



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNEK AĞIZ SÜTÜNDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN BAZI
PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehmet CAMBAZ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

AKSARAY, 2024

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 212330407 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi tarafından hazırlanan ‘‘İNEK AĞIZ SÜTÜNDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ’’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Doç. Dr. Neslihan TEKİN KARACAER

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Gülgez Gökçe YILDIZ

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 07/06/2024

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Mehmet Ali HINIS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinallliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Mehmet CAMBAZ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada tez konumun seçiminde ve hem deney hem de tez yazımı sürecinde bana akademik alanda bilgi, tecrübe ve anlayışla rehberlik eden ve kendimi geliştirmeme büyük katkı sağlayan danışmanım Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ'a teşekkür ederim. Çalışmalarımı gerçekleştirmeme imkan tanıyan Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (ASÜBTAM) ve yöneticilerine teşekkür ederim.

Çalışmamın gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Abdulkerim KOCAOĞLU, Hakan YÜCEDAĞ, Hilal ERDEN, İlayda DOĞAN ve Yaren DOĞRUL'a desteklerini benden esirgemeyen anneme, babama ve kardeşime teşekkür ederim.

Mehmet CAMBAZ

AKSARAY, 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Kolostrum	4
2.1.1. Kolostrum bileşenleri.....	4
2.1.2.Kolostrum probiyotikleri	5
2.2. Probiyotik.....	6
2.2.1. Probiyotik seçim kriterleri	7
2.2.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.....	7
2.2.3. Probiyotik özellikler	9
2.2.3.1. Gastrointestinal sistemde hayatta kalma yeteneği.....	9
2.2.3.2. Epitel yüzeye tutunma.....	9
2.2.3.3. Probiyotiklerin patojenik bakterilerin canlılığı üzerindeki etkisi.....	9
2.2.3.4. Probiyotiklerin güvenirliliği	10
2.2.3.5. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkileri.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM	11
3.1. Materyal	11
3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri	11
3.1.2. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları	12
3.1.3. Çalışmalarda kullanılan besiyerleri	13
3.2. Yöntem.....	15
3.2.1. Bakteri kültürlerinin muhafazası	15
3.2.2. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının fenol toleransının belirlenmesi.....	15
3.2.3. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının Farklı pH değerlerine toleransının belirlenmesi	15
3.2.4. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının farklı safra konsantrasyonlarına toleransının belirlenmesi	16
3.2.5. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi	17
3.2.6. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi	18
3.2.7. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının eksopolisakkarit (EPS) üretimlerinin belirlenmesi	18
3.2.8. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının agregasyon özelliklerinin tespiti	19
3.2.8.1. Otoagregasyon.....	20
3.2.8.2. Koagregasyon.....	20
3.2.9. Hidrofobisite	21
3.2.10. Hemolitik aktivite	21
3.2.11. 16S rDNA dizi analizi.....	22
3.2.12. İstatiksel analiz	22
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	24
4.1. <i>Lactobacillus</i> spp. İzolatlarının Fenol Toleransının Belirlenmesi	24

4.2. <i>Lactobacillus</i> spp. İzolatlarının Farklı pH Değerlerine Toleransının Belirlenmesi	27
4.3. <i>Lactobacillus</i> spp. İzolatlarının Farklı Safra Konsantrasyonlarına Toleransının Belirlenmesi.....	33
4.4. <i>Lactobacillus</i> spp. İzolatlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi	38
4.5. <i>Lactobacillus</i> spp. İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi.....	41
4.6. <i>Lactobacillus</i> spp. İzolatlarının Eksopolisakkarit (EPS) Üretimlerinin Belirlenmesi	46
4.7. Otoagregasyon	49
4.8. Koagregasyon.....	54
4.9. Hidrofobisite.....	59
4.10. Hemolitik Aktivite.....	63
4.11. 16S rDNA Dizi Analizi	65
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	80

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNEK AĞIZ SÜTÜNDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ

Mehmet CAMBAZ

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

ÖZET

Bu çalışmada ineklerin ağız sütünden (kolostrum) izole edilen 11 *Lactobacillus* spp. izolatlarının probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda; *Lactobacillus* spp. OO1, OO3, OO4 ve TO4 izolatlarının % 0,4 fenole karşı yüksek tolerans gösterdiği tespit edilmiştir. İzole edilen *Lactobacillus* spp. izolatları düşük pH koşuluna duyarlılık göstererek (pH 2.0), pH 3 (4,03-7,52 log kob/mL), pH 4 (6,70-7,60 log kob/mL) ve pH 7’de (7,83-9,60 log kob/mL) canlılıklarını sürdürmüşlerdir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının %0,3 ve 0,5 safra ortamlarında ortalama canlılıkları sırayla 8,56 ve 8,04 log kob/mL olarak tespit edilmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarından elde edilen metabolitlerin gıda ve bağırsak patojenlerine antimikrobiyal etkisi araştırılmış ve *Escherichia coli* ATCC 35218 (3,04-17,48 mm), *E. coli* ATCC 11229 (2,64-17,16 mm) *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 (2,24-11,56 mm), *Bacillus cereus* RSKK 863 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (6,98-20,18 mm) test bakterilerine karşı antimikrobiyal etki gösterdikleri gözlemlenmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının ampisilin, oflotoksin, eritromisin, kromfenikol, netilmisin, gentamisin ve polimiksin antibiyotiklerine duyarlılıkları test edilmiştir. İzolatlar polimiksine karşı direnç gösterirken, OO4 ampisiline ve gentaisine, TO4 ise gentamisin antibiyotiğine direnç göstermiştir. Probiyotik suşların agregasyon ve hidrofobiste aktivitelerinde etkili olduğu düşünülen ekzopolisakkarit (EPS) üretimleri 205,91 – 372,36 mg/L belirlenmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarından otoagregasyon aktivitesi %9-31 oranında belirlenirken, *S. aureus* ATCC 25923 (%1,3-27,3) ve *E. coli* ATCC 35218 (%1,5-30) test bakterileri ile düşük düzeyde koagregasyon olabildikleri gözlemlenmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının yüzde hidrofobisite değerleri sırasıyla, %13,5-94,80, %1,15-85 ve %1,6-84,8 olarak tespit edilmiştir. Yüksek EPS üretimi gösteren TO3, TO4 ve OO4 izolatları agregasyon, hidrofobisite, antimikrobiyal aktivite ve gastrointestinal sistem koşullarına tolerans gibi probiyotik özellikler göstermiştir. İzolatların hemolitik aktivitesi γ -hemolitik olarak belirlenmiştir. Probiyotik özellikleri araştırılan izolatlar arasında en iyi aktivite gösteren TO4 izolatı 16S rDNA dizi analizi sonucunda %99.86 oranında *Limosilactobacillus fermentum* türüne benzerlik göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kolostrum, Probiyotik, Fenol Toleransı, Asit- Safra, Toleransı, Antimikrobiyal Aktivite, Antibiyotiklere Duyarlılık, Ekzopolisakkarit, Otoagregasyon, Koagregasyon, Hidrofobisite, Hemolitik Aktivite.

Mayıs, 2024; 80 sayfa

M.Sc. THESIS

DETERMINATION OF SOME PROBIOTIC PROPERTIES OF BACTERIA ISOLATED FROM COW COLOSTRUM MILK

Mehmet CAMBAZ

Aksaray University

Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biotechnology and Molecular Biology

Supervisor: Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

ABSTRACT

In this study, the probiotic properties of 11 *Lactobacillus* spp isolates isolated from cow colostrum were investigated. As a result of the studies; it was determined that *Lactobacillus* spp. OO1, OO3, OO4 and TO4 isolates showed high tolerance against 0.4 %phenol. Isolated *Lactobacillus* spp. isolates showed sensitivity to low pH condition (pH 2.0), while they maintained their viability at pH 3, pH 4 and pH 7. *Lactobacillus* spp. isolate's average viability in 0.3% and 0.5% bile environments were determined as 8.56 and 8.04 log cfu/mL respectively. The antimicrobial effect of metabolites obtained from *Lactobacillus* spp isolates on food and intestinal pathogens was investigated and results revealed that isolates have antimicrobial activity against test bacteria *Escherichia coli* ATCC 35218 (3.04-17.48 mm), *E. coli* ATCC 11229 (2.64-17.16 mm) *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 (2.24-11.56 mm), *Bacillus cereus* RSKK 863 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (6.98-20.18 mm). *Lactobacillus* spp. isolates were tested using *Lactobacillus* isolates were tested for their susceptibility to ampicillin, ofloxacin, erythromycin, chloramphenicol, netilmicin, gentamicin, and polymyxin antibiotics. While the OO4 strain showed resistance to ampicillin and gentamicin, the TO4 strain exhibited resistance to gentamicin. The production of EPS believed to be effective in the aggregation and hydrophobic activities of probiotic strains was determined between 205.91 and 372.36 mg/L. While autoaggregation activity was observed in *Lactobacillus* spp. isolates at a rate of 9-31%, low levels of coaggregation were observed with test bacteria *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 35218. *Lactobacillus* spp. isolates exhibited hydrophobicity values ranging from 13.5% to 94.80%, 1.15% to 85%, and 1.6% to 84.8%, respectively. Strains TO3, TO4, and OO4, with high EPS production, showed probiotic properties such as aggregation, hydrophobicity, antimicrobial activity, and tolerance to gastrointestinal conditions. The hemolytic activity of these strains was determined as γ -hemolytic. The TO4 isolate, which showed the highest activity among the isolates whose probiotic properties were investigated, showed 99.86% similarity to the *Limosilactobacillus fermentum* species as a result of 16S rDNA sequence analysis.

Keywords: Colostrum, Probiotic, Phenol Tolerance, pH-Bile Tolerance, Antimicrobial Activity, Antibiotic Susceptibility, Exopolysaccharide, Autoaggregation, Coaggregation, Hydrophobicity, Hemolytic Activity.

May, 2024; 80 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının % 0,40 fenol toleransı.	26
Şekil 4.2. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının pH 3' de farklı inkübasyon sürelerindeki canlılıkları.	30
Şekil 4.3. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının pH 4' de farklı inkübasyon sürelerindeki canlılıkları.	31
Şekil 4.4. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının pH 7(kontrol)' de farklı inkübasyon sürelerindeki canlılıkları.	32
Şekil 4.5. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının % 0,3 safra konsantrasyonunda izolatların canlılıkları (Log kob/mL).	36
Şekil 4.6. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının % 0,5 safra konsantrasyonunda izolatların hayatta kalması (Log kob/mL).	37
Şekil 4.7. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının antimikrobiyal aktiviteleri.	40
Şekil 4.8. <i>Lactobacillus</i> spp. MM1 izolatının antibiyotiklere göstermiş oldukları disk difüzyon sonuçları.	44
Şekil 4.9. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları.	45
Şekil 4.10. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarından izole edilen EPS'lere fenol sülfirik asit eklenmiş görüntüsü.	48
Şekil 4.11. Glikoz standart grafiği.	48
Şekil 4.12. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının EPS üretimleri.	49
Şekil 4.13. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının otoagregasyon.	52
Şekil 4.14. En yüksek otoagregasyon belirlenen <i>Lactobacillus</i> spp.TO1.	53
Şekil 4.15. Otoagregasyonu yüksek <i>Lactobacillus</i> spp.TO4.	53
Şekil 4.16. Otoagregasyonu en düşük <i>Lactobacillus</i> spp.MM1.	53
Şekil 4.17. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının koagregasyon aktiviteleri.	58
Şekil 4.18. <i>Lactobacillus</i> sp. TO2 (a) ve OO1 (b) izolatlarının <i>E. coli</i> ATCC 35218 ile koagregasyon görüntüleri.	59
Şekil 4.19. <i>Lactobacillus</i> spp. TO4 izolatlarının (a) <i>E.coli</i> ATCC 35218, (b) <i>S.aureus</i> ATCC 25923 ile koagregasyon görüntüsü.	59
Şekil 4.20. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının % hidrofobisiteleri.	62
Şekil 4.21. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının hemolizin aktivitesi.	64
Şekil 4.22. Hemolitik aktivite (A): β -hemolitik <i>E.coli</i> ATCC 35218 ve (B) α -hemolitik <i>S.aureus</i> ATCC 2593.	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.	8
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan bakteriler ve izolasyon kaynağı.	11
Çizelge 3.2. Man Rogosa Sharpe (MRS) besiyerinin içeriği.	13
Çizelge 3.3. Nutirent Broth (NB) besiyerinin içeriği.	14
Çizelge 4.1. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının % 0,4 fenol toleransı.	25
Çizelge 4.2. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının farklı pH değerlerine toleransı.	29
Çizelge 4.3. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının farklı safra konsantrasyonlarına toleransı (Log kob/mL).....	35
Çizelge 4.4. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının bağırsak patojenleri ve gıda kontaminantları üzerine antimikrobiyal aktivite sonuçları.	41
Çizelge 4.5. CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi.	43
Çizelge 4.6. İnek ağız sütünden izole edilen <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının antibiyotiklere gösterdiği duyarlılık test sonuçları.	43
Çizelge 4.7. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları.	44
Çizelge 4.8. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının EPS üretimleri (mg/L).....	47
Çizelge 4.9. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının yüzde otoagregasyonu.	51
Çizelge 4.10. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının yüzde koagregasyonu.	57
Çizelge 4.11. <i>Lactobacillus</i> spp. izolatlarının %hidrofobisiteleri.	61
Çizelge 4.12. TO4 izolatının 16S rDNA dizi analizi.	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	Amerikan Tür Kültür Koleksiyonu
dk	Dakikada
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EPS	Ekzopolisakkarit
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
g	Gram
GI	Gastrointestinal
GRAS	Genel Olarak Güvenli
HCl	Hidroklorik asit
Ig	İmmünoglobulin
KCl	Potasyum klorür
KH₂PO₄	Monopotasyum fosfat
kob	Koloni oluşturan birim
L	Litre
LAB	Laktik asit bakterileri
Log	Logaritma
M	Mol
Mg	Miligram
mL	Mililitre
MRS	De Man Rogosa Sharpe
Na₂HPO₄	Disodyum fosfat
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NB	Nutrient Broth
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
nm	Nanometre
PBS	Fosfat tamponu
pH	Asitlik bazlık birimi
RSKK	Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu
SF	Serum fizyolojik
spp.	Species (türleri)
TCA	Trikloroasetik asit
TSB	Tryptic Soy Broth
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
α	Alpha
β	Beta
γ	Gama
%	Yüzde
$\pm$	Artı-eksi
°C	Derece (Santigrat)
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre

1. GİRİŞ

Günümüzde hem sağlık hem de beslenme alanlarındaki araştırmaların odağı, insan vücudunun dengeli bir mikrobiyom yapısına sahip olmasının önemi her geçen gün daha fazla artmaktadır (Redondo-Useros vd., 2020). Bağırsak florasındaki dengesizliklerin, sindirim sağlığından bağışıklık sistemi fonksiyonlarına kadar bir dizi sağlık sorununa yol açabileceği belirtilmektedir (Wang vd., 2023). Bu nedenle, probiyotikler gibi faydalı mikroorganizmaların kullanımı, sağlıklı bir mikrobiyomun korunması ve desteklenmesinde önemli bir strateji olmuştur.

Kolostrum, memeli hayvanların doğum sonrasındaki ilk süttür ve yeni doğanın bağışıklık sistemi ve gelişimi için hayati öneme sahip bileşenler içermektedir (El-Loly vd., 2022). Kolostrum ayrıca, yüksek miktarda immünoglobulinler (Ig), büyüme faktörleri, antimikrobiyal peptidler ve diğer biyoaktif bileşenler içerebilmektedir (Playford ve Weiser, 2021). Bu bileşenler, yeni doğanın bağışıklık sisteminin gelişimine katkıda bulunmakta ve onu çevresel patojenlere karşı koruduğu bildirilmiştir.

Son yıllarda, kolostrumun probiyotik özelliklere sahip olduğu ve sindirim sistemi sağlığını doğrudan etkilediği öne sürülmüştür (Ceniti vd., 2023). Ayrıca kolostrum probiyotikleri, geleneksel probiyotiklerin sindirim sistemi ve bağışıklık sistemi faydalarının yanı sıra, kolostrumun kendine özgü besleyici bileşenlerinden de faydalanabileceği düşünülmektedir (Bagwe-Parab vd., 2020).

Bu çalışma kapsamında;

- Besinle alınan ve endojen olarak proteinlerin aromatik amino asitlerinden oluşan fenol, bakteriler üzerinde inhibitörlük etkiye neden olmaktadır. Bu nedenle çalışmamızın ilk basamağında 11 adet *Lactobacillus* spp. izolatlarının %0,4 oranında fenol içeren ortamda gelişim düzeylerinin belirlenmesi,
- Probiyotik mikroorganizmalar oral yolla alındıklarında karşılarına çıkan ilk engel midedeki düşük pH'a bağlı görülen asitlik ve bağırsaktaki safranin antimikrobiyal etkisidir. Bu nedenle bir mikroorganizmanın bağırsağa ulaşarak yararlı sağlık etkilerini gösterebilmesi için gastrointestinal (GI) sistem koşullarına tolerans göstermesi gerekmektedir. Tez çalışmasında *Lactobacillus* spp. izolatlarının GI sistem koşullarına direncinin belirlemek amacıyla pH 2,3

ve 4 olan ortamlardaki canlılık düzeyleri ile bağırsak koşullarına toleransını belirlemek için de % 0, % 0,3 ve % 0,5 oranında sığır safrası içeren ortamlardaki canlılıklarının araştırılarak, bu çalışmalar sonucunda düşük asit ve yüksek safra ortamlarına tolerans gösteren suşların tespit edilerek diğer probiyotik özelliklerinin araştırılması,

- Probiyotikler ürettikleri asit, hidrojen peroksit (H_2O_2), enzim ve antimikrobiyal maddeler ile patojenler üzerinde antimikrobiyal etki göstererek konakçı sağlığının korunmasını sağlayabilmektedir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının ürettikleri metabolitlerin (postbiyotik) çeşitli enfeksiyon ve hastalıklardan sorumlu patojenler üzerindeki (*Bacillus cereus* RSKK 863, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 11229, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) antimikrobiyal etkisinin belirlenerek, yüksek düzeyde antimikrobiyal etki belirlenen patojenler ile *Lactobacillus* spp. izolatlarının koagregasyon aktivitelerinin tespit edilmesi,
- Probiyotiklerin konak organizma üzerindeki yararlı etkilerini sürdürebilmeleri için bağırsakta canlı olarak bulunması gerekmektedir. Probiyotiklerin büyümesini, gelişimini olumsuz etkilediği düşünülen ve klinikte kullanımı yaygın olan farklı etki mekanizmasına sahip antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması,
- Ekzopolisakkaritler (EPS), doğal ekolojik çevrelerde normal metabolik süreçleri sırasında çok çeşitli mikroorganizmalar (bakteri, küf ve mavi-yeşil alg) tarafından üretilen yüksek moleküler ağırlıklı ekstraselüler polimerlerdir. Laktobasiller çok farklı çeşit ve yapısal özelliğe sahip EPS üretirler. Üretilen bu polimerler bakteriyi asit, safra, antibiyotik vb. gibi stres koşullarından koruyabilmekte, probiyotiklerin epitel yüzeylere tutunmasında ve koagregasyon aktivitelerinde etkili olabilmektedir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının EPS üretimleri mg/L olarak belirlenerek, stres koşullarına tolerans ile EPS üretimi arasındaki ilişkinin araştırılması, ayrıca agregasyon ve hidrofobisite ile EPS üretimi arasındaki korelasyonun istatistiksel olarak tespit edilmesi,
- Probiyotiklerin bağırsaktaki epitel yüzeylere kolonize olması konak üzerindeki yararlı etkilerinin sürdürülmesi açısından önemlidir. Epitel yüzeylere tutunabilmesi için probiyotiklerin agregasyon özellikleri göstermesi ve

hidrofobisite ile hücre yüzey özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle *Lactobacillus* spp. izolatlarının agregasyon ve hidrofobisite özelliklerinin araştırılması,

- Probiyotik olarak kullanılan bakterilerin insan sağlığını olumsuz etkilememesi için patojen özellik göstermemesi gerekmektedir. Sitolizin virülensliğe katkı sağlayan, hemolitik aktivitenin oluşmasında rol oynayan bir toksindir. Kolostrumdan izole edilen laktobasillerin patojenitelerinin tespit edilmesi için hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi,
- Tez çalışması sonucunda probiyotik özellikler sergileyen izolatların genomik DNA'ları izole edilerek, sekans analizleri hizmet alımı ile yapılarak tür düzeyinde isimlendirmeleri yapılmıştır. Belirlenen izolatlar tez çalışmasının devamında yapılacak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla güvenilirliği belirlenerek çiftlik hayvanlarının yemlerinde doğal katkı olarak kullanımları amaçlanmaktadır

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Kolostrum

Kolostrum, memeliler tarafından doğumdan hemen sonra üretilen, β -karoten nedeniyle kalın ve sarı renge sahip benzersiz besleyici ilk süt olarak tanımlanmıştır. Kolostrumun içeriği ve fiziksel özellikleri; kaynağın cinsine, beslenme türüne, sağlık durumuna ve doğum ardından geçen süre gibi faktörlerden etkilenmektedir (Hyršlova vd., 2020). Kolostrum, yenidoğanı hastalıklara karşı koruyan antikorlara sahiptir ve normal süten daha düşük lipid ve daha yüksek protein içermektedir (Chattha vd., 2013). Kolostrumdaki antikorlar, lizozim, laktoferrin, laktoperoksidaz ve sitokinler gibi bileşikler antimikrobiyal özelliklere sahiptir. Ayrıca kolostrum, probiyotik potansiyeli olan bakterilerin izolasyonu için önemli bir rezervuar olarak kullanılabilir, patojenik bakterilere karşı antibakteriyel etkiye sahip olabilen *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Weissella* gibi farklı cinslere ait bakteriler içerebilmektedir. Bu bakteriler patojenler üzerinde bakteriyostatik ve bakterisidal aktivite gösterebilmektedirler (Hyršlova vd., 2020). Kolostrumdaki probiyotikler; yara iyileşmesi, obezite yönetimi, kas protein sentezi, solunum yolları enfeksiyonları, antiviral ve antibakteriyel özellikler bakımından sağlık üzerinde olumlu etkiler sergilemektedir (Mehra vd., 2022). Ayrıca prebiyotik etkiye sahip oligosakkaritler, kolostrumda doğal olarak bulunmaktadır. Kolostrumda bulunan prebiyotikler, probiyotik mikroorganizmaların büyümesinde ve gelişmesinde rol oynamaktadırlar (Hyršlova vd., 2016).

2.1.1 Kolostrum bileşenleri

Kolostrum, dişi memelilerin doğumdan hemen sonra, yavruya yüksek kaliteli beslenme diyeti, büyüme ve doku onarım faktörleri ile bağışıklığını geliştirmesini sağlayan, besin açısından zengin biyolojik sıvıdır (El-Loly, 2022). Kolostrum, olgun süte göre daha az laktoz ve daha fazla yağ, protein, vitaminler, mineraller, hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve nükleotidler içerir. Doğumdan ilk üç gün sonrasında bileşiklerin içerikleri azalarak olgun süte dönüşümü gerçekleşmektedir. Normal süte üç farklı ana sınıf bulunan Ig'ler (IgG, IgM ve IgA) toplam süt proteinini yaklaşık %1'ini oluştururken, kolostrumda ise %70-%80'ini oluşturmaktadır (McGrath vd.,

2016). Kolostrum; laktoferrin, laktoperoksidaz, lizozim gibi antimikrobiyal peptitlerde içermektedir. Büyüme faktörleri (epidermal büyüme faktörü, dönüştürücü, insülin benzeri büyüme faktörleri, fibroblast, trombosit türevi ve büyüme hormonu) doğum sonrası ilk 0-72 saat içinde kolostrumda bol miktarda bulunmaktadır. Laktoferrin transferin ailesine ait bir glikoprotein olup kolostrumda bulunan demire bağlanarak antibakteriyel, antiviral, antikanser aktiviteye sahiptir ve bağışıklık sistemin düzenlenmesi ile modülasyonunu sağlamaktadır (Yugis vd., 2015) Laktoperoksidaz, H₂O₂ varlığında mikrobiyal enzimlerdeki ve protein gruplarındaki sülfidril gruplarını oksitleyerek bakteriyel metabolizmayı engelleyen toksik bir bileşiktir (Fox vd., 2006). Lizozim, sindirim sırasında sindirilmeyen fakat yaralı bakterileri destekleyen bir enzimdir (Farkye vd., 2003). Prolin içeriği bakımından zengin polipeptitler timusu destekler ve aşırı aktif bir bağışıklık sistemini dengelemeye yardımcı olmaktadır (Farkye vd., 2003). Kolostrumdaki sitokinler ve interlökinler ana immünomodülatör karakterizasyonlara sahip küçük peptit molekülleridir, bağışıklık sistemini düzenlemesini sağlamaktadır (Sun vd., 2013). İnterferonlar ise vücudun tüm hücrelerinde virüs replikasyonunu inhibe eden özel bir protein olarak görev yapmaktadır (Boudry vd., 2008).

2.1.2 Kolostrum probiyotikleri

Kolostrum probiyotikleri bebekler için en güvenilir bakterilerdir ve anne kaynaklı olduğundan insan vücuduna uyum sağlayabilen güvenilir bir kaynak olarak kabul edilmektedir (Srikham vd., 2022). Kolostrumda bulunan probiyotiklerin; bebek bağırsağında antimikrobiyal bileşik üretimi, enfeksiyon insidansının ve şiddetinin azaltılması ile bağırsak geçirgenliğini azaltarak bağırsak bariyer fonksiyonunun iyileşmesinde önemli katkıları bulunmaktadır (Albesharat vd., 2011). Kolostrumda çok miktarda *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* cinlerine ait farklı türler (Sakwinska vd., 2016) ile *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium* ve *Weissella* (Albesharat vd., 2011) cinsine ait bakteri türleride bulunabilmektedir. Kolostrumdaki probiyotikler kolon kanserinin tedavisinde (Srikham vd., 2022), sindirim, solunum, iltihaplanma ve kemik büyümesi hastalıklarını iyileştirmek için kullanılabilmektedir (Sakwinska vd., 2016).

Ayrıca kolostrum probiyotikleri hayvan yemleri, sporcu beslenmesi, bebek formülleri, fonksiyonel gıdalar, besin takviyesi ürünleri, farmasötik ve kozmetikte dünya

pazarında popülaritesini korumaktadır (Mehra vd., 2020; Pietrzak vd., 2020; Silva vd., 2019).

2.2 Probiyotik

Probiyotikler, “Yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya sağlık açısından fayda sağlayan, canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (Hill vd., 2014). Probiyotik mikroorganizmalar, laktik asit bakterileri (LAB), *Bifidobacterium* türleri, *Bacillus* ve mayalar olmak üzere birçok farklı türleri içerirler. LAB grubu altındaki *Lactobacillus*, gram-pozitif ve katalaz-negatif bakteri cinsi endüstriyel işlemlerde, ilaç ve kozmetik imalatında kullanılan en eski probiyotikler olarak bildirilmiştir (de Melo Pereira vd., 2018). LAB, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* farklı türler içerirler (Zheng vd., 2020). LAB glikoz metabolizmasında Embden-Meyerhof-Parnas yoluyla sadece laktik asit üreten homofermentatif laktik asit, pentoz monofosfat yoluyla ise etanol, asetik asit ve karbondioksit gibi yaşamsal faaliyetleri yerine getirmesi için biricil metabolit üretir. LAB ayrıca fermente gıdaların kalitesini ve raf ömrünü artırmak için kullanılan bakteriyosinler, ekzopolisakkaritler ve enzimler dahil olmak üzere ikincil metabolitler üretebilir (Carr vd., 2002). *Bifidobacterium*; glikoz, galaktoz, laktoz ve fruktozu sindirme yeteneğine sahip heterofermentatif, katalaz-negatif ve anaerobik bakterilerdir. Antikanser aktivitesi, anti-inflamatuar, enterit, laktoz intoleransı, kabızlık, ağız iltihabı rahatsızlıklarına karşı kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca yenidoğan bağırsak florası, doğumdan sonraki ilk birkaç gün içinde kurulur ve bebeklik dönemindeki mikroflora bileşiminin neredeyse %80’ini bifidobakteriler oluşturmaktadır (de Melo Pereira vd., 2018). *Bacillus* spp. türleri gram pozitif, aerobik bakteri grubuna ait probiyotik türleridir. En bilinen özelliği gıda sektöründe uzun raf süreleri boyunca canlılığı korumasına sebep olan endosporların oluşumudur (Zheng vd., 2020). Mayalar; heterojen ökaryotik mikroorganizma grubunu oluşturur (Foligné vd., 2010). Protein, B vitamini, iz mineralleri ve çeşitli bağışıklık uyarıcı bileşiklerin yüksek içeriğinden dolayı bu mikroorganizmaların probiyotik olarak kullanımına olan ilgi artmıştır (Fadda vd., 2017). Ayrıca, mayaların antibiyotiklere duyarsızlık ve endüstriyel işleme koşullarına karşı iyi tolerans avantajlarına sahip olduğu da bilinmektedir (Morgunov vd., 2013).

