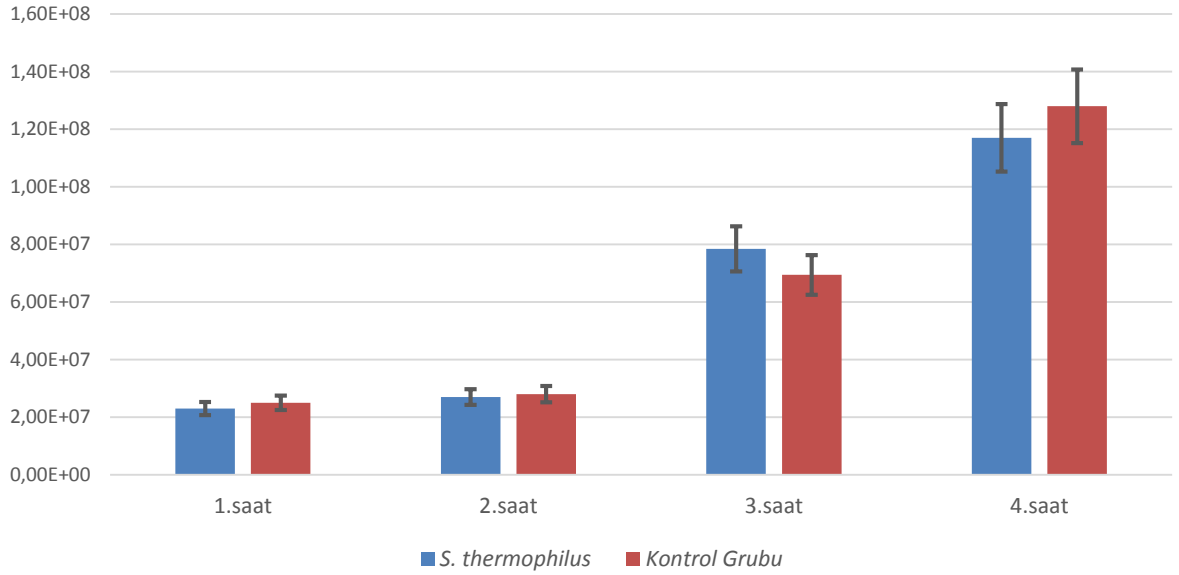


Şekil 4.11. *E. faecium*' un biyoaktif metabolitlerinin *P. aeruginosa* üremesi üzerindeki etkisi.

E. faecium' un biyolojik aktif metabolitlerinin *P. aeruginosa* üzerindeki etkisi *L. bulgaricus* ile elde edilen bulgulara benzer olarak, metabolitlerin dördüncü saatinden sonra hücre sayısında anlamlı azalma meydana getirmiştir (Şekil 4.11).

E. faecium' un metabolitleriyle muamele edilen *P. aeruginosa* kökenleri ile, metabolitlere maruz bırakılmadan inkübe edilen (kontrol grubu) *P. aeruginosa* kökenlerinin istatistiksel olarak kıyaslaması zamana göre aşağıda verilmiştir.

- 1. saatte;
E. faecium&Kontrol grubu: $P>0.05$
- 2. saatte;
E. faecium&Kontrol grubu: $P>0.05$
- 3. saatte;
E. faecium&Kontrol grubu: $P>0.05$
- 4. saatte;
E. faecium&Kontrol grubu: $P<0.05$



Şekil 4.12. *S. thermophilus*' un biyoaktif metabolitlerinin *P. aeruginosa* üremesi üzerindeki etkisi.

Probiyotik mikroorganizmalardan *S. thermophilus* ile yapılan çalışmalarda *S. thermophilus*' un biyoaktif metabolitlerinin *P. aeruginosa* izolatlarına karşı her dört saat inkübasyonlarda da istatistiksel olarak anlamlı bir etkinin gözlenmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.12).

S. thermophilus' un metabolitleriyle muamele edilen *P. aeruginosa* kökenleri ile, metabolitlere maruz bırakılmadan inkübe edilen (kontrol grubu) *P. aeruginosa* kökenlerinin istatistiksel olarak kıyaslaması zamana göre aşağıda verilmiştir.

1.saatte;

S. thermophilus&Kontrol grubu: $P > 0.05$

2.saatte;

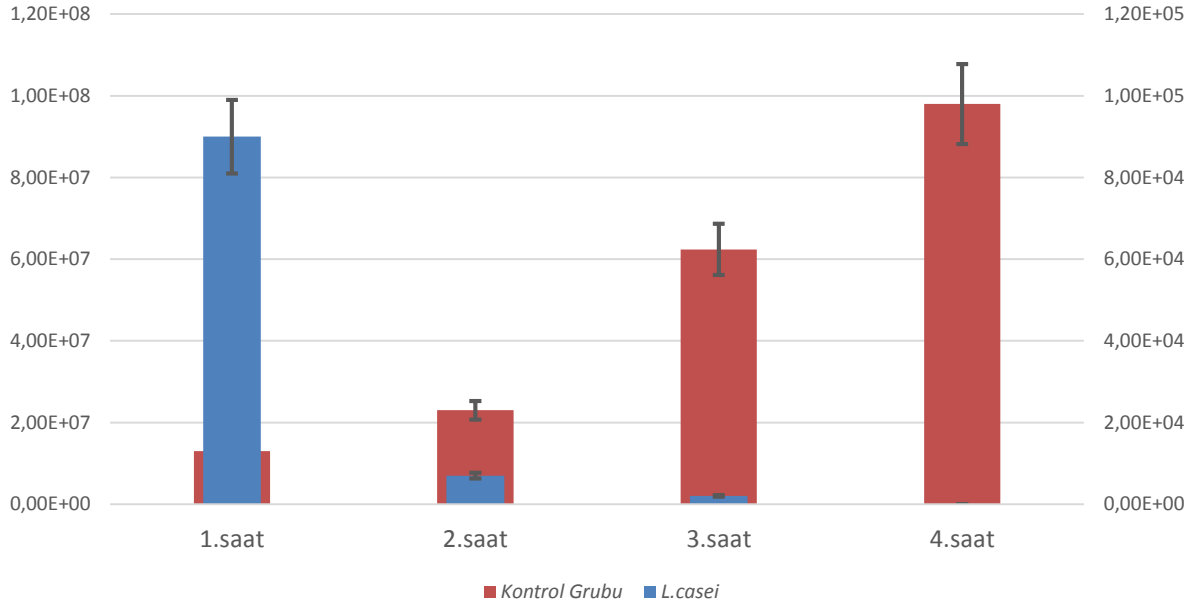
S. thermophilus&Kontrol grubu: $P > 0.05$

3.saatte;

S. thermophilus&Kontrol grubu: $P > 0.05$

4.saatte;

S. thermophilus&Kontrol grubu: $P > 0.05$



Şekil 4.13. *L. casei*' nin biyoaktif metabolitlerinin *P. mirabilis* üremesi üzerindeki etkisi.

Şekil 4.13' de *L. casei*' nin biyoaktif metabolitlerinin *P. mirabilis* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinlikleri görülmektedir. Şekilde sekonder biyoaktif metabolitlerle muamele edilmesinin birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerinde mikroorganizmanın üremesi üzerindeki etkileri verilmiştir. Probiyotik mikroorganizmlardan *L. casei*' nin metabolitlerinin birinci saatten itibaren *P. mirabilis* kökenlerinin üremesini istatistiksel olarak anlamlı derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bakteri hücre sayısında bu anlamlı azalmasının inkübasyon süresiyle doğru orantılı olarak arttığı saptanmıştır.

L. casei' nin metabolitleriyle muamele edilen *P. mirabilis* kökenleri ile, metabolitlere maruz bırakılmadan inkübe edilen (kontrol grubu) *P. mirabilis* kökenlerinin istatistiksel olarak kıyaslaması zamana göre aşağıda verilmiştir.

1. saatte;

L. casei&Kontrol grubu: $P < 0.01$

2. saatte;

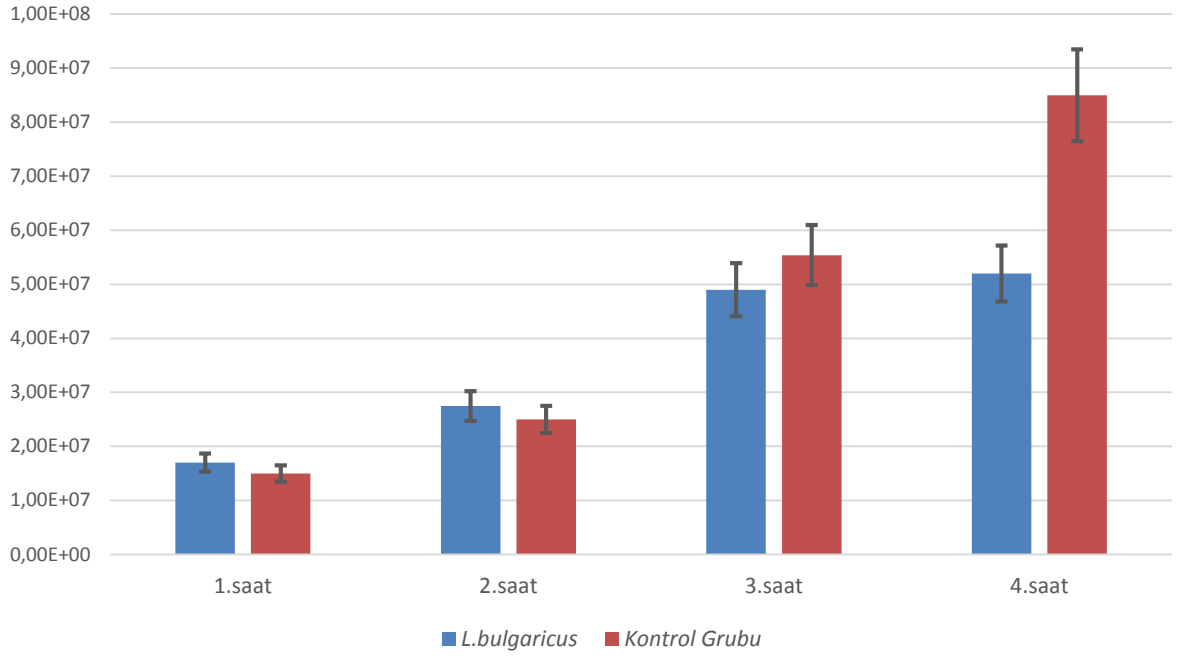
L. casei&Kontrol grubu: $P < 0.001$

3. saatte;

L. casei&Kontrol grubu: $P < 0.001$

4. saatte;

L. casei&Kontrol grubu: $P > 0.000$



Şekil 4.14. *L. bulgaricus*' un biyoaktif metabolitlerinin *P. mirabilis* üremesi üzerindeki etkisi.

L. bulgaricus' un biyoaktif metabolitlerinin ise *P. mirabilis* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliklerinin araştırıldığı deneylerde, metabolitlerin birinci, ikinci ve üçüncü saatler sonunda *P. mirabilis* sayısında anlamlı bir azalma meydana getirmezken, dördüncü saat inkübasyon sonucunda bakteri hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalma meydana getirdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.14).

P. mirabilis metabolitleriyle muamele edilen *P. mirabilis* kökenleri ile, metabolitlere maruz bırakılmadan inkübe edilen (kontrol grubu) *P. mirabilis* kökenlerinin istatistiksel olarak kıyaslaması zamana göre aşağıda verilmiştir.

1. saatte;

L. bulgaricus&Kontrol grubu: $P>0.05$

2. saatte;

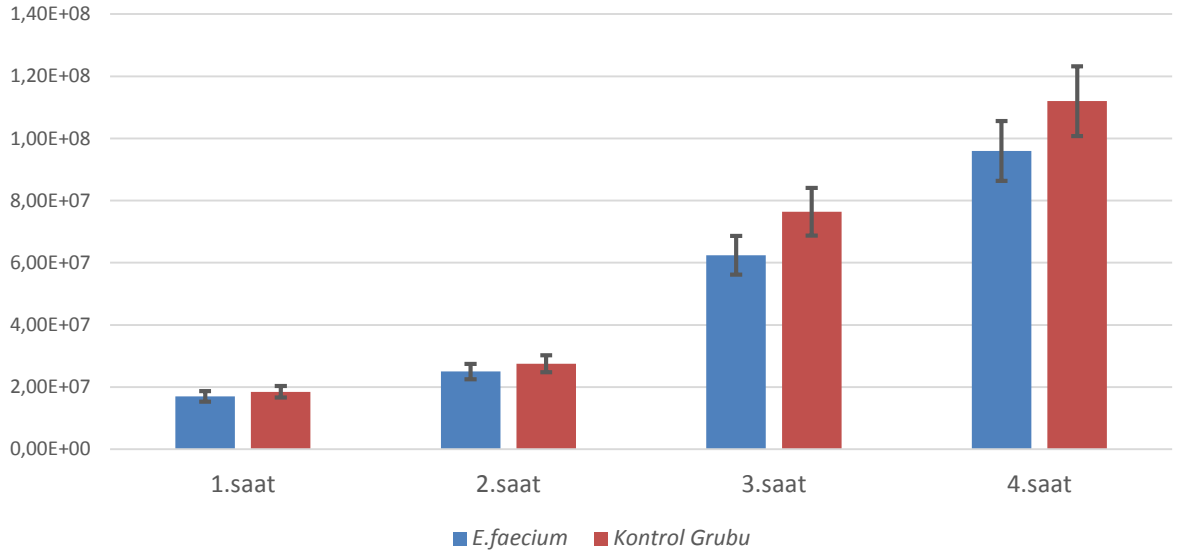
L. bulgaricus&Kontrol grubu: $P>0.05$

3. saatte;

L. bulgaricus&Kontrol grubu: $P>0.05$

4. saatte;

L. bulgaricus&Kontrol grubu: $P<0.05$



Şekil 4.15. *E. faecium*' un biyoaktif metabolitlerinin *P. mirabilis* üremesi üzerindeki etkisi.

Şekil 4.15'de de görüldüğü gibi probiyotik mikroorganizmalardan *E. faecium*' un biyoaktif metabolitlerinin *P. mirabilis* izolatlarına karşı kontrol grubuyla kıyaslandığında inkübasyonun dört farklı zamanlarında da herhangi bir antimikrobiyal etkinlik göstermedikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.15). *E. faecium*' un metabolitleriyle muamele edilen *P. mirabilis* kökenleri ile, metabolitlere maruz bırakılmadan inkübe edilen (kontrol grubu) *P. mirabilis* kökenlerinin istatistiksel olarak kıyaslaması zamana göre aşağıda verilmiştir.

