

***Bifidobacterium* CİNSİ BAKTERİLERİN BAZI PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Gülçin ALP

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2008
ANKARA**

Gülçin ALP tarafından hazırlanan *Bifidobacterium* CİNSİ BAKTERİLERİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Belma ASLIM
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU
.....
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Gülhane Askeri Tıp Akademisi

Prof. Dr. Belma ASLIM
.....
Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç Dr. Nihal YÜCEL
.....
Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih: 14 /07/ 2008

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nermin ERTAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

.....

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Gülçin ALP

***Bifidobacterium* CİNSİ BAKTERİLERİN BAZI PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Gülçin ALP

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Haziran 2008

ÖZET

Bu çalışmada, anne sütü ve anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkılarından mupirosin ilave edilerek değiştirilen BSM katı besiyeri kullanılarak 59 adet bifidobakteri izole edilmiştir. İzolatlar fruktoz-6-fosfat fosfoketolaz enzimi ile cins düzeyinde tanımlanmış ve 31 adet bifidobakteri belirlenmiştir. İdentifikasyon sonuçları *B. breve* (15 suş)' nin predominant olduğu göstermiştir. Tüm suşların asit direnci, safra toleransı, ekzopolisakkarit üretimi, antimikrobiyal aktiviteleri ve hemagglütinasyon kabiliyetleri gibi probiyotik kullanım açısından önemli olan bazı özellikleri araştırılmıştır. Suşların asit direnci, safra toleransı ve EPS üretimi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bifidobakterilerin EPS üretimi ile asit direnci ($p<0,05$) ve safra toleransı ($p<0,05$) arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Aynı zamanda, bifidobakterilerin önemli bir bağırsak patojeni olarak bilinen *E. coli* ATCC 11229 üzerinde zon çapı $0-9\pm1$ mm arasında değişen oranlarda inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Epitel yüzeye tutunma çalışmasından önce epitel yüzeye tutunmada önemli rol oynadığı düşünülen suşların hemagglütinasyon kabiliyetleri araştırılmıştır. Suşların 10 adedinde orta (+, ++) ve yüksek (+++) dereceli hemagglütinasyon kabiliyeti saptanmıştır. Epitel yüzeye tutunma çalışmasında ise asit direnci (pH 3,5- OD_{600} ; $0,98\pm0,01$), safra toleransı (% $0,40-OD_{600}$; $1,43\pm0,01$), EPS üretim kapasitesi ($97,64\pm0,01$ mg/L), *E. coli* ATCC 11229 üzerindeki inhibisyon etkisi (9 ± 1 mm), hemagglütinasyon kabiliyeti (+++)

yüksek olan *B. breve* A28 suşu ve tüm bu özellikler bakımından zayıf olan *B. bifidum* A10 suşu kullanılmıştır. *B. breve* A28 suşunun epitele tutunma indeksi $300 <$ bakteri/hücre olarak belirlenirken, *B. bifidum* A10 suşunun epitele tutunma indeksi 19 bakteri/hücre olarak bulunmuştur. Tüm tutunma sonuçları taramalı elektron mikroskobu ile de doğrulanmıştır. Prebiyotik uygulamasında, yüksek EPS üretimine sahip A28 suşunun inulinsiz ortamdaki canlılığı $7,1 \times 10^8$ cfu/ml iken, inulinli ortamda $7,4 \times 10^{11}$ cfu/ml olarak belirlenmiştir. *E. coli* ATCC 11229' nin canlılığında inulinli ortamda dikkate değer bir değişiklik gözlenmemiştir. A28 suşu taşıdığı bütün bu özelliklerinden dolayı sindirim sisteminde uzun süre canlı kalabilecektir. Bu nedenle, çalışmada probiyotik bakteri olarak *B. breve* A28 suşunun kullanımı önerilmektedir.

Bilim Kodu : 203.1.023
Anahtar Kelimeler : Bifidobakteri, Probiyotik, EPS üretimi, Hemagglütinasyon, Epitel yüzeye tutunma, Prebiyotik
Sayfa Adedi :102
Tez Yöneticisi :Prof. Dr. Belma ASLIM

**DETERMINATION OF SOME PROBIOTIC PROPERTIES OF
Bifidobacterium GENUS BACTERIA**

(M.Sc. Thesis)

Gulcin ALP

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

June 2008

ABSTRACT

In this study, fifty nine (59) strains of bifidobacteria isolated from breast milk and breastfed infants feces were isolated using BSM agar modified by the addition of mupirocin (200 u/L). The isolates were identified in the genus level by the detection of fructose-6-phosphate phosphoketolase enzyme activity. Thus thirty one (31) *Bifidobacterium* spp were determined. Identification results showed that *B. breve* was the predominant species (15 strains). In this study, some important properties in terms of probiotic use such as resistance to acid, tolerance to bile, exopolysaccharide production, antimicrobial activities, and hemagglutination abilities of all strains has been examined. Resistance to acid, tolerance to bile and EPS production of all strains were determined by spectrophotometrically. Positive correlations has been obtained between production of exopolysaccharide and tolerance to bile salts ($p<0.05$) or resistance to low pH ($p<0.05$). Also, it was also found that *Bifidobacterium* spp. had 0-9 mm zone radius inhibition effect on *E. coli*, which is known as an important intestinal pathogen. The hemagglutination abilities of the strains which are thought to have an important role on the adhesion to epithelial cells were investigated before adhesion studies to epithelial cells. The ten (10) strains showed moderate (+, ++) and high (+++) degree hemagglutination ability was detected. *B. breve* A28 strain which has the high acid resistance (pH 3.5), bile

tolerance (0.40 %), EPS production capacity (97.64 ± 0.01 mg/L), inhibition effect on *E. coli* ATCC 11229 (9 ± 1 mm), and hemagglutination ability (+++) and *B. bifidum* A10 strain has the lowest properties were used in adhesion to epithelial surface studies. Caco-2 cells were used adhesion to epithelial studies. Epithelial adhesion index of *B. breve* A28 strain was found as $300 <$ bacteria/cell, while epithelial adhesion index of *B. bifidum* A10 strain was found as 19 bacteria/cell. All these results confirmed by scanning electron microscopy observations. While the viability of A28 strain, which high EPS production, in the normal growth media was 7.1×10^8 CFU/ml, and its viability in media with inulin was found 7.4×10^{11} CFU/ml in prebiotic application. However, no significant change was observed in the viability of *E. coli* ATCC 11229 in inulin added media. Because of having all of these properties, A28 strain can survive in the gastrointestinal system for a long time. Hence, this study can suggested the use of *B. breve* A28 strain as a probiotic bacterium.

Science Code : 203.1.023

Key words : *Bifidobacterium*, Probiotic, EPS production, Hemagglutination, Adhesion to ephitelial surface, Prebiotic

Page Number : 102

Adviser : Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli katkılarıyla ve bilgileriyle beni yönlendiren sayın hocam Prof. Dr. Belma ASLİM' a, yine önemli tecrübelerinden faydalandığım hocam Prof. Dr. Yavuz BEYATLI' ya, elektron mikroskobu görüntülerinin elde edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr Zekiye SULUDERE' ye, hemaglütinasyon çalışmasında tıbbi bilgilerinden faydalandığım hematolog Doç. Dr. İdil YENİCESU' ya, deneysel çalışmalarım esnasında deneyimlerinden ve yardımlarından faydalandığım Araş. Gör. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ' a Araş. Gör. Derya ÖNAL' a, tüm Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan değerli aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 05/2007-48 kodlu projeyle desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. İnsan Mikrobiyal Ekosistemi	4
2.1.1. Mide- bağırsak sistemindeki mikroorganizmalar	4
2.1.2. Bağırsak sisteminde bifidobakteriler	6
2.2. <i>Bifidobacterium</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri.....	9
2.2.1. Morfolojisi	10
2.2.2. Fizyolojisi.....	12
2.2.3. Biyokimyasal özellikleri.....	13
2.2.4. Hücre duvarının bileşimi ve fosfolipit kompozisyonu.....	14
2.3. Probiyotikler	14
2.3.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	15
2.3.2. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkisi ve etki mekanizmaları	15
2.3.3. Probiyotik mikroorganizmaların karakteristikleri.....	17

Sayfa

2.4. Bifidobakterilerin Probiyotik Önemi	20
2.5. Bifidobakterilerin Epitel Yüzeye Tutunması	23
2.5.1. Hemaglutinasyon (HA) kabiliyeti	23
2.5.2. Epitel yüzeye tutunmanın önemi	24
2.5.3. Tutunma mekanizması	24
2.5.4. Tutunmada kullanılan doku kültürleri	25
2.6. Prebiyotikler	26
2.6.1. Prebiyotik uygulamaları	27
3. MATERYAL VE METOT	28
3.1. Materyal	28
3.1.1. Materyal örnekleri	28
3.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri	28
3.1.3. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları	31
3.1.4. Araştırmada kullanılan test bakterileri	31
3.2. Metot	32
3.2.1. Bakterilerin izolasyonu	32
3.2.2. Bakterilerin muhafaza edilmesi	32
3.2.3. Dışkı ve anne sütü örneklerinden izole edilen bifidobakterilerin tanımlanması	32
3.2.4. Bifidobakterilerin asit dirençliliğinin belirlenmesi	36
3.2.5. Bifidobakterilerin safra toleransının belirlenmesi	37
3.2.6. Bifidobakterilerin ekzopolisakkarit (EPS) üretiminin belirlenmesi	37
3.2.7. Bifidobakterilerin <i>Escherichia coli</i> üzerindeki inhibisyon etkisi	38

Sayfa

3.2.8. Bifidobakterilerin tutunma testleri.....	38
3.2.9. Prebiyotik uygulamaları	42
3.2.10. İstatistiksel analizler	43
4. DENEYSEL BULGULAR.....	44
4.1. Bifidobakterilerin İzolasyonu ve Tanımlanmaları	44
4.1.1. Klasik identifikasyon sonuçlarının numerik tasonomi programında değerlendirilmesi.....	46
4.2. Bifidobakterilerin Asit Dirençliliği Sonuçları.....	51
4.3. Bifidobakterilerin Safra Toleransı Sonuçları	51
4.4. Bifidobakterilerin Ekzopolisakkarit Üretim Kapasiteleri	52
4.5. Bifidobakterilerin <i>E. coli</i> ATCC 11229 Üzerindeki İnhibisyon Etkisi Sonuçları	55
4.6. Bifidobakterilerin Tutunma Testlerinin Sonuçları	57
4.6.1. Hemaglutinasyon (HA) sonuçları.....	57
4.6.2. Bifidobakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunması	59
4.6.3. <i>B. breve</i> A28, <i>B. bifidum</i> A10 ve <i>E. coli</i> ATCC 11229 suşlarının Caco-2 hücrelerine tutunmada rekabeti	60
4.6.4. Bifidobakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunmasında mide suyu ile birlikte bağırsak sıvısının etkisi.....	61
4.7. Prebiyotik Uygulamalarının Sonuçları.....	66
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	68
KAYNAKLAR.....	88

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>Bifidobacterium</i> cinsine ait türler ve izolasyon bölgeleri.....	11
Çizelge 2.2. Bazı bifidobakteri türlerinin hücre duvarı kompozisyonu.....	14
Çizelge 2.3. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	17
Çizelge 3.1. <i>Bifidobacterium</i> Selective Medium (BSM) sıvı besiyeri.....	29
Çizelge 3.2. Man Rogosa and Sharpe (MRS) sıvı besiyeri.....	29
Çizelge 3.2. Nutrient Sıvı Besiyeri	30
Çizelge 3.3. Phosphate Buffered Saline (PBS) tamponu	30
Çizelge 3.4. Mide suyu içeriği.....	31
Çizelge 4.1. Bifidobakterilerin fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçları	47
Çizelge 4.2. Bifidobakterilerin asit dirençliliği sonuçları	53
Çizelge 4.3. Bifidobakterilerin safra toleransı sonuçları	54
Çizelge 4.4. Bifidobakterilerin ekzopolisakkarit (EPS) üretim kapasiteleri.	55
Çizelge 4.5. Bifidobakterilerin <i>E. coli</i> ATCC 11229 üzerindeki inhibisyon etkisi	56
Çizelge 4.6. Bifidobakterilerin hemagglütinasyon testi sonuçları	59
Çizelge 4.7. <i>B. breve</i> A28, <i>B. bifidum</i> A10 ve <i>E. coli</i> ATCC 11229 suşlarının Caco-2 hücrelerine tutunma indeksi ve rekabeti	60
Çizelge 4.8. Mide suyunda inkübe edilen <i>B. breve</i> A28, <i>B. bifidum</i> A10 ve <i>E. coli</i> ATCC 11229 suşlarının canlı hücre sayımı.....	62
Çizelge 4.9. Mide suyu ve ardından bapırsak sıvısında inkübe edilen <i>B. breve</i> A28, <i>B. bifidum</i> A10 ve <i>E. coli</i> ATCC 11229 suşlarının Caco-2 canlı hücre sayımı	63
Çizelge 4.10. Mide suyu ile muamele edildikten sonra <i>B. breve</i> A28, <i>B. bifidum</i> A10 ve <i>E. coli</i> ATCC 11229 suşlarının Caco-2 hücrelerine tutunma indeksi	63

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.11. Mide suyu ve bağırsak sıvısı ile muamele edildikten sonra Caco-2 hücreleri ile inkübe edilen <i>B. breve</i> A28, <i>B. bifidum</i> A10 ve <i>E. coli</i> ATCC 11229 suşlarının tutunma indeksi	64
Çizelge 4.12. İnulinin bakteriler üzerindeki etkisi.....	66
Çizelge 4.13. <i>E. coli</i> ATCC 11229' un inulinli ortamda <i>B. breve</i> A28 ve <i>B. bifidum</i> A10 suşları ile birlikte gelişimi	67

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Mide-bağırsak sisteminde yaygın olarak bulunan mikroorganizmalar ...	5
Şekil 2.2. Bir bebeğin doğumundan itibaren ilk 7 günde bağırsak florasındaki değişimler	7
Şekil 2.3. Bağırsak florasını etkileyen faktörler	8
Şekil 2.4. Doğumdan yaşlanma dönemine kadar bağırsak mikroflorasındaki değişimler	9
Şekil 2.5. Hücre içine alınan oksijenin enzimler aracılığıyla kullanımı	12
Şekil 2.6. Bifidobakterilerin hekzos metabolizması	13
Şekil 2.7. Probiyotik mikroorganizmaların seçim kriterleri.....	18
Şekil 3.1. Hemaglütinasyon sonuçlarının değerlendirilmesi.....	39
Şekil 4.1. Bifidobakterilerin klasik metotlarla identifikasyonunun dendrogramı ...	49
Şekil 4.2. Anne sütü ile beslenen yenidoğan bebeklerin dışkılarından (a) ve anne sütünden (b) izole edilen bifidobakterilerin teşhis edilen türlerinin % dağılımı değişimler	50

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Bifidobakterilerin elektron mikroskobu görüntüleri	10
Resim 2.2. Bifidobakterilerin ışık mikroskobu görüntüleri	12
Resim 4.1. Bifidobakterilerin koloni yapısı, ışık ve elektron mikroskobu görüntüsü.....	45
Resim 4.2. Fruktoz-6-Fosfat fosfoketolaz (F-6-PPK) enzimi aktivitesi	45
Resim 4.3. Bazı bifidobakterilerin <i>E. coli</i> üzerindeki inhibisyon zonları.....	57
Resim 4.4. Bifidobakterilerin hemagglütinasyon sonuçları	58
Resim 4.5. EPS üretimi yüksek olan <i>B. breve</i> A28 suşunun Caco-2 hücrelerine tutunmasının taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	65
Resim 4.6. EPS üretimi yüksek olan <i>B. bifidum</i> A10 suşunun Caco-2 hücrelerine tutunmasının taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat derece
nm	Nanometre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
g	Gram
M	Molar
pH	Asitlik Bazlık Birimi
spp	Species (Türleri)
Kısaltmalar	Açıklama
ATCC	American Type Culture Collection
Bkz.	Bakınız
BSM	<i>Bifidobacterium</i> selective medium
Cfu	Colony forming unit
dk	Dakika
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EPS	Ekzopolisakkarit
HA	Hemaglütinasyon
LAB	Laktik Asit Bakterileri
MRS	Man-Rogosa Sharpe
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
rpm	Devir Sayısı

1. GİRİŞ

Mikroorganizmaların hayatta kalması için uygun şartlara sahip olan her bölgede, farklı grup ve türlere ait çok sayıda bakterinin yer aldığı bir mikroflora vardır [1]. Bu mikroorganizmalar temelde faydalı ve zararlı olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Sağlıklı bir konakçıda bu iki grup, dinamik bir denge halinde olup faydalı mikroorganizmalar baskın mikroflorayı oluşturmaktadır. Bu faydalı mikroorganizmalar genelde “probiyotik mikroorganizmalar” olarak adlandırılmaktadır [2].

Probiyotik mikroorganizmalar ürettikleri maddeler yardımıyla gıdaların sindirimine, vitamin üretimine ve zararlı mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların önlenmesine yardımcı olarak doğal floranın dengesini korumaktadır [3]. En çok kullanılan probiyotik mikroorganizmalar bağırsaklarda canlılığını sürdürebilen laktobasiller ve bifidobakteriilerdir. Bu gruba ait laktobasillerin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri konusunda kapsamlı çalışmaların yapıldığı bildirilmiştir [4]. Ancak, bifidobakteriilerde yapılan çalışmaların laktobasiller kadar olmadığı dikkat çekmektedir.

Bifidobakteriiler doğumdan sonraki ilk günlerde bağırsak yüzeyine kolonize olmakla birlikte, insan ve hayvanların bağırsak florasında yer almaktadır [5]. Bu bakteriler anne sütüyle beslenen bebeklerin bağırsak florasında predominant olarak bulunmaktadır [6]. Bifidobakteriilerin, normal bağırsak florasının uygun dengede olması için yararlı ve önemli bir rol oynadıkları düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, bağırsak bölgesinde bifidobakteriilerin yüksek sayıya ulaşmasıyla dış kaynaklı patojenlerin üremesine engel olduğu bildirilmiştir [7, 8]. Ayrıca, asetik asit ve laktik asit gibi asitlerin üretimleri ile bağırsak pH’ sını da kontrol altında tutarak patojenlerin kolonizasyonunu engellenmektedir [6, 9]. Bu nedenle, bifidobakterilerin probiyotik olarak bu alanda kullanımı konusunda yapılan araştırmalara ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan çalışmalarda prebiyotiklerin probiyotikler üzerine etkisi vurgulanmaktadır. Prebiyotikler, bağırsak florasında bulunan bir tür veya sınırlı sayıdaki birkaç tür mikroorganizmanın

çoğalmasını ve/veya aktivitesini seçici olarak aktive ederek, konağın sağlığını olumlu yönde etkileyebilen sindirilemeyen besin bileşenleri olarak tanımlanmaktadır [10]. Prebiyotiklerin bifidobakterilerin gelişimini teşvik etmesi, bu bakterilerin prebiyotiklerle birlikte kullanılarak daha iyi sonuçların alınması sağlanmaktadır.

Araştırmamızın amacı;

1. Anne sütü ve anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkı örneklerinden bifidobakterilerin izole edilmesi,
2. Mikroorganizmaların probiyotik olarak kullanılabilmesi için bazı özellikler taşımaları gerekmektedir. Bu özelliklerden en önemlileri arasında midenin asidik ortamına ve safraya olan dirençlilikleri de yer almaktadır. Bu çalışmada, izole edilen bifidobakterilerin midenin asidik ortamına dirençliliği ve safraya toleranslarının belirlenmesi,
3. İzole edilen bifidobakteriler tarafından, bakterinin yüzey tutunmasında önemli bir etkiye sahip olan ve bakterinin bulunduğu ortama tutunarak biyofilm oluşturmada etkili olan ekzopolisakkarit (EPS) üretimlerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu durum, EPS üreten bakteriye bulunduğu ortamda stabil olarak kalabilme ve dominant olarak kolonize olma özelliği sağlamaktır. Bu nedenle izolatların EPS üretimlerinin belirlenerek, EPS üretim kapasitelerinin safra toleransı ve asit dirençliliği ile ilişkilendirilmesi,
4. Ayrıca, mide asidine dirençli ve safraya tolerans gösterebilen suşların bağırsak mukozasına tutunabilme özelliği ve tutunmada etkili olabileceği düşünülen hemaglutinasyon yeteneklerinin belirlenmesi,
5. Probiyotik olarak kullanılan bakterilerin bağırsaklarda faaliyetlerini en iyi şekilde yerine getirebilmesi için belirli bir yoğunlukta olmaları gerekmektedir. Bu nedenle çalışmamızda kullanılan bakteriler, prebiyotik olarak kullanılan inulin ile desteklenerek, bakterilerin yoğunluklarının uygun seviyede olması,

Böylece üstün nitelikli olarak seçilen suşlar, prebiyotiklerle desteklenerek, probiyotik amaçlı kullanım esnasında daha iyi bir verim elde edilmesi amaçlanmaktadır.

Yukarıda yapılması planlanan çalışmalar sonucunda, probiyotik uygulamalarda önemli olarak görülen insan kaynaklı bifidobakteriler, probiyotik özellikler bakımından taranarak, bu özellikler açısından üstün özelliklere sahip bakteriler seçilmiş olacaktır. Türkiye’ de bu düzeyde yapılmış ilk çalışma olması nedeni ile bulunan sonuçların bundan sonra bu alanda çalışacaklara kaynak oluşturması düşünülmektedir. Ayrıca, daha sonraki çalışmalarda seçilen bu suşların vitamin üretimi ve kolesterol giderimi gibi tıbbi olarak insanlar için yarar sağlayacak özellikleri de araştırılarak, gerek gıda sektöründe gerekse tıbbi alandaki probiyotik uygulamalarda kullanılabileceklerdir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

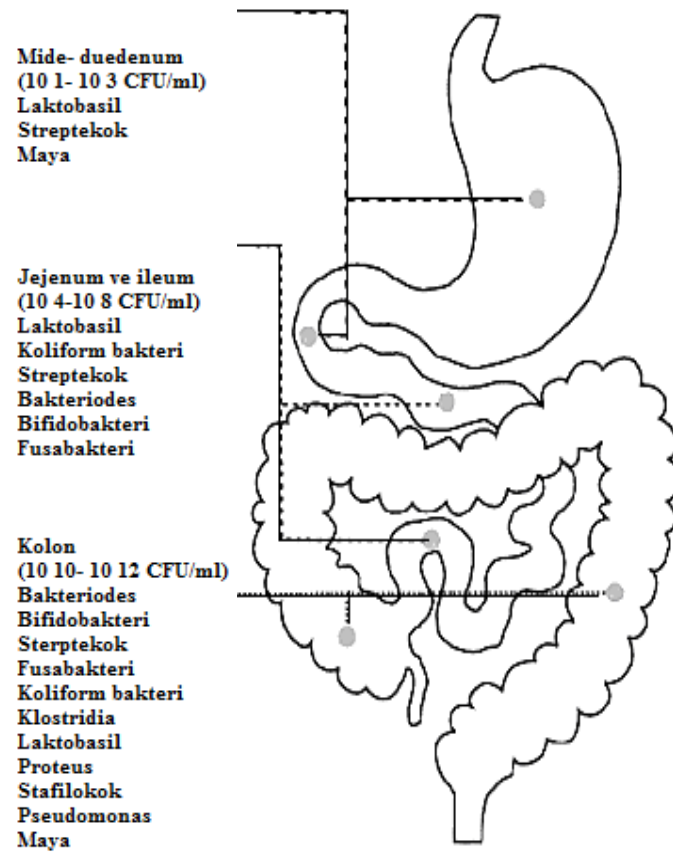
2.1. İnsan Mikrobiyal Ekosistemi

Bağırsak sisteminde, deride, ürogenital sistemde, ağız ve burun boşluklarında, kısacası insan vücudunun dış ortamın etkisi altındaki ve bakterilerin hayatta kalması için uygun şartlara sahip olan her bölgede farklı grup ve türlere ait çok sayıda mikroorganizmadan meydana gelen bir mikroflora vardır. Bu mikroflora üyelerinin sayısının 10^{13} - 10^{14} CFU/ml gibi rakamlara ulaştığı tahmin edilmektedir ki, bu rakam toplam insan vücut hücrelerinin sayısından fazladır. Sağlıklı bir insanın sindirim kanalı çok fazla sayıda ve çeşitteki mikroorganizmadan meydana gelen kompleks bir ekosisteme sahiptir [11, 12].

2.1.1. Mide- bağırsak sistemindeki mikroorganizmalar

Doğum öncesindeki dönemde steril olan mide-bağırsak sisteminin lümeni, doğumdan sonra kısa bir süre içerisinde (3-10 saat) mikroorganizmalarla tanışır ve annenin fekal florasından gelen bakteriler kolonize olarak, 1-2 gün içerisinde 10^9 - 10^{10} CFU/ml bakteri sayısına ulaşır. İlk günlerde, *E. coli*, *Streptococcus* spp. gibi fakültatif anaeroplara baskın iken, zamanla anaerobik flora gelişir ve *Bifidobacterium*, *Bacteroides* gibi zorunlu anaerob bakteriler floraya hakim olur. Anne sütü ile beslenme kesilince, artık erişkin florasından söz edilir. Erişkin mide-bağırsak sisteminde, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus* ve *Fusobacterium* türleri baskın olmak üzere 500' ün üzerinde bakteri türü yer alır. İnsan ve hayvanların bağırsak florasındaki önemli cinsler, toplam anaerob bakteri sayısının sırasıyla % 30 ve % 20' sini oluşturan, *Bacteroides* ve *Bifidobacteria*' dır [1]. Mide-bağırsak sisteminin içeriğinde yer alan trilyonlarca mikroorganizma yaklaşık 1,5 kg gibi bir kitle değerindedir. Bir başka ifade ile kolonda 1 g dışıda 1×10^{12} CFU (coloni forming unit) bakteri bulunmaktadır. Söz konusu flora üyeleri, bağırsak savunma mekanizmasında önemli rol oynarlar [13, 14].

Bağırsak florasındaki bakteriler bağırsak mukozası ile stabil bir ekosistem oluşturmaktadır. Bu denge, dışarıdan gelen mikroorganizmaların eliminasyonunu sağlayan kolonizasyon direncini sağlar [1]. İnsanların bağırsak yerleşik florasının en önemli üyeleri *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsine ait türlerdir [2]. Mide-bağırsak sisteminde yaygın olarak bulunan mikroorganizmalar Şekil 2.1’ de verilmiştir [3].



Şekil 2.1. Mide-bağırsak sisteminde yaygın olarak bulunan mikroorganizmalar [3].

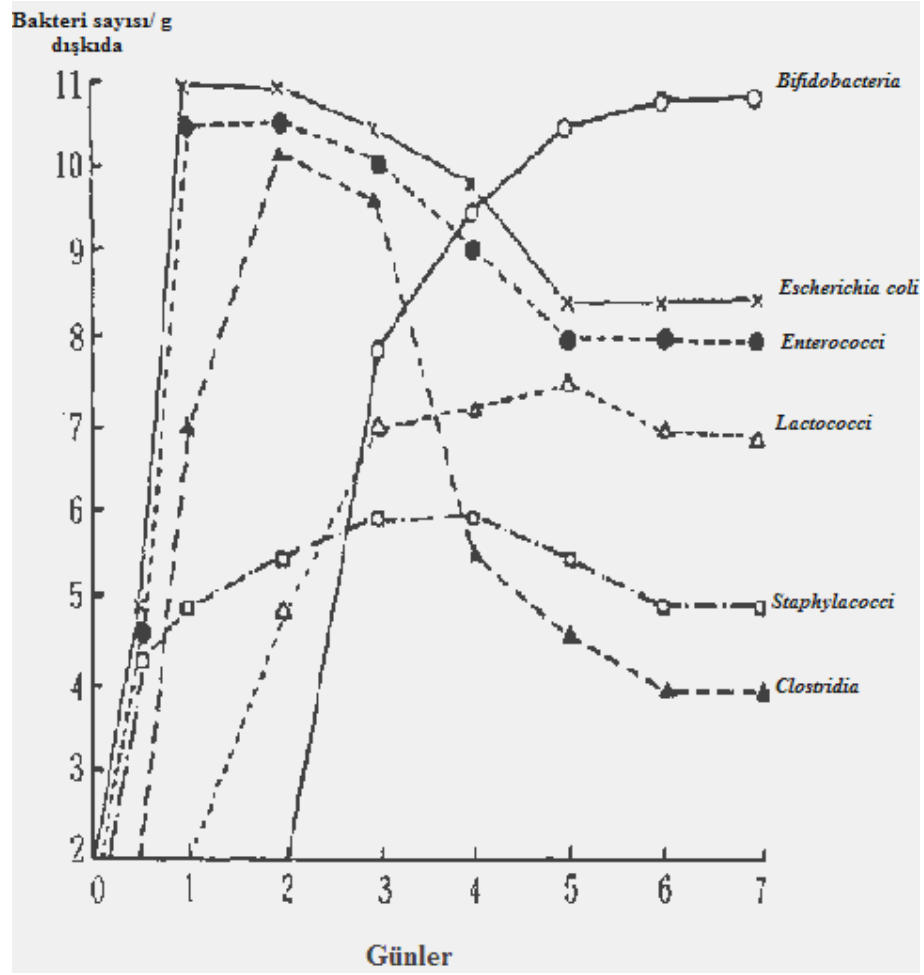
Mide-bağırsak sistemi vücudun içi ile dışı arasında köprüdür. Son zamanlardaki araştırmalar bağırsak mikroflorası ile konak arasında karşılıklı bir etkileşim olduğunu göstermiştir. Özellikle bağırsak bariyerini sağlamlaştırmada ve epitelyal değişimde bakterilerin önemli rolü olduğu anlaşılmıştır. Bağırsak mikroflorasının konakçı için faydaları, K vitamini sentezi, absorbe edilmeyen yiyeceklerden kısa zincirli yağ asidi üreterek enerji sağlaması, patojenlerin üremesine engel olması,

bağırsaklardaki bariyer bütünlüğüne destek olması ve mukozal immün dengeyi sağlaması olarak sıralanabilir [15].

2.1.2. Bağırsak sisteminde bifidobakteriler

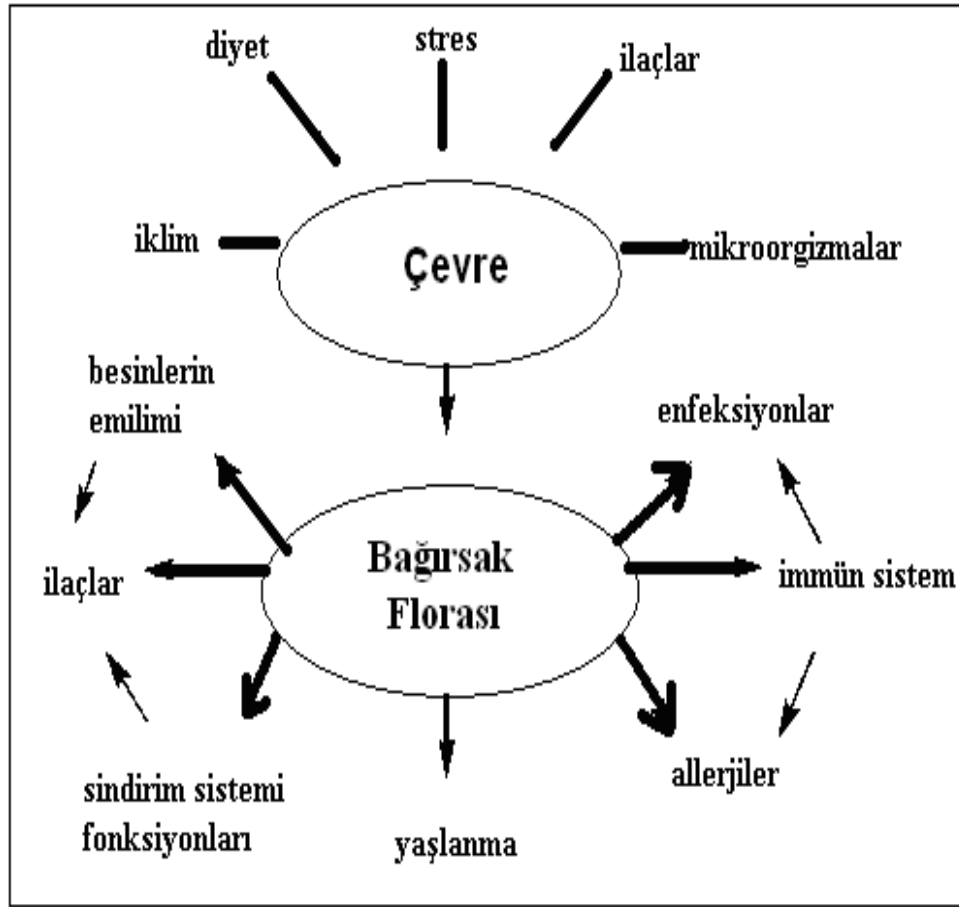
İnsanlarda bifidobakteriler doğumdan sonra 3.- 4. gün içinde görünmeye başlamakta ve 5. günde bağırsak mikroflorasında baskın bir duruma geçmektedir. Bifidobakteriler, özellikle kalın bağırsakta fazla bulunmaktadır. Bebek ve yetişkinlerin bağırsak mikroflorasında bifidobakterilerin baskın duruma geçmesi onların sağlıklı olduğunu göstermektedir [16, 17].

Bağırsakların sağlıklı olarak fonksiyon gösterebilmesi için bağırsak ekosisteminin dengesinin korunması gerekmektedir [18]. Sağlıklı bağırsak mikroflorası oldukça stabildir. Fakat insan fizyolojisi, gıda, antibiyotik veya ilaç, hastalık, stres, yaşlanma, iklim koşullarında meydana gelen değişimler ve çevresel toksik maddeler gibi faktörlerle birlikte bu stabilite değişmektedir [19]. Bağırsak sisteminin dengesinde meydana gelen bu dengesizlikler “disbiosis” olarak adlandırılmaktadır. Disbiosisin tersi bir durum olarak, bağırsak sisteminde bulunan faydalı mikroorganizmaların sistemin fizyolojik dengesine olumlu yönde katkıda bulunmasına “probiyotik”, bu mikroorganizmalara da “probiyotik mikroorganizmalar” denilmektedir [20].