2.2.1 Probiyotik seçim kriterleri

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'nin (EFSA) önerilerine göre probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların güvenlik ve işlevsellik kriterlerini sağlaması gerekmektedir (de Melo Pereira vd., 2018). Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kullanılabilmesi için;

- i. İnsan vücudunun stres koşullarına (amilaz, lizozim, düşük pH, safra tuzları ve fenole) tolerans göstermeli (Martins vd., 2008),
- ii. GI epitel hücrelerinde kolonize olabilmeli (agregasyon, hidrofobisite ve memeli epitel hücrelerine yapışma) (Martins vd., 2008),
- iii. Bağırsakta bulunana patojenlere karşı antagonistik etki göstermeli (Duany vd., 2011),
- iv. Antibiyotik direnç genleri içermemeli,
- v. Patojen olmamalı,
- vi. Konakçının bağışıklık sistemini uyarmalı (Markowiak ve Slizewska, 2017),
- vii. Kanserojen özellik göstermemeli (Tuomola vd., 2001),
- viii. Konakçıya zararsız olmalıdır (Bezkorovainy, 2001).

2.2.2 Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Probiyotik mikroorganizmalar, LAB, *Bifidobacterium* spp., *Bacillus* spp. ve mayalar olmak üzere Çizelge 2.1'de gösterildiği gibi birçok farklı türleri içermektedir (Tripathi ve Giri, 2014). *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri en fazla çalışılan, uzun güvenli kullanım geçmişine sahip ve “Genel Olarak Güvenli (GRAS)” statüsünde kabul edilmiştir (Doron ve Snyderman, 2015; Dimitrellou, vd., 2016).

Bazı lakobasiller ve bifidobakterilerin aside karşı direnç gösterdiği için gıda substratlarına uyum sağladıklarını rapor etmişlerdir (Tripathi ve Giri, 2014). Probiyotik özelliklerin ve faydaların yalnızca cinsine bağlı değil, aynı zamanda suşa da bağlı olduğu gösterilmiştir (Nuraida, 2015).

Çizelge 2. 1. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar (de Melo Pereira vd., 2018).

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lacticaseibacillus casei</i> , <i>Limosilactobacillus reuteri</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>lactobacillus gallinarum</i> , <i>Limosilactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Levilactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus murinus</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus amylovorus</i> , <i>Lentilactobacillus kefir</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp	<i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium thermophilum</i> , <i>Bifidobacterium pseudolongum</i>
Maya	<i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Diğer mikroorganizmalar	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Leuconostoc citreum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>Thermophilus</i> , <i>Bacillus cereus</i>

2.2.3 Probiyotik özellikler

2.2.3.1 Gastrointestinal sistemde hayatta kalma yeteneği

Probiyotik mikroorganizmalar oral yolla alındıklarında karşılarına çıkan ilk engel midedeki düşük pH'a bağlı görülen asitlik ve bağırsaktaki safranin antimikrobiyal etkisidir. Bu nedenle bir mikroorganizmanın bağırsağa ulaşarak yararlı sağlık etkilerini gösterebilmesi için GI sistem koşullarına tolerans göstermesi gerekmektedir. (de Melo Pereira vd., 2018). Probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin düşük pH, mide suyu, pepsine, bağırsaklarda safra tuzlarına, diyetle alınan ve endojen olarak proteinlerin aromatik amino asitlerinden oluşan fenole toleransı belirlenmelidir (Pinto vd., 2006). Mide bağırsak koşullarına tolerans gösteren probiyotik mikroorganizmaların diğer probiyotik özellikleri ve sağlık üzerindeki etkileri araştırılmaktadır (Martins vd., 2008).

2.2.3.2 Epitel yüzeye tutunma

GI sistem koşullarına tolerans gösteren suşların bağırsakta epitel yüzeylere kolonize olarak yararlı sağlık etkilerini göstermeleri beklenmektedir (Duany vd., 2011). Epitel hücrelerine mikrobiyal yapışma, probiyotik mikroorganizmalarının hücre yüzeyinin fizyokimyasal bileşimi ile insan bağırsak hücrelerinin epitel zarı arasında olan etkileşim sürecidir. Bu süreç hedef hücre yüzeylerindeki elektrostatik ve Van der Waals etkileşimlerinin dengede olmasına bağlıdır (Boonaert ve Rouxhet, 2000). Bakterilerin epitel hücrelere yapışmasının hem agregasyon (oto- ve koagregasyon) kapasitesi hem de hidrofilik özellikleriyle ilgili olduğu bildirilmiştir. Agregasyon yeteneği probiyotiklerin bağırsakta belirli bir hücre yoğunluğuna ulaşmasını ve patojenlerin inhibisyonunu sağlarken, hidrofobisite ise bakteri hücre yüzeyinin özelliği (asidik, bazik ya da nötr) ve epitel hücre ile etkileşimi hakkında bilgi sağlamaktadır (Ogunremi vd., 2015).

2.2.3.3 Probiyotiklerin patojenik bakterilerin canlılığı üzerindeki etkisi

Probiyotiklerin en önemli özelliklerinden biri de hücre metabolizmaları sonucu ürettikleri organik asit, enzim, H₂O₂ ve bakteriyosin gibi maddeler ile patojenler üzerinde antimikrobiyal etki göstermeleridir. Probiyotikler ürettikleri antimikrobiyal maddeler ile bağırsakta bulunan patojenleri inhibe ederek konakçı sağlığının korunmasını sağlayabilmektedir. Probiyotikler bağırsağa yapıştıktan sonra patojenler

üzerindeki antimikrobiyal etkilerini ürettikleri metabolitler ve koagregasyon mekanizmaları ile sürdürebilmektedirler (Lebeer vd., 2008; Vera-Pingitore vd., 2016).

2.2.3.4 Probiyotiklerin güvenirliliği

Avrupa topluluğu (QPS ve PROSAFE) ve Amerika Birleşik Devletleri (FDA ve WHO) tarafından yürütülen bazı girişimler, insanlar için probiyotiklerin güvenlik değerlendirmesi için kriterler oluşturma çalışmaları yapmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda güvenirlilik için probiyotik mikroorganizmanın izolasyon geçmişinin ve taksonomik tanımlamasının bulunması, ayrıca virülans, enfektivite, toksisite, hemolitik aktivite ve aktarılabılır antibiyotik direnç genlerinin içermemesi gerektiğini bildirmişlerdir (Sanders vd., 2010).

2.2.3.5 Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkileri

Probiyotiklerin; anti-obezite (de Melo Pereira vd., 2018), laktoz intoleransının düzenlenmesi (Salminen vd., 2002), anti-kanserojenik etki (Srikham vd., 2022), serum kolesterolünün düşürülmesi, antibiyotikle ilişkili ishal (Hempel vd., 2012), nekrotizan enterokolit (Sanders vd., 2010), irritabl bağırsak sendromu (Srikham vd., 2022), *Clostridium difficile* ilişkili sindirim bozuklukları ve iltihaplı bağırsak hastalığı, ülseratif kolitte, egzama (Rather vd., 2016) ve alerjik rinit (Berings vd., 2017) gibi sağlık üzerine birçok olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri

Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Kültür Koleksiyonunda bulunan ve Aksaray'daki ineklerin ağız sütünden izole edilen 11 bakteri suşu kullanılmıştır. İzole edilen suşların yapılan gram boyama, şeker ve fizyolojik testlerin sonuçlarına göre *Lactobacillus* spp. cinsine ait olduğu daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir. Tez çalışmasında kullanılan suşlar ve izolasyon kaynağının listesi Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Çalışmalarda kullanılan bakteriler ve izolasyon kaynağı.

No	İzolatlar	İzolasyon Kaynağı
1.	<i>Lactobacillus</i> spp. TO1	İnek ağız sütü
2.	<i>Lactobacillus</i> spp. TO2	İnek ağız sütü
3.	<i>Lactobacillus</i> spp. TO3	İnek ağız sütü
4.	<i>Lactobacillus</i> spp. TO4	İnek ağız sütü
5.	<i>Lactobacillus</i> spp. OO1	İnek ağız sütü
6.	<i>Lactobacillus</i> spp. OO2	İnek ağız sütü
7.	<i>Lactobacillus</i> spp. OO3	İnek ağız sütü
8.	<i>Lactobacillus</i> spp. OO4	İnek ağız sütü
9.	<i>Lactobacillus</i> spp. MM1	İnek ağız sütü
10.	<i>Lactobacillus</i> spp. MM3	İnek ağız sütü
11.	<i>Lactobacillus</i> spp. I6	İnek ağız sütü

3.1.2 Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları

Bakterilerin geliştirilmesinde De Man Rogosa Sharpe (MRS) Broth (Merck) ve MRS Agar (Merck) besi ortamları kullanılmıştır. Bakterilerin 37°C’de 18-24 saat aralığında kültürler en az iki kez aktifleştirilmiştir. Test bakterisi olarak kullanılan *S. enteritidis* ATCC 13076, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 11229, *S. aureus* ATCC 25923’ in aktivasyonu Nutirent Broth (NB) besiyerinde (Merck) ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 patojenlerinin aktivasyonu Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerinde (Merck) 37 °C’de 18-24 saat ayrıca *B. cereus* RSKK 863’ in aktivasyonu ise 30°C’de 18-24 saat geliştirilerek yapılmıştır. Çalışmaların hepsinde ilk aşama olarak kültürlerin hücre yoğunlukları (Optikal Density, OD) spektrofotometrede (Beckman Coulter, DU 730 UV/VIS) 600 nm ölçülerek ve bakterilerin hücre sayıları MRS agar besiyerinde kob/mL olarak değerlendirilmiştir.

3.1.3 Çalışmalarda kullanılan besiyerleri

LAB'ın üretiminde MRS besiyeri olarak bilinen ve Çizelge 3.2'de bileşimi verilen besin ortamı kullanılmıştır. Besin ortamındaki içeriği tartılarak üzerine 1000 mL distile su ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı ile homojenize olana kadar karıştırılmıştır. Besin ortamlarının pH'ı 1 M sodyum hidroksit (NaOH) ve 1 M hidroklorik asit (HCl) ile $6,8 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve otoklavda 121°C 'de 15 dakika sterilize olduktan sonra deneylere hazır hale getirilmiştir.

Çizelge 3. 2. Man Rogosa Sharpe (MRS) besiyerinin içeriği.

Bileşenler	Miktar (g/L)
Pepton	10
Et ekstraktı	8
Maya ekstraktı	4
Glukoz	20
Tween 80	1
Di potasyum hidrojen ortofosfat	2
Magnezyum sülfat $7.\text{H}_2\text{O}^+$	0,2
Amonyum sitrat	2
Sodyum asetat $3.\text{H}_2\text{O}^{\circ}$	5
Manganez sülfat	0,05
Agar ¹	15

¹Katı besiyeri hazırlamak için kullanıldı.

+ 20 mL %1 solüsyon

[°]5 mL %1solüsyon (de Man vd., 1960).

Test bakterileri üreme ve gelişiminde Nutirent Broth (NB) besiyeri, Çizelge 3.3'te verilen bileşenlerden hazırlanmıştır. Bileşenler ölçülerek 1000 mL distile suya ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Besiyerinin pH değeri 1 M NaOH ve 1 M HCl ile $7,0 \pm 0,2$ olarak ayarlanmış ve otoklavda 121°C 'de 15 dk süreyle sterilize edilmiştir. Bu besiyeri, *S. enteritidis* ATCC 13076, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 11229, *S. aureus* ATCC 25923 gibi bakteri türlerinin gelişimini sağlamak için deneylerde kullanılmıştır.

Çizelge 3. 3. Nutirent Broth (NB) besiyerinin içeriği.

Bileşenler	Miktar (g/L)
Pepton	5
Et ekstraktı	3
Agar ¹	15

¹Katı besiyeri hazırlamak için kullanıldı (Gray vd., 1950).

L. monocytogenes ATCC 7644 bakteri suşunun üretiminde Tryptic Soy Broth (TSB) besiyeri (Merck) kullanılmıştır. Besiyerinin pH değeri 1 M NaOH ve 1 M HCl ile $7,0 \pm 0,2$ olarak ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize olduktan sonra deneylere hazır hale getirilmiştir (Hawkey vd., 1986).

Çalışmalarda kullanılan serum fizyolojik çözeltisi (SF) ise %0,875 oranında sodyum klorür (NaCl)'ün tartılmasının ardından saf suda çözündürülüp ve 121°C'de 15 dk steril hale getirilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan 0,01 Molar (M) fosfat tamponu (PBS) 1,361 gr monopotasyum fosfat (KH₂PO₄), 1,780 gr disodyum fosfat (Na₂HPO₄), %0,8 NaCl, %0,2 potasyum klorür (KCl) tartılarak 1000 ml saf su içerisinde çözündürülerek pH 7,2'ye ayarlanarak 121°C'de 15 dk boyunca steril hale getirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1 Bakteri kültürlerinin muhafazası

Deneylerde kullanılan suşlar, uygun besiyerlerinde iki defa kültüre alınmıştır. Cryo tüplerde 0,4 mL gliserol ilave edildikten sonra 121°C’de 15 dakika otoklavlama ile sterilize edilmiştir. Kültürlerden 0,6±0,02 mL ölçülerek steril gliserol tüplere aktarılmış ve hazırlanan stoklar -40°C’de saklanmıştır. Stoklar her altı ayda bir yenilenmiştir.

3.2.2 *Lactobacillus* spp. izolatlarının fenol toleransının belirlenmesi

Lactobacillus spp. izolatlarının fenole karşı tolerans yetenekleri Gupta vd. (2021) metotlarında bazı modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. MRS Broth besi ortamında %2 oranında *Lactobacillus* spp. izolatlarının ekimi yapılarak 37°C’de 18-24 saat aralığında geliştirilen kültürler, en az iki kez aktiveleştirildikten sonra hücre yoğunluğu spektrofotometrede (Beckman Coulter, DU 730 UV/VIS) 600 nm’de $0,6 \pm 0,02$ ayarlanmış ve canlı hücre sayısı kob/mL olarak belirlenmiştir. Hücre yoğunluğu ayarlanan suşlardan %0,4 fenol (Sigma) içeren MRS ve fenol içermeyen MRS broth (kontrol) ortamında %2 oranında ekim yapılarak 37°C’de 18-24 saat aralığında inkübe edilmiştir. İnkübasyona bırakılan kültürlerinden inkübasyonun başlangıcında (t=0) ve 24 saat sonunda 100 µL alınıp SF (%0,875) ile dilüe yapılmıştır (10^{-1} ’den 10^{-7} ’ye kadar). Canlı bakteri sayısının tespiti için MRS agar besiyerlerine ekilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında bakteri sayısındaki nispi artış, fenole direncin bir göstergesi olarak % canlılık olarak belirlenmiştir. Eş. 3.1’de verilen formül kullanılarak suşların % canlılıkları hesaplanmıştır.

$$\%canlılık = (OD_{24} - OD_0)/OD_0 \times 100 \quad (3.1)$$

OD₀: 600 nm’de $0,6 \pm 0,02$ ’ye ayarlanan ilk optikal dansite

OD₂₄: 600 nm’de son optik dansite

3.2.3 *Lactobacillus* spp. izolatlarının farklı pH değerlerine toleransının belirlenmesi

Lactobacillus spp. izolatlarının düşük pH'daki asit ortamlara toleransın Techo vd. (2019)'nın metotlarına göre belirlenmiştir. MRS broth besiyerine %2 oranında *Lactobacillus* spp. izolatlarının ekimi yapılarak 37°C'de 18-24 saat geliştirilen kültürler, en az iki kez aktifleştirilmiştir. Kültürler 8400 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj (Gyrozen, 1848R) edilerek pellet 2 defa SF (%0,875) ile yıkanmıştır. Pellet 1 mL SF içerisinde resüspanse edilerek, hücre yoğunluğu 5 mL MRS ortamda spektrofotometrede (Bekman Coulter, DU 730 UV/VIS) 600 nm'de $0,6 \pm 0,02$ ayarlanmış ve canlı bakteri sayısı kob/mL olarak tespit edilmiştir izolatların farklı pH koşullarına direncini belirlemek için MRS Broth'un pH'ı 6M, 3M, 1M ve 0,1M HCl derişimleri kullanılarak pH 2,3,4 ve 7 (kontrol) değerlerine ayarlanmıştır. Farklı pH değerlerine ayarlanan MRS broth besiyerlerine OD'si 600 nm $0,6 \pm 0,02$ 'ye ayarlanan bakteri kültürlerinden %2'lik ekim yapılmış ve 37°C'de 0,1,2,3,4 saat süreler için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kültürlerin yoğunlukları spektrofotometrik olarak ölçülerek (600 nm) canlılığın tespiti için 10^{-1} 'den 10^{-7} 'ye kadar olan seyreltimleri MRS agar besiyerine ekilmiştir. Ekim yapılan petriler canlı kolonilerin tespiti için 37°C'de 18-24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda pH 2,3,4 ve 7 (kontrol) ortamlarındaki canlı hücre sayıları kob/mL olarak hesaplanmıştır (3.2).

$$\text{Log} \frac{\text{kob}}{\text{mL}} = \log_{10} \left(\frac{\text{koloni sayısı} \times \text{seyreltme faktörü}}{\text{Ekilen hacim (mL)}} \right) \quad (3.2)$$

Koloni sayısı= inkübasyon sonunda petrilerde sayılan koloni sayısı

Seyreltme faktörü=Petrilere ekim yapılan dilisyon oranı (10^n)

3.2.4 *Lactobacillus* spp. izolatlarının farklı safra konsantrasyonlarına toleransının belirlenmesi

Lactobacillus spp. izolatlarının %0, %0.3 ve %0.5 'lik farklı safra konsantrasyonlarına toleransı Techo vd. (2019) ve Wang vd. (2023)'ın metotlarında bazı modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. MRS Broth ortamında %2 *Lactobacillus* spp. izolatlarının ekimi yapılarak, 37°C'de 18-24 saat boyunca inkübe edilen kültürler, iki kez aktifleştirilip ardından kültürler 8400 rpm'de 10 dk santrifüj (Gyrozen, 1848R) edilmiş ve pellet 2 kez SF (%0,875) ile yıkanmıştır. Pellet 1 mL SF içerisine resüspanse edilerek, hücre yoğunluğu 5 mL MRS ortamda spektrofotometrede (Beckman Coulter, DU 730 UV/VIS) 600 nm'de $0,6 \pm 0,02$ ayarlanmış ve canlı bakteri sayısı kob/mL olarak tespit edilmiştir. OD değerleri belirlenen *Lactobacillus* spp. izolatlarından %2 oranında, %0,0 (kontrol), %0,3 ve %0,5 oranlarında safra (sığır safrası, Sigma) içeren MRS sıvı besiyerlerine inoküle edilerek 37°C'de inkübe edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda safra içeren MRS ortamlarından inkübasyonun 0, 3. ve 6. saat periyotlarında örnekler alınarak spektrofotometrede (Beckman Coulter, DU 730 UV/VIS) 600 nm'de OD değerleri ve canlı bakteri sayısı MRS agar besi ortamında kob/mL olarak hesaplanmıştır (3.2).

3.2.5 *Lactobacillus* spp. izolatlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

Lactobacillus spp. izolatlarının test bakterileri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi Beristain vd. (2016)'ye göre belirlenmiştir. Test bakterileri (*L. monocytogenes* ATCC 7644, *B. cereus* RSKK 863, *S. enteritidis* ATCC 13076, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 11229, *S. aureus* ATCC 25923) uygun besi ortamlarında %2 oranında iki kez aktifleştirildikten sonra kültürler 5000 rpm'de 15 dk santrifüj yapılmıştır. Pellet 2 kez SF (%0,875) ile yıkanmış ve 1 mL SF içerisine resüspanse edilmiştir. Ardından hücre yoğunlukları McFarland (bioMerieux) 0,5 göre ayarlanmıştır. Bu işlemlerle eş zamanlı olarak *Lactobacillus* spp. izolatlarının postbiyotik eldesi için MRS Broth besiyerine %2 oranında inokülasyonu yapılarak 37°C'de 18-24 saat geliştirilen kültürler, 1 dakikalık aralıklarla 5 dakika sonikasyona (hielscher, UP100H Ultrasonicator) maruz bırakılmıştır. Bu işlemin ardından *Lactobacillus* spp. izolatlarının 4000 g de 4°C 10 dk santrifüj (Gyrozen, 1848R) yapılarak, süpernatant 0,45 µm disposable filtreden (ISOLAB, Syringe Filter) geçirilerek postbiyotik elde edilmiştir. Yoğunluğu ayarlanan test bakterilerinden (*L. monocytogenes* ATCC 7644 için TSA ve *B. cereus* RSKK 863, *S. enteritidis* ATCC 13076, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 11229, *S. aureus* ATCC 25923 için NA) steril edilerek 50 °C'ye kadar soğutulmuş olan agar besiyerlerine %2

oranında inokülasyon yapılarak homojen bir şekilde karışması sağlanarak petrilere dökülmüştür. Besiyelerinin donması için 2 saat bekletilip, donan katı besiyelerinin üzerine delgeç yardımıyla kuyular açılmıştır. Bu kuyulara hazırlanan postbiyotiklerden 200 µL eklenerek 37°C’de 18-24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyunun etrafındaki zonların çapı (mm) kumpas yardımıyla, antimikrobiyal aktivite inhibisyon zon çaplarına göre belirlenmiştir.

3.2.6 *Lactobacillus* spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi

Probiyotik bakterinin üremesini ve gelişimini negatif yönde etkilendiği düşünülen ve klinik olarak kullanımı yaygın olan antibiyotiklerin duyarlılıklarının incelenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Katiku vd., 2022). *Lactobacillus* spp. izolatlarının hücre duvar sentezini inhibe eden ampisilin (10 mcg), protein sentezini inhibe eden eritromisin (10 µg), gentamisin (10 µg), netilmisin (10 µg) ve kloramfenikol (30 µg); nükleik asit sentezini inhibe eden ofloksasin (5 µg) ve sitoplazmik zar sentezini inhibe eden polimiksin (300 U) antibiyotik diskleri kullanılarak 4 farklı sınıfı temsil eden 7 farklı antibiyotik disk (Oxoid) ile antibiyotik duyarlılıkları test edilmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının 10^5 kob/mL’lik aktif kültürlerden (600 nm de $0,6 \pm 0,2$ optikal yoğunluğunda) MRS agar besiyerine 100 µL aktarılmış ve steril drigalski ile besiyerinde homojenize olarak yayma ekim yapılmıştır. Besikültürü içeren petri üzerine antibiyotik diskleri steril koşullarda yerleştirilmiş ve 37 °C’de anaerobik koşullarda 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından antibiyotik diskin etrafında görülen zonların çapı kumpas ile milimetrik olarak ölçülerek izolatların antibiyotiklere duyarlılıkları araştırılmıştır. Sonuçlar CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

3.2.7 *Lactobacillus* spp. izolatlarının eksopolisakkarit (EPS) üretimlerinin belirlenmesi

Lactobacillus spp. izolatlarının ekso polisakkarit (EPS) üretimleri, asit ve safraya toleransında önemli olduğu ayrıca probiyotik bakterilerin agregasyon aktivitelerini etkilediği için araştırılmıştır. *Lactobacillus* spp. izolatların EPS üretimini Kšonžeková vd. (2016)'nin metoduna göre belirlenmiştir. MRS broth besiyerinde aktifleştirilen suşların 2. aktif kültürlerinin optik yoğunlukları 600 nm $0,600 \pm 0,002$ ayarlanarak, MRS broth besiyerinde %2 oranından aşılanmış ve 37°C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından suşların ürettiği EPS'nin izolasyonu için 1 mL ependorflara alınarak örnekler 100°C'de 15 dk kaynatılmış ve buz üzerinde soğutma işlemi yapılmıştır. Örneklerin ısıları oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 12000 rpm'de 15 dk 4°C'de santrifüj (Gyrozen, 1848R) yapıp ardından süpernatant ependorflara aktarılmıştır. Protein ve peptitlerin indirgenmesi için süpernatantın üzerine 1,7 µL triklor asetik asit (TCA) (%85) (Merck) eklenerek, 4°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlanmasının ardından süpernatant ependorfa aktarılıp, 1 (örnek): 3 (alkol) oranında saf (absolute) alkol ile karıştırılmış, 4°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. EPS'nin çökeltilmesi için 24 saatlik inkübasyonun ardından örnekler 12000 rpm'de 30 dk 4°C'de santrifüj (Gyrozen, 1848R) işlemi gerçekleştirilmiştir. Pellet içerisindeki alkol dökülüp tekrar 500 µL alkol eklenmiş ve 12000 rpm'de 30 dk 4°C'de santrifüj (Gyrozen, 1848R) işlemi tekrarlanıp EPS pelletlerinin yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Pelletteki alkol dökülerek 40°C'de kuruma aşaması gerçekleştirilmiştir. Kültürlerin ürettiği EPS'yi hesaplamak için elde edilen EPS 1 mL steril saf su içerisinde çözülerek, üzerine 0,5 mL fenol ve 5 mL sülfirik asit (Carlo Erba) (H₂SO₄) eklemesinin ardından oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakılmıştır (körv için EPS yerine 1 mL saf su kullanılmıştır). İnkübasyonun ardından kültürler mekanik karıştırıcı (İka vortex, Geni vs3) yardımıyla karıştırıldıktan sonra 30°C'de 15-20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra örneklerin yoğunluğu spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda (Beckman Coulter, DU 730 UV/VIS) ölçülüp, kültürlerin üretmiş olduğu EPS'yi hesaplamak için 5-100 mg/L aralığında değişim gösteren glikoz çözeltisi kullanılarak bir standart elde edilmiştir ve bu standarta göre üretilen EPS miktarı mg/L cinsinden belirlenmiştir.

3.2.8 *Lactobacillus* spp. izolatlarının agregasyon özelliklerinin tespiti

Lactobacillus spp. izolatların agregasyon özelliklerini belirlemek için otoagregasyon ve koagregasyon deneylerinde izolatlarının MRS sıvı besiyerinde 37°C'de 18-24 saat

boyunca ard arda iki kez aktifleştirilerek aktif kültürler 8400 rpm’ de 10 dk santrifüj (Gyrozen, 1848R) yapılmıştır. Santrifüjden sonra pelet PBS (pH 7,2) ile 2 kez yıkama işlemine maruz bırakılarak aynı tamponda yeniden süspanse edilmiş ve OD’si spektrofotometrede (Beckman Coulter, DU 730 UV/VIS) 600 nm de $1.0 \pm 0,02$ ’ye ayarlanmıştır. Test bakterilerinin, Nutrient broth besi ortamında 37°C’de 24 saat boyunca inkübasyonla geliştirilen *E. coli* ATCC 35218 ve *S. aureus* ATCC 25923 içinde aynı işlemler uygulanmıştır.