1. saatte;

E. faecium&Kontrol grubu: $P > 0.05$

2. saatte;

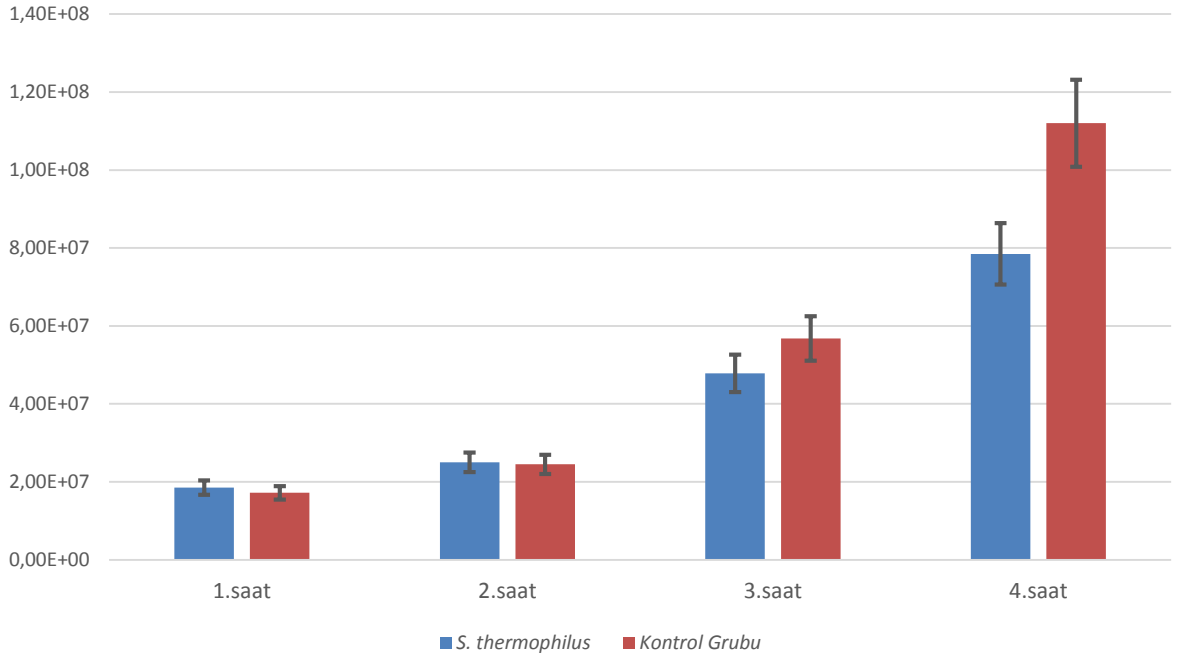
E. faecium&Kontrol grubu: $P > 0.05$

3. saatte;

E. faecium&Kontrol grubu: $P > 0.05$

4. saatte;

E. faecium&Kontrol grubu: $P > 0.05$



Şekil 4.16. *S. thermophilus*' un biyoaktif metabolitlerinin *P. mirabilis* üremesi üzerindeki etkisi.

P. mirabilis' e karşı *S. thermophilus*' un biyoaktif metabolitlerinin etkinliğinin araştırıldığı deneylerde ise biyoaktif metabolitlerin birinci, ikinci ve üçüncü saatlerde bakteri hücreleri üzerinde herhangi bir inhibitör etkilerinin olmadığı tespit edilirken, inkübasyonun dördüncü saati sonunda ise kontrol grubuyla kıyaslandığında *P. mirabilis* kökenleri üzerinden anlamlı bir azalama meydana getirdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.16).

S. thermophilus' un metabolitleriyle muamele edilen *P. mirabilis* kökenleri ile, metabolitlere maruz bırakılmadan inkübe edilen (kontrol grubu) *P. mirabilis* kökenlerinin istatistiksel olarak kıyaslaması zamana göre aşağıda verilmiştir.

1. saatte;

S. thermophilus&Kontrol grubu: $P>0.05$

2. saatte;

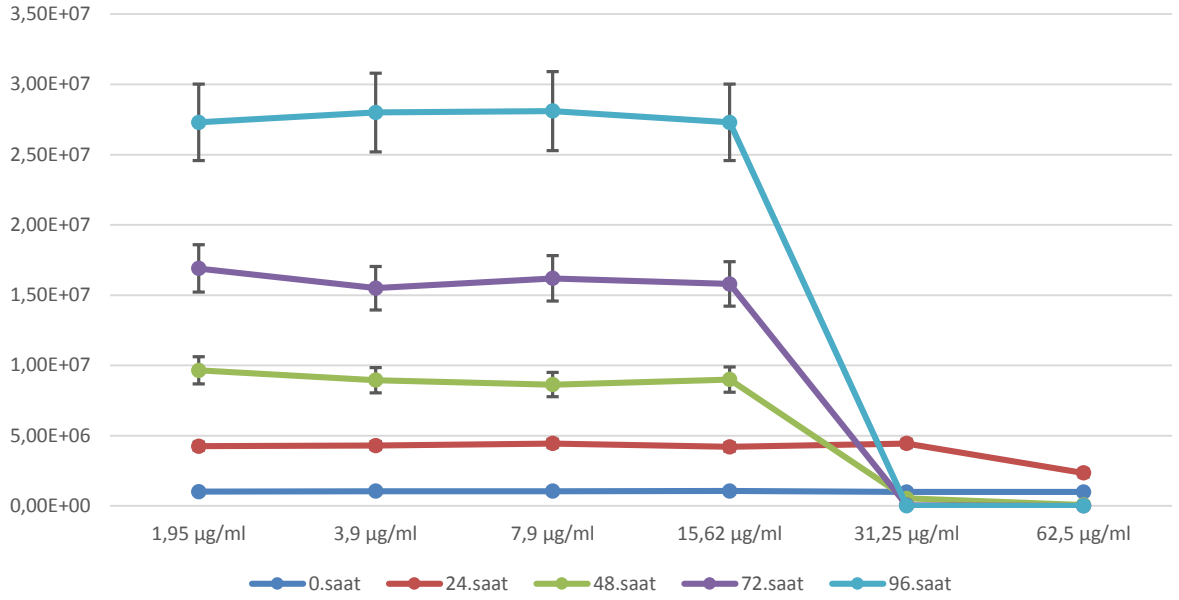
S. thermophilus&Kontrol grubu: $P>0.05$

3. saatte;

S. thermophilus&Kontrol grubu: $P>0.05$

4. saatte;

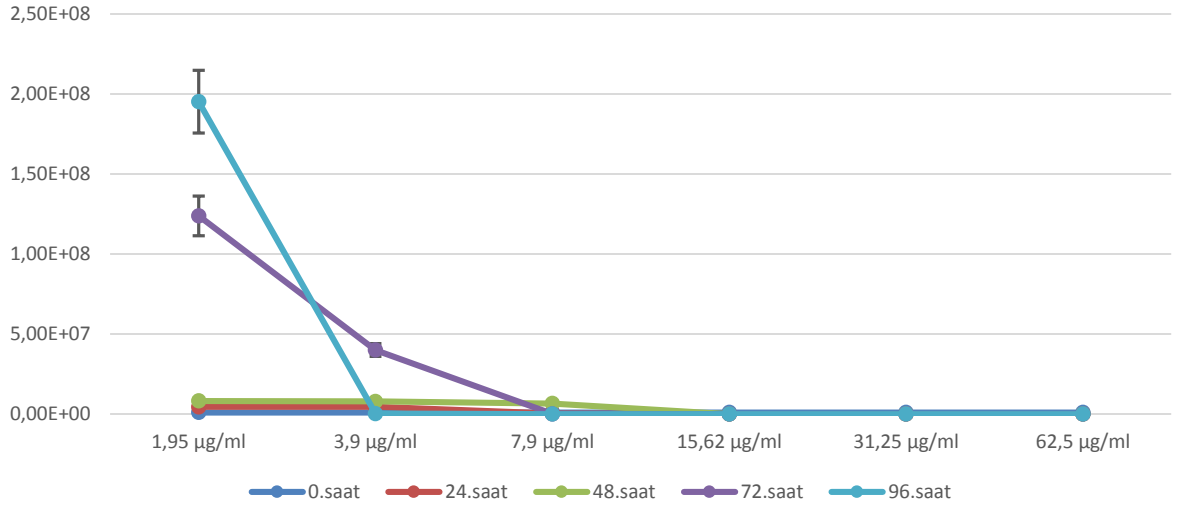
S. thermophilus&Kontrol grubu: $P<0.05$



Şekil 4.17. *L. casei*' nin Vero hücre hattı üzerinde non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.

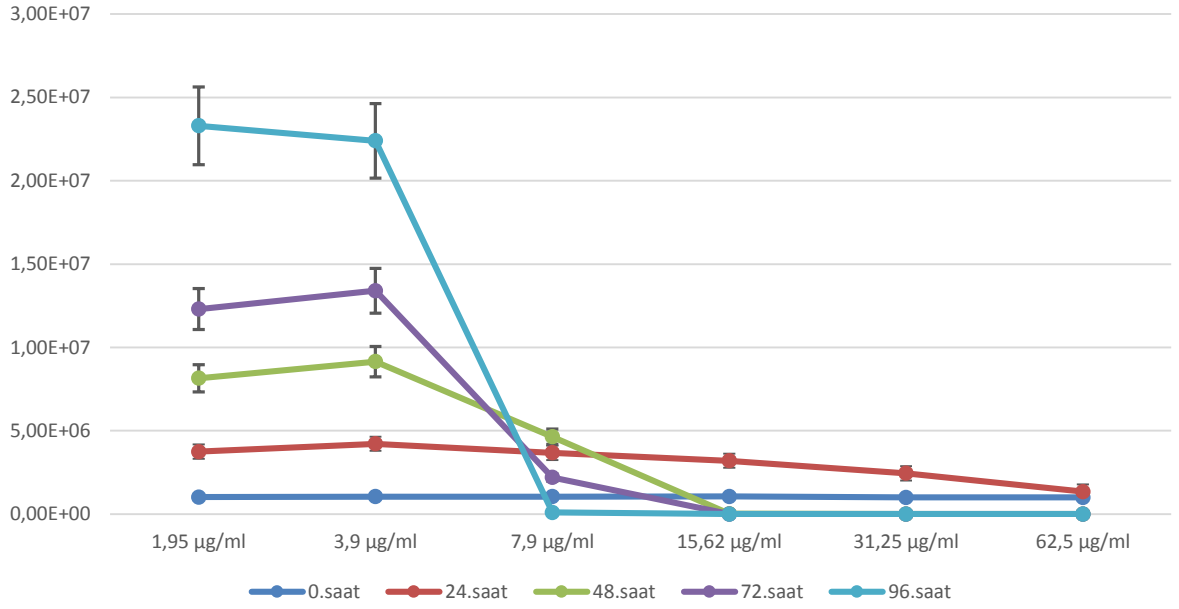
Çalışmada probiyotik mikroorganizmaların sağlıklı insan hücreleri üzerinde non-sitotoksik konsantrasyonlarının belirlenebilmesi amacıyla Vero hücre hattı seçildi. Vero hücreleri üzerinde probiyotik mikroorganizmaların farklı konsantrasyonlarını ihtiva eden miktarları hücre üretme besiyerine konularak hücreler için toksik olmayan konsantrasyonları belirlendi.

Çalışmada sitotoksitesi en düşük olan probiyotik mikroorganizmanın *L. casei* biyoaktif metabolitleri olduğu tespit edildi. *L. casei*' nin 31.25 µg/ml konsantrasyona kadar hücreler üzerinde toksik etkili olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.17).

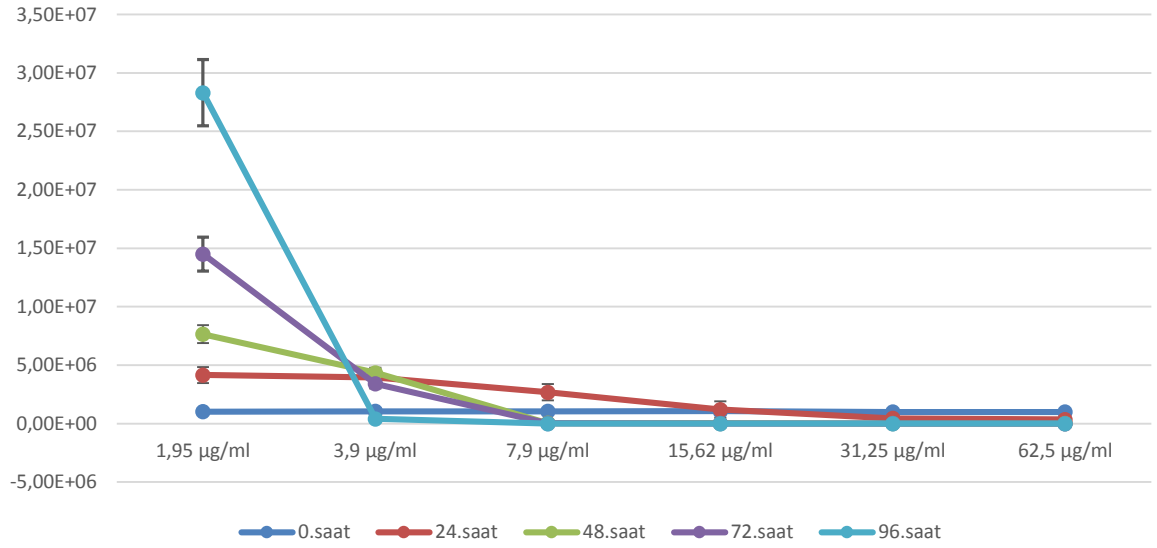


Şekil 4.18. *L. bulgaricus*' un Vero hücre hattı üzerinde non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.

L. bulgaricus' un ise Vero hücreleri üzerinde toksik olmayan konsantrasyonunun *L. casei*' ye kıyasla daha düşük olduğu, yani *L. bulgaricus* biyoaktif metabolitlerinin sağlıklı hücreler üzerinde daha yüksek toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.18).