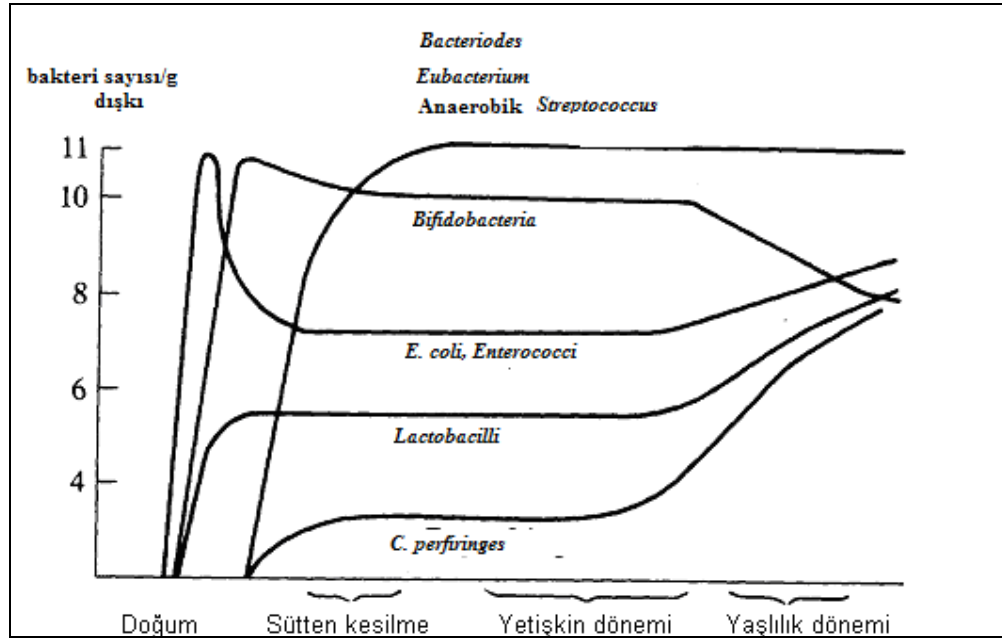
Şekil 2.2. Bir bebeğin doğumundan itibaren ilk 7 günde bağırsak florasındaki değişimler [19].

Bu durumlarda etkilenen bakteri grupları *Bifidobacteria*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Clostridium* ve *Lactobacillus*' dur. Hastalıklı ve yaşlı insanların bağırsak sisteminde bifidobakterilerin sayısı oldukça azdır [21, 22].



Şekil 2.3. Bağırsak florasını etkileyen faktörler [21].

İnsan ve hayvanların bağırsak bölgelerinde bulunan bifidobakteriler, birçok bakteri ile bir arada bulunmaktadır. Bu mikrobiyota, bölgede çeşitli alanlarda farklılık göstermektedir. Bifidobakteriler farklı habitatlarda, insanda bulunduğu bölgeye adapte olmuştur. Örneğin, bebek dışkısı, yetişkin dışkısı, vajina ve diş çürükleri gibi farklı bölgelerde farklı türleri görülmektedir. *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. longum* ve *B. pseudocatenulatum* yetişkinlerde ve yeni doğanlarda bulunurken, *B. breve* ve *B. infantis* anne sütü ya da ek gıdayla beslenen bebeklerde tipiktir. *B. adolescentis* yalnız yetişkinlerden izole edilmiştir. Vajinada *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve* ve *B. longum* bulunmaktadır. *B. denticolens*, *B. dentium* and *B. inopinatum* ise sıklıkla diş çürüklerinde bulunur [19].



Şekil 2.4. Doğumdan yaşlanma dönemine kadar bağırsak mikroflorasındaki değişimler [19].

2.2. *Bifidobacterium* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Bifidobakteriler insanların ve hayvanların mide-bağırsak sistemlerinin büyük bir kısmını kapsamaktadır [4]. İlk kez 1899 yılında Pastör Enstitüsü'nde Freshman Tissier tarafından anne sütüyle beslenen sağlıklı bebeklerin dışkısından izole edilmiş ve *Bacillus bifidus comminus* olarak adlandırılmıştır [5, 6]. 1920 yılında Castellani ve Chalmers tarafından yapılan araştırmalarda bu bakteri *Bacterium bifidus* olarak adlandırılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda ismi *Lactobacillus bifidus* olarak belirlenmiştir [7]. 1967'de De Vries ve Stouthamer, fruktoz-6-fosfat fosfoketolaz enzimi bifidobakterilerde belirlenirken, aldolaz ve glikoz-6-fosfat dehidrojenaz enzimlerinin bifidobakterilerde bulunmadığını, ancak bu enzimleri laktobasillerin içerdiğini bildirmişlerdir [8]. 1974'de "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology"nin 8. baskısında 11 tür içeren *Bifidobacterium* cins olarak gösterilmiştir. Bugün ise *Actinomycetaceae* familyasına ait olan bu cins ekolojik orijinlerine göre gruplanmış 29 tür içermektedir [9]. Türler ve izole edildikleri bölgeler Çizelge 2.1'de verilmiştir [23].

Bifidobacterium cinsinin tanımlanmasında kullanılan özellikler;

- Morfolojisi
- Fizyolojisi
- Biyokimyasal özellikleri
- Hücre duvarının bileşimi ve fosfolipid kompozisyonu [24].

2.2.1. Morfolojisi

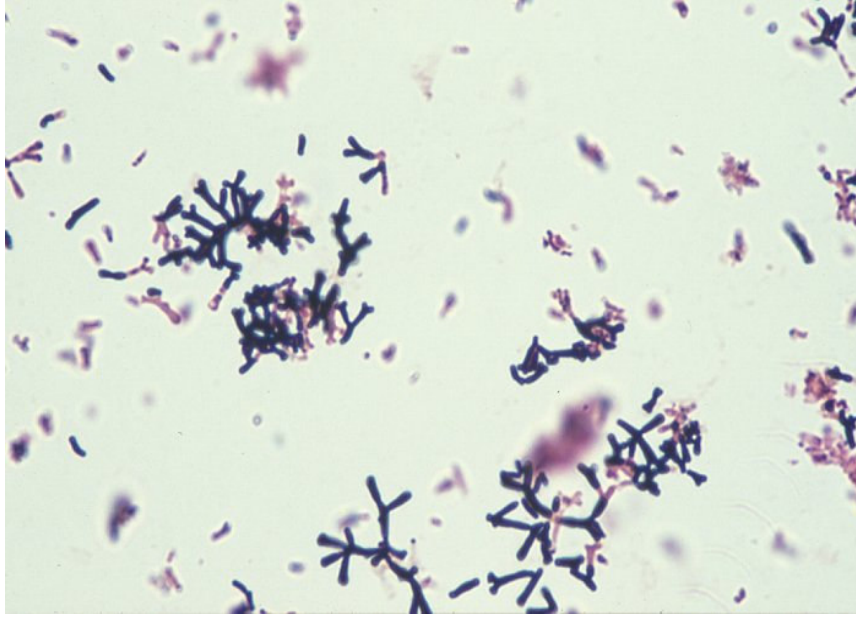
Bifidobakteriler karakteristik bir morfolojiye sahiptirler. Gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, genellikle eğri çubuklar şeklinde ve sıklıkla dallanmış olarak bulunan anaerobik mikroorganizmalardır. Taze izole edilen suşlar mikroskopta düzensiz dallanan, Y ve V şeklinde çubuklar halinde görünürler. Bununla birlikte, normal habitatlarında sıklıkla çubuklar halinde olmalarına karşın, besiyeri şartları pleomorfizm göstermelerine sebep olmaktadır [23, 24]. Plak yüzeyinde ise mukoid kremi veya menekşe rengine görünümüne sahiptirler [23].



Resim 2.1. Bifidobakterilerin elektron mikroskobu görüntüleri [25].

Çizelge 2.1. *Bifidobacterium* cinsine ait türler ve izolasyon bölgeleri [23].

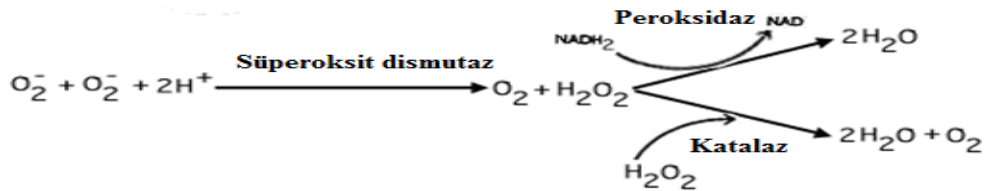
Türler	İzolasyon bölgeleri
<i>B. adolescentis</i>	Yetişkin insan dışkısı
<i>B. angulatum</i>	Yetişkin insan dışkısı, pis su
<i>B. catenulatum</i>	Yetişkin insan ve bebek dışkısı
<i>B. gallicum</i>	Yetişkin insan dışkısı
<i>B. longum</i>	Yetişkin insan ve bebek dışkısı, vajina
<i>B. bifidum</i>	Yetişkin insan ve bebek dışkısı, dana dışkısı
<i>B. breve</i>	Yetişkin insan dışkısı, vajina, dana dışkısı
<i>B. infantis</i>	Yetişkin insan dışkısı
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Yetişkin insan ve bebek dışkısı, dana dışkısı
<i>B. dentium</i>	İnsan dışkısı, vajina, çeşitli apse ve yaralar
<i>B. merycicum</i>	Sığır rumeni
<i>B. ruminantium</i>	Sığır rumeni
<i>B. globosum</i>	Sığır rumeni, hayvan ve erkek dışkısı
<i>B. boum</i>	Sığır rumeni, domuz dışkısı
<i>B. thermophilum</i>	Sığır rumeni, domuz ve dana dışkısı
<i>B. pseudolongum</i>	Sığır rumeni, domuz dışkısı
<i>B. animalis</i>	Tavuk, rat ve tavşan dışkısı
<i>B. gallinarum</i>	Tavuk dışkısı
<i>B. pullorum</i>	Tavuk dışkısı
<i>B. asteroides</i>	Arı bağırsağı
<i>B. indicum</i>	Arı bağırsağı
<i>B. coryneforme</i>	Arı bağırsağı
<i>B. choerinum</i>	Domuz dışkısı
<i>B. suis</i>	Domuz dışkısı
<i>B. cuniculi</i>	Tavşan dışkısı
<i>B. magnum</i>	Tavşan dışkısı
<i>B. saeculare</i>	Tavşan dışkısı
<i>B. minimum</i>	Pis su
<i>B. subtile</i>	Pis su



Resim 2.2. Bifidobakterilerin ışık mikroskobu görüntüleri [26].

2.2.2. Fizyolojisi

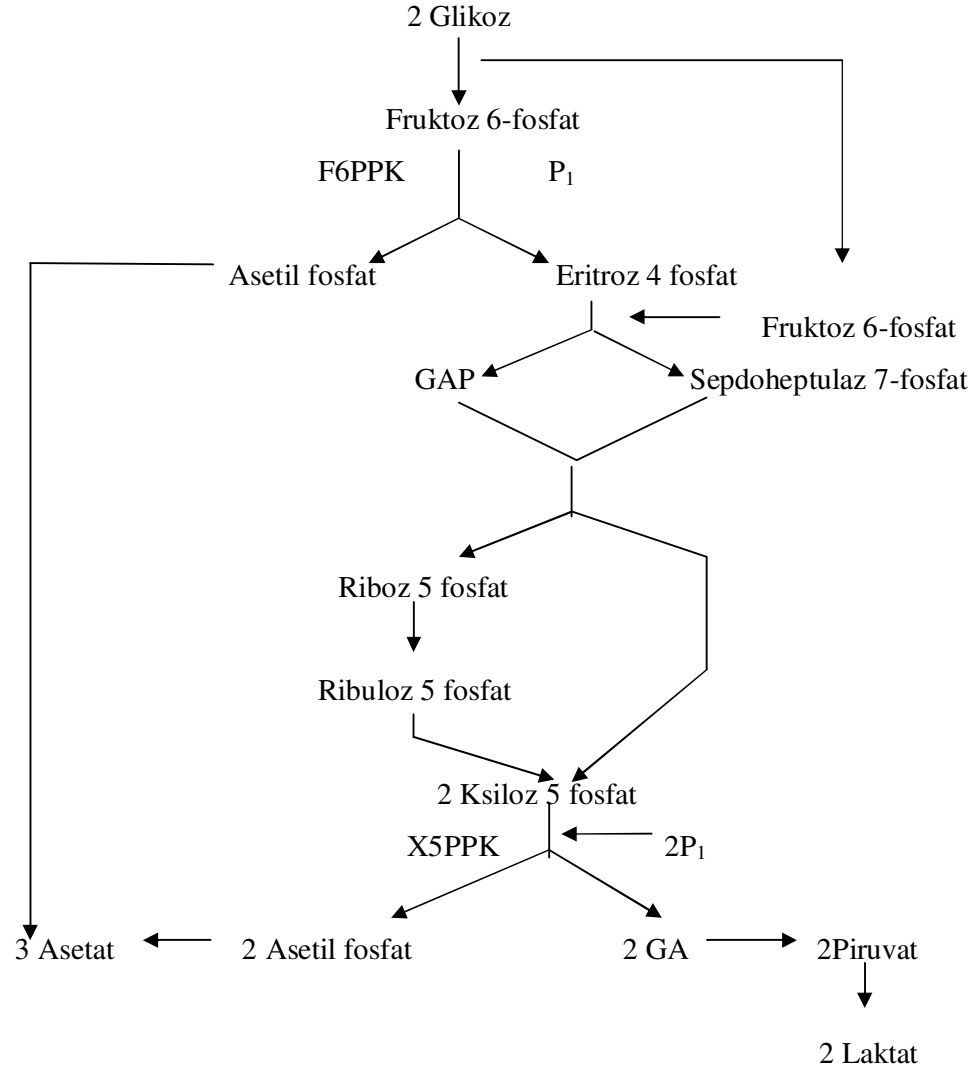
Bifidobakteriler anaerobik mikroorganizmalardır, genellikle % 10 CO₂' li ortamda gelişirler. Fakat bazı türleri oksijeni tolere edebilmektedir. Süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimler, süperoksit ve hidrojen peroksidin toksik etkilerine karşı organizmaların korunmasına yardımcı olur. Bu enzimler *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum* ve *B. adolescentis*' de çok düşük olup süperoksit dismutaz aktivitesi suşlar arasında değişmektedir. NADH oksidaz ve NADH peroksidaz oksijen kullanımında gereken önemli enzimlerdir [19, 23]. Çoğunlukla bifidobakterilerin insanlarda optimal gelişim sıcaklığı 36–38 °C iken hayvanlarda oldukça yüksek olup 41–43 °C arasındadır [23]. Gelişim için optimum pH aralığı 6,5–7 arasında olup, pH 5' ten az ve 8' den yüksek pH' da gelişim görülmemektedir [19].



Şekil 2.5. Hücre içine alınan oksijenin enzimler aracılığıyla kullanımı [27].

2.2.3. Biyokimyasal özellikleri

Bifidobakteriler metabolik aktivitelerinde kullandıkları karbonhidratlardan dolayı laktobasillerden farklılık göstermektedirler. Bifidobakteriler heksoz metabolizmasında fruktoz-6-fosfat yolunu kullanırken, laktobasiller glikoz-6-fosfat yolunu kullanmaktadırlar (Bkz. Şekil 2.6). Bu yolun sonunda oluşan önemli ürünleri; asetik asit ve L (+) laktik asittir (3:2). Yüksek asit oluşturmazlar, glikozdan CO₂ meydana getirmezler, katalaz, nitrat redüksiyonu, indol oluşumu ve jelatin hidrolizi negatiftir [24].



Şekil 2.6. Bifidobakterilerde heksoz metabolizması [28].

2.2.4. Hücre duvarının bileşimi ve fosfolipid kompozisyonu

Bifidobakteri türlerinin belirlenmesinde, peptid bağlarıyla meydana gelen amino asit zincirlerinden oluşan murein hücre duvarı kullanılmaktadır. Bifidobakterilerin hücre duvarı mureinik asit, alanin, glikozamin, glutamik asit ve ornitin veya lisin ile birlikte treonin, aspartik asit, serin, glisin aminoasitlerinden biri veya ikisinden oluşan peptidoglikandan meydana gelir. Hücre duvarındaki polisakkaritlerin bileşiminde glikoz, galaktoz ve ramnoz bulunmaktadır. Türler arasında peptidoglikanların aminoasit dizilimi farklılık göstermektedir [24, 29].

Çizelge 2.2. Bazı bifidobakteri türlerinin hücre duvarı kompozisyonu [29].

Türler	İzolasyon kaynağı	Peptidoglikan tipi	Polisakkarit bileşimi		
			Glikoz	Galaktoz	Ramnoz
<i>B. bifidum</i>	Yetişkin dışkı	Orn.-Ser.-Asp.-Ala.	+	+	+
<i>B. infantis</i>	Çocuk dışkı	Lis.-Gli.	+	+	+
<i>B. breve</i>	Çocuk dışkı	Lis.-Gli.	+	+	+
<i>B. longum</i>	Yetişkin dışkı	Orn.-Ser.-Ala.-Thr.	+	+	+

Bifidobakterilerde palmitik asit, palmitoleik asit, stearik asit, oleik asit ve miristik asit gibi yağ asitleri bulunmaktadır. Ayrıca, difosfatidilgliserol ve fosfatidilgliserol içeren laktobasil ve bifidobakteri türleri olmasına rağmen yalnızca bifidobakteriler poligliserolfosfolipitleri ve onların lizo-türevlerini üretirler [29].

2.3. Probiyotikler

Probiyotik kelimesi Yunanca kökenli olup “yaşam için” anlamına gelen ve uzun yıllardan beri çeşitli şekillerde kullanılan bir kelimedir [30]. ‘Probiyotik’ terimi ilk olarak 1954 yılında Ferdinand Vergin tarafından antibiyotik ve flora üzerinde etkili diğer antimikrobiyal maddelerin patojen olmayan bakterilerin yararlı (‘Probiotika’) etkileriyle ilişkisinin anlatıldığı ‘Anti-und Probiotika’ isimli makalede kullanılmıştır [31]. 1965 yılında, Lilly ve Stillwell adlı araştırmacılar tarafından, diğer mikroorganizmaların gelişimini destekleyen maddeleri tanımlamak için

kullanılmıştır [32]. Yine ilk olarak hayvan büyümesini destekleyici yem katkısı olarak 1970’li yıllarda kullanılmış ve ‘hayvanların bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek onlara yararlı olan canlı mikrobiyal yem katkıları’ olarak tanımlanmışlardır [33]. Probiyotiklerin en çok kabul gören tanımları Roy Fuller tarafından 1989 yılında ‘tüketici sağlığına, bireylerin bağırsak mikrobiyal dengesini koruyarak veya geliştirerek yararlı olan canlı mikrobiyal gıda katkılarıdır’ şeklinde yapılmıştır [34]. Bu tanım 1998 yılında Salminen ve ark. tarafından ‘insan ve hayvanların sağlığını geliştirmek için tasarlanan gıda, yem ya da besinsel katkılardaki canlı mikrobiyal preparatlar’ olarak değiştirilmiştir [35].

2.3.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Genel olarak probiyotik kapsamına giren mikroorganizmalar, bakteriler ve maya hücreleri olarak iki gruba ayrılır. Bu mikroorganizmalar Çizelge 2.3’ de gösterilmiştir [36]. Farklı cinslere ait birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılmaktadır [37]. Probiyotik olarak en sıklıkla kullanılanlar; laktik asit bakterileri (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*) ve *Saccharomyces boulardii*’ dir. [38-40]

2.3.2. Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığı üzerine etkisi ve etki mekanizmaları

Probiyotiklerin bağırsak fizyolojisi üzerine dolaylı veya doğrudan etkide bulunarak immün sistemi uyardığı, bu çerçevede konakçının ağız ve sindirim sistemi dâhil, üst solunum yolu ve ürogenital sistem mukozal yüzeyini etkileyerek iyi hal ve sağlığı geliştirici, hastalık riskini azaltıcı potansiyel etkiye sahip olduğu bilinmektedir [36].

Probiyotiklerin etki mekanizmasına yönelik çalışmalar, bağırsak florasının düzensizliğiyle ortaya çıkan mide-bağırsak sistemindeki bozukluklara dayanarak yapılmaya başlanmıştır [41]. Patojen mikroorganizmalar üzerine direkt antagonistik etki yaparlar: Probiyotik bakteriler, patojen bakterilerin üremesini engelleyen inhibitör antimikrobiyal peptid (mikrosin, bakteriyosin) üretir. Yapılan çalışmalarda, *S. boulardii*’ nin *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Shigella*, *E. coli* üremesini

baskıladığı gösterilmiştir. Patojenlerin adezyonunu önlerler; Probiyotik bakteriler, sayı ve hacim avantajları ile barsak ve ürogenital sistem epitel hücrelerinde, patojenlerin girmesini zorlaştırırlar. Epitelyal bariyeri güçlendirerek, patojenlerin translokasyonunu önlerler. Patojenlerin üremek için gereksinim duydukları besin maddelerini tüketerek, üremelerini inhibe ederler; *S. boulardii*, *Clostridium difficile*'nin gereksinim duyduğu monosakkaridleri tüketerek *C. difficile* üremesini önler [41, 42].

Barsak enzim aktivitesine etki ederler: Probiyotik bakteriler, laktaz, maltaz, sükröz aktivitesini arttıırırlar. *S. boulardii* poliaminleri, aminopeptidazların olgunlaşmasını sağlar [42].

Toksin ve toksin reseptörlerine etki ederler: *S. boulardii* 54 kDa proteini proteaz aktivitesinde olup, *C. difficile* toksin A üzerine direkt olarak veya toksinin reseptöre bağlanmasını önleyerek etki eder. Hayvan modellerinde, 120 kDa proteinin etkisi ile cAMP, adenilat siklaz aktivitesi azalarak, su-sodyum hipersekresyonunun azaldığı gösterilmiştir [41].

İmmün sistem üzerine etki ederler: Antibiyotik verilen *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* ile beslenen farelerde lamina propriada lenfosit proliferasyonu saptanmış, plazma hücrelerinin sayısı artmıştır. *Bifidobacterium breve* ile yapılan hayvan deneyinde, peyer plaklarında antikor üretiminin arttığı saptanmıştır. *L. casei* shirota suşu verildiğinde, T-helper sayısında artma, IgE düzeyinde azalma görülmüştür. Probiyotikler, proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin salınımını aktive ederek immün sisteme düzenleyici etki gösterirler [41].

Probiyotiklerin, hayvan modellerinde, dışkıda karsinojenleri aktive eden bakteriyel enzimleri inhibe ederek; karsinojenlerin yapısını bozarak anti-karsinojen etkilerinin olduğu gösterilmiştir [42].

Çizelge 2.3. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar [36].

<i>Bifidobacterium</i> türleri	<i>Lactobacillus</i> türleri	Diğerleri
<i>B. bifidum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. longum</i>	<i>L. lactis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. breve</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>B. infantis</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>B. lactis</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>Saccharomyces bulardii</i>
<i>B. adolescentis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>L. johnsonii</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>L. fermentum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
	<i>L. casei</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
	<i>L. paracasei</i>	
	<i>L. crispatus</i>	
	<i>L. salivarius</i>	
	<i>L. gasseri</i>	

2.3.3. Probiyotik mikroorganizmaların karakteristikleri

Probiyotik preparatlarında bulunan mikroorganizmalar, büyük bir grup olan bağırsak sistemi florası ile rekabet etmek zorundadır. Bu sistemde bulunan mikrobiyal flora üzerine bir etki yapabilmesi için de herhangi bir probiyotik preparatında bulunan mikroorganizmaların bazı karakteristik özelliklere sahip olmaları gerekmektedir [35]. Birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda probiyotik mikroorganizmaların taşımaları gereken özellikler belirlenmiştir [35, 43, 44]. Güvenilir olması için taşıması gereken özellikler;

1. İnsanlar için kullanılacak olan suşların tercihen insan kaynaklı olması gerekmektedir. Sağlıklı insanın mide-bağırsak sisteminden izole edilmelidir.
2. Patojenik olmamalıdır.
3. Mide-bağırsak bozuklukları gibi etkilere sebep olacak bir özellik taşımamalıdır.
4. Güvenilir bir probiyotik seçimindeki önemli kriterlerden biri de, antibiyotik

direnç genlerini taşıyıp aktarabilen suşlardan seçilmemesidir [45].

Probiyotik olarak tercih edilecek suşların taşımaları gereken fonksiyonel özellikler;

1. Mide asidine dirençli ve safraya toleranslı olmalı
2. Bağırsaklarda epitel yüzeye tutunmalı ve canlılığını devam ettirebilmeli
3. Antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklere sahip olmalı
4. Proinflamatuvar etki oluşturmada bağışıklık sistemini uyarması ve immün sistem elemanlarına (makrofaj, fagositoz, v.b.) dayanıklı olmalı
5. *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium difficile* gibi patojenlere karşı antagonistik aktivite göstermeli [45].



Şekil 2.7. Probiyotik mikroorganizmaların seçim kriterleri [45].

Probiyotiklerin yukarıda verilen özelliklerinin yanı sıra canlılığını devam ettirebilmesi de çok önemlidir. Bu nedenle de, asitlik ve safra tuzlarına olan direnci

çok önemlidir. Özellikle ağız yoluyla alınan probiyotikler bağırsaklara ulaşmadan önce midenin pH' ısı 1,5–3,0 olan asitli ortamından canlı olarak geçmesi gerekmektedir. Bu nedenle probiyotik seçiminde ilk aranması gereken özellik suşların asit dirençliliğidir. Yapılan araştırmalarda probiyotik olarak kültürler arasında asit dirençliliği en zayıf olan bifidobakteriler olarak bilinmektedir [46]. Mide asitliğini geçen bakteriler daha sonra safra ile karşılaşmaktadırlar. Safra organik (safra tuzları, kolesterol, fosfolipitler) ve inorganik (su, elektrolitler) bileşiklerin sulu bir karışımından oluşur. Safra, ya doğrudan safra kanalı yoluyla karaciğerden onikiparmak bağırsağına geçer ya da sindirim için hemen gereksinim yoksa safra kesesinde depolanabilir. Karaciğerde sentezlenen safra asitleri karaciğerden ayrılmadan önce bir molekül glisin ya da taurin amino asitleri ile konjuge edilir. Konjugasyon, safra asidinin karboksil grubu ile, eklenen bileşiğin amino grubu arasında oluşan amid bağı tarafından sağlanır. Oluşan bu yeni bileşik safra tuzları olarak adlandırılırlar. Bunlar, glikolik asit, glikokenodeoksikolik asit, taurokolik asit ve taurokenodeoksikolik asit' tir [47]. Safra asitlerinin konjuge olan ve olmayan formları özellikle mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkiye sahiptir. Ancak bu etki gram pozitiflerde daha belirgin olarak görülmektedir [48].

Probiyotiklerin bağırsak yüzeyine kolonize olup canlılığını devam ettirebilmesinin sağlayan diğer bir özellik ise polisakkarit üretimleridir. Laktobasiller ve bifidobakteriler de diğer birçok bakteri gibi farklı özelliklerde polisakkarit üretme yeteneğine sahiptir. Bu polisakkaritler hücrel konumlarına göre sınıflandırılırlar. Hücre duvarının dışına salgılanan polisakkaritlere ekzopolisakkarit ya da kısaca "EPS" adı verilir [49]. Hücrel lokasyonları, kimyasal ve fiziksel yapı özellikleri ile fonksiyonları esas alınarak mikrobiyal ekzopolisakkaritleri üç ana grup altında toplamak mümkündür. Bunlar; hücre yüzeyine kovalent bağlarla bağlı olan kapsül polisakkaritler (CPS), hücre duvarının bir bileşeni olan polisakkaritler (LPS) ve dış çevreye salınan ya da hücre yüzeyi ile kovalent olmayan, gevşek bağlarla ilişkilendirilmiş polisakkaritlerdir (LAM) [50, 51]. CPS ve LPS genellikle üretici bakterilerin patojenitesini belirleyen yapılar olduğundan, tıbbi açıdan büyük önem taşımaktadır. LAM' nin ise gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Ancak laktik asit bakterileri gibi genel olarak güvenli "Generally

recognized as safe” (GRAS) şeklinde tanımlanan mikroorganizmalarda CPS ve LAM, üretiminde rol alarak, gıdalara arzu edilen özellikleri kazandırmaktadır [52-54].

Bakterilerin oluşturdukları EPS, epitel doku ile bakteriler arasında (bağırsak florasında bulunan) gerçek bir bağ meydana getirir ve böylece EPS üretimine sahip suşların epitele yüksek kapasitede yapışma özelliğine sahip olacağı bildirilmektedir [55–57]. EPS’ ler ayrıca çeşitli ekosistemlerde kolonizasyonu kolaylaştıran biyofilmlerin oluşturulmasında da rol oynar. Hücre yüzey polisakkaritleri bakterilerin büyük çoğunluğu tarafından üretilmektedir. Bakteriyel EPS’ ler üretici mikroorganizma tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmazlar. Mikroorganizmaların çevrelerine salgıladıkları EPS moleküllerinin, fagositoz ve faj ataklarına, organizmadan sitokin salgılanmasına, antibiyotiklere ve toksik maddelere (toksik metal iyonları, sülfür dioksit, etanol gibi), ozmotik strese karşı, mikrobiyal hücreleri koruyucu görevi vardır. Organizmayı zararlı ortamdan korur [58, 59]. EPS bu özellikleri ile probiyotik olarak kullanılacak bakteriye florada daha fazla avantaj sağlayacaktır. EPS üreten laktik asit bakterileri yoğurt, peynir, tereyağı, kefir ve geleneksel fermente süt ürünlerinin üretiminde starter kültür suşları olarak kullanılmaktadırlar [56]. Starter kültürlerin EPS oluşturma yetenekleri, üretimde kullandıkları fermente süt ürünlerinin yapısal, aromatik ve reolojik özellikleri üzerinde belirgin bir şekilde etki etmektedir [57]. Bu polimerlerin bir diğer dikkate değer özelliği gıda sanayinde kıvam arttırıcı olmalarıdır [60]. EPS’ ler çeşitli fermente süt ürünlerinin üretiminde de teknolojik öneme sahiptirler [61, 62].

2.4. Bifidobakterilerin Probiyotik Önemi

Bir bakterinin probiyotik olarak etki göstermesi için gerekli özellikler yukarıda probiyotik mikroorganizmaların karakteristikleri başlıklı konu içeriğinde anlatılmıştır. Tüm bu özellikler göz önüne alındığında bifidobakterilerin probiyotik açıdan önemi şu şekilde özetlenebilir;

- Protein metabolizmasının iyileşmesi: Bifidobakteriler fosfoprotein fosfotaz aktivitesine sahip olduklarından insan sütünde bulunan α -kazeini parçalayabilmekte

ve böylece süt proteinlerinin absorpsiyonuna katkıda bulunmaktadır [63].

- Antimikrobiyal etkileri: Antimikrobiyal maddeler, mikroorganizma gelişimini engelleyen, biyolojik kökenli, ikincil metabolitlerdir. Bunlar, mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyici “bakteriyostatik” veya “fungustatik” olabildikleri gibi; mikroorganizmanın ölümüne sebep olan “bakterisit” ve “fungisit” gibi maddeler de olabilirler. Mikroorganizmalar tarafından üretilen, düşük moleküler ağırlıklı, organik doğal ürünlerdir [63- 65]. Bifidobakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler antimikrobiyal maddeler arasındadır. Bifidin ve bifidosin olarak adlandırılan bakteriyosinlerin sırasıyla *B. bifidum* 1452 NCDO ve *B. bifidum* 1454 NCFB suşları tarafından üretildiği ve bunların *Micrococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* gibi bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdikleri belirlenmiştir [66].

- İshal ve kabızlığı önlenmesi: Bifidobakteriler tarafından üretilen organik asitlerin bağırsağın peristaltik hareketini teşvik ettiği ve normal bağırsak hareketine yardımcı olduğu sanılmaktadır. Kabızlık çeken hastaların, bifidobakteri içeren süt ve ürünlerini tüketmeleri durumunda bağırsak hareketinde bir iyileşme olduğu ve dışkıda su miktarının arttığı gözlenmiştir [63]. Bununla birlikte, antibiyotik kullanımı esnasında bağırsaklarda *Clostridium*’ ların artmasıyla *Clostridium* toksinine bağlı olarak ishal görülebilir. Yapılan araştırmalarda bifidobakterilerin *Clostridium*’ ları ve toksinini inhibe edebildiği gözlenmiştir. Ayrıca, endüstrileşmiş toplumlarda rotavirus başlıca akut ishal nedenidir. Akut viral ishallerde probiyotiklerin bozulan bağırsak florasının iyileştirilmesi yönündeki etkinliği bildirilmiştir. Etkinliği saptanan suşlar arasında *L. rhamnosus* GG, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei* ve *Bifidobacterium lactis* sayılabilir [67].

- Böbrek rahatsızlıklarını giderme: Bifidobakterilerin böbrek rahatsızlıklarını iyileştirme ve kan amonyak düzeyini azaltma nedenleri şunlardır; (i) bifidobakteriler tarafından amonyağın bir nitrojen kaynağı olarak kullanılması, (ii) amonyak ve amin üreten bakterilerin gelişiminin önlenmesi, (iii) bifidobakteriler tarafından üretilen organik asitlerle bağırsak pH’ sının düşmesiyle iyonik koşulların oluşması ve

amonyak düzeyinin azalması, (iv) bifidobakterilerin alifatik aminler, hidrojen sülfid veya nitritler oluşturmamasıdır [66].

- Bağışıklık sistemini aktifleştirme etkileri: Bifidobakterilerin değişik immunolojik fonksiyonlarının (i) mitojenik, (ii) makrofaj ve antikor üretimini teşvik etme ve (iii) antitümör etkilerinin olduğu bildirilmiştir [68].

- Laktoz kullanımının iyileşmesi: Laktoz intoleransı insanların ince bağırsağında β -galaktozidaz veya laktaz enzimi yeterli miktarda bulunmadığından laktoz hidrolize olmamakta ve sonuçta karın ağrısı, kramp ve ishale neden olmaktadır. Bifidobakteriler β -galaktozidaz enzimini salgıladıklarından laktozun sindirilmesini iyileştirmektedir [29].

- Antikanserojenik (antikanser) aktivite: Birçok in vitro ve hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalar bifidobakterilerin antitümör ve antikanserojenik etkiye sahip oldukları ortaya konmuştur. *B. longum* kolon, böbrek ve göğüs kanserini teşvik eden “2-amino-3-metil-imidazol quinoline” (IQ)’yu inhibe etmekte veya azaltmaktadır. Ayrıca *B. longum*, kolonda glukuronit konjugelerin hidrolizinden çoğunlukla sorumlu olan β -glukuronidaz aktivitesini azaltarak toksik ve kanserojenik maddelerin oluşmasını önlemektedir [69].

- Serum kolesterol düzeyinin azaltılması: Kan lipidlerinin düşürülmesi ve kalp hastalığı riskinin azaltılmasında rol oynadıkları düşünülmektedir. Laktobasiller ve bifidobakteriler ile yapılan çeşitli deneyler, bu bakterilerin belirli suşlarının, safra tuzları varlığında, kolesterolü asimile edebilme yeteneğine sahip olduğunu kanıtlamıştır [70].

- Vitamin metabolizmasının iyileştirilmesi: Yaşa bağlı olarak sağlıklı insanların bağırsak sisteminde baskın olarak bulunan bifidobakteriler, B1, B2, B6, B12 vitaminleri ve ayrıca nikotinik asit ve folik asit üretmektedirler [71].

