

T.C.
AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN KAYNAKLI VAJEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN BAZI PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esin KIRAY

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KIRŞEHİR 2017

T.C.
AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN KAYNAKLI VAJEN LAKTİK ASİT
BAKTERİLERİNİN BAZI PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esin KIRAY

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ

KIRŞEHİR 2017

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan
Prof. Dr. Ahmet Hilmi ÇON

Üye
Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ

Üye
Prof. Dr. Kamil IŞIK

Üye
Prof. Dr. Harun ÇİFTÇİ

Üye
Doç. Dr. Belgin ERDEM

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

20/10/2017

Prof. Dr. Yılmaz ALTUN
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek yazıldığını, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Esin KIRAY



İNSAN KAYNAKLI VAJEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Doktora Tezi

Esin KIRAY

Ahi Evran Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

ÖZET

Bu çalışmada; Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran yaş aralığı 18-45 arasında değişen, menopoza girmemiş, herhangi bir doğum kontrol yöntemi ile korunmayan ve 3 ay süre içerisinde antibiyotik kullanmamış sağlıklı 60 kadının vajinal bölgelerinden sürüntü örnekleri alınarak izole edilmiş olan Laktik asit bakterileri (LAB) kullanılmıştır. 16S rDNA dizi analizine göre yapılan tanımlama sonucunda, seçilen 20 adet izolatdan 7 farklı tür elde edilmiştir. Çalışmamızda en sık görülen türü %25 oranla *L. plantarum* oluştururken, bu suşu %20 oranla *L. rhamnosus* ve *L. paracasei*, %15 oranla *P. acidilactici* ve %5 oranla *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. crispatus* ve *Lactobacillus* spp. suşları takip etmektedir. Tanımlanan suşların in vitro koşullarda çeşitli probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Değişik pH koşullarında (2.0, 2.5 ve 3.0) asitliğe en dirençli suşlar *P. acidilactici* L6, *L. rhamnosus* L8, *L. plantarum* L9, *P. acidophilus* L11, *L. rhamnosus* L15 ve *L. plantarum* L18 olarak tespit edilmiştir. Yüksek safra tuzu konsantrasyonlarında (%0.3, %0.5 ve %1.0) *L. plantarum* L9, *L. plantarum* L16, *L. plantarum* L18, *L. plantarum* L19 ve *L. plantarum* L21 suşları canlılıklarını koruyabilmiştir. Suşların antimikrobiyal aktivitelerinde özellikle tedavide kullanılan antibiyotikler için yüksek dirençlilik düzeyleri tespit edilmiş olup gentamisin, tobramisin ve amikasin antibiyotiklerine karşı bütün suşların dirençli olduğu görülürken vankomisin ve teikoplanin antibiyotiklerine ise suşların %80'nin dirençli olduğu tespit edilmiştir. LAB'nin antagonistik aktivitelerini belirlemek için 19 farklı patojen mikroorganizma

kullanılmış ve suşların genel olarak patojenlere karşı inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. Suşların kolesterol asimilasyon kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada en yüksek kolesterol asimilasyonu yapan suşların %39.65 oranla *L. gasseri* L10 ve *L. paracasei* L20 suşları olduğu tespit edilmiştir. Otogregasyon çalışmasında, 4. saatin sonunda *L. plantarum* L16 suşunun %85.2 oranla en yüksek otoagregasyon kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Koagregasyon çalışmasında ise *E. coli* ATCC 25922 ile en iyi koagregasyon yapan suşun %47.32 oran ile *L. plantarum* L9, *C. albicans* ATCC 10231 ile en iyi koagregasyon yapan suşun da %52.05 oran ile L5 suşu olduğu belirlenmiştir. Vajinal LAB'nin HeLa (Human servikal kanser hücre hattı) ve Caco-2 (insan kolon karsinoma hücre hattı) kanser hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisinin belirlendiği çalışmada ise *L. paracasei* L1, *L. rhamnosus* L8, *L. rhamnosus* L12, *L. rhamnosus* L13 ve *L. plantarum* L19 suşlarının önemli bir antiproliferatif etki yarattığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak izole edilen suşların pek çoğunun probiyotik potansiyele sahip olduğu, özellikle *L. plantarum* L9 ve L16 suşlarının tek başına veya diğer *Lactobacillus* suşları ile birlikte oral ya da vajinal preparasyonların üretiminde kullanılabilecek olası adaylar olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterileri, vajinal mikroflora, probiyotik, HeLa, Caco-2

Sayfa Adedi: xiv+169

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ

THE INVESTIGATION OF SOME PROBIOTIC PROPERTIES OF HUMAN RESOURCES VAGINA LACTIC ACID BACTERIA

PhD Thesis

Esin KIRAY

Ahi Evran University

Institute of Sciences

ABSTRACT

In this study, the isolated Lactic acid bacteria (LAB) which were gathered by taking swab samples from the vaginal areas of 60 healthy women who applied to Kırşehir Ahi Evran University Training and Research Hospital, who were between the ages of 18 and 45, who did not go through menopause, who did not carry out birth control with any contraceptive method, and had not use antibiotics within 3 months were used. As a result of the identification that was done according to 16S rDNA sequence analysis, 7 different species were obtained from 20 selected isolates. In our study, *L. plantarum* was the most frequently seen species with the rate of %25, and this strain was followed by the strains of *L. rhamnosus* and *L. paracasei* with 20%, by *P. acidilactici* with 15%, and by *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. crispatus* and *Lactobacillus* spp. with %5. Various probiotic properties of the identified strains were investigated at in vitro conditions. At different pH conditions (2.0, 2.5 and 3.0), the strains that were resistant to the acidity at the highest level were identified as *P. acidilactici* L6, *L. rhamnosus* L8, *L. plantarum* L9, *P. acidophilus* L11, *L. rhamnosus* L15, and *L. plantarum* L18. *L. plantarum* L9, *L. plantarum* L16, *L. plantarum* L18, *L. plantarum* L19 and *L. plantarum* L21 strains were able to protect their vitality in high bile salt concentrations (0.3%, 0.5%, and 1.0%). High levels of resistance were determined in antimicrobial activities of strains, in particular for the antibiotics that

are used in therapy; and against gentamicin, tobramycin and amikacin antibiotics all strains were found to be resistant, while they were found to be 80% resistant to vancomycin and teicoplanin antibiotics. 19 different pathogenic microorganisms were used in order to determine antagonistic activities of LAB, and it was determined that strains generally have an inhibitory effect against pathogens. In the study that was carried out to determine the cholesterol assimilation capacities of the strains, it was determined that the strains that assimilate cholesterol in the highest rate were *L. gasseri* L10 and *L. paracasei* L20 strains with the rate of 39.65%. In the autoaggregation study, at the end of the 4th hour, *L. plantarum* L16 strain was found to have the highest autoaggregation capacity with the rate of 85.2%. In the coaggregation study, it was determined that the strain that makes the best coaggregation with *E. coli* ATCC 25922 was *L. plantarum* L9 with the rate of 47.32%, and the strain that makes the best coaggregation with *C. albicans* ATCC 10231 is the L5 strain with the rate of 52.05%. In the study that the antiproliferative effect of vaginal LAB on HeLa (human cervical cancer cell line) and Caco-2 (Human Colon Carcinoma Cell Line) cancer cell line was identified, it was observed that *L. paracasei* L1, *L. rhamnosus* L8, *L. rhamnosus* L12, *L. rhamnosus* L13 and *L. plantarum* L19 strains create an important antiproliferative effect. As a result, it is considered that most of the isolated strains have probiotic potential; and that, *L. plantarum* L9 and L16 strains, alone or in combination with other strains of *Lactobacillus*, are the potential candidates that can be used for the production of oral or vaginal preparations.

Key Words: Lactic acid bacteria, vaginal microflora, probiotic, HeLa, Caco-2

Number of Pages: xiv+169

Thesis Advisor: Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamızın planlanması, yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilmesinin her aşamasında bilgi, birikim ve deneyimlerini paylaşan ve her türlü yardımı ve desteği esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca izolatların moleküler tanı sonuçlarının değerlendirilmesinde her türlü desteği sağlayan sayın Doç. Dr. Elif SEVİM hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Kıymetli bilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sayın Doç. Dr. Belgin ERDEM hocama, tez örneklerimin toplanması aşamasında büyük özveri göstererek yardımlarını esirgemeyen sayın Yard. Doç. Dr. Selda Songur DAĞLI hocama, laboratuvar çalışmalarında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım sayın Dr. Şener TULUMOĞLU hocama, hücre kültürü laboratuvar çalışmalarımda emeğini esirgemeyerek her türlü desteği sağlayan Doç. Dr. Serap Yalçın AZARKAN hocama, Ahi Evran Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Laboratuvar imkanlarından faydalanmama yardımcı olan sayın Yard. Doç. Dr. Özlem AYDIN hocama ve laboratuvar çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen Melike ALTUNTAŞ'a gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Benim bu günlere gelmemde büyük emekleri olan maddi ve manevi her zaman yanımda olan aileme ve eşim E. Kemal KIRAY'a sonsuz sevgilerimi sunarım.

Saygılarımla.

Bu çalışma Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri PYO-FEN.4001.16.012 kapsamında desteklenmiştir.

Esin KIRAY

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	İ
ABSTRACT.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar DİZİNİ	İX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	Xİ
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	Xİİİ
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. VAJİNAL MİKROFLORA.....	4
2.1.1. Vajinal Mikrofloranın Tarihçesi.....	4
2.1.2. Vajinal Mikrofloranın Özellikleri	6
2.2. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ	10
2.2.1. <i>Lactobacillus</i> Cinsi Bakterilerinin Genel Özellikleri	13
2.2.2. <i>Lactobacillus</i> 'ların Vajen Mikroflorasındaki Önemi	14
2.2.3. Probiyotikler	16
2.2.3.1. Probiyotiklerin tanımı ve tarihçesi	16
2.2.3.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	17
2.2.3.3. Prebiyotikler ve sinbiyotikler.....	18
2.2.3.4. Probiyotik mikroorganizmalarda aranan özellikler.....	18
2.2.3.5. Probiyotiklerin etki mekanizmaları.....	20
2.2.3.6. Probiyotik seçim kriterlerinde istenen özellikler	22
2.2.3.6.2. Antimikrobiyal aktivite	23
2.2.3.6.3. Epitel yüzeye tutunma ve önemi	28
2.2.3.6.4. Kolesterol asimilasyonu	31
2.2.3.6.5. Ürogenital enfeksiyonlar ve probiyotikler.....	34
2.2.3.6.6. Klinik denemeler	36
2.2.3.6.7. Viral enfeksiyonlar ve probiyotikler	38

2.2.3.6.8. Probiyotiklerin kanser ile ilişkisi.....	39
3. MATERYAL VE METOD	43
3.1. MATERYAL	43
3.1.1. Vajinal LAB'nin Kültürleri ve Gelişme Koşulları	43
3.1.2. Vajinal LAB Kültürlerinin Saklanması	45
3.1.3. Kültür Ortamları	45
3.1.4. Tampon ve Çözeltiler.....	45
3.1.5. Moleküler Markörler.....	46
3.1.6. Çözelti ve Malzemelerin Sterilizasyonu	46
3.2. METOD	46
3.2.1. Materyallerin Toplanması.....	46
3.2.2. Vajinal LAB'nin İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....	47
3.2.2.1. Vajinal LAB'nin kısmi karakterizasyonu	47
3.2.2.2. Vajinal LAB'nin biyokimyasal testleri	48
3.2.2.3. Vajinal LAB'nin genotipik karakterizasyonu	48
3.2.2.3.1. Vajinal LAB'nin genomik DNA izolasyonu.....	49
3.2.2.3.2. Vajinal LAB'nin agaroz jel elektroforezi.....	49
3.2.2.3.3. Vajinal LAB DNA'larının PZR ile çoğaltılması.....	50
3.2.2.3.4. Vajinal LAB'nin 16S rDNA bölgesinin baz dizisinin belirlenmesi ve izolatların tanımlanması	51
3.2.2.4. Vajinal LAB'nin probiyotik özelliklerinin belirlenmesi.....	51
3.2.2.4.1. Vajinal LAB'nin hemolitik aktivite testi.....	51
3.2.2.4.2. Vajinal LAB'nin asit ve safra toleransı.....	52
3.2.2.4.3. Vajinal LAB'nin pH değişimi üzerine etkisi.....	53
3.2.2.4.4. Vajinal LAB'nin laktik asit miktarlarının belirlenmesi	53
3.2.2.4.5. Vajinal LAB'nin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi.....	54
3.2.2.4.6. Vajinal LAB'nin patojen mikroorganizmalar üzerindeki antagonistik aktivitesinin belirlenmesi	54
3.2.2.4.7. Vajinal LAB'nin hidrojen peroksit üretim yeteneklerinin belirlenmesi	55
3.2.2.4.8. Vajinal LAB'nin kolesterol asimilasyon kapasitelerinin belirlenmesi	56

3.2.2.4.9. Vajinal LAB'nin enzim profillerinin belirlenmesi.....	57
3.2.2.4.10. Vajinal LAB'nin otoagregasyon ve koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi	57
3.2.2.4.11. Vajinal LAB'nin üroepitelyal hücrelere bağlanması	59
3.2.2.5. Kanser hücre hatları ve gelişim koşulları.....	59
3.2.2.6. Vajinal LAB'nin kültür süpernatantlarının hazırlanması.....	60
3.2.2.7. Vajinal LAB'nin XTT (Hücre proliferasyon kiti) testi	61
4. BULGULAR.....	62
4.1. VAJİNAL SÜRÜNTÜLERDEN ELDE EDİLEN LAB'NİN İZOLASYONU.....	62
4.1.1. Vajinal LAB Seçimi Yapılan Hastalar.....	62
4.1.2. Vajinal LAB'nin Morfolojik Karakterizasyonu	63
4.1.3. Vajinal LAB'nin Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	64
4.1.4. Vajinal LAB'nin Genotipik Karakterizasyonu	67
4.2. VAJİNAL LAB'NİN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ.....	72
4.2.1. Vajinal LAB'nin Hemolitik Aktivite Testi.....	72
4.2.2. Vajinal LAB'nin Asit ve Safra Toleransı	73
4.2.3. Vajinal LAB'nin pH Değişimi Üzerine Etkisi ve Laktik Asit Miktarlarının Belirlenmesi	77
4.2.4. Vajinal LAB'nin Antibiyotik Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi	78
4.2.5. Vajinal LAB'nin Patojen Mikroorganizmalar Üzerinde Antagonistik Aktivitesinin Belirlenmesi	82
4.2.6. Vajinal LAB'nin Hidrojen Peroksit Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi.....	86
4.2.7. Vajinal LAB'nin Kolesterol Asimilasyon Kapasitelerinin Belirlenmesi ..	87
4.2.8. Vajinal LAB'nin Enzim Profillerinin Belirlenmesi.....	89
4.2.9. Vajinal LAB'nin Otoagregasyon ve Koagregasyon Özellikleri.....	93
4.2.10. Vajinal LAB'nin Üroepitelyal Hücrelere Bağlanma Özelliği	99
4.2.11. Vajinal LAB'nin HeLa ve Caco-2 Hücre Hatları Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi.....	100
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	105
6. KAYNAKLAR	125
7. EKLER.....	143

TABLULAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. Sağlıklı vajinal mikroflorada en sık izole edilen bakteri türleri.....	8
Tablo 2.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.....	17
Tablo 2.3. Ticari uygulamalarda kullanılabilecek probiyotik adayların seçim kriterleri.....	19
Tablo 2.4. Probiyotiklerin yararlı etkileri ve muhtemel etki mekanizmaları.....	21
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri, gelişme ortamları ve uygun gelişim sıcaklıkları.....	44
Tablo 3.2. API-ZYM ile test edilen enzimlerin listesi.....	57
Tablo 4.1. Seçilen 20 adet vajinal LAB'sinin izole edildiği hastalara ait bazı kişisel bilgiler.....	62
Tablo 4.2. Vajinal LAB'nin API 50 CHL sonuçları.....	66
Tablo 4.3. Vajinal LAB'nin API 50 CHL sonucuna göre tanımlama sonuçları	67
Tablo 4.4. Vajinal LAB'nin API 50 CHL ve 16S rDNA gen bölgesi dizi analizi sonucuna göre elde edilen türlerin karşılaştırılmalı tablosu.....	69
Tablo 4.5. DNA dizi analizi sonucunda tanımlanan vajinal LAB'nin suş numaraları ve GenBank accession numaraları.....	70
Tablo: 4.6. Vajinal LAB'nin düşük pH ortamlarındaki canlılık düzeyleri.....	75
Tablo 4.7. Vajinal LAB'nin farklı safra tuzlarındaki canlılık oranları.....	76
Tablo 4.8. MRS sıvı besiyerinde 37°C'de 18 saat geliştirilmiş olan vajinal LAB'nin besiyerindeki pH değişimi üzerine etkisi ve ürettikleri laktik asit miktarları	77
Tablo 4.9. Vajinal LAB'nin antibiyotik duyarlılık profili.....	80
Tablo 4.10. Vajinal LAB'nin antimikrobiyal etkinliği	84

Tablo 4.11. Vajinal LAB'nin hidrojen peroksit üretim miktarları.....	86
Tablo 4.12. Vajinal LAB'nin % kolesterol giderim oranları	88
Tablo 4.13. API-ZYM test kitinde bulunan enzimler ve numara karşılıkları.....	90
Tablo 4.14. Vajinal LAB'nin API ZYM test kitinde bulunan enzimler ile girdikleri reaksiyon oranları.....	92
Tablo 4.15. Vajinal LAB'nin % otoagregasyon değerleri.....	94
Tablo 4.16. Vajinal Vajinal LAB'nin çeşitli patojenlere karşı 4. saatin sonundaki % koagregasyon değerleri.....	96
Tablo 4.17. Vajinal LAB'nin üroepitelyal hücelere bağlanma dereceleri.....	99
Tablo 4.18. Vajinal LAB'nin HeLa hüceleri üzerindeki antiproliferatif etkilerini gösteren LD50 değerleri.....	101
Tablo 4.19. Bazı LAB'nin HeLa ve Caco-2 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkilerini gösteren LD ₅₀ değerlerinin karşılaştırmalı tablosu.....	103

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Labfreez FD-10-R liyofilizasyon cihazının görüntüsü.....	61
Şekil 3.2. 96 kuyucuklu plak üzerinde XTT hücre proliferasyon kitinin şematik görünümü.....	61
Şekil 4.1. Vajinal mikrofloradan izole edilen 7 farklı türün gram boyama görüntüleri.....	64
Şekil 4.2. Vajinal mikrofloradan izole edilen bazı suşlara ait 24. saat API 50 CHL test kiti görüntüleri.....	65
Şekil 4.3. Vajinal LAB'ne ait PZR ürünlerinin 1600 bp uzunluğundaki 16S rDNA gen bölgesi.....	68
Şekil 4.4. Vajinal mikrofloradan izole edilen suşların yakın ilişkili türler ile Jukes-Cantor modele dayalı fiolgenetik ağaç görüntüsü.....	71
Şekil 4.5. 16S rDNA gen bölgesi dizi analizi sonuçlarına göre LAB'nin tür düzeyindeki dağılımının dairesel grafik üzerindeki görünümü.....	72
Şekil 4.6. L11 suşunun hemolitik zon görüntüsü.....	73
Şekil 4.7. Bazı vajinal izolatların antibiyogram görüntüleri.....	81
Şekil 4.8. Vajinal LAB'nin antibiyotiklere karşı direnç yüzdeleri.....	81
Şekil 4.9. Vajinal LAB'nin bazı patojen mikroorganizmalar üzerindeki inhibisyon zonlarının görüntüleri.....	83
Şekil 4.10. Vajinal LAB'nin %kolesterol asimilasyon değerlerinin grafik üzerinde gösterimi.....	89
Şekil 4.11. Bazı vajinal LAB'nin API ZYM test striplerindeki reaksiyon görüntüleri.....	90
Şekil 4.12. <i>L. paracasei</i> L2 suşunun 1.(a), 2.(b), 3.(c), 4.(d) saatlerdeki otoagregasyonun ışık mikroskobundaki görüntüleri (100x).....	95
Şekil 4.13. <i>L. rhamnosus</i> L13 suşunun 1.(a), 2.(b), 3.(c), 4.(d) saatlerdeki otoagregasyonun ışık mikroskobundaki görüntüleri (100x).....	95

Şekil 4.14. <i>L. paracasei</i> L1 suşunun <i>C. albicans</i> ATCC 10231 suşu ile 1.(a), 2.(b), 3.(c), 4.(d) saatlerdeki koagregasyonunun ışık mikroskopundaki görüntüleri (100x).....	97
Şekil 4.15. <i>L. rhamnosus</i> L13 suşunun <i>E. coli</i> ATCC 25922 suşu ile 1.(a), 2.(b), 3.(c), 4.(d) saatlerdeki koagregasyonunun ışık mikroskopundaki görüntüleri (100x).....	97
Şekil 4.16. <i>L. plantarum</i> L21 suşunun <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 suşu ile 1.(a), 2.(b), 3.(c), 4.(d) saatlerdeki koagregasyonunun ışık mikroskopundaki görüntüleri (100x).....	97
Şekil 4.17. Vajinal LAB'nin 4. saatin sonundaki % koagregasyon oranlarının grafik üzerindeki görünümü.....	98
Şekil 4.18. Bazı vajinal LAB'nin üroepitelyal hücreler ile 3. saatin sonundaki gram boyama görüntüleri.....	100
Şekil 4.19. 96 kuyulu plaklarda A: L8 suşunun ve B: L1 suşunun XTT kiti sonuçlarının görüntüsü	101
Şekil 4.20. XTT hücre proliferasyon kiti kullanılarak L1, L8, L12, L13 ve L19 suşlarının ekstrakte metabolit ürünlerinin HeLa hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinin grafik olarak gösterimi.....	102
Şekil 4.21. XTT hücre proliferasyon kiti kullanılarak L1, L8, L12, L13 ve L19 suşlarının ekstrakte metabolit ürünlerinin Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinin grafik olarak gösterimi.....	104

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGS	İnsan mide kanser hücre hattı
ARDRA	Amplifiye ribozomal DNA Restriksiyon Analizi
BV	Bakteriyal Vaginosis
BLAST	Basic Local Alingment Search Tool
Caco-2	İnsan kolon karsinoma hücre hattı
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik asit
FAO	Gıda ve Tarım Organizasyonu
GSBL	Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz
GIS	Gastrointestinal sistem
HeLa	Human servikal kanser hücre hattı
HIV	İnsan İmmun Yetmezlik Virüsü
HPV	Human Papilloma Virus
HSV-2	Herpes Simpleks Virüs
HT-29	İnsan kolorektal kanser hücre hattı
HUVEC	İnsan göbek bağı damar endotel hücresi
LAB	Laktik asit bakterleri
LDH	Laktat dehidrogenaz
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MCF-7	İnsan meme kanser hücre hattı
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
rDNA	Ribozomal DNA
RNA	Ribonükleik Asit
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
ROS	Reaktif Oksijen Türleri

SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamit Jel Elektroforezi
WHO	Dünya Sağlık Organizasyonu
UV	Ultraviyole
XTT	Hücre proliferasyon kiti
OD	Optik Yoğunluk
log	Logaritma
kb	Kilobaz
bç	Baz Çifti
Mb	Megabaz
cfu/ml	Mililitredeki Koloni Oluşturan Birim
kDa:	Kilo Dalton
sn	Saniye
dk	Dakika
cm	Santimetre
L	Litre
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
mm	Milimetre
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
g	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
ng	Nanogram
M	Molar
N	Normal
rpm	Dakikada Devir Sayısı
pH	Asitlik-Bazlık Birimi
°C	Santigrat Derece

1. GİRİŞ

Sağlıklı kadınların vajinal mikrofloraları tipik olarak anaerobik ve aerobik mikroorganizmaların çeşitliliğinden oluşmaktadır. Bu vajinal mikroflorada *Lactobacillus* cinsine ait bakteri türleri baskın olarak bulunmasının yanında *Leuconostoc* spp, *Pediococcus* spp., *Streptococcus* spp. ve *Weisella* spp. gibi laktik asit bakteri (LAB) grubuna ait diğer türlerde bulunabilmektedir¹. Vajinal mikroflora; yaş, cinsel aktivite, menstürel döngü, hamilelik, sigara, çevresel koşullar, ekzojen hormonlar, doğum kontrol haplarının kullanımı, gebelik önleyici aletlerin kullanımı, hijyen koşulları (vajen duşu) ve yabancı cisimler (tampon) gibi faktörlerin etkisi sonucu değişebilmektedir^{2,3,4}.

Vajinal mikroflorada baskın olarak bulunan *Lactobacillus* cinsi üyeleri, vajinal bölgede öncelikle ürettikleri laktik asit, asetik asit, ketoglutarik ve melonik asit gibi organik asitler ile düşük pH ortamını sağlayarak patojenik mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmeleri, mikro pilileri ile vajinal epitel hücrelerdeki reseptörlere yapışmaları ve koagregasyon yetenekleri ile patojen mikroorganizmaların bağlanmalarını engelleme gibi yetenekleri ile vajinal mikroflorada koruyucu rol üstlenirler. Buna ek olarak organik asitler, hidrojen peroksit (H₂O₂), karbondioksit (CO₂), diasetil, asetaldehit, reuterin, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri antimikrobiyal bileşikler üreterek patojen ve kontaminant organizmaların gelişimlerini inhibe eder ve çoğalmalarını kontrol altına alırlar^{5,6,7}.

Son yıllarda LAB'leri ürogenital enfeksiyonlardan korunma, tedavi ve hastalık semptomlarını azaltmak için çeşitli probiyotik ürünler kullanılmaya başlanmıştır^{1,8}.

Probiyotikler yeterli miktarda tüketildiklerinde insan ve hayvan sağlığına yararlı olan, canlı mikrobiyal gıda ürünleri olarak tanımlanmaktadır. En yaygın kullanılan probiyotik bakteriler arasında *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri yer almaktadır⁹.

Probiyotik karaktere sahip olabilecek bir mikroorganizmanın gerek kullanılacağı gıda sanayisindeki teknolojik yönleri, uygulanabilirliği ve dayanıklılığı gerekse hedef tüketicinin sağlığı üzerinde yaratacağı olumlu etkiler temel alınarak bir takım seçim kriterlerini taşıması gerekmektedir⁹. Bu kriterlerin başında suşların insan orjinli olması, asit ve safra tuzlarına karşı direnç gösterebilmeleri ve gastrointestinal sistemde canlılıklarını uzun süre sürdürebilmeleri gelmektedir. Ayrıca suşların bağırsak mukozasına ve epitel dokulara bağlanabilme yeteneğinin olması da önemli bir probiyotik seçim kriteridir. Suşların antimikrobiyal maddeler üretme, antibiyotiklere karşı direnç gösterebilme ve patojenleri inhibe edebilme kabiliyeti de istenen özellikler arasındadır¹¹.

Ürogenital enfeksiyonlar her yıl yaklaşık olarak bir milyon kadını etkilemekte ve oldukça fazla sağlık bakım masraflarına sebep olmasının yanında yeni doğan ve kadınlarda yüksek morbidite ve mortaliteye de neden olmaktadır¹². Bu enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklerin yaygın olarak kullanımının vajinal mikrofloranın bozulmasına, idrar yolu enfeksiyonlarına sebep olan antibiyotiklere dirençli bakteri sayısının artmasına ve dolayısıyla yüksek mali giderlere sebebiyet vermesinden dolayı son yıllarda korunmada etkili olabilecek antibiyotik olmayan alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda bilim insanları tarafından *Lactobacillus* içeren probiyotik kapsüllerin ya da vajinal ovüllerin alternatif olabileceği düşünülmekte ve üstün probiyotik özelliklere sahip suşların detaylı tanısı üzerine çalışmalar devam etmektedir^{13,14,15}.

Bu doğrultuda planlanan doktora tez çalışmasında; Kırşehir bölgesinde sağlıklı kadınların vajinal mikroflorasından izole edilen LAB'nin asit ve safra toleransları, antagonistik ve antimikrobiyal aktiviteleri, laktik asit ve H₂O₂ üretim kabiliyetleri, otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri, kolesterol giderimleri, üroepitelyal hücrelere bağlanma kapasiteleri gibi evrensel kriterler kullanılarak probiyotik özelliklerinin araştırılması, ayrıca HeLa [Human Cervical Carcinoma Cell (insan servikal kanser hücresi)] ve Caco-2 [Human Colon Carcinoma Cell Line (insan kolon karsinoma hücre hattı)] hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Ülkemizde vajen probiyotikleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur ve evrensel düzeyde bize ait probiyotik bir organizma bulunmamaktadır. Bu nedenle potansiyel probiyotik karakterlere sahip türlerin belirlenmesine ihtiyaç vardır. İleride yapılacak kapsamlı projelerin başlangıç aşamasını oluşturacak olan çalışmamız, ürogenital enfeksiyonların tedavisinde etkili olabilecek yeni probiyotik formülasyonlar geliştirilmesine katkı sağlayabilecek suşların belirlenmesine yönelik olması açısından kayda değer olacağı düşünülmektedir.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. VAJİNAL MİKROFLORA

2.1.1. Vajinal Mikrofloranın Tarihçesi

Vajinal bölgenin normal bakteriyel florası ilk olarak Alman jinekolog Döderlein tarafından 1892 yılında tanımlanmıştır. Döderlein vaginal floranın homojen olduğunu ve sadece Gram (+) basiller içerdiğini belirtmiştir¹⁶, bu basilleri daha sonra 'Döderlein basilleri' olarak isimlendirmiştir¹⁷. Döderlein basilleri'ninşimdiki *Lactobacillus* cinsinin üyeleri olduğu bilinmektedir. Bu basiller yapılan çalışmalarda *Acidobacterium doederleini*, *Bacillus lactis*, *Bacillus vaginalis*, *Bacillus vaginalis longus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus döderlein* ve *Plocamobacterium vaginae* gibi farklı isimlerle tanımlanmıştır¹⁸. Daha sonra bu bakteriler 1901'de Beijerinck tarafından sınıflandırılarak günümüzde de kullanılan *Lactobacillus* adını almıştır. İnsan vajinasının normal florasında çoğunlukta görülen mikroorganizmaların *Lactobacillus* cinsi bakteriler olduğu bildirilmiştir^{19,20}.

1898 yılında Kröing hamile kadınların vajinal bölgesinde hareketli çubukların normal olarak ortaya çıktığını ifade etmiştir²¹. Bu muhtemelen bugün *Mobiluncus* olarak bilinen bakterinin ilk tanımıdır²². Ondokuzuncu yüzyılın sonuna doğru Menge ve Kronig (1899)²³ vajinadan ilk olarak *Lactobacillus*'lar dışında anaerobik organizmaları izole etmiştir. Curtis, 1923 yılında kadınlarda beyaz akıntı sendromu olarak isimlendirilen vajinal akıntı sendromunu tanımlamış ve vajinada bulunan anaerobik kokları ve Gram değişken difteroid çubukları bu sendromla ilişkilendirmiştir. Curtis bunun yanında çeşitli kültür teknikleri kullanılarak lohusa humması hastalığına sahip olan bir kadından siyah pigmentli kanca şeklinde anaerobik bakteriyi izole etmeyi başarmıştır^{24,25,26}.

1921 yılında Schröder vajinal değişiklikleri üç farklı şekilde değerlendirmiştir. Birinci değerlendirmede *Lactobacillus*'ların hakim olduğunu, ikincisinde diğer bakteriler ve *Lactobacillus*'ların karışık halde olduğunu ve üçüncüsünde ise

Lactobacillus'ların olmadığını belirtmiştir. Bu değerlendirme, *Trichomonas* ve *Candida* enfeksiyonları dışında vajinite sebep olan spesifik ajanları tanımlamanın mümkün olmadığı durumlarda vajinit etkenini tanımlamada kullanılmıştır²⁷.