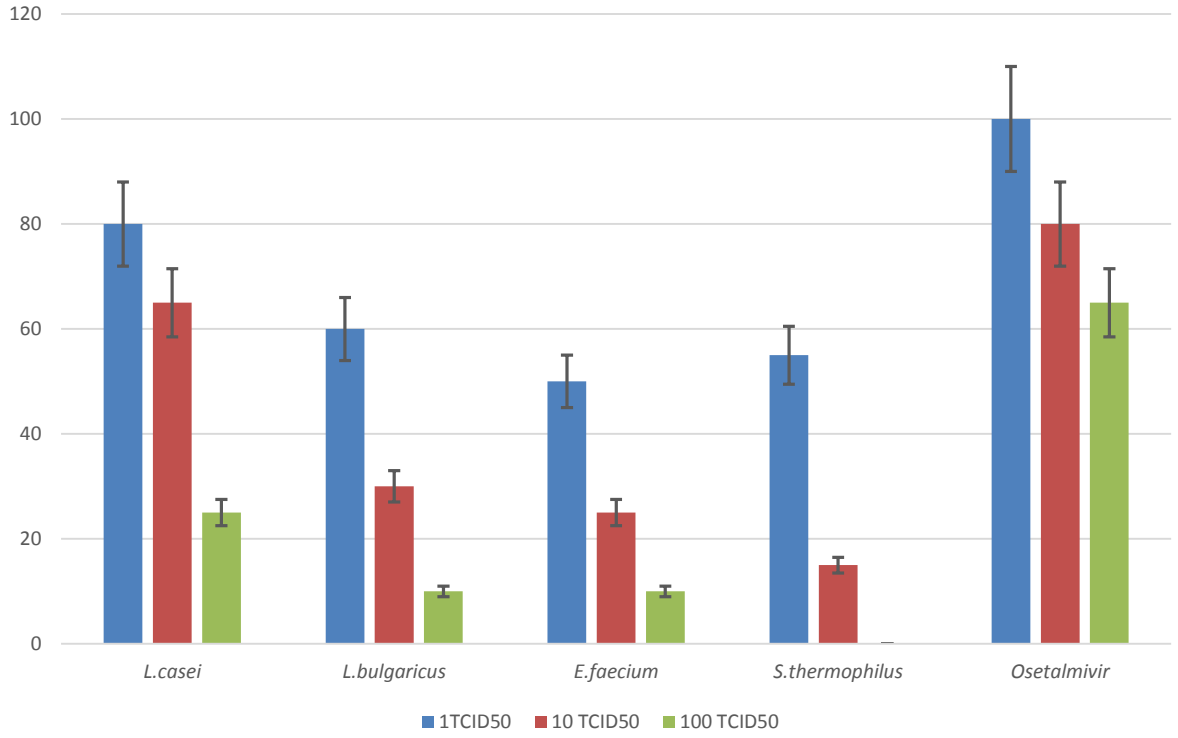
Şekil 4.19. *E. faecium*' un Vero hücre hattı üzerinde non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.



Şekil 4.20. *S. thermophilus*' un Vero hücre hattı üzerinde non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi.

Çalışmada *E. faecium* ve *S. thermophilus*' un vero hücreleri üzerinde toksik konsantrasyonlarının sırasıyla 7.9 µg/ml ve 3.9 µg/ml olduğu tespit edilmiştir (Şekil 19 ve 20).

Probiyotik mikroorganizmalar arasında hücre toksisitesi en yüksek mikroorganizma *L. casei* olarak tespit edilirken, bunu *S. thermophilus* ve *E. faecium*' un takip ettiği saptanmıştır.

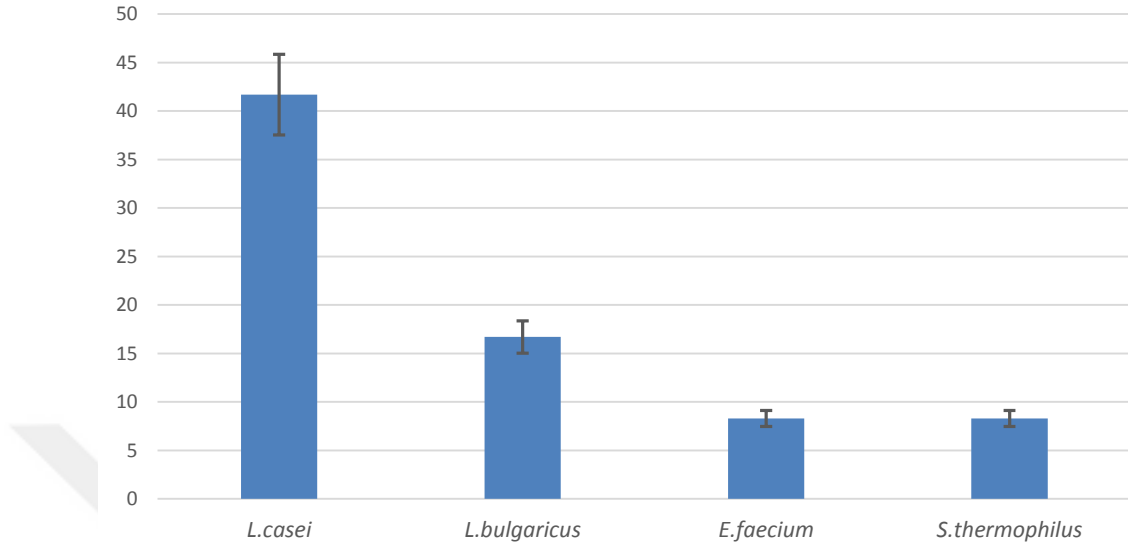


Şekil 4.21. Probiyotik mikroorganizmaların H1N1' in üç farklı enfektif dozuna karşı antiviral etkinliğinin Osetalmavir ile kıyaslanması.

Çalışmalarda insan sağlığı açısından son derece önemli viral etkenlerden biri olan influenza virüslerden H1N1'e karşı probiyotik mikroorganizmaların antiviral etkinliği de araştırılmıştır.

Probiyotik mikroorganizmaların antiviral etkinlik çalışmalarından önce virus suşunun TCID₅₀ dozu hesaplanarak, antiviral etkinlik çalışmaları standart ilaç olan Osetalmivir ile kıyaslamalı olarak 1TCID₅₀, 10TCID₅₀ ve 100 TCID₅₀ dozları üzerinde araştırıldı. Probiyotik mikroorganizma biyoaktif metabolitlerinin Osetalmivir ile kıyaslandığında Osetalmivir kadar güçlü etkinlik göstermese de dikkate değer ölçüde viral üremeyi inhibe edici etkilerinin olduğu tespit edilmiştir.

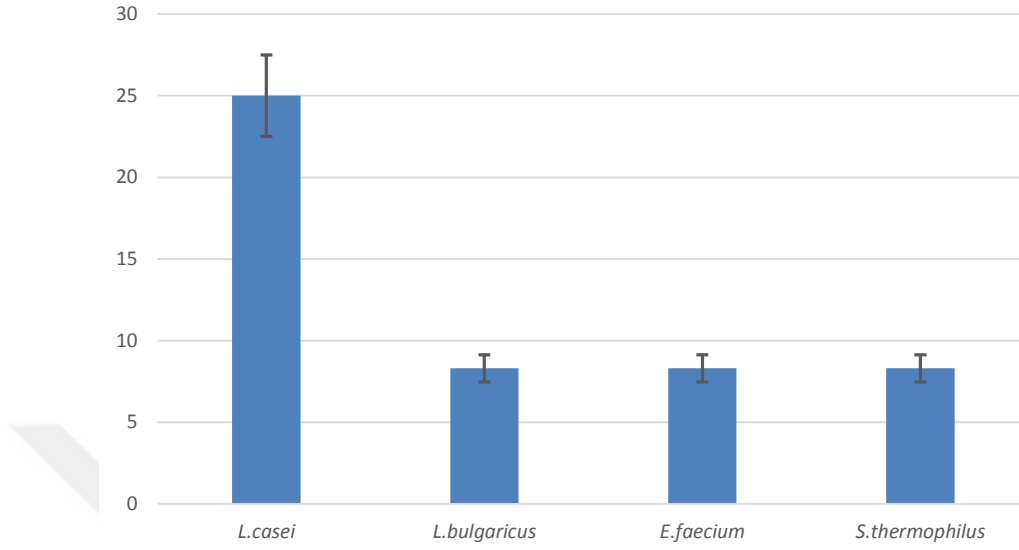
Özellikle Probiyotik mikroorganizmalar arasında *L. casei*' nin antimikrobiyal etkinliklerinde olduğu gibi antiviral etkiliğinin de oldukça güçlü olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.22. Probiyotik mikroorganizmaların *S. aureus* kökenleri üzerinde slime oluşumu üzerine inhibitör etkisi.

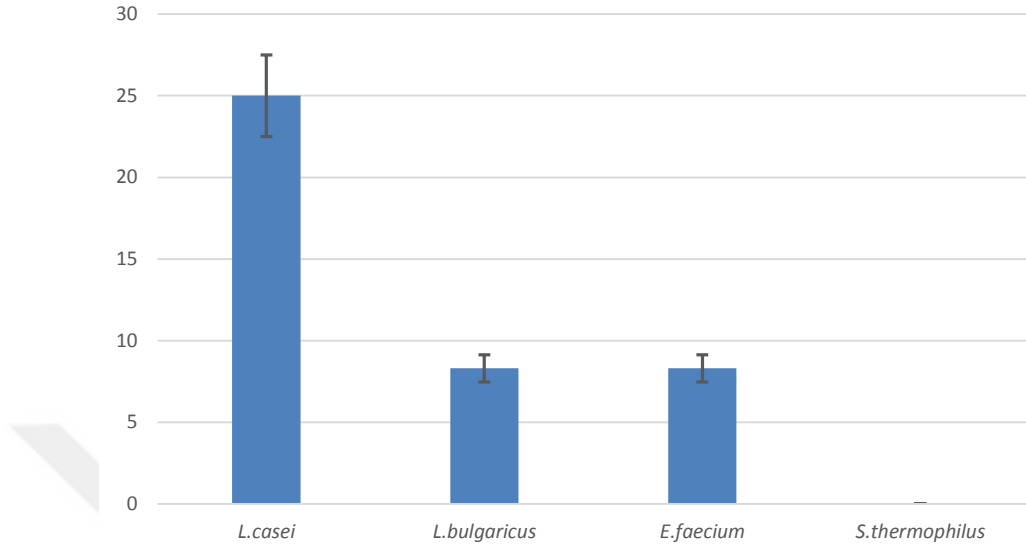
Çalışmada probiyotik mikroorganizmaların biyoaktif metabolitlerinin mikroorganizmalar üzerindeki bazı virulans faktörleri (slime üretimi ve hareketlilik) üzerindeki etkilerini metabolitlerle muamele edilen patojen üzerinde değerlendirdik.

Şekil 4.22’ de de görüldüğü gibi slime üretimi pozitif olan *S. aureus* kökenlerinin *L. casei* biyoaktif metabolitleri ile muamelesi sonucunda % 41.7’ sinde slime üretiminin negatifleştiği tespit edilmiştir. Slime üretimi üzerinde diğer probiyotik mikroorganizma kökenlerinin de *L. casei* metabolitleri kadar olmasa da etkili oldukları tespit edilmiştir.



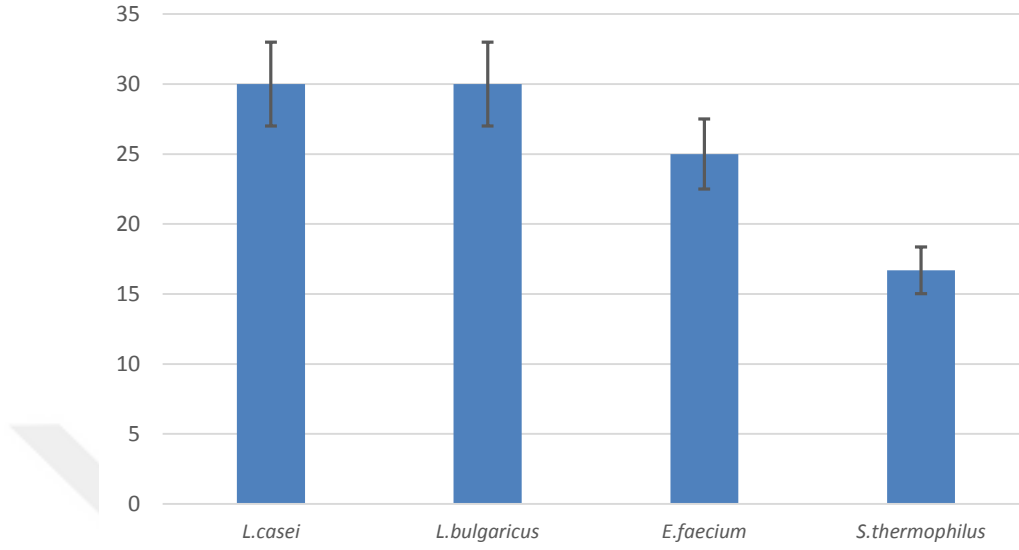
Şekil 4.23. Probiyotik mikroorganizmaların *P. aeruginosa* kökenleri üzerinde hareket üzerine inhibitör etkisi.

Probiyotik mikroorganizmaların patojen virulans faktörlerinden hareket üzerindeki etkinliklerin araştırıldığı deneylerde de dört probiyotik mikroorganizmanın da hareket üzerinde etkinliklerinin olduğu, en yüksek etkinliğe sahip probiyotiğin ise *L. casei* olduğu tespit edilmiştir. *L. casei* kökenlerin % 25' inin hareket yeteneğini ortadan kaldırdığı görülürken, *L. bulgaricus*, *E. faecium* ve *S. thermophilus*'un ise *P. aeruginosa* kökenlerinin % 8.3' ünün hareket yeteneğini ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.24. Probiyotik mikroorganizmaların *E.coli* kökenleri üzerinde hareket üzerine inhibitör etkisi.

Benzer olarak Probiyotik mikroorganizmalardan *L. casei*, *L. bulgaricus* ve *E. faecium*' un *E. coli* kökenlerinin hareketliliğini *P. aeruginosa*'da olduğu oranlarda (sırasıyla; % 25, % 8.3 ve % 8.3) inhibe ettiği tesğit edilirken, *S. thermophilus* biyooaktif metabolitlerinin *E. coli* hareketliliği üzerinden herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.24).



Şekil 4.25. Probiyotik mikroorganizmaların *P.mirabilis* kökenleri üzerinde hareket üzerine inhibitör etkisi.