2.5. Bifidobakterilerin Epitel Yüzeye Tutunması

2.5.1. Hemaglütinasyon (HA) kabiliyeti

Hemaglütinasyon, bakterilerin epitel yüzeye tutunmasında etkili olabileceği düşünülen in vitro olarak hemen sonuç alınabilen bir yöntemdir. İnsan ve çeşitli hayvanların eritrositleri, bazı bakteri veya viruslarla birlikte bulundukları zaman bir kümeleşme gösterirler ki, bu olaya kanın aglütinasyonu anlamına gelen hemaglütinasyon (HA) adı verilmektedir. Yapılan araştırmalarda memeli epitel hücre reseptörleri ile eritrosit membran reseptörleri arasında benzerlik bulunmuştur [72]. Bu nedenle bakterilerin epitel yüzeye tutundurulması çalışmaları için ön denemelerin hemaglütinasyon çalışmaları ile gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir [73].

Bakterilerce meydana getirilen HA' da, mikroorganizmaların etrafında bulunan pilusların (fimbria) önemli rolleri vardır. Bu strüktürler, aynı zamanda, bakterilerin çeşitli hücrelere tutunmasında ve bağlanmasında da etkin görev yaptığından, mikroorganizmaların kolonizasyonunda ve hastalık oluşturmalarında fonksiyonları vardır [73]. Bakterilerde fimbriya oluşumu, fimbriyal ve nonfimbriyal hemaglütinasyon özellikleri, hemaglütinasyon tipleri, eritrosit profilleri gibi özelliklerin araştırılmasında, bir yandan bilimsel bir merak, bir yandan da bakterilere ait epidemiyolojik bilgilerin genişletilmesiyle sağlık sorunlarıyla ilgili pratik yaklaşımlara olanak sağlanması gibi amaçlardan söz edilebilir. Bakteri fimbriyaları, farklı hücre tipleri arasında eritrositlere de tutunabilme ve böylelikle aglutine etme (HA) yetenekleriyle bakteri hemaglütininleri (fimbriyal hemaglütininler) arasında yer almaktadırlar [74]. Bu bağlamda, fimbriyaların varlıklarını ve yapışmada oynadıkları rolü göstermeye yönelik in vitro araştırmalarda kullanılan yöntemlerden biri de bakterilerin HA yeteneklerinin gösterilmesine dayanmaktadır [74, 75].

Birçok enteropatojenik bakterinin, bağırsak bölgelerindeki kolonizasyonu, fimbrial yapışmayla gerçekleşmekte ve çoğunlukta fimbrial yapışma, lektin aktivitesi gibi davranarak epitel hücrelerindeki gliko-bağlama reseptörlerine bağlanmaktadır. Bu

gibi çalışmaların çoğunda bakterilerin eritrositleri aglutine etme yeteneği model alınarak bakterilerin kendi konakları ile olan etkileşimleri incelenmektedir [76].

2.5.2. Epitel yüzeye tutunmanın önemi

Bağırsak mukozasına tutunma kolonizasyon için önemlidir ve probiyotik mikroorganizmaların seçiminde gerekli olan kriterlerden biridir [77]. Probiyotik bakterilerin tutunması onların bağırsak sisteminde uzun süre kalabilmesi ve taşıdıkları yararlı özellikleri gösterebilmeleri için gereklidir [78]. Probiyotik mikroorganizmaların tutunması ile patojenlerin kolonizasyonunun azaltıldığı, immün sistemin modüle edildiği ve zarar gören mukozanın iyileşmesinde artış görüldüğü bilinmektedir [79, 80]. Probiyotik kültürlerin bağırsağa ulaşması halinde, peristaltik hareketler ile bağırsaktan kayıp gitmemesi için bağırsak lümenini örten mukus tabakasına ve epitel hücrelerine yapışması gerekmektedir. Bu durum, enteropatojenlere karşı antagonistik etki göstermesi için gereklidir [81- 83].

2.5.3. Tutunma mekanizması

Son yıllarda araştırmacılar tarafından, bazı *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* bakterilerinin epitel yüzeye tutunma mekanizması araştırılmıştır. Araştırmacılar ilk olarak, *Bifidobacterium bifidum* subsp. *pennsylvanicum*' un lipoteikoik asitinin insan kolon epiteline kolayca bağlanıp ayrılabilceğini keşfetmişlerdir [84]. Ancak, yapılan araştırmalar sonucunda *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* bakterilerinin epitel yüzeye tutunmasının mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Buna karşın, birçok infeksiyon hastalık ve virulanslarla ilişkisi olan patojen mikroorganizmaların epitel yüzeye tutunması ile ilgili çok fazla araştırma bulunmaktadır. Patojen mikroorganizmaların fimbrial adezinleri sıklıkla lektin benzeri aktiviteye ve epitelyum glukokonjugat reseptörlerine bağlanabilme özelliğine sahiptir [84, 85]. Patojenik bakterilerle ilgili olarak son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu tutunma mekanizmasından başka bir tip daha keşfedilmiştir. Çoğu patojenik bakteriler fibronektin, proteoglikanlar, laminin, kollojenler ve ekstrasellüler matriks moleküllerine benzer yüzey bileşenlerine sahiptir. Bu bileşenler sayesinde epitel yüzeye ve mukozaya tutunabilmektedirler [84–87].

Probiyotik bakterilerin epitel yüzeye yapışma çalışmalarında birçok araştırmacının odak noktası bakteriyel adezinler ve reseptörler olmuştur. Bununla birlikte, araştırmacılar göstermişlerdir ki, tutunma bakterilerin yüzey ile etkileşimleri sonucu gerçekleşmektedir [88]. Yapılan araştırmalar sonucunda tutunmayı gerçekleştiren yüzey yapıları belirlenmiştir. Bu yapılar hücre duvarı yüzeyinde yer alan asidik mukopolisakkaritler [89], karbonhidrat kapsül polimerleri, glikoproteinler ve karbonhidratlar, karbonhidrat kombinasyonları ve “proteinaceous” faktördür [90].

Bifidobakterilerin epitel yüzeylere yapışmasında “proteinaceous” olarak adlandırılan bir protein bileşiğin aracılık ettiği bulunmuştur. Bu nedenle bifidobakterilerin epitel yüzeylere yapışma mekanizması laktobasillerden farklılık göstermektedir. Bifidobakterilerin yapışkan-benzeri proteinlerinin türe özgü olduğu gösterilmiştir [88]. Genellikle, bifidobakterilerin bağırsak bölgesinde hücreye tutunması bakterilerin kolonizasyonu ve proliferasyonu için ön koşuldur [81]. Bifidobakteri suşlarının kolon yüzeyine tutunması, epitelin altına tutunarak veya mukusa bağlanarak gerçekleşmektedir. Hücre adezyonu yüzey ile hücre arasında gerçekleşen çok adımlı bir süreçtir. Bu süreci hücre membranının yapısı ve bileşimi ile yüzey etkileşimi belirlemektedir [88].

2.5.4. Tutunmada kullanılan doku kültürleri

Probiyotiklerin bağırsak bölgesine tutunması ve kolonizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda in vivo deneylerde karşılaşılan zorluklar nedeniyle genellikle in vitro denemeler yapılmıştır. Bu deneylerde genellikle in vitro koşullarda üretilebilen Caco-2, HT-29 ve HT29-MTX hücreleri kullanılmaktadır. Bu hücre modellerinin avantajı, in vitro ortamda morfolojik ve işlevsel farklılaşma göstermeleridir. Ayrıca bu hücre tabakaları, polarizasyon, fonksiyonel fırça kenar ve bağırsak hidrolazlarını içeren olgun enterosit karakterlerini de gösterirler [79].

Özellikle insanda, in vivo olarak bakteriyel yapışma çalışmaları sırasında karşılaşılabilecek zorluklar nedeniyle, insan bağırsak hücrelerine bakteriyel yapışma

için in vitro model sistemi geliştirilmiştir. Araştırmacılar tarafından, insan bağırsak epitelinde bulunan çeşitli tipteki hücrelerin özelliklerine sahip, insan adeno carcinoma (Caco-2) hücrelerini izole edilmiştir. Bakteriyel çalışmaların birçoğunda bu hücreler kullanılmaktadır. Caco-2 hücreleri normal ince bağırsak villus hücrelerinin özelliklerine sahip olduğu için, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, enteropatojenik ve enterotoksijenik *E. coli* ve *Vibrio cholerae* ile yapılan yapışmaya yönelik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Caco-2 hücreleri yalnızca normal mikroorganizmaların yapışma mekanizmasıyla ilgili çalışmalarda değil aynı zamanda bu bakterilerin patojenler ile aynı ekosistem için nasıl rekabete girebildiklerini gösteren çalışmalarda da kullanılmaktadır [80–82].

2.6. Prebiyotikler

Probiyotik olarak isimlendirilen bakterilerin selektif olarak büyüme ve gelişmesini sağlayan, aktivitelerini arttıran sindirilemeyen karbonhidrat bileşenlerine prebiyotik adı verilmektedir. Bir disakkarit olan laktuloz, inulin, oligosakkaritler (maltoz, soya, ksiloz), oligofruktoz ve galaktoz içeren galaktooligosakkaritler (kurubaklagiller) prebiyotikler sınıfına girmektedirler [91]. Prebiyotikler başlıca oligosakkaridler olup bağırsak sisteminde bir veya sınırlı sayıdaki bakterilerin gelişimini veya aktivitesini teşvik ederek, insan ve hayvan sağlığını olumlu yönde etkileyen gıda bileşenleridir. Bir gıda bileşeninin prebiyotik olarak adlandırılması için bağırsak sisteminin üst kısmında hidrolize ve absorbe olmamalı, bağırsakta bulunan yararlı bakterilerden tarafından kullanılabilmesi, sağlığı iyileştirici yönde bağırsak florasını değiştirebilmesi, insan ve hayvan sağlığını olumlu yönde etkilemelidir [92]. Bağırsak sisteminde bifidobakterilerin gelişiminin artırılması, çok spesifik karbonhidratlarla sağlanabilmektedir [29]. Prebiyotikler inulin, frukto- ve galaktosakkarit gibi kısa zincirli karbonhidratlardır ve kolon bakterileri için substrat görevi görürler. İn vitro olarak yapılan çalışmalarda prebiyotikler olarak kullanılan oligofruktoz ve inulin, kolondaki yararlı mikroflora (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* gibi) tarafından selektif olarak kullanılırken, toksin üreten *Clostridium*’ lar, proteolitik *Bacteriodes*’ ler ve toksijenik *E. coli* gibi potansiyel patojen mikroorganizmaların çoğalmasını engellemektedir [93, 94].

Prebiyotikler üzerine yapılan çalışmalarda genellikle inulin kullanılmaktadır. İnulin doğada yaygın olarak bitkilerin depo karbonhidratı formunda bulunan ve fruktoz polimerlerinin heterojen karışımına verilen isimdir. İnulinin polimerizasyon derecesi oldukça yüksektir. Polimerizasyon derecesi düşük olanlara ise fruktooligosakkarit ya da oligofruktoz adı verilmektedir [92]. Bifidobakteriler tarafından fermente edilen frukto-oligosakkaritler, *E. coli* ve *C. perfringens* tarafından fermente edilememektedir [94]. Bu nedenle, birçok özelliğinden yararlanılmak istenen bifidobakterilerin kullanımının yanı sıra prebiyotikler ile birlikte kullanılması önerilmektedir. Bu şekilde, probiyotiklerin ve prebiyotiklerin birlikte kullanılmasına sinbiyotik adı verilmektedir. Günümüzde çoğu süt ve süt ürünleri sinbiyotik bileşimleri içermektedir [95].

2.6.1. Prebiyotik uygulamaları

Son yıllarda yapılan araştırmalarda bifidobakterilerin gelişimini teşvik eden inulin ve oligofruktozun bağırsak hastalıkları ve bozuklukları üzerine etkileri araştırılmıştır. Birçok çalışmada prebiyotikler bağırsak florasının metabolik fonksiyonlarını geliştirmek için kullanılmıştır. Örneğin, in vivo olarak gerçekleştirilen çalışmalarda inülinin Ca absorpsiyonunu geliştirmesiyle ilgili birçok veri toplanmıştır. Bununla birlikte hayvan denemelerinde oligofruktozun fermentasyonu ile karaciğer metabolizmasında iyileşmenin meydana geldiği ve metabolik fonksiyonlarla ilgili disfonksiyonların önlenebileceği sonucuna varılmıştır [97]. Rowland ve ark. tarafından (1997) ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada *B. longum* ve inulin kullanılarak kolon yaralarında iyileşme tespit edilmiştir [69]. Ayrıca, Osman ve ark. tarafından (2006) yapılan bir çalışmada önceden kolit oluşturulan deney hayvanları, 7 gün süreyle iki bifidobakteri türü ve bunlarla birlikte belirli oranlarda hazırlanmış olan inulin ve oligofruktoz, çeşitli kombinasyonlar oluşturularak beslenmiştir. 7 gün sonrasında deney hayvanlarının kolit oluşturulan bölgesinden alınan örneklerde yara iyileşmesine etki eden bazı fizyolojik parametreler incelenmiştir. Elde edilen verilere göre kolit oluşturulan bölgede önemli bir oranda iyileşme gözlenmiştir [98].

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Materyal örnekleri

Araştırmada kullanılan dışkı ve anne sütü örnekleri yeni doğum yapmış anne ve yeni doğan bebeklerinden olmak üzere toplam 2 anne ve 2 erkek bebekten temin edilmiştir. Doğumdan sonra 1. günden itibaren 6. aya kadar geçen süreçte belirli aralıklarla alınan örneklerden bakteri izolasyonları yapılmıştır.

3.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri

Bebek dışkısından ve anne sütünden bakteri izolasyonlarında *Bifidobacterium* seçici besiyeri (BSM-Bifidobacterium Selective Medium, Fluka) ve mupirosin (Oxoid) adlı antibiyotik kullanılmıştır. BSM besiyeri içerisinde küflerin, enterokokların ve gram negatif bakterilerin gelişimini inhibe edici tuzlar bulunmaktadır. Aynı zamanda içerisindeki diğer bileşiklerle mantar ve streptokoklarda bulunan gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz enzimi baskılanarak glikoziz inhibisyonu sağlanmaktadır. BSM besiyeri aynı zamanda BSM supplementi ile birlikte de kullanılabilir. Bu supplement içerisinde bulunan üç antibiyotik *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* ve *Bacilli* gibi birlikte bulunan bakteriyal florayı inhibe etmektedir. Ayrıca, kullanılan mupirosin de geniş spektrumlu olup, metisiline dirençli suşlar da dâhil olmak üzere *Staphylococcus aureus* ve diğer stafilokoklar ile streptokoklara karşı etkindir [99].

Araştırmada kullanılan *Bifidobacterium* selective medium (BSM) sıvı besiyeri içeriğinde yer alan maddeler Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. *Bifidobacterium* selective medium (BSM) sıvı besiyeri

Maddeler	g/L	Maddeler	g/L
Pepton	10,00	Lityum klorit	2,00
Meet Ekstrakt	10,00	Sodyum propiyonat	3,00
Yeast Ekstrakt	3,00	Sodyum klorit	5,00
Glikoz	5,00	Sistein hidroklorit	0,50
Sodyum asetat	3,00	Starch	1,00

Maddeler tartılıp distile su ile 1000 ml tamamlanıp, pH' sı $6,8 \pm 0,2$ ' ye ayarlanmıştır. Daha sonra 121°C ' de 15 dk. otoklavda steril edilmiştir. Katı besiyeri elde etmek için sıvı besiyerine % 1,5 g agar ilave edilmiştir. Antibiyotik, besiyeri sıcaklığı $45-50^{\circ}\text{C}$ ' ye kadar soğutulduktan sonra, 200 u/L oranında ilave edilmiştir.

Araştırmada kullanılan Man Rogosa ve Sharp (MRS) sıvı besiyeri içeriğinde yer alan maddeler Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Man Rogosa ve Sharpe (MRS) sıvı besiyeri

Maddeler	g/L	Maddeler	g/L
Pepton	10,00	Tri Amonyum Sitrata	2,00
Beef Ekstrakt	10,00	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20
Yeast Ekstrakt	5,00	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,05
Glikoz	20,00	Na_2HPO_4	2,00
Na-Asetat . $3\text{H}_2\text{O}$	5,00	Tween 80	1 ml

Maddeler tartılıp distile su ile 1000 ml' ye tamamlanmıştır. pH' sı $6,8 \pm 0,2$ ' ye ayarlanmıştır. Katı besiyeri hazırlamak için besiyerine % 1,5 oranında agar ilave edilmiştir. Besiyeri 121°C ' de 15 dk. otoklavda steril edilmiştir.

Araştırmada kullanılan Sisteinli-MRS sıvı besiyerinin hazırlanmasında Çizelge 3.1.' de verilen MRS besiyeri hazırlandıktan sonra 2,00 g/L olacak şekilde L-sistein ilave edilmiş ve 1000 ml' ye distile su ile tamamlanmıştır (pH $6,8 \pm 0,2$).

Araştırmada *E. coli* ATCC 11229 suşu ile yapılan çalışmalarda kullanılan nutrient sıvı besiyeri içeriğinde yer alan maddeler Çizelge 3.3' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Nutrient sıvı besiyeri

Maddeler	g/L
Pepton	5,0
Yeast Ekstrakt	2,0
Sodyum klorid	5,0

Maddeler tartılıp distile su ile 1000 ml' ye tamamlanmıştır (pH $6,8 \pm 0,2$). Katı besiyeri hazırlamak için besiyerine % 1,5 oranında agar ilave edilmiştir. Besiyeri 121 °C' de 15 dk. otoklavda steril edilmiştir.

Araştırmada kullanılan PBS Tamponu içeriğinde yer alan maddeler Çizelge 3.4' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Phosphate Buffered Saline (PBS) tamponu

Maddeler	g/L
NaCl	8,00
K ₂ HPO ₄	1,21
KH ₂ PO ₄	0,34

Maddeler tartılıp distile su ile 1000 ml' ye tamamlanır. pH $6,2 \pm 0,2$ ye 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH ile ayarlanmıştır, 121 °C' de 15 dk. otoklavda steril edilmiştir.

Epitel yüzeye tutunma çalışmasında kullanılan mide suyunun içeriği Çizelge 3.5' de verilmiştir. Bağırsak sıvısının hazırlanmasında ise 0,15 g safra 100 ml' lik distile suda çözülür ve pH' sı 5 N NaOH ile 7,0 ve 8,0' e ayarlanır. Bağırsak sıvısı filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

Çizelge 3.5. Mide suyu içeriği

Maddeler	Miktar
NaCl	125 mM
KCl	7 mM
NaCO ₃	45 mM
Pepsin	3 mg/ml

Tüm maddeler tartılıp toplam hacim 1000 ml olacak şekilde sulandırıldıktan sonra pH' ları 180 mM HCl ile 3,0; 4,0; 5,0 ve 7,0' ye ayarlanarak, 121 °C' de 15 dk. otoklavda steril edilmiştir.

3.1.3. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları

Bifidobakterilerin geliştirilmesi ve aktifleştirilmesinde Sisteinli-MRS besiyeri kullanılmıştır. Ayrıca tüm deneysel çalışmalar, anaerobik jar (Oxoid, Anaerobar) içerisinde $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ' de 24–72 saat, ortama % 10 CO₂ salınımını sağlayan anaerobik kit kullanılarak (Oxoid, Anaerobic generating kit), geliştirilmiş ve tüm çalışmalarda iki kere aktifleştirilmiş kültürler kullanılmıştır [100].

3.1.4. Araştırmada kullanılan test bakterileri

Araştırmada antimikrobiyal aktivite ve epitel yüzeye tutunma çalışmalarında test bakterisi olarak kullanılan *Escherichia coli* ATCC 11229 suşu Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Kültür Koleksiyonu' dan temin edilmiştir. Bakteri nutrient sıvı besiyerinde 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir.

Araştırmada Fruktoz–6-fosfat fosfoketolaz enzim (F6FFK) testi için test bakterisi olarak *Lactobacillus delbrückii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 (ATCC, USA) suşu kullanılmıştır. Diğer tüm çalışmalarda *Bifidobacterium breve* DSMZ 20213, *Bifidobacterium bifidum* DSMZ 20456, *B. pseudocatenulatum* DSMZ 20438, *B. longum* DSMZ 20088 (DSMZ, German) suşları kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Bakterilerin izolasyonu

Yeni doğan bebeklerden ve annelerinden, sağlık durumlarına göre belirli periyodlarla dışkı ve süt örnekleri temin edilmiştir. Anne sütü örneklerinin alınacağı bölge önceden dezenfektanlarla silinerek dışarıdan herhangi bir bulaş olması engellenmiştir. Süt ve dışkı örnekleri önceden steril edilmiş ependorf tüplerine alınmış ve en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmıştır. Daha sonra, örneklerin seyreltilme işlemi steril fosfat tamponu (PBS) ile 10^{-1} den 10^{-6} ya kadar yapılmıştır. Seyreltilerden bifidobakterilerin izolasyonu için 0,1 ml alınarak BSM agara inoküle edilip, steril şartlarda drigalski spatülü ile homojen bir şekilde yayılmıştır. Mikroorganizmaların gelişmesi için 37 ± 1 °C' de 72 saat % 10 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır [100, 101].

İnkübasyon sonunda BSM agarda üreyen bakterilerin koloni morfolojileri incelenmiştir. İncelemeler besiyerinde 2 farklı koloni tespit edilmiştir. Morfolojisi farklı olan kolonilerden örnek alınarak sisteinli-MRS besiyerlerinde aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen izolatların tanımlamalarının yapılmasında ve çalışmalarda kullanılmak üzere stokları hazırlanmıştır.

3.2.2. Bakterilerin muhafaza edilmesi

Ependorf tüplerine 0,3 ml gliserol (Merck) konularak, 121 °C' de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Bakteriler uygun sıvı besiyerinde iki kez ard arda aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen kültürlerden 0,6 ml gliserol içeren steril ependorflara ilave edilerek, -85 °C' de muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir [102].

3.2.3. Dışkı ve anne sütü örneklerinden izole edilen bakterilerin tanımlanması

Dışkı ve anne sütü örneklerinden izole edilen, stokları hazırlanmış olan bakterilerin BSM besiyerine çizgi ekimleri yapılarak 37 °C' de 72 saat süreyle inkübasyona

bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda izolatlar tarafından oluşturulan koloni morfolojileri incelenmiştir (Bkz. Resim 4.1). Ayrıca, izolatların gram boyamaları yapılmış ve bütün izolatların gram (+) oldukları görülmüştür. İzole edilen bakterilerin besiyerindeki koloni morfolojilerinin ve gram boyama sonuçlarının, *Bifidobacterium* cinsine ait türlere benzer şekilde olduğu görülmüştür [9]. *Bifidobacterium* cinsine ait olduğu düşünülen izolatlar daha sonra bifidobakterilerin belirlenmesinde kullanılan fruktoz-6-fosfat fosfoketolaz enzim testi yapılarak, fruktoz-6-fosfat fosfoketolaz enzim varlığı açısından pozitif olup olmadıkları değerlendirilmiştir.

Fruktoz-6-fosfat fosfoketolaz (F6FFK) enzimi aktivitesi

Bibiloni (2000) tarafından kullanılan metot bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır [101]. İzolatların aktif kültürlerinin optikal yoğunluk (OD) değerleri 600 nm dalga boyundaki spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) 0,600'a ayarlanmıştır (OD₆₀₀ nm ≈ 0,600) 1 ml' lik aktif kültür 4000 rpm' de 4 dk. santrifüj edilmiştir. % 0,05 sistein hidroklorid (pH 6,5) içeren 1 ml fosfat tamponu (0,05 M KH₂PO₄) ile yıkayıp, 200 µl % 0,05 sistein hidroklorid (pH 6,5) ve % 0,25 Triton X-100 içeren 1 ml fosfat tamponu süspanse edilmiştir. Daha sonra 6 mg/ml sodyum florid ve 10 mg/ml sodyum iyodasetat karışımından ve 80 mg/ml fruktoz-6-fosfattan eklenerek 60 dk. inkübe edilmiştir. 13,9 g/100 ml hidroksilamin hidrokloritten 300 µl eklenerek 10 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. % 15 trikloroasetik asit, 4 M hidroklorik asit ve % 5 FeCl₃. 6 H₂O' dan eklenerek renk değişimi gözlenmiştir. Eğer izolatlar, standart bifidobakteri suşlarında olduğu gibi menekşe renginde gözlenirse test pozitif, laktobasil suşunda olduğu gibi sarı renkli gözlenirse test negatif olarak değerlendirilmiştir (Bkz. Resim 4.2).

Bifidobacterium cinsine ait olduğu düşünülen izolatların tür düzeyinde tanımlamaları için çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır. Bakterilerin morfolojileri (şekil ve formlanış), hareket durumları, spor oluşturma durumları ve gram boyamaya karşı reaksiyonları incelenmiştir. Bunlara ilave olarak, bakterilerin sıvı besiyerindeki üreme durumu, katı besiyerindeki koloni şekli ve

yapıları da incelenmiştir. İzolatların katalaz reaksiyonları, glikozdan gaz oluşturma durumları, indol reaksiyonları, jelatin ve arjinin hidrolizi reaksiyonları da incelenmiştir [103].

Şeker testleri

İzolatların riboz, laktoz, salisin, melibiyoz, melizitoz, ksiloz, rafinoz, sellobiyoz, maltoz, mannitol, sorbitol, glikoz, galaktoz, arabinoz, mannoz, trehaloz, sükroz gibi şekerleri içeren besiyerlerinde şeker kullanımları test edilmiştir.

Şeker testleri için, sıvı MRS' den karbonhidrat kaynağı olarak dekstroz çıkarılmış ve % 0,04 g bromkresol purpur indikatörü ilave edilerek stok besiyeri hazırlanmıştır. Hangi şekerin testi yapılacaksa o şekerden % 2 oranında hazırlanmış ve 0,2 µm' lik filtre kağıdı kullanılarak, mikrofiltrasyon yolu ile steril edilmiştir. Stok şekerlerden % 1 oranında besiyerine ilave edilmiştir. Yoğunluğu eşit olarak ayalanmış ($OD_{600} \text{ nm} \approx 0,600$) olan aktif kültürlerden şekerli besiyerlerine % 1 oranında inoküle edilerek $37 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 48 saat % 10 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda şeker fermentasyon durumlarına göre (+/-) sonuçlar değerlendirilmiştir [104, 105].

Ayrıca, suşların şeker testlerine dayalı Analitik Profil İndeks (API, Biomérieux, Fransa) analizi yapılmıştır. Analizleri, API 20 A(Biomérieux, France) kiti kullanılarak yapılmıştır.

Fizyolojik ve biyokimyasal testler

Katalaz testi

Katalaz enziminin ortamdaki hidrojen peroksiti, su ve oksijene ayırdığı bilindiğinden bakteriler iki kez ard arda 5 ml' lik steril sisteinli-MRS sıvı besiyerinde uygun koşullarda aktive edilmiştir. İnkübasyon sonrasında aktif kültürlerden 1 ml alınarak tüp içerisine konulmuştur ve üzerine de % 30' luk H_2O_2 ilave edilmiştir. Sonuçlar kabarcık oluşumuna göre değerlendirilmiştir. Bu test için

Staphylococcus aureus pozitif kontrol olarak kullanılmıştır [106].

Arjinin hidrolizi

Maddeler tartılıp hacim distile edilmiş su ile 1000 ml' ye tamamlanmıştır. Katı besiyeri hazırlamak için besiyerine % 1,5 oranında agar ilave edilmiştir. Besiyeri 121 °C' de 15 dk. otoklavda steril edilmiştir. İki kez aktiveştirilen kültürlerden iğne öze ile ekim yapılarak, 37 ± 1 °C' de 48 saat % 10 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar inkübasyon sonunda renk değişimine göre değerlendirilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* pozitif test bakterisi olarak kullanılmıştır.

<u>Maddeler</u>	<u>g/L</u>
Pepton	1
NaCl	5
K ₂ HPO ₄	0,3
Fenol Red	0,01
Arjinin	10

Jelatin hidrolizi

% 10 oranında jelatin içeren sisteinli-MRS besiyeri hazırlanıp, 121 °C' de 15 dk. otoklavda steril edilmiştir. Her bir tüpe aktif bakteri kültürlerinden ekim yapılarak 37 ± 1 °C' de 48 saat % 10 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyerinin sıvılaşma durumuna göre sonuçlar pozitif veya negatif olarak değerlendirilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* pozitif test bakterisi olarak kullanılmıştır.

İndol reaksiyonu

<u>Maddeler</u>	<u>g/mL</u>
Pepton veya pankreatik kazein	1
NaCl	5 ; pH; 7,2

Yukarıdaki maddeler ile hazırlanan besiyeri 121 °C’ de 15 dk. otoklavda steril edilmiştir. Her bir tüpe aktif bakteri kültürlerinden ekim yapılarak 37 ± 1 °C’ de 48 saat % 10 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir tüpün üzerine 1-2 damla kovaks ayırıcı damlatılarak renkli halka oluşumuna göre sonuçlar pozitif veya negatif olarak değerlendirilmiştir. İndol oluşumunda pozitif test bakterisi olarak *E. coli* kullanılmıştır.

Glikozdan gaz çıkışı

Bu test için, hazırlanan sisteinli-MRS sıvı besiyeri, durhaym tüpü içeren test tüplerine 5 ml olarak dağıtılmıştır ve 121 °C’ de 15 dk. otoklavda steril edilmiştir. Daha önceden aktifleştirilmiş olan kültürlerden % 1 oranında besiyerine inoküle edilerek, 37±1 °C’ de 48 saat % 10 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda deney tüpleri incelenmiş ve oluşturmuş olabilecekleri gazlar (H₂ ve CO₂) durhaym tüplerinde incelenmiştir.

3.2.4. Bifidobakterilerin asit dirençliliğinin belirlenmesi

Bifidobakterilerin asit dirençliliklerinin belirlenmesinde Chung ve ark. (1999), Succi ve ark. (2005) ve Jiang ve ark. (2007) tarafından bildirilen yöntemler modifiye edilerek kullanılmıştır [107–109]. Probiyotiklerin midenin yüksek asitli ortamından geçerek bağırsaklara ulaşabilme yeteneğini belirlemek için mide sıvısı koşullarına benzer bir ortam oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla sisteinli-MRS besiyerinin pH’ sı sterilizasyondan önce 1 N HCl kullanılarak 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 ve 6,2’ ye (kontrol) ayarlanmış, sterilizasyondan sonra 0,45 µm’ lik filtre ile süzülerek sterilize edilmiş pepsin (Sigma) çözeltisi son konsantrasyon 1000 U/ml olacak şekilde besiyerine katılmıştır. İzolatların aktif kültürlerinin optikal yoğunluk (OD) değerleri 600 nm dalga boyundaki spektrofotometrede (Digilab Hitachi U–1800) 0,600’ a ayarlanıp (OD_{600 nm}=~0,600), pH’ ları belirli olan besiortamlarına % 1 oranında ekilerek, 37 ± 1 °C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücre konsantrasyonu spektrofotometrede 600 nm’ de ölçülmüştür.

3.2.5. Bifidobakterilerin safraya toleransının belirlenmesi

Bifidobakterilerin safra toleransının belirlenmesinde de asitlik direncinin belirlenmesine benzer olarak gerçekleştirilmiş olup, burada kullanılan sisteinli-MRS besiyeri steril edildikten sonra safra konsantrasyonu % 0,15; % 0,2; % 0,3 ve % 0,40 olacak şekilde filtreden geçirilerek safra (Sigma) ilave edilmiştir [107–109]. Suşların aktif kültürlerinin optikal yoğunluk (OD) değerleri 600 nm dalga boyundaki spektrofotometrede (Digilab Hitachi U–1800) 0,600' a ayarlanıp ($OD_{600\text{ nm}} = \sim 0,600$), safra konsantrasyonları belirlenmiş olan sisteinli-MRS besiyerine ekilerek $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücre konsantrasyonu spektrofotometrede 600 nm' de ölçülmüştür.

3.2.6. Bifidobakterilerin ekzopolisakkarit (EPS) üretiminin belirlenmesi

Bifidobakterilerin EPS üretim miktarlarının belirlenmesinde Valerie ve ark. (1999)' nın metodu kullanılmıştır [110]. İzolatların $OD_{600\text{ nm}} = \sim 0,600$ olan aktif kültürlerinden sisteinli-MRS sıvı besiyerine % 2 oranında inoküle edilerek, $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerden 1 ml' lik miktarlar ependorf tüplerine alınarak, 96°C 'de 10–15 dk. kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulmuştur. 1 ml örnek üzerine % 85' lik TCA ilave edilerek, 13,000 rpm' de 25 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmının üzerine eşit hacimde etanol eklenmiş ve tekrar santrifüjlenerek pelletler elde edilmiştir. Pelletlerin üzerine ikinci kez etanol eklenmiş ve çözülmesi sağlanmıştır. Etanol içerisindeki örnekler santrifüjlenerek presipite edilmiştir. Presipite olan örnekler 1 ml distile suda çözülmüştür. Çalışmanın devamında, EPS üretim miktarlarının belirlenmesi için Dubois ve ark. (1956)' nın Fenol-Sülfürik asit metodu uygulanmıştır [111].

Fenol- Sülfürik asit metodu:

Örneklerin üzerine 0,5 ml fenol (Sigma) ve 5 ml saf sülfürik asit eklenerek, 10 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra iyice karıştırılmıştır. Karıştırılan örnekler 30

$^{\circ}\text{C}$ ' de 15–20 dk. bekletildikten sonra, optik yoğunlukları 490 nm' de spektrofotometrik (Digilab Hitachi U–1800) olarak ölçülmüştür.

EPS üretim miktarlarını belirlemek için 5–100 mg/L arasında değişen oranlarda glikoz kullanılarak standart bir eğri çıkarılmıştır. Bu standarda göre örneklerin EPS miktarları mg/L olarak belirlenmiştir.

3.2.7. Bifidobakterilerin *Escherichia coli* üzerindeki inhibisyon etkisi

İki kere ard arda aktiveleştirilen kültürler optikal yoğunluk (OD) değerleri 600 nm dalga boyundaki spektrofotometrede (Digilab Hitachi U–1800) 0,600' a ayarlandıktan sonra steril besiyerine aktarılıp, $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kültürler 5000 rpm' de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant steril şartlar altında 0,45 μm ' lik disposable filtre ile mikrofiltrasyon yolu ile steril edilmiştir.

İnhibisyon zonunun tespiti için test bakterisi olarak *E. coli* ATCC 11229 suşu kullanılmıştır. Test bakterisini nutrient sıvı besiyerinde aktiveleştirilmiştir. Test bakterisi uygun inkübasyon sıcaklıklarında geliştirilmiş 24 saatlik aktif kültürlerden steril plaklara 50 μl aktarılmıştır. Bu işlemten sonra daha önceden hazırlanıp, 121°C ' de 15 dk otoklavda steril edilmiş olan ve yaklaşık olarak 50°C ' ye kadar soğutulmuş olan nutrient katı besiyerinden 20 ml ilave edilmiştir. Daha sonra katı besiyeri üzerinde açılan kuyulara bifidobakteri suşlarının süpernatantından ilave edilmiş ve uygun inkübasyon sıcaklıklarında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyu çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile ölçülmüştür [112].

