

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GAYTA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN BAZI LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİ**

Elif YÜRÜMEZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2011**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GAYTA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİ

Elif YÜRÜMEZ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özlem AYDIN OSMANAĞAOĞLU

Bu çalışmada farklı yaş gruplarına ait insanların ve anne sütü ile beslenen yeni doğanların gaytasından izole edilen laktik asit bakterileri API-50CHL kit kullanımı ve 16S rDNA dizi analizi tanımlanmıştır. Tanımlanan bu suşlardan 4 tanesi *Lactobacillus fermentum*, 1 tanesi *Lactobacillus salivarius*, 2 tanesi *Lactobacillus rhamnosus*, 6 tanesi *Pediococcus acidilactici*, 4 tanesi *Pediococcus pentosaceus* ve 1 tanesi de *Enterococcus faecium* olarak Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı Kültür Koleksiyonuna dahil edilmiştir. Tanımlanan suşlardan bakteriyosin üreten *Enterococcus faecium* suşu, *Enterococcus faecium* OZ-E25 olarak adlandırılmış ve suşa ait bazı probiyotik özellikler *in vitro* koşullarda tespit edilmiştir. Probiyotik özellikler kapsamında düşük pH, pH-pepsin denemeleri, pankreatin ve safra tuzunda gelişimleri incelenmiştir. Hemolitik aktivitesi ve antibiyotik duyarlılık seviyeleri saptanmıştır. *E. faecium* OZ-E25 suşunun 5.saatin sonunda otoagregasyonu % 80,9 iken *S. Typhimurium* SL 1344 ve *E. coli* LMG 3083 (ETEC) ile 5.saatin sonundaki koagregasyon yüzdesi sırasıyla % 8,00 ve % 12,50 olarak belirlenmiştir. *E. faecium* OZ-E25 suşunun Caco-2 hücrelerine tutunma yüzdesi % 11,70 ($\pm 1,45$) olarak saptanmıştır. Yarışma denemelerinde ise *E. faecium* OZ-E25 suşunun *E. coli* LMG 3083 (ETEC) ve *S. Typhimurium* SL 1344 suşlarının tutunmalarını sırasıyla % $81,55 \pm 5,40$ ve % $80,12 \pm 2,67$ oranında engellendiği gözlemlenmiştir. *E. faecium* OZ-E25 suşunun ürettiği bakteriyosinin moleküler ağırlığı Tris-SDS-PAGE kullanılarak 4,5-5,0 kDa olarak saptanmıştır. 7 farklı enterosin primerinin kullanımı ile gerçekleştirilen PZR çalışması neticesinde suş tarafından üretilen enterosinin enterosin A olduğu belirlenmiştir.

Temmuz 2011, 123 sayfa

Anahtar kelime: Laktik Asit Bakterileri, gayta, probiyotik, *Enterococcus faecium*

ABSTRACT

Master Thesis

PROBIOTICS PROPERTIES OF SOME LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM FAECES SAMPLES

Elif YÜRÜMEZ

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem AYDIN OSMANAĞAOĞLU

In this study some probiotic properties of lactic acid bacteria (LAB) isolated from faeces of healthy people and infant from different ages are determined by using API50 kit and 16s rDNA sequence analysis. 4 *Lactobacillus fermentum*, 1 *Lactobacillus salivarius*, 2 *Lactobacillus rhamnosus*; 6 *Pediococcus acidilactici*, 4 *Pediococcus pentosaceus* and 1 *Enterococcus faecium* are isolated according to the 16S rDNA sequence which added to Microbial Genetic Laboratory. *Enterococcus faecium* strain with antimicrobial activity was named as *Enterococcus faecium* OZ-E25 and some probiotic properties of the strain was determined at in vitro conditions. The strain was tested against low pH, pH-pepsin, pancreatin and bile salt; hemolytic activity and antibiotic resistance was assigned to identify some probiotic properties. Hemolytic activity and antibiotic sensitivity levels of the strain were determined. Autoaggregation of *E. faecium* OZ-E25 strain was % 80,9 at the end of the fifth hour whereas the coaggregation of *E. faecium* OZ-E25 strain with *S. Typhimurium* SL 1344 and *E. coli* LMG 3083 (ETEC) were respectively % 8,00 and % 12,50. at the end of the fifth hour. Adhesion of *E. faecium* OZ-E25 strain to Caco-2 cells was determined as 11,70 % ($\pm 1,45$). In competition study, adhesion of *E. coli* LMG 3083 and *S. Typhimurium* SL 1344 to Caco-2 cells was obstructed by *Enterococcus faecium* OZ-E25 respectively 81,55 % $\pm 5,40$ and 80,12 % $\pm 2,67$. Molecular weight of the bacteriocin produced by *E. faecium* OZ-E25 was determined as 4,5-5 kDa by using Tricin SDS-PAGE. According to the results of the PCR study realized by seven different enterocin primers, enterocin produced by the strain defined as enterocin A.

July 2011, 123 pages

Key words: Lactic Acid Bacteria, faeces, probiotic, *Enterococcus faecium*

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimimin her aşamasında ilgi ve desteğini hiç esirgemeyen, bana her zaman yol gösteren, tecrübeleriyle bana ışık tutan, yardımcı olan, sunduğu imkanlarla en temel bilgileri edinmemi sağlayan, her zaman saygı duyacağım danışmanım değerli hocam; Sayın Doç. Dr. Özlem AYDIN OSMANAĞAOĞLU (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) 'na,

Deney aşamasında çalışmamın bir kısmını gerçekleştirmem için laboratuvar imkanlarından yararlanmama izin veren değerli hocam Prof. Dr. Haluk ATAÖĞLU (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü) 'na, birlikte çalışma imkanı bulduğum, tecrübeleriyle yanımda olan, yönlendiren, ilgisi ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarımın bana destek olan değerli hocam Doç. Dr. Erkan YILMAZ (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) 'a, çalışmalarımın bana yardımcı olan hocam Yrd. Doç. Dr. Doruk ENGİN (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü)'e,

Deney aşamasında tecrübeleriyle yanımda olan, yönlendiren, ilgisi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Güven URAZ (Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı)'a, tezimin savunmasında beni değerlendiren ve katkıda bulunan değerli hocam Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı)'a

Tez aşamam boyunca desteklerini esirgemeyen, laboratuvarında gece gündüz her türlü çalışma imkanı sağlayan sayın Dr. Serdar CEYLANER'e,

Yardımları için Mikrobiyal Genetik Laboratuvar arkadaşlarım Fadime KIRAN, Başak ORAL, Kübra ALMACIOĞLU, İpek ACAR, Turabi YILMAZ, Bilge ÇETİN ve Harun ÖNLÜ'ye,

Gece gündüz demeden hafta sonu demeden birlikte çalıştığımız ayrıca laboratuvar arkadaşım Feriba TURHAN ERYILMAZ ve destekleri için eşi Kemal ERYILMAZ'a,

Eğitimim için çaba harcayan, benimle gülen ağlayan, beni bugünlere getiren, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, yüksek lisans tezim boyunca bana sabır gösteren, her şekilde yanımda olan, her türlü sıkıntımın beni yalnız bırakmayan, tezimi bitirmem için de ekstra çaba gösteren annem Nurdane YÜRÜMEZ ve babam Sebahattin YÜRÜMEZ'e,

Yaşam kaynağım, en kötü günümde bile beni güldürmeyi başaran, her sıkıntımı ve mutluluğumu paylaştığım, hayatımda her zaman ilk sırada yer alacak olan, tezimin her aşamasına bana yardım eden, beni düşünen, benimle gece gündüz çalışan, tezimi en çok hak ettiğine inandığım tek kardeşim İrem YÜRÜMEZ'e,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim her aşamasında beni yalnız bırakmayan, tezimin yapım ve yazım aşamasında yardımlarını eksik etmeyen, benden sabrımı ve sevgisini hiç esirgemeyen, benim için her türlü fedakarlığı yapacağını bildiğim ve aynı zamanda laboratuvar arkadaşım olan Şükrü CANPOLAT'a ve ailesine,

Manevi desteklerinden dolayı Nilgün-Müfit BİNİCİ ailesine ve çalışmam için bana kaynak olan oğulları Yiğit BİNİCİ'ye;

Beni yoğun çalışma temposundan uzaklaştıran, nefes almamı sağlayan, beni dinleyen ve anlamaya çalışan, yanlarına gitmek için can attığım, onlarla çalışmaktan her zaman zevk duyacağım, bana karşı her zaman anlayışlı olan ve her zaman yanımda olacaklarını bildiğim çalışma arkadaşlarım Seda ÇAYLI, Eda TÜRÜDÜ ve Metin ÇOLAK'a;

Ve;

Hayatımın en güzel vakitlerini yoğun bir tempoda geçirmeyi kabul eden, her türlü zorluğa rağmen vazgeçmeden tezimi bitirme şansını verdiği için kendime göstermiş olduğu gayretinden dolayı çok teşekkür ediyorum.

Elif YÜRÜMEZ

Ankara, Temmuz 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Bağırsak Florası.....	3
2.2 Probiyotiklerin Tanımı	5
2.3 Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar.....	6
2.3.1 Laktik asit bakterileri.....	6
2.3.1.1 <i>Lactococcus</i>	7
2.3.1.2 <i>Lactobacillus</i>	7
2.3.1.3 <i>Leuconostoc</i>	8
2.3.1.4 <i>Enterococcus</i>	9
2.3.1.5 <i>Pediococcus</i>	11
2.4 Probiyotik Mikroorganizmaların Etki Mekanizması.....	11
2.5 Probiyotik Mikroorganizmaların Sağlık Açısından Yararları.....	12
2.6 Probiyotik Mikroorganizmalarda Aranılan Özellikler.....	13
2.6.1 Asitlik ve safra tuzlarına dirençlilik.....	14
2.6.2 Antibiyotik duyarlılıkları.....	16
2.6.3 Antimikrobiyal aktivite.....	17
2.6.3.1 Bakteriyosin üretimi.....	17
2.6.3.2 <i>Enterococcus</i> sp. tarafından üretilen bakteriyosinler.....	22
2.6.4 Bağırsak hücrelerine (Caco-2 hücreleri) tutunma ve kolonizasyon.....	26
2.6.5 Agregasyon.....	28
2.6 Endüstriyel Açıldan Probiyotikler.....	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	31
3.1 Materyal.....	31
3.1.1 Bakteri Kültürleri.....	31

3.1.2 Kültür Ortamları.....	31
3.1.3 Tampon ve Çözeltiler.....	31
3.1.4 Moleküler markörler.....	31
3.1.5 Kimyasallar.....	31
3.1.6 Kullanılan çözelti ve malzemenin sterilizasyonu.....	31
3.1.7 Bakteri kültürlerinin saklanması.....	32
3.2 Yöntem.....	33
3.2.1 Laktik asit bakterilerinin izolasyonu.....	33
3.2.2 İzolatların tanımlanması.....	33
3.2.2.1 İzolatların kısmi karakterizasyonu.....	33
3.2.2.2 Biyokimyasal testler.....	34
3.2.2.3 İzolatların 16S rDNA dizi analizi genotipik karakterizasyonu.....	35
3.2.2.3.1 Genomik DNA izolasyonu ve saflık tayini.....	35
3.2.2.3.2 Agaroz jel elektroforezi.....	36
3.2.2.3.3 16S rDNA bölgesinin baz dizisinin belirlenmesi ve izolatların tanımlanması.....	36
3.2.3 <i>Enterococcus faecium</i> OZ-E25 suşunun probiyotik özelliklerinin belirlenmesi.....	36
3.2.3.1 Düşük pH'ya direnç özelliğinin belirlenmesi.....	36
3.2.3.2 Pepsine karşı direnç özelliğinin belirlenmesi.....	37
3.2.3.3 Pankreatine karşı direnç özelliğinin belirlenmesi.....	37
3.2.3.4 Safra tuzuna karşı direnç özelliğinin belirlenmesi.....	38
3.2.3.5 Hemolitik aktivitesinin belirlenmesi.....	38
3.2.3.6 Antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi.....	38
3.2.3.7 Antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi.....	39
3.2.3.8 Caco-2 hücrelerine tutunma özelliğinin belirlenmesi.....	39
3.2.3.9 Patojen bakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunmalarının engellenmesi.....	40
3.2.3.10 Caco-2 hücrelerine tutunma özelliğinin floresan mikroskopunda görüntülenmesi.....	41
3.2.3.11 Caco-2 hücrelerine tutunma özelliğinin SEM'de görüntülenmesi.....	41
3.2.3.12 Otoagregasyon ve koagregasyon özelliğinin belirlenmesi.....	42
3.2.4 Bakteriyosin üretimi.....	43

3.2.4.1 Enzim uygulamasının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi.....	43
3.2.4.2 <i>Enterococcus faecium</i> OZ-E25 suşunun ürettiği bakteriyosinin kısmi saflaştırılması.....	43
3.2.4.3 <i>Enterococcus faecium</i> OZ-E25 suşunun ürettiği bakteriyosinin sodyum sülfat poliakrilamit jel elektroforeziyle (SDS-PAGE) tespit edilmesi ve moleküler ağırlığının belirlenmesi.....	44
3.2.4.4 Protein büyüklüğünün saptanması.....	45
3.2.4.5 <i>Enterococcus faecium</i> OZ-E25 suşunun üretmiş olduğu enterosin geninin PZR ile tanımlanması.....	46
3.2.5 İstatistiksel Analizler.....	47
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	48
4.1 Bakterilerin İzolasyonu.....	48
4.2 İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması.....	48
4.2.1 İzolatların kısmi karakterizasyonu.....	48
4.2.2 Biyokimyasal testler.....	49
4.2.3 İzolatların 16S rDNA dizi analizi sonuçları.....	49
4.3 <i>Enterococcus faecium</i> OZ-E25 Suşunun Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	52
4.3.1 <i>Enterococcus faecium</i> OZ-E25 suşunun düşük ph, pepsin, pankreatin ve safra tuzlarına karşı direnç özellikleri sonuçları.....	52
4.3.2 Hemolitik aktivitenin belirlenmesi.....	54
4.3.3 Antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	56
4.3.4 Antimikrobiyal aktivite spektrumunun belirlenmesi.....	57
4.3.5 Caco-2 hücrelerine tutunma sonuçları.....	58
4.3.6 Patojen bakteriler varlığında Caco-2 hücrelerine tutunmasının engellenmesi sonuçları.....	59
4.3.7 Caco-2 hücrelerine tutunmasının floresan ve elektron mikroskopundaki görüntüleri.....	60
4.3.8 Otoagregasyon ve koagregasyon sonuçları.....	61
4.4 Bakteriyosin Üretimi Sonuçları.....	62
4.4.1 Farklı enzim uygulamasının bakteriyosin üzerindeki etki sonuçları.....	62

4.4.2 <i>Enterococcus faecium</i> OZ-E25 suşunun üretmiş olduğu bakteriyosinin saflaştırması sonucu moleküler ağırlığının belirlenmesi.....	63
4.4.3 <i>Enterococcus faecium</i> OZ-E25 suşunun üretmiş olduğu enterosin geninin PZR ile belirlenmesi.....	63
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	65
KAYNAKLAR.....	73
EKLER.....	89
EK 1 Bakteri izolasyonunda ve gelişiminde kullanılan besiyerleri.....	90
EK 2 Tampon ve çözeltiler.....	93
EK 3 DNA analizinde kullanılan moleküler markörler.....	98
EK 4 Kimyasallar.....	100
EK 5 Kromozomal (Genomik) DNA izolasyonunda kullanılan PROMEGA WIZARD GENOMIC DNA ISOLATION KIT prospektüsü.....	101
EK 6 İzolatların 16S rDNA dizi analizleri ve BLAST Tarama Sonuçları.....	103
EK 7 Enterosin geninin dizi analizi ve blast sonucu.....	121
ÖZGEÇMİŞ.....	123

SİMGELER DİZİNİ

ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Baz Çifti
C	Sitozin
°C	Santigrat Derece
Caco-2	Adenokarsinoma hücreleri
dNTP	Deoksi
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetra-Asetik Asit
EtBr	Etidyum Bromit
EPS	Eksopolisakkarit
FDA	Food and Drug Administration
gr	Gram
GRAS	Generally Regarded As Safe
H2O2	Hidrojen peroksit
IBS	Spastik kolon sendromu
kDa	Kilodalton
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LB	Luria Bertani
Mg	Magnezyum
mg	Miligram
MgCl2	Magnezyum Klorür
MgSO4	Magnezyum Sülfat
ml	Mililitre
MnSO4	Manganez Sülfat
MRS	De Man, Rogosa ve Sharpe Broth
NaCl	Sodyum Klorür
ng	nanogram
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaPO4	Sodyum fosfat

nm	Nanometre
OH	Hidroksil
OsO ₄	Osmiyum tetraoksit
PCR (PCR)	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
sn	Saniye
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TGE	Trypton Glukoz Yeast Ekstrakt
T _m	Melting Temperature (Erime Sıcaklığı)
UV	Ultra Viyole
V	Volt
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 Gram boyama yapılmış Laktik Asit Bakterilerin ıfık mikroskobunda Görüntüleri.....	49
Şekil 4.2 İzolatlara ait kromozomal DNA görüntüsü.....	50
Şekil 4.3 <i>E. faecium</i> OZ-E25 suşunun pH dirençliliği.....	53
Şekil 4.4 <i>E. faecium</i> OZ-E25 suşunun pH 2 ve pH 3 pepsin dirençliliği.....	53
Şekil 4.5 <i>E. faecium</i> OZ-E25 suşunun pankreatin ve safra tuzu dirençliliği.....	53
Şekil 4.6 Hemolitik aktivite görüntüleri.....	55
Şekil 4.7 Antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	57
Şekil 4.8 Caco-2 hücrelerine tutunma düzeyleri.....	59
Şekil 4.9 Patojen bakterileri engelleme düzeyleri.....	59
Şekil 4.10 <i>E. faecium</i> OZ-E25 suşunun Caco-2 hücrelerine <i>in vitro</i> tutunmasının akridin oranj boyama sonrasında floresan mikroskobundaki görüntüleri.....	60
Şekil 4.11 <i>E. faecium</i> OZ-E25 suşunun Caco-2 hücrelerine tutunmasının SEM'deki görüntüsü.....	60
Şekil 4.12 <i>E. faecium</i> OZ-E25 suşunun 5 saatlik otoagregasyon yüzdesi.....	61
Şekil 4.13 <i>E. faecium</i> OZ-E25 suşunun 3. ve 4. saat sonrasındaki otoagregasyonu.....	61
Şekil 4.14 <i>E. faecium</i> OZ-E25 suşunun <i>E. coli</i> LMG 3083 ile koagregasyonu.....	62
Şekil 4.15 Farklı enzimlerin <i>E. faecium</i> OZ-E25 suşu tarafından üretilen bakteriyosin üzerindeki etkileri.....	63
Şekil 4.16 Farklı enterosin primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünleri.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 İnsan sindirim sisteminde bulunan mikroorganizmalar.....	4
Çizelge 2.2 Bazı bakteriyosinler ve üretici mikroorganizmalar.....	21
Çizelge 2.3 Enterokoklardan izole edilmiş bakteriyosinler.....	24
Çizelge 2.4 Varolan enterosinlere benzer literatürde tanımlanan diğer enterosinler.....	25
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan bakteri türleri, gelişme ortamları ve optimum gelişim sıcaklıkları	32
Çizelge 3.2 Enterosin primerleri.....	46
Çizelge 3.3 PZR reaksiyon karışımları.....	47
Çizelge 4.1 İzolatların 16S rDNA dizi analizi sonuçları.....	50
Çizelge 4.2 <i>E. faecium</i> OZ-E25 suşunun düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzuna karşı direnç durumları.....	52
Çizelge 4.3 <i>E. faecium</i> OZ-E25 suşunun antibiyotik duyarlılık profili.....	56
Çizelge 4.4 <i>E. faecium</i> OZ-E25 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivite spektrumu.....	58

1. GİRİŞ

Günümüzde gıda pazarının büyük payını probiyotik gıdalar oluşturmaktadır (Saarela 2007). Probiyotik ürünlerin tüketiminin her geçen gün arttığı bilinmektedir ve bu artışın göstergeleri olarak Amerika Birleşik Devletleri'ndeki yoğurtların % 60'nın probiyotik kültür içermesi ve Finlandiya'da tüketicilerin % 64'nün probiyotik ürün tüketmesi gösterilebilir. (Campagne ve Gardner 2005, Saarela 2007). Avrupa ülkelerinde en çok tüketilen ürünler arasında probiyotik bakterileri içeren süt ürünlerinin ikinci sırada yer aldığı belirtilmektedir (Menrad 2003). Günümüzde probiyotik katkılı ürünler, küresel pazar payının 1,5 milyar doların üzerinde olduğunu işaret etmektedir (Heller 2009).

Probiyotikler laktik asit bakterilerini de içeren bazı yararlı maya ve bakteriler olarak bilinmektedir. Yüzyıllardır probiyotikler fermente süt ürünleri (yoğurt, kefir vs.) aracılığıyla insan beslenmesinde yerini almıştır. Probiyotik mikroorganizmalar ürettikleri maddeler yardımıyla gıdaların sindirimine, vitamin üretimine ve zararlı mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların önlenmesine yardımcı olarak doğal floranın dengesini korumaktadır. Bu özelliklerinden dolayı son yıllarda bu faydalı bakteriler, yoğurt gibi fermente süt ürünlerine eklenerek, probiyotik ürün olarak piyasaya sunulmaktadır (Sanders 2003).

Probiyotiklerin çoğu "laktik asit bakterileri" (LAB) olarak tanımlanmış, insan gastrointestinal mikroflorasının önemli bir parçası olan, zararlı özellik taşımayan geniş bir bakteri grubuna dahildir (Gionchetti vd. 2000). Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerine dahil olan bakterilere örnek olarak *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. ve *Enterococcus* sp. verilebilir (Klein vd. 1998). Bazı ülkelerde probiyotik olarak *Enterococcus* sp.'nin kullanımı antibiyotik direnç genlerini içermesi bakımından tartışma konusu oluşturmaktadır (Lund ve Edlund 2001).

Vücuda alınan probiyotiklerin etkilerini gösterebilmeleri için canlı olarak ve çok sayıda bağırsak sistemine ulaşmaları gerektiği bilinmektedir. Bu nedenle probiyotik olacak suşların mide asiditesine ve safra tuzlarına karşı dirençli olmaları, patojenlerle mücadele edebilmeleri, bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri antimikrobiyal maddeleri üretmeleri ve probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların konakçı sağlığına

zarar vermemesi gerekmektedir (Salminen ve vonWright 1998). Ayrıca gastrointestinal sistem duvarına tutunarak kolonize olmaları, konukçu üzerindeki olumlu etkilerinin çok kısa sürede başlaması (birkaç veya 1 haftadan kısa) ve antibiyotik alındığında etkilerini sürdürebilmeleri gerekmektedir (Young ve Huffman 2003).

Probiyotiklerin en çok gastrointestinal sistem üzerine olan yararları araştırılmaktadır. Akut ishal tedavisine, spastik kolon sendromu (IBS) gibi hastalıkların hafifletilmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir (Senok vd. 2005). Akut ishal tedavisinde etkinliği saptanmış probiyotik suşların kronik ve tekrarlayan ishallerde kullanılabileceği bildirilmiştir (Benchimol ve Mack 2004). Rotavirüsler tarafından oluşturulan diyarenin süresinin probiyotik kullanımı ile kısaltılabileceği yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Pant vd. 1996).

Bu çalışmada, çeşitli yaş gruplarına ait bireylerden alınan gayta örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinden antimikrobiyal aktiviteye sahip olan *Enterococcus faecium* OZ-E25 suşunun probiyotik özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Üretmiş olduğu bakteriyosinin saflaştırılması gerçekleştirilerek PZR ile bakteriyosin geninin tespiti amaçlanmıştır.

2.KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Bağırsak Florası

İntestinal flora, oldukça yüksek bir popülasyona yani 400'den fazla bakteriyal tür içeren bir ekosisteme sahiptir (Luckey ve Floch 1972). Mide-bağırsak sisteminin içeriğinde yer alan trilyonlarca mikroorganizma yaklaşık 1,5 kg gibi bir kitle değerindedir. Bir başka ifade ile kolonda 1 g dışkıda 1×10^{12} CFU (coloni forming unit) bakteri bulunmaktadır. Söz konusu flora üyeleri, bağırsak savunma mekanizmasında önemli rol oynarlar (Collins ve Ribson 1999). Buna ek olarak gastrointestinal flora, patojenlere karşı doğal bir bariyer oluşturarak immün sistemi ve bağırsak hareketlerini stimüle eder (Hentges 1992).

İntestinal sistemde yaygın olarak bulunan mikroorganizmaların dağılımı çizelge 2.1'de belirtilmiştir. Sindirim sistemindeki mikrobiyal yük ve çeşitlilik beslenme şekli, bağışıklık, pH, yaş ve antimikrobiyal bileşenler gibi birçok faktöre bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Fooks vd. 1999). Midede çok az mikroorganizma bulunurken bağırsağın sonlarına doğru sayıda artış gözlenmektedir. Mide ve ince bağırsağın büyük bir kısmında kolonizasyon bu bölgedeki asidite yüzünden sınırlıdır. Kalın bağırsaktaki mikroorganizma sayısı 10^{12} 'ye kadar yükselmektedir (Ballongue 1993). Mikrobiyal flora, midede 101-103 kob/g, jejunumda 107 kob/g, ileumda 109 kob/g değerlerinde olurken kalın bağırsakta 1011-1012 kob/g yoğunluğa ulaşmaktadır (Isolauri 2004).

Çizelge 2.1 İnsan sindirim sisteminde bulunan mikroorganizmalar (Fooks vd. 1999)

Bakteri genusları	
<i>Enterobacteries</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Enterococcus sp.</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Bacteroides</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Eubacterium</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Peptosteptococcus</i>
Küfler	<i>Megasphaera</i>
<i>Peptococcus</i>	<i>Gemmiger</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Treponema</i>
<i>Fusobacterium</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Eurobacterium</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Veillonella</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Corynebacterium</i>	

Probiyotikler, bağırsakların mikrobiyal popülasyonunun yararlı etkilerini destekleyen canlı mikroorganizmalardır (Holzapfel ve Schillinger 2002). İnsan intestinal sisteminde laktik asit bakterileri (LAB) doğal olarak meydana geldiği için intestinal suşlar özellikle ticari amaçla kullanılmak üzere probiyotik olarak geliştirilmektedir (Pinto vd. 2006).

Kalın bağırsakta *Bacteriodes*, *Clostridia* ve *Escherichia coli* gibi patojen mikroorganizmalar bulunmaktadır. Bu mikroorganizmaların patojenik etkileri kalın bağırsak mikroflorasında dengede tutulmaktadır (Ziemer ve Gibson 1998). Ancak patojenlerle kontamine olmuş gıdaların vücuda alınmasıyla veya mikrobiyal florayı etkileyen faktörlerin değişmesine bağlı olarak patojenler çoğalarak sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Vücuda yararlı mikroorganizmaların alınması veya bu mikroorganizmaların gelişimini teşvik edecek faktörlerin oluşması durumunda sağlık üzerinde olumlu etkiler gözlenmektedir (Holzapfel 2006).

2.2 Probiyotiklerin Tanımı

Probiyotik kelimesi Yunancadan türetilmiştir ve anlamı yaşam içindir. İlk kez probiyotik tanımı antibiyotiğin zıt anlamı olarak Lilley ve Stillwell tarafından bir organizmanın gelişimi için başka bir organizma tarafından salınan maddelerin tanımlanması şeklinde kullanılmıştır. Probiyotikler ve sağlığa olumlu etkileri üzerine ilk çalışma ise 19. yüzyılın sonlarında Rus bilim adamı Metchnikoff tarafından yapılmıştır. Metchnikoff mikrofloranın oluşması üzerine sistematik olarak çalışmış ve fermente süt ürünlerinin vücutta bulunan toksik bir maddeden dolayı zehirlenmeyi engellediğini öne sürmüştür (Fuller 1989,1999, Gismondo ve Drago 1999). 1974 yılında Parker bağırsak dengesinin sağlanmasına yardım eden, bağırsak mikrobiyal florasına katkıda bulunan organizmaları ve ürettikleri maddeleri probiyotik olarak tanımlamıştır (Fuller 1999, Schrezenmeir ve de Vrese 2001). Fuller, probiyotikleri “Konakçının intestinal mikroflorasının gelişimini teşvik eden canlı mikrobiyal katkı maddeleri” olarak tanımlamıştır. Bu tanımda güçlü bir probiyotik etki için canlı hücre varlığının önemi özellikle vurgulanmaktadır. Probiyotiklerin canlı bir mikrobiyal yem olarak kullanıldığında konak hayvanın bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek olumlu yönde etkilediğini açıklamıştır (Naidu vd. 1999).

Probiyotiklerin canlı olmayan formlarının sağlık üzerine yararlı etkileri olduğu da öne sürülmektedir. Bağırsak mikroflorasının bileşim ve aktivitesindeki olumsuz değişimleri minimum düzeye indirmek ve bunun bireye olan etkilerini sınırlamak için geliştirilen diyetetik yöntemler içinde öncelikle probiyotiklerin kullanılmasının yanında, özellikle son yıllarda bu mikroorganizmaların gelişmesini teşvik etmek amacıyla prebiyotiklerden de yararlanılmaktadır (Fuller ve Gibson 1998).

Ürünlerdeki mikrobiyal yoğunluklarının yanında probiyotiklerin tüketimi ile ilgili bir diğer önemli konu, sindirim sisteminde tutunarak aktive göstermelerine rağmen probiyotiklerin sindirim sisteminde uzun süre kolonize olamamasıdır. Ayrıca sindirim sisteminde çoğalmaları yavaş olmaktadır. Bu süreçte metabolik olarak aktif durumdadırlar (Marco vd. 2006). Bazı tip probiyotik bakteriler sindirim enzimlerinden etkilenirler, fakat önemli bir miktarı intestinal kanalda hayatta kalarak kolona ulaşır (Oozeer vd. 2002).

2.3 Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar

Probiyotik olarak en sıklıkla kullanılan bakteriler laktik asit bakterileri (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*) dir. Ancak bu türlerin tüm suşlarını probiyotik olarak kullanmak mümkün değildir. Bunlar bağırsak florasında ve birçok fermente süt ürünlerinde doğal olarak bulunmaktadır. Gıdaların insan ve hayvan kaynaklı izolatların çoğunlukla *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* türlerini içerdiği görülmüştür. Güvenirlilik ve fonksiyonları ile ilgili özelliklerin suşa spesifik olması nedeniyle gıda ya da probiyotik preparasyonların hazırlanmasında kullanılacak enterokokların suş bazında dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir (Vancanneyt vd. 2002). Bakteriyosin üretimi gibi mikrobiyolojik özelliklere sahip olsalar da patojenlere antimikrobiyal direnç aktarımına neden olabileceklerinden endişe edilmektedir. Bu bakterilerin ticari formları ilaç preparasyonları veya gıdalara canlı bakteri eklenmesiyle hazırlanmaktadır (Mombelli ve Gismondo 2000).

2.3.1 Laktik asit bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB), doğada yaygın olarak bulunan, çeşitli gıda maddelerinde sıkça rastlanan bozulmalara neden olmaları ve bazı gıdaların üretimi ve olgunlaştırılmalarında olumlu ve önemli rol oynamaları nedeniyle gıda teknolojisinde önemli yer tutmaktadırlar (Champomier-Verges vd. 2002). Gıdaların bozulmasına neden olan mikroorganizmalar veya gıda kaynaklı patojenleri içeren bazı mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivite gösterdikleri de bilinmektedir. Laktik asit bakterilerinin diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği bu antagonistik aktivitenin farklı bazı mekanizmalar sonucu oluştuğu bilinmektedir (Parada vd. 2007). Bazı gıdaların mikroflorasında doğal olarak bulunan ya da sonradan eklenen LAB kültürlerinin genellikle zararsız olduğu ve insan sağlığı için bir avantaj olduğu kabul edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde laktik asit bakterileri GRAS (genellikle güvenli kabul edilen) statüsünde kabul edilirler. LAB'lerinin bazı metabolitleri ve diğer starter kültür bakterilerinin gıdalarda kullanılmasına ve ilave edilmesine izin verilmiştir (Osmanağaoğlu ve Beyatlı 2002).

Probiyotik olarak kullanılan en yaygın laktik asit bakterileri sınıflandırmada 6 gruba ayrılır. Bunlar; *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Lactococcus*'tur (Tannock 1997). Bu bakteriler fermente olan veya olmayan gıdalarda mevcut olmakla beraber insan kommensal mikroflorasının da en önemli bileşenlerindedir. Güvenli olduklarının bilinmesi ve özellikle de probiyotik bir rol üstlenmeleri nedeniyle ilgi çekmektedirler.

2.3.1.1 *Lactococcus*

Laktokoklar, Gram-pozitif, katalaz negatif, hareketsiz ve spor oluşturmeyen bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Gelişmeleri için başta azot kaynakları olmak üzere çok sayıda besin maddesine ihtiyaç duyarlar. Homofermentatif özellikte olan laktokoklar, karbonhidrat katabolizması sonucu ana ürün olarak laktik asit üretmektedirler. Optimum gelişme sıcaklıkları 30 °C'dir. 10 °C'nin altında ve 45 °C'nin üstünde gelişmedikleri için hem streptokoklardan hem de enterokoklardan ayrılırlar (Schleifer 1987, Holt vd. 1994).

Lactococcus lactis, insan ve çoğu hayvanın gastrointestinal bölgesinde bulunan önemli bir laktik asit bakterisi türüdür (Dieye vd. 2003, Nouaille vd. 2003). Peynir, tereyağı, krema ve yoğurt gibi fermente süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanımlarından dolayı özellikle *L. lactis* subsp. *cremoris* geniş bir aralıkta fermente süt ürünlerinde kullanılmaktadır (Stiles ve Holzapfel 1997).

2.3.1.2 *Lactobacillus*

Laktobasiller, laktik asit bakterileri grubunda geniş yere sahip olan türlerdir. İnsan, hayvan, bitki ve gıdalardan izole edilen fenotipik, biyokimyasal ve fizyolojik çeşitlilik gösteren çok fazla suşa sahiptir. Laktobasiller peynir, yoğurt, hamur ekmekleri, zeytin, turşu, fermente balık ve sosis-sucuk üretiminde starter kültür olarak kullanılırlar ve fermente edilmemiş sebzelerde doğal biyolojik koruyucu olarak ön plana çıkarlar. Gastrointestinal bölgede kolonize olan laktobasil türlerinin probiyotik olarak etki gösterdiği rapor edilmiştir.

Lactobacillus cinsi bakteriler mikroskopta çubuk, uzun zincir ya da kokobasil şeklinde görülen, Gram-pozitif, spor oluşturmeyen, katalaz negatif, birkaç tür dışında hareketsiz bakterilerdir. Fermentasyon sonunda oluşan ürünlere göre homofermantatif ve heterofermantatif türleri bulunmaktadır. Kromozomlarındaki nükleik asit kompozisyonunun % 33–55’ini G+C oluşturmaktadır (Stiles ve Holzapfel 1997).

Lactobacillus türlerine farklı ortamlarda sıklıkla rastlanmaktadır. Doğada oldukça yaygın olarak bulunmaktadırlar. Genellikle zengin karbonhidrat bulunan ortamlarda yaşarlar. Karbonhidrat metabolizması sonucunda oluşan ürünler ortamın asiditesini artırır. Böylece bu tip ortamlarda gelişemeyen bakteriler için antimikrobiyal etki yaratır (Hammes ve Vogel 1995).

2.3.1.3 *Leuconostoc*

Leuconostoc türleri ovoid kok ve genellikle zincir şeklindedir. Optimum gelişme sıcaklıkları 20-30 °C’dir. Yaygın olarak bitki, süt ürünleri ve diğer gıdalarda bulunmaktadır. Heterofermantasyon ile glikozu fermente ederek, başlıca D-laktat, etanol ve gaz üretmektedir. Bu bakteri grubu, fermente gıda ürünlerinin (örneğin süt, tereyağı, peynir ve et) tekstür ve organoleptik kalitesindeki değişimlerde önemli rol oynamaktadır (Dellaglio vd. 1985).

Leuconostoc grubu dekstranın üretimi ile şeker proseslerinde ve şarap üretimindeki malalaktik fermentasyon ile meydana getirdikleri bozulmalar açısından önemli spesifik ticari değere sahiptirler. Günlük fermentasyonlarda sitrattan tat komponentlerinin üretimi ve dekstranın üretimi araştırmaları, endüstri ve medikalde geniş çapta yer almaktadır (Stiles ve Holzapfel 1997).

Lökonostokların 4 türü olduğu ortaya konmuştur. *Leuconostoc lactis*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. paramesenteroides* ve *Leu. oenos*’tur. *Leu. cremoris* ve *Leu. dextranicum* ise *Leu. mesenteroides* ‘in alt türleri olarak tanımlanmıştır (Fox 2004).

2.3.1.4 *Enterococcus*

Enterokok türleri laktik asit bakterileri arasında bulunan ve gıdalarda önemli yerleri olan bakterilerdir. Filogenetik olarak *Streptococcus* ve *Lactococcus* cinslerinden daha çok *Carnobacterium* cinsine yakındırlar (Devriese vd. 1993).

Enterokoklar ilk olarak 1899 yılında Thiercelin tarafından tanımlanmıştır. *Enterococcus* cins adı 1903 yılında Thiercelin ve Jouhaud tarafından bağırsak kaynaklı Gram-pozitif diplokoklar için önerilmiştir. Andrewes ve Holder ise 1906'da endokarditis görülen bir hastadan izole edilen potansiyel patojen bir bakteriyi, insan bağırsağından izole edilen suşlara benzerliğinden dolayı *Streptococcus faecalis* olarak sınıflandırmıştır (Franz vd. 1999). Daha sonra 1933 yılında Lancefield tarafından D grup antijene sahip olan fekal streptokoklar için serolojik bir tiplendirme geliştirilmiştir. *Streptococcus* cinsi bakteriler 1937 yılında Sherman tarafından; piyojenik streptokoklar, viridans streptokoklar, laktik streptokoklar ve enterokoklar olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Enterokok grubunun içinde *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus bovis* ve *Streptococcus equinus* yer almıştır. *Streptococcus durans*, ya ayrı bir tür olarak ya da *S. faecium*'un alt türü olarak tanımlanmıştır. *Streptococcus* cinsi 1984 yılında DNA-DNA ve DNA-RNA hibridizasyon çalışmaları ile bunların streptokoklardan farklılığı ortaya konmuş ve buna bağlı olarak *Enterococcus* olarak ayrı bir cins olarak kabul edilmiştir. *Streptococcus*, *Lactococcus* ve *Enterococcus* olmak üzere 3 ayrı cins başlığında anılmaya başlanmıştır (Schleifer ve Kilpper-Balz 1984). 16S rRNA dizilimi dikkate alındığında enterokoklar 4 gruba ayrılmaktadır. *E. faecium*, *E. hirae*, *E. mundtii* "faecium" grubu içinde; *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus* ve *E. pseudoavium* "avium" grubu içinde; *E. classiflavus* ve *E. gallinarum* "gallinarum" grubu içinde yer almakta; *E. columbae* ve *E. cecorum* da dördüncü grubu oluşturmaktadır. *E. faecalis*, *E. dispar*, *E. flavescens*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfurous* ve *E. seriolicida* gibi diğer tüm enterokoklar bireysel olarak sınıflandırılmıştır (Franz vd. 1999, 2003, Klein 2003).

Enterokoklar, insan ve hayvanlarda normal intestinal florada bulunurlar. İnsan ve hayvan kaynaklı fekal materyaller tarafından kontamine olmuş çevrelerde de yaygındırlar (Franz vd. 1999). Primer patojen olarak değerlendirilmezler fakat antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek direnç gösterme yeteneklerine bağlı olarak dünya

apında nozokomiyal patojenler olarak ortaya çıkmaktadırlar (Linden ve Miller 1999). Fonksiyonel özelliklerinden yani asitlik, proteoliz ve lipolitik aktiviteleri, sitrat metabolizması, probiyotik özellikleri ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal aktiviteye sahip proteinleri sentezleme yeteneklerinden dolayı fermente gıda endüstrisinde önemli yer tutan laktik asit bakterileridir (Andrighetto vd. 2001, Sarantinopoulos vd. 2001, Franz vd. 2003, Moreno vd. 2006, Ogier ve Serror 2008).

Enterokoklar ısıyla muamele edilen yiyeceklerde çürümeye neden olsalar da bazı peynirlerde starter kültür olarak, insan ve hayvanlarda ise probiyotik kültür olarak kullanılmaktadırlar (Jay 2000). Optimum gelişim sıcaklıkları 37°C'dir. 10–45°C sıcaklık aralığında, pH 9.6'da, % 6.5 NaCl'de ve % 40 tuzda gelişim gösterebilirler (Domig vd. 2003).

Enterokoklar birçok gıdada gıda güvenliğinin geliştirilmesi için uygun görülen mikrobiyal katkılardandır. Bakteriyosin üreten enterokok suşları peynirin de dahil olduğu birçok gıda grubuna ilave edildiğinde bu gıdalarda *Listeria monocytogenes* gibi gıda patojenlerinin gelişimi engelleyebilmektedir. Yapılan çalışmalarda enterokokların, geleneksel peynirlerin olgunlaşma ve aroma gelişiminde önemli rol oynadığı bildirilmektedir. *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* ve *Enterococcus faecium* bakterilerinin çeşitli suşlarının destek kültür olarak Cheddar peynirinde kullanımında olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu mikroorganizmaların ilavesi proteoliz ve lipolizi arttırarak aroma gelişimini hızlandırmıştır (Gillian vd. 1999).

Enterokokların birçok üyesi bakteriyosin üretmektedir. Enterokokların üretmiş olduğu bakteriyosinlerden en iyi karakterize edilenler; enterocin A, enterocin B, enterocin P, enterocin L50 ve enterocin Q'dur. Bu bakteriyosinler çeşitli fermente gıdalardan izole edilen *Enterococcus faecium* tarafından üretilmektedir (Kang ve Lee 2005).

Enterococcus cinsi içinde şu ana kadar tanımlanmış 32 tür bulunmaktadır. Bunlardan *E. faecalis* and *E. faecium* en önemli iki tür olup insanların gastrointestinal sisteminin doğal florasında bulunmaktadırlar (Giraffa 2002).

Bu cins içindeki türler *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. malodoratus*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. mundtii*, *E. raffinosus*, *E. solitarius* ve *E. pseudoavium*’ dur. Ayrıca son on yıl içinde *E. haemoperoxidus*, *E. villorum*, *E. phoeniculicola*, *E. canis*, *E. moraviensis*, *E. columbae* ve *E. cecorum* de enterokok cinsi içinde tanımlanmıştır (Koneman vd. 2005, Fisher ve Philips 2009).