Çalışmada çalışan patojen bakteriler arasında *P. mirabilis*' e karşı probiyotik mikroorganizma metabolitlerinin bakterinin hareketliliği üzerinde en yüksek etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Deneylerde *L. casei* ve *L. bulgaricus* biyoaktif metabolitlerinin *P. mirabilis* hareketliliğini % 30 oranında inhibe ettiği tespit edilirken, *E. faecium* biyoaktif metabolitlerinin % 25 ve *S. thermophilus* metabolitlerinin ise bakteri hareketliliğini % 16.7 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.25).

5. TARTIŞMA

İnsan gastrointestinal sistemi oldukça geniş, aktif ve karmaşık bir mikrobiyota topluluğuna sahiptir. Barsaklar oldukça sofistike bir organ olup hem zararlı hem de kommensal olarak yüzlerce farklı mikroorganizma türünü barındırmaktadır. İnsan mikrobiyotası metabolik aktivitenin ve besin emiliminin artırılması, biyoaktif bileşiklerin sentezi, barsak bariyer fonksiyonunun iyileştirilmesi, motilite, patojenlere karşı direnç veya bağışıklık sisteminin modülasyonu gibi fizyolojik regülasyon yoluyla konak bağışıklık mekanizmasında önemli bir role sahiptir (Kelly ve ark. 2005).

Mikrobiyotanın herhangi bir sebeple değişmesi sonucunda konakta infeksiyöz hastalıklar, kronik inflamasyon ve metabolik bozukluklar gibi doğrudan veya dolaylı olarak ciddi sindirim patolojisi meydana gelebilmektedir. Çalışmalarda sağlıklı bir barsak mikrobiyotasının özellikle konağın mukozal ve sistemik bağışıklığının güçlendirilmesinde oldukça önemli olduğu bildirilmektedir (Cani ve Delzenne 2009).

Barsak mikrobiyotası beslenme değişiklikleri ile geçici olarak değişebilmektedir. Özellikle pro veya prebiyotik tüketimi barsak ekosistemini eski haline getirebilmekte ya da koruyabilmektedir. Probiyotik yeterli miktarlarda alındığında konağa fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak bilinmektedir. Probiyotik seçimi için probiyotiğin güvenli olması, gastrointestinal koşullara dayanıklı olması, gastrointestinal mukozaya adezyon yapabilmesi ve patojenlerle rekabet içinde olarak patojenleri dışlayabilmesi önemli kriterlerlerdir. Probiyotiklerin barsak mukozasına adezyon yapabilmesi insan barsak sistemine kolonizasyonu ile sonuçlanmakta ve özellikle bağışıklık sistemini modüle etme yeteneği ile ilişkilidir. Bu kriterleri karşılayan probiyotikler arasında genellikle LAB' i en yaygın olarak *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri, *Streptococcus* ve *Enterococcus* türleri sayılabilir (Collado ve ark. 2005, Borchers ve ark. 2009).

Günümüzde probiyotik gıdaların toplam fonksiyonel gıda pazarında oldukça önemli bir yeri vardır. Bu pazarın yaklaşık % 60-70' ini oluşturduğu bildirilmektedir. (Tripathi ve Giri 2014). Probiyotik bakteriler, kolayca sindirilebilen fonksiyonel gıdalarda besin takviyesi olarak kullanılmaktadır. LAB' i bu amaçla en sık kullanılan mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Gıda fermentasyonu ile ilişkili olarak bu mikroorganizmalar arasında *Lactobacillus* ve *Bifidobakteri* cinsleri üyeleri ağırlıklı olarak bulunmaktadır (Plessas ve ark. 2017, Giri ve ark. 2018). LAB' i ve diğer “starter” kültürleri substratların biyokimyasal ve organoleptik özelliklerini dönüştürmekte çeşitli metabolitler üretmektedirler. Böylece gıdaları mineral, vitamin, amino asit ve sindirim enzimleri gibi maddeler açısından zenginleştirmektedirler. Probiyotik LAB' inin konak sağlığını iyileştirici özellikleri, barsak mikrobiyotası üzerindeki pozitif etkileri, barsak fonksiyonları, patojenik mikroorganizmaların üremelerinin inhibisyonu, bağışıklık yanıt stimülasyonu ve laktoz intolerans semptomlarının azalması ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Ray ve ark. 2016).

Çalışmamızda en önemli probiyotik mikroorganizmalar arasında gösterilen dört probiyotik mikroorganizmanın biyoaktif metabolik ürünleri önemli insan patojenlerine karşı antimikrobiyel etkinlikleri ile influenza virusa karşı antiviral etkinlikleri açısından değerlendirilmiştir. Patojenlerin konak hasarının en çok mikroorganizma virülanslığı ile ilişki olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda ayrıca probiyotik mikroorganizma biyoaktif metabolitleri ile muamele edilen insan patojenlerinin slime üretimi ve motilite gibi önemli virulans faktörler üzerindeki etkileri üzerindeki etkileri de araştırılmıştır.

Probiyotik mikroorganizmalar arasında LAB' i sağlıklı bir insanın mikrobiyotik ortamında bulunan oldukça önemli mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Bu mikroorganizmalar üzerinde yapılan son dönemlerdeki çalışmalar insan sağlığı açısından yararlı özellikleri nedeniyle laktik asit bakterilerinin kayda değer nitelikte oldukları bildirilmiştir (Walsh ve ark. 2014).

Probiyotiklerin barsağı kolonize etmekte, mukoza dokusu üzerinde olumlu etkileri göz önüne alındığında barsak bozuklukları patolojisinde iyileştirici etkilerinin olduğu bildirilmektedir. Aslında, gastrointestinal sistemdeki mikrobiyotanın disbiyozunun, bazı gastrointestinal hastalıkların ve malignitelerin gelişiminde katkıda bulunan faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir (Serban 2014).

Probiyotikler, barsak mikroflorasının aktivitelerini farklı mekanizmalar yoluyla modüle edebilmektedirler. Bu mekanizmalar arasında; patojen mikroorganizmalara yapışarak etki gösterme, doğal bağışıklık güçlendirilmesi, patojen mikroorganizmaların sebep olduğu inflamasyonun hafifletilmesi, barsak homeostazının teşvik edilmesi ve barsak epitel hücrelerinin canlılığına katkı sayılabilir (Zhu ve ark. 2011). Bu konak için faydalı olan etkilerin bazıları probiyotik mikroorganizmalarca salgılan çeşitli maddelerle ilişkili olup bu maddeler "postbiyotik" araçlar olarak bilinmektedir.

LAB' i ve özellikle *Lactobacillus* cinsi türlerin konakta immünomodülatör, antiinflamatuvar ve anti-kanserojen aktiviteler sergiledikleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Zhong ve ark. 2014, Marco ve ark. 2006, LeBlanc ve LeBlanc 2014). Bu mikroorganizmalarının etkilerinin suşa özgü, metabolik özelliklere, salgılanan moleküllere ve bileşenlere bağlı olduğu bildirilmiştir (Oelschlaeger 2010).

Bir çalışmada gıdalarla *L.casei* probiyotikleri alımının spinal kord hastalarında antibiyotik kullanımına bağlı diyare gelişimini azalttığı bildirilmiştir (Wong ve ark. 2014). Ayrıca *L. casei* probiyotiği ihtiva eden içeceklerin alınmasının 1-5 yaş arası çocuklarda çocuklarda akut diyare gelişiminde oldukça yararlı olduğu bildirilmiştir (Sur ve ark. 2011). *L. casei* probiyotik mikroorganizma alımının konakta diyareyi önlediği gibi, kronik konsipitasyon hastalarının tedavisinde de oldukça yararlı olduğu bildirilmiştir. Bir çalışmada *L. casei* içeren bir probiyotik içeceğin günlük alımı ile, STC (slow-transit constipation) hastalarında kolon geçiş süresini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Krammer ve ark. 2011). Yine benzer bir çalışmada da *L.casei* ihtiva eden içeceklerin düzenli alımı neticesinde kronik konstipasyon hastalarında gastrointestinal semptomların hızla düzeldiği gösterilmiştir

(Koebnick ve ark. 2003). *H. pylori* kolonize hastalarda *L. casei* içeren süt tüketiminin *H. pylori* üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada *L.casei* metabolitlerinin in-vitro koşullarda bakteri üremesini inhibe ettiği tespit edilirken, hastalarda kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı olmasa da *H. pylori* kolonizasyonunda bir azalma meydana getirdiği bildirilmiştir (Cats ve ark. 2003).

Bizim çalışmamızda da *L. casei*' nin biyoaktif metabolitlerinin birer saat arayla muamele edilen bakteriler üzerinde inkübasyonun birinci saatinden itibaren bakteri koloni sayılarında istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma meydana getirdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda *L. casei*' nin biyolojik metabolitlerinin hem Gram pozitif bakterilere (*S. aureus*), hem de Gram negatif bakterilere karşı (*P. aeruginosa*, *P. mirabilis* ve *E. coli*) oldukça dikkate değer antimikrobiyal etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde H1N1 influenza virus suşuna karşı da her üç viral titrede (1 TCID₅₀, 10 TCID₅₀ ve 100 TCID₅₀) *L. casei* metabolitlerinin etkinliğinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir.

L. casei' nin immun sistem üzerinde düzenleyici ve günlendirici etkilerinin varlığını araştırmak için yapılan bir çalışmada ise, *L. casei* probiyotik mikroorganizmaları içeren içecekler verilen yaşlı gönüllülerde, *L. casei* içeren probiyotik tüketiminin NK hücre aktivitesinin ve anti-inflamatuar sitokin profili üretimini arttırdığı tespit edilmiştir (Dong ve ark. 2013). Başka bir çalışmada ise atletler arasında *L. casei* probiyotik takviyesinin üst solunum yolu enfeksiyonu üzerindeki etkileri araştırılmış, yapılan çalışmada düzenli probiyotik takviyesi alan atleterde üst solunum yolu enfeksiyonu insidansında önemli oranlarda azalmalar olduğu bildirilmiştir (Gleeson ve ark. 2011).

L. casei' nin önemli insan patojenlerine karşı antimikrobiyal etkinliğinin araştırıldığı bizim çalışmamıza benzer yapılan bir çalışmada farklı kaynaklardan izole edilen *L. casei* probiyotik mikroorganizma kökenlerinin potansiyel antimikrobiyel etkinliğe sahip olduğu, bu konuda ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulduğu da bildirilmiştir (Shokryazdan ve ark. 2014).

Çalışmalar probiyotik bakterilerin insanların sağlığını iyileştirmede ve bağışıklığı modüle etmede hayati bir rol oynadığını göstermektedir. Önemli probiyotik mikroorganizmalardan bir diğeri olan *Enterokoklar* insanlar dahil olmak üzere memelilerin barsaklarını kolonize eden bir laktik asit bakterisi cinsidir. *Enterokoklar* doğumdan sonraki ilk bakteri kolonizörleri arasında yer almakta olup hem kalın ince hem de kalın barsakta çoğalabilmektedirler. *E. faecium* ve *E. faecalis*, insan dışkısında bulunan en yaygın *Enterokok* türleridir (Klein 2003).

Enterokoklarla yapılan çeşitli çalışmalarda, probiyotik *Enterokok* suşlarının kronik gastrit, mide ülseri, irritabl barsak sendromu, pankreatit ve kronik hepatit gibi gastrointestinal hastalıkların tedavisinde kullanıldığı klinik çalışmalarda gösterilmiştir. Bunun yanında, anti-kanserojen etkilerinin olduğu ve kan kolesterol seviyesinin düşürücü etkinliğe de sahip oldukları bildirilmiştir (Radchenko 2004, Starostin 2004).

E. faecium' un probiyotik olarak kullanılan suşu, insanlarda bazı durumlarda ciddi enfeksiyonlara yol açabilen *Enterokok* türüdür. Potansiyel patojenler olarak bilinen *Enterokoklar* dünya çapında önemli patojenler arasında yer almakta olup, *E. faecium* suşları enfeksiyonlara neden olma yetenekleri açısından önemli ölçüde farklılık göstermektedirler. *Enterokokların* genomik içeriği barındırdığı ilaç direnç genleri ve çeşitli virülans faktörlerini bulundurması bakımından farklılıklar göstermektedir. Çalışmalarda *Enterokok* izolatlarının yaklaşık üçte birinin vankomisine dirençli olduğu ve bu kökenlerin önemli mortalite sebebi oldukları bildirilmektedir. Probiyotik *Enterokok* suşları, bilinen virülans faktör genlerinin yanı sıra vankomisin direnç genlerini barındırmamasıyla potansiyel virulan veya tehlikeli *Enterokok* türlerinden farklılıklar göstermektedirler (Benamu ve Deresinski 2018).

Çeşitli çalışmalarda *Enterokok* cinsi içinde yer alan *E. faecium*, *E. faecalis* türlerinin mezofilik ve termofilik laktik asit bakterileriyle kombine kullanımlarının teknolojik işlevselliğini değerlendirilmiştir (Sarantinopoulos ve ark. 2002). *Enterokokkal* mikroorganizmaların gıdalarda tat, aroma, renk, yapı gibi özellikleri üzerinde olumlu etkileri bildirilmiştir. *Enterokokların* süt ürünleri üzerindeki olumlu etkisinin lipolitik aktiviteleri,

sitrat kullanımı ve aromatik uçucu bileşiklerin üretiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca *Enterokokların* yüksek pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarında çevresel faktörlere dirençlerinin yüksek olduğu da bildirilmektedir. *Enterokokların* peynir üretiminde starter kültür olarak kullanılabileceği, bu mikroorganizmaların hızlı süt asitleştirmesine ve çeşitli lezzet ve doku bileşiklerinin üretimine katkıda bulunan yüksek miktarda laktik asit üretimini gerçekleştirebildikleri bildirilmiştir (Silva ve ark. 2015).

E. faecium' un probiyotik bir mikroorganizma olarak antioksidan, anti-inflamatuar ve nöromodülatör potansiyeli üzerindeki rollerinin araştırıldığı bir çalışmada, *E. faecium*' un düşük (pH 1.5, 2 ve 3) asit stresine dayanabildiği, gastrointestinal stres koşullarına karşı oldukça güçlü direnç sergilediği gösterilmiştir. Ayrıca mikroorganizma % 0.45 safra tuzu konsantrasyonunda yaşayabilmiş ve pepsin ile tripsin enzimlerine karşı iyi tolerans gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca *E. faecium*' un majör metabolik ürünleri arasında laktik asit ve bütirik asit olduğu bildirilmiştir. Çalışmada *E. faecium*' un liyofilize hücresiz süpernatantının askorbat oto-oksidasyonu, oksijen radikal absorbanasına karşı önemli ölçüde antioksidan aktiviteye sahip olduğu da bildirilmiştir (Divyashri ve ark. 2015).