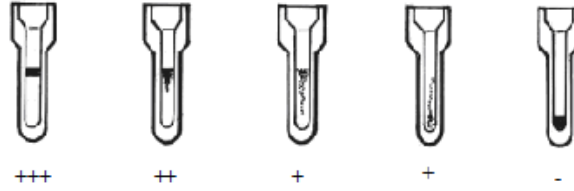
3.2.8. Bifidobakterilerin tutunma testleri

Hemaglütinasyon (HA) testi

Aktif kültürlerin hücre yoğunlukları, PBS tamponu ile iki kere yıkandıktan sonra

aynı tampon içerisinde resüspanse edilerek, Mac Farland standardında yer alan Mc Farland 10 (1×10^9 CFU/ml)' a eşdeğer yoğunluğa getirilmiştir.

Bifidobacterium cinsine ait türlerin hemaglütinasyon (HA) yetenekleri Jel yöntemi ile belirlenmiştir (Diamed AG 1785 Cressier s/Morat, Switzerland) [113]. Bu yöntemde Mac Farland 10 standardına göre yoğunluğu ayarlanan suşlar, içerisinde jel bulunan kuyulara 125 µl eklenmiştir. Üstüne 25 µl O (sıfır) grubu insan eritrositinin % 0,08' lik süspansiyonu (DiaMed A G) konulmuştur. Daha sonra bu kuyuların bulunduğu kartlar 1000 rpm' de 10 dk. santrifüj edildikten sonra hemaglütinasyon şiddeti görsel olarak değerlendirilmiştir (Bkz. Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Hemaglütinasyon sonuçlarının değerlendirilmesi

Bifidobakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunması

Doku kültürü çalışmasında epitel hücrelere bir model olarak kullanılan Caco-2 hücreleri ŞAP enstitüsü doku kültürü bankasından elde edilmiştir.

Caco-2 hücreleri, % 10 fetal calf serumu, 2mM L- glutamin (Sigma), 100 IU/ml penisilin (Flow) ve 100 µg/ml streptomisin (Flow) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle' s Medium, Flow) besiyerinde 25 cm²' lik yüzeye sahip hücre kültürü şişelerinde geliştirilmiştir. Hücreler geliştirdikten sonra 6X24' lük pleytlere dağıtılmış ve hücreler üzerine 1,5 ml' lik vasat (DMEM) konularak 37 °C % 10 CO₂ + % 90 hava bulunan etüvde tüm yüzeyi kaplayıncaya kadar (her kuyuda 1×10^5 olacak şekilde, 24 saat) inkübe edilmiştir. Hücrelerin yüzeyi kaplayıp kaplamadığı invert mikroskop ile kontrol edilmiştir. Hücreler tüm yüzeyi kapladıktan sonra çalışmalar başlatılmıştır.

Bu çalışmada, asit direnci, safra toleransı, EPS üretim kapasitesi ve hemagglütinasyon yeteneği yüksek *B. breve* A28 ve tüm bu özellikleri zayıf olan *B. bifidum* A10 suşları kullanılmıştır. Ayrıca, sıklıkla çalışmalarda karşılaşılan, inhibisyon çalışmasında da kullandığımız, önemli bir bağırsak patojeni olarak bilinen *E. coli* ATCC 11229 suşu da bu çalışmaya dâhil edilmiştir. Suşların epitel yüzeye tutunma çalışmaları bazı modifikasyonlarla Zarate (2002)' ye göre yapılmıştır [114]. Bakterilerin aktif kültürlerinin optik yoğunlukları 600 nm' de 0,600' e ayarlandıktan sonra PBS tamponu ile iki kere yıkanmış, elde edilen süspansiyonun 100 µl' si ve 1 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle' s Medium, Flow) besiyeri içerisindeki Caco-2 hücrelerine eklenerek, 37 ± 1 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında mikroplyetlerde yer alan bakteri ve Caco-2 hücreleri PBS tamponu ile yıkanarak hem kullanılan besiyeri hem de hücre yüzeyine tutunmayan bakteriler uzaklaştırılmıştır. Tutunan bakterilerin tespiti için hazırlanan preparatlar gram boyama yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiş ve sayımları yapılmıştır. Bu sayımlar için 50 farklı alanda 100 hücre üzerindeki bakteriler sayılıp, hücre başına düşen bakteri sayısı ortalama olarak hesaplanmıştır.

B. breve A28, *B. bifidum* A10 ve *E. coli* ATCC 11229 suşlarının epitel yüzeye tutunmada rekabetinin belirlenmesi

Yukarıda anlatıldığı gibi Caco-2 hücreleri pleytler içerisinde geliştirilendikten sonra, *B. breve* A28 ve *E. coli* ATCC 11229, *B. bifidum* A10 ve *E. coli* ATCC 11229 suşları birlikte Caco-2 hücrelerinin bulunduğu kuyulara eklenmiş ve inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler lama alınıp, gram boyama yöntemi ile boyanarak, ışık mikroskopunda sayımları yapılmış ve rekabet sonucunda bakterilerin yüzeye tutunma indeksleri yukarıda anlatıldığı gibi hesaplanmıştır.

Bifidobakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunmasında mide suyu ve mide suyu ile birlikte bağırsak sıvısının etkisi

Genellikle probiyotiklerin gıdalarla birlikte veya ilaç preparatları şeklinde kullanımı

önerildiğinden, bu bakterilerin bağırsaklara ulaşana kadar izlediği yolda mide suyu ve bağırsak sıvısına maruz kalmaları söz konusudur. Bu nedenle çalışmamızda mide suyu ve bağırsak sıvısının, probiyotik uygulamalarda kullanılması amaçlanan üstün nitelikli *B. breve* A28 suşu ile birlikte probiyotik kullanım açısından zayıf olduğu düşünülen *B. bifidum* A10 ve bağırsak patojeni olan *E. coli* ATCC 11229 suşlarının canlılığı üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Bu amaçla, kültürler iki kere aktiveleştirildikten sonra optikal yoğunluk (OD) değerleri 600 nm dalga boyundaki spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) 0,600' ya ayarlanmıştır (OD₆₀₀ nm = ~0,600). Yoğunluğu ayarlanmış bakteri süspansiyonundan 4 farklı test tüpüne alınarak, 5000 rpm' de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant fazı atılmıştır. Pelletin üzerine pH' sı 3,0; 4,0; 5,0 ve 7,0 (kontrol)' a ayarlanmış mide suyundan 2' şer ml eklenerek, iyice vortekslendikten sonra 37 ± 1 °C' de 60 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda mide suları atılıp, pelletler PBS tamponu ile 2 kez yıkanarak, aynı tamponda resüspanse edilmiştir. Süspansiyonun 100 µl' sinden seri dilüsyonlarla sisteinli-MRS katı besiyerine ekim yapılarak, mide suyunun bakterilerin canlılıkları etkisindeki etkisi CFU/ml olarak belirlenmiştir [108, 112]. Geri kalan bakteri süspansiyonunun 100 µL' si ve 1 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle' s Medium, Flow) besiyeri içerisindeki Caco-2 hücrelerine eklenerek, daha önce anlatılan tutunma metodu uygulanmış ve mide suyundan etkilenen bakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunması tespit edilmiştir.

Mide suyu ile birlikte bağırsak sıvısının bakteriler üzerindeki etkisinde ise yukarıda anlatılan metoda ilave olarak mide suyu uzaklaştırıldıktan sonra yerine pH' sı 7,0 olan bağırsak sıvısından 2' şer ml eklenip, iyice karıştırılmış ve 37 ± 1 °C' de 60 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında santrifüjlendiren bağırsak sıvıları atılıp, pelletler PBS tamponu ile 2 kez yıkanmış ve aynı tamponda resüspanse edilmiştir. Süspansiyondan seri dilüsyonlar ile sisteinli-MRS katı besiyerine ekim yapılarak CFU/ml olarak mide suyu ve bağırsak sıvısından etkilenen bakterilerin canlılıkları saptanırken, aynı zamanda Caco-2 hücrelerine tutundurulma işlemleri de yukarıda anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş ve mide suyu ile bağırsak sıvısından etkilenen bakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunması belirlenmiştir [114].

Taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

B. breve A28 ve *B. bifidum* A10 suşlarının Caco-2 hücrelerine tutunma çalışmaları sonucunda, hücre yüzeyine tutunan bakterilerin elektron mikroskobunda görüntülenmesi için pleytlerdeki hücrelerin bir kısmı ise % 3' lük glutaraldehid içeren 0,1 M PBS tamponu içine alınarak elektron mikroskobunda görüntülenmek üzere hazırlanmıştır. Glutaraldehid içerisinde 4 °C' de 24 saat bekletilen hücreler, PBS tamponu ile iki kere yıkandıktan sonra % 70-80-90 ve 100' lük etanolde bekletilerek ortamdaki su uzaklaştırılmış ve altınla kaplanmış CO₂' li kurutucularda (Polaron, CDP 7501, Polaron SC 502 sputter coater) kurutulmuştur. Bu örnekler Jeol JSM 6060 taramalı elektron mikroskobunda incelenmiştir.

3.2.9. Prebiyotik uygulamaları

Probiyotik uygulamalarından daha verimli sonuçların elde edilmesi amacıyla, probiyotik mikroorganizmalar prebiyotiklerle desteklenmektedir. Özellikle bifidobakterilerin prebiyotik varlığında gelişimlerinin stimüle olduğu, bazı patojenlerde ise, buna bağımlı inhibisyonlar gözlemlendiği bilinmektedir [115]. Çalışmalarda sıklıkla prebiyotik olarak inulin kullanılmaktadır. Prebiyotik olarak kullanılan inulinin bifidobakteriler üzerindeki etkisinin belirlenmesi için, steril sisteinli-MRS sıvı besiyerine % 5 inulin ve % 2 oranında optikal yoğunluğu (OD₆₀₀ nm ≈0,600) ayarlanmış olan *B. breve* A28, S4 ve *B. bifidum* A10 suşlarının aktif kültürlerinden inoküle edilerek, 37 °C' de % 10 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kültürlerden, seri dilüsyonlarla sisteinli-MRS katı besiyerine ekim yapılarak inulinin bifidobakterilerin canlılıklarına etkisi belirlenmiştir. İnulinsiz sisteinli-MRS besiyerine ekilen bifidobakterilerin canlılıklarından kontrol grubu oluşturulmuştur. Aynı çalışma modeli *E. coli* ATCC 11229 suşu ile de oluşturularak prebiyotiğin patojen bir bakteri üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. EPS üretim kapasitesi, hemagglütinasyon kabiliyeti ve inhibisyon çalışması sonuçlarına bakılarak, bu özellikler bakımından iyi verim elde edilen *B. breve* A28 suşu ve bu özellikleri zayıf olarak belirlenen *B. bifidum* A10 suşu ayrı ayrı *E. coli* ATCC 11229 ile aynı ortamda geliştirilerek, inulinli ortamda

bifidobakterilerin *E. coli* ATCC 11229 üzerindeki etkisi araştırılmıştır. *B. breve* A28 ve *E. coli* ATCC 11229, *B. bifidum* A10 ve *E. coli* ATCC 11229 suşları aynı inulinli sıvı besiyerine ekilerek, 37 °C’ de % 10 CO₂ içeren ortamda 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kültürlerden, seri dilüsyonlarla nutrient katı besiyerine ekim yapılarak inulin ve bifidobakterilerin *E. coli* ATCC 11229 üzerindeki etkisi belirlenmiştir [116].

3.2.11. İstatistiksel analizler

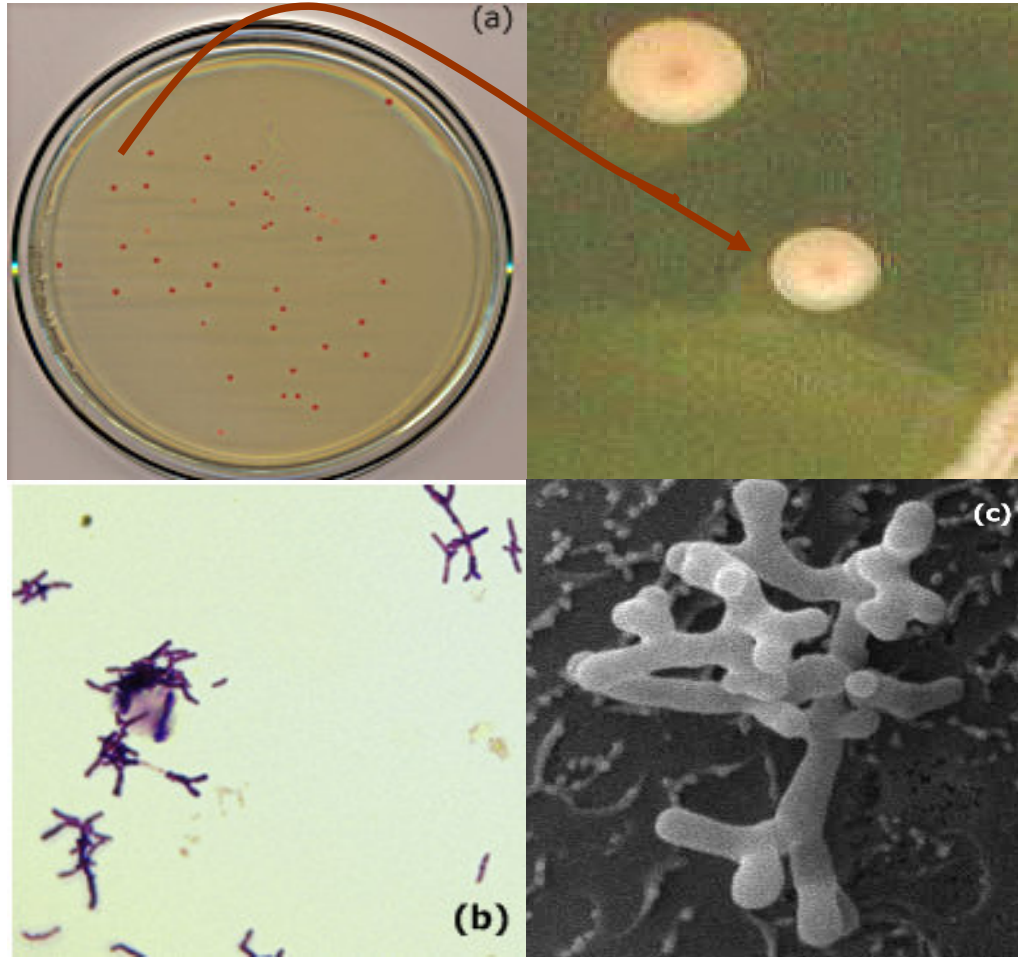
İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (13.0 versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Pearson’ un korelasyonuna göre, suşların EPS üretimi- asit dirençliliği, EPS üretimi- safra toleransı, EPS üretimi- hemaglütinasyon yeteneği ve EPS üretimi-epitel yüzeye tutunma oranları arasında korelasyon olup olmadığı incelenmiştir.

4. DENEYSEL BULGULARI

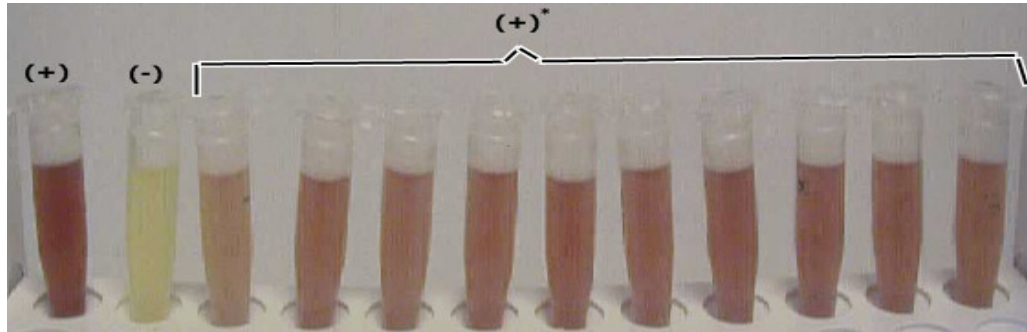
4.1. Bifidobakterilerin İzolasyonu ve Tanımlanmaları

Bu çalışmada, yeni doğum yapmış iki anne ve yeni doğan 2 erkek bebekten 0–6 aylık süreç içerisinde temin edilen süt ve dışkı örneklerinden toplam 59 adet bakteri izole edilmiştir. İlk izolasyonlar *Bifidobacterium* cinsine ait bakteriler için seçici olan *Bifidobacterium* Selective Medium (BSM) besiyerinde, bakterilerin gelişme durumuna bakılarak yapılmıştır. Ayrıca izolatların koloni morfolojileri, gram boyamaları ve hücre morfolojileri incelenerek ilk seçimleri gerçekleştirilmiştir. Resim 4.1’ de bakterilerin ışık ve elektron mikroskobu ile koloni morfolojilerinin görüntülenmesi verilmiştir.

Tüm izolatların *Bifidobacterium* cinsine ait olup olmadığının belirlenmesi için Fruktöz–6-fosfat fosfoketolaz (F6FFK) enzimi aktivite testi yapılmıştır. Bu testin sonuçlarına göre *Bifidobacterium* olarak tanımlananlar izolatların pembe-menekşe renk oluşturduğu, *Bifidobacterium* cinsi olmayan izolatların ise, negatif kontrol olarak kullanılan *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842 gibi sarı renk meydana getirdiği gözlenmiştir (Bkz. Resim 4.2). Bu ön eleme sonucunda toplam 59 izolattan F6FFK enzim aktivite testine göre, 31 tanesinin *Bifidobacterium* cinsine ait olduğu belirlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda sadece bu bakteriler değerlendirmeye alınmıştır.



Resim 4.1. Bifidobakterilerin koloni yapısı (a), ışık mikroskobu (b, X1000) ve Taramalı elektron mikroskobu (c, X5000 μm , Prof. Dr. Zekiye Suludere) görüntüsü



Resim 4.2. Fruktöz-6-fosfat fosfoketolaz (F6FFK) enzimi aktivitesi, (+) *B. breve* DSMZ 20213; (-) *L. delbrückii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842; (+)* pozitif sonuç veren test izolatları

4.1.1. Klasik identifikasyon sonuçlarının numerik taksonomi programında değerlendirilmesi

Anne sütünden ve anne sütü ile beslenen yeni doğan bebek dışkısından izole edilen 31 adet *Bifidobacterium* spp. izolatu, 4 referans ve 4' ü dublike kültürler olmak üzere toplam 39 izolat üzerinde klasik identifikasyon testleri 3 kez uygulanmıştır. Klasik identifikasyon ile yapılan biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları Çizelge 4.1' de verilmiştir. Tanımlama test sonuçlarına göre, izolatlardan 15 adedi *B. breve*, 11 adedi *B. bifidum*, 3 adedi *B. pseudocatenulatum*, 2 adedi *B. longum* olarak tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlar numerik taksonomi programında değerlendirilmiş (NTSYSpc, Numerical Taxonomy System, version 2.10q) ve oluşturulan dendrogram Şekil 4.1' de gösterilmiştir. Klasik identifikasyondan elde edilen dendrogram değerlendirildiğinde; A26 suşunun dublikantı GE1 ve A2 suşunun dublikantı GE2 dendrogramda birbirlerine yakın mesafede bulundukları tespit edilmiştir. A12S suşunun dublikantı olan GE3 ve D3 suşunun dublikantı GE4 suşları birbirlerine % 90' nın üzerinde benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Klasik identifikasyon testleri ile oluşturulan dendrogramda *B. breve*' ye ait olan suşların % 88- 96 oranları arasında benzerlik gösterdiği; *B. bifidum*' a ait olan suşların % 57- 92 oranında benzerlik belirlenmiştir. *B. pseudocatenulatum* ve *B. longum* olduğu düşünülen suşların da dendrogramda sırasıyla % 85–90 ve % 85–94 oranları arasında benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Çizelge 4.1. Bifidobakterlerin fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçları

Suş Kodu	Tammlanan Tür	Temin Edildiği Yer	İzolasyon Zamanı ^a	Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler																					
				Riboz	Laktoz	Salisin	Melibiyoz	Melizitoz	Ksiloz	Rafinoz	Sellobiyoz	Maltoz	Fruktoz	Sorbitol	Glukoz	Galaktoz	Arabinoz	Mannoz	Trehaloz	Sükroz	Gram reaksiyonu	Katalaz	Jelatin hidrolizi	Arjininden amonyak oluşumu	Glukozdan gaz çıkışı
Bifidobacterium breve DSMZ 2013			Gün	+	+	V ⁻	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	V ⁻	V ⁻	+	-	-	-	-	-
A16	B. breve	B.G.	16.	+	+	+	+	V ⁺	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
A16S	B. breve	A.S.	16.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V ⁻	-	+	-	-	-
A19	B. breve	B.G.	19.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
A19S	B. breve	A.S.	19.	+	+	+	+	V ⁺	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V ⁻	-	+	-	-	-
A26	B. breve	B.G.	26.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
A28	B. breve	B.G.	28.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
S2	B. breve	A.S.	7.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V ⁻	-	+	-	-	-
S3	B. breve	A.S.	14.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V ⁻	-	+	-	-	-
S4	B. breve	A.S.	18.	+	+	+	+	V ⁺	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
S5	B. breve	A.S.	24.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V ⁻	-	+	-	-	-
S6	B. breve	A.S.	28.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V ⁻	-	+	-	-	-
S8	B. breve	A.S.	38.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V ⁻	-	+	-	-	-
S9	B. breve	A.S.	44.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
S10	B. breve	A.S.	48.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-

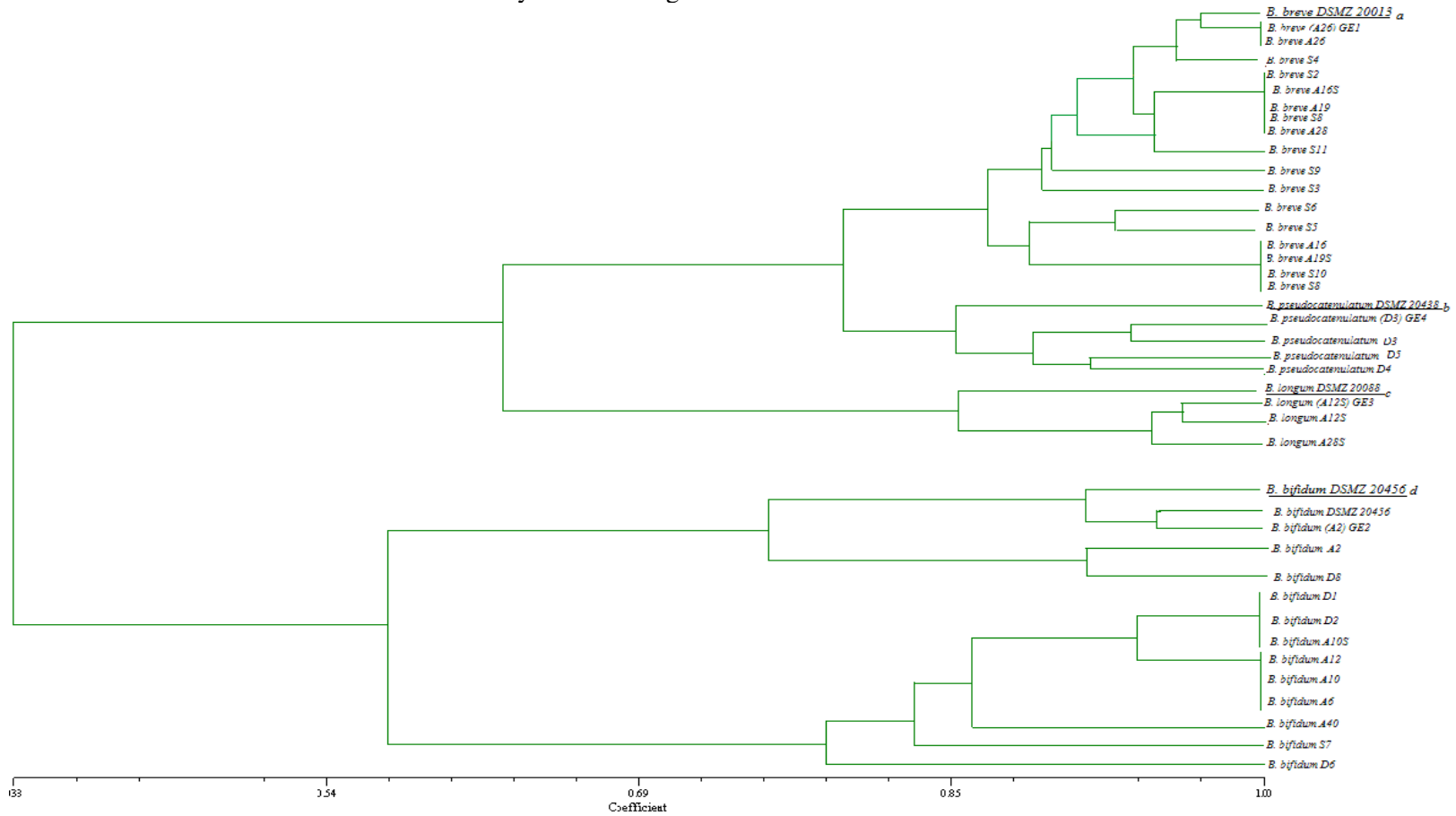
a, Doğumdan sonraki izolasyonu yapıldığı gün; v⁻; Değişken negatif, v⁺; Değişken pozitif ; A.S., Anne sütü; B.G.; Bebek geytası

Çizelge 4.1. (Devam) İzolatların fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçları

Suş Kodu	Tanımlanan Tür	Temin Edildiği Yer	İzolasyon Zamanı	Fizyolojik ve Biyokimyasal Testler																						
				Riboz	Laktoz	Salisin	Melibiyoz	Melizitoz	Ksiloz	Rafinoz	Sellobiyo	Maltoz	Fruktoz	Sorbitol	Glukoz	Galaktoz	Arabinoz	Mannoz	Trehaloz	Sükroz	Gram reaksiyon	Katalaz	Jelatin hidrolizi	Arjininde n	amonyak	Glukozda n gaz
S11	<i>B. breve</i>	A.S.	54.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSMZ 20456				-	+	-	+	✓	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	✓+	+	+	-	-	-	-	-
A2	<i>B. bifidum</i>	B.G.	2.	-	+	-	+	✓	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	✓	+	+	-	-	-	-	-
A6	<i>B. bifidum</i>	B.G.	6.	-	+	-	+	✓	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	✓	+	+	-	-	-	-	-
A10	<i>B. bifidum</i>	B.G.	10.	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
A10S	<i>B. bifidum</i>	A.S.	10.	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
A12	<i>B. bifidum</i>	B.G.	12.	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	✓	+	+	-	-	-	-	-
A40	<i>B. bifidum</i>	B.G.	40.	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
S7	<i>B. bifidum</i>	A.S.	34.	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	✓	+	+	-	-	-	-	-
D1	<i>B. bifidum</i>	B.G.	7.	-	+	-	+	✓	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	✓	+	+	-	-	-	-	-
D2	<i>B. bifidum</i>	B.G.	18.	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
D6	<i>B. bifidum</i>	B.G.	48.	-	+	-	+	✓	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
D8	<i>B. bifidum</i>	B.G.	54.	-	+	-	+	✓	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	✓	+	+	-	-	-	-	-
<i>B. pseudocatenulatum</i> DSMZ 20438				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	✓+	+	+	-	-	-	-	-
D3	<i>B. pseudocatenulatum</i>	B.G.	24.	+	+	✓	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
D4	<i>B. pseudocatenulatum</i>	B.G.	28.	+	+	✓	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	✓	+	+	-	-	-	-	-
D5	<i>B. pseudocatenulatum</i>	B.G.	38.	+	+	✓	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> DSMZ 20088				-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	✓+	+	+	-	-	-	-	-
A12S	<i>B. longum</i>	A.S.	12.	-	+	+	+	+	-	+	✓	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
A28S	<i>B. longum</i>	A.S.	28.	-	+	+	+	+	-	+	✓	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-

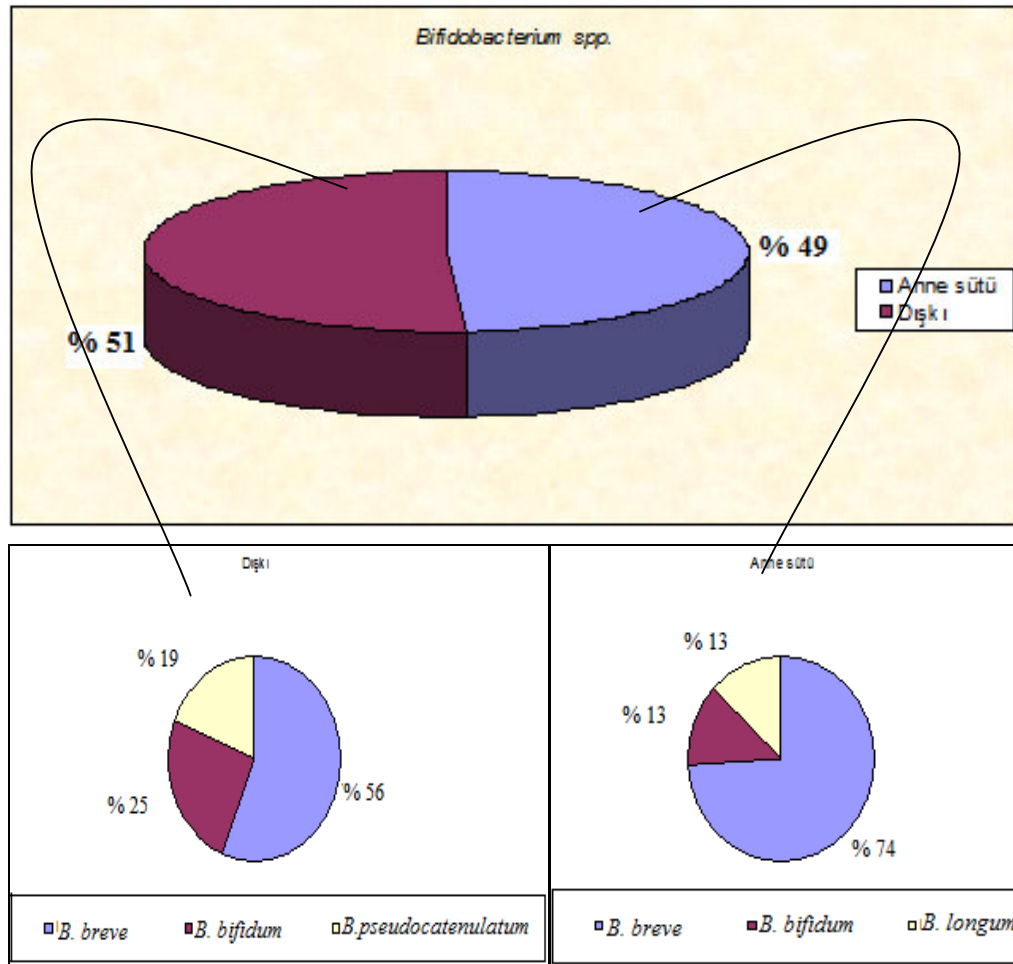
a, Doğumdan sonraki izolasyonu yapıldığı gün; v⁻; Değişken negatif, v⁺; Değişken pozitif ; A.S., Anne sütü; B.G.; Bebek gıdası

Şekil 4.1. İzolatların klasik metotlarla identifikasyonun dendrogramı



a; *B. breve* DSMZ 20013, b; *B. pseudocatenulatum* DSMZ 20438, c; *B. longum* DSMZ 20088, d; *B. bifidum* DSMZ 20456 test bakterileri

Anne sütünden ve anne sütü ile beslenen yeni doğan bebeklerin dışkılarından izole edilen *Bifidobacterium* izolatlarının yoğunluğu farklıdır. Toplam izolatların % 51' i dışkıdan olup, % 49' u anne sütünden elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4.1). Dışkıdan *B. bifidum* (% 56), *B. breve* (% 25) ve *B. pseudocatenulatum* (% 19) türleri izole edilmiştir (Bkz. Şekil 4.1.a). Anne sütünden *B. breve* (% 74), *B. bifidum* (% 13) ve *B. longum* (% 13) türleri izole edilmiştir (Bkz. Şekil 4.1.b). Anne sütü izolatları içerisinde *B. breve* dominant tür olarak belirlenirken, dışkı izolatlarında *B. bifidum* dominant tür olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Anne sütü ile beslenen yeni doğan bebeklerin dışkılarından (a) ve anne sütünden (b) izole edilen bifidobakterilerin teşhis edilen türlerinin % dağılımı

4.2. Bifidobakterilerin Asit Dirençliliği Sonuçları

Bifidobakteri suşlarının asit dirençliliği 3.2.4. kısmında anlatıldığı gibi yapılmıştır. Spektrofotometrik metoda göre belirlenen sonuçlar (OD₆₀₀) Çizelge 4.2' de verilmiştir. Tüm izolatlardan elde edilen verilere göre bifidobakterilerin mide asitliğine direnci oldukça zayıf bulunmuştur. Ortamdaki asitlik oranı arttıkça, bakterilerin yoğunluğunda düşme meydana gelmiştir. Suşların genelinde pH 3,5' da yoğunluğun düştüğü ve izolatlardan 9 adetinde ise gelişim gözlenmemiştir.

Genel olarak tüm izolatlara baktığımızda *B. breve*' ye ait olanların diğerlerine oranla daha dirençli olduğu *B. pseudocatenulatum*' a ait olanların ise oldukça duyarlı olduğu görülmektedir. Aside dirençliliği en iyi olan suş *B. breve* A28 olarak belirlenirken, bunun yanı sıra, *B. breve* S3 ve S4 suşlarının da aside olan direnci yüksek bulunmuştur. Aside dirençliliği en düşük olan bakteriler ise, *B. bifidum* A10, *B. breve* S9 ve S2 olarak belirlenirken, *B. breve* S5, S8, S10, S11, *B. bifidum* A10S, A12, D2, D8 ve *B. pseudocatenulatum* D5 suşlarında pH 3,5' de canlılık tespit edilememiştir.