Bu çalışmalara rağmen pek çok araştırmacı sağlıklı kadınlarda bu sendroma bir tek organizmanın sebep olabileceğine inanmışlardır. Bunun üzerine Gardder ve Duke, 1955 yılında yaptıkları çalışmada vajinitli kadınlardan *Haemophilus vaginalis* ismini verdikleri küçük Gram negatif bir mikroorganizma tanımlamışlar ve o zamanlar non-spesifik vajinit olarak adlandırılan hastalığa bu mikroorganizmanın neden olduğunu düşünerek bu enfeksiyona *Haemophilus* vajiniti adını vermişlerdir^{28,29}.

1960 yılında Rogosa tarafından yapılan çalışmada 21-40 yaş gurubu arasında bulunan 21 kişiden alınan vajinal sürüntü (swap) örneklerinden 35 *Lactobacillus* suşu elde edilmiş ve bu izolatların 21 tanesinin biyokimyasal ve serolojik testlere göre tanımlaması yapılmıştır. Çalışma sonucunda 21 izolatın 14 tanesinin *L. acidophilus*, 2 tanesinin *Lactobacillus casei var. rhamnosus* ve 2 tanesinin de *Lactobacillus fermenti* olduğu belirtilmiştir¹⁸.

Greenwood ve Picket'in 1980'lerde, *Haemophilus. vaginalis*'in katalaz negatif olduğunu ve hücre duvarında arabinoz içermediğini kanıtlamalarının ardından DNA rekombinasyon çalışmaları sonucu bu organizmanın *Corynebacterium* olamayacağı ve ayrı bir tür olduğunun anlaşılması üzerine bu mikroorganizma ile *H. vaginalis* bağlantısını ilk kuran kişi olan Dr. H. L. Gardner anısına "Gardnerella" olarak adlandırdıkları yeni bir cinse dâhil etmişlerdir^{30,31}.

Durieux ve Dublanchet bakteriyel vajinitli kadınların vajinal sekresyonlarında kıvrık, anaerobik çomak şeklinde yeni bir mikroorganizmadan bahsetmiş ve kanca şeklinden ve hareketli oluşundan ötürü "*Mobiluncus*" adını vermişlerdir³². Tüm bu veriler ışığında hastalığın adı bir kez daha değişmiş ve anaerobik vajinit terimi kullanılmaya başlanmıştır^{33,34}. 1984 yılından sonra bu hastalığın vajen duvarında enflamatuvar yanıt ve lökosit artışına yol açmaksızın vajinal akıntı yaptığının fark edilmesi ve vajinit teriminin artmış vajinal lökosit düzeyini ifade etmesi sebebiyle

enflamatuvar bir yanıt oluşturmeyen polimikrobiyal özellikte bir hastalık olduğunu daha iyi ifade eden “Bakteriyel Vajinozis” adı kullanılmaya başlanmıştır³⁴.

2.1.2. Vajinal Mikrofloranın Özellikleri

İnsan vücudunda yerleşik bulunan doğal flora; hormon seviyesi, immün cevap, beslenme şekli, ilaç kullanımı (antibiyotik, antiviral, antifungal, kortikosteroid), hastalık (kontROLSÜZ diyabet, AIDS) ve yaşlanma durumu gibi çeşitli nedenlere bağlı olarak değişebilir. Vajinal mikroflora da çevresel koşullar, mikrobiyal türler arası rekabet ya da kommensalizim, menstürel döngü, hamilelik, doğum kontrol haplarının kullanımı, gebelik önleyici aletlerin kullanımı, hijyen koşulları (vajen duşu) ve yabancı cisimler (tampon) gibi faktörlerin etkisi ile de değişiklik gösterebilmektedir^{2,3,35}. Genetik varyasyonların vajinal mikroflora yapısını nasıl etkilediği bilinmemekte, ancak doğuştan gelen bağışıklık sisteminin normal sinyalizasyonunu bozan genetik polimorfizmlerin daha az sağlıklı flora ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir³⁶.

Sağlıklı bir kadının vajinal mikroflorası, tipik olarak farklı aerobik ve anaerobik mikroorganizmalardan meydana gelmektedir. *Lactobacillus*'lar en yaygın ve sayıca baskın olan mikroorganizmalardır ve menopoza öncesi sağlıklı kadınların vajinal sıvısında 10^7-10^8 CFU/g *Lactobacillus* bulunmaktadır^{1,36}. Vajinal mikroflorada bulunan *Lactobacillus* türleri arasında *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* bunları takiben, *L. brevis*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. salivarius* ve *L. vaginalis* türleri sağlıklı kadınlardan izole edilen en sık görülen türlerdir³⁷. Vajinal mikroflorada *Lactobacillus*'lar doğumdan sonra 24 saat içinde kolonize olmakta ve kolonizasyonları ölüme kadar kalmaktadır. Kadınların vajinal mikroflorasında *Lactobacillus* türlerinin hiç olmaması ise anormal kabul edilmektedir³⁸.

Yapılan çalışmalarda farklı coğrafik bölgelere, ırk ve etnik duruma göre kadınların vajinal sistemlerinin kompozisyonunda *Lactobacillus* türlerinde bireysel farklılıklar gözlenmiştir. Sağlıklı asemptomatik kadınların vajinal mikrofloralarında

Leuconostoc, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Weisella* gibi laktik asit üreten diğer bakteri gruplarında bulunmaktadır²⁴. Ravel vd. (2011)³⁹ Kuzey Amerika’da yaşayan 4 farklı etnik grup (beyaz, siyah, İspanyol ve Asya’lı) üzerinde yapmış olduğu çalışmada aynı bölgede yaşayan dört farklı etnik grup arasında vajinal mikrofloranın farklı olduğunu bildirmiştir. Buna ek olarak Jin vd. (2007)⁴⁰ Uganda ve Kore’de yaptıkları çalışmada vajinal mikroflorada LAB genusunun dışında *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Streptococcus* spp. ve *Weisella* spp. gibi türleri de izole etmişlerdir. Sağlıklı bir vajinal mikroflorada sıklıkla izole edilen bakteriler Tablo 2.1’de yer almaktadır.

Yaşa bağlı olarak vajinal mikroflorada görülen değişiklikler dört farklı dönem olarak incelenmektedir. Bu dönemler neonatal dönem (yenidoğan dönemi), prepubertal dönem (ergenlik öncesi dönem), postpubertal dönem (ergenlik sonrası dönem) ve postmenopozal dönem (menopoz sonrası dönem) olarak incelenmektedir. Doğumun ardından bebeğin vajinal mikroflorasında bulunan *Lactobacillus*’lar puberte (ergenlik dönemi) dönemi olarak bilinen döneme kadar vajinal mikroflorada bulunmamaktadır. *Lactobacillus*’ların olmadığı bu dönemde florayı *S. epidermidis* Gr (+) ve Gr (-) koklarla, Gr (-) koliform basiller oluşturmaktadır. Puberte ve postpubertal dönemde ise vajinal mikroflorayı başta *Lactobacillus*’lar olmak üzere *Bacteroides*, *Clostridium*, *Listeria*, *Mycoplasma*, *Peptostreptococcus* ve *Streptococcus* cinsleri ile *Gardnerella vaginalis* türü oluşturmaktadır. Postmenopozal dönem ise hormonların etkisi ile vajinal mikroflora tekrardan *Lactobacillus*’lar yönünden yoksun hale gelmekte ve karışık bir bakteri florası meydana gelmektedir⁴¹.

Tablo 2.1. Sağlıklı vajinal mikroflorada en sık izole edilen bakteri türleri^{17,25}

Fakültatif anaerob bakteriler	
Gram-pozitif	Gram-negatif
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Lactobacillus iners</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Lactobacillus jensenii</i>	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	
<i>Streptococcus viridans</i>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>Enterococcus faecalis</i>	
Zorunlu anaerob bakteriler	
Gram-pozitif	Gram-negatif
<i>Eubacterium</i> spp.	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
<i>Peptococcus niger</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Prevotella bivia</i>
	<i>Prevotella melaninogenica</i>
	<i>Veilonella</i> spp.

Vajinal epitel hücrelerinde östrojen hormonunun uyarısıyla bol miktarda glikojen sentezlenmektedir. *Lactobacillus*'lar muhtemelen ergenlik döneminde bol miktarda salgılan glikojenin etkisinden dolayı vajinanın en baskın florasını oluştururlar⁴². Üreme dönemindeki kadınlarda dolaşımdaki östrojenlerin yüksek seviyeleri, vajinal epitelde glikojen birikimine neden olur ve artan glikojen, *Lactobacillus* türleri gibi glikozu fermente eden mikroorganizmaların büyümesini destekler³⁶. Vajina lümenindeki epitel hücreler de bulunan glikojen *Lactobacillus*'lar tarafından metabolizma edilerek laktik asit oluşturulur ve sonuçta vajinal pH'da asidik bir ortam meydana gelir⁴³. Menopozda, östrojen seviyesinin azalmasından dolayı vajinal epitel hücrelerinde körelme ve kuruma görülür. Östrojen seviyesi azaldığında

vajinal epitel hücrelerde glikojen içeriği de azalmakta ve bu da *Lactobacillus*'ların sayısının azalmasına sebep olmaktadır. Vajinal pH'nın 3.8-4.2 arasında olmasının sebebi *Lactobacillus*'ların çoğunlukta olmasıdır. *Lactobacillus* sayısının azalması durumunda glikoz laktik aside dönüştürülemez ve vajinal pH yükselir. Bu nedenle vajinal mikrobiyal ekosistem ile kadınların vücut östrojen seviyeleri arasında doğrudan bir ilişki vardır⁴⁴.

Düşük pH ortamı vajinal mikroflorada bulunmayan ve patojen olan organizmaların çoğalmasını ve kolonizasyonunu önlemesi açısından oldukça önemlidir. Yani patojen mikroorganizmalarının çoğalması düşük pH değerinin oluşmasında önemli olan *Lactobacillus*'ların kontrolü altındadır. Endojen floranın aşırı çoğalması ya da dışarıdan vücuda giren bir mikroorganizma tarafından vajinal ekosistemin bozulması sonucunda vajinitler gelişmektedir. *Lactobacillus*'ların bu rolü özellikle hamilelik süresince vajinal enfeksiyonların sebep olabildiği erken doğum ve doğum öncesi komplikasyonları önleme açısından da büyük önem taşımaktadır⁴⁴.

Vajinal mikroflorada yerleşik bulunan yararlı mikroorganizmalar bakteriyel vajinit, üriner sistem enfeksiyonları, maya vajiniti ve cinsel yolla bulaşan hastalıklardan korunmada önemli rol oynamaktadır^{45,46}. Vajinit, vajinanın iltihaplanmasıdır ve bakteriyel vajinozis (BV), vulvovajinal kandidiyazis ve trikomonas yaygın görülen vajinit enfeksiyonlarıdır. Her yıl dünya çapında yaklaşık 5-10 milyon kadın vajinit enfeksiyonu şikayeti ile hastanelere başvurmaktadır. BV, vajinal mikroflora dengesinde görülen vajinal pH'nın artması, *Lactobacillus* sayısının azalması ve fakültatif ve anaerobik bakteri sayısının ve tipinin artması ile karakterize edilen bir değişim olarak tanımlanmaktadır. BV'nin aynı bölgede ve hatta benzer nüfus gruplarında ülkeden ülkeye geniş farklılık göstermesine rağmen yaygınlığı % 8 -75 aralığında olduğu tahmin edilmektedir⁴⁷. Diğer yandan *Lactobacillus*'ların vajinal mikroflorada olmaması durumunda bakteriyel ve aerobik vajinit gibi çeşitli enfeksiyonların gelişmesinin yanında gonore (bel soğukluğu), klamidy, sifiliz (frengi), trikomonas, insan immün yetmezlik virüsü (HIV), insan papilloma virüs (HPV) ve herpes simpleks virüs (HSV-2) gibi cinsel yolla bulaşan hastalıkların gelişimi de tetiklenebilmektedir. Sağlıklı kadınlara kıyasla bakteriyel vajiniti bulunan

kadınların vajinal mikroflorasında *Atopium vaginae*, *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Megasphaera* spp., *Mobiluncus* spp., *Mycoplasma hominis*, *Prevotella* spp. ve *Peptostreptococcus* spp. gibi suşların daha yaygın görüldüğü bildirilmiştir⁴⁸.

Herhangi bir enfeksiyonu olmayan sağlıklı kadınların vajinal mikroflora kompozisyonu günden güne de değişiklik gösterebilmektedir. Yapılan çalışmalarda ard arda alınan vajinal kültürler ya da servikal smearlar (rahim ağzı sürüntüleri) incelendiğinde bazı kadınların vajinal mikroflorasında geçici değişiklikler olabildiği gibi önemli farklılıklar da olduğu gözlemlenmiştir. En çok stabil olmayan zaman aralığının kadınların mensturasyon zamanlarında ortaya çıktığı görülmektedir. Ancak bu değişikliğe sebep olan faktörün sadece mensturasyon zamanının mı olduğu yoksa başka bir etkenin mi olduğu tam olarak bilinmemektedir⁴². Menstural döngü süresince glikojen ve hormonların seviyesi değişirken, menstural kan vajinal pH'nın değişmesine sebep olmakta ve menstural döngünün 2 ve 14. günleri arasında vajinal pH 4.2-6.6 arasında değişiklik göstermektedir. Bu durum pek çok bakteri ve mayaların gelişmesi için ortam hazırlamaktadır⁴⁹. Yinede menstural döngünün proliferatif fazı boyunca *Lactobacillus* olmayan türlerin sayısında artış görülse de döngü süresince vajinal *Lactobacillus*'ların seviyesi sabit kalmakta ve üretilen laktik asit vajinal pH'nın asitleşmesine katkıda bulunmaktadır³⁵.

2.2. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Gram pozitif basil ve koklardan oluşan laktik asit bakterleri (LAB) gurubu Firmicutes filumuna ait çeşitli bakteri cinslerinden oluşmaktadır. LAB fakültatif anaerob veya mikroaerofilik mikroorganizmalardır. Katalaz enzimleri olmaksızın aerobik koşullarda gelişebilirler⁵⁰. Katalaz negatif, spor oluşturmayan (*Sporolactobacillus inulinus* dışında) sitokromdan yoksun ve hareketsiz (bir iki ayrıcalık gösteren üye dışında) olan bu grubun önemli cinsleri arasında *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella* yer almaktadır^{41,51}.

Bu bakteri grubu; kok, çomak, tetra formasyon ve ovoid şekilde bulunabilirler. LAB gelişme sıcaklıkları bakımından termofil ve mezofil özellik göstermektedir. 10-45°C arası sıcaklıklarda, yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişme, asit veya alkaliyi tolere etme yeteneklerine sahiptirler⁵².

Su ve toprakta hemen hemen hiç rastlanılmayan bu bakteri grubuna ait çeşitli cins ve türler süt ve süt ürünlerinde, bitki ve bitki atıklarında, insan ve diğer canlıların sindirim sistemlerinde rastlanabilir⁵³. Bu bakteri gruplarına ayrıca diş ve ağız bölümünde, nadiren idrar yollarında ve lokal efenksiyonlarda da rastlanabilir. Sağlıklı kadınların vajinal mikroflorasında ise dominant olarak bulunmaktadırlar⁵⁴.

LAB gram pozitif bakteriler arasında düşük düzeyde guanin ve sitozin (G+C) oranına sahip olan bir bakteri grubudur ve bu grup içinde yer alan bakterilerin genom büyüklükleri genel olarak 1.8-3.4 Mbp (mega base pairs) arasında değişmektedir⁵⁵.

LAB karbonhidrat fermantasyonu sırasında son ürün olarak laktik asit üreten bir bakteri grubudur ve laktatın sentezinde rol alan Laktat dehidrogenaz (LDH) enzimine sahiptirler. Genel olarak organik asitler, hidrojen peroksit, karbondioksit (CO₂), diasetil, asetaldehit, reuterin, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri antimikrobiyal bileşikler üreterek patojen ve kontaminant organizmaların gelişimlerini inhibe eder ve çoğalmalarını kontrol altına alırlar⁵⁷.