3.2.8.1 Otoagregasyon

Lactobacillus spp. izolatların optikal yoğunluğu (OD) 600 nm de $1,0 \pm 0,02$ olarak ayarlanmış olan izolatlardan 4 mL ve üç paral olarak tüplere aktarılıp 37°C’de 4 saat boyunca inkübasyona (Nüve, FN 120) bırakılmıştır. Inkübasyon süresinin ardından üsteki fazdan 0,1 mL alınarak, 0,9 mL fosfat tamponu ile dilüsyon yapılarak optikal yoğunluğu spektrofotometrede (Beckman Coulter, DU 730 UV/VIS) 600 nm de ölçüm yapılmıştır. Eş. 3.3’de gösterildiği gibi formül kullanılarak izolatların otoagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\%Otoagregasyon = A_0 - \frac{A_t}{A_0} \times 100 \quad (3.3)$$

A₀: 600 nm de $1,0 \pm 0,02$ ’ye ayarlanan ilk optikal dansite

A_t: 5 saat sonraki optikal dansite

3.2.8.2 Koagregasyon

Lactobacillus spp. izolatların koagregasyon aktivitesi için OD’si 600 nm de $1,0 \pm 0,02$ ’ye ayarlanan izolatlardan 2 mL ve 2 mL *E. coli* ATCC 35218 ya da *S. aureus* ATCC 25923 test bakterilerinden alınarak farklı tüp içinde 10-15 sn vortekslenip (İka vortex, Geni vs3) ardından 37°C’de üçer paralelli 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresinin ardında alttaki fazdan 0,1 mL alınarak, 0,9 mL PBS (pH 7,2) ile dilüsyon yapılarak optikal yoğunluğu spektrofotometrede (Beckman Coulter, DU 730 UV/VIS) 600 nm de ölçüm yapılmıştır. Eş. 3.4’deki formüle göre koagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\%Koagregasyon = [(A_1 + A_2) - \frac{2(A_3)}{(A_1 + A_2)}] \times 100 \quad (3.4)$$

A₁: *Lactobacillus* spp. izolatlarının optikal dansitesi

A₂: *E. coli* ATCC 11229 ya da *S. aureus* ATCC 25923'ün optikal dansitesi

A₃: Karışımın 5 saat sonundaki optikal dansitesi

3.2.9 Hidrofobisite

Lactobacillus spp. izolatlarının hidrokarbonlara mikrobiyal tutunması Zárte vd. (2002)'ye göre belirlenmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının MRS sıvı besi ortamında, 37°C'de 18-24 saat iki kez aktiveleştirilen kültürler kullanılmıştır. Aktiveleştirilen kültürler, 10000 rpm'de 15 dk santrifüj (Gyrozen, 1848R) yapılmıştır. Santrifüjden sonraki pelet, iki kez PBS (pH 7,2) ile yıkanarak, 0,1 M KNO₃ (pH 6,2) tamponuna resüspanse edilmiştir. Resüspanse edilen bakterilerin OD'si 600 nm de 0,6±0,02'ye ayarlanmıştır. Bakteri süspansiyonundan 2 mL alınarak, 0,5 mL p-ksilen (Merck) (polar olmayan nötral çözücü), kloroform (Merck) (monopolar asidik çözücü) ve etil asetat (Merck) (monopolar bazik çözücü) hidrokarbonları ile karıştırılmış oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk'lık ön inkübasyonun ardından oluşan iki faz 2 dk manyetik karıştırıcı (İka vortex, Geni vs3) ile karıştırılıp tekrar oda sıcaklığında 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından sulu fazın OD'si spektrofotometrede (Beckman Coulter, DU 730 UV/VIS) (600 nm) ölçülmüştür. *Lactobacillus* spp. izolatlarının hidrokarbonlara tutunma yüzdesi Eş. 3.5'te verilen formülle ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{Hidrofobisite} = A_1 - \frac{A_2}{A_1} \times 100 \quad (3.5)$$

A₁: 600 nm de 1,0±0,02'ye ayarlanan ilk optikal dansite

A₂: 600 nm deki son optik dansite

3.2.10 Hemolitik aktivite

Lactobacillus spp. izolatlarının hemolitik aktivitesi Kumari vd. (2022)'ye göre belirlenmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının MRS Broth ortamında, 37°C'de 18-24 saat boyunca iki kez aktiveleştirilen kültürleri kullanılmıştır. Kültürlerden %5'lik defibrine koyun kanlı agar yüzeyine çizgi ekim yapılarak 37°C'de 48 saat boyunca

inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, kanlı agar üzerinde *Lactobacillus* spp. izolatlarının oluşturacağı koloni tiplerine göre alfa hemoliz (koloni etrafındaki yeşil bölge), beta hemoliz (koloni etrafındaki beyaz bölge) veya gama hemoliz (kolonilerin etrafında net bölge yok) olarak belirlenmiştir.

3.2.11 16S rDNA dizi analizi

Lactobacillus spp. izolatları içerisinde araştırılan probiyotik özellikler (fenol toleransı, asit-safra direnci, antimikrobiyal aktivite, antibiyotik duyarlılık, EPS üretimi, agregasyon ve hidrofobisite) açısından en iyi aktivite gösteren TO4 suşunun 16S gen analizi hizmet alımı ile yapılmıştır (BM Laboratuvar Sistemleri). Analiz aşamaları;

1. TO4 izolatından DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Bacterial and Yeast DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır.
2. DNA miktar ve saflığını kontrol etmek için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazında spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır.
3. PCR çalışmasında universal primer olarak 27F – 1492R primerleriyle, tür tayini için hedeflenen gen bölgeleri çoğaltılmıştır.
4. PCR saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnekler için MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanımı ile saflaştırılmıştır.
5. Sanger Dizileme için ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılmıştır (Applied Biosystems, Foster City, CA).
6. 27F ve 1492R primerleriyle elde edilen okumalar, bir konsensus dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır.

3.2.12 İstatiksel analiz

Tüm deneylerde üç farklı paralelin ortalaması verilmiştir. İstatistiksel analiz sonuçlarında SPSS 11.0 Windows™ programları ile yapılmıştır. Pearson

korelasyonuna göre, izolatların EPS üretim miktarı-farklı pH'lara gösterdiği direnç, EPS üretim miktarı- safra toleransı, EPS üretim miktarı-otoagregasyon ve EPS üretim miktarı-koagregasyon arasındaki ilişki araştırılmıştır.



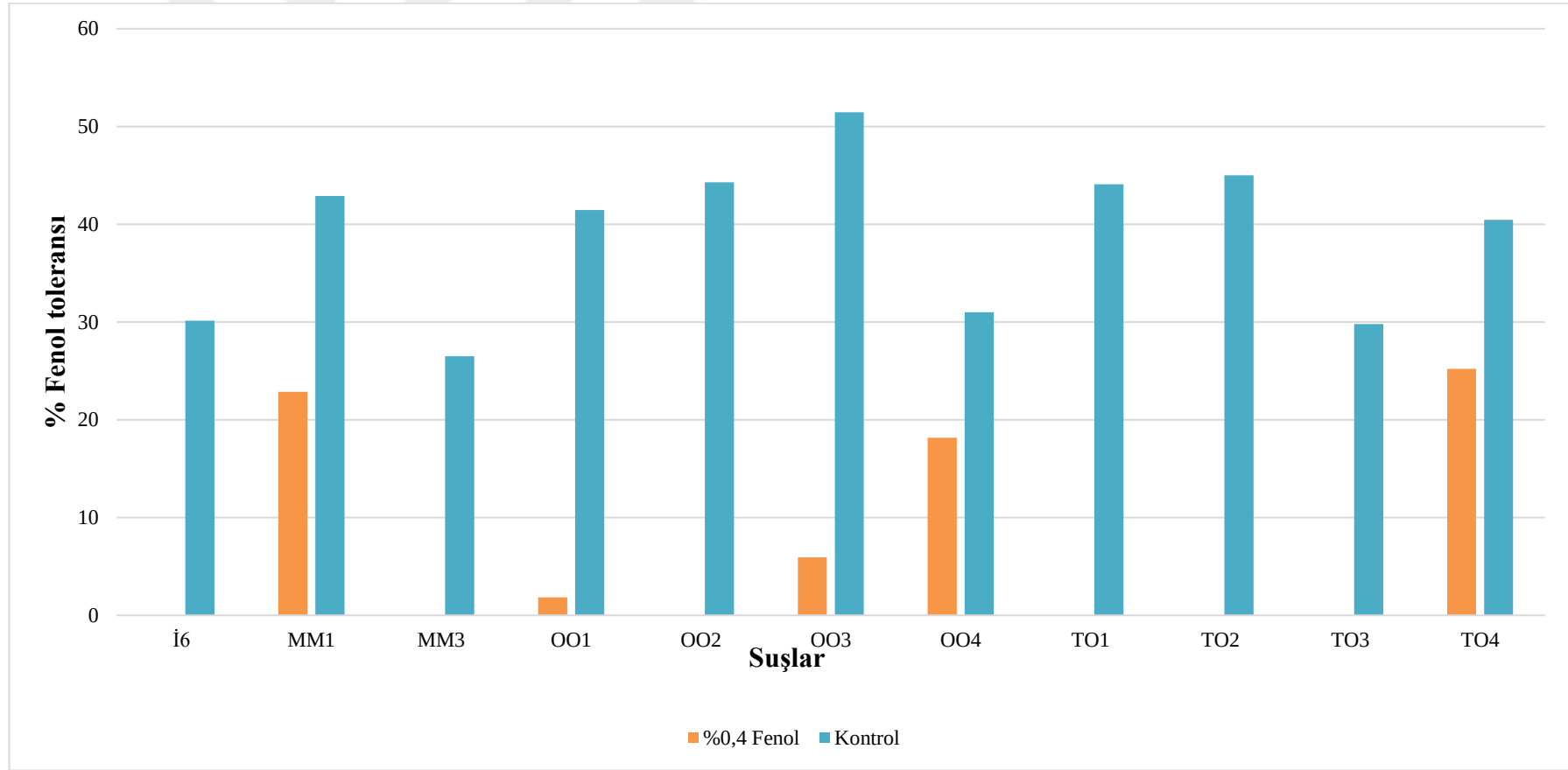
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 *Lactobacillus* spp. İzolatlarının Fenol Toleransının Belirlenmesi

Fenol, besinle veya endojen olarak alınan aromatik bileşiklerin bazı probiyotik suşlar tarafından deaminasyonu ile oluşabileceği ve bakteriyostatik etki gösterebilmesinden dolayı probiyotikler için önemli bir özellik olarak bildirilmiştir (Pinto vd., 2006). Divya vd. (2012) yaptıkları çalışmada fenol konsantrasyonu %0,6' ya kadar fenolle toleransı rapor edilmiş ancak %0,4 fenol konsantrasyonundan sonra artan fenol konsantrasyonu ile bakteri canlılığı giderek azaldığı bildirilmiştir. Bu nedenle çalışmamızın ilk basamağında 11 adet *Lactobacillus* spp. izolatlarının %0,4 oranında fenol içeren ortamda hayatta kalma yüzdeleri araştırılmıştır (Şekil 4.1). İzolatların %0,4 fenollü ortamda 24 saat sonunda üremeleri incelendiğinde en yüksek canlılık oranını TO4 izolatı (%25,21) gösterirken, MM1 (%22,86), OO4 (%18,16), OO3 (%5,92) ve OO1 (1,84) izolatlarından %0,4 fenollü ortamda canlı kalabildikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.1). OO2, TO1, TO2, TO3, MM3 ve İ6 izolatlarının ise %0,4 fenole duyarlı oldukları belirlenmiştir. Jena vd. (2013) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus acidophilus* NCDC15, CS2, CS3, CS4 ve CS7 suşları %0,4 fenollü ortamda canlılıklarını araştırılmış ve suşların sırasıyla %15,43, %3,70, %10,60, %10,60 ile %10,40 oranlarında canlı kalabildiklerini bildirmişlerdir. Gupta vd. (2021) yaptıkları çalışmada 10 LAB izolatlarının %0,4 fenol varlığında canlılıkları araştırılmış ve CPN53 (% 19,09), CPN54 (% 21,11), CPN60 (% 18,02) ve CPN67 (% 20,21) izolatları, diğer izolatlardan ve referans suşları olan *L. johnsonii* (10,20) ve *L. acidophilus* (15,17) probiyotik suşlardan daha yüksek canlılık gösterdikleri bildirilmiştir. Çalışmamızda ve çalışmalarda elde edilen verilere bakıldığında izolatların yüksek fenol konsantrasyonuna (%0,4) tolere etme kabiliyetine sahip oldukları ve fenol içerikli bileşiklerin bağırsaktaki bakteriyostatik etkisine direnç gösterebildiklerini düşünülmektedir.

Çizelge 4. 1 *Lactobacillus* spp. izolatlarının %0,4 fenol toleransı.

İzolatlar	%0,4 Fenol			Kontrol		
	0. saat	24. saat	% Canlılık	0. saat	24. saat	% Canlılık
İ6	7,24	4,00	-	7,30	9,50	30,14
MM ₁	7,00	5,40	22,86	7,30	10,43	42,90
MM ₃	7,02	5,30	-	6,64	8,40	26,51
OO ₁	6,90	7,03	1,84	7,02	9,93	41,45
OO ₂	6,70	5,00	-	7,00	10,10	44,30
OO ₃	6,42	6,80	5,92	6,61	10,01	51,44
OO ₄	8,04	9,50	18,16	8,20	10,74	31,00
TO ₁	7,20	6,21	-	7,10	10,23	44,10
TO ₂	7,12	6,00	-	7,20	10,44	45,00
TO ₃	7,40	6,00	-	7,32	9,50	29,80
TO ₄	7,02	8,79	25,21	7,17	10,07	40,45



Şekil 4.1. *Lactobacillus* spp. izolatlarının %0,40 fenol toleransı.

4.2 *Lactobacillus* spp. İzolatlarının Farklı pH Değerlerine Toleransının Belirlenmesi

Probiyotiklerin; probiyotik olarak değerlendirilmesi için gereken özelliklerden biri de sindirim sırasında asit toleransıdır. Gastrointestinal sistemde mide düşük pH'ya sahiptir. Dolayısıyla probiyotiklerin aside karşı toleranslı olmaları önemlidir. Midede salgılanan HCl'in pH'sı 0,9 olmasına rağmen mideye giren bileşiklerle pH değeri yaklaşık pH 3'e kadar çıktığı bilinmektedir (Erkkilä ve Petäjä, 2000).

Bu tez çalışmasında inek kolostrumundan izole edilen 11 *Lactobacillus* spp. izolatlarının beş farklı zaman diliminde (0, 1, 2, 3 ve 4 saat) ve pH 2.0, 3.0, 4.0 ve 7.0 ortamlarında asit toleransı araştırıldı. Sonuçlar kob/ml olarak değerlendirildi (Şekil 4.2-4.4).

Lactobacillus spp. izolatlarının pH 2.0'ye duyarlı oldukları belirlenmiş 0. saatteki canlılık sonuçları Log kob/mL olarak Çizelge 4.2 sunulmuştur. pH 3'te 4 saat inkübasyon sonunda TO1, TO3 ve TO4 izolatlarının üremelerinde artış gözlemlenirken OO4 izolatının üremesi stabil olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2.). pH 4'te, İ6, MM1 OO1 ve OO3 izolatlarında üremeleri zamana bağlı azalma görülürken, MM3, OO2, OO4, TO1, TO2, TO3 ve TO4 izolatların üremelerinde artış tespit edilmiştir (Şekil 4.3.). pH 7 (kontrol) izolatlarında zamana bağlı artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.4.). Sonuçları genel olarak değerlendirdiğimizde MM3 (4,03 Log kob/mL) ve OO2 (4,09 Log kob/mL) izolatlarında dört saatlik inkübasyon süresi sonunda pH 3'te canlılıklarında azalma tespit edilirken bu izolatların pH 4'te kontrole (pH 7) yakın üreme gösterdikleri belirlenmiştir. *Lactobacillus* spp. OO4, TO1, TO3 ve TO4 izolatları pH 3 ve pH 4 koşullarında diğer izolatlara oranla daha fazla canlılık göstererek bu çalışmada asite toleranslı izolatlar olarak belirlenmiştir. İzolatların asite toleransı üzerinde EPS üretimin etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle pH 3 ve 4 ortamlarındaki canlılıkları ile EPS üretimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İzolatların pH 3 ile EPS üretimi arasında korelasyon görülmezken ($P>0,05$), pH 4 ortamındaki canlılıkları ile EPS üretimi arasında pozitif yönde güçlü ($r=0,798$) korelasyon tespit edilmiştir ($P<0,01$). Yüksek EPS üretimi gösteren TO3 ve TO4 izolatlarının pH 4 asidik ortamda canlılığında yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

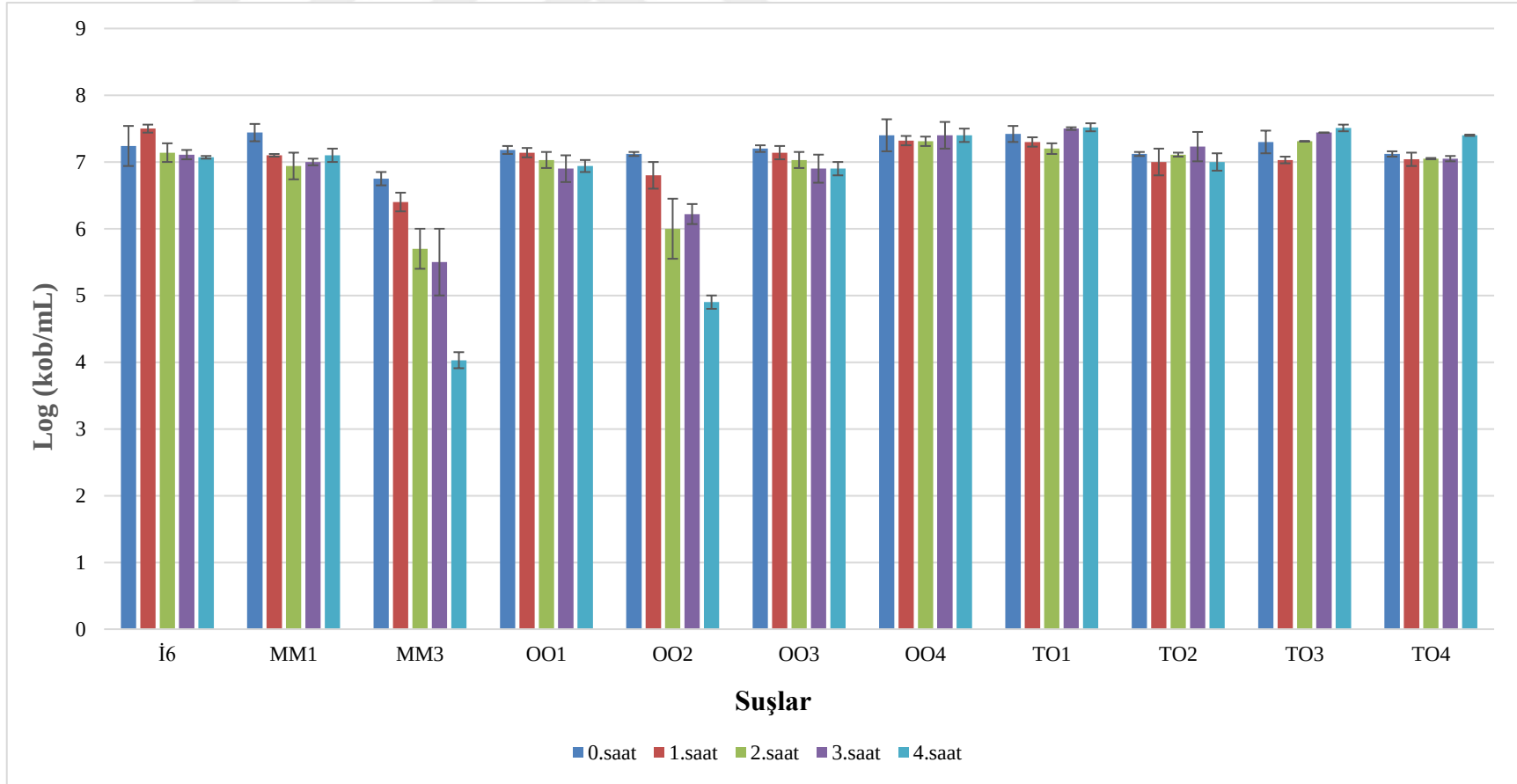
Khalil vd. (2018), tempoyak'tan izole edilen 7 farklı *Lactobacillus* spp. izolatlarının pH3 ile EPS üretimi arasında korelasyon görülmezken yüksek EPS üretimi gösteren *L. reuteri* DUR12 (810 mg/L) pH4 asidik ortamda canlılığında yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Düşük EPS üreten suşlar; *B. breve* A16, A19, A26, S5, S6, S8, S10, S11, *B. bifidum* A6, A10, A10S, A12, S7, D6 ve *B. lactis* A12S, A28S suşları düşük pH'ya daha duyarlı, yüksek EPS üreten *B. breve* A16S, A19S, A28, S2, S3, S4, *B. bifidum* A2, A40, D1, D2, D8 ve *B. pseudocatenulatum* D3, D4, D5 suşları ise düşük pH'ya daha dirençli olduğu belirlenmiştir (Alp ve Aslim,2010). Yapılan çalışmada ve literatür araştırmalarında görüldüğü gibi EPS üretimi ile asit pH toleransı arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür. EPS'nin düşük pH'ya karşı koruyucu etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Deneylerdeki verilere göre, EPS üretim miktarı ile asit direnci ve safra toleransı arasında pozitif bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Veriler arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, izolatların düşük pH ve safra toleransı ile EPS üretim miktarının kapasiteleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu saptanmıştır ($P<0.05$).

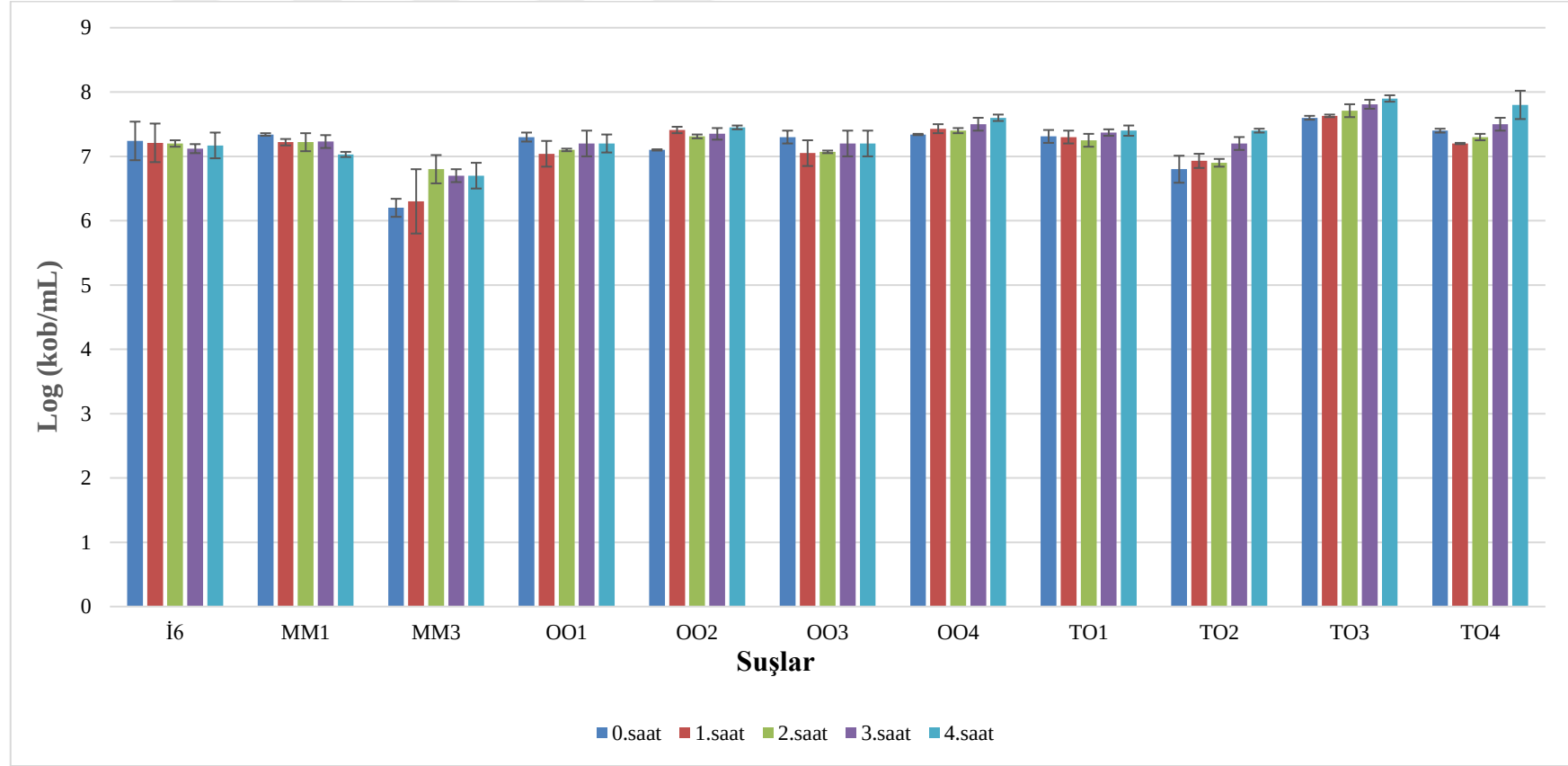
Potansiyel probiyotiklerin, probiyotik olarak değerlendirilmesi için en önemli özelliklerinden biri mide pH' da canlılıklarını sürdürmeleri gerekmektedir. Sharma vd. (2021) yaptıkları çalışmada deve sütünden izole edilen *E. lactis* Cam 14 ve *L. plantarum* Cam 15 suşlarının pH 3'te 3. saat sonunda canlılıklarını sürdürebildiklerini bildirmişlerdir. Yapılan tez çalışmasında MM3 ve OO2 izolatları dışında tüm izolatların dört saatlik inkübasyon süresi sonunda pH 3'te yüksek oranda canlı kalabildikleri tespit edilmiştir. Liu vd. (2020) insan kolostrumundan izole edilen *L. rhamnosus* (%93,2) ve *B. lactis* (%90,6) suşlarının pH 2.5' da yüksek oranda canlılık gösterdiklerini bildirmişlerdir. Zhang vd. (2022), holstein inek sütünden izole edilen 14 izolatın 3 saat sonunda pH 3'te en yüksek canlılık gösteren suş L22 ($9,60\pm0,06$ kob/ mL) en düşük canlılık ise L1 ($7,23\pm0,10$ kob/ mL) suşunda görüldüğü rapor edilmiştir. Mollova vd. (2024), insan kolostrumundan izole edilen *L. fermentum* st5'in, pH 3,0'te 5,37 Log kob/mL ve *Limosilactobacillus fermentum* st22 ise pH 3,0'te 8,57 Log kob/mL'lik hayatta kalma yeteneği gösterdiği rapor edilmiştir. Bu alandaki araştırmalar, bakterilerin asit toleransının türlerinin yanı sıra, belirli suşların özelliklerine bağlı olduğunu ortaya koymaktadır.

Çizelge 4. 2. *Lactobacillus* spp. izolatlarının farklı pH değerlerine toleransı (Log kob/mL).