4.3. Bifidobakterilerin Safra Toleransı Sonuçları

Bifidobakteri suşlarının safra toleransı 3.2.5. bölümünde anlatıldığı gibi belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.3' de verilmiştir. Tüm suşlardan elde edilen verilere göre *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin bağırsaklarda bulunan safraya olan toleransı, safra oranına göre değişmekte olup, % 0,15 oranındaki safranın bifidobakterilerin gelişimi artırdığı fakat safranın % 0,20; % 0,30 ve % 0,40 konsantrasyonlarında, artan konsantrasyona bağlı olarak tüm suşların gelişiminde düşme gözlenmiştir. Bifidobakteriler ortamda bulunan safrayı belirli bir seviyeye kadar tolere edebilmektedir. Tüm suşların gelişiminin % 0,15 oranındaki safranın varlığında stimüle olduğu görülmektedir. Ancak safra konsantrasyonu yükseldikçe ve özellikle % 0,40 oranındaki safranın varlığında tüm bifidobakterilerin yoğunluğunda azalma tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada, safraya toleransı en yüksek olan bifidobakteri izolatı *B. breve* A16 olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, *B. breve* A28, A19, *B.*

bifidum A2, A6, suşlarının da safraya olan toleransı yüksek bulunmuştur. Safraya toleransı en düşük olan suşlar ise, *B. breve* S3, S4 ve S8 olarak belirlenmiştir.

4.4. Bifidobakterilerin Ekzopolisakkarit (EPS) Üretim Kapasiteleri

Bifidobakterilerin EPS üretimi 3.2.6.' de anlatıldığı gibi belirlenmiş olup, tüm suşların EPS miktarları Çizelge 4.4' de gösterilmiştir. Yapılan çalışmada, tüm suşlarda EPS üretimi gözlenmiş, ancak suşlara bağlı olarak üretilen EPS miktarında farklılık olduğu belirlenmiştir. Bifidobakterilerin, EPS üretim miktarları 38,00 -97,64 mg/L arasında tespit edilmiştir. Suşlar arasında en yüksek EPS üretimi *B. breve* A28' de (97,64 mg/L) görülürken, en düşük EPS üretimi *B. bifidum* A10' da (38,00 mg/L) belirlenmiştir. Ayrıca, *B. breve* S4 (93,67 mg/L) ve *B. pseudocatenulatum* D5 (91,91 mg/L)' suşlarının da yüksek EPS üretim kapasitesine sahip oldukları tespit edilmiştir. Daha önce yapılan asit direnci ve safra toleransı çalışmalarında da, *B. breve* A28 suşunun, diğer suşlara göre aside daha dirençli ve safraya daha toleranslı olduğu bulunmuştur. Bu suşun EPS üretim kapasitesinin de diğerlerine göre yüksek olması *B. breve* A28' in probiyotik çalışmalarında avantajlı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, tüm bifidobakterilerin EPS üretim kapasiteleri ile asit direnci ve safra toleransları arasında bir ilişki olup olmadığının belirlenmesi amacıyla istatistiksel analizler yapılmıştır. Yapılan analizlerde, suşların EPS üretimleri ile asit direnci ve safra toleransı arasında anlamlı ve pozitif bir ilişki bulunmuştur ($p < 0.05$).

Çizelge 4.2. Bifidobakterilerin asit dirençliliği sonuçları

Suşlar	pH ^{a*}				
	Kontrol (6,2) ^b	5,0	4,5	4,0	3,5
<i>B. breve</i> A16	2,42±0,03	2,30±0,02	1,32±0,01	0,56±0,03	0,12±0,01
<i>B. breve</i> A16S	2,10±0,01	2,03±0,04	1,66±0,01	0,79±0,02	0,43±0,02
<i>B. breve</i> A19	2,55±0,02	2,56±0,01	2,01±0,03	0,49±0,01	0,17±0,02
<i>B. breve</i> A19S	2,66±0,01	2,13±0,03	2,09±0,02	0,95±0,02	0,55±0,03
<i>B. breve</i> A26	2,11±0,03	2,07±0,01	1,33±0,01	0,25±0,02	0,12±0,02
<i>B. breve</i> A28	2,18±0,01	1,92±0,03	1,89±0,03	1,61±0,01	0,98±0,01
<i>B. breve</i> S2	2,11±0,01	2,38±0,03	1,74±0,01	0,12±0,02	0,02±0,02
<i>B. breve</i> S3	2,01±0,02	2,01±0,02	1,42±0,02	1,10±0,02	0,74±0,02
<i>B. breve</i> S4	2,04±0,02	2,04±0,04	1,36±0,02	1,47±0,03	0,77±0,01
<i>B. breve</i> S5	1,30±0,01	1,15±0,03	0,73±0,02	0,03±0,01	-
<i>B. breve</i> S6	2,11±0,03	2,11±0,01	1,81±0,02	1,62±0,01	0,53±0,01
<i>B. breve</i> S8	1,11±0,01	1,17±0,02	0,78±0,03	0,08±0,01	-
<i>B. breve</i> S9	1,60±0,03	1,11±0,02	0,84±0,02	0,34±0,03	0,12±0,01
<i>B. breve</i> S10	2,11±0,04	2,01±0,03	1,57±0,02	0,13±0,01	-
<i>B. breve</i> S11	0,86±0,02	1,11±0,02	0,71±0,03	0,29±0,01	-
<i>B. bifidum</i> A2	2,14±0,03	2,14±0,02	1,57±0,03	0,86±0,04	0,23±0,00
<i>B. bifidum</i> A6	2,71±0,02	2,71±0,01	1,73±0,04	0,49±0,03	0,19±0,01
<i>B. bifidum</i> A10	2,24±0,02	1,94±0,03	0,51±0,01	0,46±0,02	0,11±0,00
<i>B. bifidum</i> A10S	1,46±0,04	1,04±0,02	0,65±0,03	0,25±0,01	-
<i>B. bifidum</i> A12	2,68±0,02	1,76±0,02	1,19±0,01	0,15±0,03	-
<i>B. bifidum</i> A40	2,02±0,03	2,02±0,02	1,72±0,03	1,21±0,01	0,24±0,01
<i>B. bifidum</i> S7	2,18±0,02	2,18±0,02	2,01±0,01	1,29±0,01	0,42±0,01
<i>B. bifidum</i> D1	2,27±0,02	2,44±0,01	1,31±0,04	0,58±0,02	0,18±0,02
<i>B. bifidum</i> D2	1,28±0,03	1,38±0,04	1,03±0,02	0,14±0,01	-
<i>B. bifidum</i> D6	1,56±0,03	1,74±0,01	1,41±0,04	0,32±0,01	0,12±0,01
<i>B. bifidum</i> D8	2,15±0,03	2,81±0,01	1,13±0,02	0,55±0,02	-
<i>B. pseudocatenulatum</i> D3	2,35±0,04	2,91±0,01	2,06±0,01	0,32±0,02	0,12±0,01
<i>B. pseudocatenulatum</i> D4	2,32±0,02	2,04±0,02	1,55±0,03	0,43±0,01	0,13±0,00
<i>B. pseudocatenulatum</i> D5	2,36±0,01	2,79±0,02	2,03±0,01	0,55±0,03	-
<i>B. longum</i> A12S	2,73±0,01	2,59±0,03	1,24±0,01	0,41±0,01	0,11±0,01
<i>B. longum</i> A28S	2,62±0,02	2,62±0,04	2,17±0,02	1,32±0,02	0,56±0,01

(a) Spektrofotometrede 600nm' de belirlenen optik yoğunluklar

(b) Kontrol pH; Çalışmada kullanılan besiyerinin pH'ıdır

(*) Sonuçlar üç farklı paralelin ortalamasıdır.

(-) Üreme yoktur.

Çizelge 4.3. Bifidobakterilerin safra toleransı sonuçları

Suşlar	Safra konsantrasyonu (%) ^{a*}				
	Kontrol ^b	0,15	0,20	0,30	0,40
<i>B. breve</i> A16	2,43±0,04	2,51±0,05	2,19±0,07	1,96±0,02	1,54±0,02
<i>B. breve</i> A16S	1,70±0,02	1,93±0,07	1,63±0,04	1,52±0,04	1,04±0,02
<i>B. breve</i> A19	1,68±0,01	2,11±0,07	2,03±0,04	1,62±0,02	1,38±0,02
<i>B. breve</i> A19S	2,60±0,04	1,65±0,05	1,47±0,02	1,40±0,03	1,07±0,04
<i>B. breve</i> A26	1,55±0,02	1,65±0,02	1,15±0,05	1,08±0,02	0,53±0,01
<i>B. breve</i> A28	2,02±0,04	2,50±0,01	1,78±0,05	1,63±0,04	1,43±0,01
<i>B. breve</i> S2	1,26±0,02	1,34±0,04	1,21±0,02	1,02±0,01	0,76±0,04
<i>B. breve</i> S3	1,90±0,02	1,50±0,02	1,41±0,03	1,08±0,02	0,27±0,02
<i>B. breve</i> S4	1,67±0,04	0,96±0,01	0,75±0,01	0,63±0,03	0,32±0,04
<i>B. breve</i> S5	2,92±0,02	1,97±0,03	1,75±0,02	0,68±0,04	0,36±0,05
<i>B. breve</i> S6	1,41±0,01	1,54±0,01	0,79±0,05	0,64±0,06	0,54±0,04
<i>B. breve</i> S8	1,41±0,02	0,71±0,05	0,51±0,05	0,51±0,03	0,32±0,01
<i>B. breve</i> S9	1,62±0,02	0,79±0,03	0,69±0,01	0,65±0,02	0,36±0,01
<i>B. breve</i> S10	1,12±0,03	1,01±0,02	0,83±0,01	0,74±0,02	0,56±0,03
<i>B. breve</i> S11	1,50±0,01	0,54±0,02	0,48±0,04	0,44±0,02	0,37±0,01
<i>B. bifidum</i> A2	2,48±0,01	2,77±0,05	2,40±0,04	2,01±0,05	1,34±0,01
<i>B. bifidum</i> A6	2,00±0,02	2,14±0,01	1,68±0,07	1,32±0,01	1,35±0,01
<i>B. bifidum</i> A10	2,94±0,04	2,39±0,04	2,03±0,07	1,77±0,07	1,02±0,04
<i>B. bifidum</i> A10S	1,38±0,01	2,21±0,07	1,75±0,01	1,40±0,08	1,29±0,01
<i>B. bifidum</i> A12	1,85±0,02	1,82±0,07	1,44±0,06	1,08±0,04	0,88±0,03
<i>B. bifidum</i> A40	1,30±0,01	1,47±0,05	1,28±0,02	1,06±0,05	0,92±0,04
<i>B. bifidum</i> S7	1,06±0,03	0,53±0,04	0,53±0,04	0,56±0,05	0,46±0,02
<i>B. bifidum</i> D1	1,76±0,02	1,72±0,01	1,59±0,02	1,12±0,04	0,91±0,02
<i>B. bifidum</i> D2	1,88±0,04	1,82±0,02	1,63±0,03	1,22±0,02	1,01±0,04
<i>B. bifidum</i> D6	1,24±0,03	1,32±0,03	1,01±0,04	0,72±0,02	0,56±0,01
<i>B. bifidum</i> D8	1,78±0,02	1,84±0,04	1,73±0,01	1,49±0,02	1,11±0,02
<i>B. pseudocatenulatum</i> D3	1,91±0,02	1,74±0,01	1,53±0,03	1,21±0,02	0,94±0,02
<i>B. pseudocatenulatum</i> D4	1,56±0,02	1,31±0,01	1,03±0,04	0,68±0,02	0,38±0,04
<i>B. pseudocatenulatum</i> D5	2,21±0,01	2,06±0,02	1,56±0,02	1,47±0,03	1,27±0,02
<i>B. longum</i> A12S	1,80±0,01	2,03±0,05	1,95±0,06	1,98±0,04	1,28±0,03
<i>B. longum</i> A28S	1,78±0,02	1,86±0,03	1,60±0,02	1,31±0,03	1,04±0,01

(a) Spektrofotometrede 600nm' de belirlenen optik yoğunlukları

(b) Kontrol; Besiyerindeki gelişme durumu (Safra içermemektedir)

(*) Sonuçlar üç farklı paralelin ortalamasıdır.

Çizelge 4.4. Bifidobakterilerin ekzopolisakkarit (EPS) üretim kapasiteleri

Suşlar	EPS üretim miktarı (mg/L)	Suşlar	EPS üretim miktarı (mg/L)
<i>B. breve</i> A16	56,61±0,01	<i>B. bifidum</i> A2	81,32±0,03
<i>B. breve</i> A16S	77,64±0,02	<i>B. bifidum</i> A6	60,73±0,05
<i>B. breve</i> A19	40,00±0,02	<i>B. bifidum</i> A10	38,00±0,01
<i>B. breve</i> A19S	87,05±0,02	<i>B. bifidum</i> A10S	65,29±0,02
<i>B. breve</i> A26	51,32±0,01	<i>B. bifidum</i> A12	55,00±0,06
<i>B. breve</i> A28	97,64±0,01	<i>B. bifidum</i> A40	86,50±0,03
<i>B. breve</i> S2	82,21±0,02	<i>B. bifidum</i> S7	51,61±0,06
<i>B. breve</i> S3	82,35±0,06	<i>B. bifidum</i> D1	74,86±0,05
<i>B. breve</i> S4	93,67±0,05	<i>B. bifidum</i> D2	85,73±0,04
<i>B. breve</i> S5	44,55±0,04	<i>B. bifidum</i> D6	69,55±0,01
<i>B. breve</i> S6	51,32±0,04	<i>B. bifidum</i> D8	89,55±0,02
<i>B. breve</i> S8	66,76±0,04		
<i>B. breve</i> S9	39,85±0,02	<i>B. pseudocatenulatum</i> D3	83,38±0,02
<i>B. breve</i> S10	51,91±0,02	<i>B. pseudocatenulatum</i> D4	70,73±0,04
<i>B. breve</i> S11	66,03±0,04	<i>B. pseudocatenulatum</i> D5	91,91±0,01
<i>B. longum</i> A12S	58,00±0,04		
<i>B. longum</i> A28S	58,67±0,02		

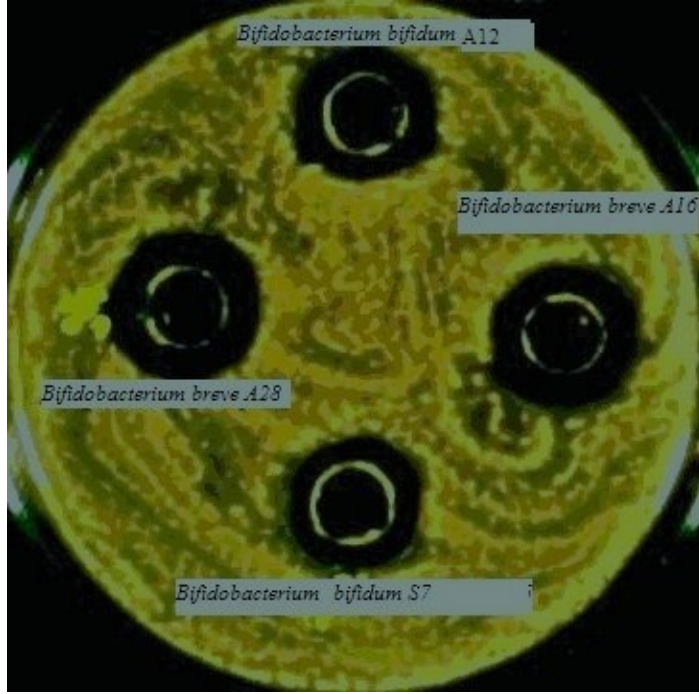
4.5. Bifidobakterilerin *E. coli* ATCC 11229 Üzerindeki İnhibisyon Etkisi Sonuçları

Probiyotik olarak kullanımı araştırılan mikroorganizmaların sahip olması gereken en önemli özelliklerden biri de patojen mikroorganizmaları inhibe edebilmesidir. Bu nedenle çalışmada izole ettiğimiz *Bifidobacterium* izolatlarının önemli bir bağırsak patojeni olarak bilinen *E. coli* üzerindeki inhibisyon etkileri belirlenmiştir. Bifidobakterilerin genel inhibisyon sonuçları Çizelge 4.5.' de verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde; hemen hemen tüm izolatların inhibisyon etkisi birbirine yakın olarak bulunmuştur. *B. breve* A16 (9±1 mm), A28 (9±1 mm), S2 (9±1 mm), S6 (9±1 mm), S9 (9±2 mm), *B. bifidum* A10S (9±1 mm), A12 (9±1 mm), S7 (9±1 mm) *B.*

longum A12S (9±1 mm) suşları yüksek inhibisyon etkisine sahip iken, *B. breve* S10 ve *B. pseudocatenulatum* D5 suşlarında ise inhibisyon (-) tespit edilememiştir.

Çizelge 4.5. Bifidobakterilerin *E. coli* ATCC 11229 üzerindeki inhibisyon etkisi

Suşlar	Zon çapı (mm)	Suşlar	Zon çapı (mm)
<i>B. breve</i> A16	9±1	<i>B. bifidum</i> A2	8±2
<i>B. breve</i> A16S	7±1	<i>B. bifidum</i> A6	8±1
<i>B. breve</i> A19	8±1	<i>B. bifidum</i> A10	7±1
<i>B. breve</i> A19S	6±1	<i>B. bifidum</i> A10S	9±1
<i>B. breve</i> A26	8±1	<i>B. bifidum</i> A12	9±1
<i>B. breve</i> A28	9±1	<i>B. bifidum</i> A40	8±1
<i>B. breve</i> S2	9±1	<i>B. bifidum</i> S7	9±1
<i>B. breve</i> S3	8±0	<i>B. bifidum</i> D1	8±1
<i>B. breve</i> S4	7±0	<i>B. bifidum</i> D2	6±0
<i>B. breve</i> S5	8±1	<i>B. bifidum</i> D6	6±1
<i>B. breve</i> S6	9±1	<i>B. bifidum</i> D8	6±1
<i>B. breve</i> S8	7±1		
<i>B. breve</i> S9	9±2	<i>B. pseudocatenulatum</i> D3	8±0
<i>B. breve</i> S10	-	<i>B. pseudocatenulatum</i> D4	5±1
<i>B. breve</i> S11	8±1	<i>B. pseudocatenulatum</i> D5	-
<i>B. longum</i> A12S	9±1		
<i>B. longum</i> A28S	7±1		



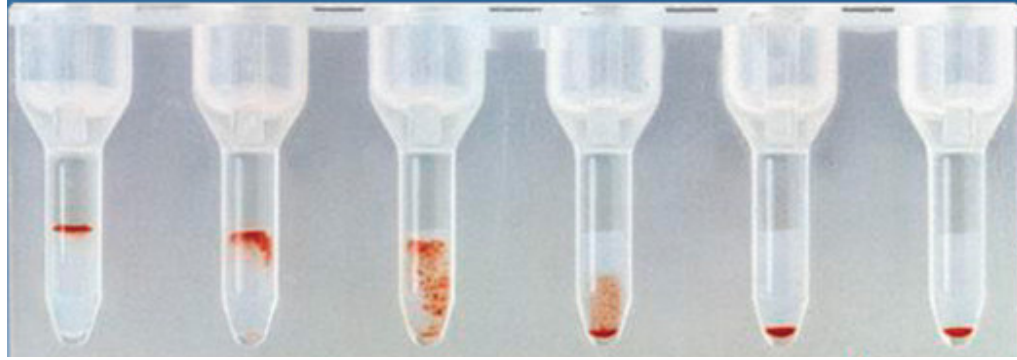
Resim 4.3. Bazı bifidobakterilerin *E. coli* ATCC 11229 üzerindeki inhibisyon zonları

4.6. Bifidobakterilerin Tutunma Testlerinin Sonuçları

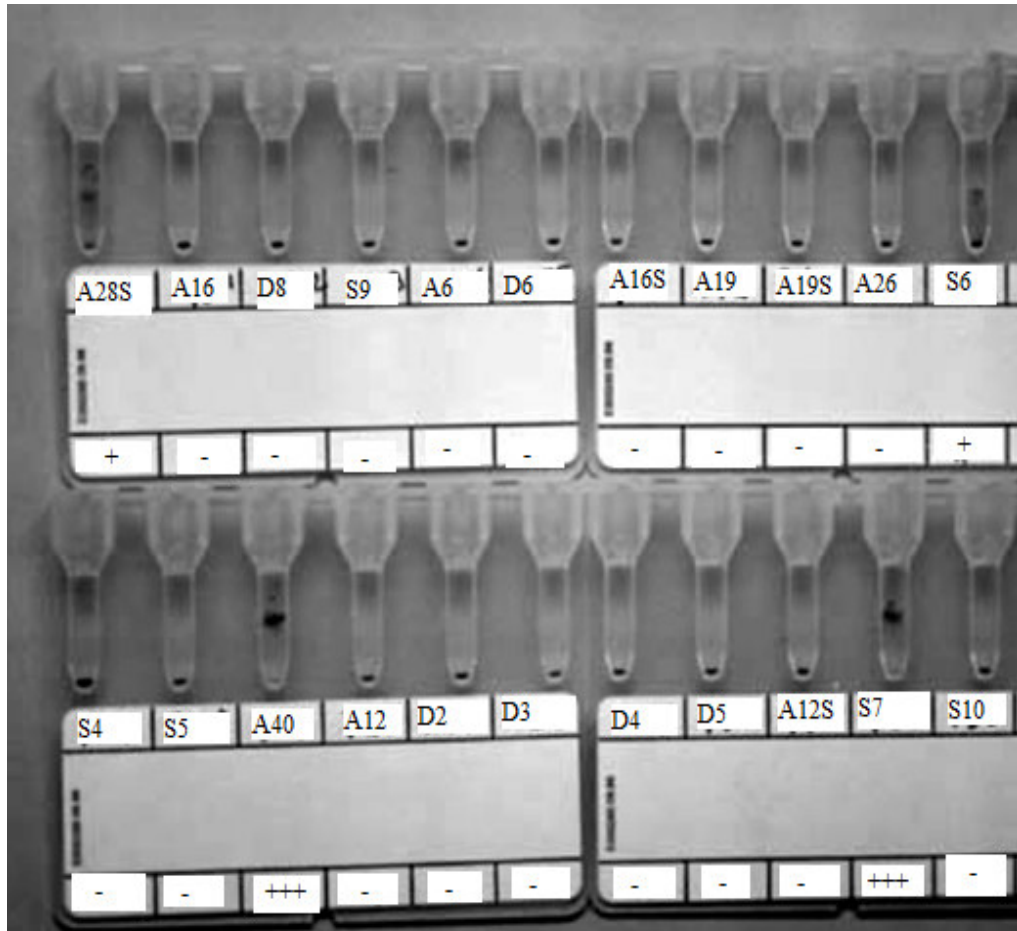
4.6.1. Hemagglütinasyon (HA) Sonuçları

Bifidobakterilerin hemagglütinasyon testi materyal metot kısmında anlatıldığı gibi yapılmıştır. Suşların hemagglütinasyon oranı, HA yeteneği yüksek olanlar +++, orta olanlar ++, düşük olanlar + ve hemagglütinasyon göstermeyenler ise – (negatif) olmak üzere değerlendirilmiştir (Bkz. Resim 4.4). Değerlendirme sonucunda *B. breve* A28 (+++), *B. breve* S3 (+++), *B. bifidum* A40 (+++), *B. bifidum* S7 (+++) ve *B. bifidum* D1 (+++) yüksek HA gösteren suşlar olarak belirlenmiştir. İzolatlardan 21 adedinde ise hemagglütinasyon kabiliyeti belirlenmemiştir (Bkz. Çizelge 4.6). Hemagglütinasyon kabiliyeti yüksek bulunan *B. breve* A28, S3, *B. bifidum* A40 ve D1 suşlarının tutunmada önemli rol oynadığı düşünülen EPS üretim kabiliyeti de oldukça yüksek bulunmuştur. *Bifidobacterium* spp.'lerin hemagglütinasyon kabiliyeti ile EPS üretim kapasiteleri arasında bir ilişki olduğu dikkati çekmiştir. Bu durum istatistiksel analiz

sonucu ile de doğrulanmış olup, aralarında pozitif bir korelasyon ($p<0.05$) belirlenmiştir.



A28 (+++) S3 (+++) A10S (++) A2 (+) S2 (-) A10 (-)



Resim 4.4. Bifidobakterilerin hemaglutinasyon sonuçları (+++ : Yüksek HA; ++: Orta HA; +: Düşük HA; -: Negatif HA)

Çizelge 4.6. Bifidobakterilerin hemaglutinasyon testi sonuçları

Suşlar	HA	Suşlar	HA
<i>B. breve</i> A16	-	<i>B. bifidum</i> A2	-
<i>B. breve</i> A16S	-	<i>B. bifidum</i> A6	-
<i>B. breve</i> A19	-	<i>B. bifidum</i> A10	-
<i>B. breve</i> A19S	-	<i>B. bifidum</i> A10S	++
<i>B. breve</i> A26	-	<i>B. bifidum</i> A12	-
<i>B. breve</i> A28	+++	<i>B. bifidum</i> A40	+++
<i>B. breve</i> S2	-	<i>B. bifidum</i> S7	+++
<i>B. breve</i> S3	+++	<i>B. bifidum</i> D1	+++
<i>B. breve</i> S4	-	<i>B. bifidum</i> D2	-
<i>B. breve</i> S5	-	<i>B. bifidum</i> D6	-
<i>B. breve</i> S6	+	<i>B. bifidum</i> D8	-
<i>B. breve</i> S8	+		
<i>B. breve</i> S9	-	<i>B. pseudocatenulatum</i> D3	-
<i>B. breve</i> S10	-	<i>B. pseudocatenulatum</i> D4	-
<i>B. breve</i> S11	+	<i>B. pseudocatenulatum</i> D5	-
<i>B. longum</i> A12S	-		
<i>B. longum</i> A28S	+		

+++ , Yüksek HA; ++: Orta HA; +: Düşük HA; -: Negatif HA

4.6.2. Bifidobakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunması

Bu çalışmada, daha önceki kısımlarda anlatılan tüm çalışmaların sonuçları incelendiğinde asit direnci, safra toleransı, EPS üretim kapasitesi ve hemaglutinasyon yeteneği en yüksek ve en düşük olarak belirlenen suşlar arasından seçilen *B. breve* A28 ve *B. bifidum* A10 suşları kullanılmıştır. Ayrıca en çok karşılaşılan bir bağırsak patojeni olan *E. coli* ATCC 11229 suşu da bu çalışmaya dâhil edilmiştir. Kullanılan suşların epitel yüzeye tutunma indeksleri, bakteriler herhangi bir çevre faktörüne maruz bırakılmadan materyal metot kısmında anlatıldığı gibi belirlenmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre, bağırsak patojeni olan *E. coli* ATCC 11229' un tutunma indeksinin (300< bakteri/hücre) yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır. Bununla

birlikte, probiyotik kullanım açısından üstün nitelikli olarak belirlenen *B. breve* A28 suşunun da tutunma indeksinin ($300 <$ bakteri/hücre), *E. coli* ATCC 11229' un indeksine benzer olduğu tespit edilmiştir. *B. bifidum* A10 suşunun tutunma indeksine bakıldığında ise, taşıdığı probiyotik özelliklere paralel olarak zayıf bir tutunma indeksine (19 bakteri/hücre) sahip olduğu gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.7). Bakterilerin EPS üretim kapasiteleri ve epitel yüzeye tutunma indeksleri arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla yapılan istatistiksel analizde bu iki parametre arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.6.3. *B. breve* A28, *B. bifidum* A10 ve *E. coli* ATCC 11229 suşlarının epitel yüzeye tutunmada rekabeti

Bu çalışmada, *E. coli* ATCC 11229 suşu ile *B. breve* A28 ve *B. bifidum* A10 suşlarının epitel yüzeye tutunmadaki rekabeti belirlenmiştir. Her iki bifidobakteri suşunun da ayrı ayrı *E. coli* ATCC 11229 ile rekabeti sonrasında tutunma indeksleri incelenmiştir. *B. breve* A28 suşunun, *E. coli* ATCC 11229 ile rekabeti sonucunda, *E. coli* ATCC 11229' un birliktelikteki tutunma indeksinin (48 bakteri/ hücre) tek başına tutunma indeksine ($300 <$ bakteri/hücre) göre azaldığı belirlenmiştir. *B. breve* A28' in ise tutunma indeksinin de azaldığı (41 bakteri/ hücre) görülmekle birlikte, hemen hemen *E. coli*' nin tutunma indeksine yakın olduğu gözlenmiştir. *B. bifidum* A10 suşunun, *E. coli* ile rekabetine bakıldığında ise *E. coli* ATCC 11229' un tutunma indeksinin (105 bakteri/ hücre) çok fazla azalmadığı, buna karşın *B. bifidum* A10' nun tutunma indeksinin (8 bakteri/ hücre) yine minimum seviyede olduğu belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. *B. breve* A28, *B. bifidum* A10 ve *E. coli* ATCC 11229 suşlarının Caco-2 hücrelerine tutunma indeksi ve rekabeti (bakteri/hücre)

Tutunma İndeksi*(bakteri/hücre)						
Kontrol			Rekabet			
11229	A28	A10	11229	A28	11229	A10
300<	300<	19	48	41	105	8

* 50 farklı alanda 100 hücreye tutunan bakteri sayısı

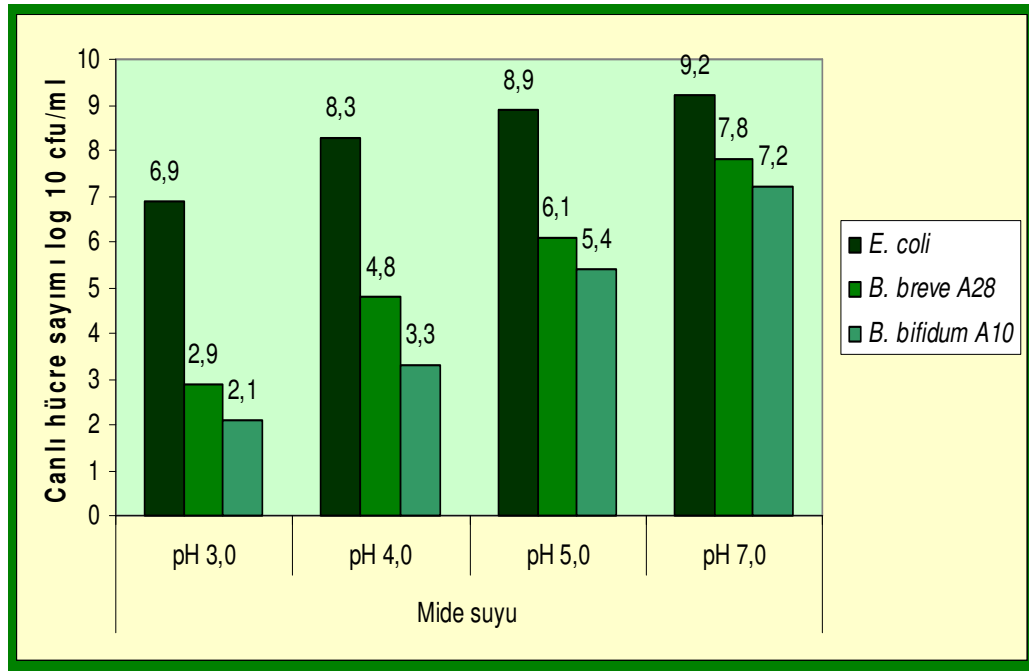
4.6.4. Bifidobakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunmasında mide suyu ve mide suyu ile birlikte bağırsak sıvısının etkisi

Oral yolla bağırsaklara ulaşması planlanan suşlar, öncelikle midenin asidik ortamına maruz kaldığı için, farklı pH' larda (pH 3,0; 4,0; 5,0 ve 7,0) hazırlanan yapay mide suları ile muamele edilmiştir. Daha sonra da suşlar, bağırsak sıvısı ile karşılaşacağından yapay mide suyuna ilaveten bağırsak sıvısına da maruz bırakılmıştır. Suşların canlılıkları materyal metot kısmında anlatıldığı gibi sisteinli-MRS katı besiyerine ekimleri yapılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9' de verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, *E. coli* ATCC 11229 ve *B. breve* A28 suşlarının mide suyuna direnç gösterebildiği tespit edilmiştir. *E. coli* ATCC 11229 ile yapılan tüm pH denemelerinde en iyi sonuçlar alınmıştır (pH 7,0- 9,2 log₁₀ CFU/ml; pH 5,0- 8,9 log₁₀ CFU/ml; pH 4,0- 8,3 log₁₀ CFU/ml; pH 3,0- 6,9 log₁₀ CFU/ml). Probiyotik açıdan araştırılan özellikler bakımından en iyi olarak belirlenen *B. breve* A28' in canlılığı, *E. coli* ATCC 11229' a göre düşük olsa bile taşıdığı probiyotik özellikler bakımından zayıf olduğu düşünülen *B. bifidum* A10' a göre çok daha iyi bir dirençliliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Mide pH' sına en yakın olan pH 3,0' de *B. breve* A28' de canlılık görülürken (pH 3,0; 2,0 log₁₀ CFU/ml), *B. bifidum* A10' da canlılık tespit edilememiştir.

Mide suyu ve mide suyu ile birlikte bağırsak sıvısının, *B. breve* A28, *B. bifidum* A10 ve *E. coli* ATCC 11229 suşlarının canlılığına etkisinden sonra bu sıvıların, suşların epitel yüzeye tutunmasını ne derece etkilediği belirlenmiştir. Bu nedenle, mide suyu ve mide suyu ile birlikte bağırsak sıvısı ile muamele edilen suşlar Caco-2 hücrelerinin geliştirildiği besiyerine inoküle edilerek tutunma indeksleri belirlenmiştir. Her iki bifidobakteri suşunun da düşük pH' da canlılığı gibi epitel yüzeye tutunma indeksi de önemli ölçüde etkilenirken, mide suyundaki pH değişimine bağlı olarak tüm tutunma indekslerinde de değişim gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.10). Mide suyunun kullanılan dört farklı pH' sında da *B. breve* A28 suşunun, *B. bifidum* A10 suşuna göre canlılığı gibi tutunma indeksinin de daha iyi olduğu tespit edilirken, *E. coli* ATCC 11229' un canlılığının ve tutunma indeksinin bifidobakteri suşlarına göre daha iyi olduğu görülmüştür. Hem bifidobakterilerin

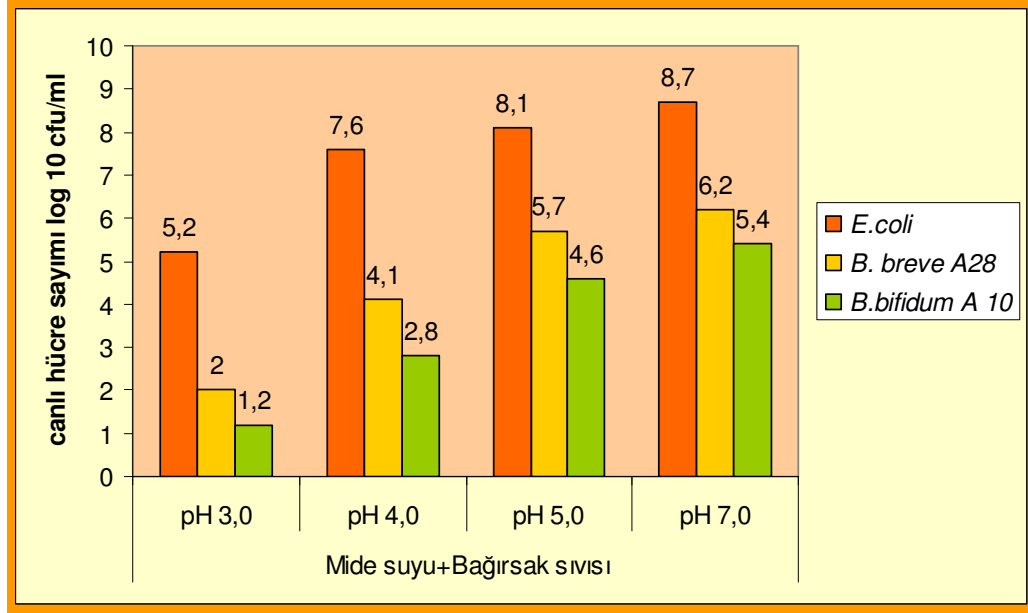
hem de ATCC 11229' un tutunma indekslerinin, mide suyunun pH 7,0' den pH 3,0' e kadar artan asitliğine paralel olarak azaldığı görülürken, ortama bir de bağırsak sıvısının eklenmesiyle de tutunma indekslerinde canlılıklarda olduğu gibi daha fazla azalma meydana gelmiştir (Bkz. Çizelge 4.11). Bununla birlikte, suşlar tek tek incelendiğinde, asit direnci, safra toleransı, ekzopolisakkarit (EPS) üretim kapasitesi ve hemagglütinasyon kabiliyeti yüksek olan *B. breve* A28 suşunun epitele tutunma indeksinin de yüksek olduğu belirlenirken, sayılan tüm bu özellikler açısından zayıf olan *B. bifidum* A10 suşunun epitele tutunma indeksinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, *E. coli* ATCC 11229 suşunun canlılığının bifidobakterilere göre oldukça iyi olmasına rağmen, artan asitlik ve bağırsak sıvısının varlığında *E. coli*' nin de epitele tutunma indeksinin etkilendiği görülmektedir.