LAB'nin karbohidrattan üretmiş olduğu laktik asit, asetik asit, ketoglutarik ve melonik asit gibi organik asitler vajen ve bağırsak pH'sını düşürmekte ve bu düşük pH ortamı zararlı bakterilerin ortamda yaşamasına engel olmaktadır⁵⁶.

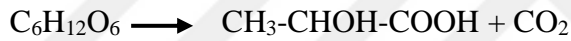
Fermantasyon sonucu ana ürün olarak laktik asit üreten bu bakteriler sitokrom içermemekte ve elektron taşıma sistemi taşımamaktadır. Bu nedenle LAB'de enerji eldesi yalnızca substrat düzeyinde fosforilasyon ile gerçekleştirilmektedir. LAB laktik asit fermantasyonu sonucunda oluşturdukları ürünlerin cinsine göre Homofermentatif LAB ve Heterofermentatif LAB olmak üzere iki gruba ayrılırlar⁵⁷.

Bu ayırım şekerlerin temel yıkım yollarındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır.

Homofermantatif yol: Homofermantatif LAB (Örn. *Lactobacillus casei*) glukozu, Fruktoz Di Fosfat (FDP) yolu ile parçalayarak fermantasyon sonucu % 99 oranında laktik asit, % 1 oranında diğer bileşikler meydana gelir. Vajen mikroflorasındaki LAB'nin hemen hemen tümünün homofermantatif tipte laktik asit bakterisi olduğu bildirilmiştir⁵⁸.



Heterofermantatif yol: Heterofermantatif LAB'nin (Örn. *Lactobacillus brevis*) glikozu Hegzos Mono Fosfat (HMF) yolu ile birden çok nihai ürüne fermente etmesidir. Fermantasyon sonucunda % 70 oranında laktik asit üretilirken % 30 oranında da asetik asit, etanol, formik asit, karbon dioksit gibi yan ürünler oluşturulur⁵⁸.



LAB'nin tanımlanması ve karakterizasyonu endüstriyel ve bilimsel açıdan gittikçe daha fazla önem kazanan bir konu hâline gelmiştir. LAB'nin tanımlanabilmesi ve karakterizasyonu amacıyla morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri ile antibiyotik duyarlılıkları ve faj tiplerinin belirlenmesini ve serolojik olarak tiplendirilmelerini içeren klasik yöntemlerin yanı sıra günümüzde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Amplifiye (çoğaltılmış) ribozomal DNA Restriksiyon Analizi (ARDRA), Pulsed Field Jel Elektrofrezisi (PFGE), Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ve DNA Dizi Analizi (Sequencing Analysis) gibi moleküler biyoloji tekniklerinden de yararlanılabilmektedir. Son yıllarda, LAB'nin tür ve suşlarının filogenetik pozisyonlarının belirlenmesinde daha güvenilir olduğu düşünülen 16S ribozomal RNA'dan da yararlanılmaktadır. Bu yöntemlerin herbiri bakteri izolatlarını cins, tür, alttür ve suş düzeyinde sınıflandırmaya, tanımlamaya ve karakterize etmeye yönelik yöntemler olup 16S rRNA gen bölgesinden elde edilen fragmentlerin dizi

analizin *Lactobacillus* türleride dahil olmak üzere tüm bakteri türlerinin belirlenmesinde kullanılan en güvenilir moleküler tekniklerden biridir⁵⁹.

2.2.1. *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerinin Genel Özellikleri

Lactobacillus cinsi bakteriler genellikle düz ya da hafif kıvrık, çubuk (basil) şekilli bir morfolojiye sahiptir. Kokobasil türleride mevcuttur. Hücreleri tek tek ya da zincir şeklinde bulunur. Gram-pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen genellikle hareketsiz, anaerobik, mikroaerofilik ya da fakültatif anaerobik mikroorganizmalardır. *Lactobacillus* biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri açısından oldukça fazla çeşitlilik içeren üyelere sahip bir cinstir⁵⁵.

Lactobacillus türleri gelişebilmeleri için aminoasit, peptit, tuz, nükleik asit türevi vitamin, yağ asidi veya yağ asidi esterleri ile fermente edebilecekleri besin maddelerine ihtiyaç duyarlar. Bu mikroorganizmalar fermentasyon sonucu laktik asit ürettikleri için ortamın pH'sını 3.2-3.5'e kadar düşürebilirler. Bu nedenle de aside dayanıklı mikroorganizmalardır⁶⁰.

Lactobacillus cinsi bakterilerin elektron mikroskop görüntüsünde hücre duvarı, sitoplazmik membran, ribozomlar ve nükleer (kromozomlar ve plazmidler) elementlerden oluştuğu görülmüştür^{51,52}.

Hücre duvarı; LAB'nin gram pozitif hücre duvar yapısı 20-40 nm kalınlığında temelde peptidoglikan, lipoteikoik asit, protein ve polisakkaritlerden oluşmaktadır. Hücre duvarının iç katmanı peptidoglikan ağı ve iki kısa peptit bağları ile çapraz bağlanmış N-asetil muramik asit ve N-asetil glikoz amin birimlerinden oluşur. LAB'nin hücre duvarındaki peptidoglikan tabakası çeşitli katmanlar ile kaplanmıştır. Bu katmanların en önemlileri lipoteikoik asit, asidik polisakkarit ve yüzey proteinleridir^{61,62}.

Bakteri hücre duvarı ile ilgili polisakkaritler ve LAB'nin ekstrasellüler polisakkaritleri nötral ya da asidiktir. Teikoik asit hücre duvarının negatif yükünden

ve antijenik karakterinden sorumlu olup, ribitol fosfat veya gliserol fosfat polimerlerinden oluşmaktadır. Probiyotik karakterdeki *Lactobacillus* türlerin bağırsak ve epitel hücrelere bağlanma yeteneğinin teikoik asit ve lektin benzeri maddelerden kaynaklandığı bilinmektedir⁶³. Pek çok *Lactobacillus* türlerinde en bol bulunan yüzey proteinleri S-layer proteinleridir^{61,62,64}.

Sitoplazmik membran; sitoplazmik membranda peptidoglikanların ekstrasellüler polimerizasyonu için gerekli enzimler bulunur ayrıca fosfotransferaz enzimi ile aktif taşıma yapılmaktadır⁶¹.

Ribozomlar; LAB'de ribozomlar 70S tipindedir, 70S, 50S büyük ve 30S küçük olmak üzere iki alt ünitelerden oluşur. 50S' lik alt birim 5S rRNA ve 23S rRNA ile yaklaşık 35 çeşit protein; 30S' lik küçük alt birim ise 16S rRNA ve 25 farklı protein içerir^{61,62}.

Plazmid: LAB çok sayıda plazmid içermektedir. LAB'nin çok sayıda plazmid içermeleri ve bunlardan bazılarının konjugasyon yoluyla diğer bakterilere aktarabilmesi, bu bakteri plazmitlerine olan ilgiyi daha da artmıştır. Plazmidler, antibiyotik direnci, virulens özellik veya çeşitli metabolik aktiviteler, ekzopolisakkarit ve antimikrobiyal madde sentezi gibi fenotipik özelliklere dair genler taşımaları açısından büyük önem taşımaktadır⁵³.

2.2.2. *Lactobacillus*'ların Vajen Mikroflorasındaki Önemi

Normal şartlarda *Lactobacillus* türlerinden oluşan vajinal mikroflora, sağlıklı kadınları genital ve ürogenital infeksiyonlardan korumada ve vajinal mikrofloranın doğal dengesinin korunmasında önemli rol oynamaktadır. Vajinal mikroflora bu koruma görevini farklı mekanizmalar ile üstlenmektedir. Öncelikle *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilen laktik asitin düşük vajinal pH ortamı sağlamasıyla potansiyel patojenik mikroorganizmaların gelişimini önlemektedir. Ayrıca *Lactobacillus*'ların hidrojen peroksit, diasetil, inhibitör enzimler, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri antimikrobiyal maddeleri üretmeleri, mikro pilileri ile vajinal

epitel hücrelerdeki reseptörlere yapışarak patojen mikroorganizmaların bağlanmalarını engellemeleri, *Lactobacillus*'ların koagregasyon yetenekleri ile patojen mikroorganizmaların vajinal epitel hücrelerine bağlanmasını önleyen yüzey bağlama proteinleri bulundurmaları diğer koruyucu mekanizmalardır^{6,20,65}.

Bu mekanizmaların hepsi patojenik mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmeye katkıda bulunmaktadır. Vajinal mikroflorada değişiklikler olması ve *Lactobacillus*'ların olmaması durumunda sağlıklı kadınlar arasında sıklıkla bakteriyel vajinit görülmektedir⁶⁶.

Uzun süreli yapılan çalışmalar *Lactobacillus*'ların olmadığı vajinal mikrofloraya sahip bazı kadınlarda tekrarlayan asemptomatik enfeksiyonların olduğunu ve kadınların büyük çoğunluğunda da haftalar ya da aylar içinde ciddi semptomlara sebep olabilen vajinal enfeksiyonların ve üriner sistem enfeksiyonlarının tekrarladığını göstermektedir⁶⁵.

Üriner sistem enfeksiyonları her yıl milyonlarca kadını etkilemektedir ve bu durum yıllık milyarlarca dolar toplumsal maliyetlere sebep olmaktadır. Üriner sistem enfeksiyonlarına yakalanan kadınların dörtte birinden fazlası altı ay içinde tekrarlayan enfeksiyonlara yakalanmaktadır. Tedavi için antibiyotiklerin yaygın olarak ve düzensiz kullanımı idrar yolu enfeksiyonlarına sebep olan antibiyotiklere dirençli bakteri sayısını artırmaktadır. Bu nedenle son yıllarda korunmada etkili olabilecek antibiyotik olmayan yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Profilaktik antibiyotik kullanımı dışında üriner sistem enfeksiyonların önlenmesi için birkaç seçenek vardır. Bu bağlamda bilim insanları tarafından *Lactobacillus* içeren probiyotik kapsüllerin potansiyel bir alternatif olabileceği düşünülmekte ve bu konu ile ilgili klinik çalışmalar devam etmektedir^{13,14,15}.

2.2.3. Probiyotikler

2.2.3.1. Probiyotiklerin tanımı ve tarihçesi

Yaşam için, canlı için anlamına gelen probiyotik kelimesi, Yunanca dantüretilmiştir. Probiyotik kavramı ilk olarak Nobel ödüllü Rus bilim adamı Elie Metchnikoff'un 1908 yılında yapmış olduğu çalışmalar neticesinde farkındalık kazanmıştır. Yaşlanma üzerine çalışmalarını sürdüren araştırmacı Kafkas ve Bulgar köylülerinin uzun ömürlü olmalarını, köylülerin çok fazla miktarda fermente süt ürünlerini tüketmelerine bağlamıştır. Metchnikoff fermente süt ürünleri tüketimininbağırsak florasının olumsuz etkilerini ortadan kaldırılabileceğini ve böylece insanların daha uzun süre yaşayabileceklerini bildirmiştir. Alman araştırmacı Ferdinand Vergin 1954 yılında yaşamın sağlıklı gelişmesi için gerekli olan canlı organizmalar için "probiotika" terimini önermiştir^{67,68}.

Vergin'in önerisinin dışında veteriner kökenli Lilly ve Stillwell ilk kez 1962 yılında bu yararlı mikroorganizmalar için "probiyotik" terimini önermiş ve bu terim günümüze kadar gelmiştir. Probiyotik kelimesi bugün kullanıldığı anlamı ile ilk kez 1974 yılında Parker tarafından, hayvan yemlerinde yer alan ve konakçının bağırsak flora dengesinin düzenlenmesi ve gelişmesini teşvik eden maddeleri ve organizmaları tanımlamak için kullanılmıştır^{68,69}. Bu yeni kavram özellikle İngiliz mikrobiyolog Rol Fuller tarafından incelenmiş ve çalışmalarını daha çok LAB üzerine yoğunlaştırmıştır. Fuller 1989 yılında probiyotikleri, konakçının "bağırsak mikrobiyal dengesini güçlendiren canlı mikrobiyal katkı maddeleri" olarak ifade etmiştir^{68,70}.

Avrupa Birliği'nin katkıları ile 1995'de Bruksel'de düzenlenen probiyotik konulu uzmanlar toplantısında ise probiyotiğin tanımı; sağlığa koruyucu etki gösteren, sindirim, üreme ve solunum sistemleri üzerinde yararlı etkileri olan, canlı, bir ya da birkaç belirli mikroorganizma tarafından oluşan kültürler olarak tanımlanmıştır. Günümüzde ise daha genel bir kavram ile yeterli oranda tüketildiklerinde insan ve hayvan sağlığına katkı sağlayan yararlı, canlı mikrobiyal gıda içerikleri olarak tanımlanmaktadır⁹.

2.2.3.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

LAB probiyotik mikroorganizmaların en önemli grubunu oluşturmaktadır. Bunların içerisinde *Lactobacillus* türleri en yaygın olarak kullanılan probiyotik mikroorganizmalardır⁹. Bazı bakteri cinsleri ile küf ve maya türleri de probiyotik karaktere sahip türler arasında yer almaktadır. Tropikal bir meyvenin kabuğundan izole edilen *Saccharomyces boulardii*'nin probiyotik özelliklerine sahip olduğunun keşfedilmesi buna bir örnektir⁵⁸. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların listesi Tablo 2.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar^{71,72}

Laktik asit bakterileri	<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. sporogenes</i>
	<i>Pediococcus</i> türleri	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. cerevisiae</i> , <i>P. pentosaceus</i>
	<i>Streptococcus</i> türleri	<i>S. salivarius</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>S. diacetylactis</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i>
	<i>Leuconostoc</i> türleri	<i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
	<i>Lactococcus</i> türü	<i>L. lactis</i>
	<i>Propionibacterium</i> türleri	<i>P. freudenreichii</i> , <i>P. shermanii</i>
Diğerleri	<i>Bifidobacterium</i> türleri	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. thermophilum</i>
	<i>Bacteriodes</i> türleri	<i>B. amylophilus</i> , <i>B. capillus</i> , <i>B. rumenicola</i> , <i>B. suis</i>
	<i>Bacillus</i> türleri	<i>B. coagulans</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i>
	<i>Aspergillus</i> türleri	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>
	<i>Saccharomyces</i> türleri	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. boulardii</i>
	<i>Candida</i> türü	<i>C. torulopsis</i>

2.2.3.3. Prebiyotikler ve sinbiyotikler

Prebiyotikler, ince bağırsakta sindirilmeden direkt olarak kalın bağırsağa geçen, seçici olarak probiyotiklerin bağırsakta gelişiminin ve aktivitelerinin artmasını sağlayan, dolayısıyla probiyotiklerin sağlık için yararlı etkilerini artıran gıda bileşenleridir. İnülin, frukto-oligosakkaritler, galakto-oligosakkaritler, soya-oligosakkaritler ve izomalto-oligosakkaritler prebiyotik olarak kullanılan ürünlerdendir⁷³.

Probiyotiklerin ve prebiyotiklerin birlikte kullanılması ile oluşturulan ürünlere ise sinbiyotik denilmektedir. Tek bir ürünlerdeki bu kombinasyon ile probiyotik bakterilerin yaşam süresi uzamakta ve kolonda daha iyi kolonize olmaları sağlanmaktadır. Sinbiyotik ürünlerdeki amaç, hem ince bağırsak için, hem de kalın bağırsak için faydalı bir ajan elde etmektir. Yapılan in vitro çalışmalarda sinbiyotik bir ürünün yalnız başına uygulanan prebiyotik ya da probiyotik ürüne göre daha avantajlı olduğu görülmektedir^{74,75}. Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada *B. breve*, *L. lactis* ve prebiyotik olarak oligo-alternan içeren bir sinbiyotik karışımın, yalnız başına kullanılan LAB'den daha fazla etkili olduğu ve kolon kanser hücrelerinin gelişimi üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu belirtilmiştir⁷⁶.