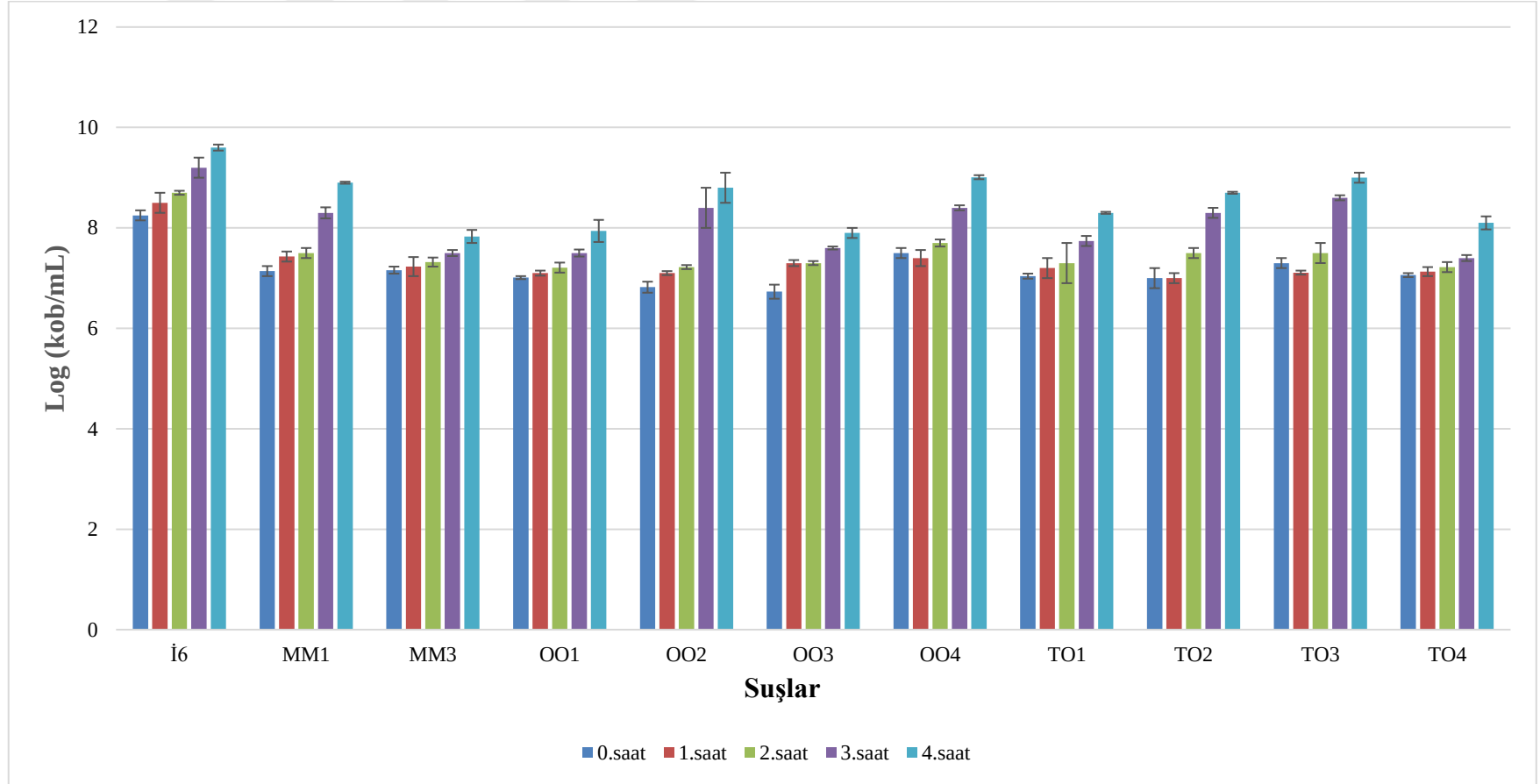
İzolatlar	pH	İnkübasyon süreleri				
		0. saat	1. saat	2. saat	3. saat	4. saat
İ6	2	7,10±0,20	-	-	-	-
	3	7,24±0,30	7,50±0,06	7,14±0,14	7,11±0,07	7,07±0,02
	4	7,24±0,30	7,21±0,30	7,20±0,00	7,12±0,07	7,17±0,20
	7	8,25±0,10	8,50±0,20	8,70±0,04	9,20±0,20	9,60±0,06
MM1	2	7,23±0	-	-	-	-
	3	7,44±0,13	7,10±0,02	6,94±0,20	7,00±0	7,10±0,10
	4	7,34±0,02	7,22±0	7,22±0,14	7,23±0,10	7,03±0,04
	7	7,14±0,10	7,43±0,10	7,50±0,10	8,30±0,11	8,90±0,02
MM3	2	5,20±0,18	-	-	-	-
	3	6,75±0,10	6,40±0,14	5,70±0,30	5,50 ±0,50	4,03±0,12
	4	6,20±0,14	6,30±0,50	6,80±0,22	6,70±0,10	6,70±0,20
	7	7,16±0,07	7,23±0,19	7,32±0,09	7,50±0,06	7,83±0,13
OO1	2	4,30±0,01	-	-	-	-
	3	7,18±0,06	7,14±0,07	7,03±0,12	6,90±0,2	6,94±0,09
	4	7,3±0,07	7,04±0,20	7,10±0,02	7,20±0,20	7,20±0,14
	7	7,01±0,03	7,10±0	7,21±0,10	7,50±0,07	7,94±0,22
OO2	2	3,63±0,30	-	-	-	-
	3	7,12±0,03	6,80±0,20	6,00±0,45	6,22±0,15	4,90±0,10
	4	7,10±0,01	7,41±0,05	7,31±0,03	7,35±0,09	7,45±0,03
	7	6,82±0,11	7,10±0,04	7,22±0,04	8,40±0,40	8,80±0,30
OO3	2	6,40±0,03	-	-	-	-
	3	7,20±0,05	7,14±0,10	7,03±0,12	6,90±0,21	6,90±0,10
	4	7,30±0,10	7,05±0,20	7,07±0,02	7,20±0,20	7,20±0,20
	7	6,73±0,14	7,30±0,06	7,30±0,04	7,60±0,03	7,90±0,10
OO4	2	4,71±0,32	±	±	±	±
	3	7,40±0,24	7,32±0,07	7,31±0,07	7,40±0,20	7,40±0,10
	4	7,34±0,01	7,43±0,07	7,40±0,04	7,50±0,10	7,60±0,05
	7	7,50±0,10	7,40±0,16	7,70±0,07	8,40±0,00	9,01±0,04
TO1	2	6,71±0,03	-	-	-	-
	3	7,42±0,0	7,30±0,07	7,20±0,08	7,50±0,02	7,52±0,0
	4	7,31±0,10	7,30±0,10	7,25±0,10	7,37±0,05	7,40±0,08
	7	7,04±0	7,20±0,2	7,30±0,4	7,74±0,1	8,30±0,02
TO2	2	6,60±0,12	-	-	-	-
	3	7,12±0,03	7,00±0,20	7,11±0,03	7,23±0,22	7,00±0,13
	4	6,80±0,21	6,93±0,11	6,90±0,06	7,2±0,10	7,40±0,03
	7	7,00±0,20	7,00±,10	7,50±0,10	8,30±0,10	8,70±0,02
TO3	2	6,91±0,22	-	-	-	-
	3	7,30±0,17	7,03±0,05	7,31±0,00	7,44±0,00	7,51±0,05
	4	7,60±0,03	7,63,02	7,71±0,10	7,81±0,07	7,90±0,05
	7	7,30±0,10	7,11±0,04	7,50±0,20	8,60±0	9,00±0,10
TO4	2	6,44±0,02	-	-	-	-
	3	7,12±0,04	7,04±0,10	7,05±0,01	7,05±0,04	7,40±0,01
	4	7,40±0,03	7,20±0,01	7,30±0,05	7,50±0,10	7,80±0,22
	7	7,06±0,04	7,13±0,09	7,22±0,10	7,40±0,06	8,10±0,13



Şekil 4. 1. *Lactobacillus* spp. izolatlarının pH3’ de farklı inkübasyon sürelerindeki canlılıkları.



Şekil 4. 2. *Lactobacillus* spp. izolatlarının pH4' de farklı inkübasyon sürelerindeki canlılıkları.



Şekil 4. 3. *Lactobacillus* spp. izolatlarının pH7(kontrol)' de farklı inkübasyon sürelerindeki canlılıkları.

4.3 *Lactobacillus* spp. İzolatlarının Farklı Safra Konsantrasyonlarına Toleransının Belirlenmesi

Safra asitlerine karşı tolerans, probiyotik bakterilerin bağırsakta hayatta kalabilmeleri için gerekli bir özelliktir (Vasiljevic ve Shah, 2008). Safra, ince bağırsaktan kalın bağırsağa geçerken bakterilerin hücre membranına zarar veren ve mikrobiyal aktiviteyle değişen organik ve inorganik bileşiklerden oluşan bir sıvıdır. Probiyotik bakterilerin safraya karşı direnç göstermeleri, safra asitlerinin antimikrobiyal etkisinden korunarak yararlı etkilerini göstermek üzere bağırsağa ulaşmalarını sağlamaktadır (Succi vd., 2005). Probiyotik bakterilerin safra toleransını belirlemek için %0,3'luk safra dozu kullanılmaktadır (Erkkilä ve Petäjä, 2000).

Bu tez çalışmasında da %0,0 (kontrol), %0,3 ve %0,5 safra konsantrasyonu içeren ortamda 0, 3 ve 6. saat inkübasyon sonunda *Lactobacillus* spp. izolatlarının safra toleransları araştırılmış sonuçlar Çizelge 4.3 ile Şekil 4.5. ve 4.6.'da Log kob/mL olarak verilmiştir.

Lactobacillus spp. izolatlarının genel olarak safraya toleransının yüksek olduğu belirlenirken; %0,3 safra ortamındaki canlılıklarının, %0,5 safra içeren ortama göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.3). TO2 (8,90 Log kob/mL), TO3 (9,74 Log kob/mL) ve TO4 (8,90 Log kob/mL) izolatlarının %0,3 safraya diğer izolatlarla kıyaslandığında toleransının daha yüksek olduğu ve safra içeren ortamlarda kontrol gruplarına oranla üremelerinde artış olduğu belirlenmiştir. Safra toleransı araştırılan 11 izolat arasında MM3 ve OO2 izolatlarının %0,3 safraya toleransının daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının %0,5 oranında safra içeren ortamda geliştirildiklerinde canlılıklarında azalma görülürken, izolatların canlılığında en yüksek artış TO3 izolatında tespit edilmiştir. MM3 ve OO2 izolatlarının %0,3 ve 0,5 safraya duyarlı oldukları, TO2, TO3 ve TO4 izolatlarında da her iki safraya toleransının yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5 ve 4.6).

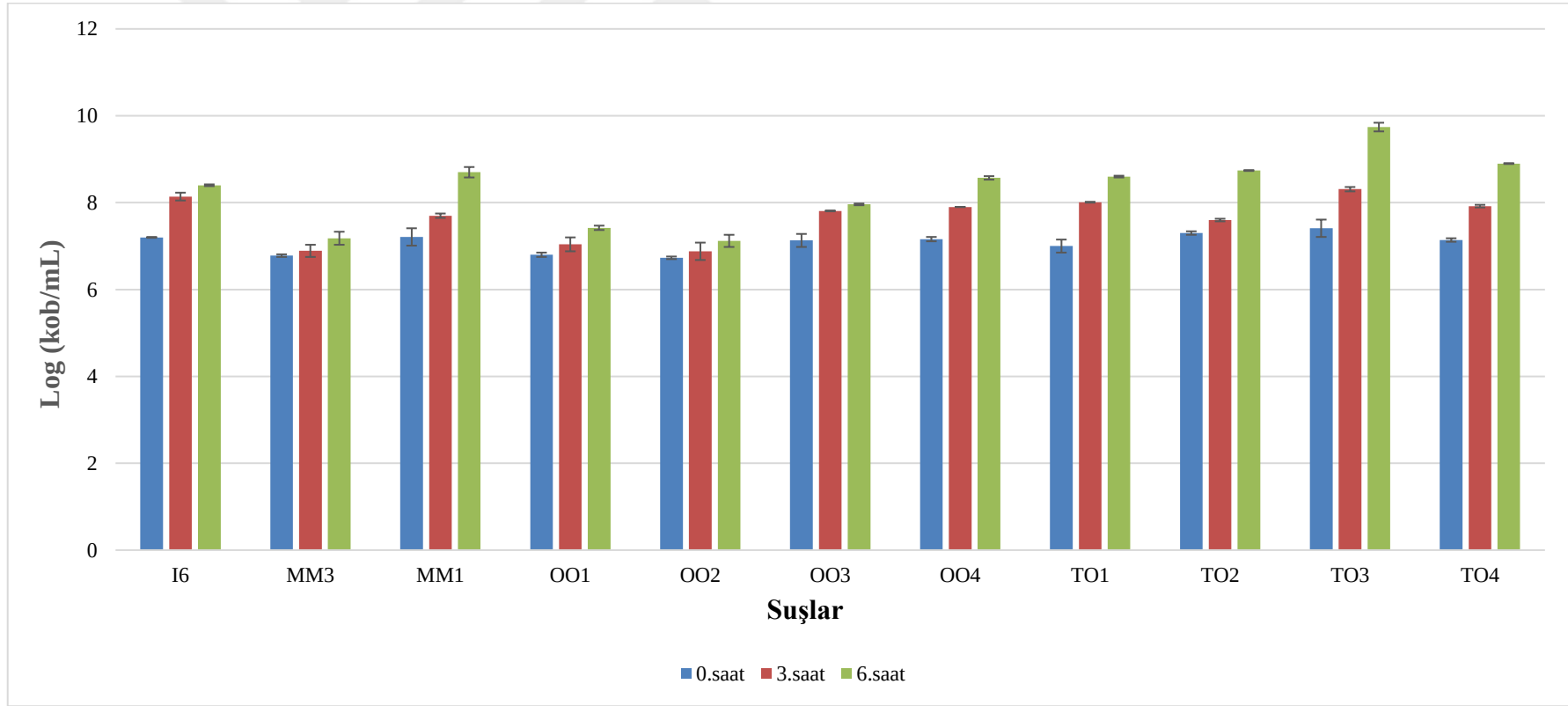
Probiyotiklerin ince bağırsağa ulaştığında karaciğerden sentezlenen safraya tolerans göstererek canlılıklarını korumaları gerekmektedir. İnsan kolostrumdan izole edilen *L. rhamnosus* GG (%52) ve *L. rhamnosus* M9 (%42,8) suşlarının %0,3 safra içeren ortamlarda üremelerinde artış olduğu rapor edilmiştir (Liu vd., 2020). Ayrıca aynı çalışmada *B. lactis* (%36,1) suşlarında üremelerinde artış olduğu gözlemlenmiştir.

Duraisamy vd. (2022), insan anne sütünden izole edilen BDUMBT10 (%75), BDUMBT08 (%71), BDUMBT09 (%71), BDUMBT11 (%71), BDUMBT12 (%67), BDUMBT13 (%68), M2403 (%67) suşların %0,5 safra içeren ortamdaki canlılıklarını %67-75 oranında koruduklarını bildirilmiştir. Elde edilen sonuçların, yapılan çalışmalara benzerlik gösterdiği ve suşların safraya toleransının yüksek olduğu ve safra ortamında üreme oranlarının arttığı gözlenmiştir.

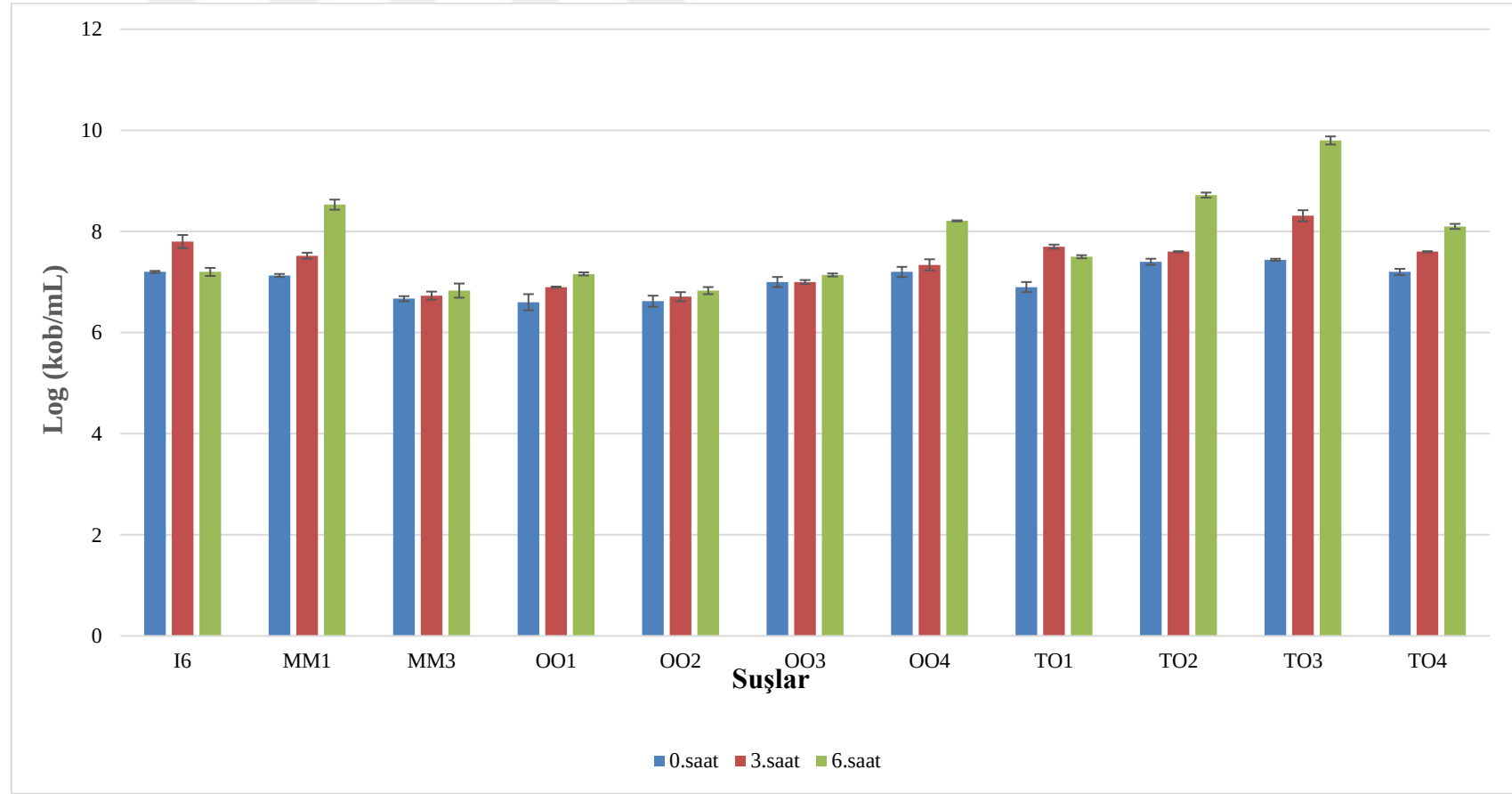
Suşlarının safraya toleransı üzerinde EPS üretimin etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle %0,3 ve %0,5 safra ortamlarındaki canlılıkları ile EPS üretimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İzolatların %0,3 safra ortamındaki canlılıkları ile EPS üretimleri arasında korelasyon bulunamamıştır ($P>0,05$). *Lactobacillus* spp. izolatlarının %0,5 safra içeren ortamdaki canlılıkları ile EPS üretimleri arasında pozitif yönde orta düzeyde ($r=0,643$) bir korelasyon gözlemlenmiştir ($P<0,05$). EPS üretimi yüksek olan TO3 ve TO4 izolatlarının safra ortamındaki canlılıklarında yüksek olduğu belirlenmiştir. Abid vd. (2018), farklı yiyecek ve içeceklerden elde edilen 4 suşunun % 0,3 safra ile EPS arasında anlamsal bir korelasyon bulunamadığı ancak EPS üretimi yüksek olan *Leuconostoc mesenteroides* TSM (1.8 106 Da) suşu % 0,3 safraya ortamındaki canlılığının yüksek (%71,15) olduğu rapor edilmiştir. Kamarinou vd. (2022) ise süt ürünlerinden izole edilen 9 suşunun %0,5 safra içeren ortamdaki canlılıkları ile EPS üretimleri arasında pozitif bir korelasyon belirlenmiştir. %0,5 safra ortamındaki canlılıkları yüksek *L. lactis* SRX5 (%97), *L. lactis* SMX16 (%95), *L. lactis* SRX3 (%93), *L. lactis* SRX2 (%91) suşların EPS üretimleride diğer suşlara göre yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada ve yapılan çalışmalardan elde edilen bilgilere göre EPS üretimi yüksek olan suşların safraya daha toleranslı olduğu görülmektedir. Ayrıca EPS'nin safraya karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4. 3. *Lactobacillus* spp. izolatlarının farklı safra konsantrasyonlarına toleransı (Log kob/mL)

İzolatlar	Safra Konsantrasyon	İnkübasyon süreleri			Kontrol
		0.saat	3.saat	6.saat	
İ6	0,3	7,20±0,01	8,14±0,09	8,40±0,02	9,60±0,06
	0,5	7,20±0,02	7,80±0,13	7,20±0,08	
MM1	0,3	7,21±0,03	7,70±0,14	8,70±0,15	8,90±0,02
	0,5	7,13±0,03	7,52±0,06	8,53±0,10	
MM3	0,3	6,78±0,20	6,89±0,05	7,18±0,12	7,83±0,13
	0,5	6,67±0,05	6,73±0,08	6,73±0,14	
OO1	0,3	6,80±0,05	7,04±0,16	7,42±0,05	7,94±0,22
	0,5	6,60±0,16	6,90±0,01	7,16±0,03	
OO2	0,3	6,73±0,03	6,88±0,20	7,12±0,14	8,80±0,30
	0,5	6,62±0,11	6,71±0,09	6,83±0,07	
OO3	0,3	7,13±0,15	7,81±0,01	7,96±0,02	7,90±0,10
	0,5	7,00±0,10	7,00±0,04	7,14±0,03	
OO4	0,3	7,16±0,05	7,90±0,00	8,57±0,04	9,01±0,04
	0,5	7,20±0,10	7,34±0,11	8,21±0,01	
TO1	0,3	7,00±0,15	8,01±0,01	8,06±0,02	8,30±0,02
	0,5	7,00±0,10	7,00±0,04	7,14±0,03	
TO2	0,3	7,14±0,04	7,92±0,03	8,90±0,01	8,70±0,02
	0,5	6,90±0,06	7,70±0,01	7,05±0,05	
TO3	0,3	7,41±0,20	8,31,05	9,74±0,10	9,00±0,10
	0,5	7,44±0,02	8,31±0,11	9,80±0,08	
TO4	0,3	7,14±0,04	7,92±0,03	8,90±0,01	8,10±0,13
	0,5	7,20±0,06	7,60±0,01	8,10±0,05	



Şekil 4. 4. *Lactobacillus* spp. izolatlarının %0,3 safra konsantrasyonunda izolatların canlılıkları (Log kob/mL).



Şekil 4. 5. *Lactobacillus* spp. izolatlarının %0,5 safra konsantrasyonunda izolatların hayatta kalması (Log kob/mL).

4.4 *Lactobacillus* spp. İzolatlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Probiyotik mikroorganizmaların gastrointestinal sistemden geçerek bağırsağa ulaştığında H₂O₂, bakteriyosin, gibi patojen bakterileri inhibe edecek antimikrobiyal metabolitler üreterek rekabet edebilmesi ve patojenlerin bağırsak florasına yapışmasını engelleyebilmesi probiyotikler için istenilen bir özelliktir (Khaneghah vd., 2020).

Lactobacillus spp. izolatlarının test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için bakteri kültürü üzerinde farklı koşullar (nötr pH, bakteri pH'sı, aerobik ve anaerobik inkübasyon), ve farklı metodlar (100 °C 30 dk ısıya maruz bırakılarak, sonikasyonla hücre içi posbiyotik eldesi) denenerek en iyi antimikrobiyal etki gösteren koşul ve yöntem belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda aerobik olarak geliştirilen kültürlerin, son kültür pH'sı ve kültürün sonikasyona maruz bırakılması sonucu elde edilen postbiyotiklerin test bakterileri üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır.

Lactobacillus spp. izolatlarının *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 11229 *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* RSKK 863 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 test bakterilerine karşı antimikrobiyal etkileri araştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.4 sunulmuştur.

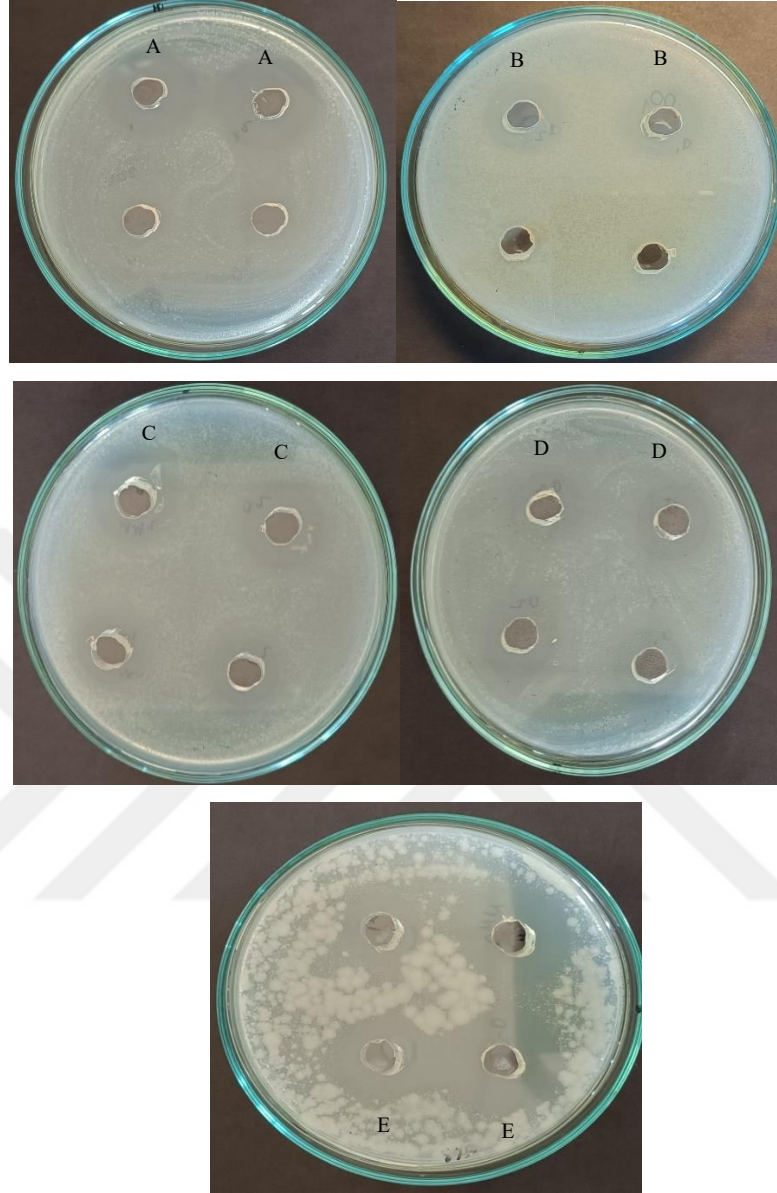
Çalışmamızda kullanılan 11 adet *Lactobacillus* spp. izolatlarının kültür süpernatantları (postbiyotiklerin) *E. coli* ATCC 11229 ve *E. coli* ATCC 35218 test bakterilerine antimikrobiyal etkisinin olduğu, *L. monocytogenes* ATCC 7644' e karşı ise etkisinin olmadığı belirlenmiştir. *Lactobacillus* spp. OO1 ve TO4 izolatlarının *E. coli* ATCC 35218 suşna karşı gösterdiği inhibisyon etkisi Şekil 4.7. (A) ve (B)'de gösterilmiştir. İzolatların % 82'si *S. enteritidis* ATCC 13076 suşuna karşı inhibisyon etkisinin olduğu gözlemlenirken, bu etki en yüksek, 11,41 mm inhibisyon zon çapı ile *Lactobacillus* spp. MM3 izolatında belirlenmiştir (Şekil 4.8.C).

Lactobacillus spp. izolatlarının *S. aureus* ATCC 25923 suşuna karşı % 64'ü inhibisyon etkisi gösterirken, inhibisyon etkisi en yüksek 20,14 mm inhibisyon zon çapı ile *Lactobacillus* spp. TO2 izolatında tespit edilmiştir. *Lactobacillus* spp. İ6, OO4, TO1 ve TO2 kültürlerinde *S. aureus* ATCC 25923 test bakterisine yüksek inhibisyon

göstermiştir. *Lactobacillus* spp. TO2 izolatının *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde gösterdiği inhibisyon etkisi Şekil 4.7. (D)'de gösterilmiştir.