Çizelge 4.8. Mide suyunda inkübe edilen *B. breve* A28, *B. bifidum* A10 ve *E. coli* ATCC 11229' un canlı hücre sayımı ($\log_{10}$ CFU/ml)



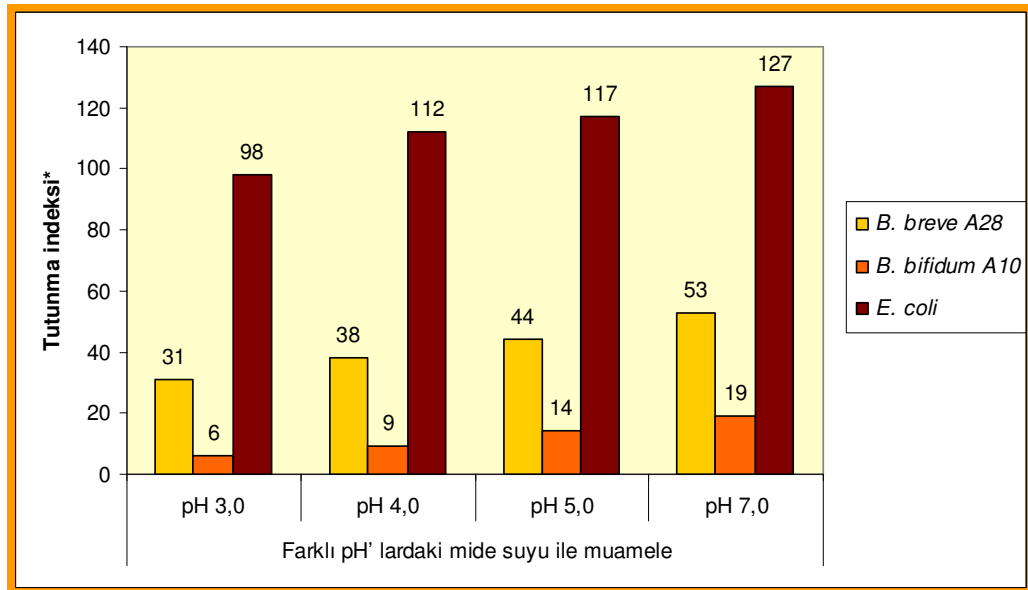
Mide suyu (pH: 3,0; 4,0; 5,0; 7,0)

Çizelge 4.9. Mide suyu ve ardından bağırsak sıvısında inkübe edilen *B. breve* A28, *B. bifidum* A10 ve *E. coli* ATCC 11229' un canlı hücre sayımı ($\log_{10}$ CFU/ml)



Mide suyu (pH: 3,0; 4,0; 5,0; 7,0) + Bağırsak sıvısı (pH: 7,0)

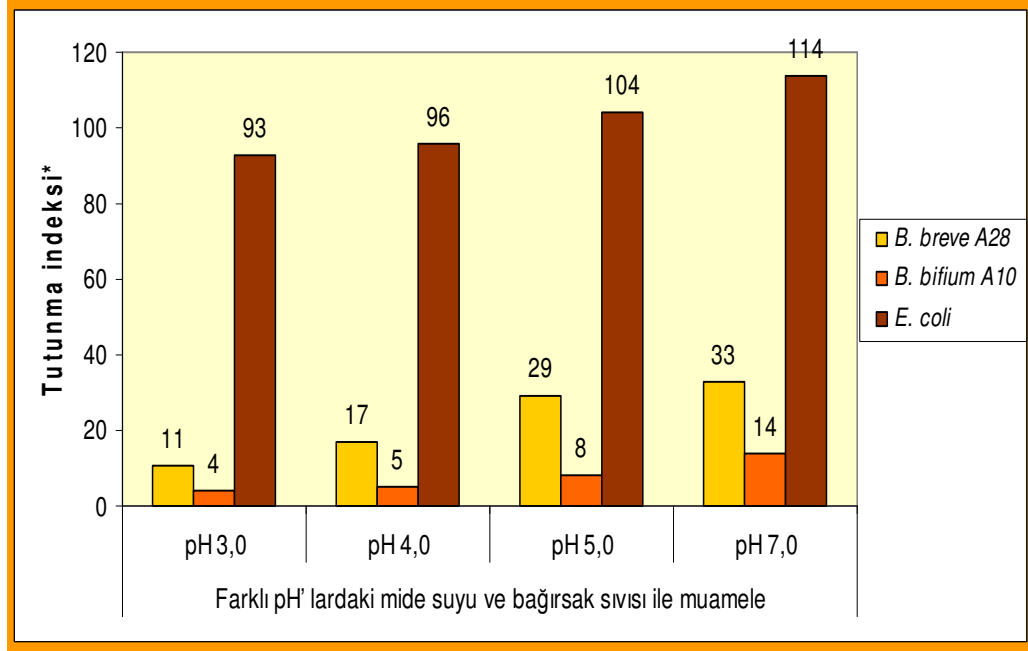
Çizelge 4.10. Mide suyu ile muamele edildikten sonra *B. breve* A28, *B. bifidum* A10 ve *E. coli* ATCC 11229' un Caco-2 hücrelerine tutunma indeksi (bakteri/ hücre)



Mide suyu (pH: 3,0; 4,0; 5,0; 7,0) + Bağırsak sıvısı (pH: 7,0)

*50 farklı alanda 100 hücre üzerindeki bakteri sayısı

Çizelge 4.11. Mide suyu ve bağırsak sıvısı ile muamele edildikten sonra Caco-2 hücreleri ile inkübe edilen *B. breve* A28, *B. bifidum* A10 suşlarının ve *E. coli* ATCC 11229' un tutunma indeksi

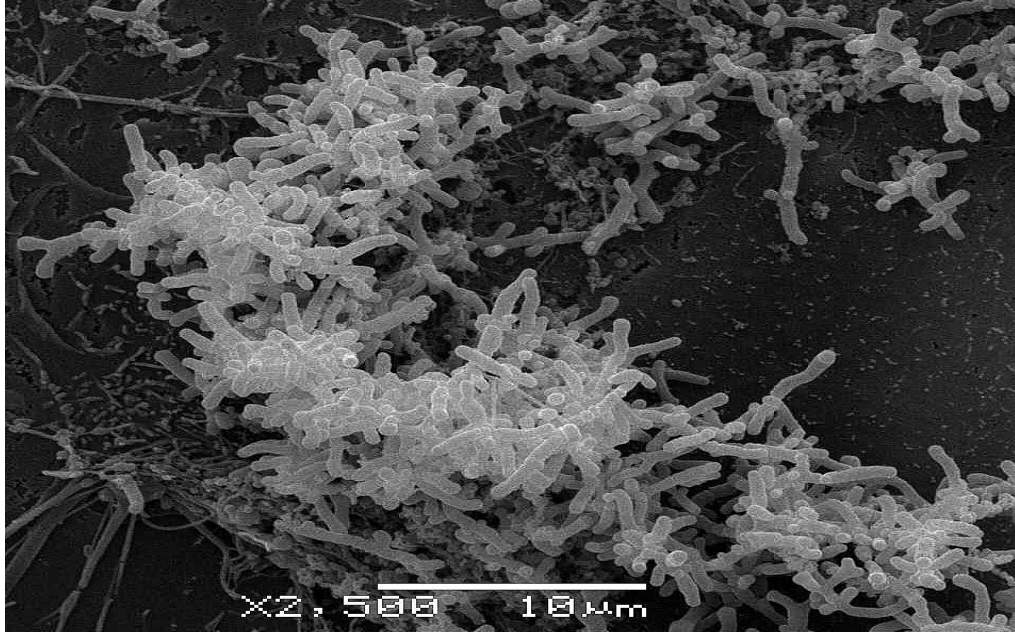


Mide suyu (pH; 3,0; 4,0; 5,0; 7,0) + Bağırsak sıvısı (pH; 7,0)

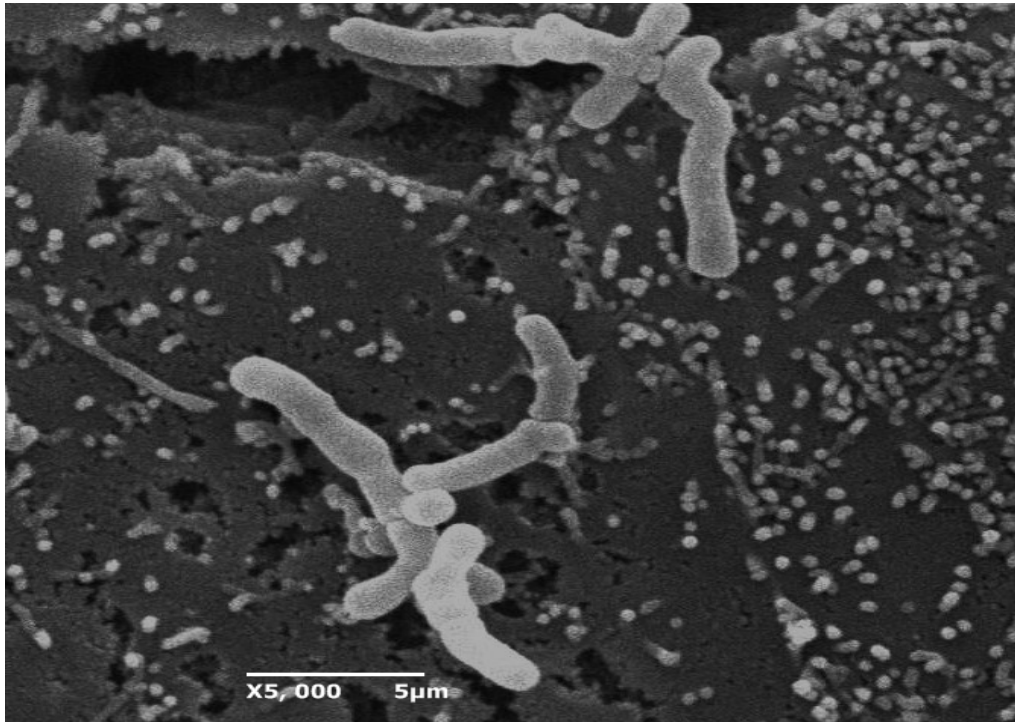
*50 farklı alanda 100 hücre üzerindeki bakteri sayısı

Taramalı elektron mikroskopu görüntüleri

Epitel yüzeye tutunmanın belirlenmesi amacıyla elektron mikroskopu ile hücre yüzeyine tutunan bakteriler görüntülenmiştir. Elde edilen görüntülerde probiyotik özellikler açısından avantajlı olan *B. breve* A28' in tutunma kapasitesinin *B. bifidum* A10' a göre daha iyi olduğu belirlenmiştir (Bkz. Resim 4.5, Resim 4.6).



Resim 4.4. EPS üretimi yüksek olan *B. breve* A28 suşunun Caco-2 hücrelerine tutunmasının taramalı elektron mikroskobu görüntüleri



Resim 4.5. EPS üretimi düşük olan *B. bifidum* A10 suşunun Caco-2 hücrelerine tutunmasının taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

4.7. Prebiyotik Uygulamalarının Sonuçları

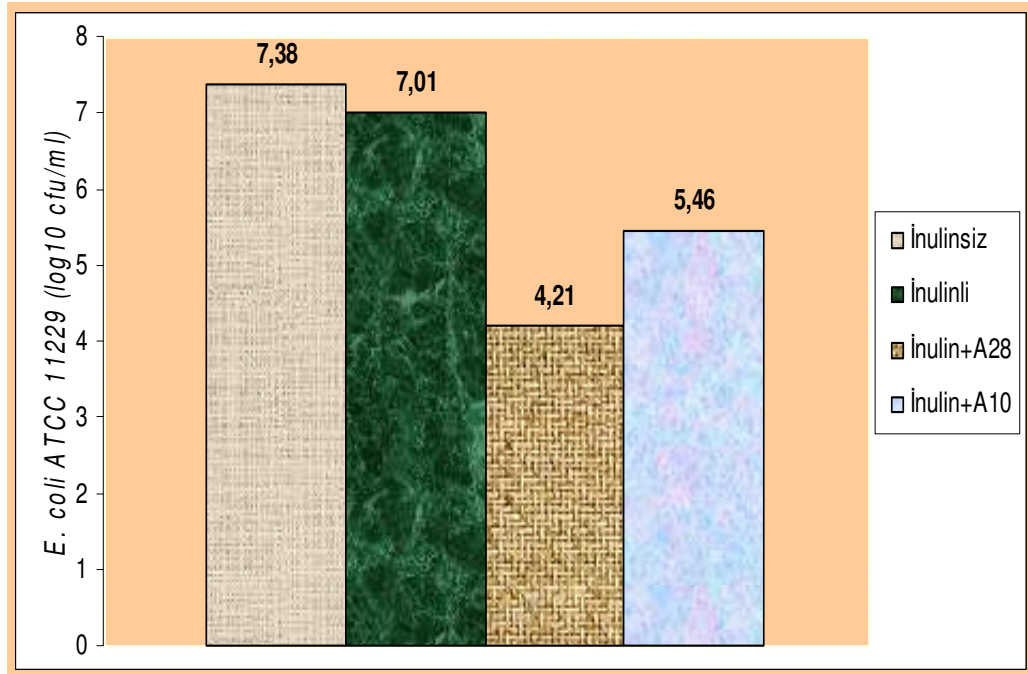
Prebiyotiklerin bifidobakteriler üzerindeki etkisi materyal metodun prebiyotik uygulamaları kısmında anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan bakteriler yukarıda anlatılan çalışmalarda, probiyotik açıdan önemli olarak bilinen özellikleri taşımaları nedeniyle seçilmiştir. EPS üretimi, asit ve safra direnci, hemagglütinasyon yeteneği yüksek olan *B. breve* A28 ve S4 ile EPS üretimi, asit ve safra direnci, hemagglütinasyon yeteneği düşük olan *B. bifidum* A10 karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır. Çizelge 4.12’ de görüldüğü gibi çalışmada kullanılan tüm bifidobakterilerin inulinli ortamda gelişmelerinin daha iyi olduğu hem optik yoğunluklarının hem de canlılık sayımlarının sonuçlarından görülmektedir. Bununla birlikte, probiyotik olarak kullanım açısından önemli olarak belirlenen suşların diğer bifidobakterilere göre yine daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. A28 suşunun inulinsiz ortamdaki canlılığı $7,1 \times 10^8$ CFU/ml iken inulinli ortamda $7,4 \times 10^{11}$ CFU/ml olarak belirlenmiştir. S4 suşunun inulinsiz ortamda canlılığı $3,5 \times 10^8$ CFU/ml olup, inulinli ortamda $5,3 \times 10^{10}$ CFU/ml’ ye yükseldiği gözlenmiştir. Yine inulinsiz ortamda canlılığı düşük olarak hesaplanan A10 suşunun da canlılığının, inulinli ortamda arttığı görülmektedir (inulinsiz, $6,7 \times 10^4$ CFU/ml; $7,8 \times 10^4$ CFU/ml). Bağırsak sisteminde sıklıkla karşılaşılan *E. coli* ATCC 11229’ un canlılığında ise inulinli ortamda inulinsiz ortama göre dikkate değer bir değişiklik gözlenmemiştir. İnulinsiz ortamda $8,2 \times 10^9$ CFU/ml iken inulinli ortamda $6,4 \times 10^9$ CFU/ml olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. İnulinin bakteriler üzerindeki etkisi

Suşlar	Kontrol (OD ₆₀₀)	Kontrol (CFU/ml)	İnulin+Bakteri (OD ₆₀₀)	İnulin+Bakteri (CFU/ml)
<i>B. breve</i> A28	7,8±0,0	$7,1 \times 10^8$	12,8±0,3	$7,4 \times 10^{11}$
<i>B. breve</i> S4	7,2±1,0	$3,5 \times 10^8$	10,2±0,2	$5,3 \times 10^{10}$
<i>B. bifidum</i> A10	5,0±1,0	$6,7 \times 10^4$	7,1±0,0	$8,7 \times 10^7$
<i>E. coli</i> ATCC 11229	9,1±2,1	$8,2 \times 10^9$	8,6±1,2	$6,4 \times 10^9$

Çalışmanın devamında, *E. coli* ATCC 11229 suşu hem prebiyotik olarak kullanılan inulinin bulunduğu ortamda hem de iki bifidobakteri suşu ile ayrı ayrı inulinli ortamlarda, birlikte geliştirilerek prebiyotik ile desteklenen bifidobakterilerin *E. coli* ATCC 11229 üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Tek başına *E. coli* ATCC 11229 suşu inulinden etkilenmez iken, bifidobakterilerle birlikte geliştirilmesinde etkilendiği gözlenmiştir. *E. coli* ATCC 11229 suşunun, inulinsiz ortamda canlılığı $7,38 \log_{10}$ CFU/ml olarak belirlenirken, inulinli ortamda $7,01 \log_{10}$ CFU/ml, inulin ve A28 bulunan ortamda $4,21 \log_{10}$ CFU/ml ve inulin ile A10 suşunun bulunduğu ortamdaki canlılığı ise $5,46 \log_{10}$ CFU/ml olarak tespit edilmiştir. İnulinli ortamda bifidobakterilerin gelişimi stimüle edildiğinden *E. coli*'nin canlılığında bir miktar azalma gözlenmiştir. Bu azalmanın bifidobakterilerin prebiyotiklerin varlığında gelişimlerinin stimüle edilerek daha hızlı ortama adapte olmaları ve kısa sürede baskın hale gelmelerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, bu çalışmada *E. coli* ATCC 11229' un, probiyotik açıdan A10 suşuna göre daha üstün niteliklere sahip olan A28 suşu ile aynı ortamda gelişiminde canlılığının daha çok etkilediği tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4. 13).

Çizelge 4.13. *E. coli* ATCC 11229' nin, inulinli ortamda *B. breve* A28 ve *B. bifidum* A10 suşları ile birlikte gelişimi



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fonksiyonel gıda bileşenleri olarak değerlendirilen probiyotik bakterilerin insan mide-bağırsak sistemi açısından önemli etkileri bulunmaktadır. Probiyotiklerin sağlığa yararlı etkileri ile ilgili birçok kaynak bulunmaktadır. Yapılan çeşitli araştırmalar, probiyotiklerin farklı nedenlere bağlı bağırsak rahatsızlıkları, *Helicobacter pylori* kaynaklı mide rahatsızlıkları, laktoz intoleransı, kolon kanseri, alerjik reaksiyonlar ve yüksek kolesterol seviyeleri gibi çeşitli rahatsızlıklar üzerinde iyileştirici etkilere sahip olduklarını ortaya koymuştur [115]. Bu nedenle, son yıllarda yapılan çalışmalarda probiyotiklerin insan sağlığı üzerine iyileştirici etkileri çalışmaların başında gelmektedir.

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların en önemlileri laktobasiller ve bifidobakterilerdir [4]. Probiyotiklerin keşfinden itibaren laktobasillerin probiyotik olarak kullanımının avantajları konusunda birçok araştırma yapılmıştır. Ancak bifidobakteriler, son zamanlarda gündeme gelmiş olup, probiyotik amaçlı kullanımları ile ilgili henüz laktobasiller kadar araştırma yapılmamıştır. Bununla birlikte, son zamanlarda, probiyotik amaçlı kullanılması planlanan bakterilerin, insan kaynaklı olmasının önemi vurgulanmaktadır. Probiyotiklerin insan orijinli olması, bu mikroorganizmaların, ortama daha kolay adapte olmaları ve konak ile diğer muhtemel ilişkilerini en iyi şekilde gerçekleştirmeleri açısından önemlidir [116]. Bu nedenle çalışmamızda insan kaynaklı bifidobakteriler kullanılmıştır.

Doğumdan hemen sonra bağırsak florasında *E. coli* ve *Streptococcus* spp. baskındır. Bebek anne sütü aldıkça *E. coli*, *Streptococcus* ve *Clostridia* lar azalırken, bifidobakterilerin sayısı artmaya başlar [117]. Bağırsaklarda bifidobakterilerin varlığı bu bireylerin sağlıklı olduğunun bir göstergesi olarak bilinmektedir [40]. Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda, anne sütünden ve anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkılarından alınan örnekler kullanılarak, seçici besiyerinden pembe-menekşe rengindeki mukoid koloni yapısına sahip muhtemel bifidobakteri olarak 59 adet izolasyon yapılmıştır.

F6FFK enzimi bifidobakterilerin hem laktobasillerden ayırt edilmesi hem de cins düzeyindeki tayini için önemlidir [101]. Tüm isolatlar arasından bifidobakterilerin ön tanısı için F-6FFK enzim testi yapılmış, 31 adet izolat pozitif sonuç vermiştir. F6FFK enzim testiyle bifidobakteri olarak ön tanısı konulan 31 adet izolatin % 51' i dışkıdan % 49' u ise anne sütünden elde edilmiştir. *Bifidobacterium* cinsi bakterilerin yoğunluğunun bebek dışkısında anne sütünden daha fazla olduğu belirlenmiştir. Genellikle yapılan çalışmalarda dışkı izolatu kullanılmış olup, anne sütü isolatlarının kullanımı yerine anne sütündeki bileşimlerin probiyotikler üzerindeki etkisi araştırılmıştır [118]. Anne sütünden bifidobakteri izolasyonu yapılarak yürütülen böyle bir çalışmanın ilk defa yapılıyor olması bu düzeyde yapılacak olan diğer çalışmalara farklı bir bakış açısı getirmiştir. Yaptığımız çalışmada bebek dışkısında bulunan bifidobakteri sayısı yaklaşık 24×10^8 CFU/ml, anne sütünde bulunan bifidobakteri sayısı ise 11×10^4 CFU/ml olarak tespit edilmiştir. Dışkı izolasyonlarında benzer rakamlar diğer araştırmacılar tarafından da belirlenmiştir, ancak literatür taramalarında anne sütü ile ilgili bu tarzda bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dışkıdan bifidobakteri izole edilen çalışmalarda bifidobakteri sayısı farklı bulunmuştur. Örneğin, Scardovi (1986) tarafından yapılan çalışmada bifidobakteri sayısı 10×10^7 CFU/ml; Beerens (1990) tarafından yapılan çalışmada 25×10^8 CFU/ml ve Hadadji (2005) tarafından yapılan çalışmada ise 26×10^9 CFU/ml olarak bildirilmiştir [100, 103, 119].

Ön tanısı konulan 31 izolatin, şeker testleri, katalaz ve oksidaz oluşturmaları, glikozdan gaz oluşumu, arjinin hidrolizi gibi fizyolojik ve biyokimyasal testleri ile API kiti kullanılarak tür tanımlama testleri yapılmıştır. Bu tanımlamaların sonucunda 31 izolatin 15 adedi *B. breve*, 11 adedi *B. bifidum*, 3 adedi *B. pseudocatenulatum*, 2 adedi *B. longum* olarak tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.1). Fizyolojik ve biyokimyasal testlerin sonuçları ile oluşturulan dendrogramda da belirlenen türlerin birbirine yakın olduğu gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.1). Oluşturulan dendrogramda, *B. breve*' ye ait olan suşların % 88- 96; *B. bifidum*' a ait olan suşların % 57- 92 *B. pseudocatenulatum* % 85–90 ve *B. longum* % 85–94 oranlarında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkısından izole ettiğimiz bifidobakteri türleri, diğer araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermiş olup, bebek

dışkısından yaptığımız izolasyonlarda, dominant türler olarak *B. bifidum* (% 56) ve *B. breve* (% 25) belirlenirken, *B. pseudocatenulatum* (% 19) türlerinin de ikinci derecede dominant olduğu belirlenmiş olup *B. longum*' a rastlanmamıştır. Buna karşın, anne sütünde ise, *B. breve* (% 25) baskın olup, ikinci derecede *B. bifidum* (% 13) ve *B. longum* (% 13) bulunmuştur. Yeni Zellanda da, Requena ve ark. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, *B. bifidum* ve *B. longum* türlerinin bağırsak florasına hâkim olduğu belirlenmiştir [120]. Bununla birlikte, Kim ve ark.'nın (2003) yaptığı çalışmada, yeni doğan dışkısı izolatları arasında *B. bifidum* ve *B. breve* baskın türler olarak bildirilmiştir [121]. Vlkova ve ark. (2005) tarafından yapılan bir başka çalışmada yine, bebek dışkısından izole edilen türlerin dağılımı *B. bifidum* % 34,08, *B. breve* % 34,08, *B. dentium* % 13,65, *B. pseudocatenulatum* % 6,81 ve diğer bifidobakteri türlerinin de oranı ise % 11,38 olarak belirtilmiştir [122].

Bir mikroorganizmanın probiyotik özelliklerini gösterebilmesi için bağırsak sisteminde canlı kalması gerekmektedir. Ağız yolu ile alınan probiyotikler bağırsak bölgesine ulaşmadan önce midenin asitli ortamı ile karşı karşıya kalmaktadırlar. Bu sebeple, bifidobakteri türlerine ait suşların aside direncinin yüksek olmasının, asidik bir ortam olan midede canlılığını kaybetmeden bağırsak sistemine geçerek, burada kolonizasyonu için avantaj olabileceği düşünülmektedir. Her gün mideden pH' sı yaklaşık 2,0 civarında olan 3 litre kadar mide suyu salgılanmaktadır. Bu nedenle, probiyotik mikroorganizmaların kolona ulaşip, orada kolonize olması için gerekli olan ilk şart mide asidinden en az oranda zarar görmesidir. Ancak yapılan çalışmalarda bifidobakterilerin birçoğunun ancak pH 3,0 ve 4,0' e direnç gösterip, daha altındaki pH' larda canlılık kaybı yaşadığı bildirilmiştir. Budan dolayı, probiyotik amaçlı kullanılmak istenen bifidobakteri türünün direncinin maksimum düzeyde olması istenmektedir [123].

Ayrıca, safra toleransı da probiyotiklerin seçiminde kullanılan önemli kriterlerden biridir. Yağları parçalayarak bunların bağırsaklardan emilimlerine yardımcı olmak üzere karaciğerden ince bağırsağa salgılanan safra, bakterilerin büyük oranda lipid ve yağ asidi içeren hücre membranlarına zarar vermek suretiyle inhibitör etkisi

yapmaktadır [46]. Bu sebeple probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin bağırsaklarda fonksiyon gösterebilmeleri için safraya karşı dirençli olmaları gerekmektedir [108, 124]. Bununla beraber, insan kullanımı için probiyotiklerin seçimindeki safra toleransı çalışmalarında % 0,15 ve % 0,3 konsantrasyonlarında safranin kullanılması önerilmektedir [125]. Yapılan çalışmalarda, insandaki safra konsantrasyonuna yakın bir değer olmasından dolayı safraya dirençli olan suşları belirlemek için özellikle % 0,3' lük safra konsantrasyonunun kritik bir değer olduğu bildirilmiştir [126].

Bifidobakterilerin asit dirençliliği ve safra toleransı ile ilgili sınırlı sayıda literatür mevcuttur. Bu çalışmalarda ise, bu bakterilerin aside oldukça duyarlı olmalarının yanı sıra, safraya karşı dirençli oldukları vurgulanmaktadır. Matsumoto ve ark. (2004), *B. longum*, *B. adolescentis* ve *B. pseudocatenulatum* ile yaptıkları çalışmada bu bakterilerin aside olan toleranslarını belirlenmişlerdir. Bu çalışmada, bifidobakterilerin pH 3,0' de yaklaşık olarak % 1 oranında bir canlılığa sahip olduğu, asidik ortam dirençlerinin oldukça zayıf olduğu gösterilmiştir [127]. Collado ve Sanz adlı araştırmacılar (2006) tarafından yapılan çalışmada ise, *B. breve* ve *B. adolescentis*' in yüksek safra konsantrasyonunu iyi tolere ettikleri, buna karşın pH 2,0 ve 2,0' den daha asidik ortamlarda canlılıklarının gözlenmediği belirlenmiştir [128]. Bizim çalışmamıza benzer şekilde, Chung ve ark. (1999) tarafından safra ve aside dirençli bifidobakterilerin seçimi yapılmıştır. pH' sı 4,0; 5,0 ve 7,0 olan besiyerinde geliştirilen suşlarda pH 7,0 ve 5,0' de canlılık tespit edilirken, pH 4,0' de herhangi bir gelişim gözlenmemiştir [107]. Bizim yaptığımız çalışmada da denenen pH' lar arasında 6,2; 5,0 ve 4,5' da suşlarda gelişim tespit edilirken, pH 4,0'ten itibaren azalma gözlenmiş olup 3,5 ve 3,5' den sonra gelişim belirlenmemiştir (Bkz. Çizelge 4.2). Hadadji ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada ise, anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkı örneklerinden bifidobakteri türleri izole edilmiş ve izolatların farklı pH' lardaki (4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0) gelişimi incelenmiştir. Bu çalışmada, bifidobakteri türlerinin en iyi gelişimi pH 6,0 ve 7,0' de gösterdiği, pH 5,0' in altında ve 8,0' in üstünde gelişimlerinin oldukça düştüğü, bununla birlikte pH

4' de suşların gelişiminin tamamen inhibe olduğu belirtilmiştir [103]. Bizim çalışmamızda da, izole edilen türler arasında mide asidine olan direnç farklılık göstermiş, pH 6,2-3,5 arasında değişen pH denemelerinde pH düşmesine bağlı olarak canlılığın düştüğü belirlenmiş ve pH 3,5' den sonra tüm suşların canlılığını kaybettiği tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda bakterilerin gelişimlerine asitliğin etkisi tür düzeyinde belirlenmemiş olması bu açıdan çalışmamıza ön plana çıkarmaktadır. Yaptığımız çalışmada, en iyi dirence *B. breve*' ye ait olan suşların sahip olduğu görülmüştür. Daha sonra *B. longum* ait suşlar gelirken, izolatlar arasındaki en zayıf suşlar *B. pseudocatenulatum*' a ait olanlarda görülmektedir. *B. breve* A28 suşu pH 3,5' de $0,98 \pm 0,01$ oranında azımsanmayacak bir yoğunluğa sahip olduğu gözlenmiştir. Yine *B. breve*' ye ait S4 suşunun pH 3,5' de $0,77 \pm 0,01$ oranında yüksek bir yoğunluk belirlenirken, *B. bifidum*' a ait olan suşlarda ise yine pH 3,5' de $0,11 \pm 0,00$ - $0,42 \pm 0,01$ arasında bir yoğunluk olduğu görülmüştür. Genel olarak tüm suşların asit direncine bakıldığında ise, 31 adet suştan 9' unda pH 3,5' de canlılık tespit edilememiştir (Bkz. Çizelge 4.2).

Safra toleransı çalışmalarında ise yapılan araştırmalarda benzer safra konsantrasyonları kullanılmış olup, tür düzeyinde çalışmalar yapılmıştır. İbrahim ve Bazkorovainy (1993) tarafından yapılan bir çalışmada 0-3 g/L arasında değişen konsantrasyonlardaki safraya maruz bırakılan bifidobakterilerden *B. infantis*' in canlılığının *B. bifidum*, *B. breve*, ve *B. longum*' dan daha iyi olduğu belirtilmiştir [129]. Buna karşın, Clark ve Martin (1994) adlı araştırmacılar yaptıkları çalışmada % 2- 4 oranındaki safra toleransında *B. bifidum* ve *B. infantis*' e karşılık *B. longum*' un daha iyi tolerans gösterdiğini bildirmişlerdir [130]. Bizim yaptığımız çalışmada da bifidobakterilerin safra toleransı türler arasında değişiklik göstermektedir. Genel olarak bakıldığında *B. bifidum*' un, *B. breve*, *B. pseudocatenulatum* ve *B. longum*' dan daha iyi tolerans gösterdiği belirlenmiştir. Marteu ve ark. (1997) tarafından yapılan farklı bir çalışmada ise, in vivo koşullarda safranin bakteriler üzerindeki inhibitör etkisinin çok kuvvetli olduğu ve buna bağlı olarak kullanılmak istenen bakterilerin safra direncinin çok iyi olması gerektiğini vurgulayarak,

bifidobakterilerin safrayı tolere edebilmesinin probiyotik kullanım açısından önemini açığa çıkarmışlardır [131]. Yaptığımız çalışmada ise, % 0,15' lik safra konsantrasyonunun suşların gelişiminde olumlu bir etki yarattığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, artan safra konsantrasyona bağlı olarak, bakteriler üzerindeki inhibitör etkisinin de arttığı belirlenmiştir. En yüksek konsantrasyon olan % 0,40 konsantrasyonundaki safra varlığında bile tüm suşlarda belirli bir yoğunluk tespit edilmiş olup, hiçbir suş canlılığını tamamen kaybetmemiştir. % 0,40 safra konsantrasyonunda en iyi toleransa sahip olan suşlar sırasıyla *B. breve* A16 ve A28 suşlarıdır. Safraya en zayıf toleransı ise, *B. breve* S3, S4, S5, S8, S9, S11 ve *B. pseudocatenulatum* D4 suşları göstermiştir (Bkz. Çizelge 4.3).