2.2.3.4. Probiyotik mikroorganizmalarda aranan özellikler

Her mikroorganizma probiyotik değildir ve bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kullanılabilmesi için öncelikli olarak deneysel ve klinik çalışmalarla o mikroorganizmanın probiyotik özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmaların iki temel aşaması vardır. Birinci aşama probiyotik suşun taksonomik olarak sınıflandırılması ve sahip olduğu özelliklerin belirlenmesidir. İkinci aşama ise seçilen probiyotik türlerin etki mekanizmalarının ayrıntılı bir şekilde gösterilmesidir⁷⁷. Etki mekanizmaları daha iyi anlaşıldıkça ve kontrollü çalışmalarla aynı genetik yapıya sahip suşlar arasındaki farklılıklar tam olarak ortaya konuldukça, suşlara özgü tahmin edilen probiyotik etkiler kanıtlanmış olacaktır⁴¹.

Probiyotik seçim kriterlerinde en çok istenen özellik suşların asit ve safra tuzlarına karşı direnç gösterebilmeleri ve gastrointestinal sistemde canlılıklarını uzun süre sürdürebilmeleridir. Bağırsak mukozasına bağlanma yeteneği de önemli probiyotik seçim kriterlerinden biridir. Çünkü suşların bağırsak mukozasına tutunabilmesi kolonizasyonu için gerekli olmakla birlikte patojen mikroorganizmaların tutunması ve kolonizasyonun engellenmesi açısından da önemlidir. Bunun yanında fenotip, genotip ve plazmit stabilitesi, epitel dokulara tutunabilme yeteneği, antimikrobiyal maddeler üretmesi, antibiyotiklere karşı direnç gösterebilmesi, patojenleri inhibe edebilme kabiliyeti de istenen özellikler arasındadır¹¹. Ticari uygulamalarda kullanılacak probiyotik bir adayın seçim kriterleri Tablo 2.3.'de belirtilmiştir.

Probiyotik karakterleri belirlenmiş suşun klinik denemelerinin yapılmış ve kanıtlanmış olması ve suşun veya ürünün minimum etki dozunun belirlenmesi ve plasebo kontrollü, çok tekrarlı canlı denemelerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Tablo 2.3. Ticari uygulamalarda kullanılacak probiyotik adayların seçim kriterleri⁷⁸.

Güvenlik Kriterleri	<ul style="list-style-type: none"> •İnsan orjinli olmalı •Patojenik ve toksijenik olmamalı •Antibiyotiklere karşı dirençli olmalı
Teknolojik kriterler	<ul style="list-style-type: none"> •Genetik olarak stabil olmalı •Fajlara karşı dirençli olmalı •İşleme ve depolama süresince canlılığını koruyabilmeli •Büyük ölçekli üretimleri sağlanabilmeli
Fonksiyonel kriterler	<ul style="list-style-type: none"> •Mide asidi safra ve pankreatik enzimlere karşı dirençli olmalı •Mukozal yüzeylere bağlanabilmeli •Epitel dokulara tutunabilmeli
İstenilen fizyolojik özellikler	<ul style="list-style-type: none"> •İmmün cevabı stimüle edebilmeli •Patojenik mikroorganizmalara karşı antagonistik aktivite gösterebilmeli •Antimikrobiyel bileşikler üretebilmeli •Kolesterol asimilasyonu sağlayabilmeli •Laktozu metabolize edebilmeli •Antimutajenik ve antikarsinojenik olmalı •Metabolik aktiviteyi olumlu etkilemeli

2.2.3.5. Probiyotiklerin etki mekanizmaları

Probiyotik mikroorganizmalar, bağırsak sisteminde ve vajinal mikroflorada mikrobiyal dengeyi düzenleyerek pek çok yararlı etki göstermektedir. Probiyotiklerin bu yararlı etkileri 3 temel mekanizma üzerinden gerçekleşmektedir^{79,80,81,82}.

1. Patojen mikroorganizmaların sayılarını azaltmak

- Antimikrobiyal bileşikler üretmek (probiyotikler, laktik asit, hidrojen peroksit, diasetil, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler üreterek gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalar üzerinde etkili olurlar).
- Besin maddeleri ve diğer büyüme faktörleri için patojen bakteriler ile rekabet etmek
- Kolonizasyon bölgeleri için patojen mikroorganizmalar ile rekabet etmek
- Patojenlerin inhibisyonu için epitel yüzeyinde asit pH'yı devam ettirmek

2. Mikrobiyal metabolizmayı (enzimatik aktiviteyi) değiştirmek

- Sindirim sistemini düzenleyen enzimlerin aktivasyonunu sağlamak
- Amonyak, amin veya zararlı toksik madde üreten enzimlerin üretimini azaltmak ve inhibisyonunu sağlamak
- Bağırsak duvarı fonksiyonlarını iyileştirmek

3. Bağışıklık sistemini iyileştirmek

- Antikor düzeyini artırmak
- Makrofaj aktivitesini artırmak

Son yıllarda probiyotik bakteriler ve bu bakterilerin insan ve diğer canlılar üzerindeki yararlı etkilerinin araştırıldığı çalışmalar hız kazanmıştır⁸³.Yapılan çalışmalar neticesinde de probiyotiklerin doğrudan ya da dolaylı olarak sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin sayısı her geçen gün artmakta ve klinikte kullanım alanlarına bir yenisi eklenmektedir. Ancak yine de hangi patojenlere ve hastalıklara karşı hangi probiyotiklerin etkili olduğunun tam olarak belirlenmesi için daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir. Probiyotiklerin deneysel veriler ışığında

kanıtlanmış sağlık üzerindeki yararlı etkileri ve muhtemel etki mekanizmaları Tablo 2.4'de sıralanmıştır.

Tablo 2.4. Probiyotiklerin yararlı etkileri ve muhtemel etki mekanizmaları^{41,68,82,84}.

Probiyotiklerin sağlık üzerine yararlı etkileri	Probiyotiklerin etki mekanizmaları
Ürogenital enfeksiyonları önleme	<ul style="list-style-type: none">-Organik asitler (laktik asit, asetik asit vd.) ve antimikrobiyal bileşikler (H₂O₂, bakteriyosin vd.) üreterek patojen bakterilerinin gelişimini engellemek.- Üriner ve vajinal bölge hücrelerine bağlanmak.- Koagregasyon yeteneğine sahip olmak.
Patojen bakterilere karşı direnç	<ul style="list-style-type: none">-Besinler ve reseptörler açısından patojen bakteriler ile rekabet etmek.-Bağırsak sisteminde patojenler için uygun olmayan koşulları sağlamak (pH, kısa zincirli yağ asitleri ve bakteriyosinler vd.).-Çeşitli yüzey proteinleri ile patojenleri mukozal yüzeyden uzaklaştırmak.-Mukus üretimini artırmak.-Antitoksin maddeler üretmek.- Bağırsak florası üzerinde yararlı etki sağlamak.
Bağırsak sisteminin düzenlenmesi	<ul style="list-style-type: none">-Bağırsak florasının kompozisyonunu değiştirmek.-Mukozal ve sistemik immün aktiviteyi artırmak.-Epitel hücrelerinin yaşam sürelerini artırmak.-Bariyer bütünlüğünü sağlamak.-Bağırsak bakterilerinin aşırı çoğalmasını engellemek.
Bağışıklık sisteminin düzenlenmesi	<ul style="list-style-type: none">-Sekretuar IgA salınımını artırmak.-B lenfosit yapımını artırmak.-Fagositik etkinliği artırmak.-Apoptoz sayısını artırmak.-Dendritik hücre fonksiyonunu modüle etmek.-Anti- enflamatuvar sitokin yapım ve salınımını artırmak.
Antikanserojenik etkide bulunması	<ul style="list-style-type: none">-Kolonda fizikokimyasal şartların değiştirilmesini sağlamak (zararlı bakterilerin gelişiminin engellenmek, fekal safra asidi seviyesini azaltmak ve kolonik kriptlerde çoğalmayı azaltmak).-Mutajenleri bağlamak ve mutajenik bileşiklerin emilimini azaltmak.-Anti-kanserojenik ya da anti-mutajenik bileşikler üretmek.

Antikanserojenik etkiye bulunması	-Tümör oluşumunu ve gelişimini kontrol eden apopitozun uyarılmasını sağlamak. - Bağırsak bakterilerinin oluşturduğu mutajen ve kanserojen etkiye sahip (β -glukuronidaz, nitroredüktaz vd.) fekal mikrobiyal enzimlerin inhibisyonunu sağlamak.
Bazı alerjik hastalıkların kontrolü	-Peptitlere karşı duyarlılığı azaltmak. -Antijenik etkiye sahip maddelerin dolaşım sistemine geçişini engellemek.
Bazı solunum yolu hastalıklarının kontrolü	-Akciğerlerde fagositik hücre sayısı ve aktivitesini artırmak. -Akciğerlerde doğal öldürücü hücre aktivasyonunu artırmak. -Antijene duyarlı olmayan Treg hücrelerini indükleyerek alerjik hava yolu enflamasyonunu azaltmak.
Enfeksiyöz ishallerin önlenmesi ve tedavisi	-Rotavirüs ve diğer viral kaynaklı ishallerin tedavisinde doğal florayı stabilize etmek. -Virüsün mukozaya tutunumunu inhibe etmek. -Konağın bağırsak epitelinde müsin kodlayan genlerin etkinliğini artırarak mukusun bariyer etkinliğini artırmak. -Bakteri adezyonunu artırarak viral atılımı artırmak. -Viral atılım süresini kısaltmak. -Toll-like reseptörlerini uyararak epitel hücrelerin onarılmasını sağlamak. -"Tight junction" bölgelerini güçlendirmek ve sitokin salınımı artırmak.
Kolesterolün asimilasyonu	-Safra tuzları varlığında, kolesterolü asimile edebilmek. -Kolesterolü hücre duvarına bağlamak ya da hücre zarının yapısına katmak. -Kolesterolü koprostanol'e dönüştürmek.
Laktoz toleransı azaltma	-Bakteriyel β - galaktosidaz enzimi ile laktozun sindirimini sağlamak.

2.2.3.6. Probiyotik seçim kriterlerinde istenen özellikler

2.2.3.6.1. Asitlik ve safra tuzlarına direnç

Asitlik ve safra tuzlarına direnç probiyotik organizmaların en önemli seçim kriterlerinden biri olup probiyotiklerin ağızdan alınımının ardından sindirim sistemine ulaşmaya kadar geçen süreçte canlı kalabilmesi için gereklidir. Bu nedenle, ağız boşluğunda bulunan lizozim enzimi başta olmak üzere diğer enzimlere karşı dayanıklı olması ve midenin asidik ortamından (pH 1-4) etkilenmemesi gereklidir⁸⁵.

Safra tuzları glisin veya taurin ile konjuge olan safra asitlerinin Na⁺ ve K⁺ tuzlarıdır. Taurokolik ve deoksikolik asitlerin tuzları bunların en önemlileridir. Yağların ince bağırsak tarafından emilmelerinde görev almaktadır. Safra tuzları, hepatositlerde kolesterolden primer safra asitleri kolik asit ve kenodeoksikolik asitten sentezlenirler. Bu asitler başlıca glisin az miktarda da taurin ile oluşturulan konjuge türevlerine dönüştürülürler⁸⁶. Günde toplam 20-30 gram safra tuzu bağırsağa salgılanır. Bu asitler daha sonra kolonda mikrobiyal aktiviteden dolayı kimyasal modifikasyonlara (dekonjugasyon, dehidroksilasyon, dehidrojenasyon ve deglukuronidasyon) uğrar. Konjuge olmayan safra tuzları daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Gram-pozitif bakterilerin safra tuzlarına hassasiyeti, Gram-negatif bakterilerden daha yüksektir. In vitro direnç denemelerinde, *Bifidobacterium*'ların safra tuzlarına *Lactobacillus*'lardan daha dirençli oldukları belirlenmiştir^{85,87}. Pithva vd. (2014)⁸⁸ yaptıkları çalışmada bebek dışkılarından ve sağlıklı kadınların vajinal mukozasından izole ettikleri *L. rhamnosus* suşlarından *L. rhamnosus* Vc suşunun pH 2.0'de %81 oranla *L. rhamnosus* 231 ve Fb suşlarının ise %72 ve %67 oranla canlılıklarını koruduğu ve suşların %4'lük safra tuzu ortamında gelişebildiklerini bildirilmiştir⁸⁸.

2.2.3.6.2. Antimikrobiyal aktivite

Probiyotik bakterilerin vajinal ekosistemde ve bağırsak sistemdeki en önemli fonksiyonlarından biri de konağın doğal florasını koruyarak patojen organizmalar için bir bariyer oluşturmasıdır. Bu nedenle probiyotik organizmaların seçim kriterlerinde probiyotiklerin patojenlerin gelişimlerini engelleyici antimikrobiyal maddeler üretmeleri önemlidir. Pek çok probiyotik mikroorganizma bu görevi; laktik asit, asetik asit gibi organik asitler, hidrojen peroksit, karbondioksit, diasetil, asetaldehit, reuterin, biyosüfaktan maddeler ve protein yapısındaki bileşikler (bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler) gibi antimikrobiyal etkiye sahip metabolitler üreterek patojen bakterilerin vajen ve bağırsak epitel hücrelerine tutunmasını engelleyerek ve mikrofloranın dengede olmasını sağlayarak yerine getirirler¹.

Laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan antimikrobiyal maddeler:

-Laktik asit: LAB'nin fermentasyon yolu ile ürettikleri bir ürün olup bu ürün mikroorganizmalar üzerinde olumsuz etki yaratmaktadır. LAB'nin laktik asit üretimi sonucu pH' ını 3.2-3.5'a kadar düşürebildiklerinden vajinal bölgede normal florada bulunmayan ve patojen olan organizmaların çoğalması ve kolonizasyonunun önlenmesi açısından oldukça önemlidirler^{49,89}. Yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda *Lactobacillus*'lar tarafından üretilen laktik asidin HSV-2 ve HIV-1 gibi viral enfeksiyonların oluşumunda koruyucu rol üstlendiği kanıtlanmıştır⁹⁰.

Vajinal mikrofloranın menstural dönem, vajinal duş ve sperm gibi faktörlerden etkilenmesi durumunda vajinal mikroflora değişmekte, vajinal pH daha alkali hale gelmekte ve vajen florasının patojen mikroorganizmalara karşı koruyucu özelliği kaybolmaktadır. Bu nedenle vajinal mikroflorada bulunan *Lactobacillus*'ların stabilizasyonu vajinal sağlık açısından büyük önem taşımaktadır¹. LAB tarafından laktik asit üretimi bu asitleştirmeye katkıda bulunabilmekte, bununla beraber bu düşük pH değeri vajinal epitel hücreleri tarafından organik asitlerin salgılanması ile korunmaktadır⁴⁹.

-Hidrojen peroksit: LAB aerobik ortamda besinlerden hidrojen peroksit üretmektedir ve üretilen hidrojen peroksit patojen mikroorganizmalar üzerinde güçlü bir inhibitör etkiye sahip olup patojenlerin gelişimlerini engellemektedir. Bu etki hidrojen peroksitin güçlü bir oksidan olmasından ileri gelmektedir⁹¹.

LAB'nin üremeleri sonucu oluşturulan hidrojen peroksit miktarı, laktik asit bakterilerinin cins, tür ve hatta suşlarına göre farklılık göstermektedir.

Sağlıklı kadınların vajinal mikroflorasında, bakteriyel vajinite sahip kadınların vajinal mikroflorasına göre hidrojen peroksit üreten *Lactobacillus* türlerinin sayısının daha fazla olduğu tespit edilmiştir⁹².

Yapılan in vitro çalışmalarda *Lactobacillus* suşları tarafından üretilen hidrojen peroksitin HIV virüsünü inaktive ettiği belirtilmiştir⁹³. Aroutcheva vd. (2001)⁹⁴

yaptıkları çalışmada H₂O₂' ten hipoklorik asit üretiminin yapıldığı belirlenmiş ve bu ürünlerin kanser öncüsü hücreleri değiştirdiği saptanmıştır. Ayrıca hidrojen peroksit konsantrasyonu yüksek olan ortamdaki hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümünün engellendiği, hatta laktik asit bakterilerinin oluşturduğu hidrojen peroksitin kanserli hücreleri tekrar eski haline dönüştürdüğü açıklanmıştır. Yine aynı çalışmada araştırmacılar vajinal orjinli *Lactobacillus* suşlarının yaklaşık olarak %80'nin hidrojen peroksit ürettiğini bildirmişlerdir.