2.3.1.5 *Pediococcus*

Gram pozitif, katalaz negatif, mikroaerofilik ve kok şeklinde bakterilerdir. Koklar ikili veya tekli şekilde bulunabilir veya kısa zincir veya tetrat oluşturabilirler. Bu cinsin türleri tuza dayanıklı homofermantatif bakterilerdir. Bitkilerde ve bazı fermente ürünlerde (örneğin, turşu, bira, şarap) bulunmaktadır. % 5.5 tuz konsantrasyonunda rahatlıkla gelişebilirken, % 10 tuz konsantrasyonunda da zayıf bir gelişme göstermektedirler. Gelişebildikleri sıcaklık aralığı 7-45 °C’dir. Optimum gelişme sıcaklıkları ise 25-37 °C arasında değişmektedir. Bu cinse ait türler tuza toleranslı olmaları, asit üretmelerinin yüksek olması ve oldukça geniş bir sıcaklık aralığında gelişebilmeleri nedeniyle gıda mikrobiyolojisinde önemli rol oynamaktadır. *Pediococcus cerevisiae*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* önemli *Pediococcus* türleridir. *P. cerevisiae*, *P. acidilactici* türleri özellikle turşu ve sucuk fermentasyonunda starter kültür olarak kullanılmaktadır (Ünlütürk ve Turantaş 2003).

2.4 Probiyotik Mikroorganizmaların Etki Mekanizması

Probiyotik bakteriler konukçuda çok yönlü (multiple) ve farklı etkiler göstermektedir. İntestinal luminal ortamı, epitelyal ve mukozal bariyer fonksiyonunu ve mukozal immun sistemi etkileyebilmektedir. Probiyotiklerin konakçıyı bağırsak sistemi bozukluklarına karşı nasıl koruduğunu açıklamaya çalışan birçok mekanizma bulunmaktadır. Probiyotiklerin etkileri açıklayan çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Bunlardan ilki antimikrobiyal bileşikler üreterek besinler ve kolonizasyon bölgeleri için rekabet ederek patojen ve zararlı bakterilerin sayılarını azaltır. İkincisi luminal bölgenin pH’sını azaltır. Üçüncüsü antikor düzeyinin artması ve makrofaj aktivitesini artırarak bağırsak sistemini iyileştirmesidir. Dördüncüsü intestinal flora bariyerinin fonksiyonunu

arttırmaktadır (Goldin ve Gorbach 1984, Salminen 1999, Rolfe 2000, Forestier vd. 2001, Ng vd. 2009).

Epitelyal hücreler, dendritik hücreler, monositler/makrofajlar, B hücreleri, T hücreleri ve NK hücreleri immun cevaba dahil olan bir dizi hücre tipi üzerinde etki göstermektedirler. Enterik bakterilerin inhibisyonu ve bariyer fonksiyonun gelişmesi probiyotik bakteriler tarafından sağlanmaktadır. Mukus üretimindeki artmayla intestinal bariyer fonksiyonunda gelişme görülmektedir. Probiyotik bakteriler ve intestinal mukoza arasında karşılıklı bir sistematik cevap bulunmaktadır (Ng vd. 2009).

Probiyotik mikroorganizmalar, canlı mikrobiyal hücrelerin direkt etkileri veya bu hücrelerin metabolitleri aracılığıyla dolaylı etkileri ile faydalı olabilirler. Genellikle pozitif sağlık etkileri sağlamak için süt ürünündeki probiyotik mikroorganizmaların canlı olması gerektiği düşünülebilir. Ayrıca canlı yerine cansız mikroorganizmaların kullanılması daha uzun raf ömrüne sahip olması ve buzdolabında saklama gereksinimlerinin azalmasından dolayı ekonomik olarak daha cazip olacaktır (Rietschel ve Brade 1992).

2.5 Probiyotik Mikroorganizmaların Sağlık Açısından Yararları

Probiyotiklerin tüketimi sonucu; laktoz toleransını artırması, sindirim sistemi enfeksiyonlarını engellemesi, kanser riskini azaltması, kolesterolü düşürmesi ve kalp-damar hastalıklarını engellemesi, sindirim zorluklarını gidermesi, çeşitli vitaminler sentezleyerek besleyiciliği artırması ve bağışıklık sisteminin kuvvetlenmesi gibi faydalı etkileri sayılabilir (Salminen vd. 1998, Fooks vd. 1999, Saarela vd. 2000, O'Sullivan 2006).

Probiyotikler, sindirim sistemi enfeksiyonlarına sebep olan bakterilere karşı bakteriyosin veya antimikrobiyal madde üretimi ile patojenleri inhibe etmektedirler. Bu antimikrobiyallere organik asitler, kısa zincirli yağ asitleri, hidrojen peroksit, etanol ve diasetil gibi bileşenler örnek gösterilebilir. Ayrıca sindirim sistemindeki epitel hücreler ile etkileşimi sonucu antikor ve immunoglobulin üretimini arttırmaktadır (De Vuyst vd. 2004).

Probiyotik özellik gösteren canlıların yaygın olarak kabul edilen özelliklerinden birisi de kolesterol seviyesini düşürmeleridir (Pinto vd. 2006). Yüksek kolesterol seviyesi kalp-damar hastalıklarının gelişimi açısından çok önemlidir, fakat kolesterol düşürücü ilaçlar mevcut olmasına karşın hem fiyatları hem de yan etkilerinden dolayı kullanımları tercih edilmemektedir. Laktik asit bakterilerinin kalp-damar hastalıkları riskini arttıran LDL-kolesterol ve fibrinojen seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiştir (De Vries vd. 2006) Bu etkinin nedenlerinden birisi de safra asitlerinin enzimatik dekonjugasyonudur. Sindirim sisteminden salgılandıktan sonra tekrar absorbe olduklarında kolesterolün yeniden sentezinde kullanılabilirler. Dekonjuge safra tuzları konjuge formlarına oranla daha zor emildikleri için vücuttan daha fazla safra asidi atılımı gerçekleştirir (Pinto vd. 2006).

Sindirim sisteminde kolonize olan probiyotiklerin diğer bir yararlı etkisi enzimatik faaliyetleri sonucu sindirim enzimleri tarafından parçalanamayan bileşenlerin parçalanması ve emilimini sağlamalarıdır. Bu sayede bu bileşenlerin de kalın bağırsakta emilimi sağlanmaktadır (Marco vd. 2006, Cruz vd. 2007). Bunlara ilave olarak bazı laktik asit bakterilerinin vitamin sentezleme özelliklerinden dolayı ekstra faydaları olduğu bilinmektedir (Magarinos vd. 2007, Morelli 2007).

Son yapılan araştırmalarda ise probiyotiklerin bağışıklık sistemini kuvvetlendirdiği belirtilmektedir. Bu özelliğin etki mekanizması bakteriler arasında farklılıklar göstermektedir. Bu mekanizmalar arasında mukozanın IgA ve IgM tepkisini teşvik etmesi, lenfosit üretimini ve fagositik aktiviteyi artırması gösterilmektedir (Saarela vd. 2000, Comanne vd. 2005). Ayrıca sitokin ve T hücrelerinin sentezini tetiklediği de tespit edilmiştir (De Vries vd. 2006, Holzapfel 2006).

2.6 Probiyotik Mikroorganizmalarda Aranılan Özellikler

Probiyotiklerin bulunduğu konakçıdaki diğer mikroorganizmalara karşı güçlü etkileri olduğu ve konakçıya yararları olduğu kabul edilmektedir. Ancak probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmalarda bazı özelliklerin bulunması istenmektedir.

Güvenilir olmalı, kullanıldığı insan ve hayvanda yan etki oluşturmamalıdır. Stabilité gösteren, karsinojenik ve patojenik bakterilere karşı antagonistik etki yapmalıdır. Konakçıda hastalıklara direnç gibi yararlı etkiler oluşturabilmelidir. Antibiyotiğe bağılı ortaya çıkan hastalıklarda (diyare) bağırsak florasını düzenlemek amacı ile kullanılabilirdiğinden, bağırsaktaki antibiyotiklerden etkilenmemelidir. Üretim ve depolama sırasında canlılığını ve aktivitesini koruyabilmelidir. Probiyotikler patojenik olmamalı ve toksin üretmemelidir (Gismondo ve Drago 1999, Saarela vd. 2000).

Pankreatik enzim, mide asiti ve safraya direnç göstermesi, intestinal ekosistemde canlılığını devam ettirebilmesi, intestinal mukozaya tutunması, insan kaynaklı olması, güvenlik, kullanım ve saklama sırasında özelliklerini koruyabilmesi, gıda alerjilerine ve patojenlere karşı immün sistemi güçlendirmesi, aktarılabılır antibiyotik direnç genlerine sahip olmaması ve teknolojik olarak iyi özelliklere sahip olması bunların başlıcalarıdır. Probiyotik üretiminde kullanılan mikroorganizmalar FDA tarafından GRAS (generally recognised as safe) olarak tanımlanmış mikroorganizmalardır (Lee vd. 1999). Probiyotik mikroorganizmaların ortamın pH'ını düşürmesi, bakteriyosin gibi antimikrobiyal peptidler salgılayarak patojenlerle mücadele etmesi de istenen önemli bir özelliktir (Young ve Huffman 2003).

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

2.6.1 Asitlik ve safra tuzlarına dirençlilik

Probiyotik özellik gösteren bir mikroorganizma bağırsak sisteminde ve endüstriyel işlemler sırasında canlı kalmalıdır. Ağızdan alınan probiyotiklerin bağırsak sistemine yararlı etki edebilmeleri için önce midenin asidik ortamında (pH 1,5-3,0) canlı kalmaları ve canlı bir şekilde bağırsağa geçmeleri gerekmektedir. Bundan dolayı probiyotik mikroorganizma seçiminde ilk aranması gereken en önemli özellik suşların asidik ortama karşı dirençli olmalarıdır (Dunne vd. 1999, Fernández vd. 2003).

Probiyotik seçiminde aranan diğer bir kriter suşların safra tuzlarına karşı dirençli olmalarıdır (Lee ve Salminen 19950). Gastrointestinal sistemde canlılıklarını korumaları ince bağırsakta safra tuzuna dayanımlarına bağlıdır. İntestinal sistemdeki safra tuzunun fizyolojik konsantrasyonu % 0.3-0.5 arasında değişmektedir (Begley vd. 2005). Laktik asit bakterilerinin ince bağırsak koşullarında *in vitro* direnç düzeylerinin belirlendiği % 0.3'lük safra tuzu uygulaması, mikroorganizmaların probiyotik özelliklerinin tanımlanmasında kritik önem taşımaktadır. (Charteris vd. 1998, Maragkoudakis vd. 2006). Safra, yağların ayrılmasında ve emiliminde rol oynayan kompleks bir sindirim salgısıdır (Russel ve Setchell 1992). Safra asitleri antimikrobiyal aktivite içeren amfipatik moleküller olarak tanımlanmıştır. Gram pozitif bakteriler çevrelerinde bulunan toksik ajanlara karşı gram negatif bakterilerden daha duyarlıdır (Thanassi vd. 1997). Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler safranın toksik etkisine direnç gösterebilmek ve sindirim sistemi gibi safra bakımından zengin ortamlarda yaşayabilmek için özgül mekanizmalar geliştirmişlerdir (Gunn 2000).

Bağırsak florası, safra asitlerini metabolize edebilen bazı laktik asit bakterilerini içerir. *L. lactis ssp cremoris*'in (Kim vd. 1999); safraya, konjuge olmamış safra asitlerine (kolik asit), konjuge olmuş safra asitlerine (glikokolik asit (GCA)) veya taurodeksikolik aside (TDCA) karşı adaptif yanıt oluşturduğu gözlenmiştir (Kim vd. 2001).

Bazı laktobasillerin de safra tuzlarını parçalamasıyla safra tuzlarının karaciğer tarafından emilmesi engellenmektedir. Böylece safra tuzu emilimi olmayan karaciğerin, safra tuzu sentezlemek için fazla miktarda serum kolesterolünü kullanması sonucunda serumda kolesterol miktarını azalttığı bulunmuştur (Vaughan vd. 1999).

Ticari et starter kültürlerinin probiyotik olabilme özelliklerinin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada, pH 6'daki % 0,3'lük safra tuzu konsantrasyonu kritik değer olarak kabul edilmiştir. Bu çalışmada *L. sake* (RM10) ve *P. acidilactici* (P2)'nin düşük pH ve yüksek safra tuzu konsantrasyonlarında en dirençli suşlar olduğu tespit edilmiştir (Erkkilä ve Petäjä 2000).

Safra tuzlarının varlığı probiyotik mikroorganizmalarda daha az inhibe edici etkiye sahiptir. *S. thermophilus* suşlarının çoğu % 0,5'lik safra tuzu ile inhibe olurken,

Lactococcus lactis suşları % 1'lik safra tuzuna az ya da çok dirençli bulunmuştur (Vinderola ve Reinheimer 2003).

2.6.2 Antibiyotik duyarlılıkları

Günümüzde tüm enfeksiyon tipleri için çeşitli antibiyotikler kullanılmaktadır. Ağız yoluyla alınan antibiyotikler mikroflora dengesini bozmakta, hatta bazı durumlarda kolit (kalın bağırsak iltihabı) oluşumuna sebep olmaktadır.

Antibiyotiklerin etkisini önemli ölçüde azaltan patojen mikroorganizmaların dirençli formları besin zinciri aracılığıyla gıdalardan insan sindirim sistemine aktarılabilmektedir. Bu sebeple mikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde ciddi sorunlar yaşanmaktadır (Klein 2003).

Bakterilerde antibiyotik direnci yapısal olabileceği gibi sonradan da kazanılabilir. Yapısal dirençlilik doğal bir oluşumdur ve tür özelliği olarak ortaya çıkar. Ancak kazanılmış dayanıklılık genetik mutasyon ve diğer bakterilerden DNA aktarımıyla meydana gelebilir (Saarela vd. 2000).

Probiyotiklerle ilgili en önemli risk faktörü olarak antibiyotik direnç genlerinin özellikle patojenler olmak üzere diğer türlere aktarılmasıdır. Antibiyotik direnci tüm dünyada giderek artan bir sağlık problemi haline gelmektedir. Artan antibiyotik kullanımı antibiyotiklere karşı dirençli kültürlerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur (Ouoba vd. 2008). Antibiyotik direnci, kültürün kendine ait özelliği olabildiği gibi seri mutasyonlarla veya gen transferi ile kazanılabilmektedir. Kendine ait olan veya mutasyonlar sonucu oluşan direncin aktarımı çok düşük bir ihtimal olarak görülürken gen transferi ile edinilen direncin aynı şekilde aktarılması mümkün olmaktadır. Transfer edilen direnç genleri kendi başlarına bir hastalık etkeni olmamakla birlikte patojenlerin direnç kazanması sonucu hastalık oranının artması, hastalık süreçlerinin uzaması, tedavilerin maliyetlerinin artması ve ölüm oranlarının artması gibi sonuçlara yol açmaktadır (Ammor vd. 2007).

Bir laktik asit bakterisinin probiyotik olarak kabul edilebilmesi için FAO/WHO (2002) tarafından şu kritere sahip olması gerekmektedir. Antibiyotik direnç yapısının belirlenerek antibiyotik direnç genlerini taşıyıp aktarabilen ve intestinal sistemde mukozal yapıya zarar veren suşlar probiyotik olarak kullanılamaz.

Birçok laktik asit bakterisi antibiyotiklere karşı direnç göstermesine rağmen bu özelliklerinin doğal özellikleri olduğu ve diğer canlılara aktarılamayacağı belirtilmektedir. Ancak bazı kültürlerinde plazmitlerde kodlanmış ve diğer canlılara aktarılabilen antibiyotik direnç genlerine rastlanmıştır (Zhou vd. 2005, Ouoba vd. 2008). Probiyotik kültürler farklı gıda ürünlerine kullanılabilmesi için antibiyotik direnç genlerinin yayılması için önemli bir potansiyel kaynak olma ihtimalleri bulunmaktadır (D'Aimmo vd. 2007).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada antibiyotik kullanımı sırasında probiyotik desteği verildiğinde antibiyotiğe bağılı olarak oluşan ishal sıklığının % 60 oranında azaldığı bildirilmiştir (Anonymous 2005).

2.6.3 Antimikrobiyal aktivite

Antimikrobiyal aktivite üretimi bakteriler, arkeler gibi prokaryotik canlıların yanında bitki ve hayvanlar da dahil olmak üzere ökaryotların birçok üyesi tarafından paylaşılan bir özelliktir (Zasloff 2002, Dufour vd. 2007). Ökaryotlardaki antimikrobiyal aktivite farklı hücrelere karşı değışik düzeylerde toksisite göstermeleridir. Bakteriler tarafından üretilen antimikrobiyal aktivite ise tipik olarak bakteriyosin olarak adlandırılır (Cleveland vd. 2001). Gram negatif (-) bakterilerde kolisin (Kotelnikova ve Gelfand 2002), Gram pozitif (+) bakterilerde ise nisin en çok çalışılan ve uygulama alanı olan bakteriyosinlerdir (Lubelski vd. 2008).

2.6.3.1 Bakteriyosin üretimi

Bakteriyosin tanımı ilk kez Jakob vd. tarafından 1953 yılında yapılmıştır. Bu tanım farklı türler arası antagonistik ilişkiler ve kolisin proteinlerini kapsamaktaydı. Daha

sonra yapılan çalışmalarla buna benzer çok fazla madde bulununca terimin kapsamı da genişletilmiştir (Eckner 1992).

Bakteriyosinler, protein yapısında antagonistik maddeler olup sınırlı sayıda bakteriye, özellikle de bakteriyosin üreten bakteriye yakın türlere karşı bakterisidal veya bakteriyostatik aktiviteye sahip bileşiklerdir (Tagg vd. 1976).

Gıda ve yemlerde antimikrobiyal katkı maddesi olarak kullanım potensiyellerinden dolayı, laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinler büyük bir ilgi çekmektedirler. Bakteriyosinler, genellikle Gram pozitif (+) bakteriler tarafından üretilir. Son yıllarda çok sayıda LAB bakteriyosini karakterize edilmiştir. Antibiyotiğe dirençli patojenik bakterilerde ve birçok kimyasal koruyucunun neden olduğu istenilmeyen yan etkilerde belirgin bir yükseliş olması nedeniyle yeni antimikrobiyal ajanların gelişmesi oldukça önem kazanmıştır. Enfeksiyon tedavisi için ilaçlarda ve gıda katkı maddesi olarak yemlerde koruyucu olarak kullanılmaları, gelişmeye devam eden bakteriyosinlere olan ilgiyi giderek arttırmaktadır. Pek çok bakteriyosin, antimikrobiyal aktivitelerini antibiyotik ve koruyuculardan tamamen farklı bir şekilde ortaya koymaktadır. Bu nedenle bazı durumlarda antibiyotik ve koruyuculara tamamlayıcı olarak kullanılmaktadırlar (Kuipers vd. 1996, Pag ve Sahl 2002, Gillor vd. 2005).

LAB tarafından salgılanan bakteriyosinler genellikle Gram pozitif bakteriler üzerinde inhibitör aktivite göstermektedirler. Gram pozitif bakterilerin ürettikleri bakteriyosin benzeri ürünler, oldukça geniş antibakteriyal aktivite gösterdikleri için uygulamalı araştırmaların en gözde olanı olmaya devam etmektedir (Osmanağaoğlu 2005). Birçok LAB bakteriyosinleri gıdalarda bozulma ve hastalık etmeni bakteriler örneğin *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve *Clostridium botulinum* üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. Ancak son zamanlarda Gram negatif bakteriler üzerinde inhibitör etkiye sahip çok az sayıda da olsa LAB bakteriyosinleri tespit edilmiştir. *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*'un bazı suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin Gram pozitif bakterilerin yanı sıra Gram negatif bakteriler üzerinde de etkili olduğu gözlenmiştir (Lee ve Paik 2001, de Kwaadsteniet vd. 2005, Mollendorff vd. 2006, Todorov vd. 2007).

LAB'nin üretmiş oldukları bakteriyosinlerin büyük bir çoğunluğunun antimikrobiyal spektrumunun dar olması ve gıda bileşiminin koruyucu etkisi gibi faktörler bakteriyosinlerin gıda koruyucusu olarak kullanılabilirliğini sınırlamaktadır (Mazzotta ve Montville 1997).

Günümüzde tüm bilim adamları bakteriyosinlerin sınıflandırılmasında Klaenhammer tarafından yapılan gruplandırmayı esas olarak kabul etmişlerdir (Jack vd. 1995, Oscariz ve Pisabarro 2001). Klaenhammer'in oluşturmuş olduğu sınıflandırmaya göre Gram pozitif bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosinler kimyasal yapılarına, molekül büyüklüklerine, enzimatik hassasiyetleri, etki mekanizmaları ve termostabilitelerine göre 4 ana sınıfa ayrılmışlardır (Klaenhammer 1993). Gram negatif bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosinler ise ayrı bir grup olarak değerlendirilmektedir (Klaenhammer 1993, Nes vd. 1996, Ennahar vd. 2000).

Grup I bakteriyosinler: Bu gruptaki bakteriyosinler genellikle "lantiyonin" içermeleri nedeniyle lantibiyotikler olarak adlandırılmaktadır. Lantibiyotiklerin yapılarında lantiyonin (Lan) ve metillantiyonin (Me-Lan) olarak adlandırılan türev amino asitlerin bulunuşu karakteristiktir. Ayrıca bu grup üyelerinde, dehidroalanin ve dehidrobütirin gibi, dehidro amino asitler de bulunmaktadır (Twomey vd. 2002). Bu grupta yer alan nisin, laktisin 3147A ve 3147B ile plantarisin C, ısı stabil biyomoleküllerdir (Chen ve Hoover 2003). Grup I bakteriyosinler, kimyasal yapılarına ve antimikrobiyel aktivitelere göre, IA ve IB olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

IA alt grubundakiler net pozitif yüke sahip, hidrofobik polipeptidlerden meydana gelmişlerdir. Membran aktif özellik gösterir. Genellikle hücre membranlarına etki ederek hedef hücrelerin inhibisyonunu sağlarlar. Nisin, bu alt grubun en önemli üyesidir. (Twomey vd. 2002, Chen ve Hoover 2003). IB alt grubundakiler ise genellikle yüksüz ya da negatif yüke sahip bakteriyosinler bu grupta yer almaktadır. Globüler peptit yapısı içerirler. Belirli bakteriyel enzimleri ya da enzim sistemlerini inhibe ederek antimikrobiyel aktivite göstermektedirler (Twomey vd. 2002).

Grup II bakteriyosinler: Genelde ısı stabil ve translasyon sonrasında modifiye olmayan bakteriyosinleri içeren oldukça geniş bir gruptur. Antimikrobiyel aktiviteleri,

membran aktif molekül yapısından kaynaklanmaktadır. Grup II bakteriyosinler, üç alt grup altında toplanmaktadır (De Martinis vd. 2002).

Ila alt grubu bakteriyosinler, *Listeria* türlerine karşı aktivite gösteren pedyosin benzeri bakteriyosinlerdir. Bu bakteriyosinlerin N-uç bölgelerinde yer alan YGNGV-C dizisi ve peptit ortasında yer alan disülfid köprüsü oluşturmuş iki sistein amino asidi evrimsel süreçte korunmuştur. Pedyosin PA-1 (AcH), lökosin A, sakasin A, sakasin P ve enterosin A, Ila alt grubu üyesi bakteriyosinlerdir (Nes vd. 1996, O'Sullivan vd. 2002). Son yapılan araştırmalar; Ila alt grubu bakteriyosinlerin, anti-listeriyal ajanlar olarak, nisin gibi grup I üyesi bakteriyosinlerden daha etkili olduklarına işaret etmektedir. Ancak, bu grup bakteriyosinler nisin kadar geniş aktivite spektrumu göstermemektedir (Nes vd. 2002). Iib alt grubu bakteriyosinler, laktokoksin G, laktokoksin F ve laktasin F'nin dahil olduğu iki peptitli bakteriyosinleri içermektedir (van Belkum vd. 1991, Diep vd. 1996). Bu grupta bulunan bakteriyosinlerin en önemli özelliği, tam aktivite gösterebilmeleri için her iki peptide de ihtiyaç duymalarıdır. Bu peptitler, tek tek oldukça zayıf inhibisyon aktivitesi gösterirken, aynı ortamda olduklarında sinerjetik etkileşim sonucu çok daha aktif moleküller haline gelmektedir (Fimland vd. 1996, Nes vd. 2002). Iic alt grubu üyelerinin çoğu sistein amino asit kalıntısı içermekte ve bu nedenle bu bakteriyosinlere tiyolbiyotikler denmektedir. Tiyol-aktif bakteriyosinler olup, aktiviteleri için indirgenmiş sistein amino asidine gereksinim duymaktadırlar (De Martinis vd. 2002).

Çizelge 2.2 Bazı bakteriyosinler ve üretici mikroorganizmalar (Chen ve Hoover 2003)

Bakteriyosin	Üretici Mikroorganizma
Sınıf I	
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i>
Laktosin S	<i>Lactobacillus sake</i>
Epidermin	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Laktisin 481	<i>Lactococcus lactis</i>
Mersasidin	<i>Bacillus subtilis</i>
Sinnamisin	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
Ankovenin	<i>Streptomyces spp.</i>
Duramisin	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>

Bakteriyosin	Üretici Mikroorganizma
Sınıf II	
Pediyosin PA-1/AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Sakasin A	<i>Lactobacillus sake</i>
Leukosin A-UAL 187	<i>Leuconostoc gelidum</i>
Mesenterisin Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Enterosin A	<i>Enterococcus faecium</i>
Diversin V41	<i>Carnobacterium divergens</i>
Laktokoksin G	<i>Lactococcus lactis</i>
Laktasin F	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Plantarisin A	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Asidosin B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Karnobakteriyosin	<i>Carnobacterium piscicola</i>
Enterosin P	<i>Enterococcus faecium</i>
Enterosin B	<i>Enterococcus faecium</i>
Sınıf III	
Helvetisin J	<i>Lactobacillus helveticus</i>
Helvetisin V-1829	<i>Lactobacillus helveticus</i>

Grup IV bakteriyosinler: Bu bakteriyosinlerin biyokimyasal karakterizasyonu henüz tamamlanamamıştır. Karbonhidrat ve lipit yan gruplarının antibakteriyel aktivitede oynadığı rolün belirlenmesi üzerine yoğun araştırmalar sürdürülmektedir (Chen ve Hoover 2003).

2.6.3.2 *Enterococcus* sp tarafından üretilen bakteriyosinler

Laktik asit bakteriyosinleri pozitif yüklü moleküller olup, sitoplazmik zar üzerinde etkili olmalarında sahip oldukları hidrofobik kısımlar önemli rol oynamaktadır. Duyarlı hücre zarında bulunan negatif yüklü fosfat gruplarının etkisiyle ortaya çıkan elektrostatik etkileşim sonucu bakteriyosin hücre zarına tutunup içeri girerek gözenek oluşumuna neden olur (Nes ve Holo 2000, Twomey vd. 2002).

Grup D streptokokların bakteriyosin benzeri madde ürettikleri ilk kez 1955'te bildirilmiş ve bu tarihten itibaren çok sayıda enterosin bulunmuştur. Enterokoklar tarafından üretilen birçok bakteriyosin yıllar içerisinde saflaştırılmış ve genetik olarak karakterize edilmiştir. Bunların çoğu *E. faecium* ve *E. faecalis*'den elde edilmiştir. Çizelge 2.3'te karakterize edilen enterosinler belirtilmiştir (Nes vd. 2007).

Bugüne kadar tespit edilen enterosinlerin sınıf I, sınıf II (a ve c grubu) ve sınıf III bakteriyosinlerinin özelliklerini taşıdığı belirlenmiştir. *E. faecalis*'in ürettiği iki bileşenli sitolisin sınıf I; *E. faecium* tarafından üretilen enterosin A, enterosin P ve enterosin CRL35; *E. faecalis* tarafından üretilen bakteriyosin 31 ve *E. mundtii* tarafından üretilen mundtis sınıf IIa'ya; *E. faecalis*'in ürettiği enterosin 1071A ve 1071B sınıf IIb'ye, *E. faecium*'un ürettiği enterosin B sınıf II'ye, enterosin L50A ve L50B ve enterosin Q sınıf IIc'ye örnek olarak verilebilir. Literatürlerde diğer enterosinlerin ilk olarak yeni enterosinler olduğu düşünülmüş fakat varolanlara gerçekten benzedikleri görülmüştür. Çizelge 2.4'te bu bakteriyosinler gösterilmiştir (Foulque-Moreno vd. 2006).

Enterosinler, proteinaz K, kimotripsin, tripsin, pepsin gibi bazı proteolitik enzimlere karşı duyarlıyken lipaz, amilaz ve katalaz enzimlerine karşı dayanıklıdırlar. Geniş pH aralıklarında aktivite gösteren enterosinler, asidik pH'larda daha fazla aktiftirler. Donma ve buzdolabı koşulları ile yüksek sıcaklığa (100 °C) dayanıklıdırlar. Liyofilizasyonla

kurutmadan sonra uzun süre stabilitelerini koruyabilmektedirler (Giraffa vd. 1994, Giraffa 1995, Cleveland vd. 2001, Rodriguez vd. 2003).

Sitolisin dışındaki enterokoklardan elde edilen bakteriyosinlerin tamamı ısı-stabil, lantibiyotik içermeyen sınıf II bakteriyosinlere aittir (Coburn vd. 2004). Sitolisin, *E. faecalis*'de bulunan ikili peptit bir bakteriyosindir. Enterokoklardan izole edilen sitolitik (hemolitik) aktiviteye sahip tek bakteriyosindir (Jett vd. 1994, Haas ve Gilmore 1999). Virülans faktör olarak kabul edilen sitolisin, antimikrobiyal ajan olarak kullanılamamaktadır. Sitolisin kodlayan genlerin sadece hastane ve hastalardan elde edilen enterokok izolatlarında değil yiyecek, hayvan ve sağlıklı yeni doğan bebeklerde de bulunduğu tespit edilmiştir (Macovei ve Zurek 2006, Jurkovic vd. 2006). Sınıf II enterokokkal bakteriyosinler, listeriyal aktiviteye sahip pediyosin benzeri (sınıf IIA) bakteriyosinlerdir (Ennahar vd. 2000). Bu bakteriyosinler arasında enterosin A, ilk karakterize edilen ve *E. faecium* suşlarının üretmekte olduğu bakteriyosindir (Aymerich vd. 1996). *E. faecalis* suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin *E. faecium* suşlarının bakteriyosinleri ile karşılaştırıldığında daha dar bir inhibitör aktivite spektrumuna sahip oldukları belirlenmiştir. Üretilen bakteriyosinlerin ısıya dayanıklı olduğu ve nötral pH'larda maksimum aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (du Toit vd. 2000).

Enterosinler aynı filogenetik yapı içinde yer alan *Listeria* sp.'ye karşı oldukça aktiftirler. Enterosinler diğer çoğu bakteriyosin gibi, sitoplazmik membran üzerinde etkilidirler. Hücre membranında gözenekler oluştururlar ve böylece elzem intraselüler moleküllerin sızıntısı ile sonuçlanan transmembran potansiyeli veya pH gradiyentini bozarlar. Enterokokkal bakteriyosinler genellikle *Staphylococcus* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *E. coli* ve *Vibrio cholerae* gibi bazı Gram pozitif (+) ve Gram negatif (-) bakterilere karşı inhibitör aktiviteye sahiptirler (McAuliffe vd. 2001, Koponen 2004). Enterosin üretici suşlar fermente gıdalar (süt ürünleri, sosis vb.), fermente olmayan gıdalardan (balık, sebze vb.), silaj, su, hayvan ve insan dışkısından izole edilmiştir (Foulquie-Moreno vd. 2003, 2006).

Çizelge 2.3 Enterokoklardan izole edilmiş bakteriyosinler (Nes vd. 2007)

Mikroorganizma	Bakteriyosin	Sınıf	Kütle (Da)
<i>E. faecalis</i>	Cytolysin Cyl_L, Cyl_S	Sınıf I-ikili peptidli lantibiyotik	3,458-2,032
<i>E. faecium</i>	Enterosin A	Sınıf IIa pediyosin benzeri bakteriyosinler	4,829
<i>E. faecium</i>	Enterosin P	Sınıf IIa pediyosin benzeri bakteriyosinler	4,493
<i>E. faecium</i>	Bac 32	Sınıf IIa pediyosin benzeri bakteriyosinler	7,998
<i>E. faecium</i>	Bakteriyosin GM-1	Sınıf IIa pediyosin benzeri bakteriyosinler	4,630
<i>E. faecalis</i>	Bac 31	Sınıf IIa pediyosin benzeri bakteriyosinler	4,630
<i>E. mundtii</i>	Mundticin ATO6, mundticin KS, enterocin CRL35, mundticin QU2	Sınıf IIa pediyosin benzeri bakteriyosinler	4,287
<i>E. faecalis</i>	Enterosin SE-K4	Sınıf IIa pediyosin benzeri bakteriyosinler	5,356
<i>E. faecium</i>	Bakteriyosin T8	Sınıf IIa pediyosin benzeri bakteriyosinler	5,090
<i>E. faecium</i>	Enterosin B	Sınıf II	5,479
<i>E. faecalis</i>	Enterosin 1071A, Enterosin 1071B	Sınıf IIb	4,285-3,897
<i>E. faecalis</i>	MR10A-MR10B	Sınıf IIc	5,0202-5,208
<i>E. faecium</i>	Enterosin L50; L50A ve L50B	Sınıf IIc	5,190-5,178
<i>E. faecium</i>	Enterosin Q	Sınıf IIc	3,980
<i>E. faecalis</i>	Enterosin EJ97	Sınıf IIc	5,323
<i>E. faecium</i>	Enterosin RJ-11	Sınıf IIc	5,049
<i>E. faecalis</i>	AS-48	Sınıf II d	7,166

Çizelge 2.4 Varolan enterosinlere benzer literatürde tanımlanan diğer enterosinler
(Foulquie-Moreno vd. 2006)

Enterosin	Varolan bakteriyosin	Üretici suş
Enterosin 4	Enterosin AS-48	<i>E. faecalis</i> INIA 4
Enterokoksin EFS2		<i>E. faecalis</i> EFS2
Bakteriyosin 21		<i>E. faecalis</i> OG1X
Enterosin 7C5		<i>E. faecium</i> 7C5
Enterosin 900		<i>E. faecium</i> BFE 900
Enterosin 1146	Enterosin A	<i>E. faecium</i> DPC1146
Enterosin EFM01		<i>E. faecium</i> EFM01
Enterosin P21		<i>E. faecium</i> P21
Enterosin 81		<i>E. faecium</i> WHE81
Enterosin N15		<i>E. faecium</i> N15
Enterosin BC25		<i>E. faecium</i> BC 25
Enterosin CCM 4231		<i>E. faecium</i> CCM 4231
Enterosin 900		<i>E. faecium</i> BFE 900
Enterosin P21	Enterosin B	<i>E. faecium</i> P21
Enterosin 81		<i>E. faecium</i> WHE 81
Enterosin RZS C13		<i>E. faecium</i> RZS C13
Enterosin RZS C5		<i>E. faecium</i> RZS C5
Enterosin 1	Enterosin L50	<i>E. faecium</i> 6T1a
Enterosin B2		<i>E. faecium</i> B2
Enterosin AA13	Enterosin P	<i>E. faecium</i> AA13
Enterosin G16		<i>E. faecium</i> G16
Enterosin B1		<i>E. faecium</i> B1
Enterosin B2		<i>E. faecium</i> B2
Enterosin 1071A	Enterosin 1071A	<i>E. faecalis</i> FAIR-E 309
Enterosin 1071B	Enterosin 1071B	<i>E. faecalis</i> FAIR-E 309
Enterosin B2	Enterosin 1071	<i>E. faecium</i>

Bakteriyosin üreten enterokokların starter kültür, yardımcı-kültür veya koruyucu kültür olarak kullanılması gıda fermentasyon işlemlerinde enterosinlerin direkt eklenmesinin yanında fermentasyon teknolojileri arasında büyük ilgi noktasıdır. Enterosinlerin birçok gıda ürünü, peynir, meyve suyu, sosis, salam, jambon gibi et ürünlerinde patojen ve bozulma etmeni olan *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *S. aureus* ve *Alicyclobacillus acidoterrestri* gibi mikroorganizmalara karşı etkili olduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Giraffa vd. 1994, Giraffa 1995, Nunez vd. 1997, Farias vd. 1999, Aymerich vd. 2000, Ananou vd. 2005, Grande vd. 2005).

2.6.4 Bağırsak hücrelerine (Caco-2 hücreleri) tutunma ve kolonizasyon

Probiyotik bakteriler, bağırsak epiteline tutunarak gastrik şartlarda canlı kalabilme ve bağırsağa kolonize olabilme gibi özelliklere sahiptirler (Lee ve Salminen 1995). Birçok probiyotik mikroorganizma, anormal bağırsak mikroflorası ve değişen bağırsak mukozal bariyer fonksiyonları tarafından üretilen, bağırsak düzensizliklerinin tedavisi için gelecek vaat eden bakterilerdir (Alvarez-Olmos ve Oberhelman 2001).

Probiyotik mikroorganizmaların bağırsak epitel yüzeyine yapışması birçok etkisiyle alakalıdır. Kolonizasyon için ön koşul immun sistemi stimule etmesi ve enteropatojen bakterilere karşı antagonistik aktivite göstermesidir (Coconier vd. 1993). Bazı çalışmalar patojenler ve diğer mikroorganizmalar üzerine yapılmıştır. Genellikle normal mikrofloranın, bağırsaktaki kolonizasyon direncinde önemli bir rol oynadığı kabul edilmesine rağmen probiyotiklerin adezyonu üzerinde doğal mikrofloranın etkileri henüz değerlendirilmemiştir (Tannock 1995). Bağırsak epitelindeki bakteriyel tutunma bölgeleri için patojenlerle yarışma, probiyotik mikroorganizmaların sahip olması gereken önemli özelliklerdendir. Zira probiyotik süşun inhibisyon etkisi; organik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeleri üretim yeteneği ya da patojen mikroorganizmaların epitel yüzeylere tutunmalarını engelleme ve besin maddeleri için rekabet mekanizmalarıyla açıklanmaktadır (Rastall vd. 2005).

İnsanda, *in vivo* olarak bakteriyel tutunma çalışmaları sırasında ortaya çıkan zorluklar nedeniyle, insan bağırsak hücrelerine bakteriyel tutunma denemeleri için *in vitro* model sistemi geliştirilmiştir. Araştırmacılar, insan bağırsak epitelinde bulunan çeşitli tipteki

hücrelerin özelliklerine sahip, insan kolon adeno carcinoma hücrelerini (Caco-2) izole etmişlerdir. Bu hücreler, normal ince bağırsak villus hücrelerinin özelliklerine sahiptir. Caco-2 hücreleri hem normal mikroorganizmaların tutunma mekanizmasıyla ilgili çalışmada hem de bu bakterilerin patojenler ile aynı ekosistem için nasıl rekabet ettiklerini gösteren çalışmada kullanılmaktadır. Epitel yüzeye tutunma probiyotik seçim kriterlerinden birini oluşturmaktadır. Probiyotik kültürlerin epitel yüzeye tutunabilmeleri için agregasyon yeteneğine sahip olmaları da gerekmektedir (Green ve Klaenhammer 1994).

Probiyotik mikroorganizmaların bağırsağa tutunma özelliklerinin belirlenmesinde doku kültürü çalışmalarının yanı sıra deney hayvanı çalışmalarının da yararlı olduğu belirtilmektedir (Holzapfel vd. 1998, Murphy vd. 1999, Frece vd. 2005). İnsanların ve farelerin sindirim sistemindeki bazı anatomik farklılıklara rağmen genel olarak her iki türün fekal bakteri popülasyonunun benzer olduğu ve bu nedenle de bağırsaklardaki bakteri popülasyonuna beslenme koşullarının etkinliğine ilişkin çalışmalarda farelerin deney hayvan modeli olarak kullanılabilmesi belirtilmektedir (Frece vd. 2005).

Bakteri hücre yüzeyindeki bileşimler, bakterilerin bağırsak epitel hücrelerine tutunmasına aracılık edebilir. *L. gasseri* ile yapılan bir tutunma çalışmasında protein ve karbonhidratların yapışmada gerekli olduğu ve divalent katyonların (Ca^{+2}) da tutunmada etkili olduğu görülmüştür. Laktobasillerin insan bağırsak hücrelerine tutunmasının, bakteri yüzeyinde bulunan protein ve karbonhidratların farklı kombinasyonlarından oluşan mekanizmadan kaynaklandığı düşünülmüştür. Probiyotik bakterilerin tutunma aktiviteleri için gerekli mekanizmalar türler arasında farklılık göstermiştir. Ayrıca hücre yüzey uzantılarının, hidrofobisite ve pH'ın tutunmada etkili olduğu bulunmuştur (Tuomola vd. 1999).

Laktik asit bakterilerinin oluşturdukları eksopolisakkarit (EPS), epitel doku ile bakteriler arasında gerçek bir bağ meydana getirip, böylece EPS üretimine sahip suşların yüksek bir adezyon kapasitesine de sahip olacağı gösterilmiştir (Kimmel vd. 1998). Bu özellikleri ile EPS probiyotik olarak kullanılacak bakteriye florada daha fazla avantaj sağlayacaktır (Sutherland 1999).

2.6.5 Agregasyon

Agregasyon, lipoteikotik asit, proteinler ve karbonhidratlar gibi hücre yüzey bileşenlerinin interaksyonu ile alakalıdır (Kolenbrander ve London 1993). Bakteri adezyonunda ilk olarak iki bakteri yüzeyi arasındaki proteinler ve reseptörlerin spesifik olmayan fiziksel interaksyonları baz alınmaktadır (Freter 1992, Rojas ve Conway 1996, Perez vd. 1998). Agregasyon, otoagregasyon ve koagregasyon olarak ikiye ayrılmaktadır. Probiyotik suşların otoagregasyon yetenekleri birbirlerine tutunarak bağırsak epitelyal hücrelere yapışmalarıdır. Koagregasyon yetenekleri ise patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu engelleyerek bir bariyer oluşturmalarını içermektedir (Reid vd. 1988, Boris vd. 1997, Del Re vd. 2000).

Otoagregasyon, mikroorganizmaların birbirlerine tutunarak kolonize olmalarıdır. Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin epitel yüzey üzerinde otoagregasyon yetenekleri ile bir bariyer oluşturdukları ve böylece yüzeye patojen mikroorganizmaların tutunmasını engelledikleri bilinmektedir (Reid vd. 1990). Probiyotik suşların otoagregasyonu bağırsak epitel hücrelerine tutunması için gerekli bir özellik olarak görülmektedir (Reid vd. 1988, Boris vd. 1997, Del Re vd. 2000). Hücre yüzeyinin fizikokimyasal karakteristik özelliği (hidrofobik) bakterilerin farklı yüzeylere tutunma ve otoagregasyonunu etkileyebilmektedir (Pe´rez vd. 1998, Del Re vd. 2000). Bazı yüzey bileşenlerinin protein yapısında olduğu gösterilmiş ve bazı *Lactobacillus* suşlarında belirlenen yüzey proteinlerinin (S-layer) tutunma ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Schneitz vd. 1993, Mukai ve Arihara 1994).

Koagregasyon, farklı mikroorganizmaların birbirlerine tutunmalarını açıklayan ve patojen türlerin bağırsak epitel yüzeyine tutunmasını engelleyen bir özellik olarak bilinmektedir (Boris vd. 1998). Koagregasyon, genetik olarak uzak bakterilerin tutunması olarak tanımlanmış ve çoklu türlerin biyofilmlerinin gelişiminde önemli bir işlem olarak görülmüştür (Kolenbrander 1988). Koagregasyon, bakteriler arasındaki fiziksel etkileşimler, oksijen korunumu (Bradshaw vd. 1998), iki hücre arası iletişim ve hücreler arası genetik alışveriş (Foster vd. 2003) şeklinde örneklendirilebilecek metabolik etkileşimler doğurmaktadır (Drago vd. 1997). Genellikle agregasyon olan

mikroorganizmalar arasında oluşan son derece spesifik lektin-karbohidrat etkileşimlerine dayanmaktadır (Cisar vd. 1979).