Bunun yanında, *E. faecium*, *Lactobacillus rhamnosus* ve liyofilize hücresiz ekstraktlarının TNF-alfa üretimini negatif olarak modüle ederek ve LPS ile uyarılan makrofaj hücre hatlarında IL-10 seviyelerini pozitif yönde regüle ederek önemli bir anti-inflamatuar etki gösterdiği de bildirilmiştir. Ayrıca, çalışmada *in-vivo* fare modelinde probiyotik takviyelerin beyin bölgesi endojen oksidatif markörleri ve redoks durumunu modüle etme eğilimi değerlendirilmiş, *E. faecium* ve *L. rhamnosus*' un oral yoldan takviye olarak verilen farelerde (28 gün boyunca günlük), beyinde azalmış oksidatif markırlar ve c-aminobutirik asit ve dopamin seviyelerinde eş zamanlı bir artışla antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırdığı saptanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada probiyotiklerin *in-vivo* olarak oksidatif hasar aracılı nörodejeneratif koşullara karşı nöroprotektif bir avantaj sağlayabildikleri bildirilmiştir (Divyashri ve ark. 2015).

Yapılan çalışmalarda *Enterokokların* genellikle enterosin olarak adlandırılan ve ürünlerin raf ömrünü ve güvenliğini artırabilen antibakteriyel peptitler (bakteriyosinler) üretebildikleri bildirilmektedir (Schirru ve ark. 2012, Todorov ve ark. 2014, Favaro ve ark. 2014). *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının da insanlar ve çiftlik hayvanları için probiyotik olarak kullanılmaktadır (Semedo ve ark. 2003).

Bizim çalışmamızda da *E. faecium* probiyotik mikroorganizmasının biyoaktif metabolitlerinin antibakteriyel ve düşük düzeyde de olsa influenza virusa (H1N1) karşı antiviral etkinliği saptanmıştır. Çalışmamızda *Enterokokkal* metabolitlerin *S. aureus* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliklerinin 1.saat inkübasyonu sonucunda etkinliğinin düşük düzeyde de olsa anlamlı farklılık görülse de, biyoaktif metabolitlerle muamele süresinin artmasının etkinliği de arttırdığını göstermiştir. *E. faecium'* un biyoaktif metabolitlerinin *E. coli* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliği birinci saat sonunda anlamlı bulunmazken, zaman ilişkili olarak *E.coli* suşları üzerinde etkinliğin zamanla doğru orantılı olarak arttığında görülmüştür. *E. faecium'* un biyolojik aktif metabolitlerinin *P. aeruginosa* üzerindeki etkisi ancak metabolitlerin dördüncü saaatinden sonra tespit edilmiştir. Çalışmamızda *E. faecium'* un biyoaktif metabolitlerinin *P. mirabilis* izolatlarına karşı ise diğer patojenlerden farklı olarak herhangi bir antimikrobiyel etkinlik sergilemediği saptanmıştır.

Probiyotikler, yeterli miktarda alındığında konak sağlığı açısından faydalı canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanır. Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kabul edilebilmesi için, suşun sadece güvenli olması yeterli olmayıp, aynı zamanda insan gastrointestinal sisteminde hayatta kalabilmesi ve konağa fayda sağlaması da gerekmektedir. *S. thermophilus*, süt fermentasyonlarında yoğurt ve peynir üretimi için yaygın olarak kullanılan bir Gram pozitif bakteridir. Diğer LAB' inin aksine, *S. thermophilus'* un probiyotik durumu hala tartışmalıdır.

Çalışmalarda bir probiyotik tür olarak tanınacak kritik kriterler arasında gastrointestinal koşullarında hayatta kalma, patojenik olmama, sağlık açısından kanıtlanmış

faydalı etkilerinin olması ve endüstriyel sürece direnç en önemliler arasında gösterilmektedir (Miquel ve ark. 2015, Nagpal ve ark. 2012, Vasiljevic ve Shah 2008).

S. thermophilus suşlarının çoğu asit pH ve safra tuzlarına duyarlı gibi görünse bile, insan çalışmalarında gastrointestinal kanaldan geçişte hayatta kalma ve yutulduğunda geçici olarak kolonize olabildikleri gösterilmiştir. Ayrıca, bazı *S. thermophilus* suşlarının probiyotik suş seçimi için önemli bir kriter olan barsak epitel hücrelerine yapışabilme özelliğine sahip olduğu da bildirilmiştir. Konak ile etkileşimi destekleyen bu biyolojik mekanizma barsak korumasına yol açmakta ve kolonizasyonu arttırmaktadır. Güvenlik açısından değerlendirildiğinde ise *S. thermophilus* FDA tarafından güvenli olarak kabul edilmektedir. İnsan veya hayvan modellerinde yapılan çok sayıda *in-vivo* çalışma, *S. thermophilus* için laktoz intoleransının hafifletilmesi, gastritin önlenmesi ve infeksiyöz ishalin önlenmesi gibi sağlık üzerine faydalarının da olduğu bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda *S. thermophilus*'un antimikrobiyal bileşik (termofilinler gibi) sentezi, antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklerinin olduğu da gösterilmiştir. Ayrıca, *S. thermophilus*' un endüstriyel işleme direncinin özellikle süt ürünlerinde oldukça yüksek olduğu da bildirilmektedir (Batista ve ark. 2015).

S. thermophilus biyoaktif metabolitlerinin dört önemli insan patojenine karşı antibakteriyel etkinliklerinin değerlendirildiği çalışmamızda, *S.thermophilus*'un biyoaktif metabolitlerinin *S. aureus* izolatlarına karşı güçlü antibakteriyel etkinlikleri saptanırken, *E. coli* ' ye karşı birinci saat sonunda hücre sayısı açısından anlamlı düzeyde etkinin görülmediği, ikinci saat sonundan itibaren ise hücre sayısında kontrol grubuyla kıyaslandığında metabolik ürünlerin bakteri üremesini anlamlı derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir. *S. thermophilus* metabolitlerinin *P. mirabilis* ve *P. aeruginosa* ' ya karşı etkinliğin düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Bu iki mikroorganizmaya karşı metabolik ürünlerle muamelesinin ancak dördüncü saatinden sonra bakteri hücre sayısında anlamlı düzeyde azalmanın olduğu tespit edilmiştir.

LAB' i arasında yer alan bir diğ er probiyotik mikroorganizma *S. thermophilus* ile birlikte *L. bulgaricus* fermente süt ürünü olan yoğurtta bol miktarda bulunmaktadır. Bu iki mikroorganizma fermente süt ürünlerinde bulunan yaygın “starter” kültürlerdir.

Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus dünya çapında yoğurt üretiminde kullanılan heterojen LAB' i grubunun en önemlilerinden biridir. Yoğurt uzun zamandır sağlıklı bir diyetin besleyici, doğal ve güvenli bir bileşeni olarak kabul edilmekte olup probiyotik kavramının da temelini oluşturmaktadır. *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* içeren yoğurt tüketiminin sağlık açısından en önemli faydası laktoz intoleransının azaltılmasıdır. Bunun yanında, hem *L. bulgaricus* hem de *S. thermophilus*' un bağışıklık modülasyonu ve diyare hafifletici etkilerinin olduğu da bildirilmiştir (Adolfsson ve ark. 2004, Perdigon ve ark. 2002).

Çalışmamızda *L. bulgaricus*' un biyoaktif metabolitlerinin *P. aeruginosa* ve *P. mirabilis* kökenleri ile dört saat muamele sonunda kontrol grubuyla kıyaslandığında hücre sayısında anlamlı düzeyde inhibitör etki yaptığı tespit edilirken, *E. coli*' ye karşı antibakteriyel etkinliğin ikinci saat sonunda anlamlı düzeyde görüldüğü tespit edilmiştir. *L. bulgaricus*' un biyoaktif metabolitlerinin en güçlü antibakteriyel etkiliği ise *S. aureus*' a karşı segilediği tespit edilmiştir. Biyoaktif metabolitlerle muamele edilen *S. aureus* kökenlerinde birinci saatten itibaren hücre sayısında istatiks l olarak anlamlı düzeyde azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Bu etkinin zamana bağlı olarak daha da arttığı saptanmıştır. Çalışmamızda bu sonuçlar bize *L. casei*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* ve *E. faecium*' un metabolik ürünleri içerisinde Gram pozitif mikroorganizmalara karşı yüksek etkinlikte bakteriyosinler ihtiva ettiği d   nd rm  t r.

Probiyotiklerin virus enfeksiyonlarındaki üzerinde yapılan sınırlı sayıda çalışmalarda akut rotavirüs gastroenteritinin süresini ve şiddetini hafiflettiği bildirilmiştir. Ayrıca, probiyotiklerin çocuklarda solunum yolu enfeksiyonu riskini azalttığı da yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (DSÖ/FAO 2002, Guarino 2009, Hojsak ve ark. 2010b, Taipale ve ark. 2011, Hatakka ve ark. 2007).

Bununla birlikte, bu yararlı etkilerin arkasındaki mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemektedir. Probiyotiklerin, lokal mikrobiyotayı dengeleyerek, patojenik mikroorganizmaların üremesini inhibe ederek ve lokal ve sistemik bağışıklık yanıtı arttırarak bu etkiyi gösterdiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, solunum yolu enfeksiyonlarına karşı özellikle de influenza virüsüne karşı probiyotiklerin etkinliği konusunda yapılan çalışma sayısı oldukça azdır (Bodera ve Chcialowski 2009, Madden 2005).

Genellikle “grip” olarak adlandırılan influenza, grip virüslerinin neden olduğu bulaşıcı bir solunum hastalığıdır. ABD' de her yıl 220.000' den fazla hastaneye yatış ve yaklaşık 36.000 yıllık ölümlerle sonuçlanan ciddi bir enfeksiyondur. Mevcut aşılama programının sınırlı etkinliği ve antiviral ilaçların sınırlı kullanımı düşünüldüğünde, influenza virüsüne karşı yeni koruyucu önlemler ya da ilaçların geliştirilmesi elzemdir.

Ayrıca, antiviral ajanlara karşı direnç gelişimi ciddi bir halk sağlığı problemi olup önemli bir tehdit unsurudur. Mevcut kullanımdaki ilaçların etkin bir şekilde yerini alabilen yeni antiviral ajanların geliştirilmesi için artan bir talep vardır (Nomura ve ark. 2006, Youn ve ark. 2012).

Probiyotik mikroorganizma biyoaktif metabolitlerinin influenza A virusu H1N1'e karşı etkinliğinin de araştırıldığı çalışmamızda hem Gram Pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı yüksek etkinliğe sahip olan *L. casei*' nin influenza virusa karşı da en güçlü antiviral etkinliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. *L. casei* dışında, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* ve *E. faecium* biyoaktif metabolitlerinin influenza virusa karşı göstermiş oldukları antiviral etkinlikler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı, bu probiyotik mikroorganizma metabolitlerinin güçlü antiviral etkinlikleri olduğu tespit edilirken, *L. casei*' nin kontrol grubu ilacı olarak çalışmamızda kullanılan Osetalmivir ile kıyaslandığında oldukça potent olduğu tespit edilmiştir.

Patojen mikroorganizmaların konak hasarının boyutu taşıdığı virülans faktörlerinin mevcudiyetine bağlıdır. *S. aureus* en önemli slime üreten bakteriler arasında olup, slime üretimi

pozitif olan suşlarda tedavi başarısı da azalmaktadır. Çalışmamızda probiyotik mikroorganizmaların metabolik ürünleri ile muamele edilen *S. aureus* kökenlerinin slime üretimi üzerindeki etkileri incelendiğinde slime üretiminin probiyotik mikroorganizmalarca farklı oranlarda inhibe edildiği saptanmıştır. Slime üretimini inhibe eden en potent probiyotiğin *L. casei* olduğu tespit edilirken, bunu *L. bulgaricus*, *E. faecium* ve *S. thermophilus*' un takip ettiği tespit edilmiştir.

Bunun yanında, mikroorganizmaların motilite üzerindeki etkilerinin de araştırıldığı çalışmamızda probiyotik mikroorganizmaların bakteri hareketleri üzerinde ciddi anlamda inhibitor etki oluşturdıkları tespit edilmiştir. *L. casei*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* kökenlerinde motiliteye karşı en güçlü etkinlik gösterirken, *P. mirabilis*' in swarming hareketine karşı *L. bulgaricus*' un *L. casei* kadar etkili olduğu saptanmıştır.

6. SONUÇ

6.1.Sonuçlar

Günümüzde organizmanın büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan besin maddelerinin temininden ibaret olan beslenmenin temel rolünün yanı sıra, sağlığın korunması ve hastalıklara karşı mücadeleyi içeren konular her geçen gün daha önemli hale gelmektedir. Tüketilen gıdaların özellikle mikrobiyaya açısından besleyici ve flora üyesi mikroorganizmaların varlığını ve çoğalmalarını tetikleyici özellikte olması son derece büyük öneme sahiptir. İşlenmiş ürünlerin tüketildiği gıda dünyasında, gıdaların kompozisyonu büyük öneme sahiptir. Gıdalar kalite, mikrobiyaya ilişkisi konak savunması ve immunité açısından önemlidir. Sağlam bir immunitenin zengin mikrobiyotaya ile ilişkili olduğu, bu durumun da obezite, alerji, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve ciddi insan patojenleri ile mücadelede ve korunmada oldukça önemli olduğu bildirilmektedir.

Gastrointestinal bozuklukların-hastalıkların tedavisinde modern tıpta probiyotiklerin kullanımı, bu ajanların yararlı etkilerinin keşfedilmesiyle daha da artmaktadır. Probiyotik mikroorganizmaların barsak mikroorganizmaları üzerindeki etkilerini araştırmak ve bu etkilerin neler olduğunun bilinmesi oldukça önem arz etmektedir. Patojen mikroorganizmalara karşı konak savunmasında, ilaç direncine karşı önemli etkinlikleri veya kanser gibi ciddi morbidite ve mortalite etkeni olan hastalıkların gerek tedavisinde ve gerekse de prognozunun düzeltilmesinde probiyotik mikroorganizmaların oldukça önemli bir yeri bulunmaktadır.