Suşların % 73'ü *Bacillus cereus* RSKK 863 suşuna karşı inhibisyon etkisi gösterirken, en yüksek inhibisyon etkisi 19,15 mm inhibisyon zon çapı ile *Lactobacillus* spp. İ6 izolatında tespit edilmiştir. *Lactobacillus* spp. MM3 izolatının *B. cereus* RSKK 863 suşu üzerine gösterdiği inhibisyon etkisi Şekil 4.7. (E) 'de verilmiştir.

Lactobacillus spp. İ6, MM1, MM3, OO1, OO4, TO1 ve TO2 izolatlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644 haricinde tüm test bakterilerine antimikrobiyal etki göstermiştir. *Lactobacillus* spp. TO4 ve OO3 izolatları ise gram negatif *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218 ve *S. enteritidis* ATCC 13076 test bakterilerine antimikrobiyal etki gösterirken, gram pozitif patojenler üzerinde ise etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Chen vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada, koyun sütünden izole edilen HSM1, HSM10, HSM14 ve HSM18 laktik asit bakteri suşlarının *S. aureus*, *E. coli*, *Aeromonas caviae* ve *L. monocytogenes* gıda kaynaklı patojenlerine karşı yüksek inhibisyon etki gösterdiği bildirilmiştir. Kumari vd. (2022) yaptıkları çalışmada; *L. rhamnosus* NCDC953 ve *L. reuteri* NCDC958 suşlarının hücresiz kültür süpernatantlarının (CFS), *E. coli* NCDC 135 ve *B. cereus* NCDC 240 'a karşı yüksek antimikrobiyal etki gösterdiğini (≥ 15 mm), *E. faecalis* NCDC 115, *S. aureus* NCDC 100 ve *S. typhi* (11-14 mm)'e karşı ise orta düzeyde antimikrobiyal etki gösterdiğini belirlemiştir. Aynı çalışmada *L. rhamnosus* NCDC953 ve *L. reuteri* NCDC958 suşlarının, *Rhodotorula glutinis* karşı zayıf (< 7 mm), *Aspergillus niger* ve *Penicillium camemberti* küflerine karşı ise antimikrobiyal etki göstermediği tespit edilmiştir. Yapılan tez çalışmasında *Lactobacillus* spp. izolatlarının gram negatif patojen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkisinin daha fazla olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 6. *Lactobacillus* spp. izolatlarının antimikrobiyal aktiviteleri.

- (A): *Lactobacillus* spp. OO1 izolatlarının *E. coli* ATCC 35218 suşu üzerine gösterdiği inhibisyon zonu
- (B): *Lactobacillus* spp. TO4 izolatlarının *E. coli* ATCC 35218 suşu üzerine gösterdiği inhibisyon zonu
- (C): *Lactobacillus* spp. MM3 izolatlarının *S. enteritidis* ATCC 13076 suşu üzerine gösterdiği inhibisyon zonu
- (D): *Lactobacillus* spp. TO2 izolatlarının *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerine gösterdiği inhibisyon zonu
- (E): *Lactobacillus* spp. İ6 izolatlarının *B. cereus* RSKK 863 suşu üzerine gösterdiği inhibisyon zonu

Çizelge 4. 4. *Lactobacillus* spp. izolatlarının bağırsak patojenleri ve gıda kontaminantları üzerine antimikrobiyal aktivite sonuçları (zon çapı, mm).

İzolatlar	<i>E. coli</i> ATCC 11229	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i> RSKK 863	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i> ATCC 7644
İ6	12,81±0,10	14,82±1,35	6,65±0,21	18,47±0,18	19,15±0,13	-
MM1	9,59±0,04	9,01±1,96	10,77±0,01	7,51±0,07	14,22±0,31	-
MM3	11,65±0,18	8,49±1,94	11,41±0,21	13,58±0,28	17,37±0,13	-
OO1	17,07±0,13	13,31±1,56	10,07±0,07	14,39±0,47	12,76±0,34	-
OO2	5,32±0,08	10,36±1,82	-	-	-	-
OO3	5,12±0,17	5,29±1,68	3,07±0,07	-	-	-
OO4	13,45±0,30	10,11±1,19	4,95±0,07	16,58±0,28	10,2±0,11	-
TO1	12,36±0,03	12,63±1,96	8,87±0,11	19,71±0,21	10,73±0,13	-
TO2	11,15±0,24	11,19±0,38	9,59±0,13	20,14±0,06	6,35±0,01	-
TO3	5,97±0,21	8,09±1,20	-	-	11,40±0,11	-
TO4	17,26±0,06	11,46±1,29	6,93±0,13	-	-	-

4.5 *Lactobacillus* spp. İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi

Antibiyotiklere karşı duyarlılık, probiyotiklerin güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmek için kritik bir parametredir (Pradhan vd., 2020). Bu çalışma inek ağız sütünden izole edilen 11 adet *Lactobacillus* spp. izolatının hücre duvar sentezini inhibe eden ampisilin (10 mcg), protein sentezini inhibe eden; eritromisin (10 µg), gentamisin (10 µg), netilmisin (10 µg) ve kloramfenikol (30 µg) nükleik asit sentezini inhibe eden; ofloksasin (5 µg), sitoplazmik zar sentezini inhibe eden polimiksin (300 U) olmak üzere 4 farklı sınıfı temsil eden 7 farklı antibiyotiğe duyarlılıkları araştırılmıştır (Çizelge 4.6). CLSI standardına (Çizelge 4.5) göre değerlendirilmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının antibiyotiklere göstermiş oldukları yüzde duyarlılık oranları Çizelge 4.7 ve Şekil 4.9'de verilmiştir.

Lactobacillus spp. izolatlarının ampisilin antibiyotğine %100 oranında yüksek duyarlılık gösterdikleri tespit edilmiştir. Protein sentezini inhibe eden eritromisin (%82) ve kloramfenikol (%91) antibiyotikleri izolatların yüksek duyarlılık gösterdikleri antibiyotikler olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.9).

Lactobacillus spp. OO3 ve OO4 izolatlarının antibiyotiklere dirençli olduğu genel olarak görülmüştür (Çizelge 4.6). Antibiyotiklere duyarlılık oranı en yüksek olan *Lactobacillus* spp. MM1 izolatının antibiyotiklere duyarlılık test sonucu Şekil 4.8’de verilmiştir. Araştırmalar sonucunda *Lactobacillus* spp. izolatlarının protein sentezini inhibe eden eritromisin (%9), ve kloramfenikol (%9) antibiyotiklerine karşı düşük seviyede dirençli oldukları tespit edilmiştir. En yüksek dirençlilik nükleik asit sentezini inhibe eden ofloksasin (%100) ve sitoplazmik zar sentezini inhibe eden polimiksin (%100) antibiyotiklerine karşı tespit edilmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının protein sentezini inhibe eden gentamisin (%91) ve netilmisin (%82) antibiyotiklerine de dirençli olduğu görülmüştür. *Lactobacillus* spp. TO1, TO2, TO3 ve TO4 izolatlarının ampisilin, eritromisin ve kloramfenikol antibiyotiklerine duyarlı, gentamisin, netilmisin, polimiksin ve ofloksasin antibiyotiklerine ise dirençli oldukları belirlenmiştir. İnsan anne sütünden izole edilen laktik asit bakterilerinin tüm izolatları gentamisin (10 µg), antibiyotiğine dirençli olduğu bildirilmiştir (Javed vd., 2022). Kumari vd. (2022) klinikte yaygın olarak kullanılan 19 antibiyotiğin *L. rhamnosus* NCDC953 ve *L. reuteri* NCDC958 suşlarının antibiyotik duyarlılık özelliklerinin belirlenmesin için yaptıkları çalışmada ise *L. rhamnosus* NCDC953 suşunun 14 antibiyotiğe duyarlı, Amikacin (30 µg) ve Tobramycin (10 µg) antibiyotiklerine orta derece duyarlı, sefadroksil (30 µg), nalidiksik asit (10 µg) ve ko-trimoksazol (25 µg) antibiyotiklerine karşı dirençli olduklarını bildirilmiştir. Bu araştırmacılar *L. reuteri* NCDC958 suşunun 16 antibiyotiğe duyarlı, Ciprofloxacın (5 µg) antibiyotiğine orta derece duyarlı, ko-trimoksazol (25 µg) ve nalidiksik asit (10 µg) antibiyotiklerine karşı dirençli olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan tez çalışmasında *Lactobacillus* spp. izolatlarının antibiyotiklere karşı belirlenen yüksek dirençlilik gıda sektöründe kullanım olasılıklarını sağlamaktadır. Kemoteropatik ajanların olduğu ortamlarda bu bakteri türleri kolaylıkla elimine olmazlar. Ancak bu tür bakterilerin gram negatif bakterilere karşı gösterdikleri antimikrobiyal aktivitenin yüksek olması bu bakterilerin probiyotik olarak kullanımlarını desteklemektedir.

Çizelge 4. 5. CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi.

No	Etki Mekanizması	Antibiyotik	Dirençli	Orta derece duyarlı	Duyarlı
1	Hücre duvarı sentezi inhibitörü	Ampisilin (AMP) 10µg	≤11	12-13	≥14
2	Protein sentezi inhibitörü	Eritromisin (E) 10µg	≤15	16-20	≥21
3	Protein sentezi inhibitörü	Gentamisin (CN) 10µg	≤12	13-14	≥15
4	Protein sentezi inhibitörü	Netilmisin (N) 10 µg	≤12	13-14	≥15
5	Protein sentezi inhibitörü	Kloramfenikol (C) 30µg	≤12	13-17	≥18
6	Sitoplazmik zar sentezi inhibitörü	Polimiksin (PB) 300 U	≤8	9-11	≥12
7	Nükleik asit sentezi inhibitörü	Ofloksasin (OFX) 5 µg	≤14	15-21	≥22

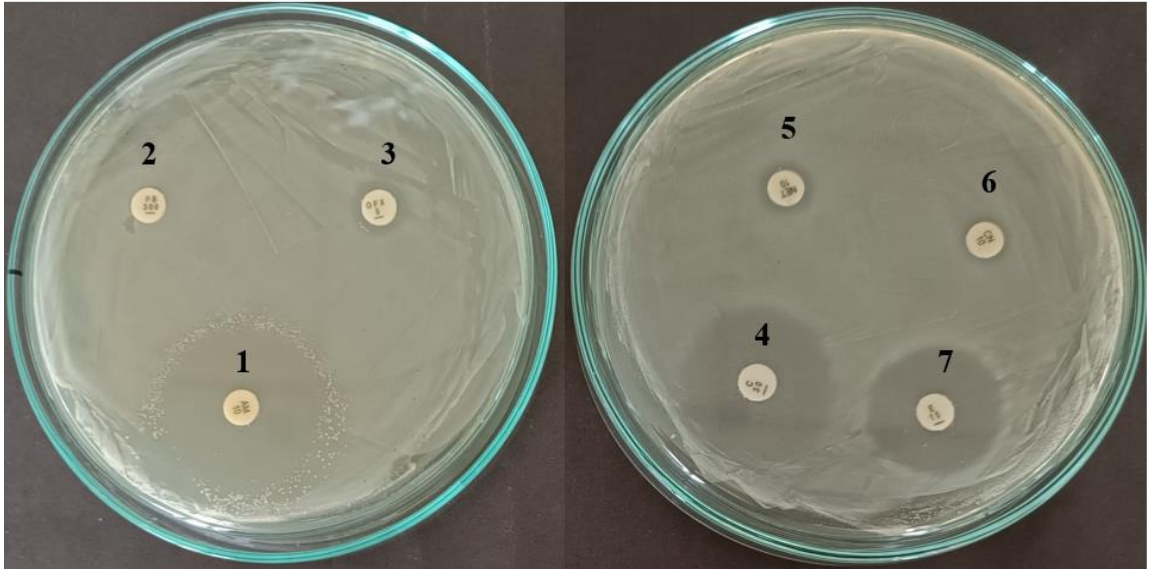
Çizelge 4. 6. İnek ağız sütünden izole edilen *Lactobacillus* spp. izolatlarının antibiyotiklere gösterdiği duyarlılık test sonuçları.

İzolatlar	Antibiyotikler						
	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Netilmisin	Kloramfenikol	Polimiksin	Ofloksasin
İ6	++	+	-	-	++	-	-
MM1	++	++	++	++	++	-	++
MM3	++	++	-	-	++	-	-
OO1	++	++	-	+	++	-	-
OO2	++	++	-	-	++	-	-
OO3	++	-	-	-	++	-	-
OO4	++	++	-	-	-	-	-
TO1	++	++	-	-	++	-	-
TO2	++	++	-	-	++	-	-
TO3	++	++	-	-	++	-	-
TO4	++	++	-	-	++	-	-

++ : Duyarlı, + : Orta Derece Duyarlı, - : Dirençli

Çizelge 4. 7. *Lactobacillus* spp. izolatlarının antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları.

Antibiyotik	Dirençli (-)	Orta Derece Duyarlı (+)	Duyarlı (++)
Ampisilin (AMP) 10µg	0	0	100
Eritromisin (E) 10µg	9	9	82
Gentamisin (CN) 10µg	91	0	9
Netilmisin (N) 10 µg	82	9	9
Kloramfenikol (C) 30µg	9	0	91
Polimiksin (PB) 300 U	100	0	0
Ofloksasin (OFX) 5 µg	100	0	0

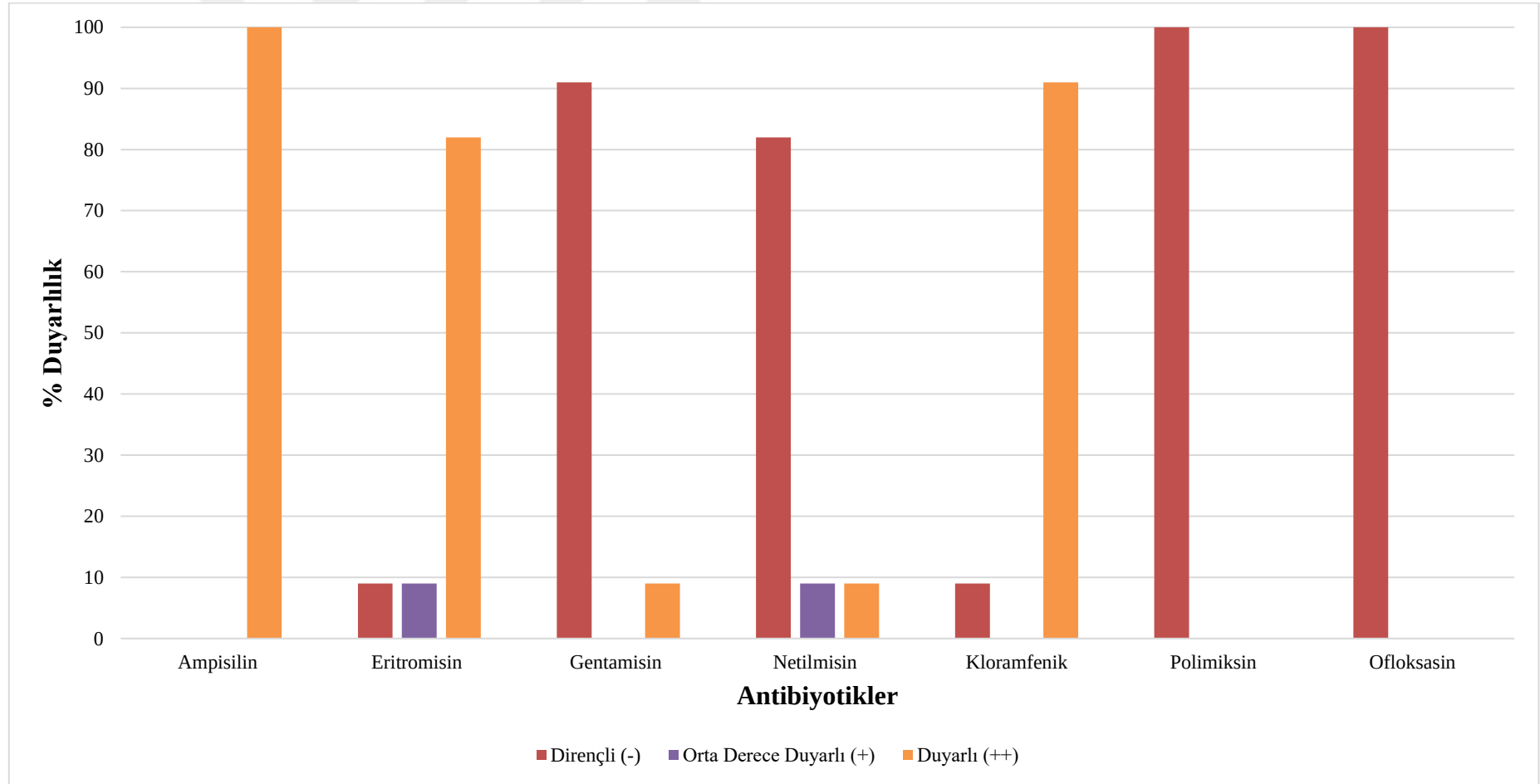


Şekil 4. 7. *Lactobacillus* spp. MM1 izolatının antibiyotiklere göstermiş oldukları disk difüzyon sonuçları.

1(AMP): Ampisilin, 2(PB): Polimiksin,

3(OFX): Ofloksasin; 4(C): Kloramfenikol, 5(N): Netilmisin,

6(CN): Gentamisin; 7(E): Eritromisin.



Şekil 4. 7. *Lactobacillus* spp. izolatlarının antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları.

4.6 *Lactobacillus* spp. İzolatlarının Eksopolisakkarit (EPS) Üretimlerinin Belirlenmesi

EPS üretimi, probiyotiklerin bağırsak mukozasına yapışmasını ve kolonizasyonunu üzerinde doğrudan etkili olduğu bildirilmiştir (Ruas-Madiedo vd., 2006). EPS üretiminin probiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasıyla etkileşimini artırarak, sindirim sistemi sağlığına katkıda bulunabileceği belirlenmiştir (de Almada vd.,2015). Probiyotikler tarafından üretilen EPS, bağırsak duvarında bir bariyer görevi görüp, koagregasyon yeteneğini artırarak patojen bakterilerin bağırsak hücrelerine yapışmasını önleyebileceği önerilmiştir (Castro-Bravo vd.,2018). EPS probiyotiklerin bağırsak yüzeyinde biyofilm oluşturmalarını sağlamaktadır (Salas-Jara vd., 2016). Ayrıca probiyotikler tarafından üretilen EPS'lerin bağırsak mukozasında bulunan immün hücrelerle etkileşimiyle bağışıklık sistemini modüle edebildiği, immün yanıtı düzenleyerek inflamasyonu azaltabildiği ve bağışıklık sisteminin dengesini koruyabildiği bildirilmiştir (Oerlemans vd., 2021).

Bu çalışmada 11 adet *Lactobacillus* spp. izolatlarının MRS broth besi ortamında geliştirilen kültürlerin EPS miktarları 5-100 mg/L arasında değişen oranlarda glikoz çözeltisi kullanılarak hazırlanan standarta göre hesaplanmıştır (Şekil 4.11). *Lactobacillus* spp. izolatlarının EPS miktarı mg/L cinsinden belirlenmiş ve Çizelge 4.8 ile Şekil 4.12'de gösterilmiştir.

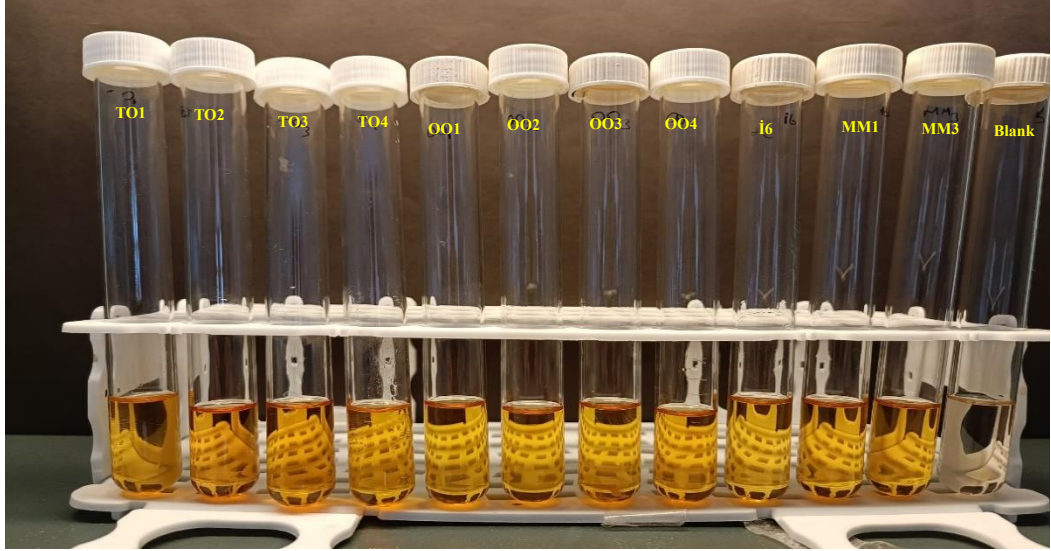
Lactobacillus spp. izolatlarının MRS sıvı besi ortamında EPS üretimleri 209,02-365,80 mg/L (Şekil 4.10) olarak belirlenmiştir. En yüksek EPS üretimi *Lactobacillus* spp. TO3 ve TO4 izolatlarında tespit edilmiştir. *Lactobacillus* spp. OO2 (263,93 mg/L) ve OO4 (275,48 mg/L) izolatlarında da yüksek EPS üretimi görülmüştür.

Laktobasiller çok farklı çeşit ve yapısal özelliğe sahip EPS üretebilmektedir. Üretilen bu polimerler bakteriyi asit, safra, antibiyotik gibi stres koşullarından koruyabilmekte, probiyotiklerin epitel yüzeylere tutunmasında ve koagregasyon aktivitelerinde etkili olabildiği düşünülmektedir. Oleksy-Sobczak vd. (2020), *L. rhamnosus* LOCK 0943 (941 mg/L) ve *L. rhamnosus* OM-1 (955 mg/L) suşlarını pH 6' da 37°C'de 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda en verimli EPS üreten suşlar olarak bildirmiştir. Rajoka vd. (2018), insan anne sütünden izole edilen *L. rhamnosus* SHA111, SHA113, SHA114, SHA115, SHA116 ve SHA117 suşları 37°C'de 18 saatlik inkübasyon süresi sonunda

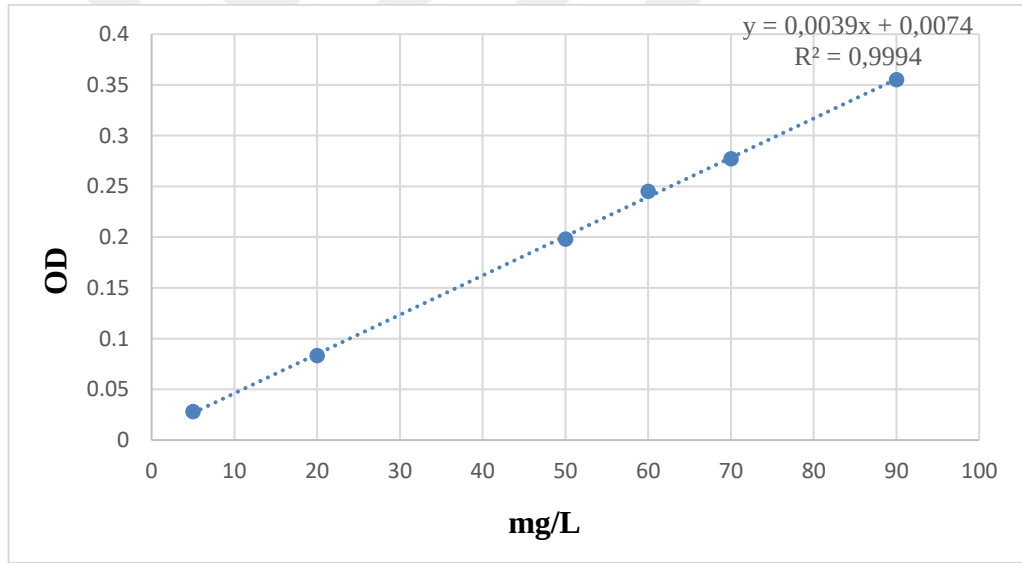
EPS üretimleri sırasıyla 737,3 mg/L, 549,6 mg/L, 461,0 mg/L, 519,6 mg/L, 631,6 mg/L, 610 mg/L rapor edilmiştir. Çalışmada kullanılan izolatların yüksek EPS üreten TO3 ve TO4 izolatları ile hem pH hem de safra toleransına dirençli olduğu ve bu ortamlarda daha fazla gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Yüksek EPS üreten izolatlar epitel hücrelere tutunmanın belirleyicisi olan oto ve koagregasyon kapasitesinin daha yüksek olduğu, ayrıca probiyotikler tarafından üretilen EPS'nin, bağırsakta mukusu maskeleyerek probiyotik mikroorganizmaların hem gelişimini hemde büyümesini artırıp patojenlerin oluşturduğu adezyonunu engellediğini bu durumda üretilen EPS'nin miktarına ve tipine bağlı olduğunu düşünülmektedir.

Çizelge 4. 8. *Lactobacillus* spp. izolatlarının EPS üretimleri (mg/L).

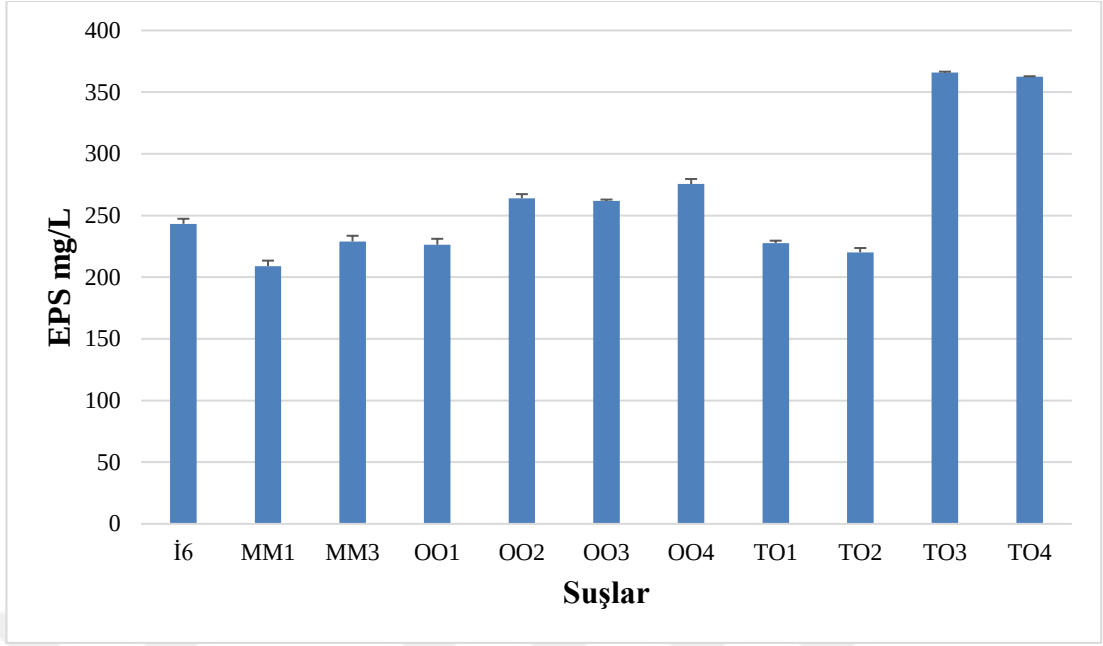
İzolatlar	Son kültür pH	Son kültür OD	EPS mg/mL
<i>Lactobacillus</i> spp. İ6	4,80±0,0	1,20±0,02	243,25±4,10
<i>Lactobacillus</i> spp. MM1	4,73±0,1	1,10±0,05	209,02±4,40
<i>Lactobacillus</i> spp. MM3	4,44±0,0	1,16±0,04	228,97±4,60
<i>Lactobacillus</i> spp. OO1	4,38±0,0	1,11±0,04	226,31±4,80
<i>Lactobacillus</i> spp. OO2	5,53±0,1	1,30±0,20	263,93±3,40
<i>Lactobacillus</i> spp. OO3	5,35±0,0	1,30±0,23	261,92±1,00
<i>Lactobacillus</i> spp. OO4	4,79±0,0	1,34±0,04	275,48±4,10
<i>Lactobacillus</i> spp. TO1	4,81±0,1	1,14±0,01	227,69±1,90
<i>Lactobacillus</i> spp. TO2	4,80±0,1	1,10±0,02	220,13±3,50
<i>Lactobacillus</i> spp. TO3	5,26±0,0	1,76±0,01	365,80±0,80
<i>Lactobacillus</i> spp. TO4	4,82±0,0	1,74±0,06	362,58±0,30



Şekil 4. 8. *Lactobacillus* spp. izolatlarından izole edilen EPS'lere fenol sülfirik asit eklenmiş görüntüsü.