Koagregasyon araştırmalarının geniş çoğunluğu insan ağız boşluğundan edinilen bakteriler üzerine yoğunlaşmıştır (Handley vd. 1985, Umemoto vd. 1999, Foster ve Kolenbrander 2004, Shen vd. 2005, Rosen ve Sela 2006). Oral bakterilerin koagregasyon yeteneklerinin ağız boşluğunda başlayıp, yabancı kuvvetlere karşı koruyucu bir mekanizma oluşturduğu varsayılmaktadır (Handley vd. 2001). Bağırsak gibi ekosistemlerden izole edilen bakterilerle yapılan koagregasyon çalışmaları potansiyel ürogenital patojenlere karşı anti-enfeksiyon mekanizması oluşturacak şekilde koagregasyon gösteren *Lactobacillus* cinsine ait türler üzerinde yoğunlaşmıştır. Örnek olarak tavukların (Vandevoorde vd. 1992) ve domuzların (Kmet vd. 1995) gastrointestinal sistemin insan enteropatojenleri (Drago vd. 1997) ve üropatojenleri (Reid vd. 1988) ile koagregasyonu verilebilir. Bununla birlikte sucul ekosistemlerden elde edilen bakteriler arasında da koagregasyon gerçekleştiği gözlenmiştir (Rickard vd. 2000, 2002).

Ağızda gözlemlenen hücresel etkileşim mekanizmaların çoğu bağırsakta da gerçekleşebilirken, insan bağırsak mikroflorasının üyeleri arasındaki koagregasyon yeni çalışmalarla da rapor edilmektedir. Ayrıca oral bakterilerin intestinal mikroflora üyeleri ile fiziksel olarak etkileşmeleri mümkündür, çünkü oral türler yiyecek ile birlikte yutulur ve tükürük ile sindirim bölgelerine geçer (Ledder vd. 2008).

2.6 Endüstriyel Açıdan Probiyotikler

Endüstriyel açıdan probiyotik kültürler; istenen reolojik, organoleptik özelliklere ve tekstüre sahip olan probiyotik süt ürünlerinin hazırlanmasındaki etkileri ve bu ürünlerde canlı kalma süreleri açısından değerlendirilmektedir. Güvenli olduğu bilinen ve probiyotik özelliğe sahip olan suşların seçimi, inokülasyonu, inkübasyon koşulları, mikroorganizmalar arası ilişkiler, ürünlerin muhafazası süresince bakteri suşlarının canlı kalması ve probiyotik ürünlerin insan sağlığı üzerindeki etkileri, üretim açısından önemli kriterlerdir. Endüstriyel alanda probiyotik mikroorganizmaların kullanımında başarılı sonuçlar alabilmek için yoğun çalışmalar giderek artmaktadır.

İsviçre’de üretilen karakterizasyonu yapılmış probiyotik olarak kullanılan enterokok suşlarından biri *E. faecium* SF 68’dir (Cylactin\ LBC SF68 ME10, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, İsviçre). Bu suşun antibiyotik kaynaklı diyarenin durdurulmasında (Wünderlich vd. 1989) ve çocuklarda diyare tedavisinde (Bellomo vd. 1980) klinik etkiye sahip olduğu öne sürülmüştür. *E. faecium* SF 68 Belçika’daki iki hastanede yetişkinlerdeki akut diyarede test edilmiştir (Buydens ve Debeuckelaere 1996). Bu tip diyarenin süresinin genelde kişiye bağlı olarak (% 95 oranında yaklaşık 6 gün) değişmesine karşın enterokok kullanımı bu süreyi 1-3 güne kadar kısaltmıştır. *E. faecium* SF 68 suşu ayrıca yem probiyotiği olarak da çalışılmıştır. Kuru köpek mamasında *E. faecium* SF 68 kullanımı köpeklerde hücrel ve humoral bağışıklık fonsiyonlarında gözle görülür şekilde gelişmeye sebep olmuştur (Benyacoub vd. 2003). Danimarka’da *E. faecium* SF 68 içeren fermente bir süt ürünü (GAIO; MD Foods, Aarhus, Danimarka) kolesterol düşürücü etkisi olduğu için yıllardır raflarda yer almaktadır (Agerbaek vd. 1995). Fakat uzun süreli iki farklı çalışmada GAIO kullanan kişiler ve kontrol grubu arasında tedavi dönemi sonunda kolesterol seviyesi açısından herhangi bir fark tespit edilmemiştir (Sessions vd. 1997).

Probiyotik bir suş olan *E. faecium* PR88 (*E. faecium* Fargo 688\ from Quest International, Naarden, The Netherlands)’in kullanımı ile insanlarda sık rastlanan IBS (Hassas Bağırsak Sendromu) hastalığında bir düşüş görülmüştür (Allen vd. 1996). Aynı suş probiyotik Cheddar peyniri üretimi için de kullanılmaktadır. Peynir içeriğini etkilemeden peynirin kıvamını arttırıcı özellik göstermektedir (Gardiner vd. 1999). Marketlerdeki diğer bir probiyotik ürün yine *E. faecium* suşu içeren Walthers ECOFLOR (Walthers Health Care, Den Haag, The Netherlands)’dur. Probiyotik özellik taşıyan bu suş, diyareye karşı etkili, karsinojenik etkiye sahip, *L. monocytogenes*’e karşı enterosin üreten, LDL-kolesterol seviyesini azaltan, laktik asit üreticisi ve vankomisine duyarlıdır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri kültürleri

Tez çalışmasında kullanılan suşlar, pek çok genusa ait Gram pozitif (+) bakteriler ve patojen özellik gösteren indikatör bakterilerden oluşmaktadır. Suşların gelişme ortamları ve optimum gelişme gösterdikleri sıcaklıklar çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

3.1.2 Kültür ortamları

Laktik Asit Bakterilerinin ve diğer bakterilerin gelişimleri için kullanılan besiyerlerinin isimleri ve içerikleri EK 1’de verilmiştir.

3.1.3 Tampon ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan tampon ve solüsyonların isimleri ve hazırlanışları EK 2’de verilmiştir.

3.1.4 Moleküler markörler

Çalışmada kullanılan moleküler marköler EK 3’te verilmiştir.

3.1.5 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları EK 4’te verilmiştir.

3.1.6 Kullanılan çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan cam malzemelerin sterilizasyonu için 185 °C’de 1 saat pastör fırını kullanılmıştır. Kullanılan besiyerleri, tampon ve solüsyonlar ise 121 °C’de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan bakteri türleri, gelişme ortamları ve optimum gelişim sıcaklıkları

Bakteri adı	Gelişme ortamı	Gelişim sıcaklıkları	Kaynak
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	LB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Candida albicans</i> ATCC 26555	TSB	30°C	Prof. Dr. Haluk Ataoglu
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25295	LB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Escherichia coli</i> LMG 3083 (ETEC)	LB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	MRS	30°C	A.Ü.F.F. Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCDO 955	MRS	37°C	A.Ü.F.F. Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı
<i>Lactococcus lactis</i> 3113	TGE	30°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 7962	TGE	30°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Lactococcus lactis</i> SIK 83	TGE	30°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> OZ1	TGE	30°C	A.Ü.F.F. Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı
<i>Listeria innocua</i> M40	TSB	30°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	TSB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Micrococcus luteus</i> M41	TSB	30°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PEDL	TGE	35°C	A.Ü.F.F. Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı
<i>Salmonella enterica</i> serotype Typhimurium SL 1344	LB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	LB	37°C	A.Ü.F.F. Prokaryot Genetiği Laboratuvarı

3.1.7 Bakteri kültürlerinin saklanması

İzolatlar uygun sıvı besi ortamında 18 saat geliştirildikten sonra 1 ml steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra 10.000 rpm'de 75 sn santrifüj edilmiş, ardından pellet 1 ml steril distile su ile bir kez yıkanarak % 50'lik steril gliserol çözeltisinde -86 °C'de saklanmıştır (Biswas vd. 1991).

3.2 Yöntem

3.2.1 Laktik asit bakterilerinin izolasyonu

Bu çalışmada farklı yaş gruplarına ait bireylerden ve yeni doğan bebeklerden gayta örnekleri toplanarak izolasyon materyali olarak kullanılmıştır.

Darası tartılmış steril gayta kaplarında laboratuvara getirilen gayta örnekleri tartılıp, steril fizyolojik tuzlu su ile 1/10 oranında seyreltilmiş ve steril cam baget ile homojenize edilmiştir. Gayta örneklerinden 10^{-7} 'ye kadar steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan 10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7} dilüsyonlarından 100 µl alınarak de Man Rogosa Sharp agar (MRS, Merck, Germany) besiyerine yayma ekimler yapılmıştır ve bu ortamlar 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda izolatların koloni morfolojisi, Gram reaksiyonları ve katalaz aktiviteleri incelenmiştir (Erkkilä ve Petäjä 2000). Sporsuz, Gram pozitif, kok ve çubuk şekilli, katalaz reaksiyonu negatif olan kolonilerin saf kültürleri elde edilip, stokları alınmıştır (Thornton 1996, Hartemink vd. 1997).

3.2.2 İzolatların tanımlanması

3.2.2.1 İzolatların kısmi karakterizasyonu

İzolatların kısmi karakterizasyonu; Gram boyanma ve metilen boyanma özellikleri ile katalaz testi sonuçlarına göre yapılmıştır. Metilen mavisi ile boyanma özelliğine basit boyama da denmektedir. Geliştirilen kültürlerden 5-10 µl alınarak lama yayılmıştır. Havada kurutma işleminden sonra alevken 3-5 kez geçirilmesiyle fiksasyon işlemi tamamlanmıştır. Üzerine Metilen mavisi (Merck, Darmstadt, Germany) damlatılarak 5 dakika beklenmiş ve distile su ile yıkanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kurumaya bırakılan lamın üzerine immersiyon yağı damlatılarak izolatların morfolojisi 1600X büyütmeli ışık mikroskopunda (ZEISS AxiCam MRc5 Imager system) gözlenmiştir.

Gram boyama işlemi için de yine aynı miktarda lamın üzerine yayılan kültür havada kurutulmuş ve aynı şekilde fiske edilmiştir. Fiksasyondan sonra gram boyama işlemi

gerçekleştirilmiştir. Boyamada kullanılan çözeltiler ve içerikleri EK 2’de verilmiştir. İlk olarak kristal viyole boyasında 1 dakika bekletilmiş, distile su ile yıkandıktan sonra lugol çözeltisinde 1-2 dakika bekletilmiştir. Yine distile su ile yıkanarak 15 saniye etanole tabi tutulmuş ve daha sonra 15 saniye bazik fuksin ile muamele edilmiştir. Su ile yıkanmasından sonra kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan lam üzerine immersiyon yağı damlatılarak 1600X büyütme ışık mikroskopunda (ZEISS AxiCam MRc5 Imager system) incelenmiştir. Mor renkli olanlar Gram pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir.

Katalaz testi için, MRS Agar ortamında geliştirilen kolonilerin üzerine H₂O₂ damlatılmış ve hava kabarcıklarının çıkışı gözlenmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak Prof. Dr. Mustafa Akçelik-Prokaryotik Genetiği Laboratuvarından temin edilen *Bacillus subtilis* ATCC 21332 suşu kullanılmıştır.

3.2.2.2 Biyokimyasal testler

İzolatların biyokimyasal olarak tanımlanabilmesi için API (Analytical Profile Index) 50 CHL test kiti (BioMerieux, Inc., France) kullanılmıştır. API 50 CHL tanımlama kiti; farklı biyokimyasal test substratlarını dehidre olarak içeren 1 tanesi kontrol tüpü olmak üzere 50 adet mikrotüp içermektedir. Bu kitin içerdiği kullanıma hazır 10 ml hacimdeki steril besi ortamına (API 50CHL Medium) bakteri kültüründen aktarılarak bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyonun turbiditesi 2 McFarland Standartı göz önüne alınarak ayarlanmış ve 50 mikrotüpe, steril damlalık kullanılarak tek tek inokülasyon işlemleri yapılmıştır. Daha sonra bu kuyucukların üst kısmı mineral yağ (BioMerieux) ile kapatılmış ve uygun koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bromkresol moru indikatörü içeren mikrotüplerdeki besi ortamı renginin söz konusu karbonhidrat fermantasyonuna (asit üretimine) bağlı olarak mordan sarıya dönüşmesi durumunda sonuç pozitif, rengin değişmemesi durumunda ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Eskülin testi gerçekleştirilen 25 nolu mikrotüpte ise besi ortamı renginin siyaha dönüşmesi durumunda sonuç pozitif, aynı kalması durumunda ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Renk değişimi konusunda şüpheye düşülmesi durumunda sonuç pozitif/negatif olarak renk tonlamasına göre kaydedilmiştir. Sonuçlar “API Identification Software (API Lab Plus Program, bioMerieux)” programına

aktarılmış ve izolatlar içinde seçilen örnekler bu bilgisayar programına göre tanımlanmıştır.

3.2.2.3 İzolatların 16S rDNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyonu

İzolatların, 16S rDNA dizi analizine göre tanımlanması için ilk olarak genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA'nın saflık ve miktar tayini yapıldıktan sonra agaroz jel elektroforezinde gözlenmiştir. İzolatların 16S rDNA dizi analizine göre tanımlanabilmesi için 16S ileri (5'-3') ve geri (3'-5') primerleri kullanılarak 16S rDNA bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması ve baz dizilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Baz dizileri belirlenerek ve elde edilen bulgular veri tabanındaki mikroorganizmalara ait baz sıraları ile karşılaştırılıp tanımlamaları yapılmıştır.

3.2.2.3.1 Genomik DNA izolasyonu ve saflık tayini

Gaytadan izole edilen laktik asit bakterilerinin 16S rDNA dizi analizine göre tanımlanması amacıyla ilk önce genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA izolasyonunda, ticari olarak temin edilen PROMEGA Wizard® Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılmıştır. Kit tarafından sağlanan izolasyon aşamaları prospektüsü EK 5'te verilmiştir.

İzole edilen DNA numunelerinin saflık ve miktar tayinleri NANODROP spektrofotometrede ölçülmüştür. DNA numunelerinin okunması için kontrol olarak dehidrasyon tamponu kullanılmıştır. 260nm, 280nm, 260nm/280nm, 260/230nm değerleri ölçülerek ve DNA numunelerinin konsantrasyonları ng/µl olarak belirlenmiştir. DNA'lardan 2 µl alınarak 3 paralel okuma gerçekleştirilmiştir (Sambrook ve Russell 2001).

DNA numuneleri için OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranının 1.8 olması örneklerin saflığını, bu orandan yüksek veya düşük değerler numunelerde kontaminasyonun varolabileceğini göstermiştir.

3.2.2.3.2 Agaroz jel elektroforezi

İzole edilen DNA numunelerinin saflık ve miktar tayini yapıldıktan sonra elektroforezleri % 1 agaroz içeren jellerde yapılmıştır (Sambrook and Russell 2001). Kullanılan çözeltiler ve agaroz jel EK 2’de verilmiştir. Markör olarak “supercoiled DNA ladder” kullanılmıştır (3 µl markör+2 µl yükleme boyası). Agaroz jel KODAK Gel Logic 200 jel dökümantasyon sisteminde (Eastman Kodak Co., USA) 365 nm dalga boyunda UV ışık altında incelenmiştir. Fotoğraf çekimleri aynı cihazda gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.3.3 16S rDNA bölgesinin baz dizisinin belirlenmesi ve izolatların tanımlanması

DNA’ları izole edilen suşların dizi analizi Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından yapılmıştır. Dizi analizi sonuçları, BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) programı ile veritabanlarıyla karşılaştırılmış ve tarama sonucu dizinin hangi mikroorganizmaya ait olduğu benzerlik yüzdesiyle belirlenmiştir. İzole edilen suşların antimikrobiyal aktivitesi incelenerek antimikrobiyal aktiviteye sahip olan suş *Enterococcus faecium* seçilmiş ve *Enterococcus faecium* OZ-E25 olarak adlandırılmıştır. Çalışmanın devamında bu suş kullanılmıştır.

3.2.3 *Enterococcus faecium* OZ-E25 suşunun probiyotik özelliklerinin belirlenmesi

Probiyotik olarak kullanılabilen suşun belirlenmesi amacıyla düşük pH (pH 1, 2 ve 3), pepsin, pankreatin ve safra tuzuna dayanıklılık testleri yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları ve hemolitik aktivitesine bakılmıştır. Son olarak da Caco-2 hücrelerine tutunma testleri yapılmıştır.

3.2.3.1 Düşük pH’ya direnç özelliğinin belirlenmesi

Tanımlanan suşun probiyotik özelliklerinin belirlenmesinde; öncelikle suşun düşük pH değerlerine karşı toleransı araştırılmıştır. MRS besiyerine % 1 oranında inoküle edilen 18 saatlik kültürden 1 ml alınarak 10000 g’de 5 dakika (4 °C) santrifüj edilmiştir. Her örnek için, pH 1.0, 2.0 ve 3.0 düzeyine ayarlanmış PBS tamponları kullanılmıştır.

Kontrol ve deney grupları, pH değeri 7.2 olan PBS tamponu ile iki kez yıkanmıştır. Deney gruplarına, pH değerleri 1, 2 ve 3 olarak ayarlanmış olan PBS tamponlarından 1 ml ilave edilip çözülmüştür ve 37 °C’de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0., 1. ve 3. saatlerinde kontrol ve deney gruplarından numuneler alınarak seri dilüsyonları yapıp MRS katı ortamlara yayma ekim yapılmıştır. 37 °C’de 24-48 saat inkübasyon sonucunda kontrol ve deney gruplarındaki koloniler sayılıp, log/kob olarak değerleri hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006).

3.2.3.2 Pepsine karşı direnç özelliğinin belirlenmesi

İzolatin pepsine toleransının belirlenmesinde, gastrik koşulun oluşturulması için pepsin içeren pH 2.0 ve pH 3.0 değerinde hazırlanan PBS tamponları kullanılmıştır. 1 ml’lik aktif bakteri kültürü 10000 g’de 5 dakika (4 °C) santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüş ve üst faz uzaklaştırılmıştır. Örnekler iki kez pH değeri 7.2 olan PBS tamponu ile yıkanarak deney gruplarına, pepsin (3 mg/ml; Merck) içeren PBS çözeltisi (pH 2 ve pH 3) ilave edilmiş ve 37 °C’de 3 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Kontrol grubuna pH değeri 7.2 olan PBS tamponu ilave edilmiştir. İnkübasyonun 0., 1 ve 3. saatinde kontrol ve deney gruplarından alınan örnekler seri dilüsyonlar yapılarak MRS katı ortamlara yayma ekimleri yapılmıştır. 37 °C’de 24-48 saat inkübasyon sonucunda kontrol ve deney gruplarındaki koloniler sayılıp, log/kob olarak canlı hücre değerleri hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006).

3.2.3.3 Pankreatine karşı direnç özelliğinin belirlenmesi

Pankreatine karşı direnç özelliğinin belirlenmesi için, 18 saat geliştirilmiş kültürden 1 ml alınmış ve 10000 g’de 5 dakika (4 °C) santrifüj edilmiştir. Üst faz uzaklaştırılarak pellet PBS tamponu ile (pH 7.2) iki kez yıkandıktan sonra test grubuna pankreatin içeren (1mg/ml, Merck, Darmstadt, Germany) PBS tamponu (pH 8.0) ilave edilmiştir. Deney ve kontrol grupları 37 °C’de 4 saat inkübe edilmiştir. Kontrol grubuna ise pH 7.2 olan PBS ilave edilmiştir. İnkübasyonun 0. ve 4. saatinde örneklerden numuneler alınıp seri dilüsyonları yapılmış ve MRS katı besiyerine yayma ekimleri gerçekleştirilmiştir. 37 °C’de 24-48 saat inkübasyon sonucu koloniler sayılarak log/kob değerlendirmeleri yapılmıştır (Maragkoudakis vd. 2006).

3.2.3.4 Safra tuzuna karşı direnç özelliğinin belirlenmesi

Safra tuzuna toleransı test etmek için hazırlanan hücrelere ise, % 0.3, % 0.5 ve % 1 (w/v) safra tuzuyla (Merck, Darmstadt, Germany) zenginleştirilmiş MRS sıvı besiyeri ilave edilmiştir. Kontrol grubunda MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. 18 saatlik geliştirilmiş aktif kültürden 1 ml alınıp 10000 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Pellet iki kez PBS (pH 7.2) tamponu ile yıkanmış ve % 0.3, % 0.5 ve % 1 oranında safra tuzu içeren MRS besiyerinde çözülmüştür. 37 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0. ve 4. saatinde kontrol ve test gruplarından örnekler alınarak seri dilüsyonları yapılmış ve MRS katı besiyerine ekimleri yapılmıştır. 37 °C'de 24-48 saat inkübasyon sonrası kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp log/kob olarak değerleri hesaplanmıştır (Maragkoudakis vd. 2006).

3.2.3.5 Hemolitik aktivitesinin belirlenmesi

Hemolitik aktivitenin belirlenmesi için 37 °C'de 18 saat geliştirilen kültürden ticari olarak temin edilen ve % 5 koyun kanı içeren Colombia-agar (bioMerieux, Inc. France) ortamına çizgi ekimleri yapılmıştır. Kontrol bakterileri olarak kullanılan *Escherichia coli* LMG 3083 (ETEC) ve *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 suşları Prof. Dr. Mustafa Akçelik- Prokaryot Genetiği Laboratuvarından temin edilmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra, kolonilerin etrafında, parlak-yeşil zon oluşturan koloniler α -hemolitik, berrak zon oluşturanlar β -hemolitik, zon oluşturmayanlar ise γ -hemolitik olarak değerlendirilmiştir (Maragkoudakis vd. 2006).

3.2.3.6 Antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi

Suşun antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi için antibiyotik disk difüzyon yöntemi denenmiştir. 37 °C'de 18 saat geliştirilen suşun hücre yoğunluğu 10^6 'ya ayarlanmıştır. 10 ml MRS besiyeri, 90 ml MRS katı ortamlara eklenerek petrilere yayılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren diskler katı ortama yerleştirilmiştir. 37 °C'de 18 saat inkübasyon neticesinde oluşan zonların çapı ölçülerek Uluslararası standarta sahip tablolar ile kıyaslanmış ve dirençlilik ya da

duyarlılıkları belirlenmiştir. Kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 kullanılmıştır (Wilkins vd. 1972).

3.2.3.7 Antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

İzolatin inhibisyon etkisi özellikle bağırsak florasında negatif etkilere sahip olan başta *E. coli* olmak üzere bazı patojenlere karşı denenmiştir. 18 saat 37 °C’de geliştirilen kültürden 1 ml alınarak 12.000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen üst faz 0.22 µm çaplı membrandan geçirildikten sonra 100 °C’de 5 dk kaynatılmıştır. *E. faecium* OZ-E25 tarafından üretilen antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için indikatör bakteri olarak *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve *Lactococcus* genusuna ait suşlar ve patojen mikroorganizmalar kullanılmıştır. 18 saat geliştirilen indikatör bakterilerden % 1 oranında 5 ml yarı katı besiyerine ekim yapılmıştır. Katı besiyeri üzerine indikatörün bulunduğu yarıkatı besiyeri eklenmiştir. Üst faz, yüzeye yayılan patojen bakteriler üzerine 5 µl olacak şekilde nokta ekim yöntemiyle ekilmiş ve 37 °C’de 18 saat inkübasyon neticesinde zon oluşturup oluşturmadıkları belirlenmiştir (Bhunja vd. 1988).

3.2.3.8 Caco-2 hücrelerine tutunma özelliğinin belirlenmesi

Diğer probiyotik özellikleri incelenen *E. faecium* OZ-E25 suşunun Caco-2 (İnsan kolon adenokarsinoma hücreleri) hücrelerine tutunma özellikleri ve patojen mikroorganizmalar ile tutunmasının engellenmesi denemeleri Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Caco-2 hücreleri % 10 inaktive edilmiş fetal bovin serum, 2 mM L-glutamin, 20 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde (Gibco BRL) ve 37 °C’de anaerobik koşullarda inkübe edilerek geliştirilmiştir. Tutunma denemeleri için Caco-2 hücreleri 24 kuyulu doku kültür plaklarında geliştirilmiştir.

E. faecium OZ-E25 suşu MRS besiyerinde 18 saat geliştirilmiştir. Kontrol suşları olan *E. coli* LMG 3083 (ETEC) ve *S. enterica serotype* Typhimurium SL 1344 uygun besiyerlerinde yine 18 saat geliştirilmiştir. Geliştirilen kültürler 6000 rpm’de 15 dakika

santrifüj edilmiştir. Üst faz atılarak hücreler pH 7.2 olan PBS tamponu ile iki kez yıkanmıştır. Hücre konsantrasyonu RPMI besiyeri ile 10^8 kob/ml'ye ayarlanarak steril tüplere alınmıştır. Kuyulardaki RPMI besiyeri ortamdan uzaklaştırılıp hücreler PBS tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Bakteri-RPMI besiyeri karışımından kuyulara 1 ml konulmuştur. Plaklar 37 °C'de %5CO2/%95 atmosfer basıncında 90 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu Caco-2 hücrelerine tutunmamış bakterileri ortamdan uzaklaştırmak için kuyulardaki bakteri süspansiyonu steril pipetler yardımıyla alınmıştır. Sonra iki kez PBS tamponu ile yıkanmıştır. Caco-2 hücrelerine tutunan bakterileri kuyulardan alabilmek için ortama 1 ml Tween 80 (% 0.1) aktararak 30 dakika daha inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde bakteri süspansiyonu steril mikrosantrifüj tüplerine alınarak seri dilüsyonlar yapılmıştır. Dilüsyonların MRS ve LB katı besiyerlerine yayma ekimleri yapılarak 37 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petrilerdeki koloniler sayılarak canlı hücre sayısı belirlenmiştir (Maragkoudakis vd. 2006).

Suşların Caco-2 hücrelerine tutunma yetenekleri; tutunmuş bakteri sayısının (TBS) başlangıç bakteri sayısına (BBS) oranlanmasıyla belirlenmiştir. Çalışma 6 paralel üzerinden yapılmıştır.

3.2.3.9 Patojen bakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunmalarının engellenmesi

Patojen mikroorganizmaların Caco-2 hücrelerine tutunmalarının engellenmesi denemelerinde *S. enterica serotype* Typhimurium SL1344 ve *E. coli* LMG 3083 (ETEC) suşları ile birlikte *E. faecium* OZ-E25 suşu kullanılmıştır.

18 saatlik geliştirilen suşlar 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz atılmış ve pellet iki kez pH'sı 7.2 olan PBS ile yıkanmıştır. Hücre konsantrasyonu 10^8 kob/ml'ye ayarlanarak steril tüplere aktarılmıştır. Caco-2 hücrelerinin bulunduğu kuyular PBS tamponu ile 3 kez yıkandıktan sonra ilk önce *E. faecium* OZ-E25 suşu kuyulara konulmuştur. Daha önce belirtilen yöntemle tutunma denemesi gerçekleştirilmiştir. 90 dakika inkübasyon sonucunda kuyular 4 kez PBS ile yıkanmıştır. 24 kuyuluk kültür plağının 6 kuyusuna *S. enterica serotype* Typhimurium SL1344, diğer 6 kuyusuna *E. coli* LMG3083 (ETEC) RPMI süspansiyonundan 1 ml aktarılmıştır.

Tekrar 37 °C’de anaerobik koşullarda 90 dakika inkübe edilmiştir. Kuyular tekrar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra bakterilerin kuyulardan alınabilmesi için Tween 80 (% 0,1) ilave edilmiştir. 30 dakikalık inkübasyon sonrasında kuyulardan alınan bakterilerin seri dilüsyonları yapılarak hazırlanan dilüsyonlar McConkey (Merck, Darmstadt, Germany) agar ortamlarına yayma ekimleri gerçekleştirilmiştir. 37 °C’de 24 saat inkübasyon sonrası petrilerdeki koloniler sayılarak tutunmuş patojen bakteri sayısı (TPBS) belirlenmiştir (Maragkoudakis vd. 2006).

Tutunmuş patojen bakteri sayısı (TPBS), başlangıç patojen bakteri sayısına (BPBS) oranlanarak hesaplanmıştır. Patojen bakterilerinin tutunma oranlarındaki düşüş, 100’den çıkarılarak hesaplanmıştır. Tutunma denemeleri, her suş için 6 paralel yapılmıştır.

3.2.3.10 Caco-2 hücrelerine tutunma özelliğinin floresan mikroskobunda Görüntülenmesi

Caco-2 hücrelerine *E. faecium* OZ-E25 suşunun tutunmasının floresan mikroskobunda görüntülenebilmesi için ilk önce 24 kuyulu kültür plağının kuyularına 12 mm çapında coverslipler yerleştirilmiştir. Caco-2 hücreleri bu coverslipler üzerinde geliştirilmiştir. Tutunma denemesinde olduğu gibi bakteri süspansiyonu kuyulara aktararak 90 dakika inkübe edilmiştir. Aynı basamaklar tekrarlanarak tutunan bakterilerin Tween 80 ile geri alınımı gerçekleştirilmemiştir. Caco-2 hücrelerine tutunan bakterilerin olduğu düşünölen coverslipler kuyulardan çıkarılarak pH 7.2 olan PBS tamponunda % 70 oranında hazırlanan metanolde 15 dakika bekletilmiştir. Bu şekilde fikse edilen coverslipler iki kez PBS ile yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra Akridin Oranj boyama yapılmıştır. Akridin oranj boyası % 0,1 oranında pH’sı 7.2 olan PBS’de seyreltilerek kullanılmıştır. Coversliplerin üzeri boya ile kaplanarak 2 dakika beklenmiştir. Sonra PBS ile yıkanarak üzerine immersiyon yağı damlatılarak 1600X büyütmede floresan mikroskobunda görüntölenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.3.11 Caco-2 hücrelerine tutunma özelliğinin SEM’de görüntülenmesi

Caco-2 hücrelerine *E. faecium* OZ-E25 suşunun tutunmasının SEM’de görüntülenebilmesi için 24 kuyulu kültür plağının kuyularına 12 mm çapında

coverslipler yerleştirilmiştir. Caco-2 hücreleri coverslipler üzerinde geliştirilmiştir. Tutunma denemesinde olduğu gibi bakteri süspansiyonu kuyulara aktararak 90 dakika inkübe edilmiştir. Aynı basamaklar tekralanarak tutunan bakterilerin Tween 80 ile geri alınımı gerçekleştirilmemiştir. Caco-2 hücrelerine tutunan bakterilerin olduğu düşünülen coverslipler kuyulardan çıkarılarak pH'sı 7.2 olan PBS tamponunda % 2,5 oranında hazırlanan glutaraldehitte bir süre bekletilmiştir. Bu şekilde fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Coverslipler üç kez PBS ile yıkandıktan sonra % 2 OsO₄ (Osmiyum Tetraoksit) ile muamele edilmiştir. Tekrar 3 kez PBS ile yıkanarak seri etanol konsantrasyonlarıyla dehidrasyona tabi tutulmuştur (Chauviere vd. 1992). Kurutulan coverslipler SEM'de görüntü alınabilmesi için incelenmeden önce altınla kaplanmıştır. SEM'de inceleme için Bilkent Üniversitesi UNAM'da (Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Enstitüsü) bulunan FEI QUANTA 200F Taramalı Elektron Mikroskobu kullanılmıştır.

3.2.3.12 Otoagregasyon ve koagregasyon özelliğinin belirlenmesi

MRS ve LB besiyerine % 1 oranında aktifleştirilen suşlar (*E. faecium* OZ-E25, *S. Typhimurium* 1344 ve *E. coli* ETEC) 37°C'de 18 saat geliştirildikten sonra 5000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Pelletler iki kez pH'sı 7.2 olan PBS tamponu ile yıkanmıştır. Yaklaşık 10⁸ kob/ml' ye ayarlanan hücreler uygun besiyerlerinde çözülmüştür. Hücre süspansiyonları 4 ml olacak şekilde 10 saniye vortekslenildikten sonra 5 saat süresince oda sıcaklığında bekletilerek otoagregasyon yetenekleri belirlenmiştir. Her saat süspansiyonun üstünden 0,1 ml alınarak 3,9 ml uygun besiyerlerine eklenmiştir. Absorbansları 600 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede ölçülmüştür (Kos vd. 2003). Otoagregasyon yüzdesi: $1 - (A_t/A_0) \times 100$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. (A_t: 1,2,3,4 ve 5 saatteki absorbans; A₀: 0. Saatteki absorbans)

Hücre süspansiyonları aynı yöntemle elde edilerek koagregasyon oranları hesaplanmıştır. Her hücre süspansiyonundan 2 ml alınmış (*E. faecium* OZ-E25-*E.coli* ve *E. faecium* OZ-E25-*S. Typhimurium* SL 1344) ve son hacim 4 ml olarak karışık kültür 10 saniye vortekslenmiştir. Kontrol tüpleri 4 ml olacak şekilde hazırlanarak otoagregasyon yüzdeleri belirlenmiştir. Koagregasyon denemesi için de her saat başında

karışık kültürlerin üst kısımdan 0,1 ml alınarak 3,9 ml uygun besiyerlerine eklendikten sonra 5 saat süresince 600 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede ölçümleri yapılmıştır. Koagregasyon yüzde hesaplamaları Handley ve ark. (1987) tarafından belirlenen formül kullanılarak yapılmıştır.

$$\text{Koagregasyon yüzdesi: } \frac{((A_x+A_y)/2) - A(x+y)}{A_x + A_y/2}$$

3.2.4 Bakteriyosin üretimi

Gram pozitif (+) ve Gram negatif (-) bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenen *E. faecium* OZ-E25 suşunun ürettiği enterosinin moleküler ağırlığı tespit edilmiş ve enterosin geninin PZR ile tanımlanması gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1 Enzim uygulamasının bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi

E. faecium OZ-E25 suşunun ürettiği bakteriyosin aktivitesi üzerine farklı enzimlerin etkisinin belirlenebilmesi için katalaz, proteinaz K, kimotripsin ve lizozim enzimleri kullanılmıştır. Farklı indikatör bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesi denemesinde olduğu gibi 18 saat geliştirilen suş, 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst fazdan 20 µl alınıp 1 mg/ml olacak şekilde 20 µl enzim ilave edilmiştir. 37 °C'de 2 saat inkübasyon sonrasında 100 °C'de 5 dakika kaynatılmıştır. Kontrol olarak enzim ilavesiz kültür üst sıvısı kullanılmıştır. *Listeria monocytogenes* 7644'e karşı nokta ekim yapılarak 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır (Todorov ve Dicks 2005).

3.2.4.2 *Enterococcus faecium* OZ-E25 suşunun ürettiği bakteriyosinin kısmi saflaştırılması

Bakteriyosin üreticisi olan suşun SDS-PAGE ile analizlerinin yapılması için saflaştırılan liyofilize kültür kullanılmıştır. Aktif *E. faecium* OZ-E25 suşu kültüründen 1600 ml MRS sıvı besiyerine % 1 oranında ekim yapılmıştır ve 37 °C'de 18 saat geliştirilen kültürün pH'ı 10 mM NaOH kullanılarak 6.5'e ayarlanmıştır. 72 °C'de 30 dk sıcak su

banyosunda bekletilmiştir. Bu şekilde istenmeyen hücrelerin ölmesi sağlanır. 30 dk sonunda besiyerlerinin soğuması için bir süre beklenmiştir. Daha sonra 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz atılıp pelletteki hücreler 5 mM pH 6.5 olan 60 ml sodyum fosfat tamponu (NaPO₄) ile yıkanmıştır. Tekrar 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüplerinin içinde bulunan kültür sıvısının üst fazı uzaklaştırılmıştır. Pellet 60 ml distile su ile yıkandıktan sonra 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Pellet 100 ml 0.1 M NaCl ile çözülerek karışımın pH'sı 2.0'ye ayarlanmıştır. Bakteriyosinlerin pH değişimiyle dışarı çıkıp ortamda muhafazaları bu şekilde sağlanmıştır. Karışım +4 °C'de buzdolabında 1 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. 1 saatin sonunda karışım 29.000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. pH değişimiyle bakteriyosinler serbest hale geçmiştir. Karışımın üst kısmı 0.22 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek steril bir şişeye alınmıştır. Karışım diyaliz membrana aktararak +4 °C'de diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. 24 saat süren işlem sonucunda bakteriyosin kısmi olarak saflaştırılmıştır. Diyaliz işleminin güvenilir sonuçlar verebilmesi için 2 saat aralıklarla diyaliz protokolünde kullanılan distile su değiştirilmiştir. Kısmi saflaştırma sonucunda bakteriyosinin sıvı hali elde edilmiştir. SDS-PAGE'de elde edilecek sonuçlar için sıvı bakteriyosin liyofilizasyona tabi tutularak toz haline getirilmiştir. Bu şekilde kısmi olarak saflaştırılmış liyofilize kültür elde edilmiştir (Yang vd. 1992).

3.2.4.3 *Enterococcus faecium* OZ-E25 suşunun ürettiği bakteriyosinin sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforeziyle (SDS-PAGE) tespit edilmesi ve moleküler ağırlığının belirlenmesi

Liyofilizatörden alınan proteinin moleküler ağırlığının belirlenmesi için Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır (Piard vd. 1992, Contreras vd. 1997). Proteinin moleküler ağırlığı, tanımlanmış protein markörle karşılaştırılarak (NOVEX Mark 12, Invitrogen) tespit edilmiştir. Dikey jel sisteminde iki tane 10x10 cm boyutlarında cam plakalar kullanılmıştır. Jel tarağının 1 cm altına kadar % 16 'lık yürütme jeli koyulmuştur. Üzerine 1 ml bütanol eklenmiştir. Jelin polimerizasyonu için 45 dk beklenmiştir. Üstündeki bütanol kurutma kağıdı ile alınmıştır. Plakanın geri kalan kısmına % 4'lük yükleme jeli dökülmüş ve tarak

yerleştirilmiştir. 30 dk sonunda plakalar elektroforez tankına yerleştirilmiş, tarak alınarak tank içine elektrot tamponu konulmuştur.

1. jel için liyofilize edilen bakteriyosin molekülünün 1 mgr'ı 100 µl distile su içerisinde çözülmüş ve çözülmüş bakteriyosin 1:1 oranında örnek tamponuyla karıştırılarak 5 dk kaynatılmıştır. Protein örneği 20 µl olacak şekilde jele yüklenmiştir. Yürütme işlemi 25 mA'da yaklaşık bir saat, 40 mA'da yaklaşık 2 saatte gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemi bittikten sonra jel alınarak Coomassie Brilliant Blue (Merck, Darmstadt, Germany) boya çözeltisinde 1 gece bekletilmiştir. Ertesi gün boya geri alma solusyonuna alınan jel, protein bantları netlik kazanana kadar bu solüsyonda bekletilmiştir. Bu şekilde proteinin moleküler ağırlığı hesaplanarak fotoğrafları çekilmiştir.

2. jele de aynı şekilde yükleme yapılarak proteinin indikatör mikroorganizmaya karşı göstermiş olduğu inhibisyon zonunun belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu jel 24 saat steril distile suda bekletilerek organik bileşiklerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Steril distile su 6 saat aralıklarla değiştirilmiştir. İnkübasyonun gösterilmesi amacıyla jel MRS katı besiyerli petri üzerine yerleştirilmiştir. Jel üzerine indikatör bakteri olarak *Listeria monocytogenes* 7644 suşu yarı katı besiyeri ile ekilmiştir. 37 °C'de 18 saatlik inübasyon sonucu petride zon oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir (Yang ve Ray 1992). 2. jeldeki inhibisyon zonunun bulunduğu bölge ilk jeldeki bantlarla karşılaştırılarak hangi bantın antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olduğu belirlenmiştir. Jel fotoğrafları KODAK Jel Görüntüleme (Gel Logic 200 Imaging System) cihazında çekilmiştir.

3.2.4.4 Protein büyüklüğünün saptanması

Beyaz ışık kaynağı üzerine yerleştirilerek KODAK jel görüntüleme cihazında fotoğrafı çekilen jeldeki proteinin moleküler büyüklüğü NOVEX Mark 12 protein markörü kullanılarak hesaplanmıştır (Laemmli 1970). Rf değeri proteinin kat ettiği mesafenin boyanın kat ettiği mesafeye bölünmesiyle bulunmuştur.

3.2.4.5 *Enterococcus faecium* OZ-E25 suşunun üretmiş olduğu enterosin geninin PZR ile tanımlanması

E. faecium OZ-E25 suşunun üretmiş olduğu enterosin geninin PZR ile tanımlanması için öncelikle total DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA numunesinin saflık ve miktar tayini NANODROP spektrofotometrede 3 paralel okuma yapıp bu değerlerin ortalaması alınarak gerçekleştirilmiştir. DNA numunesinin konsantrasyonu ng/µl olarak belirlenmiştir (Sambrook ve Russell 2001).

Enterosin geninin varlığının belirlenmesinde kullanılan primerler çizelge 3.2’de verilmiştir. Farklı T_M sıcaklıklarında çalışan primerler için şu protokol uygulanmıştır. Ön denatürasyon basamağının (94 °C’de 2 dakika) ardından gerçekleşen ve her biri kendi içinde 94 °C’de 30 saniye denatürasyon, farklı T_M değerlerinde (55 °C±5) 30 saniye primer bağlanması ve 72 °C’de 20 saniye uzama basamaklarından oluşan toplam 30 döngüden oluşmaktadır. PZR reaksiyon karışımları çizelge 3.3’te verilmiştir (Forberg 2005).

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan enterosin primerleri (Forberg 2005)

CYTOLYCIN	F: TGGCGGTATTTTACTGGAG
	R: TGAATCGCTTCCATTTCTTC
ENTEROCIN A	F: GACACAACCTTATCTATGGGGGTA
	R: CTGGAATTGCTCCACCTAAA
ENTEROLYCIN A	F: CGCAGCTTCTAATGAGTGGT
	R: CATAACACTGCCATTTCCA
ENTEROCIN B	F: TGAAACAAATTATCGGTGGAG
	R: TATACATTTGCTAACCCAGCAG
ENTEROCIN L50A&B	F: TTGGGTGGCCTATTGTAAA
	R: TCTATTGTCCATCCTTGTTCA
ENTEROCIN P	F: TTTGGTACAAAAGTTGATGCAG
	R: ATGTCCCATACCTGCCAAAC
ENTEROCIN Q	F: TTAAAGAAAGGAGGCGGAAA
	R: TGGCAAGCATCCATATTCT

Çizelge 3.3 PZR reaksiyon karışımları (Forberg 2005)

Reaksiyon bileşimi	Protokol
dH ₂ O	34,75 µl
MgCl ₂	5 µl
10x Buffer	5 µl
2.5 mM dNTP	1 µl
Taq DNA polimeraz	0,25 µl
100 pmol/µl İleri primer	0,5 µl
100 pmol/µl Geri primer	0,5 µl
DNA	3 µl

3.2.5 İstatistiksel Analizler

Araştırma sonucunda elde edilen veri ve bilgiler, SPSS 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences) programı yardımıyla değerlendirilmiştir. Araştırmada Bağımsız "t" testi, Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve Tukey posthoc testi analizlerinden yararlanılmıştır. Araştırmada tüm bulgular % 95 güven düzeyinde, p<0.05 anlamlılık düzeyinde ve çift yönlü olarak sınanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Bakterilerin İzolasyonu

Araştırmada; farklı yaş grubuna ait sağlıklı bireylerin gaytasından insan kaynaklı örnekler izole edilmiştir. Ayrıca anne sütünle beslenen farklı yaş gruplarındaki bebeklerden alınan gayta örnekleri de çalışma kapsamına dahil edilmiştir. Darası alınmiş steril gayta kaplarında laboratuvara getirilen gayta örneklerinden 1 gr tartılmıştır. Örnekler, steril fizyolojik su ile 1/10 oranında seyreltilerek homojenize edilmiştir. Gayta örneklerinden 10^{-7} ye kadar steril fizyolojik su (FTS) ile seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her bir dilüsyon tüpünden 0,1'er ml alınarak MRS agar besiyerine drigalski spatülü ile yayma ekim yapılmış ve 37 °C'de 48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Gram pozitif (+), kok veya çubuk şekilli, spor oluşturmayan izolatlar muhtemel laktik asit bakterileri olarak seçilmiştir.