- Çalışmamızda; *L. casei*, *L. bulgaricus*, *E. faecium* ve *S. thermophilus* probiyotik mikroorganizmaların biyoaktif metabolitlerinin Gram pozitif etkenlerden *S. aureus* 'a, Gram negatif etkenlerden *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *P. mirabilis* 'e, viral etkenlerden influenza virus H1N1' e karşı antibakteriyel ve antiviral etkinlikleri araştırılmıştır.

- Ayrıca, biyoaktif metabolitlerin *S. aureus* kökenleri üzerinde slime üretimine karşı etkinliği ile, Gram negatif bakterilerde (*P. aeruginosa*, *E. coli* ve *P. mirabilis*) motilite üzerindeki etkilerinin varlığı araştırılmıştır.
- *L. casei* hem Gram pozitif, hem Gram negatif bakterilere karşı etkinliği en yüksek probiyotik mikroorganizma olarak tespit edilmiştir.
- Antiviral etkinlik açısından da benzer şekilde *L. casei*' nin etkinliği diğer probiyotik mikroorganizmalardan anlamlı derecede yüksek olarak tespit edilmiştir.
- Çalışmada *S. aureus* kökenleri üzerinde slime üretimi inhibisyonu en yüksek oranda *L. casei* biyoaktif metabolitleri ile elde edilmiştir.
- Gram negatif bakterilerde hareketlilik üzerinde ise *P. aeruginosa* kökenlerine karşı en yüksek etkinlik *L. casei* probiyotik mikroorganizma metabolitleriyle elde edilirken, *L. bulgaricus*, *E. faecium* ve *S. thermophilus*'un *P. aeruginosa* hareketi üzerinde etkinliklerinin aynı olduğu saptanmıştır.
- *E. coli*' ye karşı motilite çalışmalarında benzer olarak *L. casei*' in en etkili probiyotik mikroorganizma olduğu görülürken, *S. thermophilus*' un *E. coli* üzerinde motilite üzerinde herhangi bir etkinliği tespit edilememiştir.
- *P. mirabilis* kökenlerinin swarming tarzında hareketliliğine karşı ise hem *L. casei* hem de *L. bulgaricus* aynı oranda etkinlik gösterirken, *E. faecium* ve *S. thermophilus*'un da *P. mirabilis* hareketliliği üzerinde oldukça etkili probiyotik mikroorganizmalar olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, gerek patojen mikroorganizmalara karşı konak savunmasında ve gerekse de önemli insan patojenleri olan *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. mirabilis*, H1N1 gibi insanlarda ciddi morbidite ve mortalite sebebi olan mikroorganizma ve virus infeksiyonlarının tedavisinde ve ilaç dirençli kökenlerin virülansının kırılması veya azaltılmasında *L. bulgaricus*, *L. casei*, *E. faecium* ve *S. thermophilus* mikroorganizmalarının insan sağlığının iyileştirilmesinde son derece faydalı mikroorganizmalar olduğu tespit edilmiştir.

6.2.Öneriler

Probiyotik mikroorganizmaların ticari olarak kullanımı, gıdalarda iyi tanımlanmış probiyotiklerin tüketilmesiyle ilgili hiçbir risk bulunmadığı ve birçok faydası olması sebebiyle kullanımı önerilmektedir. Günümüzde probiyotik mikroorganizmaların belki de en güçlü, ikna edici kanıtı, anti-diyare etkileri olması ve laktoz intoleransı olan kişilerde laktozun sindiriminin iyileştirilmesi alanlarıdır. Çünkü bu bulguların doğruluğu insan çalışmalarıyla kanıtlanmıştır.

Gerek bu tür mikroorganizmaların oluşturduğu infeksiyonların tedavisinde yardımcı preperatlar olarak, gerekse de konak immunitésinin güçlendirilmesinde bu probiyotik mikroorganizmaları içeren besin takviyelerinin kullanılmalarını önermekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. **Abatenh E, Gizaw B, Tsegay Z, Tefera G, Aynalem E.** Health benefits of probiotics. *J Bacteriol Infect Dis.* **2018**, vol.2(1) s.8-27.
2. **Adel MM, Sari AM.** Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from local fermented vegetables (makdoos). *Int J Curr Microbiol App Sci.* **2017**, 6(2):1673-86.
3. **Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, Gupta SR.** Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* **2016**, vol.66 s.5575--5599.
4. **Adolfsson O, Meydani SN, Russell RM.** *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, vol.80 s.245--256.
5. **Aktas B, De Wolfe TJ, Tandee K, Safdar N, Darien BJ ve ark.** The Effect of *Lactobacillus casei* 32G on the Mouse Cecum Microbiota and Innate Immune Response Is Dose and Time Dependent. *PLoS One.* **2015**, 10: e0145784. doi: 10.1371/journal.pone.0145784 PMID: 26714177.
6. **Alexandraki V, Kazou M, Blom J, Pot B, Papadimitriou K ve ark.** Comparative Genomics of *Streptococcus thermophilus* Support Important Traits Concerning the Evolution, Biology and Technological Properties of the Specie *Frontiers in Microbiology.* **2019**, vol.10(2916) doi: 10.3389/fmicb.2019.02916
7. **Aminnezhad S, Kermanshahi RK, Ranjbar R.** Evaluation of synergistic interactions between cell-free supernatant of *Lactobacillus* strains and amikacin and genetamicin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Jundishapur J Microbiol.* **2015**, 8:e16592. doi:10.5812/jjm.8(4)2015.16592.
8. **Anandharaj M, Sivasankari B.** Isolation of potential probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. *J Biosci Bioeng.* **2014**, 118:153-9.
9. **Anukam KC, Reid G.** Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology.* **2007**, s.466-474.
10. **Arias CA, Murray BE.** The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol.* **2012**, vol.10 s.266-78. doi: 10.1038/nrmicro2761.
11. **Armbruster CE, Mobley HLT.** Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nat Rev Micro.* **2012**, vol.10 s.743--754.
12. **Aryana KJ, Olson DWA.** 100-year review: yogurt and other cultured dairy products. *J. Dairy Sci.* **2017**, vol.100 s.9987--10013. doi: 10.3168/jds.201712981
13. **Avram-Hananel L, Stock J, Parlesak A, Bode C, Schwartz B.** *E. durans* strain M4-5 isolated from human colonic flora attenuates intestinal inflammation. *Dis. Colon. Rectum.* **2010**, vol.53 s.1676--1686. doi: 10.1007/DCR.0b013e3181f4b148.
14. **Bagchi T.** Traditional food & modern lifestyle: impact of probiotics. *Indian J Med Res.* **2014**, 140(3):333-5.
15. **Barbosa TM, Serra CR, La Ragione RM, Woodward MJ, Henriques AO.** Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, vol.71 s.968--978.
16. **Batista ALD, Silva R, Cappato LP, Almada CN, Garcia RKA ve ark.** Quality parameters of probiotic yogurt added to glucose oxidase compared to commercial products through microbiological, physicalchemical and metabolic activity analyses, *Food Research International.* **2015**, vol.77 s.627--635.
17. **Benamu E, Deresinski S.** Vancomycin-resistant *Enterococcus* infection in the hematopoietic stem cell transplant recipient: an overview of epidemiology, management, and prevention. *F1000Research.* **2018**, 7:3. doi:10.12688/f1000research.11831.1
18. **Bhardwaj A, Kapila S, Mani J, Malik RK.** Comparison of susceptibility to opsonic killing by in vitro human immune response of *Enterococcus* strains isolated from dairy products, clinical samples and probiotic preparation, *Int J Food Microbiol.* **2009**, vol.128 s.513--515.
19. **Bodera P, Chcialowski A.** Immunomodulatory effect of probiotic bacteria, *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* **2009**, vol.3 s.58-64.

20. **Bongaerts GPA, Severijnen R SVM.** A reassessment of the PROPATRIA study and its implications for probiotic therapy. *Nature Biotechnol.* **2016**, vol.34 s.55-63.
21. **Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME.** Probiotics and immunity. *J. Gastroenterol.* **2009**, vol.44 s.26–46.
22. **Borrueal N, Carol M, Casellas F, Antolin M, De Lara F ve ark.** Increased mucosal tumor necrosis factor α production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut.* **2002**, 51:659–664.
23. **Bybee S, Scorza A, Lappin M.** Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter. *J. Vet. Intern. Med.* **2011**, vol.25 s.856–860. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.0738.x.
24. **Cani PD, Delzenne NM.** The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease, *Curr Pharm.* **2009**, 15:1546e58.
25. **Carlos RS, Luciana Porto de Souza V, Michele RS ve ark.** The potential of probiotics. *Food Technol. Biotechnol.* **2010**, 48(4):413–34.-
26. **Carter A, Adams M, La Ragione RM, Woodward MJ.** Colonisation of poultry by *Salmonella Enteritidis* S1400 is reduced by combined administration of *Lactobacillus salivarius* 59 and *Enterococcus faecium* PXN-33. *Vet. Microbiol.* **2017**, vol.199 s.100–107.
27. **Cats A, Kuipers EJ, Bosscharts MAR, Pot RGJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE ve ark.** Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei* -containing milk drink in *Helicobacter pylori*- colonized subjects, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics.* **2003**, vol.17(3) s.429-435.
28. **Cavera VL, Arthur TD, Kashtanov D, Chikindas ML.** Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *Int J Antimicrob Agents.* **2015**, doi:10.1016/j.ijantimicag. 2015.07.011
29. **Chandan RC, Gandhi A, Shah NP.** Yogurt: historical background, health benefits, and global trade. In *Yogurt in Health and Disease Prevention. Academic Press.* **2017**, 3-29.
30. **Charlier C, Cretenet M, Even S, Le Loir Y.** Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives, *International Journal of Food Microbiology.* **2009**, vol.131 s.30–39.
31. **Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK.** Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations, *Int. J. Food Microbiol.* **1997**, vol.35 s.1–27.
32. **Chen S, Fu Y, Liu LL, Gao W, Liu YL ve ark.** Live combined *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium* ameliorate murine experimental colitis by immunosuppression, *Int J Inflamm.* **2014**, 878054.
33. **Chingwaru W, Vidmar J.** Potential of Zimbabwean commercial probiotic products and strains of *Lactobacillus plantarum* as prophylaxis and therapy against diarrhoea caused by *Escherichia coli* in children. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2017**, vol.10 s.57–63.
34. **Collado MC, Gueimonde M, Hernandez M, Sanz YM, Salminen S.** Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and its role in enteropathogen exclusion, *J Food Prot.* **2005**, 68(12):2672e8.
35. **Conway P, Gorbach S, Goldin B.** Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci.* **1987**, vol.70 s.1–2.
36. **Cortes-Zavaleta O, Lopez-Malo A, Hernandez-Mendoza A, Garcia HS.** Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *Int J Food Microbiol.* **2014**, 173:30–35.
37. **Croxen MA, Finlay BB.** Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* **2010**, 8(1):26-38.
38. **Curry B, Crow V, Roginski H, Funquay J, Fox P.** *Lactobacillus spp.* General characteristics. *Encyclopedia of Dairy Science.* **2003**, 1479–1511.
39. **Dawlat P, Brabet C, Thantsha MS, Buys EM.** Visualisation and quantification of fumonisins bound by lactic acid bacteria isolates from traditional african maize-based fermented cereals, ogi and mahewu. *Food Addit. Contam.* **2019**, 36, 296–307. doi: 10.1080/19440049.2018.1562234
40. **De Marco S, Sichiatti M, Muradyan D, Piccioni M, Traina G ve ark.** Probiotic Cell-Free Supernatants Exhibited Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity on Human Gut Epithelial Cells and Macrophages Stimulated with LPS. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2018**, 1756308.

41. **De Vuyst L, Leroy F.** Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **2007**, 13:194–9.
42. **Delley M, Germont JE.** Differentiation of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, *subsp lactis* and *subsp delbrueckii* using physiological and genetic tools and reclassification of some strains from the ATCC collection, *Syst. Appl. Microbiol.* **2002**, vol.25 s.228–231.
43. **Dicks L, Du Plessis E, Dellaglio F, Lauer E.** Reclassification of *Lactobacillus casei subsp. casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei subsp. casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1996**, 46, 337–340. doi: 10.1099/00207713-46-1-337
44. **Dietrich C, Köhler T, Brune A.** The Cockroach Origin of the Termite Gut Microbiota: Patterns in Bacterial Community Structure Reflect Major Evolutionary Events *Applied and Environmental Microbiology.* **2014**, vol.80 s.2261–2269.
45. **Divya P.** Benefits of probiotics in oral cavity – A detailed review. *Annals of International Medical and Dental Research.* **2016**, vol.2(5) s.1–8.
46. **Divyashri G, Krishna G, Muralidhara, Prapulla SG.** Probiotic attributes, antioxidant, anti-inflammatory and neuromodulatory effects of *Enterococcus faecium* CFR 3003: in vitro and in vivo evidence, *J Med Microbiol.* **2015**, 64(12):1527–40.
47. **Divyashri G, Krishna G, Prapulla SG.** The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related *J Med Microbiol.* **2015**, 64(12):1527–40.
48. **Do Carmo MS, Santos CID, Araújo MC, Girón JA, Fernandes ES ve ark.** Probiotics, mechanisms of action, and clinical perspectives for diarrhea management in children. *Food Funct.* **2018**, vol.9 s.5074–5095.
49. **Dong H, Rowland I, Thomas LV, Yaqoob P.** Immunomodulatory effects of a probiotic drink containing *Lactobacillus casei* Shirota in healthy older volunteers. *Eur J Nutr.* **2013**, 52(8):1853–63. doi: 10.1007/s00394-012-0487-1.
50. **Duran N, Dogramaci Y, Ozer B ve ark.** Detection of adhesin genes and slime production among Staphylococci in orthopaedic surgical wounds, *Afr J Microbiol Res.* **2010**, 4(9) 708–15.
51. **Dünya Sağlık Örgütü/Gıda ve Tarım Örgütü.** Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/DSÖ working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. **2002**. London Ontario, Canada: World Health Organization.
52. **Dünya Sağlık Örgütü.** Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. World Health Organization, Geneva **2014**, pp.232.
53. **EFSA.** Update of the list of Qps-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 4: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March **2016**. *EFSA J.* 14:e04522.
54. **Enrica P ve Simona C.** Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: encrypted peptides and biogenic amines. *Front. Microbiol.* **2016**, 7:876. doi: 10.3389/fmicb.2016.00876
55. **Enujiugha VN ve Badejo AA.** Probiotic potentials of cereal-based beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, 57, 790–804. doi: 10.1080/10408398.2014. 930018
56. **European Food Safety Authority [EFSA].** Opinion of the scientific committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J.* **2007**, vol.587 s.1–16. doi: 10.2903/j.efsa.2007.587
57. **Evivie SE, Abdelazez A, Li B, Bian X, Li W, ve ark.** In vitro organic acid production and in vivo food pathogen suppression by probiotic *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*. *Front Microbiol.* **2019**, vol.10 s.1–9.
58. **Eyer L, Hruska K.** Antiviral agents targeting the influenza virus: a review and publication analysis. *Veterinari Medicina.* **2013**, vol.58 s.113– 185.
59. **Favaro L, Basaglia M, Casella S, Hue I, Dousset X, de Melo Franco BDG, Todorov SD.** Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese, *Food Microbiol.* **2014**, vol.38 s.228–239.
60. **Figueroa-Gonzalez I, Cruz-Guerrero A, Quijano G.** The benefits of probiotics on human health. *J Microb Biochem Technol*, **2011**, doi: 10.4172/1948-5948.S1-003
61. **Fisher K, Phillips C.** The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* **2009**, 155, 1749–1757.