Aroutcheva ve arkadaşları seksüel aktiviteye sahip kadınların vajinal sürüntülerinden izole edilen 205 *Lactobacillus* suşu arasından *L. crispatus* suşlarının %95'inin ve *L. jensenii* suşlarının ise 94%'nün hidrojen peroksit ürettiği, izole edilen 14 *L. gasseri* suşlarının ise %71'nin hidrojen peroksit ürettiğini belirtmiştir⁹⁴.

Ocana vd. (1999)⁹⁵ asitlikten ve bakteriyosinden arındırılmış ortamda *L. crispatus* F117 suşunun ürettiği hidrojen peroksidin *Staphylococcus aureus* 'un gelişimini önemli ölçüde engellediğini bildirmiştir. Pashaian ve Oganessian (2011)⁹⁶ yaptıkları çalışmada ise vajinal kaynaklı *L. delbrueckii* MH-10 suşunun aktif bir hidrojen peroksit üreticisi olduğunu bildirmişlerdir.

Sağlıklı kadınların vajinal mikroflorasında yüksek hidrojen peroksit üretimi yapan mikroorganizmalar özellikle hamile kadınlarda ekolojik dengenin korunmasından sorumlu olan mikroorganizmalardır. Belirtilen bu *Lactobacillus* suşlarının (*L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. jenseni* ve *L. minutus*) erken doğum patofizyolojisinde önemli bir rol sahip olabildiği gözlemlenmiş ancak yapılan bazı in vivo çalışmalarda bunun mümkün olmadığı gösterilmiştir^{97,98}.

-Bakteriyosin: Bakteriyosinler pek çok bakteri tarafından üretilen, Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler tarafından sentezlenen, yakından ilişkili ya da ilişkili olmayan türlerin gelişimini inhibe eden, protein yapıda antimikrobiyal maddelerdir. Ribozomlar tarafından küçük peptitler, polipeptitler ya da protein olarak sentezlenirler. Bazı vakalarda lipit ya da karbonhidratlar ile de ilişkilendirilmiştir^{99,100,101}.

Gratia'nın ilk olarak 1925 yılında *E. coli* tarafından sentezlenen kolisin adlı bakteriyosini keşfetmesinin ardından Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler tarafından sentezlenen çok farklı tiplerde bakteriyosin elde edilmiş ve farklı sınıflandırmalar gündeme gelmiştir. Bakteriyosinlerin aynı ya da farklı bakteri grupları tarafından sentezlenen yüzden fazla çeşidi bulunmaktadır. *E. coli* suşlarının yanı sıra *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Staphylococcus* gibi birçok mikroorganizma bakteriyosin üretmektedir. Ancak daha çok gıdalar da güvenli olduğu düşünülen LAB tarafından sentezlenen bakteriyosinler üzerinde araştırma yapılmakta ve gıdalarda bu bakteriyosinler kullanılabilir. Bu nedenle LAB, özellikle de *Lactobacillus* ve *Lactococcus* tarafından sentezlenen bakteriyosinler üzerine yapılan araştırmalar hız kazanmıştır¹⁰².

Bakteriyosinler son yıllarda gıdalarda muhtemel koruyucu ajanlar olarak kullanılmasının yanında korunmada ya da bakteriyel enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibiyotik tedavisini tamamlayıcı olarak da kullanılmaktadır. Bu doğal maddelerin çoğu güçlü bir biyoteknolojik potansiyele sahip olup temelde antibiyotikler ile çapraz direncin olmaması, düşük ökaryotik sitotoksitenin olmasından dolayı yalnızca gıda ve ilaç sanayinde değil veteriner tıpta da geniş kullanım alanı bulmaktadır^{103,104}. Bakteriyosinlerin ayrıca yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda antiviral ajan, bitki koruma ajanı ve antikanser ajan potansiyeline sahip olduğu da belirtilmektedir¹⁰⁵.

Genel olarak, bakteriyosinlerin antibiyotiklerden farkı; sentezlenme şekillerinin, etki mekanizmalarının, antimikrobiyal spektrumunun, toksik etkileri ve direnç mekanizmasının farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenirken, antibiyotikler multi-enzim kompleksleriyle sentezlenirler. Bakteriyosinler daha düşük konsantrasyonlarda hedef mikroorganizma üzerinde engelleyici etki gösterebilirken, antibiyotiklerde daha yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç vardır. Bakteriyosinler, genelde gelişme fazında üretilirken, antibiyotikler durağan fazda ikincil metabolit olarak sentezlenirler¹⁰⁶.

LAB bakteriyosinleri bakterileri öldürme ya da inhibe etme yeteneğine sahiptir¹⁰⁵. Genellikle ökaryotik hücrelerde toksik değildir ve protein yapıda olduğu için proteolitik enzimler tarafından kolay parçalanır^{105,107}.

Bakterilerde bakteriyosinin sentezlenebilmesi için, özel bakteriyosin genlerinin bulunması gerekmektedir. LAB'de bakteriyosin kodlayan genler kromozomal DNA ya da plazmid üzerinde bulunmaktadır¹⁰⁸. Bakteriyosin üretimi çeşitli çevresel şartlar altında ve bakterilerin çeşitli gelişim evrelerinde sentezlenebilmektedir¹⁰⁵.

LAB birbirinden farklı bakteriyosinler üretme yeteneğine sahiptir. Yapılan bazı çalışmalarda üretilen bu bakteriyosinlerin antimikrobiyalaktivitelerinin, kendi türleri ile ilişkili olduğu ya da *E. coli* ve *C. jejuni* gibi ilişkili olmayan pek çok patojenik türleride inaktive edebilme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir^{50,105}.

Ruiz vd. (2012)¹⁰⁰ vajinal mikrofloradan izole ettikleri *L. fermentum* L23 suşu ve *L. rhamnosus* L60 suşlarının ürettiği bakteriyosin benzeri maddelerin hamile kadınlarda ciddi enfeksiyonlara ve düşüklere sebep olan *Streptococcus agalactiae* suşu üzerindeki inhibitör etkisini araştırmışlardır. Çalışmada *L. fermentum* L23 suşu ve *L. rhamnosus* L60 suşlarının hamile kadınlardan izole edilen *S. agalactiae* suşları üzerinde (%91) inhibisyon etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Yine aynı araştırmacının 2015 yılında yapmış olduğu çalışmada vajinal mikrofloradan izole edilen *L. fermentum* L23 ve *L. rhamnosus* L60 suşlarının *Neisseria gonorrhoeae* bakterisi üzerindeki inhibitör etkisi de araştırılmış ve etken maddenin *N. gonorrhoeae*'nin gelişimini sırasıyla %87.28 ve %80.66 oranlarında inhibe ettiği gözlenmiştir¹⁰¹.

Vajinal mikrofloradan izole edilen *Lactobacillus* suşlarının bakteriyosin üretim yeteneklerinin ve bakteriyosin gen bölgelerinin araştırıldığı bir başka çalışmada sağlıklı kadınların vajinal mikroflorasından izole edilen 20 *Lactobacillus* suşu arasından 6 suşun ürettiği bakteriyosinin iki farklı *Klebsiella* türü üzerinde, 5

farklı suşun da *Staphylococcus aureus* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirtilmiştir⁶.

Trivedi vd. (2014)¹⁰⁹ vajinal izolat olan *Lactobacillus brevis* DT24 suşu tarafından üretilen kolisin E2 bakteriyosinin üropatojenik *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal etkisini araştırdıkları çalışmada *L. brevis* DT24 suşunun çok yüksek inhibitör aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Vera Pingitore vd. (2009) 110 vajinal *L. salivarius* CRL 1328 suşu tarafından üretilen bir bakteriyosinin *E. faecalis*'e karşı etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Antibiyotik direncinin ülkemizde ve dünyada global sağlık sorunu hâline gelmesinin ardından pek çok araştırmacı çalışmalarında çeşitli patojenlere karşı antibiyotikleri ve bakteriyosinleri bir arada kullanmışlardır. Araştırmacılar çoklu ilaç direnci gösteren mikroorganizmalara karşı yeni ilaç ve alternatifler elde etmek için yaptıkları çalışmalarda LAB bakteriyosinlerini yalnız başına ya da antibiyotikler ile birlikte kombine kullandıklarında insan ve veteriner tıpta gücünü kaybeden antibiyotiklerin çoklu ilaç direnci gösteren patojen mikroorganizmalara karşı parlak bir gelecek sunabileceğini ve bu kombinasyonun daha çok geliştirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir¹¹¹⁻¹¹⁴.

2.2.3.6.3. Epitel yüzeye tutunma ve önemi

Probiyotiklerin bağırsaktaki ve vajinal bölgedeki epitel hücre yüzeylerine bağlanması ve bağlanma bölgeleri için yarışması; patojenlerin kolonizasyonunun engellenmesi, mikrofloranın kararlılığının sağlanması, immün sistemin aktive edilmesi ve zarar gören mukozanın iyileştirilmesi açısından önemlidir. Bu nedenle epitel yüzeye bağlanma en önemli probiyotik seçim kriterlerindedir. LAB'nin kolonizasyonu, gastrointestinal ve ürogenital hastalıkların önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır⁹.

Patojen mikroorganizmaların vajinal epitel hücrelere bağlanmasını engelleyen temelde üç mekanizma vardır: (i) Blokaj; *Lactobacillus*'ların vajinal hücre resptörlerine bağlanarak patojenlerin bağlanmalarını engellemeleri, (ii) rekabet ile

bloka; *Lactobacillus*'lar ve patojen suşların epitel hücre reseptörlerine yapışmasını engellemek için yarışmaları (iii) yer değiştirerek bloka; daha önceden epitele yapışmış olan patojenlerin dışardan alınan *Lactobacillus*'lar tarafından yerlerinden uzaklaştırılıp *Lactobacillus*'ların epitele bağlanmalarıdır¹¹⁵.

Hormonal değişiklikler (özellikle östrojen), vajinal pH ve glikojen içeriği gibi faktörler vajinada kolonize olan *Lactobacillus*'ların yeteneğini etkileyebilmektedir. Menstrual dönemde östrojen konsantrasyonunun yükselmesi ile vajinal epitel hücrelere *Lactobacillus*'ların bağlanma oranının artması vajinal mikroflorada değişikliklere sebep olabilmektedir³⁷.

Sağlıklı bir ürogenital sistemde patojenik bakterilerin, *Lactobacillus*'ların mukozada potansiyel bağlanma bölgelerini işgal etmelerinin ile florada bulunan *Lactobacillus*'ların dışlanması sebep olduğuna inanılmaktadır. Ancak enfekte olmuş ürogenital bir sistemde floradaki *Lactobacillus*'ların sayısı azaldığında dışarıdan alınan probiyotik *Lactobacillus*'lar daha önceden bağlanmış patojenlerin yerine geçme ve bazı reseptörler için patojenler ile yarışma kapasitesine sahiptir^{116,117}.

Yapılan pek çok araştırma verilerine göre *Lactobacillus*'ların vajinal epitel hücrelere bağlanma yeteneği patojenik bakterilerin kolonizasyonuna karşı bir bariyer görevi görmektedir¹¹⁸. *Lactobacillus*'ların epitel hücrelerine bağlanma sürecinde bakteri yüzeyinde bulunan protein ve karbonhidratların farklı kombinasyonlarından oluşan mekanizmaların rol aldığı düşünülmektedir. Probiyotik bakterilerin yapışma aktiviteleri için gerekli olan mekanizmalar da türden türe farklılık göstermektedir. Tuomola vd. (1999)¹¹⁹ yapmış oldukları *L. gasseri* ile yaptıkları çalışmada protein ve karbonhidratların epitel hücrelere yapışmada gerekli olduğu ayrıca divalent (iki değerlikli) katyonların (Ca^{+2}) da yapışmada etkili olduğu görülmüştür. Yine benzer bir çalışmada Boris vd. (1998)¹²⁰ vajinal epitel hücrelerine bağlanmadan sorumlu olan faktörlerin glikoprotein ve karbonhidratlar olduğunu rapor etmiştir.

Boris vd. (1998)¹²⁰ probiyotik karaktere sahip bakterilerin epitel hücre yüzeylerine tutunabilmeleri için agregasyon yeteneğine de sahip olmaları gerektiğini bildirmişlerdir.

Agregasyon toplanma, bir araya gelme, kümeleşme olarak tanımlanmaktadır¹²¹. LAB agregasyon özelliği ile bulunduğu yüzeye ve birbirlerine yapışarak bir bariyer oluştururlar ve patojen mikroorganizmaların epitel hücrelere bağlanmasını engellerler⁸⁹. Agregasyon yeteneği, benzer hücrelerin kümeleşerek otoagregasyon oluşturması, farklı genetik materyalli hücrelerin koagregasyon oluşturmasına göre belirlenmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda probiyotik suşların vajinal epitel hücrelere bağlanabilmesi için otoagregasyonun gerekli olduğunu bildirilmektedir¹²². LAB koagregasyon yetenekleri ile bir bariyer görevi görürler ve ortamda bulunan patojenlere bağlanarak onları etkisiz hâle getirerek olası bir enfeksiyonu ve bakterinin toksik etkisini engellemiş olurlar. *Lactobacillus*'ların agrege olarak koloni oluşturması ağız boşluğunda ve ürogenital sistemde önemli bir rol üstlenmektedir¹²³.

Kos vd. (2003)¹²⁴ yaptıkları çalışmada insan gastrointestinal sisteminden izole ettikleri *L. acidophilus* M92 suşunun hem bazı patojen mikroorganizmalara karşı koagregasyon yeteneğini hem de probiyotik karaktere sahip diğer bakteriler arasındaki bağlanma yeteneklerini araştırdığı çalışmada *L. acidophilus* M92 suşunun oldukça yüksek bağlanma kapasitesine sahip olduğunu ve bağlanmada bakteri hücre yüzeyinde bulunan proteinli yapıların büyük önem taşıdığını belirtmiştir.

LAB'nin yapışma yeteneğini araştırmada in vitro model sistemler geliştirilmiştir. En çok kullanılan modeller; enterositlere benzeyen normal ince bağırsak villus hücrelerinin özelliklerine sahip Caco-2 doku kültür hücreleri, bağırsak mukusu ve ostom glikoproteinleridir. Yapışmaya etki eden faktörler in vitro olarak belirlenmesine rağmen yapışmanın asıl mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır⁹.

Caco-2 hücreleri araştırmacılar tarafından farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Caco-2 hücreleri yalnızca çeşitli mikroorganizmaların tutunma mekanizmasıyla ilgili

çalışmalarda değil aynı zamanda bu bakterilerin patojenler ile aynı ekosistem içinde nasıl rekabete girebildiklerini gösteren çalışmalarda da kullanılmıştır. Pascual vd. (2008)¹²² çalışmalarında vajinal mikrofloradan izole edilen *L. rhamnosus* L60' suşunun bariyer mekanizmasıyla vajinal epitel hücreleri koruduğu, engelleme mekanizmasıyla ile de patojenlerin tutunmalarını engellediği ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal içerik ürettiğinibelirtmişlerdir. Çalışmada ayrıca *L. rhamnosus* L60 suşunun yüksek hidrofobisite gösterdiğini de bildirmişlerdir^{1,122}.

Chassot vd. (2010)¹²⁵ yılındaki yaptıkları çalışmada doğum kontrol yöntemi olarak spiral kullanan kadınlardan izole ettikleri iki adet *Candida albicans* suşu üzerinde vajinal mikrofloradan izole edilen *L. acidophilus* suşunun bağlanma yeteneği araştırılmış ve çalışma sonunda probiyotik karakterdeki suşun maya hücreleri üzerinde güçlü bir şekilde bağlanma kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir.