4.2 İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması

4.2.1 İzolatların kısmi karakterizasyonu

İzole edilen bakterilerin metilen mavisi ile basit boyaması yapıldıktan sonra 1600X büyütme li ışık mikroskopunda uzun, ince ve zincir çubuk veya ikili, dörtlü kok şekilli olanların laktik asit bakterisi olduğu düşünölmüştür. Gram boyama sonucunda ise mor renk gözlemlenen bakteriler Gram pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir.

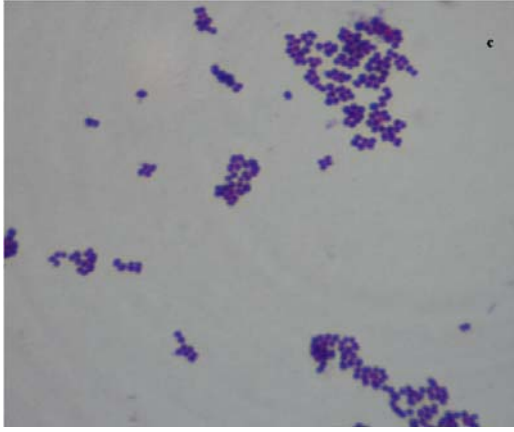
Laktik asit bakterileri katalaz negatif özellik göstermektedir. MRS katı besiyerinde geliştirilen kolonilerin üzerine % 3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatılarak gaz çıkışının olmadığı koloniler katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir.



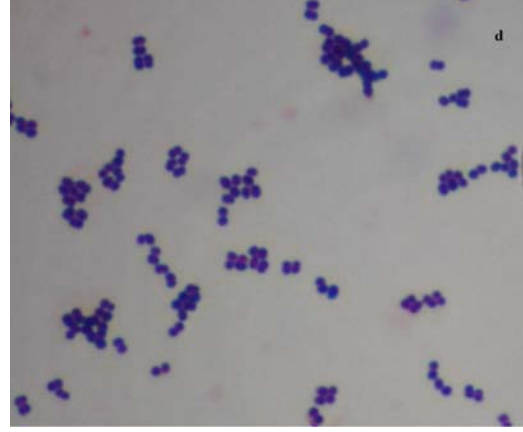
(a) *Lactobacillus fermentum*



(b) *Lactobacillus rhamnosus*



(c) *Pediococcus pentosaceus*



(d) *Enterococcus faecium*

Şekil 4.1 Gram boyama yapılmış Laktik Asit Bakterilerin ışık mikroskopunda Görüntüleri (1000x)

4.2.2 Biyokimyasal Testler

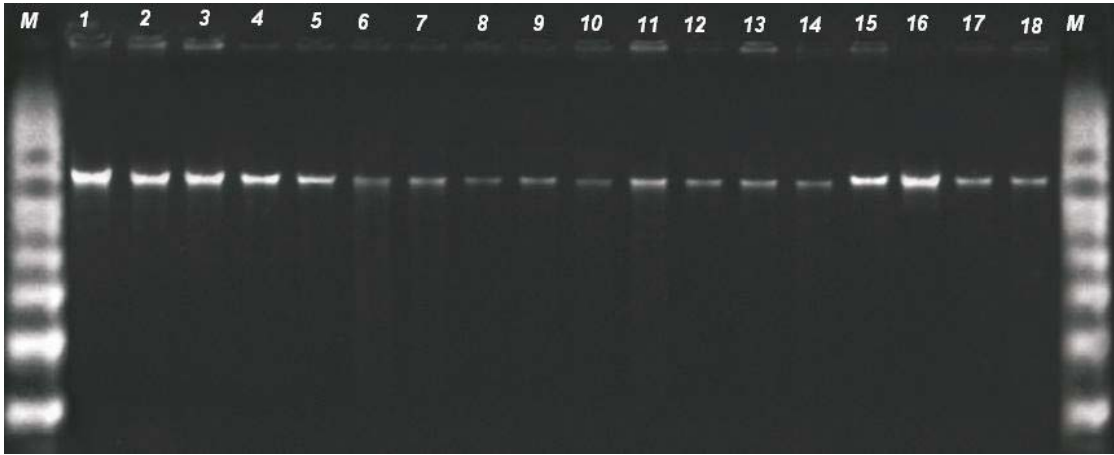
İzolatların biyokimyasal olarak tanımlanabilmesi için API 50 CHL test kitinden yararlanılmıştır. Sonuçlar, API Identification Software (API Lab Plus Program, bioMerieux) programına aktarılarak farklı şekerlerin fermentasyonu esas alınmıştır.

4.2.3 İzolatların 16S rDNA dizi analizi sonuçları

Laktik asit bakterisi olarak düşünülen bakterilerin DNA'ları izole edilmiş, saflık ve miktar tayinleri nanadrop spektrofotometrede ölçülmüştür. OD_{260}/OD_{280} değerinin 1.75

2.0 arasında olması gerekmektedir. İzolatların DNA konsantrasyonları ölçülmüştür ve bu sonuçlar DNA'ların genomik çalışmalar için uygun olduğunu göstermiştir.

PROMEGA Wizard DNA izolasyon kit kullanımı ile izole edilen kromozomal DNA numunelerinin elektroforezi % 1 agaroz içeren jellerde yapılarak fotoğraf çekimleri KODAK jel görüntüleme cihazında gerçekleştirilmiştir. İzole edilen kromozomal DNA moleküllerine ait agaroz jel görüntüleri çizelge 4.1'deki sıraya göre şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2 İzolatlara ait kromozomal DNA görüntüsü

Çizelge 4.1 İzolatların 16S rDNA dizi analizi sonuçları

Kod numaraları	Bakteri Adları	Kod numaraları	Bakteri Adları
OZ-E1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	OZ-E10	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
OZ-E2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	OZ-E11	<i>Pediococcus acidilactici</i>
OZ-E3	<i>Lactobacillus salivarius</i>	OZ-E12	<i>Pediococcus acidilactici</i>
OZ-E4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	OZ-E13	<i>Pediococcus acidilactici</i>
OZ-E5	<i>Lactobacillus fermentum</i>	OZ-E14	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
OZ-E6	<i>Lactobacillus fermentum</i>	OZ-E19	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
OZ-E7	<i>Pediococcus acidilactici</i>	OZ-E20	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
OZ-E8	<i>Pediococcus acidilactici</i>	OZ-E25	<i>Enterococcus faecium</i>
OZ-E9	<i>Pediococcus acidilactici</i>	OZ-E26	<i>Pediococcus acidilactici</i>

İzolatların tanımlanması Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından gerçekleştirilmiştir. Baz sıraları NCBI BLAST veri tabanında karşılaştırılarak kesin tanı sonuçları çıkarılmıştır. 16S rDNA dizi analizine göre kesin sonuçlar çizelge 4.1’de verilmiştir. Ayrıca BLAST tarama sonuçları EK 6’da verilmiştir. Antimikrobiyal aktivite gösteren suş, *Enterococcus faecium* olarak tanımlanmıştır. Diğer suşlar Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonuna eklenmiş, *Enterococcus faecium* suşu, *Enterococcus faecium* OZ-E25 olarak adlandırılmıştır.

Sonuçlara göre izolatların 4’ü *Lactobacillus fermentum*, 3 tanesi *Pediococcus pentosaceus*, 1 tanesi *Lactobacillus salivarius*, 2 tanesi *Lactobacillus rhamnosus*, 7 tanesi *Pediococcus acidilactici* ve 1 tanesi de *Enterococcus faecium* olarak tanımlanmıştır.

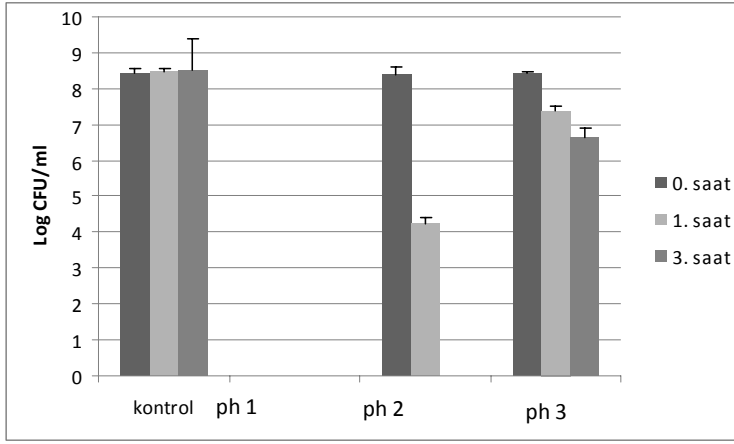
4.3 *Enterococcus faecium* OZ-E25 Suşunun Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

4.3.1 *Enterococcus faecium* OZ-E25 suşunun düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzlarına karşı direnç özellikleri sonuçları

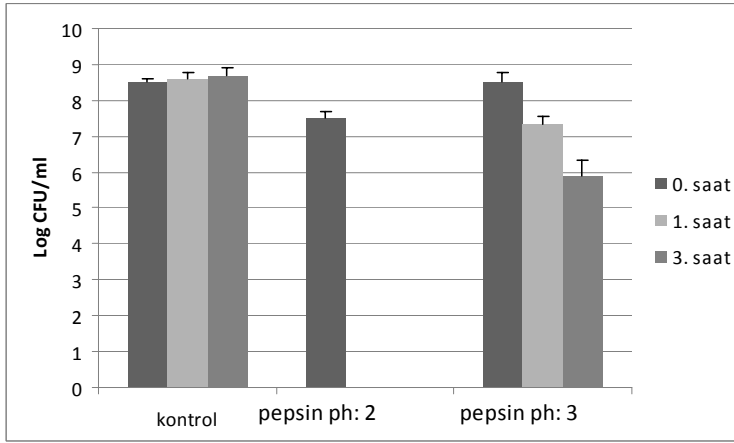
E. faecium OZ-E25 suşunun ilk olarak düşük pH'ya karşı direnç özelliği belirlenmiştir. Suşun pH 1.0'de, canlılığını sürdüremediği tespit edilmiştir. pH 2.0'de ise 1 saat sonunda canlı hücre sayısında % 50,06 oranında kayıp olmuş, 3 saat sonunda ise canlılığını tamamen kaybettiği belirlenmiştir. pH 3.0'te 3. saat sonunda canlılığın % 77,84 oranında devam ettiği bulunmuştur. pH 2'de yürütülen pepsin denemelerinde 1. saatin sonunda suşun canlılığını tamamen kaybettiği, pH 3- pepsin denemesinde 3. saatin sonunda ise canlılığın % 67,86 oranında devam ettiği bulunmuştur.

Çizelge 4.2 *E. faecium* OZ-E25 suşunun düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzuna karşı direnç durumları

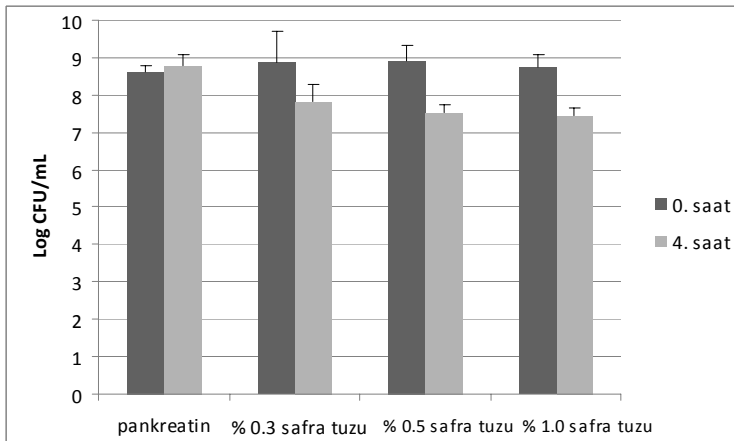
	İnkübasyon zamanı (saat)			
	0	1	3	4
pH 1.0	0	0	0	
pH 2.0	8.38	4.24	0	
pH 3.0	8.41	7.37	6.64	
Pepsin pH 2.0	7.49	0	0	
Pepsin pH 3.0	8.51	7.34	5.89	
Pankreatin	8.62	-	-	8.79
% 0.3 safra tuzu	8.89	-	-	7.82
% 0.5 safra tuzu	8.90	-	-	7.55
% 1.0 safra tuzu	8.76	-	-	7.45



Şekil 4.3 *E. faecium* OZ-E25 suşunun pH dirençliliği



Şekil 4.4 *E. faecium* OZ-E25 suşunun pH 2 ve pH 3 pepsin dirençliliği



Şekil 4.5 *E. faecium* OZ-E25 suşunun pankreatin ve safra tuzu dirençliliği

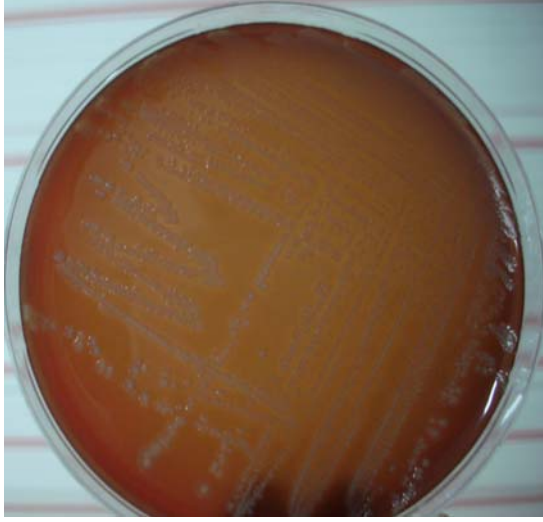
Pankreatin denemesinde 4 saat sonunda yüksek direnç gösteren suşun canlılığının % 100'den fazla olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç pankreatinin suşun canlılığını etkilemediğini göstermektedir. Safra tuzunun % 0.3, % 0.5 ve % 1.0 konsantrasyonlarında yapılan çalışmada canlılığın devam ettiği fakat canlılık oranında bir azalma olduğu tespit edilmiştir. % 0.3'lük safra tuzu denemesinde % 86,39 oranında, % 0.5'lik safra tuzunda % 82,00 oranında ve % 1.0'lık safra tuzunda ise % 80,09 oranında canlılık tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

4.3.2 Hemolitik aktivitenin belirlenmesi

E. faecium OZ-E25 suşunun hemolitik aktivitesinin belirlenmesinde kontrol suşları olarak kullanılan *E. coli* ATCC 25295'in bulunduğu ortamda kolonilerin etrafında parlak-yeşil zon (α -hemolitik) oluşurken, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538'in geliştiği ortamda, kolonilerin etrafında berrak zon (β -hemolitik) meydana geldiği tespit edilmiştir. Aynı ortamda geliştirilen bakteriyosin üreticisi *E. faecium* OZ-E25 suşunun kolonilerinin etrafında ise zon oluşumu gözlenmemiştir (γ -hemolitik) (Şekil 4.6). Probiyotik mikroorganizmaların seçiminde, hemolitik aktivitenin belirlenmesi önemli bir kriterdir. Probiyotik organizmaların seçiminde, hemolize neden olmayan γ -hemolitik suşlara dikkat edilmektedir (Maragkoudakis vd. 2006). Bu suşun hemolitik aktivitesinin belirlenerek probiyotik olarak kullanımı açısından bir sorun teşkil etmeyeceği belirlenmiştir.



(a)



(b)



(c)

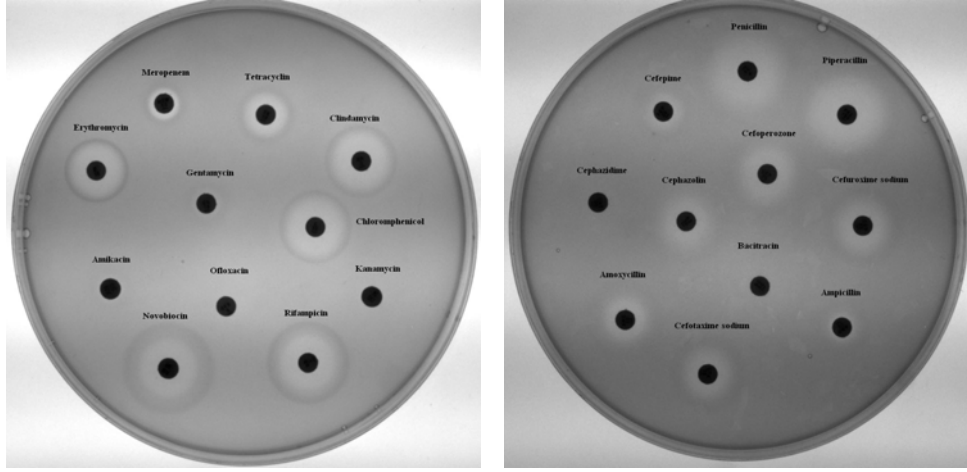
Şekil 4.6 Hemolitik aktivite görüntüleri: a. Berrak zon veren *S. aureus* ATCC 6538, b. Yeşil zon veren *E. coli* ATCC 25295, c. Zon vermeyen *E. faecium* OZ-E25

4.3.3 Antibiyotik duyarlılık sonuçları

E. faecium OZ-E25 suşunun antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi için çeşitli konsantrasyonlarda antibiyotik diskleri kullanılmıştır. 37 °C’de 18 saat inkübasyondan sonra antibiyotik diskleri etrafında oluşan zon çapları ölçülmüştür (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 *E. faecium* OZ-E25 suşunun antibiyotik duyarlılık profili

Antibiyotik	Konsantrasyonu (mg)	İnhibisyon çapı (mm)	ICMR-Bülten 2009
Piperallcin	100	20	I
Cefuroxime sodium	30	16	I
Ampicillin	10	10	R
Penicilin	10	20	S
Vancomycin	30	-	R
Cefoperazone	75	18	I
Bacitracin	10	-	R
Cefotaxime sodium	30	14	R
Cephazolin	30	14	R
Amoxycillin	30	12	R
Tetracyclin	30	16	I
Clindamycin	2	20	S
Erythromycin	15	18	I
Gentamycin	10	-	R
Chloromphenicol	30	22	S
Kanamycin	30	-	R
Ofloxacin	5	-	R
Meropenem	10	10	R
Rifampicin	30	17	I
Novobiocin	30	16	I
Amikacin	30	-	R
Cefepime	30	10	R
Cephazidime	30	-	R



Şekil 4.7 Antibiyotik duyarlılık sonuçları

Bu çalışmada disk difüzyon yöntemi kullanılarak suşun vankomisine dirençli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada suşun penicilin, clindamycin ve chloramphenicol antibiyotiklerine karşı duyarlı; piperacillin, cefuroxime sodium, cefoperazone, tetracyclin, erythromycin, rifampicin ve novobiocin antibiyotiklerine karşı yarı hassas ve amikacin, ampicillin, bacitracin, gentamycin, kanamycin, ofloxacin, cephalosin ve denenen diğer antibiyotiklere karşı dirençli olduğu bulunmuştur. İzole edilen enterokokların disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyotik duyarlılıkları incelenmiş ve % 38'inin vankomisine dirençli olduğu belirlenmiştir (Temmerman vd. 2003).

4.3.4 Antimikrobiyal aktivite spektrumunun belirlenmesi

Tanımlanan *E. faecium* OZ-E25 suşunun antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için Gram negatif (-) ve Gram pozitif (+) bakterilere karşı etkisi araştırılmıştır. Çizelge 4.4'de çalışmada kullanılan suşlar ve *E. faecium* OZ-E25 suşunun bu suşlara karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivite sonuçları verilmiştir.

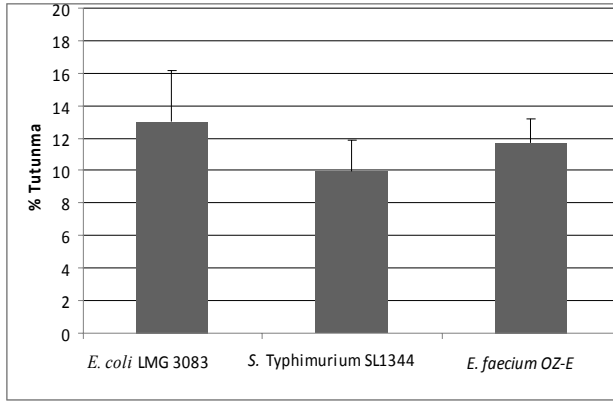
E. faecium OZ-E25 suşunun ürettiği bakteriyosinin birçok Gram (+) mikroorganizmaya karşı etkili olduğu ve Gram (-) bakterilerin bu bakteriyosinden etkilenmediği bulunmuştur.

Çizelge 4.4 *E. faecium* OZ-E25 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin aktivite spektrumu

Mikroorganizma adı	Antimikrobiyal madde aktivitesi
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	+
<i>Esherichia coli</i> ATCC 25295	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCDO 955	+
<i>Lactococcus lactic</i> ATCC 7962	+
<i>Lactococcus lactis</i> 3113	+
<i>Lactococcus lactis</i> SIK 83	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> OZ1	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	+
<i>Listeria monocytogenes</i> MA	+
<i>Listeria innocua</i> M40	+
<i>Micrococcus luteus</i> M41	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i> Ped L	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium SL 1344	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-

4.3.5 Caco-2 hücrelerine tutunma sonuçları

Caco-2 hücrelerine tutunma denemelerinde; pozitif kontrol olarak çalışılan *S. Typhimurium* SL 1344 suşunun % 9,94 ($\pm 1,93$), *E. coli* LMG 3083 (ETEC) suşunun ise % 13,02 ($\pm 3,11$) düzeyinde tutunma aktivitesi içerdiği belirlenmiştir. *E. faecium* OZ-E25 suşunun tutunma oranı ise % 11,70 ($\pm 1,45$) olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.8) Yapılan istatistiksel analizlere göre (ANOVA) bu suşların tutunmaları arasında fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$).

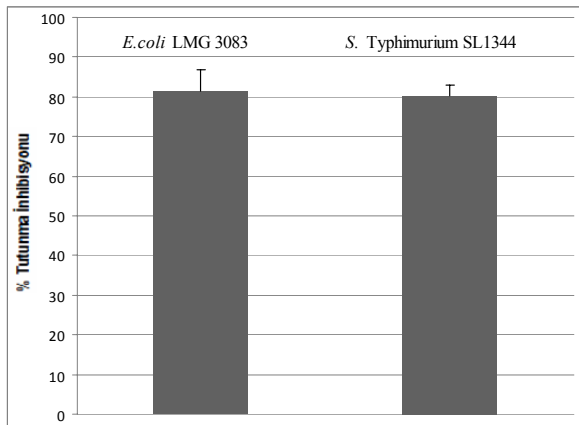


Şekil 4.8 Caco-2 hücrelerine tutunma düzeyleri

4.3.6 Patojen bakteriler varlığında Caco-2 hücrelerine tutunmasının engellenmesi sonuçları

E. coli LMG 3083 (ETEC) suşunun Caco-2 hücrelerine tutunma yeteneğinin engellenmesi denemesinde; önce Caco-2 hücrelerine *E. faecium* OZ-E25 suşu tutundurulmuş, daha sonra *E. coli* LMG 3083 (ETEC) suşu tutundurulmuştur. Birlikte inkübasyon sonucunda tutunmanın $81,55 \pm 5,40$ oranında engellediği bulunmuştur.

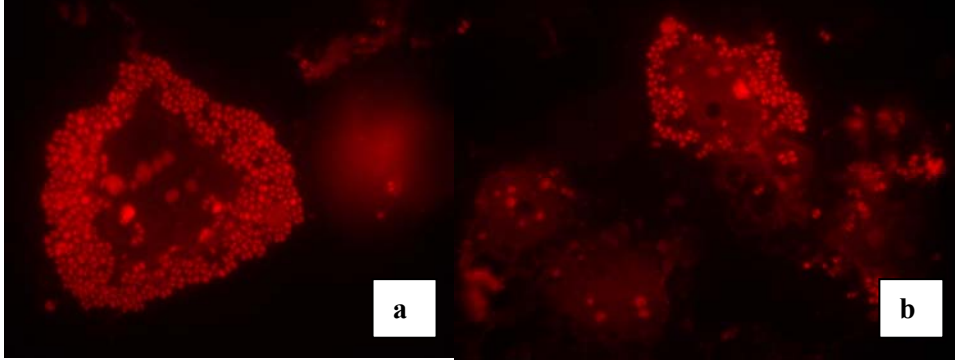
Aynı denemenin *S. Typhimurium* SL 1344 ile yürütülmesi halinde ise, bu patojenin Caco-2 hücrelerine tutunma yeteneğinin *E. faecium* OZ-E25 suşu tarafından $80,12 \pm 2,67$ oranında düşürüldüğü belirlenmiştir ($p < 0.001$) (Şekil 4.9).



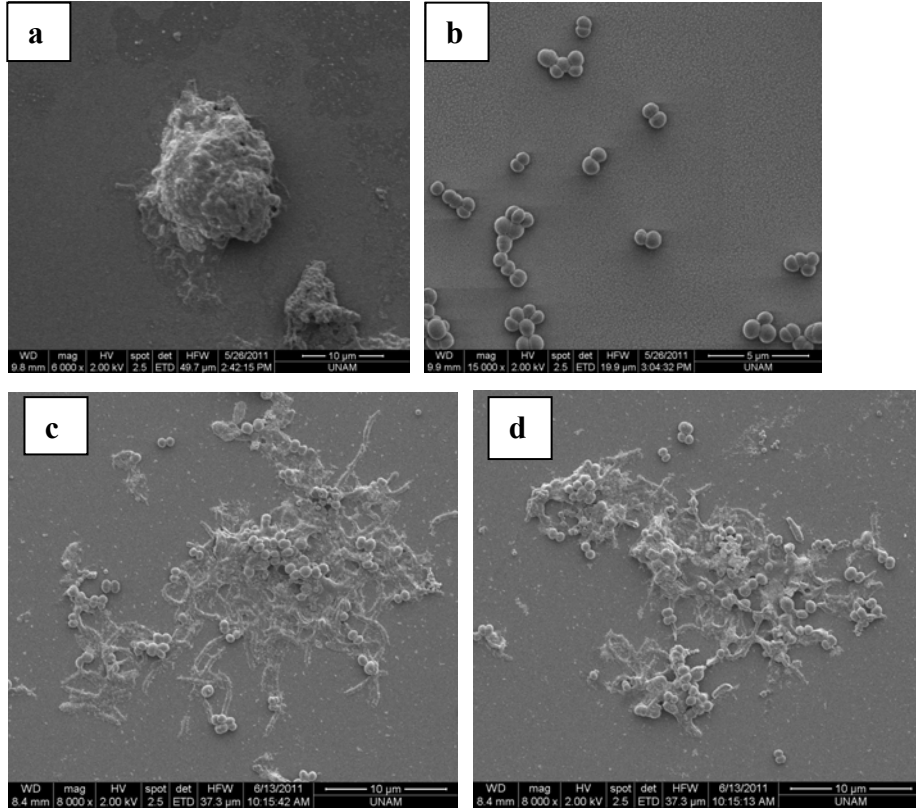
Şeli 4.9 *E. faecium* OZ-E25 suşunun patojen bakterileri engelleme düzeyleri

4.3.7 Caco-2 hücrelerine tutunmasının floresan ve elektron mikroskobundaki görüntüleri

E. faecium OZ-E25 suşunun Caco-2 hücrelerine tutunması görüntüleri şekil 4.10 ve şekil 4.11’de verilmiştir.



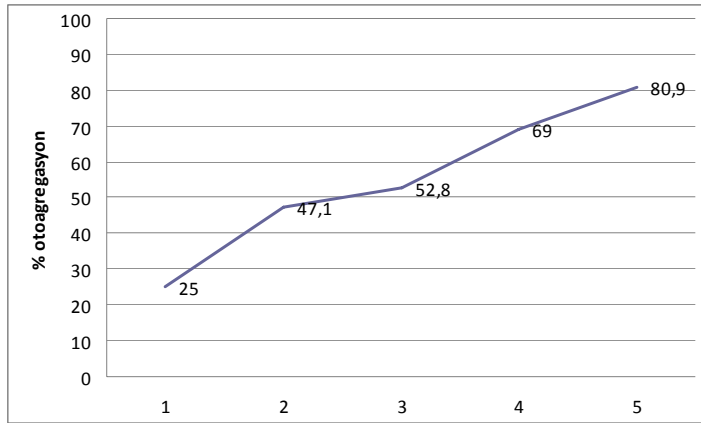
Şekil 4.10 *E. faecium* OZ-E25 suşunun Caco-2 hücrelerine *in vitro* tutunmasının akrinin oranj boyama sonrasında floresan mikroskobundaki görüntüleri (a ve b)



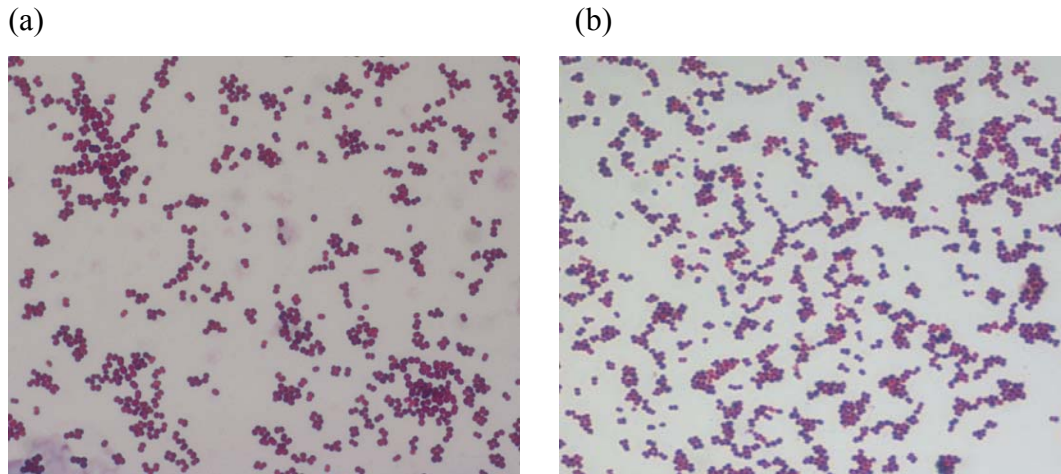
Şekil 4.11 *E. faecium* OZ-E25 suşunun Caco-2 hücrelerine *in vitro* tutunmasının SEM’deki görüntüsü: a) Caco-2 hücresi, b) *E. faecium* OZ-E25 suşunun kontrol hücreleri, c ve d) *E. faecium* OZ-E25 suşunun Caco-2 hücrelerine tutunması

4.3.8 Otoagregasyon ve koagregasyon sonuçları

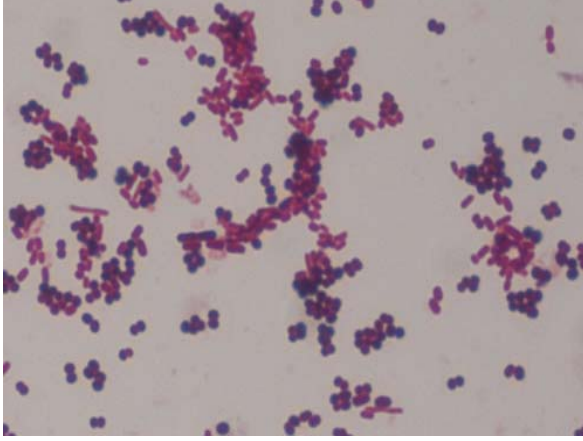
E. faecium OZ-E25 suşunun otoagregasyon yüzdesi 5. Saatin sonunda % 80,9 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12). Otoagregasyon yüzdeleri 5 saat boyunca doğrusal bir şekilde seyretmiştir. Suşun *E. coli* LMG 3083 (ETEC) ile koagregasyon yüzdesi % 12,50 *S. Thyphimurium* SL 1344 ile koagregasyon yüzdesi % 8,00 olarak belirlenmiştir. Agregasyonun ışık mikroskopundaki görüntüleri şekil 4.13'te verilmiştir. Suşun *E. coli* LMG 3083 (ETEC) ile koagregasyonu şekil 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.12 *E. faecium* OZ-E25 suşunun 5 saatlik otoagregasyon yüzdesi



Şekil 4.13 *E. faecium* OZ-E25 suşunun 3. (a) ve 4.(b) saat sonrasındaki otoagregasyonu



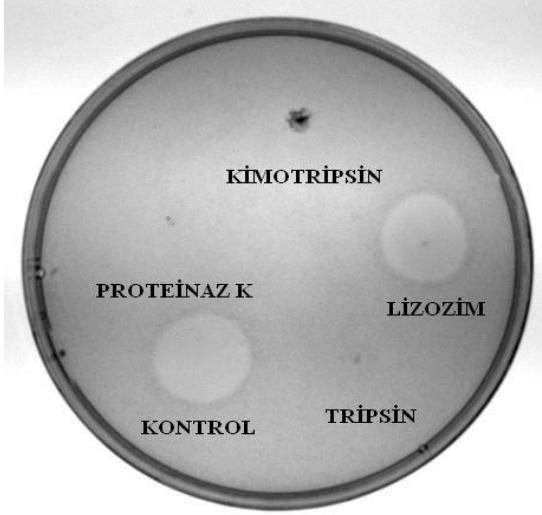
Şekil 4.14 *E. faecium* OZ-E25 suşunun *E. coli* LMG 3083 ile koagregasyonu

4.4 Bakteriyosin Üretimi Sonuçları

E. faecium OZ-E25 suşu tarafından üretilen bakteriyosin geninin varlığını belirlemek için çizelge 3.2’de verilen primerler kullanılmıştır. Bakteriyosinin kısmi saflaştırması yapılarak moleküler ağırlığı tespit edilmiştir.

4.4.1 Farklı enzim uygulamasının bakteriyosin üzerindeki etki sonuçları

E. faecium OZ-E25 suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin aktivitesi proteinaz K, tripsin, kimotripsin ve lizozim gibi enzimlere karşı denenmiştir. Proteinaz K, kimotripsin ve tripsin gibi proteolitik enzimlerle inkübasyon sonucunda antimikrobiyal maddenin aktivitesinin kaybolduğu görülmüştür. Lizozim ile muamelede ise aktivite kaybı olmamıştır. Bu sonuçlar suşun ürettiği bakteriyosinin protein ya da peptid yapısında olabileceğini göstermektedir. Şekil 4.15’te farklı enzimlerin antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkileri gösterilmiştir.



Şekil 4.15 Farklı enzimlerin *E. faecium* OZ-E25 suşu tarafından üretilen bakteriyosin üzerindeki etkileri

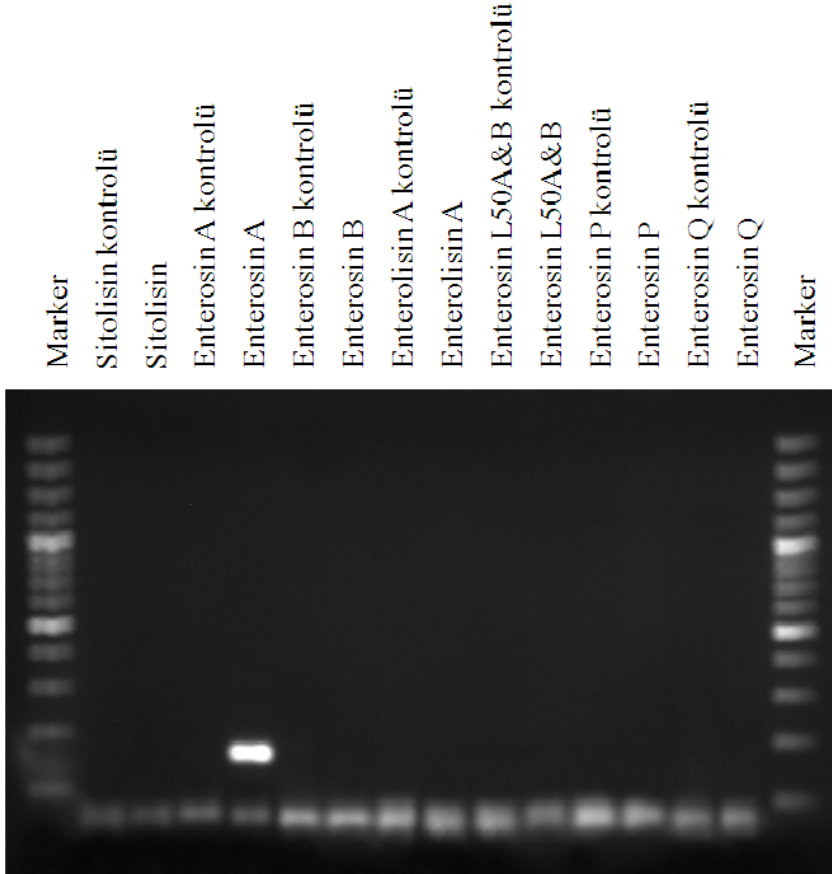
4.4.2 *Enterococcus faecium* OZ-E25 suşunun ürettiği bakteriyosinin saflaştırılması sonucu moleküler ağırlığının belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite gösteren bakteriyosinin kısmi saflaştırılması sonucunda liyofilize edilmesinden sonra SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan yöntemde 2 paralel SDS-PAGE aynı koşullar altında yürütülmüştür. CBB ile boyanan 1. jeldeki bantların hangisinin antimikrobiyal aktivite gösteren bant olduğunun belirlenmesi için, 2. jeldeki inhibisyon zonunun olduğu bölge ile kıyaslanmıştır. *E. faecium* OZ-E25 suşunun ürettiği bakteriyosinin 2. jelde göstermiş olduğu 1 tane inhibisyon zonu, muhtemelen CBB ile boyanan 1. jeldeki yaklaşık 4,5-5 kDa'luk moleküler ağırlığa sahip bantla özdeşleştirilmektedir. Sonuç olarak *E. faecium* OZ-E25 suşu tarafından üretilen bakteriyosinin yaklaşık 4,5-5 kDa büyüklüğündeki peptid tarafından sentezlendiği düşünülmektedir.

4.4.3 *Enterococcus faecium* OZ-E25 suşunun ürettiği enterosin geninin PZR ile belirlenmesi

E. faecium OZ-E25 suşunun total DNA izolasyonu yapıldıktan sonra bakteriyosin geninin belirlenmesi için çizelge 3.2'de verilen 7 tane farklı enterosin geni primer çifti kullanılmıştır. Bu primerler mevcut bakteriyosinlerin dışında yeni olası bakteriyosinlerin tanımlanabilmesi için seçilmiştir. Enterokoklar, farklı enterosinlerin

üretmesini sağlayan genler içermektedir. Bu enterosinler enterosin A, enterosin B, enterosin P, enterosin L50A/B, enterolislin A, sitolislin ve enterosin Q' dur.



Şekil 4.16 Farklı enterosin primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünü

Spesifik enterosin A primer çifti kullanılarak *E. faecium* OZ-E25 suşunun PZR amplifikasyonu sonucu elde edilen 155 bp'lik PZR ürünü ile enterosin geninin varlığı gösterilmiştir. PZR ürününün dizi analizi Refgen Biyoteknoloji (ODTÜ Teknokent/Ankara) tarafından ileri ve geri primerin kullanılması neticesinde yapılmıştır. Dizi analizi sonuçları BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı kullanılarak diğer verilerle karşılaştırılmış ve dizinin Enterosin A geni ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Enterosin geninin dizi analizi sonucu EK 7'de verilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sağlıklı insan ve anne sütü ile beslenen bebeklerin gaytasından izole edilen ve 16S rDNA dizi analizine göre tanımlanan suşlar arasından antimikrobiyal aktivite gösteren *Enterococcus faecium* suşu, *Enterococcus faecium* OZ-E25 olarak adlandırılmış ve düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzlarına karşı direnç gibi bazı probiyotik özellikleri, hemolitik aktivitesi ve antibiyotik duyarlılık seviyeleri belirlenmiştir. Ayrıca suşun Caco-2 hücrelerine tutunma testi üzerine bazı denemeler gerçekleştirilmiştir. Probiyotik suşlar, gastrointestinal sistemde zorlu koşullarda hayatta kalmak zorundadırlar. Örneğin midede pH 1.0 ile 3.0 arasında ve ince bağırsakta % 0.3'lük safra tuzuna karşı direnç göstermeleri gerekmektedir (Mainville vd. 2005). Düşük pH'ya ve safra tuzunun yüksek konsantrasyonlarına direnç özelliği probiyotik bakterilerin seçiminde önemli kriterlerdir (Havenaar vd. 1992).

E. faecium OZ-E25 suşunun midenin yüksek asitli ortamından geçerek bağırsaklara ulaşabilme yeteneğini belirlemek amacıyla mide sıvısı koşullarına benzer bir ortam oluşturulmaya çalışılmıştır. İlk aşamada midedeki asidik ortamda canlılığın gözlenmesi için pH değeri 1, 2 ve 3'e ayarlanan MRS kültür ortamında yeterli canlılığı göstermesi incelenmiştir. Çalışmamızdaki pH 3'teki 3 saat sonunda % 77,84 ve pH 3-pepsin denemesinde 3. saatin sonunda % 65,87'lik canlılık oranı, diğer çalışmalarla kıyaslandığında probiyotik seçim kriterleri için uygun olduğunu göstermektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda pH 3'de izolatların sayılarında belirgin bir değişim meydana gelmediği veya sayının çok az düzeyde azaldığı bildirilmiştir (Erkkilä ve Petäjä 2000, Prasad vd. 1999). Mide özsuyuna benzer bir ortam hazırlanarak 24 adet probiyotik bakterinin asit ortamına dayanması incelenmiş, pH 3'te 3 saat sonunda *L. casei* ve *L. rhamnosus*'un 2.7-5.9 logaritmik birim azaldığını belirlenmiştir (Vinderola ve Reinheimer 2003). Ördek kökenli 112 adet laktik asit bakterisinden sadece 2 tanesinin pH 2 ve 3'te 4 saat sonunda canlı kalabildiği bildirilmiştir (Ehrmann vd. 2002) Laktik asit bakterilerinin bağırsağa ulaşması için geçen 90 dakikalık sürede canlı kalması probiyotik olarak seçimleri açısından yeterli olmaktadır (Chang vd. 2001). Ambadoyiannis ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada (2004) *Enterococcus* suşlarında pH 1'de hiç birinde canlılık tespit edilmemiştir. pH 3'te 37 °C'de 1. saatin sonunda

canlı hücre sayısında bir değişiklik gözlenmemiş, 4 saatlik inkübasyon sonucunda ise denenen suşların % 47,3 - % 98,6'sında kayıp söz konusu olmuştur. *E. durans* suşları, hem *E. faecalis* hem de *E. faecium* suşlarına nazaran düşük pH'ya karşı daha yüksek direnç göstermiştir. *E. faecalis* V1.26 suşu % 58,3 oranıyla düşük pH'ya karşı en yüksek düzeyde direnç gösteren suştur. *E. faecium* G1.5 suşunun kendi türleri arasında % 46,2 oranla düşük pH'ya karşı en dirençli suş olduğu bulunmuştur. Aynı kökenden gelen bu suşlar arasında hiçbir ayırım bulunamamıştır. Süt ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus* izolatlarının pH 2-pepsin denemesinin 1. saatin sonunda 29 suşun 21'nin canlılığını sürdürdüğü, ancak 3. saatte 13'ünün canlılığını tamamen yitirdiği tespit edilmiştir (Maragkoudakis vd. 2006). Çeşitli laktik asit bakterilerinin gastrik koşullara toleranslarının araştırıldığı bir çalışmada, pH 3.0'te ve 3 saat sonunda *Pediococcus* üyelerinin diğer suşlara göre daha fazla direnç gösterdiği tespit edilmiştir (Jonganurakkum vd. 2008).