Şekil 4. 9. Glikoz standart grafiği.



Şekil 4. 10. *Lactobacillus* spp. izolatlarının EPS üretimleri.

4.7 Otoagregasyon

Otoagregasyon, probiyotik bakterilerin büyük kütleler oluşturarak bağırsak mukozasına yapışma, kolonizasyonunu (Grigoryan vd., 2018) ve probiyotiklerin diğer bağırsak mikroorganizmalarıyla etkileşimlerini artırabilir (Krausova vd., 2019). Ayrıca probiyotiklerin biyofilim oluşturmaya olanak sağlamaktadır (Jaffar vd., 2016). Probiyotiklerin terapötik etkinliğini artırmak ve bağırsak sağlığını desteklemek için otoagregasyon yetenekleri araştırılmıştır. İnek ağız sütünden izole edilen 11 adet *Lactobacillus* spp. izolatlarının otoagregasyon özellikleri araştırılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9 ile Şekil 4.13’de gösterilmiştir.

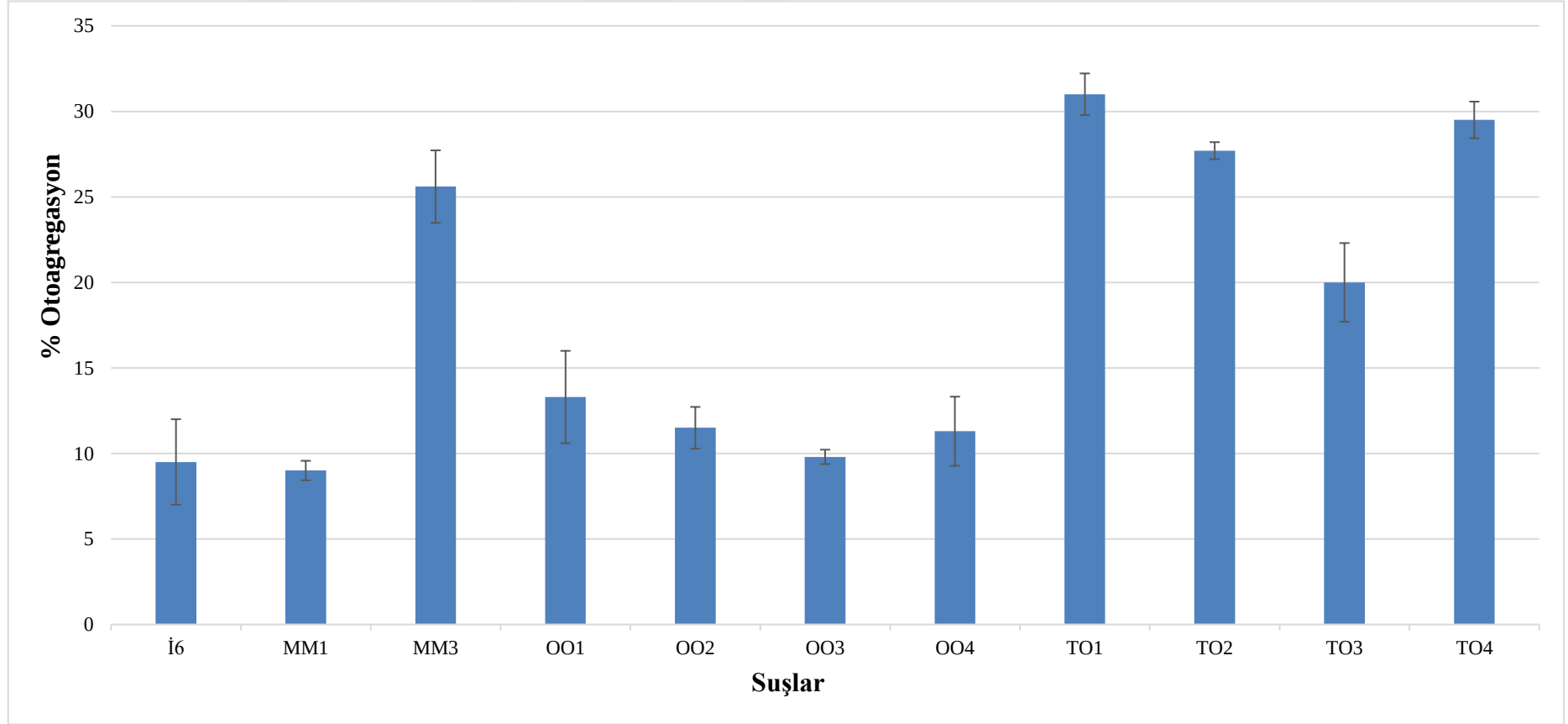
Lactobacillus spp. TO1 izolatının en yüksek otoagregasyon aktivitesi (%31) göstermiştir (Şekil 4.14). Test edilen bakteriler içerisinde *Lactobacillus* spp. MM3, TO2 ve TO4 izolatlarında yüksek otoagregasyon belirlenirken, İ6 ve MM1 izolatlarının ise otoagregasyonun düşük olduğu belirlenmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının otoagregasyon aktiviteleri ile EPS üretimleri arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($r=0,200$, $P>0,05$). Ancak EPS üretimi yüksek olan *Lactobacillus* spp. TO3 (365,8 mg/L) ve TO4 (362,58 mg/L) izolatlarının otoagregasyon aktivitelerinde yüksek olduğu (%20 ve 29,5) gözlemlenirken, EPS

üretimi düşük olan MM1 (209,2 mg/L) izolatının otoagregasyonunun da düşük olduğu (%9) tespit edilmiştir (Şekil 4.15 ve 4.16). Khalil vd. (2018) yapılan çalışmada Tempoyak'tan izole edilen 7 farklı *Lactobacillus* spp. izolatlarının otoagregasyon aktiviteleri ile EPS üretimleri arasındaki korelasyon anlamlı bir sonuç gözlemlenmezken EPS üretimi yüksek olan *L. crispatus* DUR4 (580 mg/mL) ve *L. plantarum* DUR8 (450 mg/mL) izolatlarının otoagregasyon aktivitelerinde yüksek olduğu (%60.09 ve 49.88) gözlemlenmiştir. Ayrıca EPS üretimi düşük olan *L. fermentum* DUR18 (110 mg/L) izolatının otoagregasyonunun da düşük olduğu (%43,41) rapor edilmiştir. Çalışmamızda ve literatür çalışmalarına göre EPS-otoagregasyon arasındaki ilişki bakterin türlerinden ziyade izolatların spesifik özelliklerinden kaynaklandığı görülmektedir. Probiyotik suşlar kendi aralarında otoagregasyon oluşturup mukozal yüzeye tutunarak patojenlerin mukozal yüzeye tutunmasını engelleyebilmektedir (Das vd., 2022). Raveschot vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada 8 *Lactobacillus* suşunun otoagregasyon kabiliyetleri araştırılmış ve 5 saat sonunda en yüksek *Lactobacillus casei* 9b (%95) olarak en yüksek otoagregasyon aktivitesine sahip suş olarak belirlenirken test edilen diğer suşlarda otoagregasyon %7,86- %67,44 aralığında tespit edilmiştir. *L. plantarum* KLDS 1.0328. suşunun ise 5 saat sonunda %26.37 otoagregasyon aktivitesi gösterdiği bildirmiştir (Ma vd., 2020). İnsan kolostrumundan izole edilen 7 farklı (*L. plantarum* SP₁, SP₂, SP₃, SP₁ B, SP₁ S, SP₁ M, B₂Enr) suşların yüksek agregasyon (%53- 85) gösterdiği bildirilmiş ve en yüksek agregasyon SP₁S (%85) suşu göstermiştir (Kurkutia vd., 2019). Osmanagaoglu vd. (2010) yapılan çalışmada insan kolostrumundan izole edilen *P. pentosaceus* OZF suşu %85,71 agregasyon yeteneğine sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada ve diğer çalışmalarda olduğu gibi LAB'nin genelinde agregasyon yeteneğinin yüksek olduğu görülmektedir.

Çizelge 4. 9. *Lactobacillus* spp. izolatlarının yüzde otoagregasyonu.

İzolatlar	%Otoagregasyon
<i>Lactobacillus</i> spp. İ6	9,5 ± 2,50
<i>Lactobacillus</i> spp. MM1	9 ± 0,57
<i>Lactobacillus</i> spp. MM3	25,6 ± 2,12
<i>Lactobacillus</i> spp. OO1	13,3 ± 2,70
<i>Lactobacillus</i> spp. OO2	11,5 ± 1,22
<i>Lactobacillus</i> spp. OO3	9,8 ± 0,42
<i>Lactobacillus</i> spp. OO4	11,3 ± 2,02
<i>Lactobacillus</i> spp. TO1	31 ± 1,22
<i>Lactobacillus</i> spp. TO2	27,7 ± 0,50
<i>Lactobacillus</i> spp. TO3	20 ± 2,30
<i>Lactobacillus</i> spp. TO4	29,5 ± 1,07

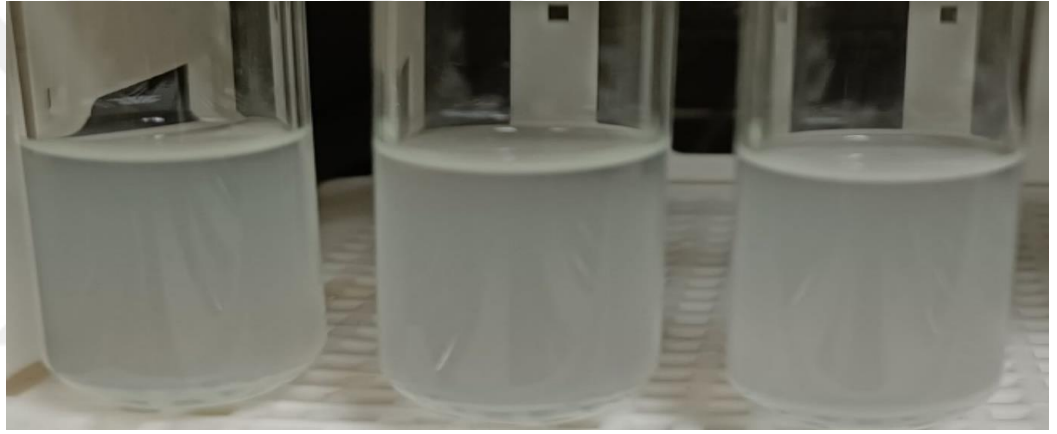
+++; Yüksek otoagregasyon; ++; Orta dereceli otoagregasyon; +; Düşük otoagregasyon



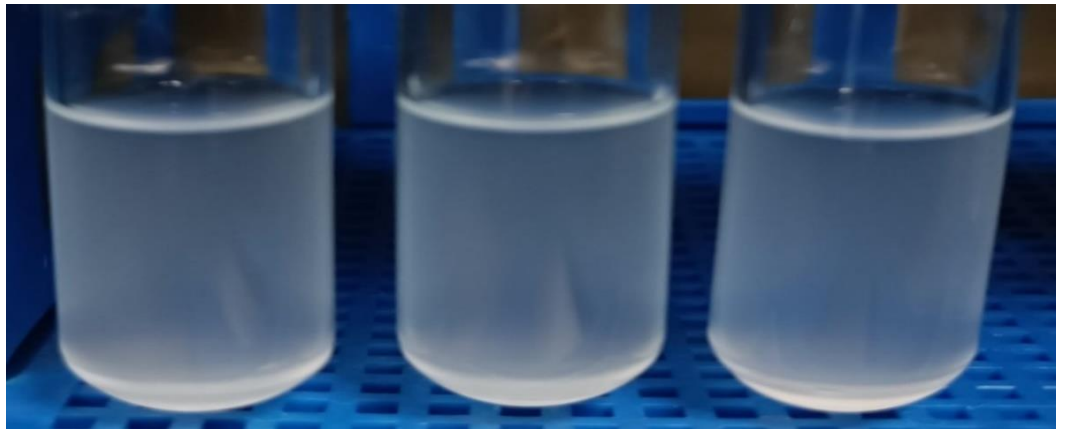
Şekil 4. 11. *Lactobacillus* spp. izolatlarının otoagregasyon



Şekil 4. 12. En yüksek otoagregasyon belirlenen *Lactobacillus* spp.TO1.



Şekil 4. 13. Otoagregasyonu yüksek *Lactobacillus* spp.TO4.



Şekil 4. 14. Otoagregasyonu en düşük *Lactobacillus* spp.MM1.

4.8 Koagregasyon

Probiyotik bakterilerin diğerk mikroorganizmalarla birlikte bağırsak lümenine hücre yüzeyi molekülleri arayıcıyla yapışması koagregasyon olarak bilmektedir (Cervin, 2019). Probiyotikler koagregasyon aktivitesi ile patojenik mikroorganizmalarla rekabete girerek bağırsak lümeninde patojenlerin büyümesini engelleyebilir veya inhibe edebilmektedir (Nair vd.,2017).

Bu çalışmada Bölüm 4.4’ de ve Çizelge 4.4’de antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre *Lactobacillus* spp. izolatlarının antimikrobiyal aktivitesinin yüksek olduğu gram negatif *E. coli* ATCC 35218 ve gram pozitif *S. aureus* ATCC 25923 test bakterileri olarak seçilmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının koagregasyon aktiviteleri yüzde olarak Çizelge 4.10 ve Şekil 4.17’ da verilmiştir.

Lactobacillus spp. izolatlarının *E. coli* ATCC 35218 ile koagregasyonu değerlendirildiğinde en yüksek koagregasyon *Lactobacillus* spp. TO2 izolatında (%30) belirlenmiştir. *Lactobacillus* spp. MM3, TO1, TO3 ve TO4 izolatlarının *E. coli* ATCC 35218 ile koagregasyonun yüksek olduğu gözlemlenirken, OO1, OO2, OO3 ve OO4 ile koagregasyon olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.10). TO1, TO2, TO3 ve TO4 izolatlarının *E. coli* ATCC 35218 test bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkisinde güçlü olduğu daha önce belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Ancak OO1, OO2, OO3 ve OO4 izolatlarında *E.coli* ile koagregasyon aktivitesi belirlenmezken antimikrobiyal etkisinin olduğu gözlenmiştir. *Lactobacillus* spp. TO2 ve OO1 izolatlarının *E. coli* ATCC 35218 ile koagregasyon görüntüleri Şekil 4.18 (a) ve (b) de verilmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının *E. coli* ATCC 35218 ile koagregasyon aktiviteleri ve EPS üretimleri arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($r=0,210$, $P>0,05$). Ancak EPS üretimi yüksek olan TO3 (365,8 mg/L) ve TO4 (362,58 mg/L) izolatlarının *E. coli* ATCC 35218 ile koagregasyonunda yüksek olduğu gözlenmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının otoagregasyon ve *E. coli* ATCC 35218 ile koagregasyon aktiviteleri arasında istatistiksel olarak pozitif yönde yüksek ilişki belirlenmiştir ($r=0,876$ $P<0,01$). Yüksek otoagregasyon belirlenen TO1 (%31), TO2 (%27,7) ve TO4 (%29,5) izolatlarının koagregasyon aktivitelerinde yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Lactobacillus spp. izolatlarının *S. aureus* ATCC 25923 ile koagregasyonu değerlendirildiğinde en yüksek koagregasyon *Lactobacillus* spp. TO4 izolatında (%28) belirlenmiş ancak bu izolatta *S. aureus*'a karşı herhangi bir antimikrobiyal etki görülmemiştir (Çizelge 4.4). MM3, TO1, TO2 izolatlarının *S. aureus* ATCC 25923 ile koagregasyonun yüksek olduğu gözlemlenirken, OO1 ve OO3 OO4 ile koagreg olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.12). *Lactobacillus* spp. TO4 izolatının *E.coli* ATCC 35218 ve *S. aureus* ATCC 25923 ile koagregasyon görüntüleri Şekil 4.19 (a) ve (b) de verilmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının *S. aureus* ATCC 25923 ile koagregasyon aktiviteleri ve EPS üretimleri arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($r=0,253$, $P>0,05$). Ancak EPS üretimi yüksek olan *Lactobacillus* spp. TO4 izolatının (362,58 mg/L) *S. aureus* ATCC 25923 ile koagregasyon aktivitesinde yüksek olduğu gözlenmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının otoagregasyon ve *S. aureus* ATCC 25923 ile koagregasyon aktiviteleri arasında istatistiksel olarak pozitif yönde güçlü ilişki belirlenmiştir ($r=0,909$ $P<0,01$). Yüksek otoagregasyon belirlenen TO1 (%31), TO2 (%27,7) ve TO4 (%29,5) izolatlarının koagregasyon aktivitelerinde yüksek olduğu tespit edilmiştir.

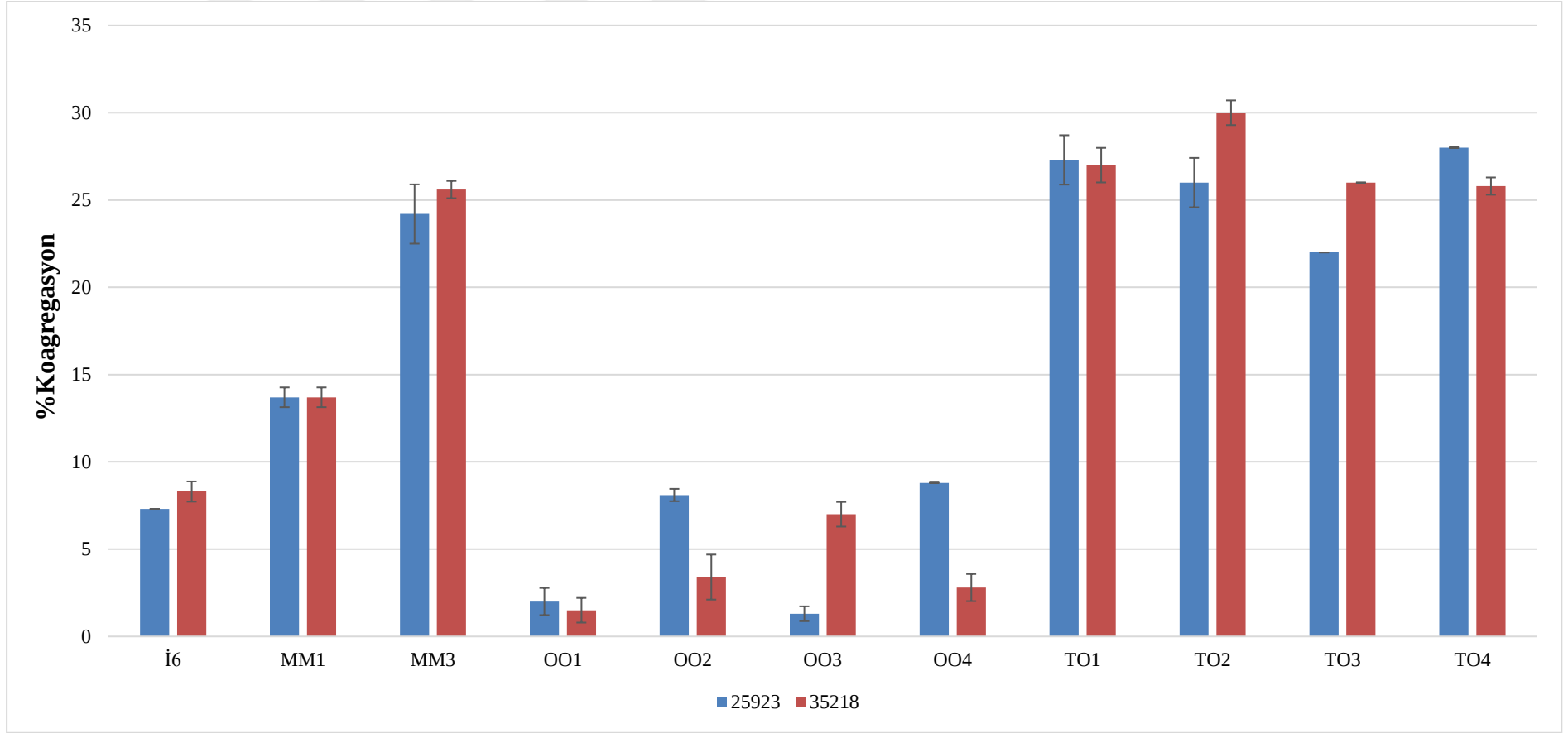
L. plantarum KLDS 10328 suşunun 5 saatlik inkübasyon sonrasında %26,37 oranında otoagregasyon aktivitesi, *L. monocytogenes* CMCC 54004 ($\%24,01 \pm 0.40$) ve *E. coli* ATCC 25922 ($\%20,46 \pm 0.21$) test bakterileri ile koagreg olabildikleri bildirilmiştir (Ma vd., 2020). Rodríguez-Sánchez vd. (2021), 28 adet potansiyel probiyotik suşun *S. aureus* ile koagregasyon aktivitesini araştırdıklarında *L. plantarum* Lb71 (%55,3), *L. plantarum* Lb41 (%52,9) ve *L. plantarum* Lb76 (%49,4) suşlarının yüksek koagregasyon aktivitesi gösterdiğini bildirmiştir. Bu araştırmacılar %20'nin altında olan değerleri ise zayıf koagregasyon aktivitesi olarak değerlendirmişlerdir. Zhang vd. (2022) yaptıkları çalışmada inek sütünden 14 bakteri izole edilmiş ve koagregasyon kabiliyetleri araştırılmıştır. 14 izolatın *E. coli* ATCC 25922 ile koagregasyonu değerlendirildiğinde en yüksek koagregasyon L20 izolatı ($76,32 \pm 2,27$) belirlendiği, L5, L14, L7 ve L22 izolatlarının *E. coli* ATCC 25922 ile yüksek koagregasyon yeteneği gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca 14 izolatın *S. aureus* ATCC 25923 ile koagregasyonu değerlendirildiğinde en yüksek koagregasyon L5 izolatı ($74,24 \pm 0,37$) belirlenirken, L20, L22, L14 ve L7 izolatlarının koagregasyon aktiviteleri yüksek olduğu rapor edilmiştir. Abushelaibi vd. (2017), deve sütünden izole edilen 9 izolatın 37°C'de 4 saat inkübasyon sonunda *E. coli* O157:H7 ile koagregasyonu

değerlendirildiğinde en yüksek koagregasyon İSO 73 izolatı (%16,2) belirlenirken, İSO 34, İSO 22 ve İSO 70 izolatları yüksek koagregasyon aktiviteleri olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca 9 izolatın 37°C’de 4 saat inkübasyon sonunda *S. aureus* ATCC 15923 ile koagregasyonu değerlendirildiğinde en yüksek koagregasyon İSO 73 izolatı (%16,9) belirlenirken, İSO 70, İSO 34 ve İSO 22 izolatları yüksek koagregasyon aktiviteleri olduğu rapor edilmiştir. Bizim çalışmalarımızda ve literatür araştırmalarımızda olduğu gibi otoagregasyon yetenekleri yüksek olan izolatların *E. coli* ve *S. aureus* ile koagregasyon aktivitelerinin yüksek olduğu görülmektedir.

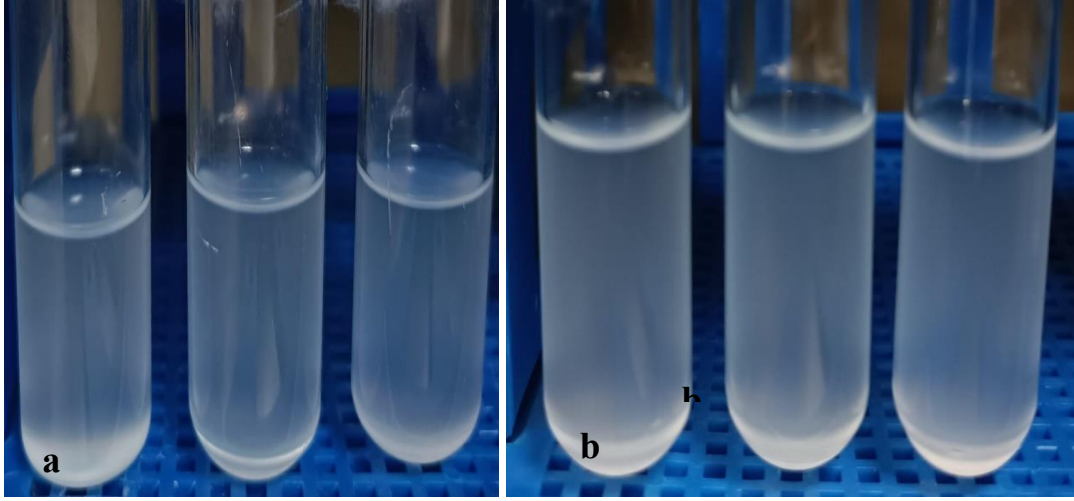
Khalil vd. (2018), yaptıkları çalışmada tempoyak’tan izole edilen 7 farklı *Lactobacillus* spp. izolatlarının *E. coli* ATCC O157:H7 ile koagregasyon aktiviteleri ve EPS üretimleri arasındaki korelasyon anlamlı olmadığı ancak EPS üretimi en yüksek olan *L. pentosus* DUR20 (850 mg/L) izolatı *E. coli* ATCC O157:H7 ile koagregasyonunda en yüksek olduğu rapor edilmiştir. *S. aureus* ATCC 6538 ile koagregasyon aktiviteleri ve EPS üretimleri arasındaki korelasyonda anlamlı olmadığı ancak EPS üretimi en yüksek olan *L. pentosus* DUR20 (850 mg/L) izolatı *S. aureus* ATCC 6538 ile koagregasyonunda en yüksek olduğu rapor edilmiştir. Yapılan çalışmada ve literatürde olduğu gibi Yüksek EPS üreten izolatlar koagregasyon oluşturma yeteneklerinde yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bakterilerin EPS-koagregasyon arasındaki anlamlı ilişki türlerinden ziyade, özellikle belirli suşlara bağlı olduğunu ortaya koymaktadır.

Çizelge 4. 10. *Lactobacillus* spp. izolatlarının yüzde koagregasyonu.