Gil vd. (2010)¹²⁶ sağlıklı kadınlardan vajinal mikroflorasından elde edilen 11 vajinal *Lactobacillus* izolatların otoagregasyon yetenekleri ve *C. albicans*, *C. glabrata*, *Candida krusei* ve *Candida tropicalis* suşları üzerindeki bağlanma kabiliyetlerini araştırdıkları çalışmada 4 saatlik inkübasyonun ardından bütün suşların kendi aralarındaki otoagregasyon yeteneklerini %25.3 ile %75.4 arasında bulmuşlardır. İzole edilen 11 farklı suş arasından *L. crispatus* suşu 4 farklı *Candida* türü üzerinde en yüksek koagregasyon yeteneğine sahip suş olarak tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada 11 suşun Caco-2 hücrelerine bağlanma yetenekleri araştırılmış ve çalışma sonunda *L. agilis*, *L. jensenii*, *L. johnsonii* ve *L. ruminus* suşlarının Caco-2 hücrelerine güçlü bağlanma yeteneklerinin olduğu belirtilmiştir.

2.2.3.6.4. Kolesterol asimilasyonu

Kolesterol, hayvanlar alemindeki tüm canlıların vücut dokularındaki hücre zarlarında bulunan, çoğu vücut tarafından sentezlenen, vücutta kortikosteroidler, üreme hormonları, safra asitleri ve D vitamini gibi diğer steroidlerin ön bileşiğini oluşturan, yağların sindiriminde görev alan safra asitlerini üreten ve metabolizmada pek çok biyokimyasal reaksiyonda önemli rol oynayan organik bir maddedir¹²⁷.

Kolesterol vücudun her hücresinde bulunmakla beraber, sentezlendiği ya da hücre zarlarının daha çok bulunduğu karaciğer, omurilik beyin ve aterom gibi çeşitli organ ve dokulardaki yoğunluğu daha yüksektir. Kanda normalden fazla bulunması hâlinde damarlarda birikerek damar sertleşmesine (ateroskleroz) yol açmakta bazen de safra pigmentleri ile birleşerek safra taşlarının oluşmasına sebep olmaktadır.

Yüksek kolesterol ile ilişkili olan kardiyovasküler hastalıklar, tüm dünyadaki en önemli ölüm sebeplerinden biridir. Bu nedenle, serumdaki kolesterol seviyesinin düşürülmesi, özellikle kardiyovasküler hastalıklarının önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır^{128,129}.

Son bulgular bağırsaktaki mikrobiyal düzensizliğin kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde rol oynayabildiğini göstermektedir. Bu nedenle çeşitli araştırmacılar kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde ve/veya tedavisinde bir yaklaşım olarak probiyotik ile bağırsak mikroflorasını değiştirmeyi düşünmüşlerdir¹³⁰. Yapılan çeşitli araştırmalarda araştırmacılar özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarını içeren probiyotiklerden bazı LAB'nin yüksek kolesterolü asimile ettiğini kanıtlamışlardır. İn vitro ve hayvan modelli çalışmalar kolesterol ile ilişkili gen ekspresyonu ve metabolik süreçler üzerindeki probiyotik müdahalelerin etkisini belirlemek için kullanılmıştır¹²⁹. Probiyotiklerin kolesterol seviyesini nasıl düşürdüğü ile ilgili pek çok etkili yol öne sürülmektedir.

Bu konu ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda Rossi vd. (1999)¹³¹ yaptıkları çalışmada probiyotik özelliğe sahip *E. faecium*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus jugurti*, *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşların in-vitro koşullarda kolesterol konsantrasyonunu azaltma ve safra tuzları varlığında gelişebilme yeteneklerini araştırmışlar ve *E. faecium* ile *L. jugurti* (1:1 oranında) kombinasyonunun kolesterolü %43 oranında düşürdüğü tespit etmişlerdir.

Pan vd. (2011)¹²⁸ süt ürünü olan kımızdan izole ettikleri *L. fermentum* SM-7 suşunun yüksek asit ve safra tuzuna dayanıklı olduğunu ve kolesterol miktarını %66.8 oranında azalttığını bildirmişlerdir.

Bir başka çalışmada Tomaro vd. (2015)¹³² probiyotik özelliğe sahip *L. fermentum* NCIMB 5221 ve NCIMB 2797 suşlarının kolesterol düşürme mekanizmalarını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada kontrol örneklere göre sırasıyla %85 ve %86 oranlarında kolesterol oranını düşürdüğünü tespit etmişlerdir.

Ichim vd. (2016)¹²⁹ yapmış oldukları çalışmada *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* genusuna ait 9 probiyotik organizma ve 10 sindirim enzimi bulunan karışımın kolesterol metabolizması üzerindeki etkisini araştırmak amacı ile in vitro sistem ve fare modelleri kullanmışlardır. Yüksek kolesterole sahip fare modellerinin, hazırlanan karışımı sekiz hafta boyunca her gün alması sağlanmıştır. Çalışma sonunda özellikle 4. haftadan sonra kandaki düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oranında %47 azalma ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) oranında ise %32 artma gözlemlenirken 8. haftadan sonra çarpıcı bir şekilde LDL konsantrasyonu %78 azalma ve HDL konsantrasyonunda ise %52 artma gözlemlenmiştir.

- Probiyotiklerin Kolesterol Konsantrasyonunu Düşürmesini Sağlayan Olası Mekanizmalar

- Probiyotik özelliğe sahip *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin safra tuzlarını serbest asitlere parçalayarak, konjuge safra tuzlarının bağırsak sisteminden daha hızlı uzaklaşmasını sağladıkları düşünülmektedir. Serbest safra tuzlarının vücuttan atılmasından dolayı kolesterolden yeni safra asitlerinin sentezi, vücuttaki toplam kolesterol konsantrasyonunu düşürebilir¹³³.

- LAB bağırsakta kandaki lipit seviyesinde sistemik azalmaya sebep olan kısa zincirli yağ asitleri üretebilir¹³⁴.

- Probiyotik bakteriler direkt olarak kolesterolü metabolize ederek bağırsaktan kolesterol adsorbsiyonuna müdahale edebilir ve kana geçişini azaltabilir¹²⁹.

- LAB asit üretimi sonucu pH'yı düşürerek, dekonjuge safra tuzları ile kolesterolün presipitasyonuna neden olabilir⁸⁵.

- Kolesterol bakteri hücre duvarına bağlanabilir¹³⁵.

2.2.3.6.5. Ürogenital enfeksiyonlar ve probiyotikler

Ürogenital enfeksiyonlar; cinsel yolla bulaşan hastalıklar dışında, BV, aerobik vajinit, vulvovajinal kandidiyazis ve üriner sistem enfeksiyonlarını kapsamakta ve dünya çapında her yıl yaklaşık olarak bir milyon kadını etkilemektedir¹³⁶. Ürogenital enfeksiyonlar oldukça yüksek sağlık bakım masraflarına sebep olmasının yanında yenidoğan ve kadınlarda yüksek morbidite ve mortaliteye de neden olmaktadır. Kadınlarda görülen ürogenital enfeksiyonlar koruyucu *Lactobacillus*'ların sayıca azalması ve doğal vajinal mikroflorada değişikliğe sebep olan farklı mikroorganizmaların yerleşmesi sonucu görülmektedir.

BV, kadınlarda pek çok komplikasyona sebep olan en yaygın ürogenital enfeksiyonlardan biridir¹². Menopoz öncesi kadınların %75'i hayatlarında en azından bir kez BV enfeksiyonu ile karşılaşırken %45'i iki ya da daha fazla oranda bu enfeksiyonla karşı karşıya kalmaktadır¹³⁷. BV dünyanın farklı bölgelerinde farklı prevalansa sahip olup özellikle gelişmekte olan ülkelerde oldukça sık rastlanmakta bunun yanında gelişmiş ülkelerde de üreme dönemindeki yetişkin kadınların % 19-24'ünü etkilediği düşünülmektedir. Dünya çapında rutin klinik kontrollere başvuran hastalarda BV görülme oranı ise %12- 25 arasındadır^{12,138,139}.

BV vajinada görülen diğer enfeksiyon hastalıklarından farklı olarak tek bir mikroorganizmanın neden olduğu bir hastalık olmayıp, polimikrobiyal klinik bir sendromdur. Bu yakınma mikrobiyolojik ekosistemin bozulması sonucunda özellikle de anaerob bakterilerin sayıca artmasından dolayı ortaya çıkan bir durumdur. BV esnasında istenmeyen ve en sık görülen organizmalar arasında mayalar (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*), vajinozise sebep olan anaerobik bakteriler (*Atopobium vaginae*, *Bacteroides* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Mycoplasma hominis*, *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Ureaplasma urealyticum*, *Veillonella* spp.), üropatojenler (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp.) ve seksüel yolla geçen virüsler (HIV, HPV, HSV-2) bulunmaktadır^{140,141}. Bu nedenle sağlıklı kadınların vajinal mikroflorası ile BV'li kadınların vajinal mikroflorası arasında belirgin farklılıklar görülmektedir. Vajinal mikroflorada baskın bulunan

Lactobacillus cinsi bakterilerinin sayısının BV enfeksiyonu esnasında 100-1000 kat azaldığı belirtilmiştir³⁴.

Sağlıklı kadınların vajinal mikroflorasında bulunan *Lactobacillus*'lar organik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin, üreterek ve/veya daha düşük bir pH ortamı oluşturarak BV'e sebep olan mikroorganizmaların vajinada kolonizasyonunu inhibe etmekte ve koruyucu bir etki sağlamaktadır. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin vajinal ortamın asidik kalmasına katkıda bulunmalarının yanında bu asit ortamı *Lactobacillus*'ların üremesini de teşvik etmektedir²⁰.

BV'nin tedavisinde metronidazol ve klindamisin gibi antibiyotikler kullanılabilen ancak bu tedavi yöntemi hastaların yakınmalarına neden olan tekrarlayan enfeksiyonları önlemekte yetersiz kalmaktadır¹². Farklı ilaçlar ile farmakolojik tedavi yöntemleri koruyucu mikroflorayı yeniden oluşturmada başarısız olmaktadır. Geleneksel tedaviler yan etkilere, antibiyotiklere dirençli suşların gelişmesine ve tekrarlayan semptomların artmasına sebebiyet vermektedir^{136,142}. Standart bir tedaviden sonra tekrarlayan BV prevalansına bakıldığında 6-12 ay içinde enfeksiyonların görülme oranı %10-50 arasında değişmektedir. BV geçiren bir kadının hayat kalitesi azalmakta ve bu durum hamile bayanlarda ciddi doğum komplikasyonlarına sebep olabilmektedir¹.

LAB'ni içeren probiyotik ürünlerin kullanımının ürogenital enfeksiyonlardan korunmada ve tedavide alternatif bir yöntem olduğu düşünülmekte ve bu konu ile ilgili yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda probiyotik içeren tedavinin yüksek riskli hastalarda bile tekrarlayan BV oranını azaldığı ya da önlediği kanıtlanmıştır^{12,136,142,143}.

Yapılan pek çok klinik çalışmalarda semptomatik ya da asemptomatik BV enfeksiyonuna sahip olan kadınların *Lactobacillus* içeren farklı formlardaki probiyotik ürünleri oral olarak ya da intra vajinal olarak kullanmaları sağlanmış ve sonuçta BV enfeksiyonununun semptom ve /veya bulgularının azaldığı, tekrarlanma oranının düştüğü ve patojen mikroorganizmalarının kolonizasyonunun engellediğine yönelik veriler elde edilmiştir.

Probiyotikler vajinal olarak ya da oral olarak alınabilir çünkü gıdalar ve diyet takviyeleri ile alınabildiği gibi *Lactobacillus*'lar rektumdan vajinaya pasif olarak da geçebilir¹⁴⁴. Buna ek olarak vajinal probiyotik takviyesi ile de *Lactobacillus*'ların vücuda alımı sağlanmaktadır ancak oral yoldan probiyotik alımı düşük oranda enfeksiyon riski barındıran rektumdan vajinaya maya ve patojenik bakterilerin transferini azaltmada daha avantajlı olduğu görülmektedir³⁷.

Dünyanın her tarafında kremler, jeller, tabletler, filmler, kapsüller, köpükler, yağlar, tamponlar ve antiseptik sular gibi vajinal uygulama formları bulunmaktadır. Vajinal ilaçların çoğunluğunu ise jel formunda kremler, tablet ve filmler oluşturmaktadır. Yapılan pek çok klinik denemelerde BV'i bulunan hastaların spesifik geleneksel tedavi yöntemi ile birlikte *Lactobacillus* suşlarını ya oral olarak ya da vajina içine yerleştirilen tabletler şeklinde kullanmaları sağlanmıştır¹⁴⁵.

2.2.3.6.6. Klinik denemeler

Probiyotik içeren ürünlerin en önemli ürogenital enfeksiyonlardan biri olan BV enfeksiyonunun tedavisinde ve tekrarlayan BV enfeksiyonlardan korunmadaki etkinliğinin belirlenmesi amacı ile yapılan klinik çalışmalara baktığımızda Bodean vd. (2013)¹⁴¹ Romanya'da 20-45 yaş aralığında cinsel aktiviteye sahip hamile olmayan ve hiçbir sağlık problemi bulunmayan BV'i olan 173 hasta üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada kontrol grubu, vajinal probiyotik ürünler kullanan grup (6 gün boyunca) ve probiyotik ürünleri oral olarak alan grup (10 gün boyunca) olmak üzere üç farklı grup oluşturulmuş ve bütün grupların yedi gün boyunca günde iki kez 500 mg metronidazol kullanması sağlanmıştır. Çalışma sonunda her hangi bir ek probiyotik tedavisi almayan grupta bir yıl içinde tekrarlayan BV görülme oranı % 50 iken vajinal probiyotik tablet kullanan hastalarda % 30, probiyotik ürünleri oral olarak kullanan hastalarda ise % 15 bulunmuştur.

Marccone vd. (2010)¹⁴⁶ metronidazol tedavisi görmüş BV enfeksiyonuna sahip hastalarda tedavi sonrasında uzun süreli vajinal *L. rhamnosus* suşunun kullanım avantajlarının araştırıldığı çalışmada BV enfeksiyonuna sahip 49 hastanın yedi gün

süren metronidazol tedavisinin ardından haftada bir kez 40 mg *L. rhamnosus* vajinal uygulamayı 6 ay süresince hastaların kullanması sağlanmıştır. Çalışma sonucunda altı ay boyunca hastaların % 96'sında vajinal mikrofloranın dengede kaldığı ve tekrarlayan BV enfeksiyon görülme oranının oldukça azaldığı görülmüştür.

Davar vd. (2016)¹³⁷ yılında yaptıkları randomize çift körlü klinik çalışmada, vajinal kültürlerinde *Candida* spp. tanısı konan, menopoz öncesi hamile olmayan ve yaş ortalaması 32 olan hastaların öncelikle bilinçli olarak tek doz 150 mg flukonazol tablet ile tedavi edilmesi sağlanmış ve profilaksi tedavi için vakalar probiyotik tablet [Pro-Digest tablet (*L. acidophilus*, *B. bifidum*, *B. longum*)] alanlar ve plasebo alanlar olmak üzere iki grup olarak ayrılmıştır. Gruplarına göre hastaların 10 gün boyunca günde iki kez probiyotik içeren kapsülleri ve plaseboları kullanmaları sağlanmış ve altı ay süresince her ay jinekolojik muayeneleri yapılarak vajinal kültürleri alınmıştır. Altı ay süren çalışmanın bütün ayları değerlendirildiğinde 28 kişiden oluşan probiyotik tablet kullanan grupta sadece bir kişide (% 7.2) tekrarlayan enfeksiyon görülürken plasebo kullanan 31 kişilik grupta dört kişide (% 35.5) tekrarlayan enfeksiyon görülmüştür. Yine benzer bir çalışmada Martinez (2009)¹⁴⁷ *Candida* kültürü pozitif olan 55 hasta üzerinde yaptığı çalışmada probiyotik ve flukonazol kullanan grupta tekrarlayan BV enfeksiyonu görülme oranı %10.3 iken plasebo ve flukonazol kullanan grupta ise % 38.5 oranında görülmüştür.