Daha sonra suşun % 0.3, % 0.5 ve % 1 oranında safra tuzu içeren MRS besiyerinde canlılıkları test edilerek ince bağırsakta salgılanan safra suyunun etkisi incelenmiştir. E. faecium OZ-E25 suşu 4 saatlik inkübasyon sonucunda canlı sayısında azalma ile birlikte istenen canlılığı gösterdiği tespit edilmiştir. Süt ürünlerinden izole edilen probiyotik olabilecek 3 adet suşla yapılan bir çalışmada suşların düşük pH'da canlılıklarını devam ettirirken, bağırsaklardaki yüksek safra konsantrasyonunda gelişip çoğalabildiklerini belirtilmiştir. İzolatların % 77'sinin safra tuzunda gelişebildiği ancak türlerin probiyotik özellikte olabileceğinin belirtilebilmesi için düşük pH ve safra tuzlarına dirençlerinin de incelenmesi gerektiği vurgulanmıştır (Prasad vd. 1999). Yapılan başka bir çalışmada farklı safra tuzu konsantrasyonları denenerek % 0,3'lük safra tuzu konsantrasyonunun suşların safra tuzuna toleransının belirlenmesi için kritik miktar olduğu tespit edilmiştir (Gilliand vd. 1984, Goldin ve Gorbach 1992). Erkkilä ve Petäjä (2000)'nin yapmış olduğu bir çalışmada pH 7'de % 0.3'lük safra tuzu konsantrasyonunda bakteri sayısında bir değişme gözlenmezken düşük pH'da hücrelerin safra tuzundan daha fazla etkilendiğini belirlenmiştir. Bebek gaytasından izole edilen laktik asit bakterilerinden % 43'ünün, % 0.4'lük safra tuzu konsantrasyonunda, canlılıklarını devam ettirdikleri bulunmuştur (Khalil vd. 2007).

Probiyotik özelliklere sahip olduğunu düşündüğümüz suşun disk difüzyon yöntemi kullanılarak vankomisine dirençli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada suşun piperallisin, penicilin, clindamycin ve chloramphenicol antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu; piperallisin, cefoperazine, tetracyclin, erytromycin, rifampicin, novobiocin ve cefuroxime sodium antibiyotiklerine karşı yarı hassas olduğu ve denenen diğer antibiyotiklere karşı dirençli olduğu bulunmuştur. Enterococcus faecium EF9296 suşu ile yapılan bir çalışmada suşun amfisilin, vankomisin, rifampisin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin antibiyotiklerine duyarlı, kanamisine karşı dirençli olduğu saptanmıştır (Marcinakova vd. 2004). Bozadan izole edilen E. mundtii suşunun sulphamethoxazole, neomycin, tobramycin, cefuroxime, clindamycin, cefotaxime, oxacillin, cefepime, amikacin, ceftazidime, ceftriaxone, streptomycin antibiyotiklerine dirençli; erythromycin, ciprofloxacin, vancomycin, rifampicin, chloramphenicol, tetracycline antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu bulunmuştur (Todorov vd. 2009). Tavuktan izole edilen E. faecium suşlarının antibiyotik disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarının belirlendiği bir çalışmada E. faecium EFMI 47 and EFMI 49 suşlarının denenen antibiyotiklere en iyi sonuç verdiği bulunmuştur. Bu sonuçlara göre suşların amoxicillin + clavulanic, ciprofloxacin, gentamycin, trimethoprim + sulphamethoxazole, vancomycin ve trimethoprim'e duyarlı, cefotaxime, erythromycin ve tetracycline'e karşı dirençli olduğu bulunmuştur (Lertworapreecha vd. 2011). İnsan, hayvan gayta örnekleri ve fermente gıdalardan izole edilen; Enterococcus ve laktik asit bakterileri gibi normal intestinal flora üyesi olan mikroorganizmalarda antibiyotik direnç genlerinin bulunduğu belirlenmiştir (Klare vd. 2007). Antibiyotik direnç genlerini taşıyan probiyotik mikroorganizmaların tüketimi sonucunda yatay gen transferi ile direnç genlerinin bağırsaktaki diğer mikroorganizmalara aktarımı ve antibiyotik dirençli patojen bakterilerin gelişimi söz konusu olduğundan insan veya hayvan tüketimi için çalışılan probiyotik ürünlerde, antibiyotik direnç plazmidlerini taşıyan mikroorganizmalar kullanılmamalıdır (Zhou vd. 2005, Hummel vd. 2007).

Caco-2 hücreleri ince bağırsak villuslarına özgüdür ve probiyotik bakterilerin tutunması ve patojen bakterilerin yayılma mekanizmalarını anlamak için oluşturulan in vitro modeller olarak iş görmektedir (Granato vd. 2004). Suşun Caco-2 hücrelerine tutunma yeteneğinin yanında, S. Typhimurium ve E. coli gibi bağırsak epiteline

tutunmada etkin olan bakterilerin epitel hücrelere tutunmasını engellemesi, probiyotik özellikleri içinden öne çıkmaktadır. *E. coli* LMG 3083 suşu % 13,02 ($\pm 3,11$) ile çalışmada en yüksek tutunma yüzdesine sahiptir. *E. faecium* OZ-E25 suşunun tutunma oranı ise % 11,70 ($\pm 1,45$) olarak belirlenmiştir. *S. Typhimurium* SL 1344 suşunun ise tutunma yüzdesi % 9,94 ($\pm 1,93$) oranında tespit edilmiştir. Denenen suşlar arasında tutunma yüzdeleri arasında fark olmadığı istatistiksel verilere göre belirlenmiştir.

Tavuktan izole edilen *E. faecium* suşlarının intestinal mukozal yüzeye tutunma yeteneklerinin incelendiği bir çalışmada *E. faecium* suşlarının tutunma yüzdeleri % 39 ve % 59,6 arasında bulunmuştur. En yüksek tutunma yüzdeleri *E. faecium* EFMI 47 ve EFMI 49 suşlarında % 59,6 ve % 55,4 olarak bulunmuştur (Lertworapreecha vd. 2011). Thirabunyanon ve ark. (2009) yapmış olduğu çalışmada *E. faecium* RM11 ve *L. fermentum* RM 28 suşlarının Caco-2 hücrelerine tutunma yüzdeleri sırasıyla % 13 ve % 7 olarak bulunmuştur. Süt ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus* sp suşlarıyla yapılan bir çalışmada ise bu suşların Caco-2 hücrelerine tutunma yüzdeleri % 0,2 ile % 25,5 arasında değişmektedir (Maragkoudakis vd. 2006). *Lactobacillus plantarum* 423, *Lactobacillus plantarum* ST28MS, *Enterococcus faecium* ST311LD ve *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ST33LD suşlarının Caco-2 hücrelerine tutunma düzeylerinin araştırıldığı çalışmada sırasıyla % 8, % 4, % 4 ve % 3 oranında tutunma değerleri bulunmuştur (Todorov ve Dicks 2008). Bazı probiyotik laktobasillerin Caco-2 hücrelerine tutunma değerleri ise % 14 oranında rapor edilmiştir (Tuomola ve Salminen 1998). *E. mundtii* ST4SA ve *L. plantarum* 423'ün Caco-2 hücrelerine tutunma yüzdeleri sırasıyla % 6 ve % 8 olarak tespit edilmiştir. *L. rhamnosus* GG, test edilen suşlardan % 9.2 tutunma yüzdesi ile en yüksek tutunma oranına sahiptir. *L. johnsonii* La1, *L. casei* MB1 ve *L. casei* Shirota % 7.0, % 4.5 ve % 3.2 oranında tutunma gerçekleştirmişlerdir (Botes vd. 2008).

Otoagregasyon suş spesifiktir. Bizim çalışmamızda *E. faecium* OZ-E25 suşunun otoagregasyon yüzdesi % 80,9 olarak belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada *Lactobacillus plantarum* ST23LD ve *Lactobacillus plantarum* ST28MS suşlarının otoagregasyon yüzdeleri sırasıyla % 74,3 ve % 95,4 olarak saptanmıştır (Todorov ve Dicks 2008).

Agregasyon biyofilm oluşumu için önemlidir. Ayrıca probiyotik bakterilerin epitelyal hücrelere ve mukus mukozasına tutunmasına ve bu bakterilerin gastrointestinal sistemin zorlu koşullarında hayatta kalmalarına yardımcı olmaktadır (Lepargneur ve Rousseau 2002, Reid ve Burton 2002). Diğer laktik asit bakterileri veya patojen bakteriler ile koagregasyon, konukçunun gastrointestinal sistemine yararlı etki sağlanabilmesi için önemlidir. *E. faecium* OZ-E25 suşunun *E. coli* LMG 3083 (ETEC) ile koagregasyonu % 12,50 ve *S. Thyphimurium* SL 1344 ile koagregasyonu % 8,00 olarak belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada *Listeria innocua* LMG 13568 ve *Lactobacillus plantarum* ST23LD arasındaki koagregasyon seviyesi % 94,3 ile oldukça yüksek düzeydedir. Aynı şekilde *E. faecium* ST311LD suşunun otoagregasyonu % 89,5 iken *Listeria innocua* LMG 13568 ile koagregasyonu % 93,7 olarak bildirilmektedir (Todorov ve Dicks 2008).

Kanlı agara yapılan çizgi ekimler neticesinde kolonilerin etrafında yeşil zon veren *E. coli* ATCC 25295 α hemolitik, berrak zon veren *S. aureus* ATCC 6538 β hemolitik, zon oluşumunun gözlenmediği *E. faecium* OZ-E25 ise γ hemolitik olarak değerlendirilmiştir. Hemolitik aktivitesin sonucunda elde edilen veri, suşun probiyotik kullanımına engel teşkil etmemektedir.

Çalışmamızda *E. faecium* OZ-E25 suşunun Gram pozitif (+) ve Gram negatif (-) bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite denemesi yapılmıştır. Gram negatif (-) bakterilerin üretilen bakteriyosinden etkilenmediği fakat birçok Gram pozitif (+) bakteriye karşı etkili olduğu bulunmuştur. *E. faecium* suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin inhibitör etkilerinin belirlendiği bir çalışmada bakteriyosinin *Propionibacterium* spp., *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *Clostridium sporogenes* ve *C. tyrobutyricum*'u kapsayan geniş inhibitör aktivite spektrumuna sahip olduğu görülmüştür (du Toit vd. 2000). Achemchem ve ark. (2005) yaptıkları bir araştırmada *E. faecium* F58'in ürettiği bakteriyosinin *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Brochothrix* ve *Bacillus*'un bazı suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Tunus "Rigouta" peynirinden izole edilen *E. faecium*'un MMT21 suşunun ürettiği enterosin A ve B'nin laktik asit bakterilerinin yanısıra *L. monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde de inhibitör etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Ghraiiri vd. 2008). Fermente bir soya ürününden izole edilen *E. faecium* S2C10 ve S2C11'nin

ürettiği bakteriyosinlerin *L. monocytogenes* ve LAB'lerine karşı aktif olduğu belirlenmiştir (Yoon vd. 2008). Tunus'ta fermente et ürününden izole edilen *E. faecium*'un MMZ'nin 04-09-13-17 kodlu suşlarının üretmiş olduğu bakteriyosinlerin birçok Gram pozitif bakteri (*L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *L. lactis* spp. *cremoris*, *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* ve *Leuconostoc mesenteroides*) üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Belgacem vd. 2008).

Farklı enzimlerin E. faecium OZ-E25 suşu tarafından üretilen bakteriyosin üzerindeki etkileri incelendiğinde proteolitik enzimler bakteriyosin aktivitesinin kaybolmasına neden olmuştur. Lizozim enzimi ile inkübasyon sonucunda aktivite kaybı olmamıştır. Enterosin ON-157'nin proteolitik enzimlere duyarlı, LAB ve *L. monocytogenes* 'e karşı aktif olduğu belirlenmiştir (Ohmomo vd. 2000). *E. faecium* P21 tarafından üretilen enterosin A ve B'nin proteazlara karşı duyarlı, lipaz ve amilaza dayanıklı olduğu, liyofilizasyondan ve -20°C'de 12 ay depolama koşullarından etkilenmediği tespit edilmiştir (Herranz vd. 2001). *E. faecium* N15 tarafından üretilen bakteriyosinin kimotripsin, proteinaz K, tripsin ve pepsin gibi proteazlar ile amilaza karşı duyarlı, lipaz enzimine dayanıklı olduğu gözlenmiştir (Losteinkit vd. 2001). *E. faecium* USC-46 ve *E. mundtii* USC-51 tarafından maksimum bakteriyosin üretiminin, gelişimlerinin durgun fazında olduğu belirlenmiştir. Her iki bakteriyosinin proteinaz K ile inaktif olduğu gözlenmiştir (Campos vd. 2006). *E. faecium* MMT21'nin ürettiği enterosin A ve enterosin B'nin tripsin, pronaz E ve proteinaz K'ya karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Ghrai vd. 2008).

Sodyum dodesil sülfatın (SDS) bulunduğu poliakrilamid jel elektroforezi protein alt birimlerini ayırmada kullanılmaktadır. SDS-PAGE sonucu Listeria monocytogenes 7644'e karşı zon veren jelde yaklaşık 4,5-5 kDa büyüklüğünde bir bant tespit edilmiştir.

Enterosinler ribozomlar tarafından sentezlenen, lider peptidin ayrılması dışında post translasyonel modifikasyonlara uğramayan, düşük moleküler ağırlıklı ve ısı stabil peptidlerdir. Enterosin A, sınıf IIa'ya dahil olan, antilisteriyal peptidin N terminalindeki YGNGVXC aminoasit rezidüsü ile pediyosin benzeri yapı içeren bakteriyosindir (Aymerich vd. 1996). Enterosin B, pediyosin benzeri bakteriyosin olmamakla birlikte

kimyasal özellikleri, ısı stabilitesi ve antilisteriyal aktivite göstermesi nedeniyle sınıf IIa bakteriyosinler içinde yer almaktadır. Enterosin A ve B'nin inhibisyon etkileri arasında çok az bir fark olmasına rağmen her ikisi de birlikte faaliyet göstermektedirler (Casaus vd. 1997). Sosis ve peynirden izole edilen *Enterococcus faecium* T136 ve *Enterococcus faecium* WHE81 suşlarının hem enterosin A hem de enterosin B üreticisi olduğu saptanmıştır.

Molekül ağırlık açısından enterosinler değerlendirildiğinde, enterosin A ve B (*E. faecium* MMT21)'nin sırasıyla 4828.67 Da ve 5463.8 Da (Ghrai vd. 2008), bakteriosin B1 ile B2 (*E. faecium* B1 ve B2)'nin 3,4 ile 5,8 kDa (Moreno vd. 2002), bakteriosin DO81821 (*E. faecium* D081821 ve D081833)'in 3,0 kDa (Chen vd. 2007), enterosin ON-157 (*E. faecium* NIAI 157)'nin 2,5 kDa (Ohmomo vd. 2000), enterosin RZS C5 ve enterosin RZS C13 (*E. faecium* RZS C5 ve *E. faecium* RZS C13)'ün 5460 ve 5477 Da (Foulquie-Moreno vd. 2003), *E. faecium* JCM 5804T tarafından üretilen bakteriyosin 4,5 kDa (Park vd. 2003) moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilmektedir.

Çalışmamızda E. faecium OZ-E25 suşunun üretmiş olduğu bakteriyosin geninin tespiti için 7 farklı enterosin gen bölgesine spesifik primer çiftleri kullanılmış ve PZR amplifikasyonu sonucunda 155 bp'lik PZR ürünü sekanslanmış ve elde edilen dizi analizi sonuçları BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı kullanılarak diğer verilerle karşılaştırılmıştır. Dizi, Enterosin A geni ile % 99 oranında benzerlik göstermiştir.

Bebek gaytasından izole edilen *E. faecium* GM-1 suşunun üretmiş olduğu bakteriyosin gıdalardan izole edilen enterokokların ürettikleri enterosinler ile benzer özellik göstermiştir. Enterosin geni birçok primer kullanılarak tanımlanmıştır. 130 bp'lik PZR ürününün nükleotit sekansı bu bakteriyosinin enterosin P (% 82,9) olduğunu ortaya çıkarmıştır (Kang ve Lee 2005). Diğer bir çalışmada 7 tane bakteriyosin üretici enterokokun enterosin 4, enterosin A, enterosin B, enterosin P, bakteriyosin 31 ve enterosin L50A ve L50B primerleri kullanılarak hangi enterosin üreticisi oldukları tespit edilmiştir. Enterosin A primerleri kullanılarak *E. faecium* BFE 1170, 1228 ve 900 suşlarının üretmiş oldukları bakteriyosinler ortalama 126 bp'lik üründen oluşmaktadır. Enterosin B primeri kullanılarak BFE 900 suşunun üretmiş olduğu bakteriyosinin PZR

ürünü 159 bp ve enterosin P primeri kullanılarak BFE 1072 suşunun üretmiş olduğu bakteriyosinin 130 bp olduğu bildirilmiştir (du Toit vd. 2000). *Enterococcus faecium* JCM 5804 suşunun üretmiş olduğu bakteriyosin enterosin A, B ve P primerleri kullanılarak yaklaşık 130, 160 ve 120 bp'lik PZR ürünleri elde edilmiştir. Fakat enterosin P'nin PZR ürünlerinde net bir bant gözlenemediği için enterosin P'ye özgün yeni primerler dizayn edilerek 220 bp'lik yeni PZR ürün elde edilmiştir. PZR ürünlerinin sekanslanması sonucu suşun üretmiş olduğu bakteriyosinlerin enterosin A, enterosin B ve % 91 benzerlik oranıyla enterosin P olduğu bulunmuştur (Park vd. 2003). Saavedra ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada geleneksel peynirlerden izole edilen iki adet *E. faecium* suşunun *L. innocua* ve *L. monocytogenes* üzerine inhibitör etki gösterdiği ve bu suşların aynı zamanda enterosin A genini de taşıdıkları belirlenmiştir. Bununla birlikte çalışmada her iki patojene karşı antimikrobiyal etki göstermediği belirlenen 4 farklı *E. faecium* suşunda da enterosin A geninin bulunduğu belirtilmiştir. Çalışmada elde edilen bu sonuçlara dayanılarak, bakteriyosin üretmeyen suşların DNA promotor bölgelerindeki çeşitli düzenlemelerin aktif bakteriyosin üretiminden sorumlu genlerin ifadesinde etkili olduğu belirtilmiştir.

Sonuçları genel olarak değerlendirdiğimizde diğer araştırmalara göre *in vitro* ortamda *E. faecium* OZ-E25 suşunun daha uzun süre canlı kalabildiği belirlenmiştir. Bu çalışmada yapılan ve ileride yapılabilecek *in vitro* analizler bu suşun probiyotik olabilmesi için önemli kanıtlar olmakla birlikte probiyotik iddiası için yeterli görülmemektedir. Kültürlerin probiyotik olarak adlandırılabilmesi için insan veya hayvan denekler üzerinde çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca bu suşun endüstriyel ölçekte kullanılabilir olması için uygun gelişim koşullarının incelenmesi de gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Achemchem, F., Martinez-Bueno, M., Abrini, J., Valdivia, E. and Maqueda, M. 2005. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *Journal of Applied Microbiology*, 99; 141–150.
- Agerbaek, M., Gerdes, L.U. and Richelsen, B. 1995. Hypocholesteroleamic effect of a new fermented milk product in healthy middle-aged men. *European Journal of Clinical Nutrition*, 49; 346– 352.
- Allen, W.D., Linggood, M.A. and Porter, P. 1996. *Enterococcus* organisms and their use as probiotics in alleviating irritable bowel syndrome symptoms. *European Patent*. 0508701 (B1).
- Alvarez-Olmos M.I. and Oberhelman, R.A. 2001. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 32; 1567-1576.
- Ambadoyiannis, G., Hatzikamari, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis N. 2004. Probiotic and technological properties of enterococci isolates from infants and cheese. *Food Biotechnology*, 18 (3); 307-325.
- Ammor, M.S., Florez, A.B. and Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in nonenterococcal lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24; 559–570.
- Ananou, S., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Galvez, A. and Valdivia, E. 2005. Control of *Staphylococcus aureus* In Sausages By Enterocin AS-48. *Meat Science*, 71; 549–556.
- Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J. and Dellaglio, F. 2001. Phenotypic And Genetic Diversity of Enterococci Isolated From Italian Cheeses. *Journal of Dairy Research*, 68; 303-316.
- Anonymous, 2005. Harv Womens Health Watch, Health benefits of taking probiotics. We take vitamins and minerals to safeguard our health. Should we also add a daily dose of bacteria?, 12, 6-7
- Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. and Nes, I.F. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 62; 1676–1682.
- Aymerich, T., Aartigas, M.G., Garriga, M., Monfort, J.M. and Hugas, M. 2000. Effect of Sausage Ingredients And Additives On The Production Of Enterocins A And B By *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization Of In Vitro Production And Anti-Listerial Effect In Dry Fermented Sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 88; 686–694.
- Ballongue, J. 1993. Bifidobacteria and probiotic action. In: *Lactic acid bacteria*, Seppo Slininen and Atte von Wright (eds.), pp. 357-428. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Begley, M., Sleator, R.D., Grahan, C.G.M. and Hill, C. 2005. Contribution of three Bile- Associated Loci, bsh, pva, and btlB, to Gastrointestinal Persistence and Bile Tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 73 (2); 894-904.

- Belgacem, Z.B., Ferchichi, M., Prevost, H., Dousset, X. and Manai, M. 2008. Screening for anti-listerial bacteriocin-producing lactic acid bacteria from “Gueddid” a traditionally Tunisian fermented meat. *Meat Science*, 78; 513–521.
- Bellomo, G., Mangiagle, A., Nicastro, L. and Frigerio, G. 1980. A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics. *Current Therapeutic Research*, 28; 927–936.
- Benchimol, E.I. and Mack, D.R. 2004. Probiotics in relapsing and chronic diarrhea. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 26 (8); 515-517.
- Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G.L., Cavadini, C., Sauthier, T., Anderson, R.E., Schiffrin, E.J. and von der Weid, T. 2003. Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *Journal of Nutrition*, 133; 1158– 1162.
- Bhunja, A.K., Johnson, M.C. and Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65; 261-268.
- Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C. and Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of bacteriocin, pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied and Environmental Microbiology*, 57; 1265-1268.
- Boris, S., Suarez, J.E. and Barbes, C. 1997. “Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, vaginal isolate”. *Journal of Applied Microbiology*, 83; 413-420.
- Boris, S., Suarez, J.E., Vazquez, F. and Barbes, C. 1998. Adherence of human vaginal Lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infection and Immunity*, 66 (5); 1985-1989.
- Botes, M., Loos, B., van Reenen, C.A and Dicks, L.M.T. 2008. Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. *Arch Microbiology*, 190; 773-584.
- Bradshaw, D.J, Marsh, P.D., Watson, G.K. and Allison, C. 1998. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infection and Immunity*, 66; 4729–4732.
- Buydens, P. and Debeuckelaere, S. 1996. Efficacy of SF 68 in the treatment of acute diarrhea. A placebo-controlled trial. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 31; 887– 891.
- Campos, C.A., Rodriguez, O., Mata, P.C., Prado, M. and Velazquez, J.B. 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (psetta maxima). *Food Research International*, 39; 356–364.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernandez, P.E. and Holo, H. 1997. Enterosin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, 61; 2643-2648.
- Champagne, C.P. and Gardner, N.J. 2005. Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45; 61–84.
- Champomier-Verges, M.C., Maguin, E., Mistou, M.Y., Anglade P. and Chich, J.F. 2002. Lactic Acid Bacteria and Proteomics: Current Knowledge and

- Perspectives. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 771 (1-2); 329-342.
- Chang, Y., Kim, J., Kim, H., Kim, W., Kim, Y. and Park, Y. 2001. Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent *in vivo* studies. *Antonie van Leeuwenhoek*, 80; 193-199.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, J.K. 1998. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84; 759-768.
- Chauviere, G., Coconnier, M.H., Kerneis, S., Fourniat, J. and Servin, A.L. 1992. Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Journal of General Microbiology*, 138; 1689-1696.
- Chen, H. and Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science Safety*, 2; 82-100.
- Chen, Y.S., Yanagida, F. and Srionnual, S. 2007. Characteristics of bacteriocin-like inhibitory substances from dochi-isolated *Enterococcus faecium* D081821 and D081833. *Letters in Applied Microbiology*, 44; 320-325.
- Cisar, J.O., Kolenbrander, P.E. and McIntire, F.C. 1979. Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. *Infection and Immunity*, 24; 742-752.
- Cleveland, J., Montville, J.T., Nes, F.I. and Chikidas, L.M. 2001. Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials For Food Preservation. *International Journal of Microbiology*, 50; 1-17.
- Coburn, P. S., Pillar, C. M., Jett, B. D., Haas, W. and Gilmore, M. S. 2004. *Enterococcus faecalis* senses target cells and in response expresses cytolysin. *Science*, 306; 2270-2272.
- Coconnier, M.-H., Bernet, M.-F., Kerneis, S., Chauviere, G., Fourniat, J. and Servin, A.L. 1993. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiology Letters*, 110; 299-306.
- Collins, M.D. and Ribson, G.R. 1999. "Probiotics, prebiotics and Synbiotics: Approaches for modulating the microbial ecology of the gut", *American Journal of Clinical Nutrition*, 69 (5); 10525-1075.
- Comanne, D., Hughes, R., Shortt, C. and Rowland, I. 2005. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutation Research*, 591; 276-289.
- Contreras, B.G.L., De Vuyst, L., Devreese, B., Busanyova, K., Raymaeckers, J., Bomsan, F., Sablon, E. and Vandamme, E.J. 1997. Isolation, purification and amino acid sequence of Lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139. *Applied and Environmental Microbiology*, 37; 13-20.
- Cruz, A.G.D., Faria, J.D.A.F. and Dender, A.G.F.V. 2007. Packaging system and Probiotic dairy foods. *Food Research International*, 40; 951-956.
- D'Aimmo, M.R., Modesta, M.M. and Biavati, B. 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. Isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*, 15; 35-42.
- de Kwaadsteniet, M., Todorov, S.D., Knoetze, H. and Dicks, L.M.T. 2005. Characterization of A 3944 Da Bacteriocin, Produced By *Enterococcus*

- mundtii* ST15, With Activity Against Gram-Positive And Gram-Negative Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 105; 433–444.
- Dellaglio, F., Dicks, L.M.T. and Torrani, S. 1985. The Genus *Leuconostoc* in The Lactic Acid Bacteria, The Genera of Lactic Acid Bacteria. Volume 2, edited by Wood BJB and Holzapfel WH. (Blackie Academic & Professionals, Glasgow), 235-279.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M. and Palenzona, D. 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 31; 438–442.
- De Martinis, E.C.P., Alves, V.F. and Franco, B.D.G.M. 2002. Fundamentals and perspectives for use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Review International*, 18 (2-3); 191-208.
- De Vries, M.C., Vaughan, E.E., Kleerebezem, M. and De Vos, W.M., 2006. *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16; 1018–1028.
- Devriese, L.A., Pot, B. and Collins, M.D. 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Microbiology*, 75; 399-408.
- De Vuylts, L., Avonts, L. and Makras, L. 2004. Probiotics, prebiotics and gut health. In: *Functional Foods, ageing and degenerative disease*, Eds. C. Remacle, B. Reusens, Woodhead Publishing Limited and CRC Press Limited, England, 416-482.
- Diep, D. B., Havarstein, L. S. and Nes, I. F. 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *The Journal of Bacteriology*, 178; 4472-4483.
- Dieye, Y., Hoekman, A.J., Clier, F., Juillard, V., Boot, H.J. and Piard J.C. 2003. Ability of *Lactococcus lactis* to export viral capsid antigens: a crucial step for development of live vaccines, *Applied of Environmental Microbiology*, 69; 7281–7288.
- Domig, K. J., Mayer, H. K. & Kneifel, W. (2003). Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Phenotypic and genotypic criteria. *International Journal of Food Microbiology*, 88; 165–188.
- Drago, L., Gismondo, M.R., Lombardi, A., de Haen, C. and Gozzini, L. 1997. Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiology Letters*, 153; 455–463.
- Dufour, A., Hindre, T., Haras, D. and Le Pennec, J.P. 2007. The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiology Reviews*, 31; 134–167.
- Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E. M. M., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F. and Collins, J. K. 1999. Probiotics: From myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinicaltrials. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76; 279-292.
- du Toit, M., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F. and Holzapfel, W.H. 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 88; 482–494.

- Eckner, K. F. 1992. Bacteriocins and Food Applications. Dairy, Food and Environmental Sanitation, 12; 204-209.
- Ehrmann, M. A., Kurzak, P., Bauer, J. and Vogel, R. F. 2002. Characterisation of Lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. Journal of Applied Microbiology, 92; 966-975.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiology Reviews, 24; 85-106.
- Erkkilä, S. and Petäjä, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Science, 55; 297-300.
- Farias, M.E., Nunez de Kairuz, M., Sesma, F., Palacios, J., de Ruiz Holgado, A.P. and Oliver, G. 1999. Inhibition Of *Listeria monocytogenes* by the bacteriocin Enterocin CRL35 During Goat Cheese Making. Milchwissensc, 54; 30– 32.
- Fernández, M. F., Boris, S. and Barbés, C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology, 94; 449-455.
- Fimland, G., Blingsmo, O. R., Sletten, K., Jung, G., Nes, I. F. and Meyer, J-N. 1996. New Biologically Active Hybrid Bacteriocins Constructed by Combining Regions from Various Pediocin-Like Bacteriocins: the C-Terminal Region Is Important for Determining Specificity. Applied and Environmental Microbiology, 62 (9), 3313–3318.
- Fisher, K. and Philips, C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology, 155; 1749-1757.
- Fooks, L.J., Rycroft, C.E. and Gibson, G.R. 1999. Methods for assessing the potential of prebiotics and probiotics. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 2 (6); 481-484.
- Forberg, T. 2005. Lactic acid bacteria of different origin production of antimicrobial substances and distribution of bacteriocin genes. Master thesis (unpublished), Noregian University of Life Sciences, p; 113, Norway.
- Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C. and Joly, B. 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties, Research in Microbiology, 42; 39-44.
- Foster, J.S., Palmer, R.J. Jr. and Kolenbrander, P.E. 2003. Human oral cavity as a model for the study of genome–genome interactions. The Biological Bulletin, 204; 200–204.
- Foster, J.S. and Kolenbrander, P.E. 2004. Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. Applied and Environmental Microbiology, 70; 4340–4348.
- Foulquie' Moreno, M.R., Rea, M., Cogan, T. And De Vuyst, L. 2003. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a coculture in Cheddar cheese manufacture. International Journal of Food Microbiology, 81; 73– 84.
- Foulquie Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L. 2006. The Role and Application of Enterococci In Food and Health. International Journal of Food Microbiology, 106; 1–24.
- Fox, P.F. 2004. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition. Major Cheese groups. 2; 1-434.
- Franz, C.M., Halzapfel, W.H. and Stiles, M.E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? International Journal of Food Microbiology, 47; 1-24.

- Franz, C.M.A.P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H. and Holzapfel, W. H. 2003. Enterococci In Foods A Conundrum For Food Safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88; 105–122.
- Frece, J., Kos, B., Beganovic, J., Vukovic, S. and Suskovic, J. 2005. *In vivo* testing of functional properties of three selected probiotic strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21; 1401-1408.
- Freter, M. 1992. Factors affecting the microecology of the gut. In *Probiotics. The Scientific Basis* ed. Fuller, R. pp. 111–145. Glasgow: Chapman & Hall.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66; 365-378.
- Fuller, R. and Gibson, G.R. 1998. Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health. *Clinical Microbiology and Infection*, 4 (9); 477-480.
- Fuller, R. 1999. Probiotics, Colonic Microbiota. *Nutrition and Health*, 89-99.
- Gardiner, G.E., Ross, R.P., Wallace, J.M., Scanlan, F.P., Jägers, P.P.J.M., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K. and Stanton, C. 1999. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of Cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47; 4907–4916.
- Ghrairi, T., Frere, J., Berjeaud, J.M. and Manai, M. 2008. Purification and characterisation of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Control*, 19; 162-169.
- Gillian, G.E., Ross, R.P., Wallace, J.M., Scanlan, F.P., Jägers, P.P., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K. and Stanton, C. 1999. Influence of a Probiotic Adjunct Culture of *Enterococcus faecium* on the Quality of Cheddar Cheese *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12); 4907–4916.
- Gilliand, S., Staley, T. and Bush, L. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, 67; 3045-3051.
- Gillor, O., Nigro, L.M. and Riley, M.A. 2005. Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design*, 11; 1065-1075.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., Mateuzzi, D., Bazzocchi, G., Poggioli, G., Miglioli, M. and Campieri, M. 2000. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: A doubleblind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, 119; 305–309.
- Giraffa, G., Neviani, E. and Torri Tarelli, G. 1994. Antilisterial Activity By Enterococci In A Model Predicting The Temperature Evolution Of Taleggio, An Italian Soft Cheese. *Journal of Dairy Science*, 77; 1176– 1182.
- Giraffa, G. 1995. Enterococcal bacteriocins: their potential use as anti-Listeria factors in dairy technology. *Food Microbiology*, 12; 551-556.
- Giraffa, G. 2002. Enterococci From Foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26; 163–171.
- Gismondo, M.R. and Drago, L. 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobiol Agents*, 12; 287-292.
- Goldin, B.R. and Gorbach, S.L. 1984. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 39; 756-761.
- Goldin, B. R. and Gorbach, S. L. 1992. Probiotics for humans. In R. Fuller, *Probiotics the scientific basis* London, Chapman and Hall; 355-376.

- Granato, D.G.E.B., Pridmore, R.D., Marvin, L., Rouvet, M. and Corthesy- Theulaz, I.E. 2004. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infection and Immunity*, 72; 2160-2169.
- Grande, M.A.J., Lucas, R., Abriouel, H., Omar, N. B., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Martinez-Canamero, M., Valdivia, E. and Galvez, A. 2005. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* In Fruit Juices By Enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*, 104; 289– 297.
- Green, J.D. and Klaenhammer, R.T. 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 60; 4487-4494.
- Gunn, J.S. 2000. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and Infection*, 2; 907–913.
- Haas, W. and Gilmore, M. S. 1999. Molecular nature of a novel bacterial toxin: the cytolysin of *Enterococcus faecalis*. *Medical Microbiology and Immunology*, 187; 183–190.
- Hammes, W. P. and Vogel, R. F. 1995. The genus *Lactobacillus*. In: B. J. B. Wood and W. H. Holzappel (editors), *The Lactic Acid Bacteria, The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol. 2. Blackie Academic, London, 19-54.
- Handley, P.S., Carter, P.L., Wyatt, J.E. and Hesketh, L.M. 1985. Surface structures (peritrichous fibrils and tufts of fibrils) found on *Streptococcus sanguis* strains may be related to their ability to coaggregate with other oral genera. *Infection and Immunity*, 47; 217–227.
- Handley, P.S., Harty, D.W.S., Wyatt, J.E. Brown, C.R., Doran, J.P. and Gibbs, A.C.C. 1987. A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*. *Journal of General Microbiology*, 133; 3207-3217.
- Handley, P.S., Rickard, A.H., High, N.J. and Leach, S.A. 2001. Coaggregation–is it a universal phenomenon? *Biofilm Community Interactions: Chance or Necessity?* (Gilbert P, Allison D, Brading M, Verran J & Walker J, eds), pp. 1–10. Bioline Press, Cardiff.
- Hartemink, R., Domenech, V.R. and Rombouts, F.M. 1997. LAMVAB-A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods*, 29 (2); 77-84.
- Havenaar, R., Ten Brink, B. ad Huis in't Veld J.H.C. 1992. Selection of strains for probiotic use. In: Fuller R., Ed., *Probiotics: The Scientific Basis*, Chapman and Hall, London.
- Heller, L. 2009. Danisco breaks down probiotics market. <http://www.nutraingredients-usa.com/Industry/Danisco-breaksdown-probiotics-market>, 11.05.2009.
- Hentges, D.J. 1992. Gut flora and disease resistance. In: Fuller, R. (Ed.), *Probiotics*. Chapman and Hall, Cambridge, pp. 87-110.
- Herranz, C., Casaus, P., Mukhopadhyay, S., Martinez, J.M., Rodriguez, J.M., Nes, I.F., Hernandez, P.E. and Cintas, L.M. 2001. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. *Food Microbiology*, 18 (2); 115-131.
- Hirayama, K. and Rafter, J. 1999. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention: mechanistic consideration. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76; 391-394.

- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition, Williams&Wilkins, Baltimore, 787 s.
- Holzapfel, W. H., Haberera, P., Snelb, J., Schillinger, U. and Huis in't Veld, H.J.J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41; 85–101.
- Holzapfel, W.H. and Schillinger, U. 2002. Introduction to pre-and probiotics. *Food Research International*, 35 (2-3); 109-116.
- Holzapfel, W.H. 2006. Introduction to Prebiotics and Probiotics. In: *Probiotics in Food Safety and Human health*, Eds. I. Goktepe, V.K. Juneja ve M. Ahmedna, Taylor and Francis Group, CRC Press Boca Raton, 1-35.
- Hummel, A.S., Hertel, C., Holzapfel, W.H. and Franz, C.M. 2007. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73; 730-739.
- Isolauri, E. 2004. The role of probiotics in pediatrics. *Current Pediatrics*, 14(2);104-109.
- Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59 (2); 171-200.
- Jay, J. M. 2000. *Modern Food Microbiology*. 6 th Edition, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 362-399.
- Jett, B. D., Huycke, M. M. and Gilmore, M. S. 1994. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7; 462–478.
- Jonganurakkum, B., Wang, Q., Xu, S., Tada, Y., Minamida, K., Yasakawa, D., Sugi, M., Hara, H. and Asano, K. 2008. *Pediococcus pentosaceus* NB17 for probiotic use. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106; 69-73.
- Jurkovic, D., Krizkova L., Dusinsky, R., Belicova, A., Sojka, M., Krajcovic, J. and Ebringer, L. 2006. Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 42; 553–559.
- Kang, J.H. and Lee, M.S. 2005. Characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *Journal of Applied Microbiology*, 98; 1169-1176.
- Khalil, R., Mahrous, H., El-Halafawy, K., Kamaly, K., Frank, J. and El Soda, M. 2007. Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt. *African Journal of Biotechnology*, 6 (7); 939-949.
- Kim, W.S., Ren, J. and Dunn, N.W. 1999. Differentiation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactic* and subsp. *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiology Letters*, 171; 57-65.
- Kim, W.S., Perl, L., Park, J.H., Tandianus, J.E. and Dunn, N.W. 2001. Assesment of stres response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Current Microbiology*, 43; 346-350.
- Kimmel, S.A., Roberts, R.F. and Ziegler, G.R. 1998. 'Optimization of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR Grown in a Semidefined Medium', *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (2); 659-664.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Reviews*, 12; 39-86.
- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W. and Goossens, H. 2007.

- Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59 (5); 900-912.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2); 103–125.
- Klein, G. 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 88; 123-131.
- Kmet, V., Callegari, M.L., Bottazzi, V. and Morelli, L. 1995. Aggregation-promoting factor in pig intestinal *Lactobacillus* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 21; 351–353.
- Kolenbrander, P.E. 1988. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. *Annual Review of Microbiology*, 42; 627–656.
- Kolenbrander, P.E. and London, J. 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *Journal of Bacteriology*, 175; 3247-3252.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C., Procop, G. and Woods, G. 2005. *Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology*. Sixth edition. Philadelphia: Lippincott Co:700-711.
- Koponen, O. 2004. Studies of Producer Self-Protection and Nisin Biosynthesis of *Lactococcus lactis*, Doctoral Dissertation, Institute of Biotechnology and Department of Applied Chemistry and Microbiology, Helsinki.
- Kos, B., Suskovic, S., Simpraga, M., Frece, J. and Matosic, S. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal Applied of Microbiology*, 94; 981-987.
- Kotelnikova, E.A. and Gelfand, M.S. 2002. Bacteriocin Production by Gram-Positive Bacteria and the Mechanisms of Transcriptional Regulation. *Russian Journal of Genetics*, 38 (6); 628-641.
- Kuipers, O. P., Bierbaum, G., Ottenwalder, B., Dodd, H. M., Horn, N., Metzger, J., Kupke, T., Gnau, V., Bongers, R., van den Bogaard, P., Kusters, H., Rollema, H.S., de Vos, W. M., Siezen, R. J., Jung, G., Götz, F., Sahl, H. G. and Gasson M. J. 1996. Protein engineering of lantibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69; 161-170.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227; 680-685.
- Ledder, R. G., Timperley, A. S. Friswell, M.K., Macfarlane, S. and McBain, A. 2008. Coaggregation betweenandamong human intestinal and oral bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 66; 630-636.
- Lee, Y. and Salminen, S. 1995. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 6; 241-245.
- Lee, Y. K., Nomoto, K., Salminen, S. and Gorbach, S. L. 1999. *Handbook of Probiotics*. A Wiley-Interscience Publication, 211 p. Canada.
- Lee, N.K. and Paik, H.D. 2001. Partial Characterization Of Lacticin NK24, A Newly Identified Bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 Isolated From Jeot-Gal. *Food Microbiology*, 18; 17-24.
- Lepargneur J.P. and Rousseau V. 2002. Protective role of the *Doderlein flora*. *Journal de Gynecologie Obstetrique Biologie de la Reproduction*, 31; 485-494.