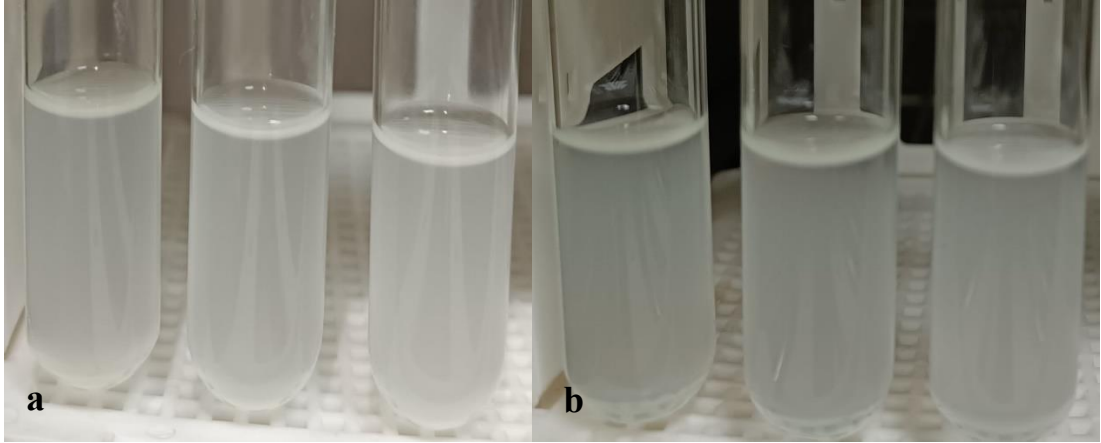
İzolatlar	% Koagregasyon <i>E. coli</i> ATCC 35218	%Koagregasyon <i>S. aureus</i> ATCC 25923
<i>Lactobacillus</i> spp. İ6	8,3±0,00	7,3±0,00
<i>Lactobacillus</i> spp. MM1	13,7±0,60	13,7± 0,60
<i>Lactobacillus</i> spp. MM3	25,6±0,50	24,2±1,70
<i>Lactobacillus</i> spp. OO1	1,5±0,70	2,0±0,80
<i>Lactobacillus</i> spp. OO2	3,4± 1,30	8,1±0,35
<i>Lactobacillus</i> spp. OO3	7,0±0,70	1,3±0,42
<i>Lactobacillus</i> spp. OO4	2,8±0,80	8,8±0,00
<i>Lactobacillus</i> spp. TO1	27,0±1,00	27,3±1,40
<i>Lactobacillus</i> spp. TO2	30,0±0,70	26,0±1,40
<i>Lactobacillus</i> spp. TO3	26,0±0,00	22,00±0,00
<i>Lactobacillus</i> spp. TO4	25,8±0,50	28,0±0,00



Şekil 4. 15. *Lactobacillus* spp. izolatlarının koagregasyon aktiviteleri.



Şekil 4. 16. *Lactobacillus* sp. TO2 (a) ve OO1 (b) izolatlarının *E. coli* ATCC 35218 ile koagregasyon görüntüleri.



Şekil 4. 17. *Lactobacillus* spp. TO4 izolatlarının (a) *E.coli* ATCC 35218, (b) *S.aureus* ATCC 25923 ile koagregasyon görüntüsü.

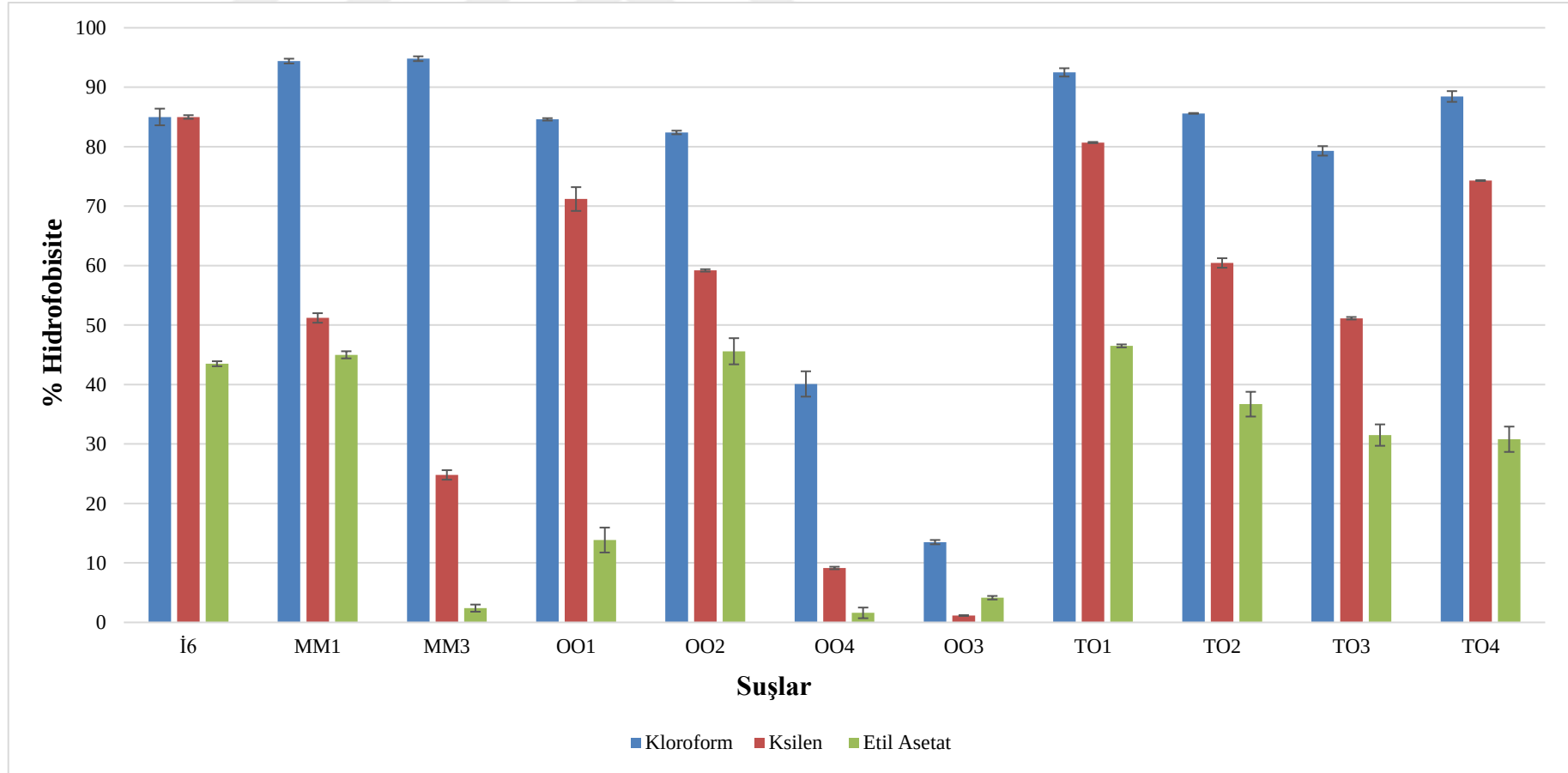
4.9 Hidrofobisite

Hidrofobisite, bakterilerin hücre yüzey özelliklerinin ve konakçı hücreler ile arasındaki etkileşimin belirlenmesinde önemli bir yöntemdir (Krausova vd., 2019). *Lactobacillus* spp. izolatlarının hücre yüzey hidrofobitesini belirlemek için p-ksilen (polar olmayan nötral çözücü), kloroform (polar asidik çözücü) ve etil asetat (polar bazik çözücü) kullanılmış, sonuçlar Çizelge 4.11 ve Şekil 4. 20 da gösterilmiştir.

Lactobacillus spp. İ6, MM1, MM3, OO1, OO2, TO1, TO2, TO3 ve TO4 izolatlarının hidrofobisite sonuçları değerlendirildiğinde, izolatların çözücülerin üçünde de yüksek hidrofobisite görülmesi yüzey yapılarının kompleks olduğunu göstermektedir. İzolatların asidik çözücü olan kloroforma ilgisinin daha yüksek olması hücre yüzeylerinde bazik yapılar olduğunu göstermektedir. *Lactobacillus* spp. OO3 izolatının kloroform, ksilen ve etil asetat ile belirlenen hidrofobiste değerlerinin diğer izolatlara göre düşük olması hücre yüzeyinin hidrofilik olduğunu göstermektedir. Bakterilerin hücre yüzeyi üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, yüzey proteinlerin varlığında yüksek hidrofobikliğe, polisakkaritlerin varlığında ise hidrofilikle ilişkilendirilmiştir (Pe'rez vd., 1998). Hücre yüzeyinin hidrofilik olduğu düşünülen *Lactobacillus* spp. OO3 izolatında EPS üretimide yüksek olarak (261,92 mg/L) tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Ksilen bakteri hücre yüzeyinin hem hidrofobisite hemde hidrofilite özelliklerinin belirlenmesi için apolar çözücü olarak hidrofobisite çalışmalarında kullanılmaktadır. *Lactobacillus* spp. OO4 ise kloroform ile %40,10 oranında hidrofobisite gösterirken, ksilen (%9,15) ve etil asetat (%1,60) ile hidrofobisitesinin düşük olarak belirlenmesi bu izolatın hücre yüzeyinin daha çok bazik yapıda olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Çalışma test edilen *Lactobacillus* spp İ6, OO1, OO2, TO1, TO2, TO3 ve TO4 izolatlarının hem kloroform hem de ksilen solventlerine yüksek afinite göstermesi, bakterilerin hücre yüzeyinde yüksek miktarda protein ve polisakkarit olduğunu düşündürmektedir. Hidrofobik etkileşimler güçlü kovalent olmayan etkileşimlerdir. Dolayısıyla hücre yüzeyi hidrofobikliği, LAB'nin yapışmasında rekabetçi bir avantaj sunabilir ve insan bağırsak epitel hücrelerine yapışma için kritik bir faktör olabilir. Rodríguez-Sánchez vd. (2021) potansiyel probiyotik 28 suşun hidrofobisite özelliklerini ksilen ve toluen hidrokarbonlarını kullanarak araştırdıklarında, ksilen ile en düşük hidrofobisite *L. brevis* Lb99 (%0,6) suşunda en yüksekte *L. rhamnosus* Lb10 (%57,1) suşunda belirlerken, toluen ile en düşük hidrofobisite *L. brevis* Lb99 (%1,1) ve en yüksek *L. paracasei* Lb24 (%67,4) suşunda tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar test ettikleri LAB'lerin hidrofilik olduğunu ve hidrofobikliğin suşa bağlı bir özellik olduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 4. 11. *Lactobacillus* spp. izolatlarının %hidrofobisite.

İzolatlar	% Hidrofobisite		
	Kloroform	Ksilen	Etil Asetat
<i>Lactobacillus</i> spp. İ6	85,00± 1,40	85,00±0,30	43,50±0,42
<i>Lactobacillus</i> spp. MM1	94,40±0,40	51,20±0,80	84,80 ±0,60
<i>Lactobacillus</i> spp. MM3	94,80±0,40	24,80±0,80	2,40±0,60
<i>Lactobacillus</i> spp. OO1	84,60±0,20	71,20±2,00	13,85±2,10
<i>Lactobacillus</i> spp. OO2	82,40±0,30	59,20±0,20	45,60±2,20
<i>Lactobacillus</i> spp. OO3	13,50±2,13	1,15±0,21	4,15±0,90
<i>Lactobacillus</i> spp. OO4	40,10±0,36	9,15±0,07	1,60±0,30
<i>Lactobacillus</i> spp. TO1	92,50± 0,70	80,7±0,10	46,50±0,25
<i>Lactobacillus</i> spp. TO2	85,60±0,07	60,45±0,80	36,70±2,08
<i>Lactobacillus</i> spp. TO3	79,30±0,80	51,15±0,21	31,50±1,80
<i>Lactobacillus</i> spp. TO4	88,45±0,90	74,30±0,00	30,80±2,13

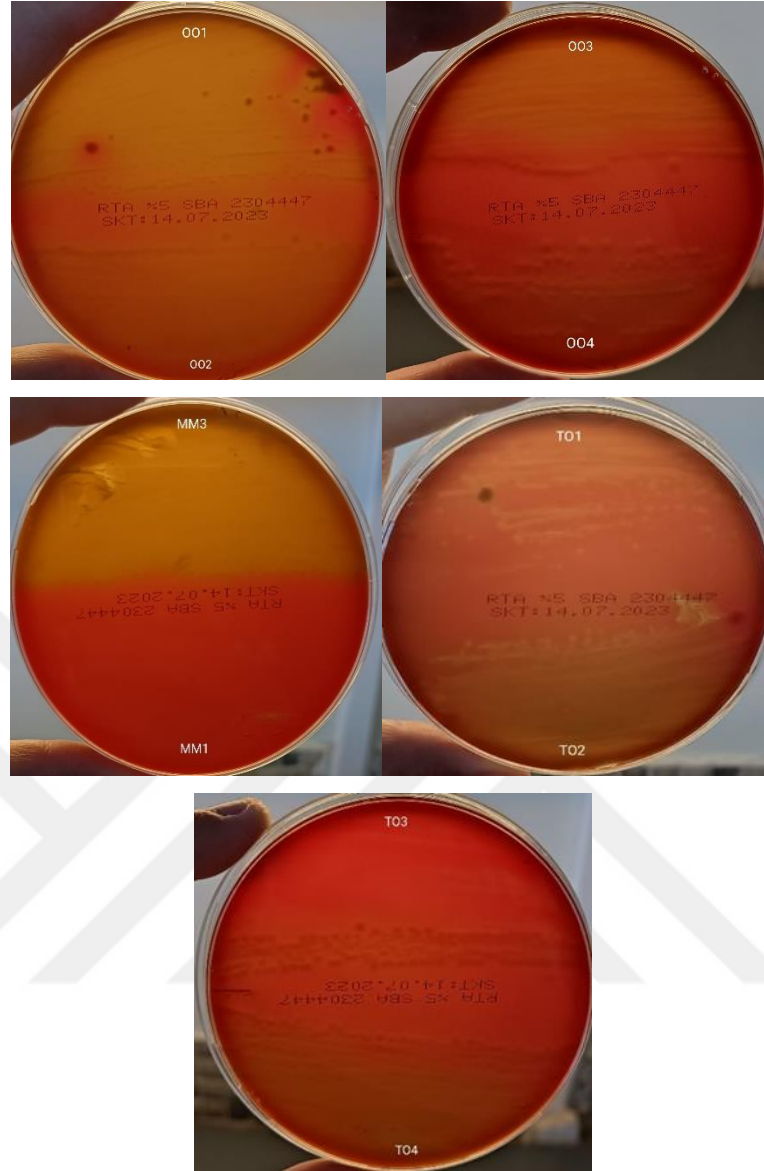


Şekil 4. 18. *Lactobacillus* spp. izolatlarının % hidrofobisite

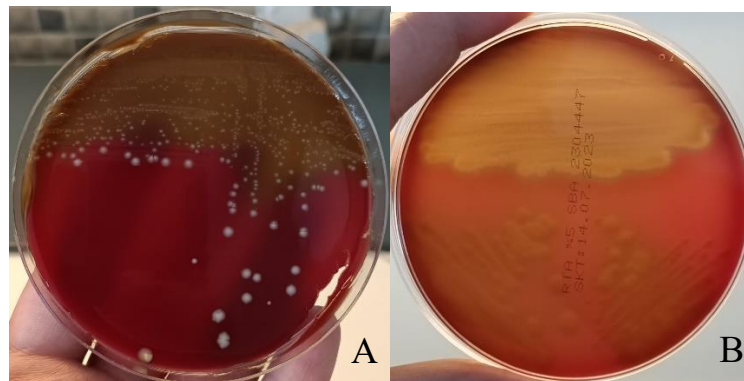
4.10 Hemolitik Aktivite

Bakterilerin probiyotik olarak kullanılabilmesi için insan sağığına olumsuz yönde etkilememesi gerekmektedir. Hemolitik aktivite de probiyotik seçimi için bir ön koşul olarak kabul edilmektedir (Kumar vd., 2022). LAB genellikle güvenli bakteriler kabul edilir ve hemoliz aktivitesinin görülmemesi, izolatlar arasında fırsatçı virölansın gelişmemesini sağlamaktadır. Ancak patojenler ve bazı LAB, H₂O₂ üretmesi sonucunda eritrositelerin yapısını bozarak hemolize uğramasına neden olabilmektedir (Kumari vd., 2022). Bu tez çalışmasında inek ağız sütünden izole edilen *Lactobacillus* spp. izolatlarının hemolizin aktivitesi koyun kanlı agar içeren besiyeri kullanılarak test edilmiştir. Test edilen *Lactobacillus* spp. izolatlarının kanlı agar besiyerinin hemoliz oluşturamayan γ -hemolitik bakteriler oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.21). Pozitif kontrol için kullanılan β -hemolitik *E. coli* ATCC 35218 suşunun kanlı agar besiyerinde tam hemoliz yaparak, kolonilerin etrafında düzgün bir hatla çevrilmiş temiz ve berrak bir hemoliz zonu oluşturduğu (Şekil 4.22.A), α -hemolitik *S. aureus* ATCC 2593 suşunun ise kolonilerin etrafında parlak-yeşil zon olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.22.B).

Hemolitik aktivite kırmızı kan hücrelerini parçalayarak anemiye ve diğer kan dolaşımı problemlerine neden olabileceğinden dolayı probiyotiklerin güvenliğini belirlemede önemli görülmektedir. Kumari vd. (2022) bebek dışkılarından izole ettikleri ve probiyotik özelliklerini araştırdıkları *L. rhamnosus* NCDC953 ve *L. reuteri* NCDC958 suşlarının ikisinde γ -hemoliz gösterdiğini bildirmiştir. Zhang vd. (2022) yaptıkları çalışmada holstein inek sütünden izole edilen 14 izolatın γ -hemolitik aktivite gösterdiği bildirilmiştir Yi vd. (2021) yaptıkları çalışmada insan sütünden izole edilen *E. faecium* 2C suşunun γ -hemolitik olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda da bu çalışmalarda olduğu gibi test edilen *Lactobacillus* spp. izolatlarının hemoliz aktivitesi göstermemesi nedeniyle probiyotik olarak kullanımının güvenli olacağını düşünmekteyiz.



Şekil 4. 19. *Lactobacillus* spp. izolatlarının hemolizin aktivitesi.



Şekil 4. 20. Hemolitik aktivite (A): β -hemolitik *E.coli* ATCC 35218 ve (B) α -hemolitik *S.aureus* ATCC 2593.

4.11 16S rDNA Dizi Analizi

Bu tez çalışmasında inek ağız sütünden izole edilen 11 adet *Lactobacillus* spp. izolatının potansiyel probiyotik olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi için fenol toleransı, asit-safraya direnç, antimikrobiyal aktivite, antibiyotiklere duyarlılık, EPS üretimi, agregasyon ve hidrofobisite gibi bazı probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Araştırılan probiyotik özellikler genel olarak değerlendirildiğinde fenol, asit ve safraya tolerans gösteren, gram negatif bakterilere antimikrobiyal aktivite gösteren, ampisilin, eritromisin ve kloromfenikol antibiyotiklerine duyarlı olarak belirlenen, yüksek EPS üretimi ile agregasyon ve hidrofobisite gösteren *Lactobacillus* spp. TO4 izolatının daha sonra yapılacak ileri çalışmalarda kullanılmak üzere 16S rDNA dizi analizi ile tanımlaması yapılmıştır. 16S rDNA dizi analizi sonucunda Çizelge 4.12’de gösterildiği gibi TO4 izolatın NCBI üzerinde %99,86 *Limosilactobacillus fermentum* türüne benzerlik göstermiştir. Ozen vd. (2023), insan kolostrumundan *Limosilactobacillus fermentum* CECT5716 suşunu izole ettiklerini bildirmişlerdir. Mollova vd. (2024), insan kolostrumundan *L. fermentum* st5 ve *L. fermentasyon* st22 suşlarını izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Çizelge 4. 12. TO4 izolatının 16S rDNA dizi analizi.

AAGTCGAACGCGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGCTTGACCTGATTGATTTTGGTCGCCAAC
GA
GTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCAGAAGCGGGGGACAACATTTGGA
AACAGATGCTAATACCGCATAACAACGTTGTTTCGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCT
CG
CTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGC
G
ATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACAC
CGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGA
GA
GTAAGTGTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CG
CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGT
TT
TCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAACTGGATAACTT
GA
GTGCAGAAGAGGGTAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
ACCAAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAG
CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGG
TT
TCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAG
GTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
A
AGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCCAACCCTAGAGATAGGGCGTTT
C
CTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG
TT
AAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTTTAGTG
AG
ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGAC
CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGC
AAATCTCTTAAAACCGTTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGA
AT
CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
CGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAGGCCAGC
C G

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde hem sağlık hem de beslenme alanlarındaki araştırmaların odağı, insan vücudunun dengeli bir mikrobiyom yapısına sahip olmasının önemi her geçen gün daha fazla artmaktadır (Redondo-Useros vd., 2020). Bağırsak florasındaki dengesizliklerin, sindirim sağlığından bağışıklık sistemi fonksiyonlarına kadar bir dizi sağlık sorununa yol açabileceği belirtilmektedir (Wang vd., 2023). Bu nedenle, probiyotikler gibi faydalı mikroorganizmaların kullanımı, sağlıklı bir mikrobiyomun korunması ve desteklenmesinde önemli bir strateji olmuştur.

Kolostrum, memeliler tarafından doğumdan hemen sonra üretilen, benzersiz besleyici ilk süttür (Hyršlova vd., 2020). Ayrıca yenidoğanı hastalıklara karşı koruyan antikorlara sahip ve normal süttten daha düşük lipid ve daha yüksek protein içermektedir (Chattha vd., 2013). Kolostrum, probiyotik potansiyeli olan bakterilerin izolasyonu için önemli bir rezervuar kaynağına sahiptir. Ayrıca son yıllarda, kolostrumun probiyotik özelliklere sahip olduğu ve sindirim sistemi sağlığını doğrudan etkilediği öne sürülmüştür (Ceniti vd., 2023). Kolostrum probiyotikleri, geleneksel probiyotiklerin sindirim sistemi ve bağışıklık sistemi faydalarının yanı sıra, kolostrumun kendine özgü besleyici bileşenlerinden de faydalanabileceği düşünülmektedir (Bagwe-Parab vd., 2020).

Bakterikler probiyotik olarak değerlendirilmesi için insan vücudunun dayattığı olumsuz koşullara (fenol, düşük pH ve safra asidine tolerans) karşı dayanıklılığa sahip olmaları gerekmektedir. Gastrointestinal sistemde hem otoagregasyon hem koagregasyon hem de hidrofilik özellikleri yeteneklerine sahip olmaları gerekmektedir. Probiyotik adaylar epitel hücrelere yapıştıktan sonra karbonhidratları, proteinleri ve EPS gibi bakteriyi asit, safra, antibiyotik vb. gibi stres koşullarından koruyabilen, epitel yüzeylere tutunmasında ve koagregasyon aktivitelerinde etkili olabilen ayrıca patojenlere inhibe edebilecek maddeler üreterek veya besin rekabetine girerek patojen bakterileri inhibe edebilecek antimikrobiyal özellik göstermelidir. Son olarak antibiyotik ve hemolitik aktivite gibi güvenlik değerlendirmesi gerekmektedir. Kriterler göz önüne alındığında Aksaray'daki ineklerin ağız sütünden izole edilen 11 *Lactobacillus* spp. izolatlarının bakteri izolatlarının probiyotik özellikleri araştırılmıştır.

Fenol, besinle veya endojen olarak alınan aromatik bileşiklerin bazı probiyotik suşlar tarafından deaminasyonu ile oluşabileceği ve bakteriyostatik etki gösterebilmesinden dolayı probiyotikler için önemli bir özellik olarak bildirilmiştir (Pinto vd., 2006). 11 adet *Lactobacillus* spp. izolatlarının %0,4 oranında fenol içeren ortamda hayatta kalma yüzdeleri araştırılmıştır. izolatların %0,4 fenollü ortamda 24 saat sonunda üremeleri incelendiğinde en yüksek canlılık oranını TO4 izolatı (%25,21) gösterirken, MM1 (%22,86), OO4 (%18,16), OO3 (%5,92) ve OO1 (1,84) izolatlarında %0,4 fenollü ortamda canlı kalabildikleri belirlenmiştir. OO2, TO1, TO2, TO3, MM3 ve İ6 izolatlarının ise %0,4 fenole duyarlı oldukları belirlenmiştir.

Bakteri izolatların probiyotik olarak değerlendirilmesi için sindirim sırasında aside karşı toleranslı olmalıdır. *Lactobacillus* spp. izolatlarının pH 2.0'de 0. saatten sonra canlılık görülmemiştir. pH 3'de 4 saat inkübasyon sonunda TO1, TO3 ve TO4 izolatlarının üremelerinde artış gözlemlenirken OO4 izolatlarının üremesi stabil olduğu tespit edilmiştir. pH 4'te, İ6, MM1 OO1 ve OO3 izolatlarında üremeleri zamana bağlı azalma görülürken, MM3, OO2, OO4, TO1, TO2, TO3 ve TO4 izolatların üremelerinde artış tespit edilmiştir. Yüksek EPS üretimi gösteren TO3 ve TO4 izolatlarının diğer izolatlara göre pH4 asidik ortamda canlılığında yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Probiyotik bakterilerin safraya karşı direnç göstermeleri, safra asitlerinin antimikrobiyal etkisinden korunarak yararlı etkilerini göstermek üzere bağırsağa ulaşmalarını sağlamaktadır (Succi vd., 2005). Bu tez çalışmasında da %0,0 (kontrol), %0,3 ve %0,5 safra konsantrasyonu içeren ortamda 0. 3. ve 6. saat inkübasyon sonunda *Lactobacillus* spp. izolatlarının safra toleransları araştırılmıştır. *Lactobacillus* spp. izolatlarının genel olarak safraya toleransının yüksek olduğu belirlenirken; %0,3 safra ortamındaki canlılıklarının, %0,5 safra içeren ortama göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. TO2 (8,90 Log kob/mL), TO3 (9,74 Log kob/mL) ve TO4 (8,90 Log kob/mL) izolatlarının %0,3 safraya diğer izolatlarla kıyaslandığında toleransının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Safra toleransı araştırılan 11 izolat arasında MM3 ve OO2 izolatlarının %0,3 safraya toleransının daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının %0,5 oranında safra içeren ortamda geliştirildiklerinde canlılıklarında azalma görülürken, izolatların canlılığında en yüksek artış TO3 izolatında tespit edilmiştir. MM3 ve OO2 izolatlarının %0,3 ve 0,5 safraya duyarlı oldukları, TO2, TO3 ve TO4 izolatlarında da her iki safraya toleransının yüksek olduğu

belirlenmiştir. EPS üretimi yüksek olan TO3 ve TO4 izolatlarının safra ortamındaki canlılıklarında yüksek olduğu belirlenmiştir. Safraya toleransı üzerinde EPS üretimin etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

Probiyotik mikroorganizmaların gastrointestinal sistemden geçerek bağırsağa ulaştığında patojen bakterileri inhibe edecek antimikrobiyal metabolitler üreterek rekabet edebilmesi ve patojenlerin bağırsak florasına yapışmasını engelleyebilmesi probiyotikler için istenilen bir özelliktir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 11229 *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* RSKK 863, *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve test bakterilerine karşı antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda kullanılan 11 adet *Lactobacillus* spp. izolatlarından elde edilen kültür supernatantlarının (postbiyotiklerin) *E. coli* ATCC 11229 ve *E. coli* ATCC 35218 test bakterilerine antimikrobiyal etkisinin olduğu, *L. monocytogenes* ATCC 7644' e karşı ise etkisinin olmadığı belirlenmiştir. İzolatların %82'si *S. enteritidis* ATCC 13076 suşuna karşı inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenirken, bu etki en yüksek, 11,41 mm inhibisyon zon çapı ile *Lactobacillus* spp. MM3 izolatında belirlenmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının % 64'ü *S. aureus* ATCC 25923 suşuna karşı inhibisyon etkisi gösterirken, en yüksek inhibisyon etkisi 20,14 mm inhibisyon zon çapı ile *Lactobacillus* spp. TO2 izolatında tespit edilmiştir. Suşların % 73'ü *Bacillus cereus* RSKK 863 suşuna karşı inhibisyon etkisi gösterirken, en yüksek inhibisyon etkisi 19,15 mm inhibisyon zon çapı ile *Lactobacillus* spp. İ6 izolatında tespit edilmiştir. *Lactobacillus* spp. İ6, MM1, MM3, OO1, OO4, TO1 ve TO2 izolatlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644 dışında tüm test bakterilerine antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *Lactobacillus* spp. TO4 ve OO3 izolatları ise gram negatif *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218 ve *S. enteritidis* ATCC 13076 test bakterilerine antimikrobiyal etki gösterirken, gram pozitif patojenler üzerinde ise etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Antibiyotiklere karşı duyarlılık, probiyotiklerin güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmek için kritik bir parametredir (Pradhan vd., 2020). *Lactobacillus* spp. izolatlarının ampicilin antibiyotğine %100 oranında yüksek duyarlılık gösterdikleri tespit edilmiştir. Protein sentezini inhibe eden eritromisin (%82) ve kloromfenikol (%91) antibiyotikleri izolatların yüksek duyarlılık gösterdikleri antibiyotikler olarak tespit edilmiştir. *Lactobacillus* spp. OO3 ve OO4 izolatlarının kullanılan

antibiyotiklere genel olarak dirençli olduğu görülmüştür. Antibiyotiklere duyarlılık oranı yüksek olan *Lactobacillus* spp. MM1 izolatının olarak görülmektedir.