62. **Food and Drug Administration [FDA]**. 21 CFR Part 131: Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List). Silver Spring, **2007**. MA: FDA.
63. **Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT**. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci, *J. Clin. Pathol.* **1989**, vol.42 s.872-874.
64. **Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B**. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production, *Int J Food Microbiol.* **2010**, vol.141 s.15–28.
65. **Galdeano CM, LeBlanc AM, Viderola G, Bonet MEB, Perigón D**. Proposed Model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin. Vaccine Immunol.* **2007**, vol.14 s.485-492.
66. **Gareau MG, Sherman PM, Walker WA**. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2010**, vol.7 s.503–514.
67. **Gemechu T**. Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *Afr J Food Science* **2015**, 9:170–175
68. **Giri SS, Sen SS, Saha S, Sukumaran V, Park SC**. Use of a potential probiotic, *Lactobacillus plantarum* L7, for the preparation of a ricebased fermented beverage, *Front. Microbiol.* **2018**, vol.9 s.473. doi: 10.3389/fmicb.2018. 00473.
69. **Gleeson M, Bishop NC, Oliveira M, Tauler P**. Daily probiotic's (*Lactobacillus casei* Shirota) reduction of infection incidence in athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* **2011**, 21(1):55-64.
70. **Gouesbet G, Jan G, Boyaval P**. Two-dimensional elec-trophoresis study of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ther-motolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, vol.68 s.1055–1063. doi.org/10.1128/AEM.68.3.1055-1063.2002.
71. **Grande Burgos MJ, Pulido RP, Del Carmen Lopez Aguayo M, Galvez A, Lucas R**. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *Int. J.Mol. Sci.* **2014**, 15(12):22706-22727 doi: 10.3390/ijms151222706
72. **Gu Q, Zhang C, Song D, Li P, Zhu X**. Enhancing vitamin B12 content in soy-yogurt by *Lactobacillus reuteri*. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, vol.206 s.56–59.
73. **Guarino A, Vecchio AL, Canani RB**. Probiotics as prevention and treatment for diarrhea, *Curr Opin Gastroenterol.* **2009**, vol.25 s.18-23.
74. **Hammes WP, Vogel RF**. The Genus *Lactobacillus*. In: *The Lactic Acid Bacteria*, Wood BJB, Holzapfel WH. (Eds.), Chapman and Hall, London, UK **1995** vol. 2, s.19–54.
75. **Han DJ, Kim JB, Park SY, Yang MG, Kim H**. Growth inhibition of hepatocellular carcinoma Huh7 cells by *Lactobacillus casei* extract. *Yonsei Med J.* **2013**;54:1186–93.
76. **Hanchi H, Mottawea W, Sebei K, Hammami R**. The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update *Frontiers in Microbiology* **2018**, vol.9 doi: 10.3389/fmicb.2018.01791.
77. Hansen, P., and Lessel, E. F. (1971). *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen) comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 21, 69–71. doi: 10.1099/00207713-21-1-69
78. **Hatakka K, Blomgren K, Pohjavuori S, Kaijalainen T, Poussa T, Leinonen M, Korpela R, Pitkäranta A**. Treatment of acute otitis media with probiotics in otitis-prone children-A double-blind, placebocontrolled randomised study, *Clin Nutr.* **2007**, vol.26 s.314-321.
79. **Herich R, Levkut M**. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system, *Vet. Med. - Czech*, **2002**, vol.47 s.169–180.
80. **Herron-Olson L, Fitzgerald JR, Musser JM, Kapur V**. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **2007**. 2 (10), e1120.
81. **Hill D, Sugrue I, Tobin C, Hill C, Catherine Stanton C, Ross RP**. The *Lactobacillus casei* Group:History and Health Related, *Frontiers in Microbiology* **2018**, vol.9(2107), doi: 10.3389/fmicb.2018.02107
82. **Hojsak I, Snovak N, Abdovic S, Szajewska H, Misak Z, Kolacek S**. *Lactobacillus* GG in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in children who attend day care centers: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Clin Nutr.* **2010b**, vol.29 s.312-316.
83. **Hu T, Zhang Y, Cui Y, Zhao C, Jiang X ve ark**. Technological properties assessment and two component systems distribution of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from fermented milk. *Arch Microbiol.* **2018**, vol.200 s.567–580 doi.org/10.1007/s00203-017-1468-9

84. **Hussain SA, Patil GR, Reddi S, Yadav V, Pothuraju R ve ark.** Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) supplemented probiotic lassi prevents *Shigella* infiltration from epithelial barrier into systemic blood flow in mice model. *Microb. Pathog.* **2017**, vol.102 s.143–147.
85. **Islam SU.** Clinical uses of probiotics. *Medicine (Baltimore)* **2016**, 95(5):e2658. doi: 10.1097/MD.0000000000002658.
86. **Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S.** Probiotics: Effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, vol.73 s.444–450.
87. **Jacome PR, Alves LR, Cabral AB, Lopes AC, Maciel MA.** Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* **2012**;45:707e12.
88. **JimmySaint-Cyr M, Haddad N, Taminiau B, Poezevara T, Quesne S ve ark.** Use of the potential probiotic strain *Lactobacillus salivarius* SMXD51 to control *Campylobacter jejuni* in broilers. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, vol.247 s.9–17.
89. **Juturu V, Wu JC.** Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnol. Adv.* **2018**, vol.36 s.2187–2200.
90. **Kaneko D, Igarashi T, Aoyama K.** Reduction of the off-flavor volatile generated by the yogurt starter culture including *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in soymilk. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, vol.62 s.1658–1663.
91. **Karami S, Roayaei M, Zahedi E, Bahmani M, Mahmoodnia L, ve ark.** Antifungal effects of lactobacillus species isolated from local dairy products. *Int. J. Pharm. Investig.* **2017**, vol.7 s.77–81. doi: 10.4103/jphi.JPHI-9-17
92. **Kareem KY, Ling FH, Chwen LT, Foong OM, Asmara SA.** Inhibitory activity of postbiotic produced by strains of *Lactobacillus plantarum* using reconstituted media supplemented with inulin. *Gut Pathog* **2014**, vol.6 s.1-7.
93. **Katayama Y.** The antitumor activity of *Lactobacillus casei* – the direct effects of *L. casei* to human tumor cell lines. *Kansenshogaku zasshi.* **1990**;64:781–6.
94. **Kelly D, Conway S, Aminov R.** Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation, *Trends Immunol.* **2005**, 26:326e33.
95. **Kim BN, Kim NJ, Kim MN, Kim YS, Woo JH, Ryu J.** Bacteraemia due to tribe Proteaeae: a review of 13 2 cases during a decade (1991–2000) *Scand J Infect Dis.* **2003**;35:98–103.
96. **Kimoto-Nira H, Aoki R, Mizumachi K, Sasaki K, Naito H ve ark.** Interaction between *Lactococcus lactis* and *Lactococcus raffinolactis* during growth in milk: development of a new starter culture. *J Dairy Sci.* **2012**;95:2176–85.
97. **Klein G.** Taxonomy, Ecology and Antibiotic Resistance of *Enterococci* From Food and Gastro-Intestinal Tract. *International Journal of Food Microbiology.* **2003**, 88(2-3):123-131.
98. **Koebnick C, Wagner I, Leitsmann P, Stern U, Zunfit HJF.** Probiotic beverage containing *Lactobacillus casei* Shirota improves gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation, *Canadian Journal of Gastroenterology.* **2003**, vol.17(11) s.655-659.
99. **Krammer HJ, Von Seggem H, Schaumberg J, Neumer F.** Effect of *Lactobacillus casei* Shirota on colonic transit time in patients with chronic constipation. *Coloproctology*, **2011**, vol.33 s.109-113.
100. **Laukova A, Kandricakova A, Bunkova L, Pleva P, Scerbova J.** Sensitivity to enterocins of biogenic amine-producing faecal *Enterococci* from ostriches and pheasants. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* **2017** vol.9 s.483–491. doi: 10.1007/s12602-017-9272-z
101. **Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ.** Genes and molecules of *Lactobacilli* Supporting probiotic action *microbiol. Mol Biol Rev.* **2008**; 72(4):728
102. **LeBlanc A, LeBlanc J.** Effect of probiotic administration on the intestinal microbiota, current knowledge and potential applications, *World J Gastroenterol.* **2014**, vol.20(33) s.16518–16528.
103. **Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS.** Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In *Enterococci: From Commensals to Lead. Causes Drug Resistant Infection*; Massachusetts Eye and Ear Infirmary: Boston, MA, USA, **2014**, pp. 1–56.
104. **Lee YK.** Selection and maintenance of probiotic microorganisms. In *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, **2009**, s.177–187.

105. **Li B, Ding X, Evvie SE, Jin D, Meng Y ve ark.** Genomic and phenotypic analyses of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* KLDS SM. *J. Dairy Sci.* **2018**, vol.101(1) s.106–112, doi.org/10.3168/jds.2017-13534
106. **Li P, Gu Q.** Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LZ95, a potential probiotic strain producing bacteriocins and B-group vitamin riboflavin. *J. Biotechnol.* **2016**, vol.229 s.1–2.
107. **Lilly DM, Stillwell RH.** Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms, *Science*, **1965**, vol.47 s.747–748.
108. **Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C.** The healthy human microbiome. *Genome Med* **2016**;8:1–11.
109. **Lukic J, Chen V, Strahinic I, Begovic J, Lev-Tov H ve ark.** Probiotics or pro-healers: The role of beneficial bacteria in tissue repair. *Wound. Repair. Regen.* **2018**, 25, 912–922.
110. **Macfarlane GT.** Cummings JH Probiotics, infection and immunity. *Curr Opin Infect Dis* **2002**, vol.15 s.501–506.
111. **Madden JAJ, Plummer SF, Tang J, Garaiova I, Plummer NT ve ark.** Effect of probiotics on preventing disruption of the intestinal microflora following antibiotic therapy: A double-blind, placebo-controlled pilot study, *Int Immunopharmacol.* **2005**, vol.5 s.1091–1097.
112. **Maia OB, Duarte R, Silva AM, Cara DC, Nicoli JR.** Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium, *Vet. Microbiol.* **2001**, vol.79 s.183–189.
113. **Makino S, Ikegami S, Kume A, Horiuchi H, Sasaki H ve ark.** Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Br. J. Nutr.* **2010**, 104:998–1006. <https://doi.org/10.1017/S000711451000173X>
114. **Manoj G, Monika B, Shailesh Y.** Probiotics: The friendly microbes. *Indian Journal of Clinical Practice.* **2012**;23(3):126–30
115. **Marco ML, Pavan S, Kleerebezem M.** Towards understanding molecular modes of probiotic action, *Curr Opin Biotechnol.* **2006**, 17(2): 204–210.
116. **Maria K, Dimitrios B, Stavroula K.** Health Benefits of probiotics: A review. *ISRN Nutrition.* **2013**, s.1–7.
117. **Markowiak P, Slizewska K.** Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health, *Nutrients.* **2017**, 9:1021 s.20 of 30
118. **Marteau P, Shanahan F.** Basic aspects and pharmacology of probiotics: An overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2003**, vol.17 s.725–740.
119. **Marteau P.** Safety aspects of probiotic products, *Scand. J. Nutr./Näringsforskning*, **2001**, vol.45 s.22–30.
120. **McCormick SP.** Microbial detoxification of mycotoxins. *J. Chem. Ecol.* **2013**, vol.39 s.907–918.
121. **McMahon JB, Buckheit RW, Jr Gulakowski RJ, Currens MJ, Vistica DT ve ark.** Biological and biochemical anti-HIV activity of UC38, a new nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor, submitted. **1995**.
122. **Michaylova M, Svetlana M, Kimura K, Takashi S, Isawa K.** Isolation and characterisation of *Lactobacillus delbrueckii*ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from plants in Bulgaria. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, vol.269 s.160–169.
123. **Miquel S, Beaumont M, Martin R, Langella P, Braesco V, Thomas MA.** Proposed framework for an appropriate evaluation scheme for microorganisms as novel foods with a health claim in Europe, *Microbial Cell Factories.* **2015**, vol.14 s.48.
124. **Mohammad Kazem SY, Abolfazl D, Hamid Reza KZ, ve ark.** Characterization and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Iranian traditional yogurts. *Italian Journal of Animal Science.* **2017**;16(2):185–8.
125. **Monica P, Ravinder KM, Harsh P.** Screening of lactic acid bacteria of different origin for their probiotic potential. *J Food Process Technol.* **2016**;7(1):1–9.
126. **Montealegre MC, Singh KV, Murray BE.** Gastrointestinal tract colonization dynamics by different *Enterococcus faecium* clades. *J. Infect. Dis.* **2016** vol.213 s.1914–1922. doi: 10.1093/infdis/jiv597.