Bifidobakterilerde asit ve safra dirençliliği çalışmalarının az olmasına karşın, *Lactobacillus* cinsine ait çeşitli suşların asit dirençliliği ve safra toleranslarının araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır [132, 133]. Xanthopoulos ve ark. (2000) bebek dışkılarından izole ettikleri farklı türler (*L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*) içeren 20 adet laktik asit bakterisinin probiyotik özelliklerini araştırmışlardır. Bu çalışmada pH 3,0' de inkübasyona bırakılan izolatların, inkübasyon sonrası % 0,1–73,3 oranlarında canlılıklarını korudukları belirlenmiştir [134]. Haller ve ark. (2001) ise, insan bağırsağından izole ettikleri 10 farklı laktobasil türünden 4 tanesinin (*L. johnsonii* La1, *L. plantarum* 2963, 2966, 2833) pH 1,5–2,5' a direnç gösterdiği, diğer suşlarına direnç gösteremediğini belirlemişlerdir. İnsan izolatu olan *L. johnsonii* La1 suşunun düşük pH ve safra dirençliliğinden dolayı probiyotik bir suş olabileceğini bildirmişlerdir [135]. Yapılan diğer bir çalışmada, probiyotik olarak kullanılması amaçlanan bazı suşların asit ve safra dirençlilikleri araştırılmıştır. *Pediococcus acidilactici* (P2), *Lactobacillus curvatus* (RM10) ve *P. pentosaceus* (FF) suşlarının asitli ortama dirençliliklerinin oldukça yüksek olduğu, pH 3,0' de canlılıkları ya çok az etkilenmiş ya da hiç etkilenmemiştir. Buna karşın safra konsantrasyonlarının herhangi bir pozitif etki göstermediğini ve % 0,3 oranında safraya karşı bakterilerin toleranslarının düşük olduğunu bildirmişlerdir [126]. Böke (2005) tarafından yapılan

çalışmada ise *Lactobacillus* suşlarının mide asitliğine yakın farklı pH' lara (1,0–3,0) dayanıklılıkları ölçülmüştür. Sonuçta, pH 3,0' e tüm suşların yüksek oranda (% 72,5-96,3) dirençlilik gösterdiği fakat pH 1' de canlılık gözlenemediği belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, laktobasil suşlarının % 0,15 konsantrasyonundaki safrayı % 30–39 ve % 0,3 konsantrasyonundaki safrayı % 24–36 arasında değişen oranlarda tolere ettikleri belirlenmiştir [56].

Genel olarak tüm izolatlar bakıldığında, bifidobakterilerin diğer probiyotik bakterilere göre aside dirençliliklerinin daha az olduğu görülmektedir. Ancak, yapılan sınırlı çalışmalarda da bifidobakterilerin safra toleransının laktobasillere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Berrada ve ark. (1991) tarafından yapılan çalışmada, aside ve safraya dirençli olan bifidobakterilerin in vivo çalışmalarda sağlığı iyileştirici özellikler bakımından diğer probiyotiklere göre daha iyi olduğu gösterilmiştir [136]. Yaptığımız çalışmada elde edilen verilere göre, suşlarımızın aside olan dirençliliğinin literatür taramalarında belirlenen laktobasillere göre düşük olduğu, buna karşın safraya karşı toleransının çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Bakterilerin mideden geçip bağırsağa ulaştıklarında probiyotik özelliklerini gösterebilmelerindeki en büyük avantajlardan biri de ekzopolisakkarit (EPS) üretim kapasitelerine sahip olmalarıdır [56]. Probiyotik özellik olarak ekzopolisakkarit üretiminin (EPS); bakteriyi sıvı kaybına, makrofajlara, fagositoza, bakteriyofajlara, antibiyotik ve toksik bileşiklere karşı koruduğu bilinmektedir [58]. Yapılan literatür taramalarında, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* vs. tarafından üretilen EPS ile ilgili birçok çalışma belirlenirken, EPS üretim kapasitesinin, probiyotik ve gıda uygulamalarında oldukça önemli olduğunun bilinmesine rağmen, bifidobakteriler tarafından EPS üretimi ile ilgili yeterli çalışma bulunmamıştır [55]. Sınırlı sayıda yapılmış olan çalışmalarda ise, bazı bifidobakterilerinin EPS üretim kapasitesine sahip olduğu ancak, probiyotik kullanım açısından avantajlı olabileceği belirtilmemiş ve bu konuda çalışma yapılmamıştır. Bu sebeple, yaptığımız bu çalışma probiyotik

kullanıma yönelik kapsamlı bir çalışma olması ve bu çalışmayla yüksek EPS üretimine sahip bifidobakterilerin avantajlarının vurgulanması açısından bir ilk olmuştur.

Bifidobakterilerin EPS üretimi ilk olarak 1990' da Sutherland tarafından bildirilmiştir. Daha sonra 1995' de Roberts ve ark. tarafından *Bifidobacterium longum* BB-79 suşunun EPS üretimi araştırılmıştır [137]. Ancak bu çalışmalarda sadece bifidobakterilerde EPS varlığı belirlenmiş olup, EPS üretiminin önemine değinilmemiştir. Buna karşın, laktik asit bakterilerinin (LAB), EPS üretimi ile ilgili yapılan birçok çalışmada, EPS üretim kapasitesi ve EPS' nin probiyotikler açısından avantajları vurgulanmıştır. Cerning ve ark.(1995), LAB' nin sütte ürettikleri EPS miktarlarının farklı olduğunu tespit etmişlerdir. Bu araştırmacılar EPS miktarını; *S. thermophilus* için 50–350 mg/L, *L. bulgaricus* için ise 60–150 mg/L, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* için 80–600 mg/L olarak bulmuşlardır [138]. Yine Ginka ve ark.' nın (2000) yaptıkları benzer bir çalışmada, *L. bulgaricus* 2–11 kodlu suşun EPS üretimini 540 mg/L olarak belirlenirken, *S. thermophilus* 15a için 229 mg/L, *S. thermophilus* 2a için ise 58 mg/L olarak tespit edilmiştir [139]. Bizim yaptığımız çalışmada ise, bifidobakterilerin her birinde EPS üretim kapasitesi belirlenmiştir. Suşların EPS üretimi 38,00 mg/L–97,64 mg/L arasında bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.5). Suşlar arasında EPS üretim kapasitesi oldukça farklı olup, bebek dışkısından izole edilen suşlar arasında en yüksek EPS üretimi *B. breve* A28 (97,64 mg/L) suşunda tespit edilmiştir. *B. pseudocatenulatum* D5 (91,91 mg/L), *B. bifidum* D8 (89,55 mg/L), *B. bifidum* A40 (86,50 mg/L), *B. bifidum* D2 (85,73 mg/L) suşlarında da yüksek bulunmuştur. Süt izolatları arasında en yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olan suşlar ise, *B. breve* S4 (93,67 mg/L), *B. breve* A19S (87,05 mg/L), *B. breve* S3 (82,35 mg/L) ve *B. breve* S2 (82,21 mg/L)' dir. Tüm suşların EPS üretiminin, daha önce *Lactobacillus* cinsine ait farklı türlerle yapılan çalışmalarda elde edilen değerlere göre daha az olduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar EPS üretimlerinin türler ve hatta suşlar arasında farklı olmasında, fermentasyon şartlarının (sıcaklık, inkübasyon, süre ve pH) ve besiyeri bileşenlerinin (karbon ve nitrojen kaynağı) etkili olabileceğini bildirmişlerdir [140, 141].

Yaptığımız çalışmada, EPS üretimi yüksek olan suşların düşük asitliğe daha dirençli ve safraya daha toleranslı olması dikkat çekicidir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, EPS üretimi ile asit direnci ve safra toleransı özellikleri arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Bu ilişki istatistiksel olarak da değerlendirilmeye alındığında, suşların asit direnci ve safra toleransı ile EPS üretim kapasiteleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu saptanmıştır ($P<0.05$). Elde edilen bu sonuçlar, özellikle EPS' nin asit ve safraya karşı koruyucu etkisinin varlığını göstermektedir ve bu düzeyde yapılmış ilk çalışma olması, çalışmamızın önemini ortaya çıkarmaktadır.

Probiyotik mikroorganizmaların en önemli özelliklerinden biri de, ortamda bulunan gıda kaynaklı patojenlerin ve kontaminant mikroorganizmaların (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* gibi) gelişimini engellemeleri ve ölümlerine sebep olmalarıdır [142]. Bu özelliklerinden dolayı gıdaların korunmasında laktik asit bakterilerinin fermantasyonu sonucu ortamda bulunan karbonhidratların miktarı azalır ve antimikrobiyal aktiviteye sahip organik moleküller (laktik, asetik, formik, propiyonik asit) ve antimikrobiyal bileşikler (hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriyosin) oluşur [143- 145]. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bu metabolitler *E. coli* gibi gram-negatif bakteriler üzerinde etkili olmaktadır. Reid ve ark. (1990) farklı *Lactobacillus* spp. türlerinin birçok patojen üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiğini belirlemişlerdir [146]. Bifidobakterilerin patojenler üzerindeki inhibisyonu ile ilgili çok fazla araştırma olmamasına rağmen, Gibson ve Wang (1994) adlı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda, birçok bifidobakteri türünün (*B. infantis* ve *B. longum* gibi) gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. En iyi inhibisyon etkisinin *E. coli* türleri ile gerçekleştiğini, gözlemlemişlerdir [147]. Bu nedenle, çalışmamızda bifidobakterilerin *E. coli* üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Yapılan deneyde, suşların birçoğunun *E. coli* üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Tüm izolatların inhibisyon etkisi incelendiğinde, 5- 9 mm arasında değişen oranlarda zon çapları elde edilmiştir. Buna karşın, sadece iki bifidobakteri izolatının *E. coli* ATCC 11229 üzerindeki inhibisyon etkisi tespit edilememiştir (Bkz. Çizelge 4.7, Resim 4.4).

Bakterilerin bağırsak bölgelerindeki kolonizasyonu, fimbrial yapışmayla gerçekleşmektedir. Bakteri fimbriyaları, farklı hücre tipleri arasında eritrositlere de yapışabilme ve böylelikle aglutine etme (hemagglütinasyon) yetenekleriyle bakteri hemagglütininleri (fimbriyal hemagglütininler) arasında yer almaktadırlar [74, 148]. Bu nedenle, fimbriyaların varlıklarını ve yapışmada oynadıkları rolü göstermeye yönelik in vitro araştırmalarda kullanılan yöntemlerden biri de bakterilerin hemagglütinasyon kabiliyetlerinin gösterilmesine dayanmaktadır [74, 75, 148]. Hemagglütinasyon iki veya daha fazla eritrosite bakterilerin tutunmasıyla meydana gelmektedir. Bu nedenle, bazı araştırmacılar tarafından bakterilerin hemagglütinasyon yetenekleri, bakterilerin bağırsak yüzeyine kolonize olmasında ön seçim olarak kullanılmıştır [76]. Ocana ve ark. (1999), memeli epitel hücre reseptörleri ile eritrosit membran reseptörleri arasında benzerlikten yararlanarak bakterilerin HA yeteneğinin epitel yüzeye tutunma çalışmalarından önce, bir ön basamak olabileceğini belirtmişlerdir [72]. Bifidobakterilerin hemagglütinasyon yetenekleri önemini vurgulayan, Perez ve ark. (1998) ark. tarafından yapılmış sadece bir literatür bulunmaktadır. Bu çalışmada, insan orijinli bifidobakterilerin hücre yüzey özelliklerini incelenerek, hemagglütinasyon kapasitesi yüksek olan suşların epitel yüzeylere tutunma kapasitelerinin de daha yüksek olduğu belirlenmiştir [149]. Mukai ve ark. (1998) ise benzer bir çalışmada 6 adet *Lactobacillus reuteri* suşlarının, bağırsak epiteline yapışma yetenekleri ile HA yetenekleri arasında korelasyon olup olmadığını araştırmışlardır. *L. reuteri* suşlarının HA yeteneği gösteren suşların çeşitli bağırsak epitel hücrelerine yapışma yeteneği gösterirken, HA yeteneği göstermeyen suşların ise epitele tutunamadıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca, *Lactobacillus acidophilus* suşlarının da HA yeteneği gösteren ve epitel hücrelere iyi adezyona sahip bir suş olduğunu rapor etmişlerdir [150]. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da, izole edilen tüm bakterilerin hemagglütinasyon kabiliyetleri incelenmiştir (Bkz. Çizelge 4.6). Sonuçlarda suşlar, hemagglütinasyonun şiddetine göre derecelendirilmiştir (Bkz. Resim 4.3). *B. breve* A28, *B. breve* S3, *B. bifidum* A40, *B. bifidum* S7 ve *B. bifidum* D1 yüksek (+++) HA gösteren suşlar olarak belirlenmiştir. *B. pseudocatenulatum* ve *B. longum* suşlarının HA göstermediği tespit edilmiştir. Yaptığımız bu çalışmadan elde edilen veriler, epitel yüzeye tutunma çalışmasında

kullanılması planlanan suşların tutunma indeksinin belirlenmesi açısından bir ön seçim oluşturmuştur.

Probiyotik kültürlerin bağırsağa varması halinde, peristaltik hareketler ile bağırsaktan kayıp gitmemesi için bağırsak lümenini örten mukus tabakasına ve epitel hücrelerine tutunması gerekmektedir [151]. Bağırsak hücrelerine bakterilerin tutunma yeteneği en önemli probiyotik seçim kriteri olarak dikkate alınmaktadır [152]. Bağırsak epiteline veya mukusa tutunma, başarılı kolonizasyon, enteropatojenlere karşı antagonistik aktivite gösterebilme, immün sistemin modülasyonu ve mide mukoza hasarlarının iyileştirilmesinin artırılması için gerekli olan ön koşullardan biridir [152- 154]. Bu nedenle, bağırsak yüzeyine kolonizasyonda ilk adım olarak, bakterilerin bağırsak hücrelerine veya mukusa tutunması düşünülmektedir [155, 156]. Bifidobakteriler ile bağırsak hücreleri arasındaki etkileşim bilinmesine rağmen, hücreye tutunma mekanizması hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Gram pozitif bakterilerin polisakkaritlerinin kuvvetli elektrostatik gücünün, hücreye tutunmalarında önemli olabileceği düşünülmektedir [157]. Laktik asit bakterilerinin oluşturdukları EPS, bakterinin yüzeye tutunmasında yapıştırıcı (slime) işleve sahip olması nedeniyle, bakterinin tutunmasında ve biyofilm oluşturmada etkilidir [58]. Bakteriler tarafından oluşturulan EPS, epitel doku ile bakteriler arasında (bağırsak florasında bulunan) gerçek bir bağ meydana getirir. EPS üretimine sahip suşların yüksek bir adezyon kapasitesine sahip olacağı bilinmektedir [128]. Bütün bu özellikler, EPS üreten bakteriye, bulunduğu ortamda stabil olarak kalabilme ve dominant olarak kolonize olma özelliği sağlamaktadır [158]. Bu sebeple, epitel yüzeye tutunma çalışmasında kullanılmak üzere, 31 izolat arasından, EPS üretim kapasitesi ve hemagglütinasyon kabiliyeti göz önüne alınarak EPS üretimi ve hemagglütinasyon kabiliyeti yüksek *B. breve* A28 ile EPS üretimi ve hemagglütinasyon kabiliyeti düşük olan *B. bifidum* A10 suşları kullanılmıştır. Bununla birlikte, bifidobakterilerin epitel yüzeye tutunmasında, patojen olarak *E. coli* ATCC 11229 suşunun da etkisinin belirlenmesi amacıyla çalışmaya dâhil edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda, insan kolon kanserli hücrelerinden izole edilmiş Caco-2 hücreleri bakteri ve bağırsak epitel hücreleri arasındaki etkileşimi çalışmada en iyi model sistemi olarak bulunmuştur [159]. Bu nedenle in vitro olarak epitel yüzeye bakterilerin tutunma deneylerinde Caco-2 hücreleri kullanılmıştır. Çalışmamızda aynı koşullar altında *B. breve* A28, *B. bifidum* A10 ve *E. coli* ATCC 11229 suşlarının Caco-2 hücrelerine tutunma indeksleri belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.7). Elde edilen verilere göre EPS üretim kapasitesi-hemaglutinasyon kabiliyeti yüksek olan *B. breve* A28 suşu ile *E. coli* ATCC 11229 suşunun epitel yüzeye tutunma indeksleri çok yüksek bulunmuştur (300< bakteri/hücre). Bununla birlikte, EPS üretim kapasitesi düşük ve hemaglutinasyon kabiliyeti olmayan *B. bifidum* A10 suşunun epitel yüzeye tutunma indeksi (19 bakteri/hücre) düşük olduğu belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizlere göre, epitel yüzeye tutunma ile EPS üretimi arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu belirlenmiştir ($P<0,05$). Çalışma sonunda EPS üretimi yüksek *B. breve* A28 ve EPS üretimi düşük *B. bifidum* A10 suşlarının Caco-2 hücrelerine tutunması elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir. Elektron mikroskobu analizlerinde de EPS üretimi yüksek *B. breve* A28 suşunun tutunma ve biyofilm oluşturma kapasitesinin EPS üretimi düşük *B. bifidum* A10 suşuna göre daha yüksek olduğu doğrulanmıştır (Bkz. Resim 4.3, 4.4). Çeşitli çalışmalarda bifidobakterilerin, epitel yüzeye tutunma gösterip göstermedikleri araştırılmıştır. Örneğin, insan enterosit benzeri Caco-2 hücreleri ile yapılan çalışmalarda *B. breve*, *B. longum* ve *B. adolescentis* tutunma gösterip, *B. bifidum* ve *B. infantis*' in tutunması belirlenmemiştir [149]. Yaptığımız çalışmada da *B. bifidum*' un tutunma indeksinin *B. breve*' nin tutunma indeksinin çok altında olduğu tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada, Ouwehand ve ark. (1999) tarafından, 2-6 aylık bebeklerden izole edilen dört bifidobakteri suşunun epitel hücrelerine tutunması araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre % 4,2- 11,4 değişen oranlarda tutunma oranları belirlenmiştir [160]. Fang ve ark. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada ise, yetişkin ve bebek dışkılarından izole edilen bifidobakterilerin in vitro koşullarda bağırsak epiteline yapışması incelenmiştir. İzolatlar, pozitif kontrol olarak kullanılan *Lactobacillus* GG (ATCC 53103) ve *Bifidobacterium lactis* Bb12 suşlarının bağırsak hücrelerine tutunması ile kıyaslanmıştır. *Lactobacillus* GG (ATCC 53103) ve *Bifidobacterium lactis* Bb12 suşlarının tutunma yüzdesi sırayla % 35,5 ve % 19,0 olarak belirlenmiştir [154].

Diğer probiyotik bakterilerde yapılan çalışmalarda da epitel yüzeye tutunma kapasiteleri belirlenmiştir. Zarate ve ark. (2002) tarafından *Propionibacterium acidopropionici* CRL 1198 suşu ile epitel yüzeye tutunma deneylerinde benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bu suşun, mide suyu ve bağırsak sıvısı ile muamele edildikten sonra çok iyi tutunma özelliği sergilediği gözlenmiştir [114].

Bağırsak epitel yüzeyine bakteriyel tutunma için yarışmalı inhibisyon, probiyotiklerin diğer bir etki mekanizmasıdır. Bu çalışmada da yine *B. breve* A28, *B. bifidum* A10 ve *E. coli* ATCC 11229 suşları kullanılmıştır. EPS üretimi yüksek olan *B. breve* A28 ile *E. coli* ATCC 11229 suşlarının rekabetinde, her iki suşunda tutunma indeksinde azalma gözlenmiştir. Rekabetin olmadığı ortamda *E. coli* ATCC 11229' un tutunma indeksi 300< bakteri/hücre iken, ortama *B. breve* A28' in katılması ile beraber tutunma indeksinin 48 bakteri/hücre' ye düşmüştür. *B. breve* A28 suşunun da rekabetsiz ortamda 300< bakteri/hücre olan tutunma indeksi, *E. coli* ATCC 11229 suşu ile birlikteliğinde 41 bakteri/hücre' ye inmiştir. EPS üretim kapasitesi düşük olan *B. bifidum* A10 ile *E. coli* ATCC 11229 suşlarının rekabetinde ise *B. bifidum* A10 suşunun tutunma indeksinin 19 bakteri/hücre' den 8 bakteri/hücre' ye düştüğü, buna karşın *E. coli* ATCC 11229' un tutunma indeksinin 105 bakteri/hücre olduğu gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.7). Bu sonuçlar incelendiğinde, EPS üretiminin, bifidobakterilerin Caco-2 hücrelerine tutunmasında ve mide-bağırsak sistemindeki canlılığında koruyucu bir etki göstermesi konusundaki hipotezimiz doğrulanmaktadır. Ouwehand ve ark. (2001) tarafından laktobasil ve bifidobakterilerin, epitel yüzeye tutunmada *E. coli* ile rekabet ederek baskın olduklarını bildirmişlerdir [77]. Yapılan başka bir çalışmada da, *E. coli* ve probiyotikler arasındaki tutunma rekabeti belirlenmiştir. Roselli ve ark. (2006) enterotoksijenik *E. coli* K88' in neden olduğu inflamasyondan Caco-2 hücrelerinin korunmasında probiyotik olarak kullanılan *B. animalis* MB5 ve *L. rhamnosus* GG suşlarının rolü ile ilgili yaptıkları çalışmada, *E. coli*' nin inhibe olduğunu gözlemişlerdir [161]. Collado ve ark. (2006) tarafından bifidobakterilerin patojenlerle rekabeti sonucunda bağırsak bölgesinde epitel hücrelere tutunması araştırılmıştır. Çalışmada bağırsak patojeni olarak, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter sakazakii* ve *Clostridium difficile* kullanılmıştır. Bifidobakteri

suşlarının tek başına epitele tutunması % 2–10 arasında değişirken, patojenlerin tutunma yüzdeleri *E. coli*' de % 20, *E. sakazakii*' de % 15, *C. difficile*' de % 14 ve *L. monocytogenes* % 3 oranlarında bulunmuştur. Rekabette *L. monocytogenes*' in % 5,06- 14,09; *E. coli*' nin % 6,75- 25,37; *E. sakazakii*' nin 17,25–27,0; *C. difficile*' nin % 14,20–21,27 arasında değişen oranlarda tutunma kapasitesinin azaldığı görülmüştür [128]. Bizim yaptığımız çalışmada da, bifidobakteriler ile birlikte aynı ortama konulan *E. coli* ATCC 11229' un tutunma indeksinde azalma belirlenmiştir. Servin (2003) tarafından yapılan çalışmada probiyotiklerin patojenlerle etkileşimi ve bağırsak epitel yüzeyine tutunması araştırılmıştır. *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. kullanıldığında enterik patojenlerin enfeksiyon oluşturma ve epitel yüzeye tutunma oranlarında azalma meydana geldiği belirlenmiştir [162].

Çalışmamızda aynı zamanda, bifidobakterilerin yapay mide suyu ve bağırsak sıvısı ile muamelesinden sonra tutunmaları araştırılmıştır. Bu araştırma, oral yolla verilmesi düşünülen probiyotik kültürlerin öncelikle karşılaştıkları mide asitliği ve safra tuzuna karşı toleransının tutunmadaki rolünün belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Böylece dayanıklı olan bakteriler bağırsaklara rahatlıkla ulaşip, epitel yüzeye tutunarak kolonize olmaktadır [150]. Bakteriler, epitel yüzeye tutundurulmadan önce mide-bağırsak sistemindeki olumsuz koşullara maruz bırakılarak bağırsaklara ulaşan bakteri sayıları tespit edilmiştir. Deneyin ilk basamağı olarak, bakteriler farklı pH (3,0; 4,0; 5,0; 7,0)' lara sahip mide sularına maruz bırakılmıştır. Mide suyu ile bakterilerin inkübasyonundan sonra katı ortama ekim yapılarak her bir bakterinin farklı pH' lardaki canlılıkları belirlenmiştir. Bifidobakterilerin canlılığı *E. coli*' ye göre oldukça düşük bir oranda elde edilmiştir. Bu farkın, hem bifidobakterilerin asitliğe olan duyarlı olması hem de *E. coli*' nin aside direncinin yüksek olması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, azalan pH ile birlikte tüm bakterilerin canlılığında da azalma meydana gelmiştir (Bkz. Çizelge 4.8). Bu çalışmada araştırılan yüksek kapasitede EPS üretimine sahip *B. breve* A28 suşunun pH 7,0' de canlılığı $\log_{10}$ 7,8 CFU/ml iken, azalan pH ile birlikte pH 3,0' de canlılığında da azalma belirlenmiştir ($\log_{10}$ 2,9 CFU/ml). Bununla birlikte, EPS üretimi düşük *B. bifidum* A10 suşunun canlılığının *B. breve* A28 suşuna göre çok daha fazla etkilendiği görülmektedir (pH 7,0' de $\log_{10}$ 7,2 CFU/ml; pH 3,0' de $\log_{10}$

2,1 CFU/ml). Bu sonuçlara göre, EPS üretimi yüksek A28 suşunun canlı kalma kapasitesinin EPS üretimi düşük A10 suşuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bakteriler, mide suyu ve ardından bağırsak sıvısında inkübe edildiklerinde ise canlılıklarının, mide suyu uygulamasına göre daha fazla etkilendiği tespit edilmiştir. Yapay mide suyu ardında bağırsak sıvısının uygulanması ile bifidobakterilerin canlılığı çok etkilense de, EPS üretimi yüksek olan *B. breve* A28 suşu, EPS üretimi düşük olan *B. bifidum* A10 suşuna göre canlılığını daha fazla koruyabildiği belirlenmiştir. Her ne kadar bifidobakterilerin safraya olan toleransları yüksek olsa bile, asitlik ile muamelenin ardından safra sıvısıyla karşılaşınca daha çok zarar gördükleri tespit edilmiştir. Bu çalışma sonunda, elde edilen verilerle, yine EPS üretim kapasitesi yüksek olan *B. breve* A28 suşunun önemi ortaya çıkmaktadır (Bkz. Çizelge 4.9). Bununla birlikte, *E. coli* ATCC 11229 suşunun, çalışmada kullanılan en düşük pH (pH 3,0) ve safra ile muamelesinde bile canlılığını bifidobakterilere göre daha çok koruyabildiği gözlenmiştir. EPS üretimi yüksek olan *B. breve* A28 suşunun canlılığında, asidik ortamın artması ve safranın varlığı ile düşme belirlenmesine rağmen, pH 3,0' de bile canlılık tespit edilmiştir. Buna karşın EPS üretimi düşük olan *B. bifidum* A10 suşunun mide suyu ve bağırsak sıvısı uygulamasında pH 3,0' de canlılığını tamamen kaybettiği belirlenmiştir. Bu çalışmanın devamında, hem mide suyu ile muameleden sonra hem de mide suyu ve bağırsak sıvısı ile muameleden sonra bakteriler Caco-2 hücrelerine tutundurularak ışık mikroskopunda sayımları yapılmıştır (Bkz. Çizelge 4.10; Çizelge 4.11). Buna göre, EPS üretim kapasitesi yüksek olan A28 suşunun epitel yüzeylere tutunmasının EPS üretim kapasitesi düşük olan A10 suşundan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada da mide suyunun düşen pH' sına ve eklenen safra sıvısına bağlı olarak tutunan bakteri sayılarında da azalama gözlenmiştir. Yaptığımız bu çalışma, bifidobakterilerin mide-bağırsak sistemi koşullarına maruz kaldığındaki epitel yüzeye tutunmaları ve bu tutunmada EPS üretim kapasitelerinin etkisinin belirlenmesi nedeniyle ön plana çıkmaktadır.

Bifidobakterilerin epitel yüzeye tutunmalarında asitlik ve safranın etkisi ile ilgili çok fazla araştırma bulunmamaktadır. Ram ve Chander (2003) adlı araştırmacılar tarafından yapılan bir çalışmada ise, *B. bifidum* HI 39 ve *B. bifidum* HI 48 suşlarının

farklı pH' larda (pH 5,0; 6,0; 7,0 ve 8,0) tutunma kapasitelerini belirlemişlerdir. Suşların her ikisinin de pH 7,0' de maksimum düzeyde (% 80–90) epitele tutunabildiklerini, pH 5,0' de ise minimum düzeyde tutunabildikleri gösterilmiştir [163]. Bizim çalışmamızda da hem mide suyu hem de mide suyuna ile birlikte bağırsak sıvısının varlığında kullanılan tüm bakterilerin epitele tutunmasında pH 7,0' nin daha uygun olduğu pH 3,0' de ise tutunmanın en alt seviyede olduğu gözlenmiştir. *B. breve* A28 suşunun sadece mide suyu ile muamele edilmesinin ardından Caco–2 hücrelerine tutunma indeksi pH 7,0' de 53 bakteri/hücre iken, mide suyunun ardından bağırsak sıvısı ile muamele edildiğinde pH 7,0' de tutunma indeksi 31 bakteri/hücre' ye düştüğü gözlenmiştir. EPS üretimi düşük olan *B. bifidum* A10 suşunda ise, mide suyu ile muameleden sonra tutunma indeksi pH 7,0' de 19 bakteri/hücre olarak belirlenirken, ortama bağırsak sıvısı eklendikten sonra pH 7,0' de 14 bakteri/hücre' ye düştüğü belirlenmiştir. Mide suyunun tutunma indeksinde pH 3,0' de A28 suşunun indeksinin 31 bakteri/hücre' ye kadar düştüğü belirlenirken, A10 suşunun indeksinin 6 bakteri/hücre' ye düştüğü tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.9). Mide suyuna bağırsak sıvısı ilave edildiğinde ise, A28 suşunun pH 3,0' de tutunma indeksi 11 bakteri/hücre A10 suşunda ise pH 3,0' de tutunma indeksi 4 bakteri/hücre olduğu belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.9). EPS üretimi yüksek A28 suşunun Caco–2 hücrelerine tutunma kapasitelerinin yüksek olduğu elektron mikroskobu incelemeleri ile de doğrulanmıştır (Resim 4.4, 4.5)

Elde ettiğimiz verilere dayanarak probiyotik açıdan üstün özellikli olarak belirlenen suşların bağırsak koşullarında canlılıklarını sürdürebilecek ve dolayısı ile probiyotik özelliklerini sergileyebileceklerdir. Probiyotik özelliklerini daha iyi gösterebilmeleri için de bu bakterilerin prebiyotiklerle desteklenmesinin avantajlı olacağı düşünülmektedir. Prebiyotik olarak fruktooligosakkaritlerin (FOS), kolonda faydalı bakterilerin gelişimini teşvik etmesi ve bağırsak sisteminin üst kısmında hidrolize ve absorbe olmaması dikkat çekmektedir. Prebiyotikler, bakterilerin gelişimini ve onların metabolik aktivitelerinin olumlu yönde etkilediği için probiyotik çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Bifidobakteriler, prebiyotikler için uygun hedef organizmalardır [164]. Bifidobakteriler ile FOS kombinasyonları, bakteriyel gelişimi teşvik ederek probiyotik etkinin devam ettirilmesinde önemli bir rol

oynamaktadır. Prebiyotikler arasında en çok doğada yaygın olarak bitki karbonhidrat depolarında bulunan inulin kullanılmaktadır [92]. Bu nedenle yaptığımız çalışmada da prebiyotik olarak inulin kullanılmıştır.

İlk olarak prebiyotiklerle yapılan çalışmalarda, inulin ve fruktooligosakkaritlerin kolonda bifidobakterilerin gelişimini teşvik ettiğine dair raporlar Roberfroid (1998) tarafından bildirilmiştir [165]. Prebiyotikler üzerine yapılan çalışmalardaki en önemli bulgu, inulinin bifidobakterilerin gelişimini teşvik ettiği, buna karşın *Bacteroides*, *Clostridia* ve *E. coli* gibi patojenler üzerinde inhibitör etki göstermesidir [166]. Bunun üzerine çalışmalar bifidobakteriler ile birlikte prebiyotik uygulamalarına çevrilmiştir. 2001 yılında Sharp ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, bifidobakteriler ve *E. coli*’ de sindirilmeyen oligosakkaritlerin etkisi araştırılmıştır. Deneylerde, *B. longum*, *B. adolescentis* ve *B. angulatum* türlerinin baskın florayı oluşturduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, toplam bifidobakteri popülasyonunun sayısında da büyük farklılık belirlenmemiştir. Bununla birlikte, *E. coli* popülasyonunda oldukça belirgin bir azalma saptanmıştır [167]. Prebiyotik çalışmaları araştırmacılar tarafından genellikle in vivo koşullarda gerçekleştirilmiştir. Prebiyotiklerin sağlığı iyileştirici rollerinden dolayı deney hayvanlarının bağırsak bölgelerinde oluşturulan hasarlardaki iyileştirici özelliği konusunda çalışmalar yapılmıştır [98, 169, 170]. Bizim yaptığımız çalışmada bu tarzda yapılması planlanan çalışmalara temel oluşturacak niteliktedir.

Çalışmamızda, bifidobakteri suşlarından probiyotik açıdan önemli olduğu düşünülen *B. breve* A28, S4, *B. bifidum* A10 suşları ve *E. coli* ATCC 11229 suşu prebiyotik uygulamalarında kullanılmıştır. İnulinin bifidobakteri ve *E. coli* ATCC 11229 suşlarının gelişimi üzerindeki etkisi Çizelge 4.12’ de verilmiştir. Kontrol grubunda canlılığı $8,2 \times 10^9$ CFU/ml olan *E. coli*’ nin inulinli ortamda canlılığı $6,4 \times 10^9$ CFU/ml olduğu belirlenmiştir. EPS üretim kapasitesi yüksek olan *B. breve* A28, S4 ve EPS üretim kapasitesi düşük olan *B. bifidum* A10 suşlarının canlılığında ise, tam tersine artış saptanmıştır. Probiyotik özellikler bakımından üstün olarak belirlenen A28 suşunun canlılığı kontrol grubunda $7,1 \times 10^8$ CFU/ml iken, inulinli ortamda $7,4 \times 10^{11}$ CFU/ml’ ye yükselmiştir. Bu artışın A28 suşunda EPS üretimi düşük olan A10

suşuna göre daha fazla olduğu görülmüştür. Bu çalışmada probiyotik özellikler bakımından üstün nitelikli olarak belirlenen *B. breve* A28 ile zayıf olduğu düşünülen *B. bifidum* A10 ve *E. coli* ATCC 11229 suşları prebiyotik ile desteklenerek, prebiyotiğin *E. coli* üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çizelge 4.13’ de bifidobakterilerin ve prebiyotik olarak inulinin varlığındaki gelişim sonrasında *E. coli* ATCC 11229’ nin canlılık sonuçları verilmiştir. *E. coli* ATCC 11229 suşunun, inulinsiz ortamda canlılığı $7,38 \log_{10}$ CFU/ml olarak belirlenirken, inulinli ortamda $7,00 \log_{10}$ CFU/ml, inulin ve A28 bulunan ortamda $4,21 \log_{10}$ CFU/ml ve inulin ile A10 suşunun bulunduğu ortamdaki canlılığı ise $5,46 \log_{10}$ CFU/ml olarak tespit edilmiştir. İnulinin varlığından çok fazla etkilenmeyen *E. coli*’ nin, bifidobakteriler ve inulin uygulamasında gelişiminin azaldığı görülmüştür. Prebiyotik varlığında bifidobakterilerin gelişimi stimüle edilerek ortamda baskın duruma geçmeleri ile ilişkilendirilebilir. Aynı zamanda, *E. coli*’ nin, EPS üretimi yüksek olan A28 suşu ile inulinli ortamdaki canlılığı, EPS üretimi düşük olan A10 suşu ile inulinli ortamdaki canlılığından daha fazla düşmüştür. Bu durumda EPS üretiminin birçok avantajının yanı sıra prebiyotiklerle de desteklendiğinde bifidobakterilerden daha yüksek verim elde edilebilecektir.