Bakterilerin mideden geçip bağırsağa ulaştıklarında probiyotik özelliklerini gösterebilmelerindeki en büyük avantajlardan biri de EPS üretim kapasitelerine sahip olmalarıdır. *Lactobacillus* spp. OO2 (263,93 mg/L) ve OO4 (275,48 mg/L) izolatlarında da yüksek EPS üretimi görülmüştür. EPS üretimi yüksek olan izolatların düşük asitliğe daha dirençli ve safraya daha toleranslı olması dikkat çekicidir. Elde edilen sonuçlara göre, EPS üretimi ile asit direnci, safra toleransı, hidrofobisite ve agregasyon özellikleri arasında pozitif bir ilişki olduğu tespit edilmiştir.

Otoagregasyon, probiyotik bakterilerin büyük kütleler oluşturarak bağırsak mukozasına yapışma, kolonizasyonunu (Grigoryan vd., 2018) ve probiyotiklerin diğer bağırsak mikroorganizmalarıyla etkileşimlerini artırabilir. *Lactobacillus* spp. TO1 izolatının en yüksek otoagregasyon aktivitesi (%31) göstermiştir. Test edilen bakteriler içerisinde *Lactobacillus* spp. MM3, TO2 ve TO4 izolatlarında yüksek otoagregasyon belirlenirken, İ6 ve MM1 izolatlarının ise otoagregasyonun düşük olduğu belirlenmiştir. EPS üretimi yüksek olan *Lactobacillus* spp. TO3 (365,8 mg/L) ve TO4 (362,58 mg/L) izolatlarının otoagregasyon aktivitelerinde yüksek olduğu (%20 ve 29,5) gözlemlenirken, EPS üretimi düşük olan MM1 (209,2 mg/L) izolatının otoagregasyonunun da düşük olduğu (%9) tespit edilmiştir.

Probiyotikler koagregasyon aktivitesi ile patojenik mikroorganizmalarla rekabete girerek bağırsak lümeninde patojenlerin büyümesini engelleyebilir veya inhibe edebilmektedir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının *E. coli* ATCC 35218 ile koagregasyonu değerlendirildiğinde en yüksek koagregasyon *Lactobacillus* spp. TO2 izolatında (%30) belirlenmiştir. *Lactobacillus* spp. MM3, TO1, TO3 ve TO4 izolatlarının *E. coli* ATCC 35218 ile koagregasyonun yüksek olduğu gözlemlenirken, OO1, OO2, OO3 ve OO4 ile koagregasyon olmadığı belirlenmiştir. EPS üretimi yüksek olan TO3 (365,8 mg/L) ve TO4 (362,58 mg/L) izolatlarının *E. coli* ATCC 35218 ile koagregasyonunda yüksek olduğu gözlemlenmiştir. *Lactobacillus* spp. izolatlarının *S. aureus* ATCC 25923 ile koagregasyonu değerlendirildiğinde en yüksek koagregasyon *Lactobacillus* spp. TO4 izolatında (%28) belirlenmiştir. MM3, TO1, TO2 ve TO4 izolatlarının *S. aureus* ATCC 25923 ile koagregasyonun yüksek olduğu gözlemlenirken, OO1 ve OO3 OO4 ile koagregasyon olmadığı belirlenmiştir. EPS üretimi yüksek olan *Lactobacillus* spp. TO4

izolatının (362,58 mg/L) *S. aureus* ATCC 25923 ile koagregasyon aktivitesinde yüksek olduğu gözlenmiştir.

Hidrofobisite, bakterilerin hücre yüzey özelliklerinin ve konakçı hücreler ile arasındaki etkileşimin belirlenmesinde önemli bir yöntemdir. *Lactobacillus* spp. İ6, MM1, MM3, OO1, OO2, TO1, TO2, TO3 ve TO4 izolatlarının hidrofobisite sonuçları değerlendirildiğinde, izolatların her üç çözücüde de yüksek hidrofobisite göstermesi yüzey yapılarının kompleks olduğunu göstermektedir. İzolatların asidik çözücü olan kloroforma ilgisinin daha yüksek olması hücre yüzeylerinde bazik yapılar olduğunu göstermektedir. *Lactobacillus* spp. OO3 izolatının kloroform, ksilen ve etil asetat ile belirlenen hidrofobiste değerlerinin diğer izolatlarla göre düşük olması hücre yüzeyinin hidrofilik olduğunu göstermektedir. *Lactobacillus* spp İ6, OO1, OO2, TO1, TO2, TO3 ve TO4 izolatlarının hem kloroform hem de ksilen solventlerine yüksek afinite göstermesi, bakterilerin hücre yüzeyinde yüksek miktarda protein ve polisakkarit olduğunu düşündürmektedir.

Hemolitik aktivite de probiyotik seçimi için bir ön koşul olarak kabul edilmektedir (Kumar vd., 2022). LAB genellikle güvenli bakteriler kabul edilir ve hemoliz aktivitesinin görülmemesi, izolatlar arasında fırsatçı virülansın gelişmemesini sağlamaktadır. Ancak patojenler ve bazı LAB, H₂O₂ üretmesi sonucunda eritrositelerin yapısını bozarak hemolize uğramasına neden olabilmektedir (Kumari vd., 2022). *Lactobacillus* spp. İzolatlarının kanlı agar besiyerinde hemoliz oluşturamayan γ -hemolitik bakteriler oldukları belirlenmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda Aksaray'daki ineklerin ağız sütünden izole edilen 11 bakteri izolatları içerisinde probiyotik potansiyeli olan TO4 izolatı vücudunun dayattığı olumsuz koşullara, hem otoagregasyon hem koagregasyon hem de hidrofilik özellikleri sahip olması patojenlere karşı yüksek antimikrobiyal aktivite göstermesi, yüksek EPS üretmesi ve güvenlik sorunu teşkil etmemesi sebebiyle 16S rDNA dizi analizi yapılmış ve NCBL üzerindeki en yakın olduğu tür %99,86 benzerlik ile *Limosilactobacillus fermentum* türüne ait olduğu tespit edilmiştir. Tez çalışmasının devamında yapılacak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla çiftlik hayvanlarının yemlerinde doğal katkı olarak kullanımı ve araştırılması hedeflenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abid, Y., Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzetta, R., Corsaro, M. M., Attia, H. ve Azabou, S., 2018. Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria, *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 1, 719-728.
- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P. ve Ayyash, M., 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk, *LWT-Food Science and Technology*, 79, 1, 316-325.
- Albesharat, R., Ehrmann, M. A., Korakli, M., Yazaji, S. ve Vogel, R. F., 2011. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies, *Systematic and Applied Microbiology*, 34, 2, 148-155.
- Alp, G. ve Aslim, B., 2010. Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk, *Anaerobe*, 16, 2, 101-105.
- Bagwe-Parab, S., Yadav, P., Kaur, G., Tuli, H. S. ve Buttar, H. S., 2020. Therapeutic applications of human and bovine colostrum in the treatment of gastrointestinal diseases and distinctive cancer types: The current evidence, *Frontiers in Pharmacology*, 11, 01100.
- Berings, M., Karaaslan, C., Altunbulakli, C., Gevaert, P., Akdis, M., Bachert, C. ve Akdis, C. A., 2017. Advances and highlights in allergen immunotherapy: on the way to sustained clinical and immunologic tolerance, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140, 5, 1250-1267.
- Beristain-Bauza, S. C., Mani-López, E., Palou, E. ve López-Malo, A., 2016. Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*, *Food Control*, 62, 44-51.
- Bezkorovainy, A., 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 2, 399-405.
- Boonaert, C. J. ve Rouxhet, P. G., 2000. Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 6, 2548-2554.
- Boudry, C., Dehoux, J. P., Portetelle, D. ve Buldgen, A., 2008. Bovine colostrum as a natural growth promoter for newly weaned piglets: a review, *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 12, 2, 157-170.
- Carr, F. J., Chill, D. ve Maida, N., 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey, *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 4, 281-370.
- Castro-Bravo, N., Wells, J. M., Margolles, A. ve Ruas-Madiedo, P., 2018. Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment, *Frontiers in Microbiology*, 9, 2426.

- Ceniti, C., Costanzo, N., Morittu, V. M., Tilocca, B., Roncada, P. ve Britti, D., 2023. Colostrum as an Emerging food: Nutraceutical Properties and Food Supplement, *Food Reviews International*, 39, 7, 4636-4664.
- Cervin, J., 2019. Evaluation of fucosylated receptors for Cholera toxin in the human small intestine, Doctoral thesis, Sahlgrenska Academy, Microbiology and Immunology Institute of Biomedicine, Gothenburg, Sweden.
- Chattha, K. S., Vlasova, A. N., Kandasamy, S., Esseili, M. A., Siegismund, C., Rajashekara, G. ve Saif, L. J., 2013. Probiotics and colostrum/milk differentially affect neonatal humoral immune responses to oral rotavirus vaccine, *Vaccine*, 31, 15, 1916-1923.
- Chen, T., Wang, L., Li, Q., Long, Y., Lin, Y., Yin, J., Zeng, Y., Huang, L., Yao, T., Abbasi, M. N., Yang, H., Wang, Q., Tang, C., Khan, T. A., Liu, Q., Yin, J., Tu, Q., ve Yin, Y., 2020. Functional probiotics of lactic acid bacteria from Hu sheep milk, *BMC Microbiology*, 20, 1, 1-12.
- Das, S., Vishakha, K., Banerjee, S., Bera, T., Mondal, S. ve Ganguli, A., 2022. A novel probiotic strain of *Lactobacillus fermentum* TIU19 isolated from Haria beer showing both *in vitro* antibacterial and antibiofilm properties upon two multi resistant uro-pathogen strains, *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100150.
- de Almada, C. N., Nunes de Almada, C., Martinez, R. C. R. ve Sant'Ana, A. D. S., 2015. Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 4175-4199.
- de Man, J. D., Rogosa, D. ve Sharpe, M. E., 1960. A medium for the cultivation of *lactobacilli*, *Journal of Applied Microbiology*, 23, 1, 130-135.
- de Melo Pereira G. V., de Oliveira C. B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V. ve Soccol, C. R., 2018. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria, *Biotechnology Advances*, 36, 8, 2060-2076.
- Dimitrellou, D., Kandyli, P., Petrović, T., Dimitrijević-Branković, S., Lević, S., Nedović, V. ve Kourkoutas, Y., 2016. Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk, *LWT-Food Science and Technology*, 71, 169-174.
- Divya, J. B., Varsha, K. K. ve Nampoothiri, K. M., 2012. Newly isolated lactic acid bacteria with probiotic features for potential application in food industry, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 1314-1324.
- Doron, S., ve Snyderman, D. R., 2015. Risk and safety of probiotics, *Clinical Infectious Diseases*, 60, 2, 129-134.
- Duary, R. K., Rajput, Y. S., Batish, V. K ve Grover, S., 2011. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic *lactobacilli* to human colonic epithelial cells, *The Indian Journal of Medical Research*, 134, 5, 664-671.
- Duraisamy, S., Husain, F., Balakrishnan, S., Sathyan, A., Subramani, P., Chidambaram, P., Arokiyaraj, S., Al-Qahtani, W. H., Rajabathar, J. ve Kumarasamy, A., 2022.

- Phenotypic assessment of probiotic and bacteriocinogenic efficacy of indigenous LAB strains from human breast milk, *Current Issues in Molecular Biology*, 44, 2, 731-749.
- El-Loly, M. M., 2022. Colostrum ingredients, its nutritional and health benefits-an overview, *Clinical Nutrition Open Science*, 44, 126-143.
- Erkkilä, S. ve 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, 3, 297-300.
- Fadda, M. E., Mossa, V., Deplano, M., Pisano, M. B. ve Cosentino, S., 2017. *In vitro* screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics, *LWT Food Science and Technology*, 75, 100-106.
- Farkye, N. Y., 2003. Other enzymes, In *Advanced Dairy Chemistry 1 Proteins*, 1, 571-603.
- Foligné, B., Dewulf, J., Breton, J., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. ve Pot, B., 2010. Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: immunomodulation by *Oenococcus oeni*, *International Journal of Food Microbiology*, 140, 2-3, 136-145.
- Fox, P. F. ve Kelly, A. L., 2006. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects Part 1, *International Dairy Journal*, 16, 6, 500-516.
- Gray, F. V. ve Pilgrim, A. F., 1950. Fermentation in the Rumen of the Sheep, *Nature*, 166, 478.
- Grigoryan, S., Bazukyan, I. ve Trchounian, A., 2018. Aggregation and adhesion activity of lactobacilli isolated from fermented products *in vitro* and *in vivo*: a potential probiotic strain, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10, 269-276.
- Gupta, M., Pattanaik, A. K., Singh, A., Sharma, S., Jadhav, S. E., Kumar, A. ve Verma, A. K., 2021. Functional and probiotic characterization of *Ligilactobacillus salivarius* CPN60 isolated from calf faeces and its appraisal in rats, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 132, 6, 575-584.
- Hawkey, P. M., 1986. Resistant bacteria in the normal human flora, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 18, 133-139.
- Hempel, S., Newberry, S. J., Maher, A. R., Wang, Z., Miles, J. N., Shanman, R., Jhonsen, B. ve Shekelle, P. G., 2012. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis, *Jama*, 307, 18, 1959-1969.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C. ve Sanders, M. E., 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11, 506-514.

- Hyršlova, I., Krausova, G., Bartova, J., Kolesar, L. ve Curda, L., 2016. Goat and bovine colostrum as a basis for new probiotic functional foods and dietary supplements, *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 8, 2, 56-59.
- Hyršlova, I., Krausova, G., Michlova, T., Kana, A. ve Curda, L., 2020. Fermentation ability of bovine colostrum by different probiotic strains, *Fermentation*, 6, 3, 93-101.
- Jaffar, N., Ishikawa, Y., Mizuno, K., Okinaga, T. ve Maeda, T., 2016. Mature biofilm degradation by potential probiotics: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* versus *Lactobacillus* spp., *PLoS One*, 11, 7, 0159466.
- Javed, G. A., Arshad, N., Munir, A., Khan, S. Y., Rasheed, S. ve Hussain, I., 2022. Signature probiotic and pharmacological attributes of lactic acid bacteria isolated from human breast milk, *International Dairy Journal*, 127, 105-297.
- Jena, P. K., Trivedi, D., Thakore, K., Chaudhary, H., Giri, S. S. ve Seshadri, S., 2013. Isolation and characterization of probiotic properties of *lactobacilli* isolated from rat fecal microbiota, *Microbiology and Immunology*, 57, 6, 407-416.
- Kamarinou, C. S., Papadopoulou, O. S., Doulgeraki, A. I., Tassou, C. C., Galanis, A., Chorianopoulos, N. G. ve Argyri, A. A., 2022. Mapping the key technological and functional characteristics of indigenous lactic acid bacteria isolated from Greek traditional dairy products, *Microorganisms*, 10, 2, 246-261.
- Katiku, M. M., Matofari, J. W. ve Nduko, J. M., 2022. Preliminary evaluation of probiotic properties and safety profile of *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from spontaneously fermented milk, *Amabere amaruranu*, Heliyon, 8, 8, 10342.
- Khalil, E. S., Abd Manap, M. Y., Mustafa, S., Alhelli, A. M. ve Shokryazdan, P., 2018. Probiotic properties of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus* strains isolated from tempoyak. *Molecules*, 23, 2, 398-418.
- Khaneghah, A. M., Abhari, K., Eş, I., Soares, M. B., Oliveira, R. B., Hosseini, H., Rezaei, M., Balthazar, C. F., Silva, R., Cruz, A. G., Ranadheera, C. S. ve Sant'Ana, A. S., 2020. Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: A review, *Trends in Food Science & Technology*, 95, 205-218.
- Krausova, G., Hyršlova, I. ve Hynstova, I., 2019. *In vitro* evaluation of adhesion capacity, hydrophobicity, and auto-aggregation of newly isolated potential probiotic strains, *Fermentation*, 5, 4, 100-111.
- Kšonžeková, P., Bystrický, P., Vlčková, S., Pätoprstý, V., Pulzová, L., Mudroňová, D., Kubašková, T., Csankve, T., Tkáčiková, L., 2016. Exopolysaccharides of *Lactobacillus reuteri*: Their influence on adherence of *E. coli* to epithelial cells and inflammatory response, *Carbohydrate Polymers*, 141, 10-19.
- Kumar, S., Kumar, B., Chouraddi, R., Bhatia, M., Rashmi, H. M., Behare, P. V. ve Tyagi, N., 2022. *In vitro* screening for potential probiotic properties of *Ligilactobacillus salivarius* isolated from cattle calves, *Current Research in Biotechnology*, 4, 2, 275-289.

- Kumari, M., Patel, H. K., Kokkiligadda, A., Bhushan, B. ve Tomar, S. K., 2022. Characterization of probiotic *lactobacilli* and development of fermented soymilk with improved technological properties, *LWT Food Science and Technology*, 154, 112827.
- Kurkutia, D. K., Mistry, N. ve Dwivedi, M., 2019. Probiotic properties and *in vitro* biosafety assessment of human breast milk isolates, *Journal of Pure ve Applied Microbiology*, 13, 2, 1121-1134.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. ve De Keersmaecker, S. C., 2008. Genes and molecules of *lactobacilli* supporting probiotic action, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72, 4, 728-764.
- Liu, W., Chen, M., Duo, L., Wang, J., Guo, S., Sun, H., Menghe, B. ve Zhang, H., 2020. Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from human colostrum, *Journal of Dairy Science*, 103, 5, 4013-4025.
- Ma, J., Wang, W., Sun, C., Gu, L., Liu, Z., Yu, W., Chen, L., Jiang, Z. ve Hou, J., 2020. Effects of environmental stresses on the physiological characteristics, adhesion ability and pathogen adhesion inhibition of *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0328, *Process Biochemistry*, 92, 426-436.
- Markowiak, P., ve Śliżewska, K., 2017. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9, 9, 1021.
- Martins, F. S., Miranda, I. C., Rosa, C. A., Nicoli, J. R. ve Neves, M. J., 2008. Effect of the trehalose levels on the screening of yeast as probiotic by *in vivo* and *in vitro* assays, *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 1, 50-55.
- McGrath, B. A., Fox, P. F., McSweeney, P. L. ve Kelly, A. L., 2016. Composition and properties of bovine colostrum. a review, *Dairy Science & Technology*, 96, 133-158.
- Mehra, R., Garhwal, R., Sangwan, K., Guiné, R. P., Lemos, E. T., Buttar, H. S., Visen, P. K. S., Kumar, N., Bhardwaj, A. ve Kumar, H., 2022. Insights into the research trends on *Bovine Colostrum*: Beneficial health perspectives with special reference to manufacturing of functional foods and feed supplements, *Nutrients*, 14, 3, 659-680.
- Mehra, R., Singh, R., Kumar, N., Kumar, S. ve Kumar, H., 2020. Composition, properties, and health attributes of bovine colostrum, *Food Safety, Nutritional Security and Sustainability*, 10, 2, 118-123
- Mollova, D., Batsalova, T., Dzhambazov, B., Vasileva, T., Bivolarski, V. ve Iliev, I., 2024. *In vitro* Digestion: Exploring the probiotic abilities and metabolization of human milk oligosaccharides by two strains of *Limosilactobacillus fermentum* isolated from, *Journal of Functional Foods*, 114, 106068.
- Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V. ve Lunina, J. N., 2013. The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 7387-7397.

- Nair, M. S., Amalaradjou, M. A. ve Venkitanarayanan, K., 2017. Antivirulence properties of probiotics in combating microbial pathogenesis, *Advances in Applied Microbiology*, 98, 1-29.
- Nuraida, L., 2015. A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods, *Food Science and Human Wellness*, 4, 2, 47-55.
- Oerlemans, M. M., Akkerman, R., Ferrari, M., Walvoort, M. T. ve de Vos, P., 2021. Benefits of bacteria-derived exopolysaccharides on gastrointestinal microbiota, immunity and health. *Journal of Functional Foods*, 76, 104289.
- Ogunremi, O. R., Sanni, A. I. ve Agrawal, R., 2015. Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products, *Journal of Applied Microbiology*, 119, 3, 797-808.
- Oleksy-Sobczak M., Klewicka, E. ve Piekarska-Radzic, L., 2020, Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains—Optimization of synthesis and extraction conditions, *LWT Food Science and Technology*, 122, 109.
- Osmanagaoglu, O., Kiran, F. ve Ataoglu, H., 2010. Evaluation of in vitro probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF isolated from human breast milk, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2, 162-174.
- Ozen, M., Piloquet, H. ve Schaubeck, M., 2023. *Limosilactobacillus fermentum* CECT5716: clinical potential of a probiotic strain isolated from human Milk, *Nutrients*, 15, 9, 2207.
- Pe'rez, P. F., Minnaard Y., Disalvo E. A. ve De Antoni G. L., 1998. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1, 21-26.
- Pietrzak-Fiećko, R. ve Kamelska-Sadowska, A. M., 2020. The comparison of nutritional value of human milk with other mammals' milk, *Nutrients*, 12, 5, 1404-1422.
- Pinto, M. G. V., Franz, C. M., Schillinger, U. ve Holzapfel, W. H., 2006. *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products, *International Journal of Food Microbiology*, 109, 3, 205-214.
- Playford, R. J. ve Weiser, M. J., 2021. Bovine colostrum: Its constituents and uses, *Nutrients*, 13, 1, 265-288.
- Pradhan, D., Mallappa, R. H. ve Grover, S., 2020. Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria, *Food Control*, 108, 106872.
- Rajoka, M. S. R., Jin, M., Haobin, Z., Li, Q., Shao, D., Jiang, C., Huang, Q., Yang, H., Shi, J., ve Hussain, N., 2018. Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk, *LWT Food Science and Technology*, 89, 638-647.

- Rather, I. A., Bajpai, V. K., Kumar, S., Lim, J., Paek, W. K. ve Park, Y. H., 2016. Probiotics and atopic dermatitis: an overview, *Frontiers in Microbiology*, 7, 507-514.
- Raveschot, C., Coutte, F., Frémont, M., Vaeremans, M., Dugersuren, J., Demberel, S., Drider, D., Dhulster, P., Flahaut, C., ve Cudennec, B., 2020. Probiotic *Lactobacillus* strains from Mongolia improve calcium transport and uptake by intestinal cells *in vitro*, *Food Research International*, 133, 109201.
- Redondo-Useros., N., Nova, E., González-Zancada, N., Díaz, L. E., Gómez-Martínez, S. ve Marcos, A., 2020. Microbiota and lifestyle: a special focus on diet, *Nutrients*, 12, 6, 1776.
- Rodríguez-Sánchez, S., Fernández-Pacheco, P., Seseña, S., Pintado, C. ve Palop, M. L., 2021. Selection of probiotic *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity to be used as biocontrol agents in food industry, *LWT Food Science and Technology*, 143, 111142.
- Ruas-Madiedo P., Gueimonde, M., Margolles, A., Clara, G. ve Salminen, S., 2006. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus, *Journal of Food Protection*, 69, 8, 2011-2015.
- Sakwinska, O., Moine, D., Delley, M., Combremont, S., Rezzonico, E., Descombes, P., Vinyes-Pares, G., Zhang, Y., Wang, P. ve Thakkar, S. K., 2016. Microbiota in breast milk of Chinese lactating mothers, *PLoS One*, 11, 8, 0160856.
- Salas-Jara, M. J., Ilabaca, A., Vega, M. ve García, A., 2016. Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics, *Microorganisms*, 4, 3, 35-49
- Sanders, M. E., Akkermans, L. M., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J. T., Hörmannspurger, G. ve Huys, G., 2010. Safety assessment of probiotics for human use, *Gut microbes*, 1, 3, 164-185.
- Sharma, A., Lavania, M., Singh, R. ve Lal, B., 2021. Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28, 3, 1622-1632.
- Silva, E. G. D. S. O., Rangel, A. H. D. N., Mürmam, L., Bezerra, M. F. ve Oliveira, J. P. F. D., 2019. Bovine colostrum: benefits of its use in human food, *Food Science and Technology*, 39, 355-362.
- Srikham, K. ve Thirabunyanon, M., 2022. Bioprophylactic potential of novel human colostrum probiotics via apoptotic induction of colon cancer cells and cell immune activation, *Biomedicine ve Pharmacotherapy*, 149, 112871.
- Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S. ve Coppola, R., 2005. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese, *FEMS Microbiology Letters*, 244, 1, 129-137.

- Sun, Q., Chen, X., Yu, J., Zen, K., Zhang, C. Y. ve Li, L., 2013. Immune modulatory function of abundant immune-related microRNAs in microvesicles from bovine colostrum, *Protein ve cell*, 4, 3, 197-210.
- Techo, S., Visessanguan, W., Vilaichone, R. K. ve Tanasupawat, S., 2019. Characterization and antibacterial activity against *Helicobacter pylori* of lactic acid bacteria isolated from thai fermented rice noodle, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 92-102.
- Tripathi, M. K. ve Giri, S. K., 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage, *Journal of functional foods*, 9, 225-241.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E. ve Salminen, S., 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria, *The American journal of clinical nutrition*, 73, 2, 393-398.
- Vasiljevic, T. Ve Shah, N. P., 2008. Probiotics: From Metchnikoff to bioactives, *International Dairy Journal*, 18, 7, 714-728.
- Vera-Pingitore, E., Jimenez, M. E., Dallagnol, A., Belfiore, C., Fontana, C., Fontana, P., Wright A., V., Vignolo G. ve Plumed-Ferrer, C., 2016. Screening and characterization of potential probiotic and starter bacteria for plant fermentations, *LWT-Food Science and Technology*, 71, 288-294.
- Wang, M., Fu, R. J., Xu, D. Q., Chen, Y. Y., Yue, S. J., Zhang, S. ve Tang, Y. P., 2023. Traditional Chinese Medicine: A promising strategy to regulate the imbalance of bacterial flora, impaired intestinal barrier and immune function attributed to ulcerative colitis through intestinal microecology, *Journal of Ethnopharmacology*, 116879.
- Yi, E. J., Lee, J. E., Jo, S. Y., Kim, S. B., Yu, D. N., Kook, M. ve Kim, A. J., 2021. Anti-hemolytic and antimicrobial effects against multidrug-resistant bacteria of *Enterococcus faecalis* isolated from human breast milk, *Microbiology and Biotechnology Letters*, 49, 4, 519-527.
- Yugis, A. R., Saputra, A., Noviana, R., Iskandriati, D., Pamungkas, J. ve Suparto, I. H., 2015. Comparison of methods for the purification of goat lactoferrin and antiviral activity to human papillomavirus, *Am J Microbio Res*, 3, 5, 171-175.
- Zárate, G., Morata De Ambrosini, V. I., Chaia, A. P. ve González, N. S., 2002. Adhesion of dairy Propionibacteria to intestinal epithelial tissue *in vitro* and *in vivo*, *J. Food Protect.*, 65, 3, 534-539.
- Zhang, W., Lai, S., Zhou, Z., Yang, J., Liu, H., Zhong, Z., Fu H., Ren Z., Shen L., Cao S., Deng L. ve Peng, G., 2022. Screening and evaluation of lactic acid bacteria with probiotic potential from local Holstein raw milk, *Frontiers in Microbiology*, 13, 918774.
- Zheng, Z. Y., Cao, F. W., Wang, W. J., Yu, J., Chen, C., Chen, B., Liu J., X., Firman J., Renye J. ve Ren, D. X., 2020. Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* E680 and its effect on Hypercholesterolemic mice, *BMC microbiology*, 20, 1-9.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Mehmet CAMBAZ

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji,
2017-2021

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji
Anabilim Dalı, 2021-2024

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

1. Cambaz M., Onal Darilmaz, D., İnek Ağız Sütünden İzole Edilen Bakterilerin Bazı Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi. Ankara International Congress On Scientific Research-VIII June 9-11, 2023 / Ankara – TÜRKİYE. Syf 125 (Oral Presentation)