- Lertworapreecha, N., Poonsuk, K. and Chalermchiakit, T. 2011. Selection of potential *Enterococcus faecium* isolated from Thai native chicken for probiotic use according to the *in vitro* properties. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 33 (1); 9-14.
- Linden, P.K. and Miller, C.B. 1999. Vancomycin-resistant enterococci: the clinical effect of a common nosocomial pathogen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 33; 113– 120.
- Losteinkit, C., Uchiyama, K., Ochi, S., Takaoka, T., Nagahisa, K. and Shioya, S. 2001. Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91; 390-395.
- Lubelski, J., Rink, R., Khusainov, R., Moll, G.N. and Kuipers, O.P. 2008. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (3); 455–76.
- Luckey, T.D. and Floch, M.A. 1972. Introduction to intestinal microbiology. *American Journal of Clinical Nutrition*, 25; 1291-1295.
- Lund, B. and Edlund, C. 2001. Probiotic *Enterococcus faecium* strains is a possible recipient of the vanA gene cluster. *Clinical Infectious Diseases*, 32 (9); 1384–1385.
- Macovei, L. and Zurek, L. 2006. Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of enterococci from houseflies collected in food settings. *Applied and Environmental Microbiology*, 72; 4028–4035.
- Magarinos, H., Selaive, S., Costa, M., Flores, M. and Pizarro, O. 2007. Viability of micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) in ice cream. *International Journal of Dairy Technology*, 60 (2); 128-131.
- Mainville, I., Arcand, Y. and Farnworth, E.R. 2005. A dynamic model that simulates the human upper gastro-intestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 99; 287-296.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C. Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16; 189-199.
- Marcinakova, M., Simonova, M., and Laukova, A. 2004. Probiotic Properties of *Enterococcus faecium* EF9296 Strain Isolated from Silage. *Acta Veterinaria Brno*, 73; 513-519.
- Marco, M.L., Pavan, S. and Kleereberzem, M. 2006. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology*, 17; 204–210.
- Mazzotta, A. S. and Montville, T. J. 1997. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10 °C and 30 °C. *Journal of Applied Microbiology*, 82; 32–38.
- Mc Auliffe, O., Ross, R. P. and Hill, C. 2001. Lantibiotics: Structure, Biosynthesis And Mode of Action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25; 285-308.
- Menrad, K. 2003. Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*, 56 (2-3); 181-188.
- Mollendorff, J.W., Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T. 2006. Comparison of Bacteriocins Produced by Lactic-Acid Bacteria Isolated from Boza, a Cereal-Based Fermented Beverage from the Balkan Peninsula. *Current Microbiology*, 53; 209-216.

- Mombelli, B. and Gismondo, M.R. 2000. The use of probiotics in medical practise. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16 (4); 531-536.
- Morelli, L. 2007. In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. *International Dairy Journal*, 17; 1278–1283.
- Moreno, M.R., Leisner, J.J., Tee, L.K., Ley, C., Radu, S., Rusul, G., Vancanneyt, M. and de Vuyst, L. 2002. Microbial Analysis Of Malaysian Tempeh, and Characterization of Two Bacteriocins Produced By Isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Applied Microbiology*, 92 (1); 147-157.
- Moreno, Y., Collando, M.C., Ferrus, M.A., Cobo, J.M., Hernandez, E. and Hernandez, M. 2006. Viability Assessment of Lactic Acid Bacteria in Commercial Dairy Products Stored at 4 °C using LIVE/DEAD®BacLight™ Staining and Conventional Plate Counts. *International Journal of Food Science and Technology*, 41 (3); 275-280.
- Mukai, T. and Arihara, K. 1994. Presence of intestinal lectin-binding glycoproteins on the cell surface of *Lactobacillus acidophilus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58; 1851–1854.
- Murphy, L., Dunne, C., Kiely, B., Shanahan, F., O’Sullivan, G.C. and Collins, J.K. 1999. In vivo assessment of potential probiotic *Lactobacillus salivarius* strains: evaluation of their establishment, persistence, and localization in the murine gastrointestinal tract. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11; 149-157.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R. and Clemens, R.A. 1999. Probiotics Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38 (1); 113-126.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. and Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70; 113-128.
- Nes, I. F. and H. Holo. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Peptide Science*, 55; 50–61.
- Nes, I.F., Holo, H., Fimland, G., Hauge, H.H. and Nissen-Meyer, J. 2002. Unmodified peptide-bacteriocins (class II) produced by lactic acid bacteria. In: *Peptide antibiotics; discovery, modes of action, and applications*. eds. Dutton, C.F., Marcel Dekker Inc., 81-115, New York.
- Nes, I.F., Diep, D.B. and Holo, H. 2007. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Bacteriology*, 189 (4); 1189-1198.
- Ng, S.C., Hart, A.L., Kamm, M.A., Stagg, A.J. and Knight, S.C. 2009. Mechanisms of Action of Probiotics: Recent Advances, *Inflamm Bowel Dis*, 15 (2); 300-310.
- Nouaille, S., Ribeiro, L.A., Miyoshi, A., Pontes, D., Le Loir, Y., Oliveira, S.C., Langella, P. and Azevedo, V. 2003. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genetic and Molecular Research*, 2(1); 102–111.
- Nunez, M., Rodriguez, J.L., Garcia, E., Gaya, P. and Medina, M. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 83; 671– 677.
- Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisinprasart, S., Kobayashi, M., Nakajima, T., Yajima, M. and Nakanishi, K. 2000. Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *Journal of Applied Microbiology*, 88; 81–89.
- Ogier, J.C. and Serror, P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The

- Enterococcus* genus. International Journal of Food Microbiology, 126 (3); 291-301.
- Oscariz, J.C. and Pisabarro, A. 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. Review Article. Springer-Verlag and a system for enumerating models (SEM), 12; 123-127.
- Osmanağaoğlu, Ö. and Beyatlı, Y. 2002. The use of Bacteriocins Produced by Lactic acid bacteria in food biopreservation. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 32 (3-4); 295-306.
- Osmanağaoğlu, Ö. 2005. Sensitivity of sublethally injured Gram-negative bacteria to pediocin P. Journal of Food Safety, 25 (4); 266–275.
- Oozeer, R., Goupil-Feuillerat, N., Alpert, C.A., van de Guchte, M., Anba, J., Mangaud, J. and Cortheir, G. 2002. *Lactobacillus casei* is able to survive and initiate protein synthesis during transit in the digestive tract of human flora-associated mice. Applied Environment Microbiology, 68 (7); 3570-3574.
- O’Sullivan, L., Ross, R.P. and Hill, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie, 84; 593-604.
- O’Sullivan, D.J. 2006. Primary sources of probiotic cultures. In: Probiotics in Food Safety and Human health, Eds. I pek Goktepe, V.K. Juneja ve M. Ahmedna, Taylor and Francis, CRC Press Boca Raton, 67-91.
- Ouoba, L.I.I., Lei, V. and Jensen, L.B. 2008. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and Bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. International Journal of Food Microbiology, 121; 217–224.
- Pag, U. and Sahl, H. G. 2002. Multiple activities in lantibiotics-models for the design of novel antibiotics? Current Pharmaceutical Design, 8; 815-833.
- Pant, A.R., Graham, S.M. and Allen, S.J. 1996. *Lactobacillus* GG and acute diarrhea in young children in the tropics. Journal of Tropical Pediatrics, 42 (3); 62–165.
- Parada, J.L., Caron C.R., Medeiros P. B.A. and Soccol, C.R. 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and Use as Biopreservatives. Brazilian Archives of Biology and Technology, 50 (3); 521-542.
- Park, S.H., Itoh, K. and Fujisawa, T. 2003. Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. Journal of Applied Microbiology, 95; 294–300.
- Pe’rez, P.F., Minnaard, Y., Disalvo, E.A. and de Antoni, G.L. 1998. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. Applied and Environmental Microbiology, 64; 21–26.
- Piard, J.C., Kuipers, O.P., Rollema, H.S., Desmazeud, M.J. and Klaenhammer, T.R. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactic* CNRZ481. Applied and Environmental Microbiology, 58; 279-284.
- Pinto, M.G.V., Franz, C.M.A.P., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. 2006. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. International Journal of Food Microbiology, 109; 205-214.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J. and Gopal, P. K. 1999. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic. International Dairy Journal, 8; 993-1002.

- Rastall, R., Gibson, G., Gill, H., Guarner, F., Klaenhammer, T., Pot, B., Reid, G., Rowland, I. and Sanders, M.E. 2005. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbial Ecology*, 52 (2); 145-152.
- Reid, G., McGroarty, J.A., Angotti, R. and Cook, R.L. 1988. *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, 34; 344–351.
- Reid, G., Bruce, A. W., McGroarty, J.A. Cheng, K.J. and Costerton, J.W. 1990. ‘Is there a role for lactobacilli in prevention of urogenital and intestinal infections?’ *Clinical Microbiology review*, 3 (4); 335-344.
- Reid G. and Burton, J. 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infections by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*, 4; 319-324.
- Rickard, A.H., Leach, S.A., Buswell, C.M., High, N.J. and Handley, P.S. 2000. Coaggregation between aquatic bacteria is mediated by specific-growth-phase-dependent lectin–saccharide interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66; 431–434.
- Rickard, A.H., Leach, S.A., Hall, L.S., Buswell, C.M., High, N.J. and Handley, P.S. 2002. Phylogenetic relationships and coaggregation ability of freshwater biofilm bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68; 3644–3650.
- Rietschel, E.T. and Brade, H. 1992. Bacterial endotoxins. *Scientific American*, 267 (2); 54-62.
- Rodriguez, J.M, Martinez, M.I., Horn, N. and Dodd, H.M. 2003. Heterologous Production Of Bacteriocins By Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 80; 101-116.
- Rojas, M. and Conway, P.L. 1996 Colonization by lactobacilli of piglet small intestinal mucus. *Journal of Applied Bacteriology*, 81; 474–480.
- Rolfe, R. D. 2000. The role of probiotics cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of nutrition*, 130; 396-402.
- Rosen, G. and Sela, M.N. 2006. Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* PK 1594 is mediated by capsular polysaccharide and lipopolysaccharide. *FEMS Microbiology Letters*, 256; 304–310.
- Russel, D.W. and Setchell, K.D. 1992. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry*, 31(20); 4737-4749.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. and Sandholm, T.M. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84; 197–215.
- Saarela, M. 2007. Functional Foods: Probiotics. In: *Anti-Angiogenic Functional and Medicinal Foods*, Edited by J.N. Lusso, F. Shahidi ve D. Bagchi. Taylor and Francis Group, CRC Press Boca Raton, 611-625.
- Saavedra, L., Taranto, M.P., Sesma, F. and Font de Valdez, G., 2003, Homemade traditional cheeses for isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. Short communication. *International Journal of Food Microbiology*, 88; 241-245.
- Salminen, S., Ouwehand, A.C. and Isolauri, E. 1998. Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 8; 563-572.
- Salminen, S. and vonWright, A. 1998. Current probiotics-safety assured? *Microbial Ecology in Health and Disease*, 10; 68-77.
- Salminen, S. 1999. Probiotics: Scientific support for use. *Food Technology*, 53; 66.

- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, New York.
- Sanders, J.W., Venema, G. and Kok, J. 1999. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 23; 483-501.
- Sanders, M.E. 2003. Probiotics: considerations for human health. *Nutrition Reviews*, 61 (3); 91- 99.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G. and Tsakalidou, E. 2001. Biochemical Properties of Enterococci Relevant to Their Technological Performance. *International Dairy Journal*, 11; 621–647.
- Schleifer, K.H. and Kilpper-Balz, R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34 (1); 31– 34.
- Schleifer, K.H. 1987. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 46; 201-203.
- Schneitz, C., Nuotio, L. and Lounatma, K. 1993. Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). *Journal of Applied Bacteriology*, 74; 290–294.
- Schrezenmeir, J. and de Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics: Approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73; 361-364.
- Senok, A.C., Ismaeel, A.Y. and Botta, G.A. 2005. Probiotics: facts and myths. *Clinical of Microbiology and Infection*, 11; 958-966.
- Sessions, V.A., Lovegrove, J.A. and Taylor, G.R.J., 1997. The effect of a new fermented milk product on total plasma cholesterol, LDL-cholesterol and apolipoprotein B concentrations in middle-aged men and women. In: Sadler, M.J., Saltmarch, M. (Eds.), *Functional Foods: The Consumer, The Product, and The Evidence*. The Royal Society of Chemistry, London, United Kingdom, pp. 15–19.
- Shen, S., Samaranayake, L.P. and Yip, H.K. 2005. Coaggregation profiles of the microflora from root surface caries lesions. *Archives of Oral Biology*, 50; 23–32.
- Stiles, M.E. and Holzappel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36; 1-29.
- Sutherland, I.W. 1999. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides, *Carbohydrate Polymers*, 38; 319-328.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Vannamaker, L.V. 1976. Bacteriocin of gram Positive Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40; 721-756.
- Tannock, G.W. 1995. *Normal Microflora: An Introduction to Microbes Inhabiting the Human Body*. Chapman and Hall, London.
- Tannock, G. W. 1997. Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D. *Trends in Biotechnology*, 15 (7); 270-274.
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G. and Swings, J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 81; 1-10.
- Thanassi, D.G., Cheng, L.W. and Nikaido, H. 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179 (8); 2512-2518.

- Thirabunyanon, M., Boonprasom, P. and Niamsup, P. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnology Letters*, 31; 571–576.
- Thornton, G. M. 1996. Probiotic bacteria. Selection of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from the healthy human gastrointestinal tract: characterization of novel *Lactobacillus* derived antibacterial protein. PhD thesis, National University of Ireland.
- Todorov, S.D. and Dicks, L. M.T. 2005. Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. *Process Biochemistry*, 40; 365-370.
- Todorov, S.D., Nyati, H., Meincken, M. and Dicks, L.M.T. 2007. Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. *Food Control*, 18; 656-664.
- Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T. 2008. Evaluation of lactic acid bacteria from kefir, molasses and olive brine as possible probiotics based on physiological properties. *Annals of Microbiology*, 58 (4); 661-670.
- Todorov, S.T., von Mollendorff, J.W., Moelich, E., Muller, N., Witthuhn, R.C. and Dicks, L.M.T. 2009. Evaluation of Potential Probiotic Properties of *Enterococcus mundtii*, Its Survival in Boza and *in situ* Bacteriocin Production. *Food Technology and Biotechnology*, 47 (2); 178–191.
- Tuomola E.M. and Salminen S. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 41; 45-51.
- Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C. and Salminen, S.J. 1999. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26; 137-142.
- Twomey, D., Ross, R. P., Ryan, M., Meaney, B. and Hill, C. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. In: *Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications* (Sizezen, R.J., Kok, J., Abee, T. and Schaafsma, G. Eds.) pp. 165-185. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Umamoto, T., Yoshimura, F., Kureshiro, H., Hayashi, J., Noguchi, T. And Ogawa, T. 1999. Fimbria-mediated coaggregation between human oral anaerobes *Treponema medium* and *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Immunology*, 43; 837–845.
- Ünlütürk, A. ve Turantaş, F. 2003. *Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi. (Microbiological Quality Control)* 3 nd Edition. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, Bornova-İzmir, 606.
- van Belkum, M. J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I. F., Konings, W. N. and Abee, T. 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases the permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *Journal of Bacteriology*, 17; 37934 -37941.
- Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., Torriani, S., Bjorkroth, K.J., Franz, C.M., Foulquie Moreno, M.R., Revets, H., De Vuyst, L., Swings, J., Kersters, K., Dellaglio, F. and Holzapfel, W.H. 2002. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 68; 1381– 1391.

- Vandevoorde, L., Christiaens, H. and Verstraete, W. 1992. Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 72; 214–219.
- Vaughan, E.E., Mollet, B. and deVos, W.M. 1999. Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. *Current Opinion in Biotechnology*, 10; 605-610.
- Vinderola, C. G. and Reinheimer, J. A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative ‘*in vitro*’ study of probiotic characteristic and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36; 895-904.
- Wilkins, T. D., Holdeman, L. V., Abramson, I.J. and Moore, W.E.C. 1972. Standardized Single-Disc Method for Antibiotic Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 1(6); 451-459.
- Williams, G.M. and Wynder, E.L. 1996. Diet and cancer: A synopsis of causes and prevention strategies. In “Nutrition and Cancer Prevention,” ed. R.R. Watson and S.I. Mufti, pp. 1–23. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Wunderlich, P.F., Braun, L., Fumagalli, I., D’Apuzzo, V., Heim, F., Karly, M., Lodi, R., Politta, G., Vonbank, F. and Ja Zeltner, L. 1989. Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. *Journal of International Medical Research*, 17; 333–338.
- Yang, R. and Ray, B. 1992. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 11; 281-291.
- Yang, R., Johnson, M.C. and Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocin from lactic acid bacteria. *Applied of Environmental Microbiology*, 58; 3353-3359.
- Yoon, M.Y., Kim, Y.J. and Hwang, H.J. 2008. Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from *Chungkukjang*, a fermented soy product. *LWT-Food Science and Technology*, 41; 925-933.
- Young, R.J. and Huffman, S. 2003. Probiotic use in children. *Journal Pediatric Health Care*, 17 (6); 277-283.
- Zaslhoff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415 (6870); 389–395.
- Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K. and Gill, H.S. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 98; 211-217.
- Ziemer, C.J. and Gibson, G.R. 1998. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, 8 (5-6); 473-479.

EKLER

EK 1: BAKTERİ İZOLASYONUNDA ve GELİŞİMİNDE KULLANILAN BESİYERLERİ

EK 2: TAMPON ve ÇÖZELTİLER

EK 3: DNA ANALİZİNDE KULLANILAN MOLEKÜLER MARKÖRLER

EK 4: KİMYASALLAR

EK 5: KROMOZOMAL (GENOMİK) DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN PROMEGA WIZARD GENOMIC DNA ISOLATION KIT PROSPEKTÜSÜ

EK 6: İZOLATLARIN 16S rDNA DİZİ ANALİZİ VE BLAST SONUÇLARI

EK 7: ENTEROSİN GENİNİN DİZİ ANALİZİ VE BLAST SONUCU

EK 1: BAKTERİ İZOLASYONUNDA ve GELİŞİMLERİNDE KULLANILAN BESİYERLERİ

MRS BESİYERİ (52.2gr/l)

100 ml'de 5.2 gr hazır besiyeri içeriği çözülerek hazırlanmıştır. Katı besiyeri için % 1.5 agar ilave edilmiş ve sterilizasyon 118°C'de 15 dakika yapılmıştır.

İçerik	%g
Kazein pepton	10 g
Et ekstraktı	8 g
Maya ekstraktı	4 g
Glukoz	20 g
Dipotasyum hidrojenfosfat	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.2 g
Tween 80	1 ml
Triamonyum sitrat	2 g
Sodyum asetat	5 g

pH 5,7±0.02

TGE BESİYERİ (Trypton-glucose-yeast extract)

İçerik	%g
Trypton	1.0
Glukoz	1.0
Maya ekstratı	1.0
Tween 80	0.1
MgSO ₄	0.005
MnSO ₄	0.005

Bu içerikler 100 ml distile su içerisinde çözülür, pH 6.8'e ayarlanır. Katı besiyeri hazırlamak için üzerine % 1.5 agar eklenir. 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

LB BESİYERİ (Luria Bertani)

İçerik	%g
Trypton	1.0
Maya ekstratı	0.5
NaCl	1.0

Bu içerikler 100 ml distile su içerisinde çözülür, pH 7'ye ayarlanır. Katı besiyeri hazırlamak için üzerine % 1.5 agar eklenir. 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

TSB BESİYERİ

İçerik	%g
Kazein pepton	1.7
Soya pepton	0.3
NaCl	0.5
Glukoz	0.25
K ₂ HPO ₄	0.25

Sterilizasyondan önce pH 7.3 ±0.2'ye ayarlanarak 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

EK 2: TAMPON VE ÇÖZELTİLER

TBE TAMPONU (Tris-Borik asit-EDTA)1X

İçerik (pH: 8.3)	% g
Tris	10.8
Borik asit	5.5
EDTA (1M)	0.94
Distile su	1 lt
pH: 8.3	

YÜKLEME BOYASI

İçerik	% g
Bromofenol blue	0.25
Sakkaroz	40
Distile su	100 ml

Bu bileşenler 100 ml distile suda çözülerek 0.22 µm çapındaki Sartorius membran filtreden geçirilir ve + 4 °C’de saklanır.

ETİDYUM BROMİT ÇÖZELTİSİ

İçerik	% g
Etidyum bromit	1.0
Distile su	100 ml

Bu bileşenler 100 ml distile suda çözülerek 0.22 µm çapındaki Sartorius membran filtreden geçirilir ve + 4 °C’ de stok olarak koyu renk, ışık almayan bir şişede saklanır.

% 1' lik AGARUZ JEL

İçerik	% g
Agaroz	1.0
1 X TBE Tamponu	100 ml

Agaroz 1.0 gr tartılarak 100ml 1X TBE Tamponu eklenerek mikrodalga fırında yüksek ısıda yaklaşık 3 dakika eritilir ve homojen hale gelmesi sağlanır. Jel soğuduktan sonra jele 2 µl etidyum bromit solüsyonu eklenir.

% 1.5 'lik AGARUZ JEL (PCR ÜRÜNLERİ İÇİN)

İçerik	% g
Agaroz	1.5
1 X TBE Tamponu	100 ml

Agaroz 1.5 gr tartılarak 100ml 1X TBE Tamponu eklenerek mikrodalga fırında yüksek ısıda yaklaşık 3 dakika eritilir ve homojen hale gelmesi sağlanır. Jel soğuduktan sonra jele 4 µl etidyum bromit solüsyonu eklenir.

GRAM BOYAMADA KULLANILAN ÇÖZELTİLER VE İÇERİKLER

Kristal viyole stok çözeltisi

Kristal Violet	1 gr
Etanol	% 95
dH ₂ O	100 ml'ye tamamlanır

Bazik fuksin stok çözeltisi

Bazik Fuksin	3 gr
Etanol	% 95
dH ₂ O	100 ml'ye tamamlanır

İyot çözeltisi

İyot	1 gr
Potasyum İyodür	2 gr
Sodyum karbonat % 5	60 ml
dH ₂ O	140 ml

Tüm kimyasal malzemeler Merck, Darmstadt, Germany.

TRİSİN SDS-PAGE'DE KULLANILAN TAMPONLAR ve ÇÖZELTİLER

Akrilamid-Bisakrilamid Çözeltisi	% gr
Akrilamid	29.2
Bisakrilamid	0.8

Whatman kurutma kağıdından geçirildikten sonra karanlık bir şişeye alınır ve + 4°C'de saklanır.

SDS Çözeltisi	% gr
SDS	10

10 gr tartılır, 100 ml'de çözülür.

Toplayıcı jel Tamponu (0.5 M, ph 6.8)	% gr
0.5 M Trizma Base	6.05
SDS	0.4

Ayırıcı jel Tamponu (1.5 M, ph 8.8)	% gr
1.5 M Trizma Base	18.17
SDS	0.1

Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi	gr/ml
Amonyum Persülfat	0.1

0.1 gr tartılıp 1 ml distile suda çözülür. Günlük hazırlanmalıdır.

Elektrot Tamponu

Tris	1.65 gr
Gisin	8 gr
SDS	1.4 gr

dH₂O 1100 ml

Ayırıcı Jel (Resolving jel)

dH₂O 3.30 ml

Akril-Bisakrilamit 4.0 ml

1.5 M Tris (PH 8.8) 2.5 ml

% 10 SDS 100 µl

% 10 Amonyum persülfat 100 µl

TEMED 5.5 µl

Toplayıcı Jel (Stacking jel)

dH₂O 3.4 ml

Akril-Bisakrilamit 830 µl

0.5 M Tris (PH 6.8) 630 µl

% 10 SDS 50 µl

% 10 Amonyum persülfat 50 µl

TEMED 5.5 µl

Coomasie brilliant blue boya çözeltisi

Coomasie brilliant blue R 250 1 gr

Metanol 400 ml

Glasiyal asetik asit 100 ml

dH₂O 500 ml

Boya geri alma çözeltisi

Metanol 400 ml

Glasiyal asetik asit 100 ml

dH₂O 500 ml

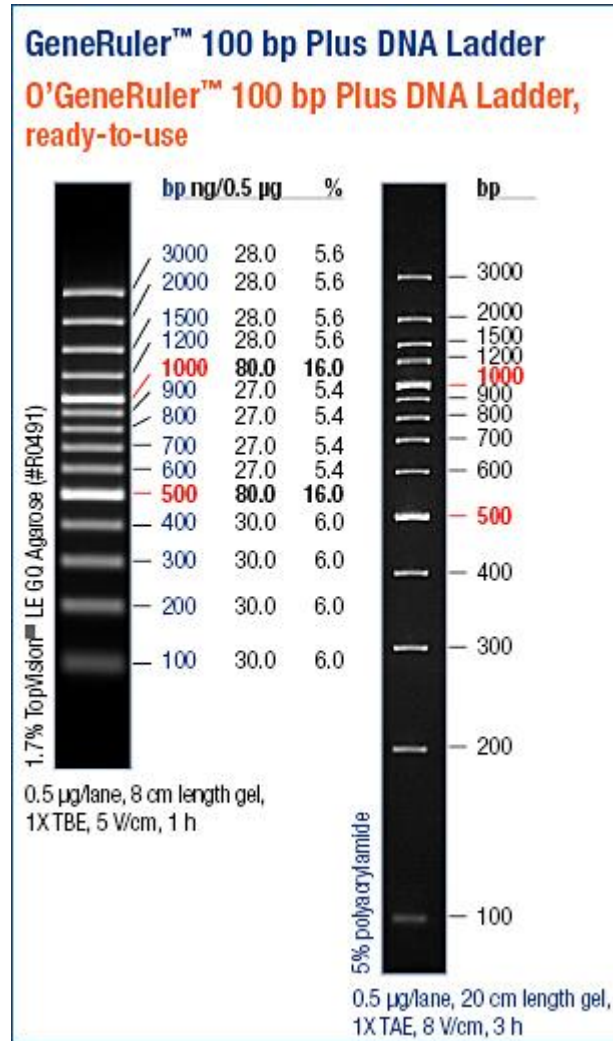
Jel Fiksasyon Çözeltisi

Glasiyal asetik asit 70 ml

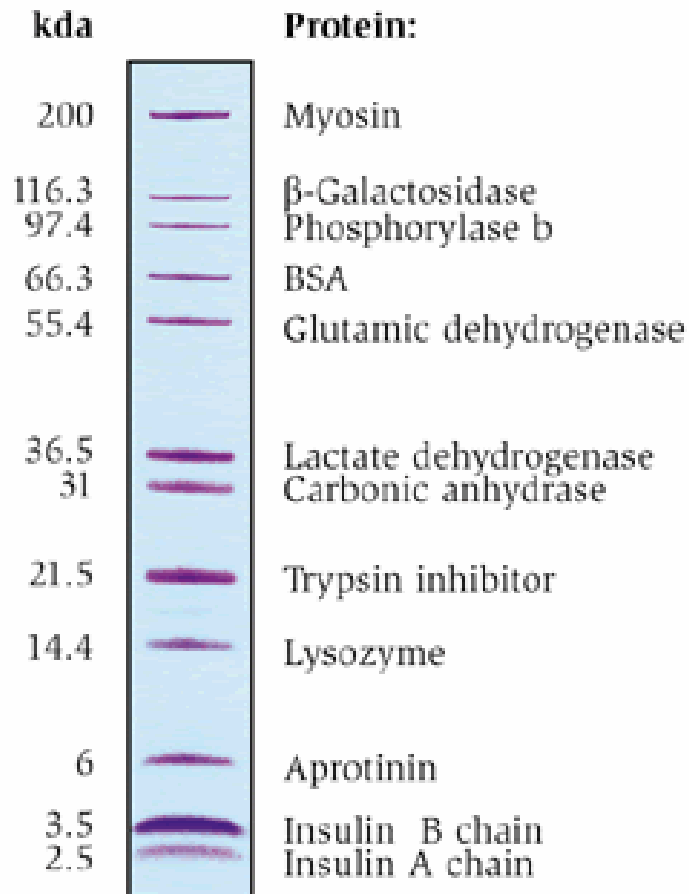
dH₂O 930 ml

EK 3: DNA ANALİZİNDE KULLANILAN MOLEKÜLER MARKÖRLER

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (FERMENTAS)



Novex Mark 12 Protein Markörü



EK 4 KİMYASALLAR

Kimyasal Adı	Marka
Agaroz	SIGMA
Borik Asit	MERCK
Bromofenol Blue	MERCK
EDTA	MERCK
Etidyum Bromit	SIGMA
Glukoz	SIGMA
MRS Besiyeri	LAB M
Maya Ekstraktı	OXOID
MgSO ₄	MERCK
MnSO ₄	MERCK
Supercoiled DNA Ladder	SIGMA
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	PROMEGA
Tripton	OXOID
Tris	SIGMA
Tween 80	MERCK
100bp DNA Ladder	FERMENTAS

EK 5 KROMOZOMAL (GENOMİK) DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN PROMEGA WIZARD GENOMIC DNA ISOLATION KIT PROSPEKTÜSÜ



III.G. Isolating Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Materials to Be Supplied by the User

- 1.5ml microcentrifuge tubes
- water bath, 80°C
- water bath, 37°C
- isopropanol, room temperature
- 70% ethanol, room temperature
- water bath, 65°C (optional; for rapid DNA rehydration)
- 50mM EDTA (pH 8.0) (for gram positive bacteria)
- 10mg/ml lysozyme (Sigma Cat.# L7651) (for gram positive bacteria)
- 10mg/ml lysostaphin (Sigma Cat.# L7386) (for gram positive bacteria)

1. Add 1ml of an overnight culture to a 1.5ml microcentrifuge tube.
2. Centrifuge at 13,000-16,000 × g for 2 minutes to pellet the cells. Remove the supernatant. For Gram Positive Bacteria, proceed to Step 3. **For Gram Negative Bacteria go directly to Step 6.**
3. Resuspend the cells thoroughly in 480µl of 50mM EDTA.
4. Add the appropriate lytic enzyme(s) to the resuspended cell pellet in a total volume of 120µl (see note in the margin), and gently pipet to mix. The purpose of this pretreatment is to weaken the cell wall so that efficient cell lysis can take place.

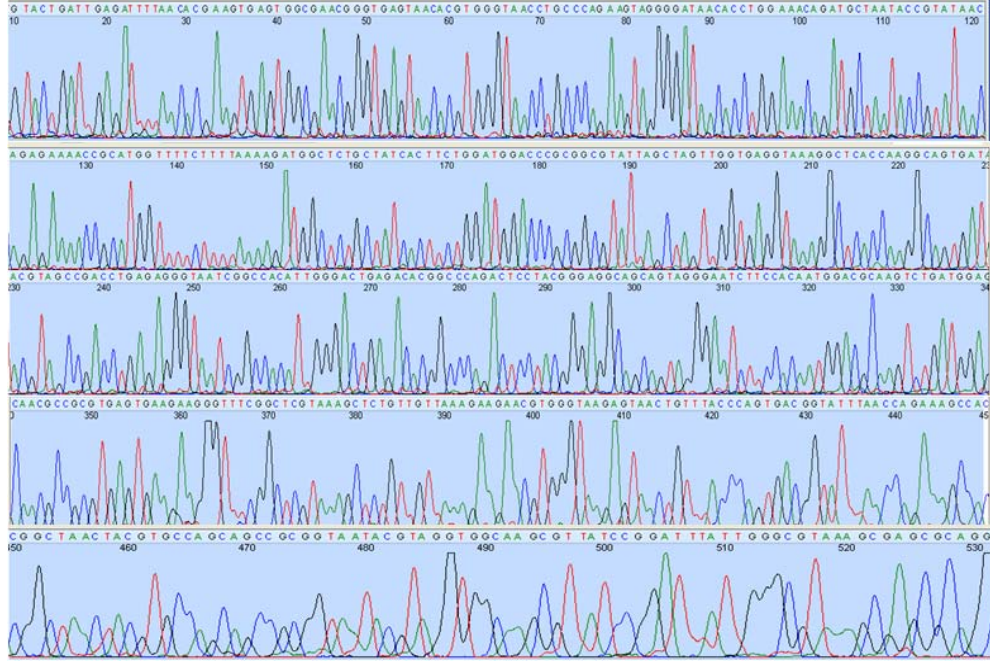
Note: For certain *Staphylococcus* species, a mixture of 60µl of 10mg/ml lysozyme and 60µl of 10mg/ml lysostaphin is required for efficient lysis. However, many Gram Positive Bacterial Strains (e.g., *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia otitidiscaviarum*, *Rhodococcus rhodochrous*, and *Brevibacterium albidium*) lyse efficiently using lysozyme alone.

5. Incubate the sample at 37°C for 30-60 minutes. Centrifuge for 2 minutes at 13,000-16,000 × g and remove the supernatant.
6. Add 600µl of Nuclei Lysis Solution. Gently pipet until the cells are resuspended.
7. Incubate at 80°C for 5 minutes to lyse the cells; then cool to room temperature.
8. Add 3µl of RNase Solution to the cell lysate. Invert the tube 2-5 times to mix.
9. Incubate at 37°C for 15-60 minutes. Cool the sample to room temperature.
10. Add 200µl of Protein Precipitation Solution to the RNase-treated cell lysate. Vortex vigorously at high speed for 20 seconds to mix the Protein Precipitation Solution with the cell lysate.
11. Incubate the sample on ice for 5 minutes.
12. Centrifuge at 13,000-16,000 × g for 3 minutes.

13. Transfer the supernatant containing the DNA to a clean 1.5ml microcentrifuge tube containing 600 μ l of room temperature isopropanol.
Note: Some supernatant may remain in the original tube containing the protein pellet. Leave this residual liquid in the tube to avoid contaminating the DNA solution with the precipitated protein.
14. Gently mix by inversion until the thread-like strands of DNA form a visible mass.
15. Centrifuge at 13,000-16,000 $\times g$ for 2 minutes.
16. Carefully pour off the supernatant and drain the tube on clean absorbent paper. Add 600 μ l of room temperature 70% ethanol and gently invert the tube several times to wash the DNA pellet.
17. Centrifuge at 13,000-16,000 $\times g$ for 2 minutes. Carefully aspirate the ethanol.
18. Drain the tube on clean absorbent paper and allow the pellet to air-dry for 10-15 minutes.
19. Add 100 μ l of DNA Rehydration Solution to the tube and rehydrate the DNA by incubating at 65°C for 1 hour. Periodically mix the solution by gently tapping the tube. Alternatively, rehydrate the DNA by incubating the solution overnight at room temperature or at 4°C.
20. Store the DNA at 2-8°C.

EK 6 İZOLATLARIN 16S rDNA DİZİ ANALİZİ VE BLAST SONUÇLARI

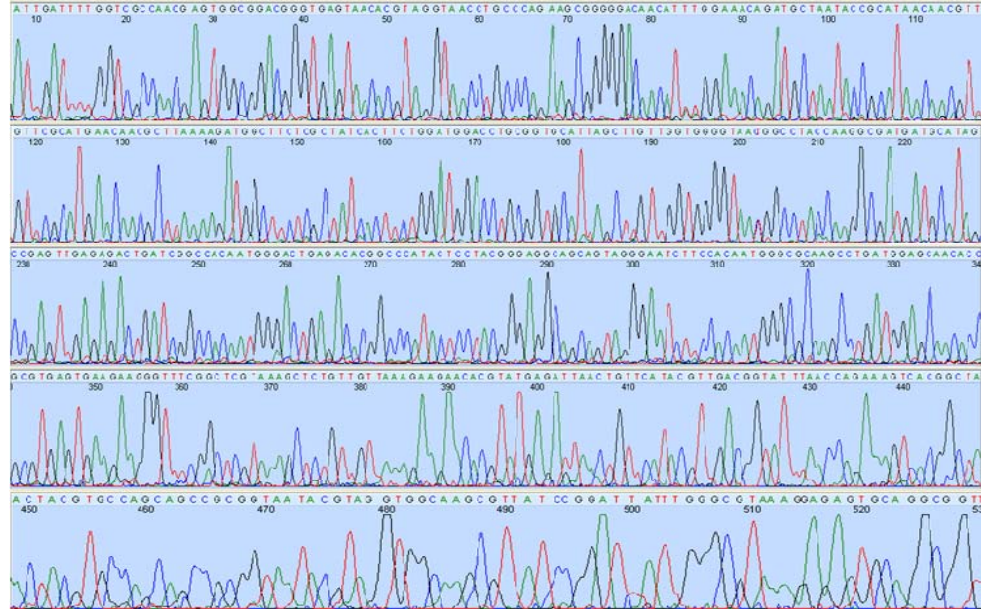
1. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU Accession Number JN243998



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ615680.1	Pediococcus pentosaceus strain B1 16S ribosomal RNA gene, partial se	979	979	100%	0.0	100%	
HQ589248.1	Pediococcus pentosaceus strain Z1 16S ribosomal RNA gene, partial se	979	979	100%	0.0	100%	
HQ834496.1	Pediococcus pentosaceus strain SC1 16S ribosomal RNA gene, partial :	979	979	100%	0.0	100%	
HQ286591.1	Pediococcus pentosaceus strain PP 16S ribosomal RNA gene, partial se	979	979	100%	0.0	100%	
FR717465.1	Pediococcus pentosaceus partial 16S rRNA gene, strain LB-25	979	979	100%	0.0	100%	
FR717460.1	Pediococcus pentosaceus partial 16S rRNA gene, strain LB-12	979	979	100%	0.0	100%	
HQ141912.1	Uncultured <i>Pediococcus</i> sp. clone LAB 6 16S ribosomal RNA gene, part	979	979	100%	0.0	100%	
HM536141.1	Pediococcus pentosaceus strain B22 16S ribosomal RNA gene, partial :	979	979	100%	0.0	100%	
HM462429.1	Pediococcus pentosaceus strain Chr-I-str16 16S ribosomal RNA gene,	979	979	100%	0.0	100%	
HM044322.1	Pediococcus sp. GS4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	979	979	100%	0.0	100%	
AB494722.1	Pediococcus pentosaceus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequenc	979	979	100%	0.0	100%	
AB550295.1	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, isolate:	979	979	100%	0.0	100%	
AB550294.1	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, isolate:	979	979	100%	0.0	100%	
GU369798.1	Pediococcus pentosaceus strain JS-8-1 16S ribosomal RNA gene, parti	979	979	100%	0.0	100%	
AB481102.1	Pediococcus pentosaceus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequenc	979	979	100%	0.0	100%	
GQ076332.1	Uncultured bacterium clone nbw363q07c1 16S ribosomal RNA gene, pa	979	979	100%	0.0	100%	
GQ073616.1	Uncultured bacterium clone nbw210q08c1 16S ribosomal RNA gene, pa	979	979	100%	0.0	100%	
GQ072129.1	Uncultured bacterium clone nbw192e10c1 16S ribosomal RNA gene, pa	979	979	100%	0.0	100%	
GQ072023.1	Uncultured bacterium clone nbw191c02c1 16S ribosomal RNA gene, pa	979	979	100%	0.0	100%	
GQ071985.1	Uncultured bacterium clone nbw190q06c1 16S ribosomal RNA gene, pa	979	979	100%	0.0	100%	
FJ892738.1	<i>Pediococcus</i> sp. S18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	979	979	100%	0.0	100%	
FJ892737.1	<i>Pediococcus</i> sp. S17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	979	979	100%	0.0	100%	
FJ539347.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain YTX21BMX 16S ribosomal RNA gene, i	979	979	100%	0.0	100%	
FJ538575.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain YTX36BMX 16S ribosomal RNA gene, i	979	979	100%	0.0	100%	
FJ538572.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain YTX26BMX 16S ribosomal RNA gene, i	979	979	100%	0.0	100%	

2. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

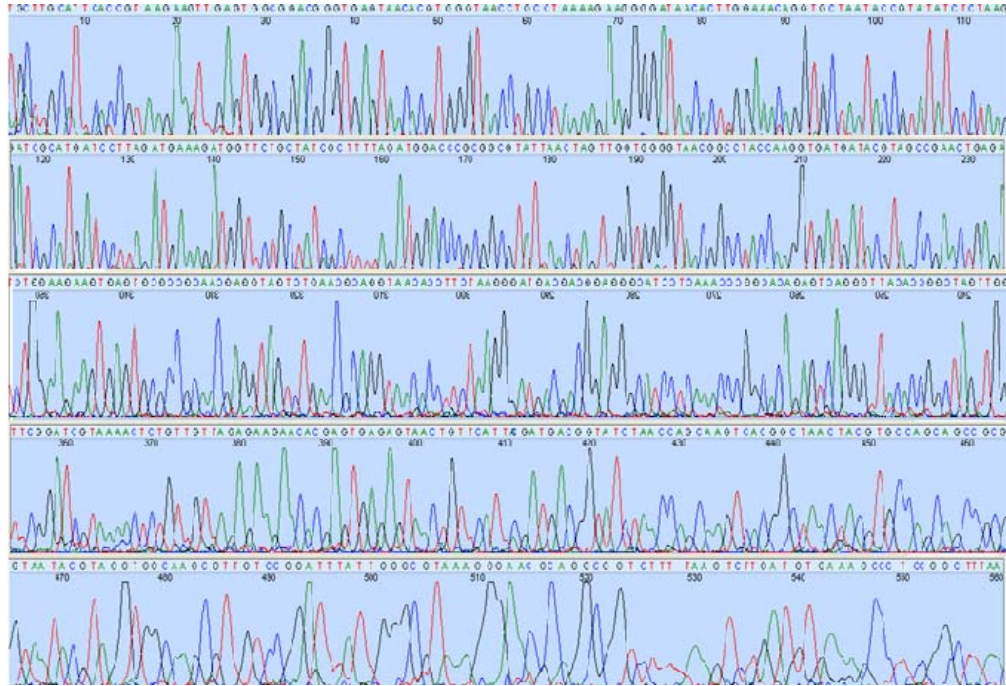
Accession Number JN244739



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
EU886727.1	Lactobacillus fermentum strain PN-1 16S ribosomal RNA gene, partial s	941	941	100%	0.0	99%	
AP008937.1	Lactobacillus fermentum IFO 3956 DNA, complete genome	941	4666	100%	0.0	99%	
GQ141827.1	Lactobacillus fermentum strain Kx364#A1 16S ribosomal RNA gene, pa	937	937	100%	0.0	99%	
GQ141805.1	Lactobacillus fermentum strain Kx364A1 16S ribosomal RNA gene, par	937	937	100%	0.0	99%	
JF903803.1	Lactobacillus fermentum strain 48705 16S ribosomal RNA gene, partial	935	935	100%	0.0	99%	
HQ61566.1	Lactobacillus fermentum strain C1 16S ribosomal RNA gene, partial sec	935	935	100%	0.0	99%	
JF719998.1	Lactobacillus fermentum strain VL2 16S ribosomal RNA gene, partial se	935	935	100%	0.0	99%	
HQ423153.1	Lactobacillus fermentum strain M1-16 16S ribosomal RNA gene, partial	935	935	100%	0.0	99%	
JF728268.1	Lactobacillus fermentum strain GIMC16:TVS-2 16S ribosomal RNA gene	935	935	100%	0.0	99%	
JF414110.1	Lactobacillus fermentum strain HT4 16S ribosomal RNA gene, partial se	935	935	100%	0.0	99%	
JF414109.1	Lactobacillus fermentum strain HT3 16S ribosomal RNA gene, partial se	935	935	100%	0.0	99%	
HM036120.1	Lactobacillus fermentum strain F1 16S ribosomal RNA gene, partial seq	935	935	100%	0.0	99%	
JF268322.1	Lactobacillus fermentum strain 10-35B 16S ribosomal RNA gene, parti	935	935	100%	0.0	99%	
HQ449670.1	Lactobacillus fermentum strain UN01 16S ribosomal RNA gene, partial :	935	935	100%	0.0	99%	
HQ677597.1	Lactobacillus fermentum strain AdF7 16S ribosomal RNA gene, partial s	935	935	100%	0.0	99%	
HQ650232.1	Lactobacillus fermentum strain KN02 16S ribosomal RNA gene, partial :	935	935	100%	0.0	99%	
HM989920.1	Lactobacillus fermentum strain FBT-1 16S ribosomal RNA gene, partial	935	935	100%	0.0	99%	
HQ293047.2	Lactobacillus fermentum strain NWL24 16S ribosomal RNA gene, partie	935	935	100%	0.0	99%	
HQ293040.2	Lactobacillus fermentum strain NWL17 16S ribosomal RNA gene, partie	935	935	100%	0.0	99%	
HQ293049.1	Lactobacillus fermentum strain NWL26 16S ribosomal RNA gene, partie	935	935	100%	0.0	99%	
HQ293037.1	Lactobacillus fermentum strain NWP14 16S ribosomal RNA gene, partie	935	935	100%	0.0	99%	
HM218438.1	Lactobacillus fermentum strain NM103-3 16S ribosomal RNA gene, par	935	935	100%	0.0	99%	
HM218434.1	Lactobacillus fermentum strain NM102-6 16S ribosomal RNA gene, par	935	935	100%	0.0	99%	
HM217971.1	Lactobacillus fermentum strain S1-3 16S ribosomal RNA gene, partial s	935	935	100%	0.0	99%	
FR667196.1	Lactobacillus fermentum partial 16S rRNA gene, strain K8-Lb3	935	935	100%	0.0	99%	
FR667192.1	Lactobacillus fermentum partial 16S rRNA gene, strain K5-Lb1	935	935	100%	0.0	99%	

3. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

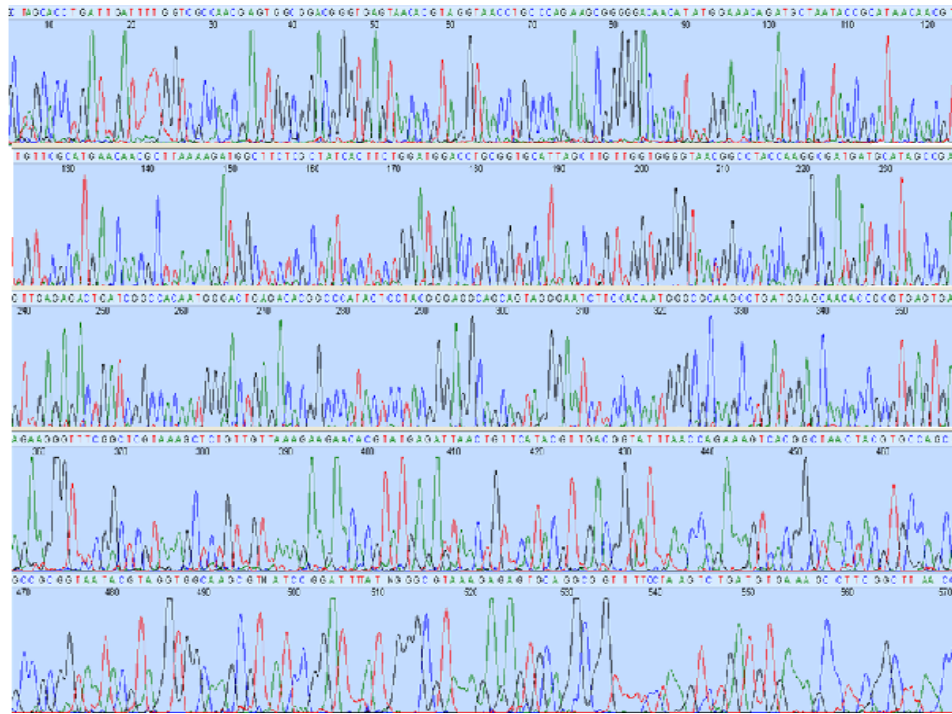
Accession Number JN244740



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ615668.1	Lactobacillus salivarius strain CHS1E 16S ribosomal RNA gene, partial s	990	990	100%	0.0	99%	
JF803559.1	Lactobacillus salivarius strain C1170B 16S ribosomal RNA gene, partial	990	990	100%	0.0	99%	
JF268324.1	Lactobacillus salivarius strain 2-23A 16S ribosomal RNA gene, partial s	990	990	100%	0.0	99%	
HQ701584.1	Uncultured bacterium clone 3sto2 16S ribosomal RNA gene, partial seq	990	990	100%	0.0	99%	
FJ508370.1	Uncultured bacterium clone 16slp83-10f06.w2k 16S ribosomal RNA ge	990	990	100%	0.0	99%	
FJ508369.1	Uncultured bacterium clone 16slp83-13a11.w2k 16S ribosomal RNA qe	990	990	100%	0.0	99%	
FJ508368.1	Uncultured bacterium clone 16slp83-12q01.w2k 16S ribosomal RNA qe	990	990	100%	0.0	99%	
GU171077.1	Uncultured bacterium clone E1Day21bio1cold 16S ribosomal RNA gene	990	990	100%	0.0	99%	
GU171045.1	Uncultured bacterium clone A4day21controlcold 16S ribosomal RNA qe	990	990	100%	0.0	99%	
HQ293061.1	Lactobacillus salivarius strain NWL38 16S ribosomal RNA gene, partial :	990	990	100%	0.0	99%	
HQ293057.1	Lactobacillus salivarius strain NWL34 16S ribosomal RNA gene, partial :	990	990	100%	0.0	99%	
HQ293056.1	Lactobacillus salivarius strain NWL33 16S ribosomal RNA gene, partial :	990	990	100%	0.0	99%	
HQ293054.1	Lactobacillus salivarius strain NWL31 16S ribosomal RNA gene, partial :	990	990	100%	0.0	99%	
CP002034.1	Lactobacillus salivarius CECT 5713, complete genome	990	6906	100%	0.0	99%	
AB425928.1	Lactobacillus salivarius gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, :	990	990	100%	0.0	99%	
AB425910.1	Lactobacillus salivarius gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, :	990	990	100%	0.0	99%	
FJ751787.1	Lactobacillus salivarius strain DSPV 344T 16S ribosomal RNA gene, par	990	990	100%	0.0	99%	
FJ751785.1	Lactobacillus salivarius strain DSPV 340T 16S ribosomal RNA gene, par	990	990	100%	0.0	99%	
FJ751784.1	Lactobacillus salivarius strain DSPV 333T 16S ribosomal RNA gene, par	990	990	100%	0.0	99%	
FJ751783.1	Lactobacillus salivarius strain DSPV 329T 16S ribosomal RNA gene, par	990	990	100%	0.0	99%	
FJ751782.1	Lactobacillus salivarius strain DSPV 327T 16S ribosomal RNA gene, par	990	990	100%	0.0	99%	
FJ751780.1	Lactobacillus salivarius strain 324T 16S ribosomal RNA gene, partial se	990	990	100%	0.0	99%	
FJ751779.1	Lactobacillus salivarius strain DSPV 322T 16S ribosomal RNA gene, par	990	990	100%	0.0	99%	
GQ303717.1	Lactobacillus salivarius strain LB1 16S ribosomal RNA gene, partial seq	990	990	100%	0.0	99%	
GQ175447.1	Uncultured bacterium clone cc 126 16S ribosomal RNA (rrs) gene. par	990	990	100%	0.0	99%	

4. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

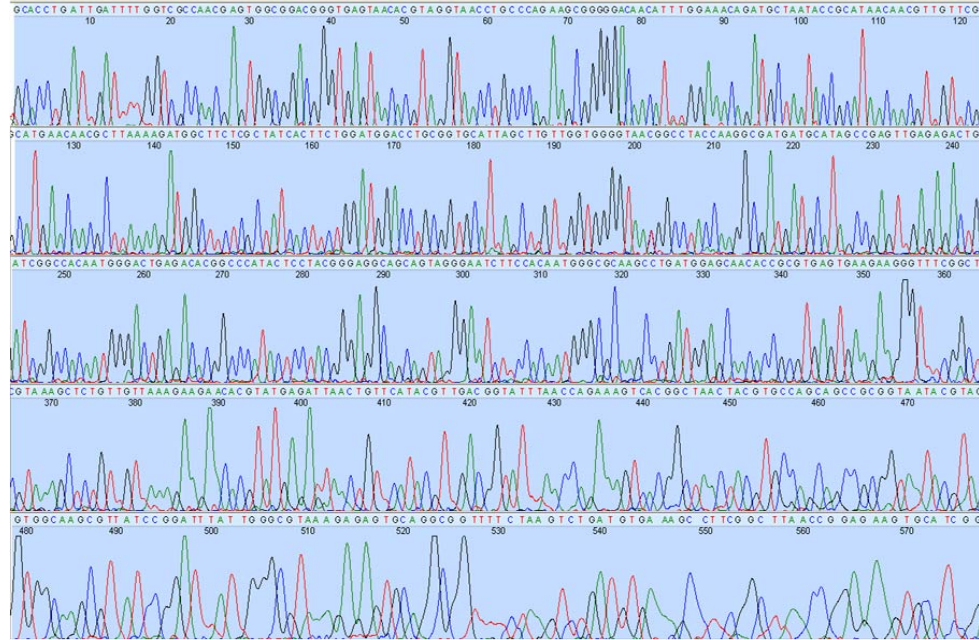
Accession Number JN244741



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AP008937.1	Lactobacillus fermentum IFO 3956 DNA, complete genome	1062	5264	99%	0.0	99%	
GQ141827.1	Lactobacillus fermentum strain Kx364#A1 16S ribosomal RNA gene, partial	1059	1059	99%	0.0	98%	
GQ141805.1	Lactobacillus fermentum strain Kx364A1 16S ribosomal RNA gene, partial	1059	1059	99%	0.0	98%	
JF719998.1	Lactobacillus fermentum strain VL2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1057	1057	99%	0.0	98%	
HQ423153.1	Lactobacillus fermentum strain M1-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1057	1057	99%	0.0	98%	
JF268322.1	Lactobacillus fermentum strain 10-35B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1057	1057	99%	0.0	98%	
HQ449670.1	Lactobacillus fermentum strain UN01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1057	1057	99%	0.0	98%	
HQ677597.1	Lactobacillus fermentum strain AdF7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1057	1057	99%	0.0	98%	
HQ650232.1	Lactobacillus fermentum strain KN02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1057	1057	99%	0.0	98%	
HM989920.1	Lactobacillus fermentum strain FBT-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1057	1057	99%	0.0	98%	
HQ293047.2	Lactobacillus fermentum strain NWL24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1057	1057	99%	0.0	98%	
HM218438.1	Lactobacillus fermentum strain NM103-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1057	1057	99%	0.0	98%	
HM217971.1	Lactobacillus fermentum strain S1-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1057	1057	99%	0.0	98%	
FR667196.1	Lactobacillus fermentum partial 16S rRNA gene, strain K8-Lb3	1057	1057	99%	0.0	98%	
HQ111081.1	Lactobacillus fermentum strain NWS14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1057	1057	99%	0.0	98%	
HQ111080.1	Lactobacillus fermentum strain NWS11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1057	1057	99%	0.0	98%	
HM462428.1	Lactobacillus fermentum strain ChPR-II-str59 16S ribosomal RNA gene	1057	1057	99%	0.0	98%	
CP002033.1	Lactobacillus fermentum CECT 5716, complete genome	1057	5275	99%	0.0	98%	
HM058978.1	Lactobacillus fermentum culture-collection IMAU:80814 16S ribosomal RNA gene	1057	1057	99%	0.0	98%	
HM058946.1	Lactobacillus fermentum culture-collection IMAU:80780 16S ribosomal RNA gene	1057	1057	99%	0.0	98%	
HM058945.1	Lactobacillus fermentum culture-collection IMAU:80778 16S ribosomal RNA gene	1057	1057	99%	0.0	98%	
HM058912.1	Lactococcus raffinolactis culture-collection IMAU:80740 16S ribosomal RNA gene	1057	1057	99%	0.0	98%	
HM058792.1	Lactobacillus fermentum culture-collection IMAU:80601 16S ribosomal RNA gene	1057	1057	99%	0.0	98%	

5. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

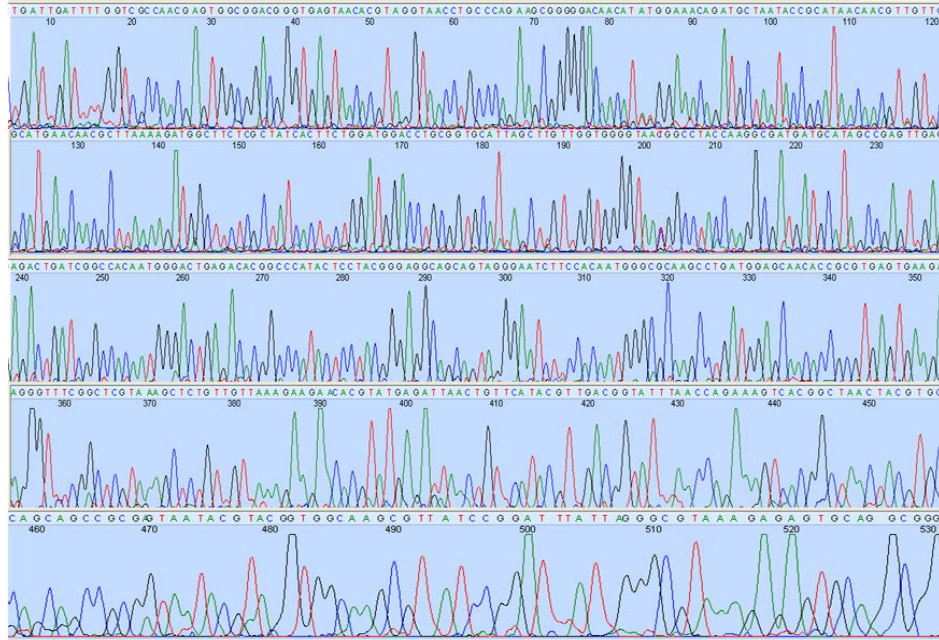
Accession Number JN244742



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AP008937.1	Lactobacillus fermentum IFO 3956 DNA, complete genome	961	4757	100%	0.0	100%	
GQ141827.1	Lactobacillus fermentum strain Kx364#A1 16S ribosomal RNA gene, par	957	957	100%	0.0	99%	
GQ141805.1	Lactobacillus fermentum strain Kx364A1 16S ribosomal RNA gene, par	957	957	100%	0.0	99%	
HQ615664.1	Lactobacillus fermentum strain C1 16S ribosomal RNA gene, partial seq	955	955	100%	0.0	99%	
JF719998.1	Lactobacillus fermentum strain VL2 16S ribosomal RNA gene, partial seq	955	955	100%	0.0	99%	
HQ423153.1	Lactobacillus fermentum strain M1-16 16S ribosomal RNA gene, partial seq	955	955	100%	0.0	99%	
JF268322.1	Lactobacillus fermentum strain 10-35B 16S ribosomal RNA gene, partial seq	955	955	100%	0.0	99%	
HQ449670.1	Lactobacillus fermentum strain UN01 16S ribosomal RNA gene, partial seq	955	955	100%	0.0	99%	
HQ677597.1	Lactobacillus fermentum strain AdF7 16S ribosomal RNA gene, partial seq	955	955	100%	0.0	99%	
HQ650232.1	Lactobacillus fermentum strain KN02 16S ribosomal RNA gene, partial seq	955	955	100%	0.0	99%	
HM989920.1	Lactobacillus fermentum strain FBT-1 16S ribosomal RNA gene, partial seq	955	955	100%	0.0	99%	
HQ293047.2	Lactobacillus fermentum strain NWL24 16S ribosomal RNA gene, partial seq	955	955	100%	0.0	99%	
HM218438.1	Lactobacillus fermentum strain NM103-3 16S ribosomal RNA gene, partial seq	955	955	100%	0.0	99%	
HM217971.1	Lactobacillus fermentum strain S1-3 16S ribosomal RNA gene, partial seq	955	955	100%	0.0	99%	
FR667196.1	Lactobacillus fermentum partial 16S rRNA gene, strain K8-Lb3	955	955	100%	0.0	99%	
HQ111081.1	Lactobacillus fermentum strain NWS14 16S ribosomal RNA gene, partial seq	955	955	100%	0.0	99%	
HQ111080.1	Lactobacillus fermentum strain NWS11 16S ribosomal RNA gene, partial seq	955	955	100%	0.0	99%	
HQ008218.1	Lactobacillus fermentum strain RD3 16S ribosomal RNA gene, partial seq	955	955	100%	0.0	99%	
HM462428.1	Lactobacillus fermentum strain ChPR-II-str59 16S ribosomal RNA gene	955	955	100%	0.0	99%	
CP002033.1	Lactobacillus fermentum CECT 5716, complete genome	955	4768	100%	0.0	99%	
HM058978.1	Lactobacillus fermentum culture-collection IMAU:80814 16S ribosomal RNA gene	955	955	100%	0.0	99%	
HM058946.1	Lactobacillus fermentum culture-collection IMAU:80780 16S ribosomal RNA gene	955	955	100%	0.0	99%	
HM058945.1	Lactobacillus fermentum culture-collection IMAU:80778 16S ribosomal RNA gene	955	955	100%	0.0	99%	
HM058912.1	Lactococcus raffinolactis culture-collection IMAU:80740 16S ribosomal RNA gene	955	955	100%	0.0	99%	
HM058792.1	Lactobacillus fermentum culture-collection IMAU:80601 16S ribosomal RNA gene	955	955	100%	0.0	99%	
HM058765.1	Lactobacillus fermentum culture-collection IMAU:80571 16S ribosomal RNA gene	955	955	100%	0.0	99%	

6. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

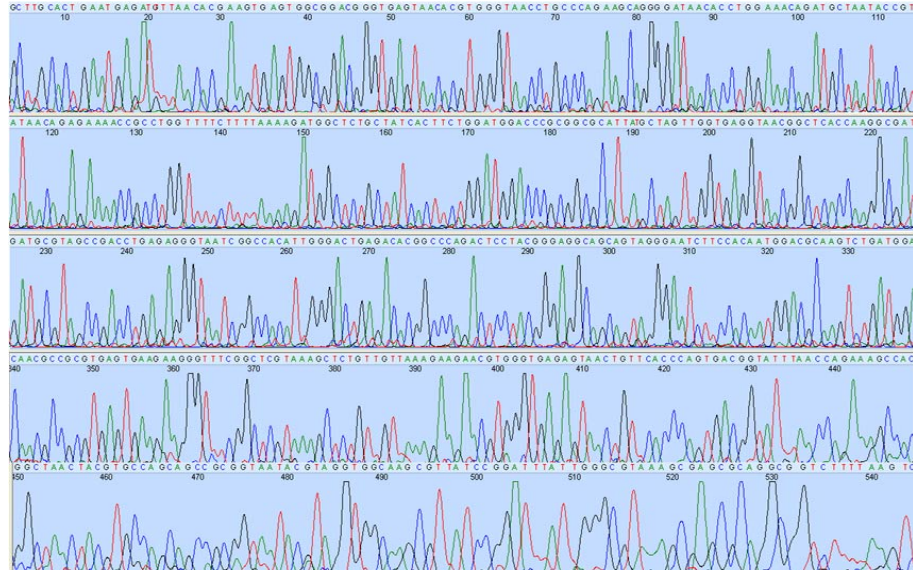
Accession Number JN244743



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AP008937.1	Lactobacillus fermentum IFO 3956 DNA, complete genome	937	4648	99%	0.0	99%	
GQ141827.1	Lactobacillus fermentum strain Kx364#A1 16S ribosomal RNA gene, par	933	933	99%	0.0	98%	
GQ141805.1	Lactobacillus fermentum strain Kx364#A1 16S ribosomal RNA gene, par	933	933	99%	0.0	98%	
JF903803.1	Lactobacillus fermentum strain 48705 16S ribosomal RNA gene, partial	931	931	99%	0.0	98%	
HQ615664.1	Lactobacillus fermentum strain C1 16S ribosomal RNA gene, partial sec	931	931	99%	0.0	98%	
JF719998.1	Lactobacillus fermentum strain VL2 16S ribosomal RNA gene, partial se	931	931	99%	0.0	98%	
HQ423153.1	Lactobacillus fermentum strain M1-16 16S ribosomal RNA gene, partial	931	931	99%	0.0	98%	
JF728268.1	Lactobacillus fermentum strain GIMC16:TVS-2 16S ribosomal RNA gen	931	931	99%	0.0	98%	
JF414110.1	Lactobacillus fermentum strain HT4 16S ribosomal RNA gene, partial se	931	931	99%	0.0	98%	
JF414109.1	Lactobacillus fermentum strain HT3 16S ribosomal RNA gene, partial se	931	931	99%	0.0	98%	
HM036120.1	Lactobacillus fermentum strain F1 16S ribosomal RNA gene, partial seq	931	931	99%	0.0	98%	
JF288322.1	Lactobacillus fermentum strain 10-35B 16S ribosomal RNA gene, partik	931	931	99%	0.0	98%	
HQ449670.1	Lactobacillus fermentum strain UN01 16S ribosomal RNA gene, partial :	931	931	99%	0.0	98%	
HQ677597.1	Lactobacillus fermentum strain AdF7 16S ribosomal RNA gene, partial :	931	931	99%	0.0	98%	
HQ650232.1	Lactobacillus fermentum strain KN02 16S ribosomal RNA gene, partial :	931	931	99%	0.0	98%	
HM989920.1	Lactobacillus fermentum strain FBT-1 16S ribosomal RNA gene, partial	931	931	99%	0.0	98%	
HQ293047.2	Lactobacillus fermentum strain NWL24 16S ribosomal RNA gene, partie	931	931	99%	0.0	98%	
HQ293040.2	Lactobacillus fermentum strain NWL17 16S ribosomal RNA gene, partie	931	931	99%	0.0	98%	
HQ293049.1	Lactobacillus fermentum strain NWL26 16S ribosomal RNA gene, partie	931	931	99%	0.0	98%	
HQ293037.1	Lactobacillus fermentum strain NWP14 16S ribosomal RNA gene, partie	931	931	99%	0.0	98%	
HM218438.1	Lactobacillus fermentum strain NM103-3 16S ribosomal RNA gene, par	931	931	99%	0.0	98%	
HM218434.1	Lactobacillus fermentum strain NM102-6 16S ribosomal RNA gene, par	931	931	99%	0.0	98%	
HM217971.1	Lactobacillus fermentum strain S1-3 16S ribosomal RNA gene, partial s	931	931	99%	0.0	98%	

7. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

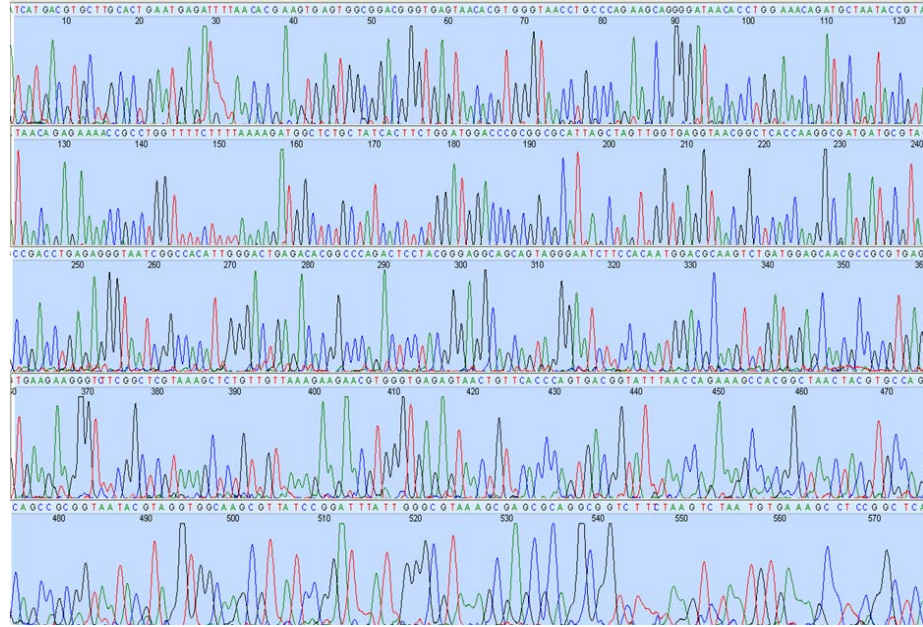
Accession Number JN244744



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ603181.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain MW2 16S ribosomal RNA gene, partial se	972	972	100%	0.0	99%	
HQ603179.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain FJ4 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	972	972	100%	0.0	99%	
JF733794.1	Bacterium 2/2/3/4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	972	972	100%	0.0	99%	
HQ288527.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain B3 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	972	972	100%	0.0	99%	
JF268323.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain 0-4A 16S ribosomal RNA gene, partial se	972	972	100%	0.0	99%	
FR693801.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> partial 16S rRNA gene, isolate LB1	972	972	100%	0.0	99%	
HQ315859.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain MS200 16S ribosomal RNA gene, partial s	972	972	100%	0.0	99%	
HQ315858.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain MS198 16S ribosomal RNA gene, partial s	972	972	100%	0.0	99%	
HQ184064.1	Uncultured <i>Pediococcus</i> sp. clone LAB 51 16S ribosomal RNA gene, pai	972	972	100%	0.0	99%	
HQ185406.1	Uncultured <i>Pediococcus</i> sp. clone LAB 33 16S ribosomal RNA gene, pai	972	972	100%	0.0	99%	
HM076835.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_94 16S ribosomal R	972	972	100%	0.0	99%	
HM076781.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_29 16S ribosomal R	972	972	100%	0.0	99%	
HM101329.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain LBRH025 16S ribosomal RNA gene, part	972	972	100%	0.0	99%	
GU904688.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain L169 16S ribosomal RNA gene, partial sei	972	972	100%	0.0	99%	
GU904684.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain L94 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	972	972	100%	0.0	99%	
GU369791.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain JS-9-5 16S ribosomal RNA gene, partial s	972	972	100%	0.0	99%	
GU369790.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain JS-9-4 16S ribosomal RNA gene, partial s	972	972	100%	0.0	99%	
GU369789.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain JS-9-3 16S ribosomal RNA gene, partial s	972	972	100%	0.0	99%	
GU369788.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain JS-9-1 16S ribosomal RNA gene, partial s	972	972	100%	0.0	99%	
FJ751795.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain DSPV 358T 16S ribosomal RNA gene, par	972	972	100%	0.0	99%	
FJ751789.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain DSPV 348T 16S ribosomal RNA gene, par	972	972	100%	0.0	99%	
GQ421480.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain GL20 16S ribosomal RNA gene, partial se	972	972	100%	0.0	99%	
GQ421479.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain GL16 16S ribosomal RNA gene, partial se	972	972	100%	0.0	99%	

8. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

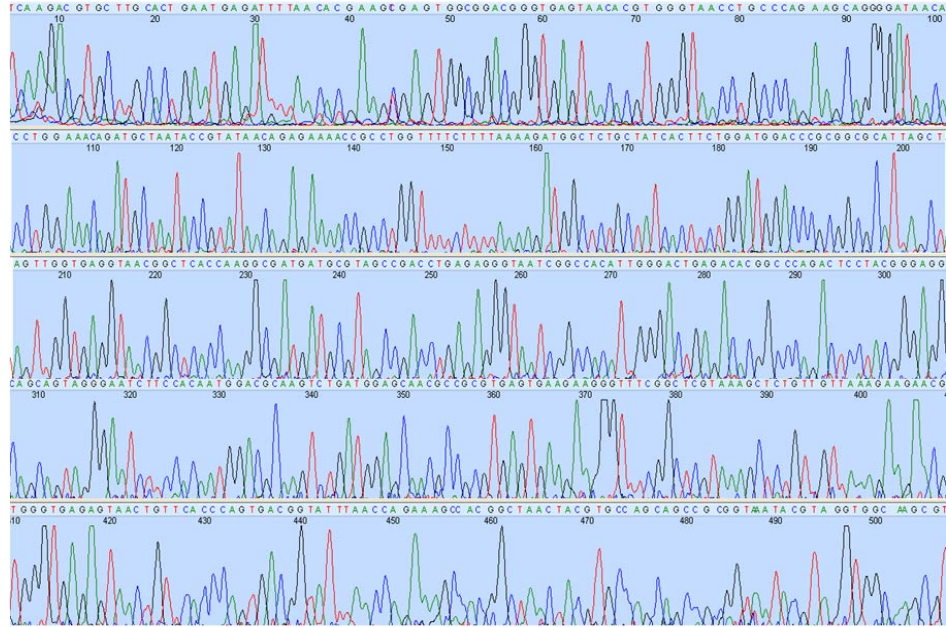
Accession Number JN244745



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FJ538583.1	Pediococcus acidilactici strain CSI34MX 16S ribosomal RNA gene, partia	1062	1062	100%	0.0	99%	
FJ538581.1	Pediococcus acidilactici strain CSI32MX 16S ribosomal RNA gene, partia	1062	1062	100%	0.0	99%	
FJ538579.1	Pediococcus acidilactici strain CSI30MX 16S ribosomal RNA gene, partia	1062	1062	100%	0.0	99%	
FJ538578.1	Pediococcus acidilactici strain CSI29MX 16S ribosomal RNA gene, partia	1062	1062	100%	0.0	99%	
FJ538555.1	Pediococcus acidilactici strain YXT41BMX 16S ribosomal RNA gene, parti	1062	1062	100%	0.0	99%	
FJ538498.1	Pediococcus acidilactici strain CLM2MX 16S ribosomal RNA gene, partial	1062	1062	100%	0.0	99%	
FJ538497.1	Pediococcus acidilactici strain CLM1MX 16S ribosomal RNA gene, partial	1062	1062	100%	0.0	99%	
FJ538496.1	Pediococcus acidilactici strain 65SYCU2MX 16S ribosomal RNA gene, pa	1062	1062	100%	0.0	99%	
HQ603181.1	Pediococcus acidilactici strain MW2 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1061	1061	100%	0.0	99%	
JF733794.1	Bacterium 2/2/3/4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1061	1061	100%	0.0	98%	
HQ315858.1	Pediococcus acidilactici strain MS198 16S ribosomal RNA gene, partial s	1061	1061	100%	0.0	99%	
HQ184064.1	Uncultured Pediococcus sp. clone LAB 51 16S ribosomal RNA gene, pai	1061	1061	100%	0.0	99%	
HQ185406.1	Uncultured Pediococcus sp. clone LAB 33 16S ribosomal RNA gene, pai	1061	1061	100%	0.0	99%	
HM076835.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_94 16S ribosomal R	1061	1061	100%	0.0	99%	
HM076781.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_29 16S ribosomal R	1061	1061	100%	0.0	99%	
GU904688.1	Pediococcus acidilactici strain L169 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1061	1061	100%	0.0	99%	
GU904684.1	Pediococcus acidilactici strain L94 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1061	1061	100%	0.0	99%	
FJ751795.1	Pediococcus acidilactici strain DSPV 358T 16S ribosomal RNA gene, par	1061	1061	100%	0.0	99%	
FJ751789.1	Pediococcus acidilactici strain DSPV 348T 16S ribosomal RNA gene, par	1061	1061	100%	0.0	99%	
GQ421480.1	Pediococcus acidilactici strain GL20 16S ribosomal RNA gene, partial se	1061	1061	100%	0.0	99%	
GQ421479.1	Pediococcus acidilactici strain GL16 16S ribosomal RNA gene, partial se	1061	1061	100%	0.0	99%	
GQ421474.1	Pediococcus acidilactici strain GL22 16S ribosomal RNA gene, partial se	1061	1061	100%	0.0	99%	
GQ421473.1	Pediococcus acidilactici strain GL17 16S ribosomal RNA gene, partial se	1061	1061	100%	0.0	99%	

9. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

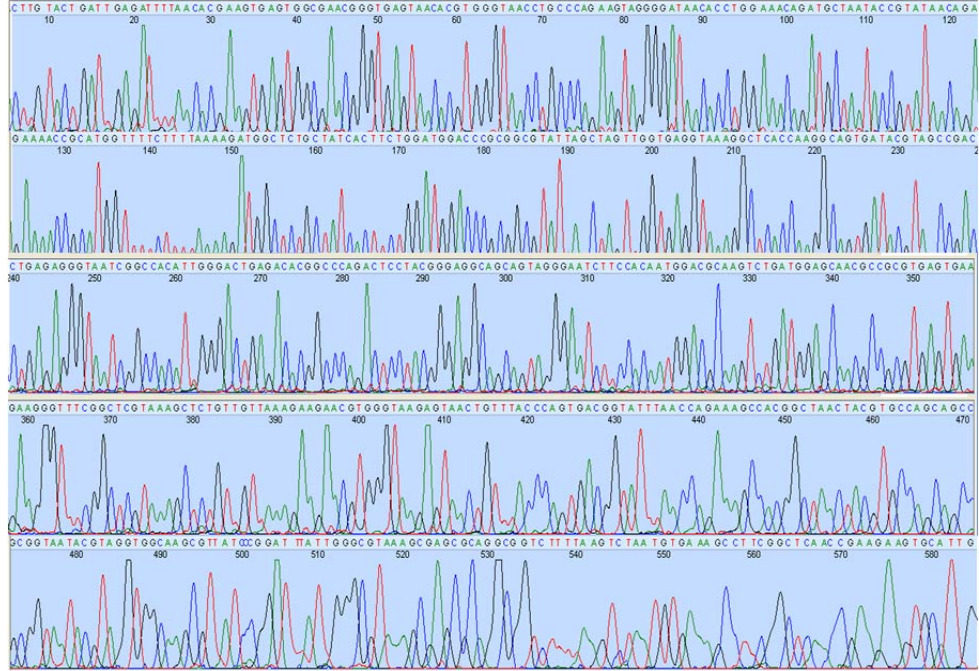
Accession Number JN244746



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HM076835.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_94 16S ribosomal R	907	907	100%	0.0	99%	
HM076781.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_29 16S ribosomal R	907	907	100%	0.0	99%	
GU904664.1	Pediococcus acidilactici strain L94 16S ribosomal RNA gene, partial seq	907	907	100%	0.0	99%	
FJ538593.1	Pediococcus acidilactici strain 20SYCU01MX 16S ribosomal RNA gene, p	907	907	100%	0.0	99%	
FJ538592.1	Pediococcus acidilactici strain 5S2YCU01MX 16S ribosomal RNA gene, p	907	907	100%	0.0	99%	
FJ538591.1	Pediococcus acidilactici strain 5SYCU01MX 16S ribosomal RNA gene, pa	907	907	100%	0.0	99%	
FJ538588.1	Pediococcus acidilactici strain YFPB3BMX 16S ribosomal RNA gene, part	907	907	100%	0.0	99%	
FJ538576.1	Pediococcus acidilactici strain CSI27MX 16S ribosomal RNA gene, partia	907	907	100%	0.0	99%	
FJ538571.1	Pediococcus acidilactici strain YTX20B2MX 16S ribosomal RNA gene, pa	907	907	100%	0.0	99%	
FJ538503.1	Pediococcus acidilactici strain CLM10MX 16S ribosomal RNA gene, parti	907	907	100%	0.0	99%	
FJ538501.1	Pediococcus acidilactici strain CLM6MX 16S ribosomal RNA gene, partial	907	907	100%	0.0	99%	
EU082179.1	Pediococcus acidilactici strain F328 16S ribosomal RNA gene, partial seq	907	907	100%	0.0	99%	
EF700094.1	Uncultured Bacilli bacterium clone MS144A1_B10 16S ribosomal RNA q	907	907	100%	0.0	99%	
HO603181.1	Pediococcus acidilactici strain MW2 16S ribosomal RNA gene, partial seq	902	902	100%	0.0	99%	
HQ288527.1	Pediococcus acidilactici strain B3 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	902	902	100%	0.0	99%	
HQ315859.1	Pediococcus acidilactici strain MS200 16S ribosomal RNA gene, partial s	902	902	100%	0.0	99%	
HQ315858.1	Pediococcus acidilactici strain MS198 16S ribosomal RNA gene, partial s	902	902	100%	0.0	99%	
HQ184064.1	Uncultured Pediococcus sp. clone LAB 51 16S ribosomal RNA gene, pai	902	902	100%	0.0	99%	
HQ185406.1	Uncultured Pediococcus sp. clone LAB 33 16S ribosomal RNA gene, pai	902	902	100%	0.0	99%	
HM076834.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_93 16S ribosomal R	902	902	100%	0.0	99%	
HM076823.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_80 16S ribosomal R	902	902	100%	0.0	99%	
HM076785.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_33 16S ribosomal R	902	902	100%	0.0	99%	
HM076761.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_04 16S ribosomal R	902	902	100%	0.0	99%	

10. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

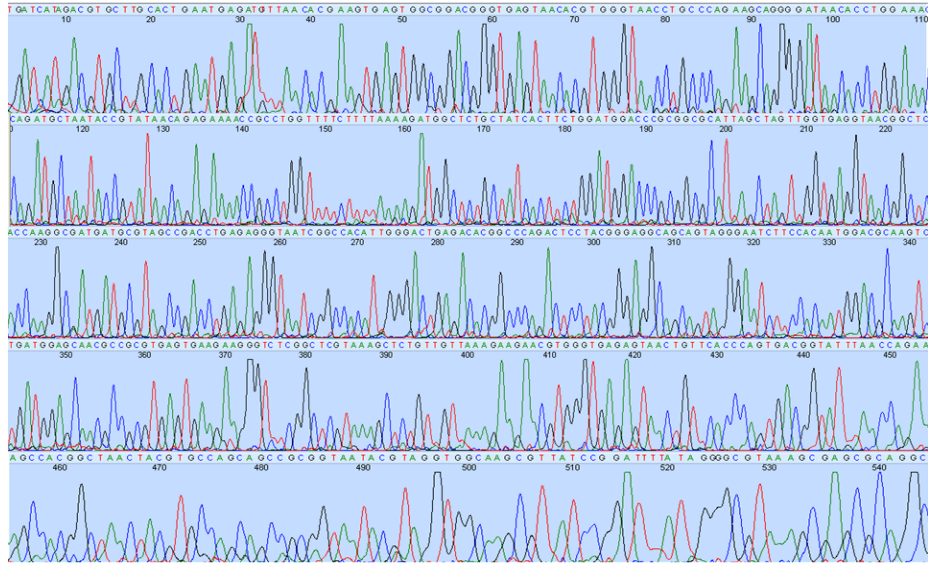
Accession Number JN244747



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ615680.1	Pediococcus pentosaceus strain B1 16S ribosomal RNA gene, partial se	977	977	100%	0.0	99%	
HQ589248.1	Pediococcus pentosaceus strain Z1 16S ribosomal RNA gene, partial se	977	977	100%	0.0	99%	
HQ834496.1	Pediococcus pentosaceus strain SC1 16S ribosomal RNA gene, partial :	977	977	100%	0.0	99%	
HQ286591.1	Pediococcus pentosaceus strain PP 16S ribosomal RNA gene, partial se	977	977	100%	0.0	99%	
FR717465.1	Pediococcus pentosaceus partial 16S rRNA gene, strain LB-25	977	977	100%	0.0	99%	
FR717460.1	Pediococcus pentosaceus partial 16S rRNA gene, strain LB-12	977	977	100%	0.0	99%	
HQ141912.1	Uncultured Pediococcus sp. clone LAB 6 16S ribosomal RNA gene, part	977	977	100%	0.0	99%	
HM536141.1	Pediococcus pentosaceus strain B22 16S ribosomal RNA gene, partial s	977	977	100%	0.0	99%	
HM462429.1	Pediococcus pentosaceus strain Chr-I-str16 16S ribosomal RNA gene,	977	977	100%	0.0	99%	
HM044322.1	Pediococcus sp. GS4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	977	977	100%	0.0	99%	
AB494722.1	Pediococcus pentosaceus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequenc	977	977	100%	0.0	99%	
AB550295.1	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, isolate:	977	977	100%	0.0	99%	
AB550294.1	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, isolate:	977	977	100%	0.0	99%	
AB481102.1	Pediococcus pentosaceus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequenc	977	977	100%	0.0	99%	
GQ076332.1	Uncultured bacterium clone nbw363q07c1 16S ribosomal RNA gene, pa	977	977	100%	0.0	99%	
GQ073616.1	Uncultured bacterium clone nbw210q08c1 16S ribosomal RNA gene, pa	977	977	100%	0.0	99%	
GQ072129.1	Uncultured bacterium clone nbw192e10c1 16S ribosomal RNA gene, pa	977	977	100%	0.0	99%	
GQ072023.1	Uncultured bacterium clone nbw191c02c1 16S ribosomal RNA gene, pa	977	977	100%	0.0	99%	
GQ071985.1	Uncultured bacterium clone nbw190q06c1 16S ribosomal RNA gene, pa	977	977	100%	0.0	99%	
FJ892738.1	Pediococcus sp. S18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	977	977	100%	0.0	99%	
FJ892737.1	Pediococcus sp. S17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	977	977	100%	0.0	99%	
FJ539347.1	Pediococcus pentosaceus strain YTX21BMX 16S ribosomal RNA gene, I	977	977	100%	0.0	99%	
FJ538575.1	Pediococcus pentosaceus strain YTX36BMX 16S ribosomal RNA gene, I	977	977	100%	0.0	99%	
FJ538572.1	Pediococcus pentosaceus strain YTX26BMX 16S ribosomal RNA gene, I	977	977	100%	0.0	99%	
FJ538567.1	Pediococcus pentosaceus strain YTX5BMX 16S ribosomal RNA gene, pi	977	977	100%	0.0	99%	

11. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

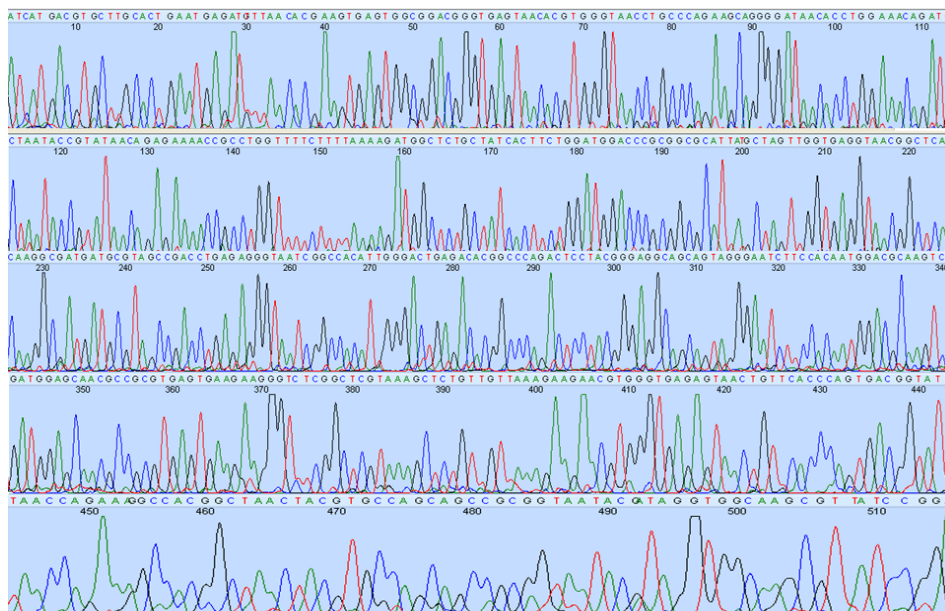
Accession Number JN244753



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FJ538583.1	Pediococcus acidilactici strain CSI34MX 16S ribosomal RNA gene, partie	965	965	100%	0.0	98%	
FJ538581.1	Pediococcus acidilactici strain CSI32MX 16S ribosomal RNA gene, partie	965	965	100%	0.0	98%	
FJ538579.1	Pediococcus acidilactici strain CSI30MX 16S ribosomal RNA gene, partie	965	965	100%	0.0	98%	
FJ538578.1	Pediococcus acidilactici strain CSI29MX 16S ribosomal RNA gene, partie	965	965	100%	0.0	98%	
FJ538555.1	Pediococcus acidilactici strain YXT41BMX 16S ribosomal RNA gene, partie	965	965	100%	0.0	98%	
FJ538498.1	Pediococcus acidilactici strain CLM2MX 16S ribosomal RNA gene, partial	965	965	100%	0.0	98%	
FJ538497.1	Pediococcus acidilactici strain CLM1MX 16S ribosomal RNA gene, partial	965	965	100%	0.0	98%	
FJ538496.1	Pediococcus acidilactici strain 65SYCU2MX 16S ribosomal RNA gene, partie	965	965	100%	0.0	98%	
HQ603181.1	Pediococcus acidilactici strain MW2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	959	959	100%	0.0	98%	
HQ288527.1	Pediococcus acidilactici strain B3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	959	959	100%	0.0	98%	
HQ315859.1	Pediococcus acidilactici strain MS200 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	959	959	100%	0.0	98%	
HQ315858.1	Pediococcus acidilactici strain MS198 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	959	959	100%	0.0	98%	
HQ184064.1	Uncultured <i>Pediococcus</i> sp. clone LAB 51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	959	959	100%	0.0	98%	
HQ185406.1	Uncultured <i>Pediococcus</i> sp. clone LAB 33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	959	959	100%	0.0	98%	
HM076835.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_94 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	959	959	100%	0.0	98%	
HM076781.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	959	959	100%	0.0	98%	
GU904688.1	Pediococcus acidilactici strain L169 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	959	959	100%	0.0	98%	
GU904684.1	Pediococcus acidilactici strain L94 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	959	959	100%	0.0	98%	
FJ751795.1	Pediococcus acidilactici strain DSPV 358T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	959	959	100%	0.0	98%	
FJ751789.1	Pediococcus acidilactici strain DSPV 348T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	959	959	100%	0.0	98%	
GQ421480.1	Pediococcus acidilactici strain GL20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	959	959	100%	0.0	98%	
GQ421479.1	Pediococcus acidilactici strain GL16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	959	959	100%	0.0	98%	
GQ421474.1	Pediococcus acidilactici strain GL22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	959	959	100%	0.0	98%	

12. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

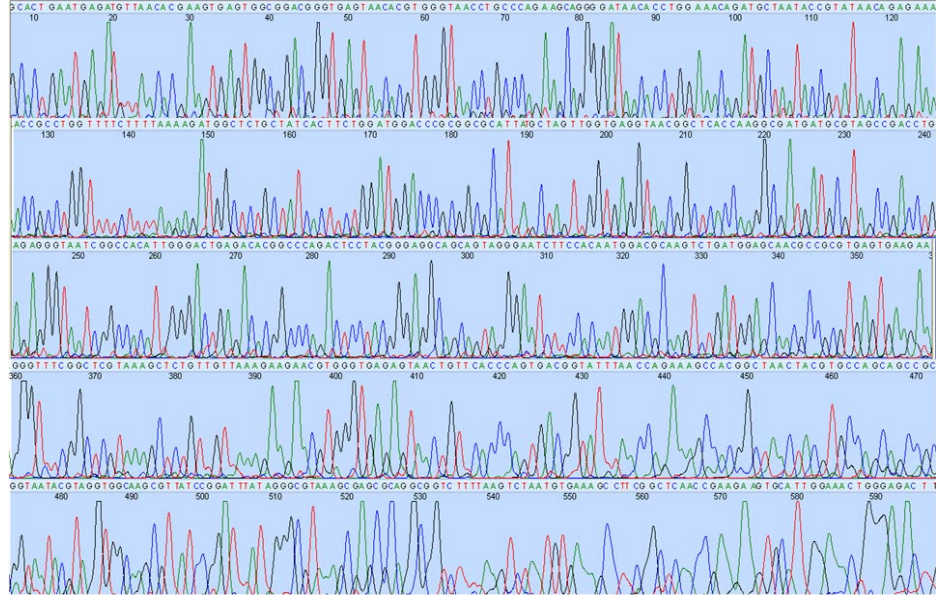
Accession Number JN244748



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ603181.1	Pediococcus acidilactici strain MW2 16S ribosomal RNA gene, partial se	915	915	100%	0.0	98%	
HQ288527.1	Pediococcus acidilactici strain B3 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	915	915	100%	0.0	98%	
HQ315859.1	Pediococcus acidilactici strain MS200 16S ribosomal RNA gene, partial s	915	915	100%	0.0	98%	
HQ315858.1	Pediococcus acidilactici strain MS198 16S ribosomal RNA gene, partial s	915	915	100%	0.0	98%	
HQ184064.1	Uncultured Pediococcus sp. clone LAB 51 16S ribosomal RNA gene, pa	915	915	100%	0.0	98%	
HQ185406.1	Uncultured Pediococcus sp. clone LAB 33 16S ribosomal RNA gene, pa	915	915	100%	0.0	98%	
HM076835.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_94 16S ribosomal R	915	915	100%	0.0	98%	
HM076781.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_29 16S ribosomal R	915	915	100%	0.0	98%	
GU904688.1	Pediococcus acidilactici strain L169 16S ribosomal RNA gene, partial se	915	915	100%	0.0	98%	
GU904684.1	Pediococcus acidilactici strain L94 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	915	915	100%	0.0	98%	
FJ751795.1	Pediococcus acidilactici strain DSPV 358T 16S ribosomal RNA gene, par	915	915	100%	0.0	98%	
FJ751789.1	Pediococcus acidilactici strain DSPV 348T 16S ribosomal RNA gene, par	915	915	100%	0.0	98%	
GQ421480.1	Pediococcus acidilactici strain GL20 16S ribosomal RNA gene, partial se	915	915	100%	0.0	98%	
GQ421479.1	Pediococcus acidilactici strain GL16 16S ribosomal RNA gene, partial se	915	915	100%	0.0	98%	
GQ421474.1	Pediococcus acidilactici strain GL22 16S ribosomal RNA gene, partial se	915	915	100%	0.0	98%	
GQ421473.1	Pediococcus acidilactici strain GL17 16S ribosomal RNA gene, partial se	915	915	100%	0.0	98%	
FJ917739.1	Pediococcus acidilactici strain IMAU60189 16S ribosomal RNA gene, par	915	915	100%	0.0	98%	
FJ917738.1	Pediococcus acidilactici strain IMAU10082 16S ribosomal RNA gene, par	915	915	100%	0.0	98%	
FJ917729.1	Pediococcus acidilactici strain IMAU10073 16S ribosomal RNA gene, par	915	915	100%	0.0	98%	
FJ844984.1	Pediococcus acidilactici strain IMAU20075 16S ribosomal RNA gene, par	915	915	100%	0.0	98%	
FJ844982.1	Pediococcus acidilactici strain IMAU20070 16S ribosomal RNA gene, par	915	915	100%	0.0	98%	
FJ844981.1	Pediococcus acidilactici strain IMAU20068 16S ribosomal RNA gene, par	915	915	100%	0.0	98%	
FJ844959.1	Pediococcus pentosaceus strain IMAU20032 16S ribosomal RNA gene,	915	915	100%	0.0	98%	
FJ787307.1	Pediococcus acidilactici strain DSPV 006T 16S ribosomal RNA gene, par	915	915	100%	0.0	98%	
FJ538593.1	Pediococcus acidilactici strain 20SYCU01MX 16S ribosomal RNA gene, p	915	915	100%	0.0	98%	
FJ538592.1	Pediococcus acidilactici strain 5S2YCU01MX 16S ribosomal RNA gene, p	915	915	100%	0.0	98%	

13. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

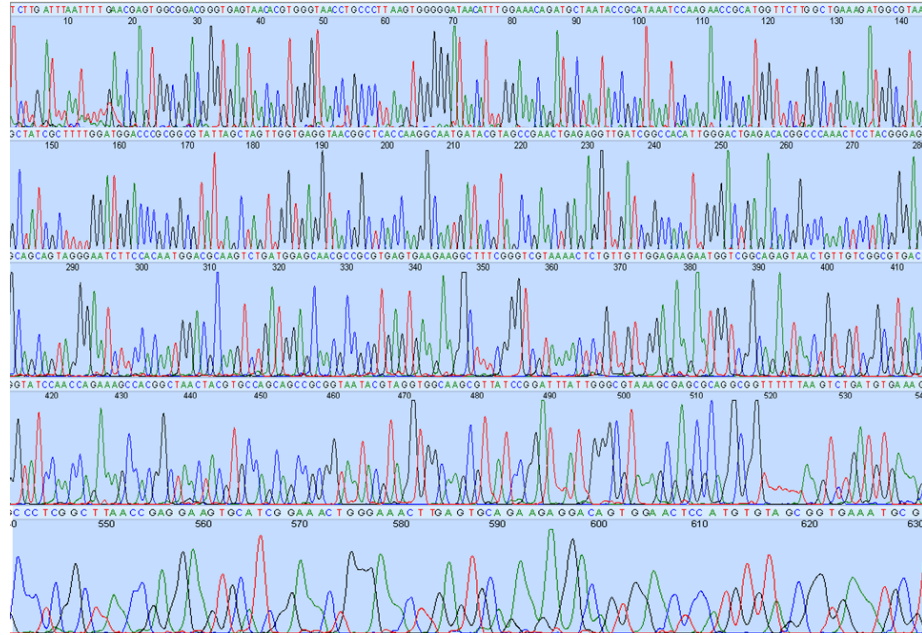
Accession Number JN244749



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ603181.1	Pediococcus acidilactici strain MW2 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1116	1116	100%	0.0	99%	
HQ603179.1	Pediococcus acidilactici strain FJ4 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1116	1116	100%	0.0	99%	
JF268323.1	Pediococcus acidilactici strain 0-4A 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1116	1116	100%	0.0	99%	
FB693801.1	Pediococcus acidilactici partial 16S rRNA gene, isolate LB1	1116	1116	100%	0.0	99%	
HQ315858.1	Pediococcus acidilactici strain MS198 16S ribosomal RNA gene, partial s	1116	1116	100%	0.0	99%	
HQ184064.1	Uncultured Pediococcus sp. clone LAB 51 16S ribosomal RNA gene, pa	1116	1116	100%	0.0	99%	
HQ185406.1	Uncultured Pediococcus sp. clone LAB 33 16S ribosomal RNA gene, pa	1116	1116	100%	0.0	99%	
HM076835.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_94 16S ribosomal R	1116	1116	100%	0.0	99%	
HM076781.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_29 16S ribosomal R	1116	1116	100%	0.0	99%	
HM101329.1	Lactobacillus plantarum strain LBRH025 16S ribosomal RNA gene, part	1116	1116	100%	0.0	99%	
GU904688.1	Pediococcus acidilactici strain L169 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1116	1116	100%	0.0	99%	
GU904684.1	Pediococcus acidilactici strain L94 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1116	1116	100%	0.0	99%	
GU369791.1	Pediococcus acidilactici strain JS-9-5 16S ribosomal RNA gene, partial s	1116	1116	100%	0.0	99%	
GU369790.1	Pediococcus acidilactici strain JS-9-4 16S ribosomal RNA gene, partial s	1116	1116	100%	0.0	99%	
GU369789.1	Pediococcus acidilactici strain JS-9-3 16S ribosomal RNA gene, partial s	1116	1116	100%	0.0	99%	
GU369788.1	Pediococcus acidilactici strain JS-9-1 16S ribosomal RNA gene, partial s	1116	1116	100%	0.0	99%	
GQ421480.1	Pediococcus acidilactici strain GL20 16S ribosomal RNA gene, partial se	1116	1116	100%	0.0	99%	
GQ421479.1	Pediococcus acidilactici strain GL16 16S ribosomal RNA gene, partial se	1116	1116	100%	0.0	99%	
GQ421474.1	Pediococcus acidilactici strain GL22 16S ribosomal RNA gene, partial se	1116	1116	100%	0.0	99%	
GQ421473.1	Pediococcus acidilactici strain GL17 16S ribosomal RNA gene, partial se	1116	1116	100%	0.0	99%	
FJ917739.1	Pediococcus acidilactici strain IMAU60189 16S ribosomal RNA gene, par	1116	1116	100%	0.0	99%	
FJ915729.1	Pediococcus acidilactici strain IMAU10073 16S ribosomal RNA gene, par	1116	1116	100%	0.0	99%	
FJ844984.1	Pediococcus acidilactici strain IMAU20075 16S ribosomal RNA gene, par	1116	1116	100%	0.0	99%	
FJ844982.1	Pediococcus acidilactici strain IMAU20070 16S ribosomal RNA gene, par	1116	1116	100%	0.0	99%	
FJ844981.1	Pediococcus acidilactici strain IMAU20068 16S ribosomal RNA gene, par	1116	1116	100%	0.0	99%	

14. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

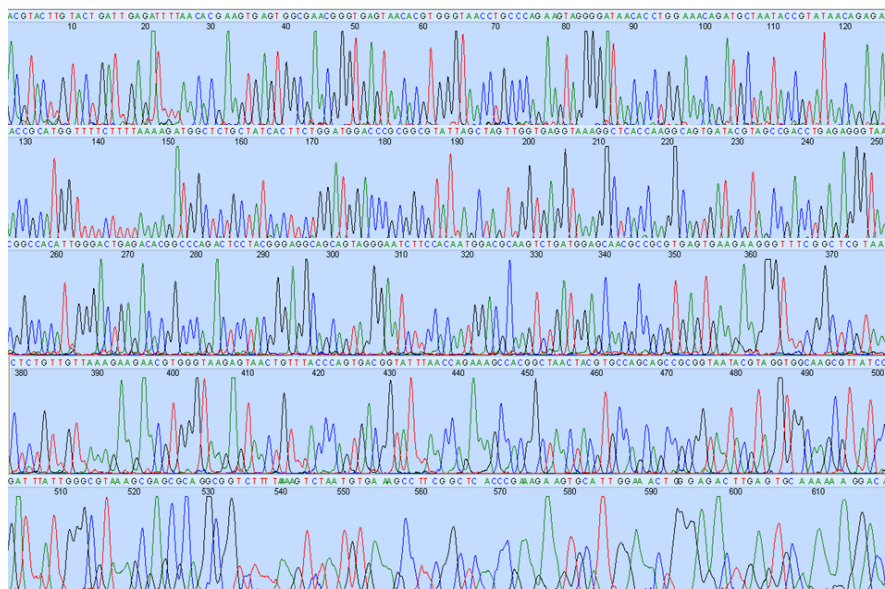
Accession Number JN244750



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
JF728290.1	Lactobacillus rhamnosus strain GIMC38:TVS-3 16S ribosomal RNA gene	1140	1140	100%	0.0	100%	
GU372713.1	Lactobacillus rhamnosus strain P3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
GU372712.1	Lactobacillus rhamnosus strain L235N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
GU372711.1	Lactobacillus rhamnosus strain P31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
AB626049.1	Lactobacillus rhamnosus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: I	1140	1140	100%	0.0	100%	
JF431545.1	Lactobacillus sp. ab3-w1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
JF414108.1	Lactobacillus rhamnosus strain HT2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
JF414107.1	Lactobacillus rhamnosus strain HT1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
JF149454.1	Uncultured bacterium clone ncd1703c11c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
HQ616370.1	Lactobacillus sp. BT6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
HM218396.1	Lactobacillus rhamnosus strain NM94-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
HM218389.1	Lactobacillus rhamnosus strain NM93-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
HM218365.1	Lactobacillus rhamnosus strain NM86-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
HM218363.1	Lactobacillus rhamnosus strain NM85-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
HQ177094.1	Lactobacillus sp. lab2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
HQ111077.1	Lactobacillus rhamnosus strain NWP13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
HQ111076.1	Lactobacillus rhamnosus strain NWP12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
HM162419.1	Lactobacillus rhamnosus strain 20300 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
HM462427.1	Lactobacillus rhamnosus strain ChPR-II-str56 16S ribosomal RNA gene	1140	1140	100%	0.0	100%	
HM125050.1	Lactobacillus rhamnosus strain LP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
GU812307.1	Lactobacillus rhamnosus strain E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
GU812306.1	Lactobacillus rhamnosus strain B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
GU550100.1	Lactobacillus rhamnosus GG 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1140	1140	100%	0.0	100%	
GU386370.1	Lactobacillus rhamnosus strain WS11/04/06 16S ribosomal RNA gene	1140	1140	100%	0.0	100%	

15. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

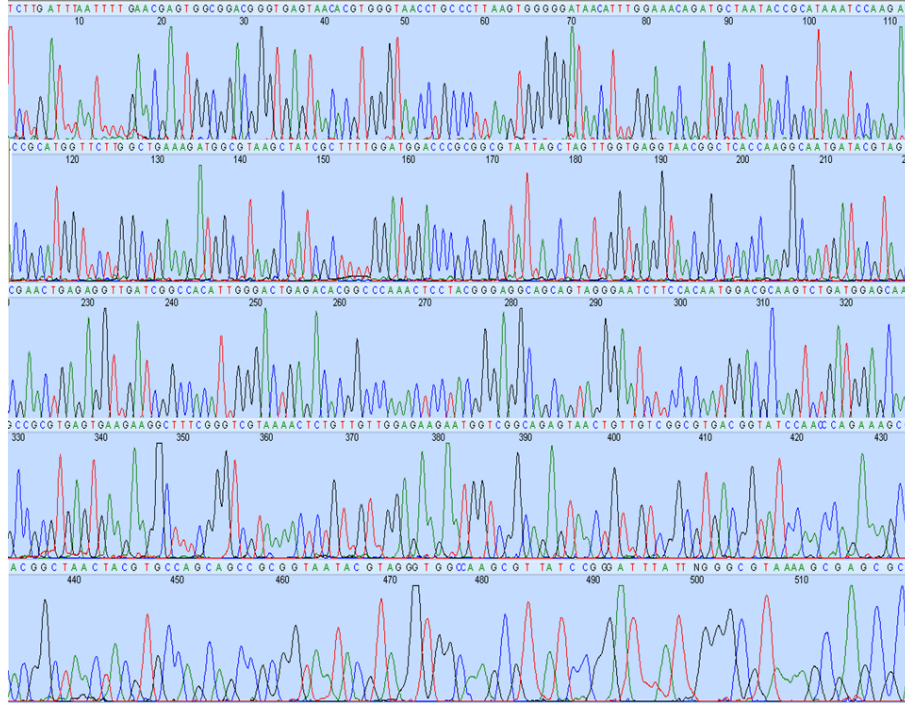
Accession Number JN244751



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
GQ071985.1	Uncultured bacterium clone nbw190q06c1 16S ribosomal RNA gene, pa	1103	1103	99%	0.0	99%	
HQ589248.1	Pediococcus pentosaceus strain Z1 16S ribosomal RNA gene, partial se	1098	1098	99%	0.0	99%	
HQ834496.1	Pediococcus pentosaceus strain SC1 16S ribosomal RNA gene, partial s	1098	1098	99%	0.0	99%	
HQ286591.1	Pediococcus pentosaceus strain PP 16S ribosomal RNA gene, partial se	1098	1098	99%	0.0	99%	
FR717465.1	Pediococcus pentosaceus partial 16S rRNA gene, strain LB-25	1098	1098	99%	0.0	99%	
FR717460.1	Pediococcus pentosaceus partial 16S rRNA gene, strain LB-12	1098	1098	99%	0.0	99%	
HQ141912.1	Uncultured Pediococcus sp. clone LAB 6 16S ribosomal RNA gene, part	1098	1098	99%	0.0	99%	
HM536141.1	Pediococcus pentosaceus strain B22 16S ribosomal RNA gene, partial s	1098	1098	99%	0.0	99%	
HM462429.1	Pediococcus pentosaceus strain ChR-I-str16 16S ribosomal RNA gene,	1098	1098	99%	0.0	99%	
HM044322.1	Pediococcus sp. GS4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1098	1098	99%	0.0	99%	
AB494722.1	Pediococcus pentosaceus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequenc	1098	1098	99%	0.0	99%	
AB550295.1	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, isolate:	1098	1098	99%	0.0	99%	
AB550294.1	Pediococcus pentosaceus gene for 16S rRNA, partial sequence, isolate:	1098	1098	99%	0.0	99%	
AB481102.1	Pediococcus pentosaceus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequenc	1098	1098	99%	0.0	99%	
GQ076332.1	Uncultured bacterium clone nbw363q07c1 16S ribosomal RNA gene, pa	1098	1098	99%	0.0	99%	
GQ073616.1	Uncultured bacterium clone nbw210q08c1 16S ribosomal RNA gene, pa	1098	1098	99%	0.0	99%	
GQ072129.1	Uncultured bacterium clone nbw192e10c1 16S ribosomal RNA gene, pa	1098	1098	99%	0.0	99%	
GQ072023.1	Uncultured bacterium clone nbw191c02c1 16S ribosomal RNA gene, pa	1098	1098	99%	0.0	99%	
FJ892738.1	Pediococcus sp. S18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1098	1098	99%	0.0	99%	
FJ892737.1	Pediococcus sp. S17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1098	1098	99%	0.0	99%	
FJ539347.1	Pediococcus pentosaceus strain YTX21BMX 16S ribosomal RNA gene, i	1098	1098	99%	0.0	99%	
FJ538575.1	Pediococcus pentosaceus strain YTX36BMX 16S ribosomal RNA gene, i	1098	1098	99%	0.0	99%	
FJ538572.1	Pediococcus pentosaceus strain YTX26BMX 16S ribosomal RNA gene, i	1098	1098	99%	0.0	99%	
FJ538567.1	Pediococcus pentosaceus strain YTX5BMX 16S ribosomal RNA gene, pa	1098	1098	99%	0.0	99%	
FJ538565.1	Pediococcus pentosaceus strain YXT71BMX 16S ribosomal RNA gene, i	1098	1098	99%	0.0	99%	

16. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

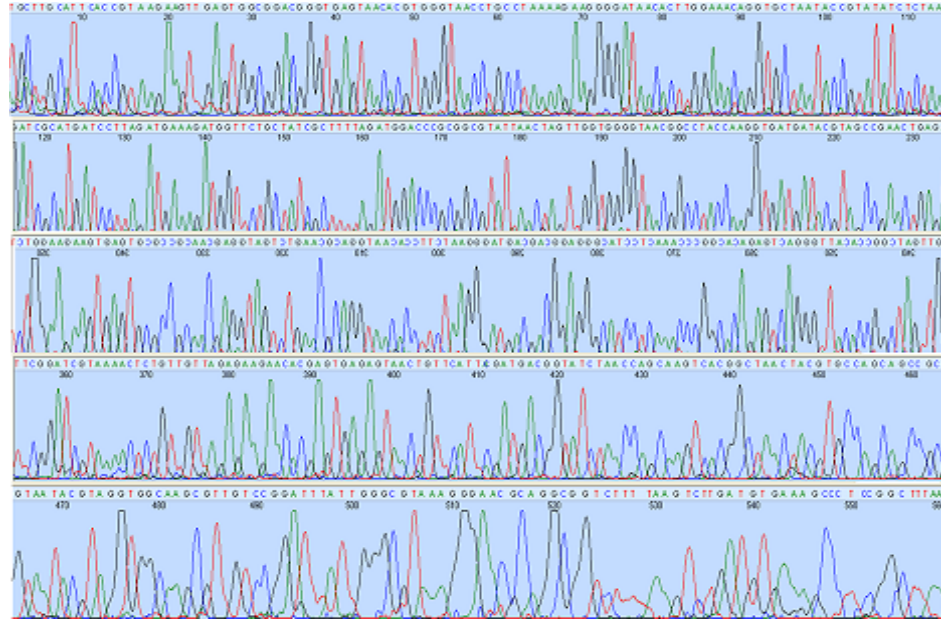
Accession Number JN314421



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HM125049.1	Lactobacillus rhamnosus strain E9 16S ribosomal RNA gene, partial seq	922	922	100%	0.0	98%	
JF719999.1	Lactobacillus rhamnosus strain VL3 16S ribosomal RNA gene, partial s	920	920	100%	0.0	98%	
JF728290.1	Lactobacillus rhamnosus strain GIMC38:TVS-3 16S ribosomal RNA gen	920	920	100%	0.0	98%	
GU372713.1	Lactobacillus rhamnosus strain P3 16S ribosomal RNA gene, partial seq	920	920	100%	0.0	98%	
GU372712.1	Lactobacillus rhamnosus strain L235N 16S ribosomal RNA gene, partia	920	920	100%	0.0	98%	
GU372711.1	Lactobacillus rhamnosus strain P31 16S ribosomal RNA gene, partial s	920	920	100%	0.0	98%	
AB626049.1	Lactobacillus rhamnosus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: l	920	920	100%	0.0	98%	
JF431545.1	Lactobacillus sp. ab3-w1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	920	920	100%	0.0	98%	
JF414108.1	Lactobacillus rhamnosus strain HT2 16S ribosomal RNA gene, partial s	920	920	100%	0.0	98%	
JF414107.1	Lactobacillus rhamnosus strain HT1 16S ribosomal RNA gene, partial s	920	920	100%	0.0	98%	
JF150176.1	Uncultured bacterium clone ncd1713b06c1 16S ribosomal RNA gene, p	920	920	100%	0.0	98%	
JF149454.1	Uncultured bacterium done ncd1703c11c1 16S ribosomal RNA gene, p	920	920	100%	0.0	98%	
HQ616370.1	Lactobacillus sp. BT6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	920	920	100%	0.0	98%	
HQ418481.1	Lactobacillus rhamnosus strain Lr19 16S ribosomal RNA gene, partial s	920	920	100%	0.0	98%	
HQ418480.1	Lactobacillus rhamnosus strain Lr18 16S ribosomal RNA gene, partial s	920	920	100%	0.0	98%	
HQ293100.1	Lactobacillus rhamnosus strain NWL77 16S ribosomal RNA gene, parti	920	920	100%	0.0	98%	
HQ293051.1	Lactobacillus rhamnosus strain NWL28 16S ribosomal RNA gene, parti	920	920	100%	0.0	98%	
HM218396.1	Lactobacillus rhamnosus strain NM94-5 16S ribosomal RNA gene, parti	920	920	100%	0.0	98%	
HM218389.1	Lactobacillus rhamnosus strain NM93-4 16S ribosomal RNA gene, parti	920	920	100%	0.0	98%	
HM218365.1	Lactobacillus rhamnosus strain NM86-1 16S ribosomal RNA gene, parti	920	920	100%	0.0	98%	
HM218362.1	Lactobacillus rhamnosus strain NM85-1 16S ribosomal RNA gene, parti	920	920	100%	0.0	98%	
HQ177094.1	Lactobacillus sp. lab2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	920	920	100%	0.0	98%	
HQ111082.1	Lactobacillus rhamnosus strain NWS19 16S ribosomal RNA gene, parti	920	920	100%	0.0	98%	

17. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

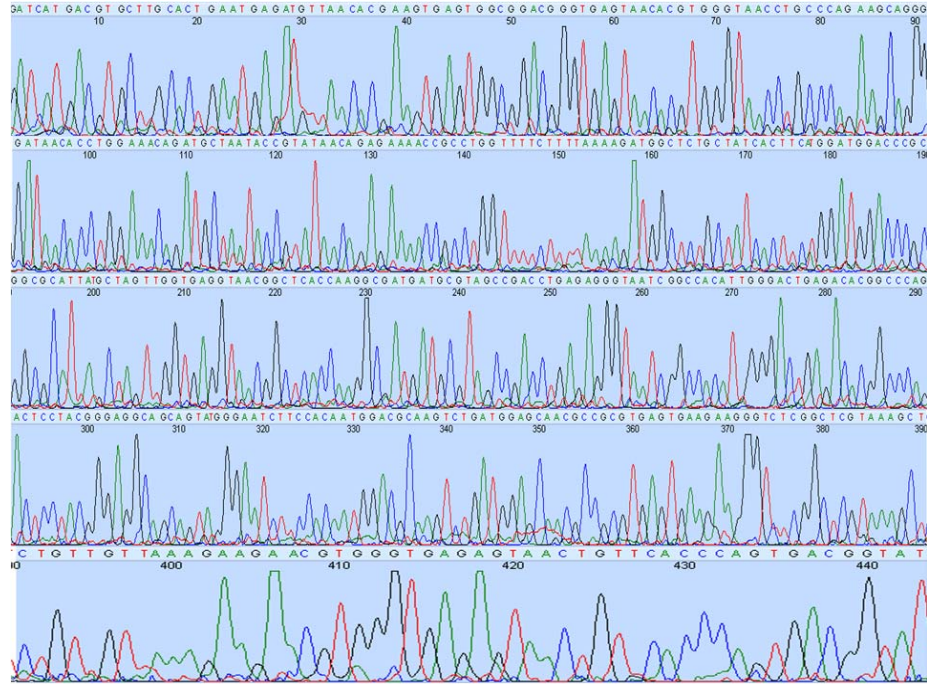
Accession Number JN244752



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
JF411346.1	Uncultured Enterococcus sp. clone H-2 16S ribosomal RNA gene, parti	1077	1077	100%	0.0	99%	
JF496526.1	Enterococcus faecium strain CB-6 16S ribosomal RNA gene, partial sec	1077	1077	100%	0.0	99%	
JF896447.1	Enterococcus durans strain R03-12 16S ribosomal RNA gene, partial s	1077	1077	100%	0.0	99%	
JF896436.1	Enterococcus durans strain R07-28 16S ribosomal RNA gene, partial s	1077	1077	100%	0.0	99%	
JF733823.1	Bacterium 73 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1077	1077	100%	0.0	99%	
JF692641.1	Uncultured bacterium clone MRF01C 16S ribosomal RNA gene, partial s	1077	1077	100%	0.0	99%	
JF728294.1	Enterococcus faecium strain GIMC502:BS-26P 16S ribosomal RNA gen	1077	1077	100%	0.0	99%	
JF728293.1	Enterococcus faecium strain GIMC501:BS-75 16S ribosomal RNA gene	1077	1077	100%	0.0	99%	
HQ450714.1	Enterococcus faecium strain UPAA66 16S ribosomal RNA gene, partial :	1077	1077	100%	0.0	99%	
FR717466.1	Enterococcus hirae partial 16S rRNA gene, strain LB-28	1077	1077	100%	0.0	99%	
FR717463.1	Enterococcus hirae partial 16S rRNA gene, strain LB-27	1077	1077	100%	0.0	99%	
FR717462.1	Enterococcus hirae partial 16S rRNA gene, strain LB-17	1077	1077	100%	0.0	99%	
HQ293078.1	Enterococcus faecium strain NWP55 16S ribosomal RNA gene, partial s	1077	1077	100%	0.0	99%	
HQ293030.1	Enterococcus faecium strain NWL07 16S ribosomal RNA gene, partial s	1077	1077	100%	0.0	99%	
HM568878.1	Enterococcus faecium strain CDM3A 16S ribosomal RNA gene, partial s	1077	1077	100%	0.0	99%	
HQ005362.1	Enterococcus faecium strain RLB 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1077	1077	100%	0.0	99%	
HQ005361.1	Enterococcus faecium strain VLP2 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1077	1077	100%	0.0	99%	
HQ005360.1	Enterococcus faecium strain VLP1 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1077	1077	100%	0.0	99%	
HM584103.1	Enterococcus hirae strain CAIM 1553 16S ribosomal RNA gene, partial	1077	1077	100%	0.0	99%	
HM584102.1	Enterococcus hirae strain CAIM 1552 16S ribosomal RNA gene, partial	1077	1077	100%	0.0	99%	
GQ158419.1	Uncultured bacterium clone 16slp123-1c10.p1k 16S ribosomal RNA qe	1077	1077	100%	0.0	99%	
GQ158418.1	Uncultured bacterium clone 16slp123-1c09.p1k 16S ribosomal RNA qe	1077	1077	100%	0.0	99%	
GQ158417.1	Uncultured bacterium clone 16slp123-2d11.p1k 16S ribosomal RNA qe	1077	1077	100%	0.0	99%	

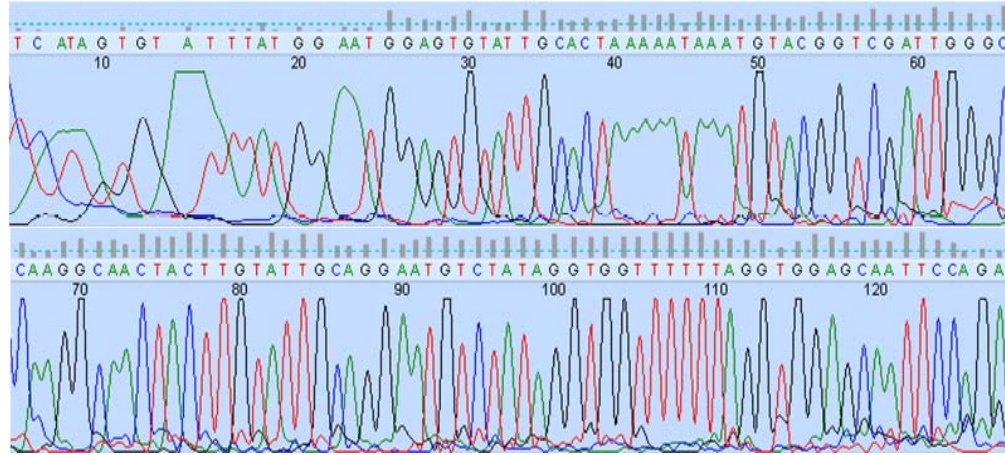
18. İZOLAT 16S rDNA DİZİ ANALİZİ BLAST TARAMA SONUCU

Accession Number JN244754



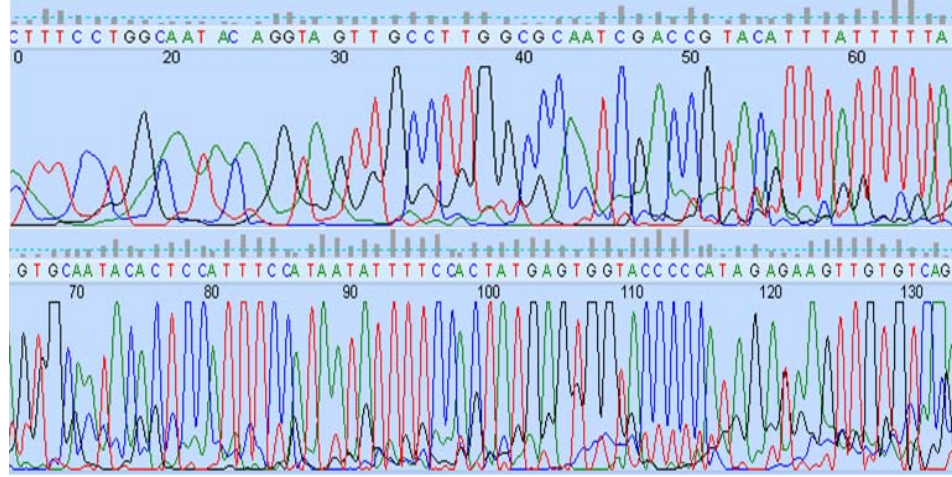
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FJ538583.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CSI34MX 16S ribosomal RNA gene, partia	784	784	100%	0.0	98%	
FJ538581.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CSI32MX 16S ribosomal RNA gene, partia	784	784	100%	0.0	98%	
FJ538579.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CSI30MX 16S ribosomal RNA gene, partia	784	784	100%	0.0	98%	
FJ538578.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CSI29MX 16S ribosomal RNA gene, partia	784	784	100%	0.0	98%	
FJ538555.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain YXT41BMX 16S ribosomal RNA gene, par	784	784	100%	0.0	98%	
FJ538498.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CLM2MX 16S ribosomal RNA gene, partial	784	784	100%	0.0	98%	
FJ538497.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain CLM1MX 16S ribosomal RNA gene, partial	784	784	100%	0.0	98%	
FJ538496.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain 65SYCU2MX 16S ribosomal RNA gene, pa	784	784	100%	0.0	98%	
HQ603181.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain MW2 16S ribosomal RNA gene, partial sei	782	782	100%	0.0	98%	
AB627843.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Pbi	782	782	100%	0.0	98%	
HQ288527.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain B3 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	782	782	100%	0.0	98%	
HQ315859.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain MS200 16S ribosomal RNA gene, partial s	782	782	100%	0.0	98%	
HQ315858.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain MS198 16S ribosomal RNA gene, partial s	782	782	100%	0.0	98%	
HQ315857.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain MC184 16S ribosomal RNA gene, partial s	782	782	100%	0.0	98%	
HQ184064.1	Uncultured <i>Pediococcus</i> sp. clone LAB 51 16S ribosomal RNA gene, pa	782	782	100%	0.0	98%	
HQ185406.1	Uncultured <i>Pediococcus</i> sp. clone LAB 33 16S ribosomal RNA gene, pa	782	782	100%	0.0	98%	
HM076835.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_94 16S ribosomal R	782	782	100%	0.0	98%	
HM076781.1	Uncultured Lactobacillaceae bacterium clone VA17_29 16S ribosomal R	782	782	100%	0.0	98%	
GU904688.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain L169 16S ribosomal RNA gene, partial sei	782	782	100%	0.0	98%	
GU904684.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain L94 16S ribosomal RNA gene, partial seq	782	782	100%	0.0	98%	
FJ751795.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain DSPV 358T 16S ribosomal RNA gene, par	782	782	100%	0.0	98%	
FJ751789.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain DSPV 348T 16S ribosomal RNA gene, par	782	782	100%	0.0	98%	
GQ421480.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain GL20 16S ribosomal RNA gene, partial se	782	782	100%	0.0	98%	
GQ421479.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain GL16 16S ribosomal RNA gene, partial se	782	782	100%	0.0	98%	
GQ421474.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain GL22 16S ribosomal RNA gene, partial se	782	782	100%	0.0	98%	
GQ421473.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain GL17 16S ribosomal RNA gene, partial se	782	782	100%	0.0	98%	

EK 7 ENTEROSİN GENİNİN DİZİ ANALİZİ VE BLAST SONUCU (EAF Primer)



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ890377.1	Enterococcus faecium strain E9 enterocin A (entA) gene, partial cds	202	202	90%	4e-49	99%	
GQ900435.1	Enterococcus faecium plasmid p5753cA, complete sequence	202	202	90%	4e-49	99%	
GQ182975.1	Enterococcus faecium strain LR/6 entrocin gene locus, partial sequence	202	323	90%	4e-49	99%	
AB292463.1	Enterococcus faecium entA, entI, entF, entK, orfA1, orfA2, orfA3, e	202	202	90%	4e-49	99%	
AM746970.1	Enterococcus faecium partial enterocin A operon (entAIFK genes), strain N	202	202	90%	4e-49	99%	
X94181.1	E.faecium entA and orf2 genes	202	202	90%	4e-49	99%	
AF240561.1	Enterococcus faecium class IIa bacteriocin EntA (entA) and putative immu	202	202	90%	4e-49	99%	
AB038464.1	Enterococcus faecium genes for enterocin A, immunity protein against ent	202	202	90%	4e-49	99%	
AF099088.1	Enterococcus faecium enterocin A (entA), EntI (entI), EntF (entF), EntK (e	202	202	90%	4e-49	99%	
JF944896.1	Enterococcus faecalis strain E5 enterocin A (entA) gene, partial cds	200	200	89%	1e-48	99%	
HQ186248.1	Enterococcus faecium strain MC13 enterocin (ent) gene, partial cds	196	196	90%	2e-47	98%	
FJ161958.1	Enterococcus mundtii strain CWBI_B1431 EntA (entA) gene, partial cds	191	191	90%	9e-46	97%	
FJ161954.1	Enterococcus faecium strain CWBI_B1430 EntA (entA) gene, partial cds	191	191	90%	9e-46	97%	
FJ424062.1	Enterococcus sp. DF14 enterocin (entA) gene, partial cds	185	185	83%	4e-44	99%	
HM060244.1	Enterococcus faecium strain airy1 enterocin A gene, partial cds	176	176	76%	2e-41	100%	
GQ369790.1	Enterococcus faecium strain CRL1385 class IIa bacteriocin enterocin A pre	161	161	70%	7e-37	100%	
HQ407491.1	Enterococcus faecium strain SM31 enterocin A gene, partial cds	126	126	59%	3e-26	97%	
HQ407485.1	Enterococcus faecium strain SM52 enterocin A gene, partial cds	126	126	59%	3e-26	97%	

ENTEROSİN GENİNİN DİZİ ANALİZİ VE BLAST SONUCU (EAR Primer)



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
JF944896.1	Enterococcus faecalis strain E5 enterocin A (entA) gene, partial cds	195	195	98%	6e-47	97%	
HQ890377.1	Enterococcus faecium strain E9 enterocin A (entA) gene, partial cds	195	195	98%	6e-47	97%	
GQ900435.1	Enterococcus faecium plasmid p5753cA, complete sequence	195	195	98%	6e-47	97%	
GQ182975.1	Enterococcus faecium strain LR/6 enterocin gene locus, partial sequence	195	384	98%	6e-47	97%	
AB292463.1	Enterococcus faecium entA, entI, entF, entK, entR, orfA1, orfA2, orfA3, e	195	195	98%	6e-47	97%	
AM746970.1	Enterococcus faecium partial enterocin A operon (entAIFK genes), strain M	195	195	98%	6e-47	97%	
X94181.1	E.faecium entA and orf2 genes	195	195	98%	6e-47	97%	
AF240561.1	Enterococcus faecium class IIa bacteriocin EntA (entA) and putative immu	195	195	98%	6e-47	97%	
AB038464.1	Enterococcus faecium genes for enterocin A, immunity protein against ent	195	195	98%	6e-47	97%	
AF099088.1	Enterococcus faecium enterocin A (entA), EntI (entI), EntF (entF), EntK (e	195	195	98%	6e-47	97%	
FJ161958.1	Enterococcus mundtii strain CWBI_B1431 EntA (entA) gene, partial cds	154	154	81%	1e-34	95%	
FJ161954.1	Enterococcus faecium strain CWBI_B1430 EntA (entA) gene, partial cds	154	154	81%	1e-34	95%	
HQ186248.1	Enterococcus faecium strain MC13 enterocin (ent) gene, partial cds	145	145	75%	6e-32	96%	
GQ369790.1	Enterococcus faecium strain CRL1385 class IIa bacteriocin enterocin A pre	110	110	56%	2e-21	96%	
FJ424062.1	Enterococcus sp. DF14 enterocin (entA) gene, partial cds	99.0	99.0	53%	5e-18	95%	
HM060244.1	Enterococcus faecium strain airy1 enterocin A gene, partial cds	89.8	89.8	46%	3e-15	96%	

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Elif YÜRÜMEZ
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 24.07.1986
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu Kurum ve Yıl

Lise : İncirli Yabancı Dil Ağırlıklı Lise 2000-2004
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü,
2004-2008
Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji
Anabilim Dalı (Eylül 2008- Ağustos 2011)