127. **Moro García MA, Alonso Arias R, Baltadjieva M.** Oral supplementation with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 8481 enhances systemic immunity in elderly subjects. *Age (Dordr)*. **2013**;35:1311–26.-
128. **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **1983**, vol.65 s.55–63.
129. **Nagpal R, Kumar A, Kumar M, Behare PV, Jain S, Yadav H.** Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review, *FEMS Microbiology Letters*. **2012**, vol.334(1) s.1–15.
130. **Nakayama Y, Mariya T, Sakai F, Ikeda N, Shiazaki T ve ark.** Oral administration of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 is effective for preventing influenza in mice. *Sci. Rep.* **2014** 4, 4638, <https://doi.org/10.1038/srep04638>.
131. **Nikbakht Nasrabadi E, Jamaluddin R, Abdul Mutalib MS, Khaza'ai H, Khalesi S ve ark.** Reduction of aflatoxin level in aflatoxin-induced rats by the activity of probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, vol.114 s.1507–1515.
132. **Nomura M, Kobayashi M, Narita T, Kimoto-Nira H, Okamoto T.** Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants, *J Appl Microbiol.* **2006**, vol.101 s.396–405.
133. **O'Sullivan L, Ross RP, Hill C.** Review: Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality, *Biochimie*, **2002**, vol.84 s.593–604.
134. **Oelschlaeger TA.** Mechanisms of probiotic actions—A review. *Int. J. Med. Microbiol.* **2010**, vol.300 s.57–62
135. **Oelschlaeger TA.** Mechanisms of probiotic actions—A review. *Int. J. Med. Microbiol.* **2010**, vol.300 s.57–62
136. **Ooi MF, Mazlan N, Foo HL, Loh TC, Mohamad R, Rahim RA ve ark.** Effects of carbon and nitrogen sources on bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* I-UL4. *Malays J Microbiol* **2015**;11:176–84.
137. **Owusu-Kwarteng J, Tano-Debrah K, Akabanda F ve Jespersen L.** Technological properties and probiotic potential of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from West African fermented millet dough. *BMC Microbiol.* **2015**. 15:261. doi: 10.1186/s12866-015-0602-6
138. **Pamer EG.** Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. *Science* **2016**;352:535–8.
139. **Parker RB.** Probiotics, the other half of the antibiotic story, *Anim. Nutr. Health*, **1974**, vol.29 s.4–8.
140. **Parolin C, Marangoni A, Laghi L, Foschi C, Nahui Palomino RA ve ark.** Isolation of vaginal *Lactobacilli* and characterization of anti-candida activity, *PLoS One*. **2015**, 10:e0131220. doi: 10.1371/journal.pone.0131220
141. **Patel RM, Denning PW.** Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: what is the current evidence? *Clin Perinatol* **2013**;40:11–25.
142. **Patel RM, Lin PW.** Developmental biology of gut-probiotic interaction. *Gut Microbes* **2010**, vol.1 s.186–195.
143. **Perdigon G, Fuller R, Raya R.** Lactic acid bacteria and their effect on the immune system, *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2001**, vol.2 s.27–42.
144. **Perdigon G, Maldonado Galdeano C, Valdez JC, Medici M.** *Eur. J. Clin. Nutr.* (2002) 56, Suppl. 4, S21–S26).
145. **Plessas S, Nouska C, Karapetsas A, Kazakos S, Alexopoulos ve ark.** Isolation, characterization and evaluation of the probiotic potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from Feta-type cheese, *Food Chem.* **2017**, vol.226 s.102–108. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.01.052.
146. **Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, Zanoni S, Matteuzzi D ve ark.** Folate production by *Bifidobacteria* as a potential probiotic property. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, vol.73 s.179–185.
147. **Prasanna PHP, Ranadheera CS, Vidanarachchi JK.** Microstructural aspects of yogurt and fermented milk. In *Microstructure of Dairy Products USA*, **2018**, s.181–208.
148. **Radchenko V.** Disturbance of the gut microbiocenosis and its correction in patients with chronic liver diseases and their correction in patients with the syndrome of chronic intrahepatic cholestasis (in Russian). *Gastroenterology of Saint-Petersburg*. **2004**, 2-3: M120.

149. **Ramiah K, Ten Doeschate K, Smith R, Dicks L.** Safety assessment of *Lactobacillus plantarum* 423 and *Enterococcus mundtii* ST4SA determined in trials with Wistar rats. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2009**, vol.1 s.15–23. doi: 10.1007/s12602-009-9010-2
150. **Ranadheera R.D.C.S., Baines S.K., Adams M.C.,** Importance of food in probiotic efficacy, *Food Res. Int.* **2010**, vol.43 s. 1–7.
151. **Ravinder N, Ashwani K, Manoj K.** Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiol Lett.* **2012**, vol.334 s.1–15.
152. **Ray M, Ghosh K, Singh S, Mondal KC.** Folk to functional: an explorative overview of rice-based fermented foods and beverages in India, *J. Ethnic Foods.* **2016**, vol.3 s.5–18. doi: 10.1016/j.jef.2016.02.002.
153. **Reed LJ, Muench H.** A simple method of estimating fifty per centend points. *Am. J. Hyg.,* **1938**, vol.27 s.493–497.
154. **Salminen S, Bouley C, Boutron Rault MC, Cummings JH, Franck A ve ark.** Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Bri J Nutr.* **1998**; vol.80: s.147–171.
155. **Sarantinopoulos P, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E.** Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, vol.76 s.93–105.
156. **Schachtsiek M, Hammes WP, Hertel C.** Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein CPF mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, vol.70 s.7078–7085.
157. **Schirru S, Todorov SD, Favaro L, Mangia NP, Basaglia M ve ark.** Sardinian goat's milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures, *Food Contr.* **2012**, vol.25 s.309–320.
158. **Scott KP, Antoine JM, Midtvedt T, van Hemert S.** Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. *Microb Ecol Health Dis* **2015**, 26. Doi.org/10.3402/mehd. v26.25877
159. **Semedo T, Santos MA, Lopes MFS, Figueiredo Marques JJ, Crespo MTB ve ark.** Virulence factors in food, clinical and reference *Enterococci*: A common trait in the genus? *Syst. Appl. Microbiol.* **2003**, vol.26 s.13–22
160. **Serban DE.** Gastrointestinal cancers: influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics, *Cancer Lett.* **2014**, 345(2): 258–270.
161. **Servin AL, Coconnier M.H.** Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* **2003**, vol.17 s.741–754.
162. **Sharma M, Devi M.** Probiotics: a comprehensive approach toward health foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2014**;54:537–52.
163. **Shida K, Nanno M.** Probiotics and immunology: separating the wheat from the chaff, *Trends in Immunology.* **2008**, vol.29 s.565–574.
164. **Shokryazdan P, Sieo CC, Kalavathy R, Liang JB, Alitheen NB ve ark.** Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains, *Biomed Res Int.* **2014**, 927268.
165. **Sidira M, Karapetsas A, Galanis A, Kanellaki M, Kourkoutas Y.** Effective survival of immobilized *Lactobacillus casei* during ripening and heat treatment of probiotic dry-fermented sausages and investigation of the microbial dynamics, *Meat Sci.* **2014**, vol.96 s.948–955.
166. **Sidira M, Santarmaki V, Kiourtzidis M, Argyri AA, Papadopoulou OS ve ark.** Evaluation of immobilized *Lactobacillus plantarum* 2035 on whey protein as adjunct probiotic culture in yoghurt production, *LWT-Food Sci. Technol.* **2017**, vol.75 s.137–146.
167. **Sieuwerths S, Bok FAMD, Hugenholtz J, Vlieg JETVH.** Unraveling microbial interactions in food fermentations: From classical to genomics approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, vol.74 s.4997–5007.
168. **Sieuwerths S, Molenaar D, van Hijum SAFT, Beerthuyzen M, Stevens MJA ve ark.** Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Appl Environ Microbiol.* **2010**, vol.76 s.7775–7784. doi.org/10.1128/AEM.01122-10.
169. **Silva LF, Casella T, Gomes ES, Nogueira MCL, Lindner JDDL ve ark.** Diversity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian water buffalo Mozzarella cheese, *J. Food Sci.* **2015**, 80:M411–M417.

170. **So JS, Lee CG, Kwon HK, Yi HJ, Chae CS ve ark.** Lactobacillus casei potentiates induction of oral tolerance in experimental arthritis. *Mol Immunol.* **2008**;46:172–80. [PubMed] [Google Scholar]
171. **Song DF, Zhu MY, Gu Q.** Purification and characterization of plantaricin ZJ5, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. *PLoS One*, **2014**, 9(8):e105549. doi:10.1371/journal.pone.0105549
172. **Spinler JK, Taweechotipatr M, Rognerud CL.** Human- derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe.* **2008**;14:166–71.
173. **Starostin BD.** Combination therapy of chronic pancreatitis (in Russian). *Gastroenterology of Saint-Petersburg.* **2004**, 2-3: M120.
174. Statistical Package for Social Sciences for Windows software, Chicago, ABD.
175. **Stefania P, Marco R.** Description of a novel probiotic concept: Implications for the modulation of the immune system. *Am J Immunol.* **2017**;13(2):107-13.
176. **Sun P, Wang J, Jiang Y.** Effect of *Enterococcus faecium* (SF68) on immune function in mice, *Food Chem.* **2010**, vol.123 s.63–68.
177. **Sur D, Manna B, Niyogi SK.** Role of probiotic in preventing acute diarrhea in children: a community-based, randomized, double-blind placebo-controlled field trial in an urban slum. *Epidemiol. Infect.* **2011**, vol.139 s.919-926.
178. **Taipale T, Pienihäkkinen K, Isolauri E, Larsen C, Brockmann E ve ark.** *Bifidobacterium animalis subsp lactis* BB-12 in reducing the risk of infections in infancy, *Br J Nutr.* **2011**, vol.105 s.409-416.
179. **Tandee K.** Evaluation of potential probiotic *Lactobacillus casei* strains PhD. Thesis. University of Wisconsin-Madison. **2013**.
doi:depot.library.wisc.edu/repository/fedora/1711.dl:LS3GUH4GRCPJD8Y/datastreams/REF/content.
180. **Teanpaisan R, Hintao J, Dahlén G.** Oral *Lactobacillus* species in type 2 diabetic patients living in southern Thailand. *Anaerobe.* **2009**;15:160–3.
181. **Tejero-Sarinena S, Barlow J, Costabile A, Gibson GR, Rowland I.** Antipathogenic activity of probiotics against *Salmonella Typhimurium* and *Clostridium difficile* in anaerobic batch culture systems: is it due to synergies in probiotic mixtures or the specificity of single strains? *Anaerobe* **2013**;24:60-5.
182. **Tiptiri-Kourpeti A, Spyridopoulou K, Santarmaki V, Aindelis G, Tompoulidou E ve ark.** *Lactobacillus casei* exerts anti-proliferative effects accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of TRAIL in colon carcinoma cells, *PLoS One.* **2016**, 11, e0147960
183. **Todorov SD, Franco BDM, Wiid IJ.** In vitro studies of beneficial properties and safety of lactic acid bacteria isolated from Portuguese fermented meat products, *Benef. Microbes.* **2014**, vol.5 s.351–366.
184. **Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG.** *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, vol.28 (3) s.603–661.
185. **Tripathi MK, Giri SG.** Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage, *J. Funct. Foods.* **2014**, vol.7 s.101–111. doi: 10.1016/j.jff.2014.04.030.
186. **Upadhyay N, Moudgal V.** Probiotics: A Review, *J Clin Outcomes Manage.* **2012**, vol.19 s.76-84.
187. **Vandenbergh PA.** Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.* **1993**, vol.12 s.221–238.
188. **Vanderpool C, Yan F, Polk DB.** Mechanisms of Probiotic Action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases, *Inflamm. Bowel Dis.* **2008**, vol.14 s.1585–1592. doi: 10.1002/ibd.20525.
189. **Vasiljevic T, Shah NP.** Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal.* **2008**, vol.18 s.714-728.
190. **Vemula SV, Zhao J, Liu J, Wang X, Biswas S, Hewlett I.** Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. *Viruses.* **2016**; 8: 96.
191. **Vitetta L, Llewellyn H, Oldfield D.** Gut Dysbiosis and the Intestinal Microbiome: *Streptococcus thermophilus* a Key Probiotic for Reducing Uremia *Microorganisms* **2019**, vol.7 s.228 doi:10.3390/microorganisms7080228
192. **Walsh CJ, Guinane CM, O'Toole PW, Cotter PD.** Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Lett.* **2014**, vol.588(22) s.4120–4130. doi: 10.1016/j.febslet.2014.03.035 PMID: 24681100

193. **Wang C, Chang T, Yang H, Cui M.** Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, **2015**, 47:231-236 doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.034
194. **Wasilewska E, Zlotkowska D, Wroblewska B.** Yogurt starter cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* ameliorate symptoms and modulate the immune response in a mouse model of dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Dairy Sci*, **2018**, vol.102 s.37-53.
195. **Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K.** NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun*. **2004**;72:5750--8.
196. **Wei Q, Ma LZ.** Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci* **2013**;14:20983e1005.
197. **Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, Van Leeuwen W, Van Belkum A ve ark.** The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* **2005**. vol.5 (12) s.751--762.
198. **Wong S, Jamous A, O'Driscoll J, Sekhar R, Weldon M ve ark.** A *Lactobacillus casei* Shirota probiotic drink reduces antibiotic-associated diarrhoea in patients with spinal cord injuries: a randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition*. **2014**, vol.111 s.672--678. doi:10.1017/S0007114513002973
199. **Wu Q, Tun HM, Leung FCC, Shah NP.** Genomic insights into high exopolysaccharide-producing dairy starter bacterium *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Sci Rep*. **2014**, vol.4 s.4974, doi.org/10.1038/srep04974
200. **Youn HN, Lee DH, Lee YN, Park JK, Yuk SS ve ark.** Intranasal administration of live *Lactobacillus* species facilitates protection against influenza virus infection in mice, *Antiviral Res.* **2012**, vol.93 s.138-43.
201. **Zhong L, Zhang X, Covasa M.** Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer, *World J Gastroenterol*. **2014**, vol.20(24) s.7878--7886.
202. **Zhu X, Zhao Y, Sun Y, Gu Q.** Purification and characterisation of plantaricin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ008. *Food Chem* **2014** 165:216--223
203. **Zhu Y, Michelle Luo T, Jobin C, Young HA.** Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis, *Cancer Lett.* **2011**, vol.309(2) s.119--127.
204. **Zisu B. ve Shah N.** Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *J. Dairy Sci.* **2003**, vol.86(11) s.3405--3415, doi.org/10.3168/jds. S0022-0302(03)73944-7

ÖZGEÇMİŞ

1994 yılında Antakya’ da doğdu. 2012 yılında Hasan Kalyoncu Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümünü kazandı. 2016 yılında mezun oldu. 2017 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’ nda yüksek lisansa başladı.