Çalışmamızda anne sütü ile beslenen yeni doğan dışkısından ve anne sütünden izole edilen bifidobakterilerin tanımlamaları yapılarak probiyotik kullanım açısından önemli olduğu düşünülen bazı özellikleri incelenmiştir. Bu özelliklerin başında bakterilerin asit ve safraya dirençlilikleri gelmektedir. Bu nedenle öncelikle izole edilen bakterilerin asit ve safra direnci araştırılarak dirençli ve duyarlı olan suşlar belirlenmiştir. Ayrıca, tüm suşların EPS üretim kapasiteleri incelenmiş, en yüksek ve en düşük üretim kapasitesine sahip suşlar tespit edilmiştir. Bununla birlikte, tüm suşlar, epitel yüzeye tutunmada bir ön seçim olabileceği düşünülen hemagglütinasyon kabiliyeti açısından test edilmiş ve *B. breve* A28 ile *B. bifidum* A10 suşlarının epitel yüzeye tutunma indeksleri belirlenmiştir.

Birçok araştırmacının ileri sürdüğü gibi verimli bir probiyotik uygulaması için bakterinin insan kaynaklı olması önemlidir. Bu nedenle yaptığımız çalışma, Türkiye’ de yaşayan bireylerde (anne ve bebeklerinde) bulunan bifidobakterilerin araştırıldığı

ilk çalışmadır. Bu çalışma birçok anne ve bebekten alınmış örneklerle yapılmış kapsamlı bir çalışma olmamakla birlikte, Türkiye’ de yaşayan annelerin sütü ve bebeklerinin dışkılarından izole edilen bifidobakterilerin probiyotik özellikleri bakımından bilgiler verecektir. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre suşlar tarafından üretilen EPS’ nin probiyotik kullanım açısından önemli olduğunu vurgulanmıştır. Şöyle ki, EPS üretimi yüksek bifidobakteri suşlarının asitliğe ve safraya daha dirençli olduğu, bununla birlikte epitel hücrelere tutunma kapasitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Özellikle probiyotik kullanım açısından çok önemli bir grup olan bifidobakterilerde bu düzeyde ilk defa yapılmış bir çalışma olması nedeni ile bundan sonra bu alanda yapılacak olan araştırmalar için çok önemli bir kaynak oluşturacağı düşünülmektedir. Ayrıca, bu bakterilerin kolonizasyonunda toplumun beslenme alışkanlıkları, coğrafi koşullar ve bakteri türlerinin farklılığı gibi birçok parametrenin de etkili olduğu düşünülürse, özellikle anne sütü ve anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkılarından izole edilmiş, probiyotik özellikleri araştırılmış üstün nitelikli suşların özellikle bu bölgedeki insanlarda uygulanması ile daha verimli sonuçların alınabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma sonucunda, *B. breve* A28 suşunun asit direnci, safra tuzu toleransı ve EPS üretim kapasitesinin yüksek olması nedeniyle canlılığını koruyarak, bağırsaklara ulaşacağı düşünülmektedir. Ayrıca, üretmiş olduğu EPS aracılığıyla epitel yüzeylere daha kolay kolonize olup, patojenler üzerindeki inhibisyon etkisi sayesinde de epitel yüzeyde *E. coli* gibi patojen mikroorganizmalar için biyolojik bir bariyer oluşturabilecektir. *B. breve* A28 suşunun taşıdığı bütün bu özelliklerinden dolayı sindirim sisteminde canlı kalarak konukçu için yararlı olabileceği düşünüldüğünden, probiyotik mikroorganizma olarak kullanımı önerilmektedir.

Elde ettiğimiz verilere dayanarak probiyotik açıdan üstün özellikli olarak belirlenen suşlar, mide-bağırsak koşullarında canlılıklarını sürdürebilecek ve dolayısı ile probiyotik özelliklerini sergileyebileceklerdir. Bu mikroorganizmaların, probiyotik özellikleri bakımından daha etkin olabilmeleri için, bu bakterilerin prebiyotiklerle desteklenmesinin avantajlı olacağı düşünülmüş ve bu nedenle çalışmamızda probiyotik amaçlı kullanımının uygun olduğu belirlenen bifidobakteriler ile

kullanımı önerilmeyen bifidobakteri suşları, kıyaslamalı olarak prebiyotikle desteklenerek, canlılıkları ve *E. coli* üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Sonuçta üstün nitelikli olarak belirlenen *B. breve* A28 suşunun prebiyotiklerle de desteklenerek daha yüksek verim elde edilmiştir.

Gelecek çalışmalarda, bifidobakterilerin asit direncinin az olması nedeniyle bu özelliği kapsülleme ve benzeri tekniklerle geliştirilerek probiyotik açıdan daha verimli kültürlerin oluşturulması önerilebilir. Aynı zamanda, üstün özelliğe sahip suşlar probiyotik uygulamalar için ticari preparatlar haline getirilebilir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuçların daha sonraki probiyotik çalışmalarına ışık tutacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Gürsoy O., Kınık Ö., Gönen İ., “Probiyotikler ve Gastrointestinal Sağlığa Etkileri”, *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 35: 136-148 (2005).
2. Salminen, S., Isolauri, E. Onnela, T., “Gut microflora in health and disease”, *Chemotherapy*, 41: 5-15 (1995).
3. Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J.H.J., “Overview of gut flora and probiotics”, *Int. J. Food Microbiol.*, 41: 85-101 (1998).
4. Rada, V., Petr J., “Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples”, *Vet. Med.-Czech.*, 47: 1-4. (2002).
5. Bezkorovainy, A., Miller-Catchpole, R., “Biochemistry and physiology of Bifidobacteria”, 2th ed., *CRC Pres.*, Boca Raton, FL, 34-41 (1989).
6. Mitsuoka, T., “Bifidobacteria and their role in human health”, *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 6: 263-268 (1990).
7. Castellani, A., Chalmers, A.J., “Manual of tropical medicine”, 3rd ed., *William Wood and Co.*, New York, 276-297 (1919).
8. De Vries W., Gerbrandy S.J., Stouthamer A.H., “Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*”, *Biochem. Biophys. Acta.*, 136: 415-425 (1967).
9. Holt, J.G.N.R., Krieg, P.H.A., Sneath, T., Staley, Williams, S.T., (Eds), "Genus Bifidobacteria", Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed., *Williams & Wilkins*, Baltimore, MD., 1346–1353 (1993).
10. Bengmark, S., “Pre-, pro and synbiotics”, *Curr. Opin. Clin. Nutr.*, 4: 571-79 (2001).
11. Luckey, T.D., “Bicentennial overview of intestinal microecology”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 30: 1753 (1977).
12. Savage, D.C., “Microbial ecology of the gastrointestinal tract”, *Annu. Rev. Microbiol.*, 31: 107 (1977).
13. Collins, M.D., Ribson, G.R. “Probiotics, prebiotics and Synbiotics: Approaches for modulating the microbial ecology of the gut”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 69: 1052S-75 (1999).

14. Kato, K., Mizuno, S., Umesaki, Y., “Randomized placebo controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis”, *Aliment. Pharm. Therap.*, 20: 1133-1141 (2004).
15. Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., Doyle, J., Jewell, L., De Simone, C., “Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function”, *J. Gastroenterol.*, 121: 580–591 (2001).
16. Beasley, S., “Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota”, *University of Helsinki*, Helsinki, 6-9 (2004).
17. Vural, T., “Probiyotikler”, *XXVII.Türk Mikrobiyoloji Kongresi*, İzmir, 33-34 (1998).
18. Kantha, D., Arunachalam, Ph.D., “Role of Bifidobacteria in nutrition, medicine and technology”, *Nutr. Res.*, 19: (10) 1559-1597 (1999).
19. Fooks L.J., Fuller R., Gibson G.R., “Prebiotics, Probiotics and human gut microbiology”, *Int. Dairy, J.*, 9: 53-61 (1999).
20. Tok, E., Aslim, B., “Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri”, *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 37 (1): 62-68 (2007).
21. İnternet: Iowa State University “Publications”
<http://www.extension.iastate.edu/Publications/NCR332.pdf> (1996).
22. Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K., “Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods”, *Int. J. Dairy. Technol.*, 51(4): 123-135 (1998).
23. Leahy, S.C., Higgins D.G., Fitzgerald G.F. Sinderen Va D., “Getting better with bifidobacteria”, *J. Appl. Microbiol.*, 98: 1303-1315 (2005).
24. Poupard J.A., Husain I., Norris R.F., “Biology of the Bifidobacteria”, *Bacteriol. Rev.*, 37(2): 136-165 (1973).
25. İnternet: Michigan State University “Bifidobacteria and Human Health” (2002).
<http://www.msu.edu/user/hongbao/research/bifid.htm>
26. İnternet: The University of Chicago Medical Center “Images” (2007).
http://www.uchospitals.edu/images/gs/es_1807.gif
27. İnternet: Iowa State University “Bacteria” (2007).
<http://www.isu.edu/images/bacteriology/nutgro.gif>

28. Rohr, M.L., "The Phosphoketolase from *Bifidobacterium lactis*: Biochemistry, Genetics, and Phyloeny", *Swiss Federal Institute of Technology Zurich*, PhD Thesis, 76-88 (2003).
29. Rasic, L.J. Kurman J.A., "Bifidobacteria and their role", *Birkhauser*, *Experientia*, 39:3-34 (1983).
30. Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., "Bifidobacterium spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and threpeutic properties revelant for use as probiotics", *Trends. Food Sci. Techn.*, 10: 139 (1999).
31. Corthier, G., "The health benefits of probiotics" Danone Nutritopics, Route Departementale *Palaiseau Cedex*, France, 17: 1-4 (2004).
32. Mercenier, A., Pavan, S., Pot, B., "Probiotics as Biotherapeutic Agents: Present Knowledge and Future Prospects", *Curr. Pharm. Design.*, 8: 99-110 (2002).
33. Sullivan, A., Nord, C.E., "The place of probiotics in human intestinal infections", *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 20: 313 (2002).
34. Fuller, R., "Probiotics in man and animals", *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 365-383 (1998).
35. Salminen, S., Bouley, C., Boutron- Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M., Rowland, O., "Functional food science and gastrointestinal physiology and function", *Brit. J. Nutr.*, 80 (1): 147 (1998).
36. Klaenhammer, T. R., Kulen, J. M., "Selection and design of properties", *Int. J. Food Microbiol.*, 50: 45-57 (1999).
37. Salminen, S., Ouwehand, A.C., Isolauri E. "Probiotics: an overview of beneficial effects", *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, 82: 279-289 (2002).
38. Gorbach, S.L., "Probiotics and Gastrointestinal Health", *Am. J. Gastroenterol.*, 95(1): 2-4 (2000).
39. Bengmark, S., "Colonic Food; Pre and Probiotics", *Am. J. Gastroenterol.*, 95(1): 5-7 (2000).
40. Lee, Y.K., Salminen, S., "The coming of age of probiotics", *Trends Food Sci. Tech.*, 6: 241-245 (1995).
41. Donohue, D.C., Salminen, S.J., "Safety of probiotic bacteria", *Asia., Pac., J., Clin. Nutr.*, 5: 25-28 (1996).

42. Karahan, Z.C., Güvener, E., “Probiotics”, *J. Infections Diseases and Clinical Microbiol.*, 4(3): 156-162 (1999).
43. Gültekin, M., “Probiyotikler”, *ANKEM Derg.*, 18 (2): 87-89 (2004).
44. Adams, M.R., “Safety of industrial lactic acid bacteria”, *J. Biotechnol.*, 68: 171–178 (1999).
45. Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-Salholm, T., “Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties”, *J. Biotechnol.*, 84: 197-215 (2000).
46. Dunne, C. Myrphy, L. Flynn, S., O’Mahony, L., O’Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G, Daly, C., Kiely, B., Quigley, E.M.M., O’sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K., “Probiotics: From myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials”, *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, 76: 279-292 (1999).
47. Önal, D., “Bazı laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 7-29 (2005).
48. Tahri, K., Crociani, J., Ballongue, J., Schneider, F., “Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol”, *Lett. Appl. Microbiol.*, 21: 149-151 (1995).
49. Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P., “An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria”, *Int. J. Dairy.*, 12: 163-171 (2002).
50. Bouzar, Cerning, J., Desmazeaud, M., ”Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants”, *J. Dairy Sci.*, 79: 205-211 (1996).
51. Hosono, A., Lee, J., Amentoni, A., Natsume, M., Hirayama, M., Adachi, T., Kaminogawa, S., “Characterization of a water-soluble polysaccharides fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M 101-4”, *Biosci. Biotech Bioch.*, 61: 312-316 (1997).
52. Leigh, J.A., Walker, G.C., ”Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function”, *Trends Genet.*, 10: 63-67 (1994).
53. Whitfield, C., Amor, P.A., Koplin, R., “Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer: lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length”, *Mol. Microbiol.*, 23: 629-638 (1997).
54. Sutherland, I.W., “Polysaccharases for microbial exopolysaccharides”, *Carbohydr. Polym.*, 38: 319-328 (1999).

55. Ruas- Madiedo P., De los R.G., “Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria”, *J. Dairy Sci.*, 88: 843–856 (2005).
56. Böke, H., “*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait suşların bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi ve tutuklamanın bu özellikler üzerine etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 4-52 (2005).
57. Duboc, P., Mollet, B., “Applications of exopolysaccharides in the dairy industry”, *Int. Dairy J.*, 11: 759-768 (2001).
58. Tyvaert, G., Morel, C., Joly, J.P., Decaris, B., Charron-Bourgoin, F., “The EPS locus of *Streptococcus thermophilus* IP6757 is not involved in exopolysaccharides production”, *Int. Dairy J.*, 16: 467-473 (2006).
59. Cerning, J., “Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria”, *Fems Microbiol. Rev.*, 87: 113-130 (1990).
60. Korakli, M., Gaonzle, M.G., Vogel, R.F., “Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*”, *J. Appl. Microbiol.*, 92: 958–965 (2002).
61. Welman, A.D., Maddox, S., “Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges”, *Trends Biotechnol.*, 21 (6): 269-274 (2003).
62. Marshall, V.M.E., Cowie, E.N., Moreton, R.S., “Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC330”, *J. Dairy Res.*, 62: 621–628 (1995).
63. Guarner, F., Malagelda, J.R., “Gut flora in health and disease”, *Lancet*, 22: 360-6 (2003).
64. Demain, A.L., “Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 455-463 (1999).
65. El-Adaway, T.A., “Optimum production, stability, partial purification and inhibitory spectrum of antimicrobial compounds produced by *Pediococcus pentosaceus* D1”, *Nahrung/Food*, 45 (2): 118-124 (2001).
66. Anand, S.K., Srinivasan, R.A. Rao, L.K., “Antimicrobial activity associated with *Bifidobacterium-II*”. *Cul. Dairy Product. J.*, 2: 22-21 (1985).

67. Aygün, G., Aslan, M., Yaşar, H., Atlas, K., “Antibiyotikle ilişkili ishal olgularında *Clostridium difficile* toksin A+ B araştırılması”, *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 33; 39-41 (2003).
68. Garsse, J., Herreilers, M., Loveren, H.van., Vos, J., Opperhuizen, A., “Immunomodulation by probiotics: a literature survey”, *RIVM report 340320001*, Bilthoven, 6-33 (2003).
69. Rowland, I.R., Rumney, C.J., Countts, J.T., Lievense, L.C., “Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin a gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats”, *Human Colonic Bacteria* CRC Pres, Boca Raton, 281-285 (1998).
70. Klaver, F. A. M., Van Der Meer, R., “The Assumed Assimilation of Cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* Is Due to Their Bile Salt-Deconjugating Activity”, *Appl. Environ. Microb.*, 59 (4): 1120-1124 (1993).
71. Prestamo, G., Pedrazuelab, A., Penasa, E., Lasuncionc, M.A., Arroyob, G., “Role of buckwheat diet on rats as prebiotic and healthy food”, *Nutr. Res.*, 23: 803-814 (2003).
72. Ocaña, V.S., Bru, E., de Ruiz Holgado, A.A.P., Macías, M.E.N., “Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina”, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 45: 203-212 (1999).
73. Arda M., “Temel mikrobiyoloji”, *Medisan Yayınları*, Üçüncü baskı, Ankara, 302-310 (2006).
74. Coşar, G., “The relationship between fimbriae and hemagglutinating activity of *Salmonella typhimurium* strains”, *Kükem*, 8- 21 (1985).
75. Erdarcan, S., “*Escherichia coli*’ nin hemagglütinasyon yapma özelliği ve hastalık tanısındaki değeri”, Tıp Bilimleri Doktora Tezi, *İstanbul Tıp Fak.*, İstanbul, 15-21 (1985).
76. Mukai, T., Kaneko, S., Ohori, H., “Hemagglutination and glycolipid-binding activities of *Lactobacillus reuteri*”, *Lett. Appl. Microbiol.*, 27: 130-134 (1998).
77. Ouwehand, A.C., Tuomola, E.M., Tölkö, S., Salminen, S., “Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus”, *Int. J. Food Microbiol.*, 64: 119-126 (2001).
78. Coconnier, M.H., Klaenhammer, T.R., Kernéis, S., Fourniat, S., Servin, A.L., “Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture”, *Appl. Environ. Microb.*, 58: 2034-2039. (1992).

79. Green, J.D., Klaenhammer, R.T., “Factors involved in adherence of lactobacilli to human caco-2 cells”, *Appl. Environ. Microb.*, 60: 4487-4494 (1994).
80. Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Grönlund, M., Isolauri, E., Salminen, S.J. “Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus” *Int. Dairy J.*, 9: 623-630 (1999).
81. Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A., “Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions”, *Appl. Environ. Microb.*, 59: 4121-4128 (1993).
82. Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., Gill, S.H., “In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*”, *Int. J. Food Microbiol.*, 67: 207-216 (2001).
83. Ouwehand, A.C., Tuomola, E.M., Tölkö, S., Salminen, S., “Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus”, *Int. J. Food Microbiol.*, 64: 119-126 (2001).
84. Tuomola, E.M., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J., “The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus”, *Fems Immunol. Med. Mic.*, 26:137-142 (1999).
85. Ouwehand, A.C., Seppo, N.P., Salminen, J., “The normal faecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria in vitro”, *Fems Microbiol. Lett.*, 177:35-38 (1999).
86. Bianchi, M.A., Del Rio, D., Pellegrini, N., Sansebastiano, G., Neviani, E., Brighenti, F., “A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells”, *Lett. Appl. Microbiol.*, 39: 301-305 (2004).
87. Morata de Ambrosini, V.L., González, S.N., Oliver, G., “Study of adhesion of *Lactobacillus casei* CRL 431 to ileal intestinal cells of mice”, *J. Food. Protect.*, 62: 1430-1434 (1999).
88. Coconnier, M.H., Klaenhammer, T.R., Kerneis, S., Bernet, M.F., Servin, A.L., “Protein- mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture”, *Appl Environ. Microb.*, 58: 2034-2039 (1992).

89. Sillanpää, J., "Tissue – adherence in lactic acid bacteria identification and characterization of the collagen- binding S-layer protein of *Lactobacillus crispatus*", *Academic Disseration in General Microbiol.*, 28: 1-57 (2001).
90. Tuomola, M.E., Salminen, J. S., Ouwehand, A.C., "Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mukus to investigate adhesion of probiotics", *Lett. Appl. Microbiol.*, 28: 159-163 (1999).
91. Cummings, J.H., Macfarlane, G.T. "Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism", *Clin. Nutr.*, 16: 3-11 (1997).
92. Perrin, S., Warchol, M., Grill J.P. Schneider, F., "Fermentations of fructo-oligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium", *J. Appl. Microbiol.*, 90: 859-865. (2001).
93. Gibson, G.R. Roberfroid, M.B., "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introduction the concept of prebiotics", *J. Nutr.*, 125: 1401-1412 (1995).
94. Modler, H.W., "Bifidogenic factors-sources,metabolism and applications", *Int. Dairy J.*, 4: 383-407 (1994).
95. Flickinger, E.A., Fahey, G.C. Jr., "Pet food and feed applications of inulin, oligofructose and other oligosaccharides", *Brit. J. Nutr.*, 87: 297-300 (2002).
96. Manning, T.S., Gibson, G.R., "Prebiotics", *Best Pract. Res. Cl. GA.*, 18: 287-298 (2004).
97. Bolognani, F., Rumney, C.J., Pool-Zobel, B.L., Rowland, I.R., "Effect of lactobacilli, bifidobacteria and inulin on the formation of aberrant crypt foci in rats", *Eur. J. Nutr.*, 40: 293-300 (2001).
98. Osman, N., Adawi, D., Molin, G., Ahrne, S., Berggren, A., Jeppsson, B., "Bifidobacterium infantis strains with and without a combination of Oligofructose and Inuline (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats", *BMC Gastroenterol.*, 6: 31-37 (2008).
99. Badak, M.İ., Boğa, M., Özkısacık, E.A.: Gürcün, U., Gülmen, Ş., Dişçigil, B., "Açık kalp cerrahisinde profilaktik nazal mupirosin uygulaması", *Türk Göğüs ve Kalp Damar Cerrah. Derg.*, 3 (4): 350-353 (2005).
100. Beerens, H., "Year elective and selective insulation medium for *Bifidobacterium* spp", *Lett. Appl. Microbiol.*, 11: 155-157 (1990).

101. Bibiloni, R., Perez, P.F., De Antoni, G.L., “An enzymatic– colourimetric assay for the quantification of *Bifidobacterium*”. **J. Food Protect.** 63: 322– 326 (2000).
102. Cruikshank, R., “Medical microbiology 11th ed.”, **Livingstone**, London, 356 (1972).
103. Hadadji M., Benama R., Saidi N., Henni D.E., Kihal M., “Identification of cultivable *Bifidobacterium* species isolated from breast-fed infants feces in West-Algeria”, **African J. Biotechn.**, 4 (5): 422-430 (2005).
104. Saidi N, Guessas B, Bensalah F, Badis A, Hadadji M, Henni DE, Prevost H., Kihal, M., “Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides”, **J. Alg. Reg. Arides.**, 1: 01-11 (2002).
105. Samelis, J., Maurogenakis, F., Metaxopoulos, J., “Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami”, **Int. J. Food Microbiol.**, 23: 179-196 (1994).
106. Spelhaug, S.R., Harlander, S.K., “Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*”, **J. Food Protect.**, 52(12): 856-862 (1989).
107. Chung, H.S., Kim, Y.B., Chun, S.L., Ji, G.E., “Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria”, **Int. J. Food Microbiol.**, 47: 25-32 (1999).
108. Succi M, Tremonte P, Reale A, Sorrentino E, Grazia L, Pacifino, F., Coppola, R., “Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolates from Parmigiano Reggiano cheese”, **Fems Microbiol. Lett.**, 244: 129-137 (2005).
109. Jiang, Z.L.Z., Zhou, K., Li,P., Liu, G., Zhang, B., “Screening of bifidobacteria with acquired tolerance to human gastrointestinal tract”, **ANAEROBE** , 13: 215– 219 (2007).
110. Valerie, M.M., Rawson, H.L., “Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt”, **Int. J. Food Sci. Tech.**, 34: 137-143 (1999).
111. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Peters, P.A., Smith, F., “Colorimetric method for determination of sugars and related substances”, **Anal. Chem.**, 28, 350-356 (1956).
112. Reinheimer, J.A., Demkow, M.R., Condioti, M.C., “Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures” , **Aust J. Dairy Technol.**, 5: 5-9 (1990).

113. Harmening, D.S., Walker, P.S., “Alternative technologies in routine blood bank testing”, *Modern Blood Banking and Transfusion Practices*, **F.A. Davis Company**, Philadelphia, 545-558 (1999).
114. Zárate, G., De Ambrosini, V.M., Chaia, A.P., González, A., “Some factors affecting the adherence of probiotic *Propionibacterium acidipropionici* CRL 1198 to intestinal epithelial cells”, **Can. J. Microbiol.**, 48 (5): 449-457 (2002).
115. Houdijk, J.G.M., “Effects of non-digestible oligosaccharides in young pig diets”. PhD Thesis **Wageningen University**, 1-141 (1998).
116. Fuller, R., “Probiotics in man and animals”, **J. Appl. Bacteriol.**, 66: 365–378 (1989).
117. Coşkun, T., “Probitikler”, **Çocuk Sağ. Hastalık. Derg.**, 49 (2): 128-148 (2006).
118. Collins, D.M., Gibson, G.R., “Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbiol ecology of the gut”, **Am J Clin. Nutr.**, 69: 1052-1057 (1999).
119. Scardovi, V., “Genus *Bifidobacterium*”. In Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 7th ed. **Williams & Wilkins**, Baltimore, 122-136 (1986).
120. Requena, T., Burton, J., Matsuki, T., Munro, K., Simon, M.A., Tananka, R., Watanabe, K., Tannock, G.W., “Identification, detection and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene”, **App. Environ. Microb.**, 68: 2420– 2427 (2002).
121. Kim, J.Y., Choi, S.I., Heo, T.R., “Screening of antioxidative activity of *Bifidobacterium* species isolated from Korean infant feces and their identification”, **Biotechnol Bioproc E.**, 8: 199– 204 (2003).
122. Vlkova’ a, E., Nevoralb , J, Jencikovac, B., Godefrooije, J.,Trojanova’a, I., Rada, V., “Detection of infant faecal bifidobacteria by enzymatic methods”, **J. Microbiol. Meth.**, 60: 365– 373 (2005).
123. Vernazza, C.L., Gibson, G.R., Rastal, R.A., “In vitro fermentatation of chitosan derivaties by mixed cultures of human fecal bacteri”, **Carbohydr. Polym.**, 60: 539-545 (2005).
124. Lin, S. Y., Ayres, J. W., Winkler, W., Sandine, W. E., “*Lactobacillus* effects on cholesterol: In vitro and in vivo results”, **J. Dairy Sci.**, 72: 2885-2899 (1988).
125. Huang, Y., Adams, M. C., “In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria”, **Int.. J. Food Microbiol.**, 91: 253-260 (2004).

126. Erkkilä, S., Petäjä, E., “Screening of comerial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use”, *Meat Sci.*, 55: 297-300 (2000).
127. Matsumoto, M., Ohishi, H., Benno, Y., “H⁺ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance”, *Int. J. Food Microbiol.* 93: 109–113 (2004).
128. Collado , C.M., Sanz, Y., “Method for direct selection of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains from human feces based on their acid- adaptation agabeylity”, *J. Microbiol. Meth.*, Doi: 10.1016/j.mimet. 2008.10.007 (2008).
129. Ibrahim, S.A., Bazkorovainy, A., “Survival of bifidobacteria in the presence of bile salts”, *J. Sci. Food Agr.*, 62: 351-354 (1993).
130. Clark, P. A., Martin, J. H., “Selection of Bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: III—Tolerance to simulated bile of human stomachs”, *Cult. Dairy Pro. J.*, 29: 18–21 (1994).
131. Marteu, P., Havenaar, R., Huis In’ t Veld J.H.J., “Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and effect of baile”, *J. Dairy Sci.*, 88: 55-66 (1997).
132. Lionng, M.T., Shah, N.P., “Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of *Lactobacilli* strains”, *J. Dairy Sci.*, 88: 55-66 (2005).
133. Pereira, D.I.A., Gibson, G.R., “Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut”, *Appl. Environ. Microb.*, 68 (9): 4689-4693 (2002).
134. Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., "Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts", *Food Microbiol.*, 17: 205-215 (2000).
135. Haller, D., Colbus, H., Ganzle, M. G., Scherenbacher, P., Bode, C., Hammes, W. P., “Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: A comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin”, *Syst. Appl. Microbiol.*, 24: 218-226 (2001)
136. Berrada, N., Lemeland, J.F., Laroche, G., Thouvenot, P., Piaia, M., “Bifidobacterium from fermented milks: survival during gastric transit”, *J. Dairy Sci.*, 74(2): 409-413 (1991).

137. Roberts, C.M., Fett, W.F., Osman, S.F., Wijey, C., O'Connor, J.V., Hoover, D.G., "Exopolysaccharide production by *Bifidobacterium longum* BB-7", **J. Appl. Bacteriol.**, 78 (5): 463-468 (1995).
138. Cerning, J., "Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy probionobacteria", **Lait**, 75: 463-472 (1995).
139. Ginka, I., Frengova-Simova, E.D., Beshova, D.M., Simov, Z.I., "Production and monomer composition of exopolysaccharides by yogurt starter cultures", **Can. J. Microbiol.**, 46: 1123-27 (2000).
140. Desai, K.M., Akolkar, S.K., Badhe, Y.P., Tambe, S.S., Lele, S.S., "Optimization of fermentation media for exopolysaccharide production from *Lactobacillus plantarum* using artificial intelligence-based techniques", **Process Biochem.**, 41: 1842-1848 (2006).
141. Sanchez, J.I., Martinez, B., Guillen, R., Jimenez-Diaz, R., Rodriguez, A., "Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26", **Appl. Environ. Microb.**, 72: 7495-7502 (2006).
142. Halkman, K., "Tarım Mikrobiyolojisi", **Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Yayınları**, Ankara, 1214: 82 (1991).
143. Rodriguez, J.M., Martinez, M.I., Horn, N., Dodd, H.M., "Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria", **Int. J. Food Microbiol.**, 80: 101-116 (2003).
144. Attaie, R., Whalen, P.J., Shahani, K.M., Amer, M.A. (vic), "Inhibition growth of *Staphylococcus aureus* during production of acidophilus yoghurt", **J. Food Protect.**, 50 (3): 224-228 (1987).
145. Okereke, A., Montville, T.J., "Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria", **J. Food Protect.**, 54(5): 349-353 (1999).
146. Reid, G., McGroarty, J.A., Angotti, A. and Cook, R.L., "*Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens", **Can. J. Microbiol.**, 34: 344-351 (1988).
147. Gibson, G.R., Wang, X., "Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria", **Appl. J. Bacteriol.** 77: 412- 420 (1994).
148. Coşar, G., "Bakteri fimbriyaları", **İnfeksiyon Derg.**, 2: 429 (1988).

149. Perez, P.F., Minnaard, Y., Disalvo, E.,A, Antoni, G.L.D., “Surface properties of bifidobacterial strains of human origin”, *Appl. Environ. Microb.*, 64: 21–26 (1998).
150. Mukai, T., Kaneko, S., Ohori, H., “Hemagglutination and glycolipid-binding activities of *Lactobacillus reuteri*”, *Letters Appl. Microbiol.*, 27: 130-134 (1998).
151. Fernández, M.F., Boris, S., Barbés, C., “Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract”, *App. Microbiol. Biot.*, 94: 449-455 (2003).
152. Bibiloni, R., Perez, P.F., De Antoni, G.L., “Factors Involved in Adhesion of Bifidobacterial Strains to Epithelial Cells in Culture”, *Anaerobe*, 5: 483-485 (1999).
153. Alander M. Satokari R, Korpela R, “Persistence of colonization of human colonic mucus by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG after oral consumption”, *Appl. Environ. Microb.*, 65: 351–354 (1999).
154. Fang H., Ouwehand, AC., Isolauri, E., Hosoda, M., Benno, Y., Salminen, S., “Differences in Composition and Mucosal Adhesion of Bifidobacteria Isolated from Healthy Adults and Healthy Seniors”, *Curr. Microbiol.*, 43: 351-354 (2001).
155. Beachey, E.H., “Bacterial adherence: adhesin receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces”, *J. Infect. Dis.*, 143: 325-345 (1981).
156. Havenaar, R., Brink, B., Huis in't Veld, J.H. “Selection of strains for probiotic use: In Probiotics, the scientific basis”, R. Fuller. *Chapman & Hall*, London, 209-224 (1992).
157. Abbad Andaloussi S., Talbaoui, H., Marczak, R., Bonaly, R., “Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*”, *Appl. Microbiol. Biot.*, 43: 995-1000 (1995).
158. Looijesteijn, P.J., Trapet, L., De Vries, E., Abee, T., Hugenholtz, J., “Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*”, *Int.. J. Food Microbiol.*, 64: 71-80 (2001).
159. Hood, S.K., Zottola, E.A., “Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells”, *J. Food Sci.*, 53: 1514-1516 (1998).

160. Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Grönlund, M., Isolauri, E., Salminen, S.J., “Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus”, *Int. Dairy J.*, 9: 623-630 (1999).
161. Roselli, M., Finamore, A., Britti, M.S., Mengheri, E., “Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88”, *Brit. J. Nutr.*, 95: 1177–1184 (2006).
162. Servin, A.L., “Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens”, *Best Pract. Res. Cl. Ga.*, 17(5): 741–754 (2003).
163. Ram, C., Chander, H., “Optimization of culture conditions of probiotic bifidobacteria for maximal adhesion to hexadecane”, *World J. Microb. Biot.*, 19: 407–410 (2003).
164. Collins, M. D., Gibson, G.R., “Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 69:1052–1057 (1999).
165. Roberfroid, M.B., Van Loo, J.A.E., Gibson G.R., “The bifidogenic nature of the colonic mucosa in man”, *Gut.*, 21: 793-798 (1998).
166. Kruse, H., Kleessen, P., Blaut, M., “Effect of inulin on faecal bifidobacteria in human subjects”, *Brit. J. Nutr.*, 82: 375-382 (1998).
167. Sharp, R., Fishbain, S., Macfarlane, G.T., “Effect of short-chain carbohydrates on human intestinal bifidobacteria and *Escherichia coli* in vitro”, *J. Med. Microbiol.*, 50: 152-160 (2001).
168. Wargovich, M.J., Uda, N., Woods, C., Velasco, M., Mc. Kee, K., “Allium vegetables: their role in the prevention of cancer”, *Biot. Biochem. Soc. T.*, 24(3): 811-4 (1996).
169. Furrie, E., Macfarlane, S., Kennedy, A., Cummings J. H., Walsh S. V., O’neil D.A., Macfarlane, G.T., “Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy I) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial”, *Gut.*, 54: (2) 242-9 (2005).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ALP, Gülçin
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 06.10.1983 ANKARA
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (539) 871 99 70
e-mail : alp.gulcin@yahoo.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2005
Lise	Ankara Lisesi	2000

Yabancı Dil

İngilizce