2009-2012 yılları arasında Polonya'nın özel jinekolojik polikliniklerine tekrarlayan BV enfeksiyonu nedeni ile başvurma hikayesi olan hastalar değerlendirilmeye alınmıştır. Hastaların ilk muayenelerinde 7 gün süren 500 mg metronidazol tedavisi ile birlikte 10 gün süresince (73 kişi) ya *L. gasseri* 57C, *L. fermentum* 57A ve *L. plantarum* 57B bulunan kombinasyondan oluşan probiyotik kapsül ya da plasebo (81 kişi) almaları sağlanmıştır. Yaklaşık 14 gün sonraki ikinci ziyaretlerinde katılımcıların vajinal kültürleri alınarak jinekolojik muayeneleri yapılmış ve BV enfeksiyonu yönünden mikrobiyolojik tanımlamaları sağlanmıştır. Değerlendirme sonucunda oral probiyotik tablet kullanan katılımcılarda plasebo kullananlara kıyasla BV enfeksiyonu görülme oranının oldukça düşük olduğunu ve görülme süresini %76 uzattığını bildirmişlerdir Heczko vd. (2015)¹⁴⁸.

2.2.3.6.7. Viral enfeksiyonlar ve probiyotikler

Son yıllarda yapılan çalışmalar göz önüne alındığında *Lactobacillus*'ların bulunmadığı ya da anormal kabul edilen vajinal mikroflorada cinsel yolla bulaşan viral hastalıkların geçişinin de daha kolay olduğu özellikle HIV ile anormal vajinal mikroflora arasında bir bağlantı olduğu görülmektedir. Bunun yanında vajinal mikrofloradaki *Lactobacillus* sayısındaki azalma HPV ve HSV enfeksiyonlarının bulaşına da zemin hazırlamaktadır. Diğer yandan genital herpes virüs enfeksiyonu cinsel temas yoluyla HIV enfeksiyonunun bulaşma ve yayılması açısından da önemli bir risk faktörüdür.

Doğal vajinal mikroflora antiviral bileşenlerin üretimini sağlayarak, viral partiküllerin geçişini ve bağlanmasını engelleyerek ve immün sistemi uyararak HIV, HSV ve HPV gibi viral enfeksiyonlarına karşı koruyucu rol oynayabilmektedir^{149,150}. İn vitro yapılan çalışmalar *L. acidophilus* tarafından üretilen hidrojen peroksitin HIV-1 virüsüne karşı antiviral etki gösterdiği belirtilmiştir. Yine bir başka çalışmada *L. gasseri* ve *L. iners* suşlarının yüksek miktarlarının HPV üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir¹⁵⁰. Viral enfeksiyonlara karşı *Lactobacillus*'ların mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte laktik asit, hidrojen peroksit ve bakteriyosin gibi metabolik ürünlerin virüslere karşı korumada koruyucu rol aldığı kanıtlanmıştır¹⁵¹. Dimitonova vd. (2007)¹⁵² tarafından yapılan bir çalışmada vajinal mikrofloradan izole edilen *L. fermentum* ve *L. brevis* suşlarının ürettiği bakteriyosin benzeri moleküllerin HSV-2 virüsüne karşı anti tümör etki gösterdiği belirtilmiştir. Cinsel yolla geçen HIV enfeksiyonunun kadınlarda hızlı yayılımına engel olabilecek yeni terapötik yaklaşımların araştırıldığı çalışmada ise insan vajinal mikroflorasından izole edilen *L. reuteri* RC-14 suşunun genetik olarak periferik mononükleer kan hücrelerine HIV virüsünün geçişini engelleme yeteneğine sahip anti-HIV proteinini ürettiği tespit edilmiştir¹⁵³.

Bu bağlamda yapılan çalışmalara baktığımızda Zabihollahi vd. (2012)¹⁵¹ yaptıkları çalışmada vajinal mikrofloradan izole edilmiş *Lactobacillus* suşlarının in vitro ve in vivo şartlar altında anti-HIV ve HSV üzerindeki aktivitesini belirlemek ve

olabilecek mekanizmaları değerlendirmek adına gerçekleştirdikleri çalışmada *Lactobacillus* suşları tarafından üretilen anti-viral moleküller ve diğer olası mekanizmaların açık bir şekilde anti-HSV ve HIV etkinliği gösterdiği, *Lactobacillus* suşlarının bulunduğu kültürlerde HSV ve HIV'in sitotoksik etkisinin önemli derecede azaldığı, vajinal *Lactobacillus* suşlarının HSV enfeksiyonunu ilk evrede engelleyebildiği ve özellikle çalışmada kullanılan vajinal *Lactobacillus* suşları arasından *L. gasseri* suşunun HIV virionuna karşı inhibitör etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Elde edilen bu sonuçların fare modeli in vivo çalışmada da doğruluğu kanıtlandığı bildirilmiştir.

2.2.3.6.8. Probiyotiklerin kanser ile ilişkisi

Kanser tüm dünyada insan ölümlerinin en önemli sebeplerinden biridir. Kanser türleri arasından kolorektal kanser türünde ise her yıl yaklaşık 1 milyon yeni kolorektal kanser vakası tespit edilmekte ve 500.000 hasta kolorektal kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir¹⁵⁴. Birçok kanser türünde olduğu gibi kolorektal kanserden korunma çalışmaları, probiyotiklere ve dolayısı ile sinbiyotiklere olan ilgiyi artırmış ve bu kansere karşı tedavi ve / veya alternatif koruma çalışmalarında potansiyel probiyotik bakterilerin kullanılmasının mümkün olabileceği açıklanmıştır¹⁵⁵.

Yapılan çalışmalarda biyoterapötiklerin kolorektal kanseri önleme mekanizması tam olarak belirlenirse de elde edilen veriler neticesinde probiyotiklerin kanser oluşum sürecindeki koruyucu etkisi açık bir şekilde gösterilebilmiştir.

Probiyotikler, kanser oluşum sürecinde;

- Bağırsakta karsinojen ve mutajenlere maruziyetini azaltarak ve mutajenik bileşikleri bağlayıp inaktive ederek
- Prokarsinojenlerin aktif karsinojenlere dönüşümünü engelleyerek
- Bağırsak mikroflorasını dengede tutarak kanserojen ve tümör arttırıcı maddeler ve enzimler (β -glukuronidaz, nitroredüktaz, azoredüktaz ve 7- α dehidrosiklaz vb.) üreten zararlı bakterilerin gelişimini engelleyerek ve bakteriyel enzimlerin inhibisyonu sağlayarak
- Bağırsak inflamasyonunu azaltarak

- Bütirat gibi maddeler üreterek programlı hücre ölümünün aktivasyonunu artırarak ve dolayısı ile anormal hücrelerin yok edilmesini sağlayarak
- Bağışıklık sistemini aktive ederek anormal hücrelerin eliminasyonunu hızlandırarak
- Hücre gelişimini regüle eden ve insan kolon kanseri hücrelerinde apoptozu teşvik eden kısa zincirli yağ asitleri sentezini sağlayarak
- Anti-kanser ya da anti-mutajenik bileşikler üreterek kanser hücrelerinin gelişimini engelleyen pek çok önemli etki mekanizmalarına sahiptir^{7,156,157,158}.

Yine yapılan çalışmalarda bazı spesifik *Lactobacillus* suşlarının insan vücudunda ve hayvanlarda pro inflamatuvar sitokinlerin (interlökinler IL-1 ve IL-6) ve anti-inflamatuvar sitokinlerin (interlökinler IL-10 ve IL-12) üretimini tetiklediği belirtilmiştir¹⁵⁹.

Probiyotiklerin antikanser etkisi üzerine yapılan çalışmaların çoğunluğunu kolorektal kanser çalışmaları oluştururken vajinal probiyotiklerin kullanıldığı çalışmalarda da genellikle kolorektal ve servikal kanser üzerine odaklanılmıştır. Probiyotik mikroorganizmaların kolorektal kansere karşı koruyucu bir role sahip olduğunu kanıtlayan çalışmalar arasından Urbanska vd. (2009)¹⁶⁰ kanserli farelerin günlük *L. acidophilus* içeren formüle yoğurtları tüketmesi sağlandığında çalışma sonunda tümör büyüklüğünde ve metastazında ciddi azalma görüldüğü, yine bir başka geniş skalaya sahip cerrahi müdahale geçirmiş 398 kolon kanser hastasının dahil edildiği klinik çalışmada bir grup hastanın sadece buğday kepeği, diğer gruptaki hastaların sadece *L. casei* ve bir diğer gruptaki hastaların ise buğday kepeği ile birlikte *L. casei* alması sağlanmış ve 2. ve 4. yılın sonunda yapılan incelemelerde *L. casei* kullanan hasta grubunda kolon kanserinin tekrarlama oranının diğer gruptakilere kıyasla oldukça az olduğu görülmüştür¹⁶¹.

Haghshenas vd. (2014)¹⁶² yayınladıkları çalışmada geleneksel süt ürünlerinden izole ettikleri *Lactobacillus* ve *Lactococcus* suşların potansiyel probiyotik özelliklerini belirledikleri çalışmada ayrıca sekrete edilen metabolitlerin HT29 (insan kolorektal kanser hücre hattı), AGS (insan mide kanser hücre hattı), MCF-7 (insan meme kanser

hücre hattı) ve HeLa (insan servikal kanser hücre hattı) kanser hücre hattı ve normal hücre hattı HUVEC (insan göbek bağı damar endotel hücresi) üzerindeki sitotoksik etkisini de araştırmışlardır. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 44Lac. tarafından sentezlenen metabolitlerin kanser tedavisinde kullanılan ünlü ilaçlardan biri olan Taxol ile benzer sitotoksik etkisinin olduğunu ve normal hücre hattı üzerinde hiçbir sitotoksik etkinin olmadığını ancak yine de bu metabolitlerin potansiyel bir anti-kanser ilacı olarak kullanılabilmesi için in vitro /in vivo çalışmalarında daha ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerektiğini belirtmişlerdir.

Vajinal mikrofloradan izole edilen probiyotik mikroorganizmaların kullanıldığı çalışmalara bakacak olursak Nami vd. (2014a)¹⁵⁹ yayınladıkları çalışmada, sağlıklı İran kadınlarının vajinal mikroflorasından izole edilen *L. acidophilus* 36YL suşunun potansiyel probiyotik karakterizasyonunu ve AGS, HeLa, MCF-7, HT-29 ve normal hücre olan HUVEC hücre hatlarından oluşan dört farklı karsinom hücre lizatları üzerindeki anti-kanser etkisini belirlemeyi amaçlamışlar. Çalışma sonunda *L. acidophilus* 36YL suşundan sentezlenen metabolitlerin dört farklı kanser hücre hattı üzerinde kabul edilebilir bir antikanser aktivitesinin olduğunu ancak en çok sitotoksik etkinin HT-29 ve HeLa hücreleri üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonunda ayrıca normal hücre hattı üzerinde de önemsiz bir yan etki görüldüğünü bildirmişlerdir

Sağlıklı kadınların vajinal mikroflorasından izole edilen *L. fermentum* SK5 suşunun probiyotik özelliklerinin ve HeLa, HT-29 ve and Caco-2 hücrelerine bağlanma mekanizmasının araştırıldığı bir başka çalışmada ise *L. fermentum* SK5 suşunun HeLa, HT-29 ve Caco-2 hücrelerine sırasıyla % 92.26, 93.21 ve 93.32 oranlarında bağlanarak hücrelerin gelişimini inhibe ettiği kontrol suş olarak kullanılan *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 suşunun bağlanma oranlarının ise %86.63, 79.91 ve 98.09 olduğu açıklanmıştır¹⁶³.

Probiyotik mikroorganizmaların vajinal ekosistem ve gastrointestinal sistemdeki pek çok yararlı etkisi yapılan çeşitli insan ve hayvan modelli çalışmalar sonucunda kanıtlanmıştır. Bu nedenle öncelikle sağlıklı bir yaşam ve sonrasında çeşitli

hastalıklardan korunma ve tedavide probiyotiklerin rolü tartışılmaz hâle gelmiştir. Ancak probiyotik mikroorganizmanın, hangi dozda, hangi sıklıkla ve ne kadar süre kullanılması ile ilgili çalışmalarda net veri bulunmamaktadır. Bu nedenle daha fazla sayıda bu yararlı mikroorganizmaların vajinal enfeksiyonlar (BV, viral enfeksiyonlar vb.) gastrointestinal sistem enfeksiyonları (ishal vb.) ve çeşitli kanser türlerinde biyoterapötik olarak kullanılabilmesi için etkinlik çalışmalarının olduğu (ülke, yaş, beslenme, yaşam tarzı, farklı probiyotik ve prebiyotik kombinasyonları, dozu ve süresi) iyi dizayn edilmiş, randomize, çift körlü, plasebo kontrollü klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır⁷.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Vajinal LAB'nin Kùltürleri ve Gelişme Koşulları

Çalışmamızda Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran yaş aralığı 18-45 arasında değişen, menopoza girmemiş, herhangi bir doğum kontrol yöntemi ile korunmayan ve 3 ay süre içerisinde antibiyotik kullanmamış sağlıklı kadınların vajinal bölgelerinden izole edilen LAB'i kullanılmıştır.

Alınan numuneler, steril koşullarda Ahi Evran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirilerek aynı gün içerisinde değerlendirmeye alınmıştır. LAB'nin geliştirilmesi ve aktifleştirilmesinde MRS (De Man Rogosa Sharpe, Merck) sıvı ve katı besiyeri kullanılmıştır. Laboratuvara getirilen her bir örneğin MRS katı besiyeri üzerine çiftlerli ekimleri gerçekleştirilmiş anaerob kavonozda 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda petrilere oluşan beyaz, kirli beyaz ve opak koloniler değerlendirmeye alınmıştır⁵⁸. Kullanılan kültürlerin uygun gelişim sıcaklıkları ve suşların kaynakları Tablo 3.1' de, besiyerlerin kimyasal bileşenleri ise EK 1' de gösterilmiştir.

LAB'nin antagonistik etkilerinin tespiti için kullanılan *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida albicans* 10098, *Candida albicans* Y-1200-NIH, *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 tip suşları Ahi Evran Üniversitesi (A.E.Ü.) Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarının kültür koleksiyonundan, *Bacillus cereus* (709) Roma, *Bacillus cereus* CU1065 ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşları A.E.Ü. Mühendislik Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Mikrobiyal Genetik Laboratuvarından temin edilmiştir.

Çalışmada ayrıca A.E.Ü. Eğitim ve Araştırma Hastanesine ürogenital enfeksiyon şikayeti ile çeşitli polikliklere başvuran hastaların idrarlarından izole edilen patojen bakterilerde kullanılmıştır. Bu bakteriler A.E.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen bakteriler olup *Candida glabrata* AEÜ1, *Escherichia coli* AEÜ2, *E. coli* AEÜ3 [GSBL+ (Geniş spektrumlu beta laktamaz)], *Enterococcus faecalis* AEÜ4, *Klebsiella pneumoniae* AEÜ5, *Proteus mirabilis* AEÜ6, *Staphylococcus aureus* AEÜ7 [MRSA (Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*)] suşlarından oluşmaktadır.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri, gelişme ortamları ve uygun gelişim sıcaklıkları

Bakteri adı	Gelişme ortamı	Gelişim sıcaklıkları	Kaynak
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	TSB	37°C	A.E.Ü. FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	TSB	37°C	A.E.Ü. FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	TSB	37°C	A.E.Ü. FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	TSB	37°C	A.E.Ü. FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	TSB	37°C	A.E.Ü. FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Bacillus cereus</i> Roma (709)	TSB	37°C	A.E.Ü. MMF. Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı
<i>Bacillus cereus</i> CU1065	TSB	37°C	A.E.Ü. MMF. Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	TSB	37°C	A.E.Ü. MMF. Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	PDA	30°C	A.E.Ü. FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Candida albicans</i> ATCC 10098	PDA	30°C	A.E.Ü. FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Candida albicans</i> Y-1200-NIH	PDA	30°C	A.E.Ü. FEF. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	PDA	30°C	A.E.Ü. MMF. Mikrobiyal Genetik Laboratuvarı
<i>Candida glabrata</i> AEÜ1	PDA	30°C	A.E.Ü. TIP Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Escherichia coli</i> AEÜ2	TSB	37°C	A.E.Ü. TIP Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Escherichia coli</i> AEÜ3 (GSBL+)	TSB	37°C	A.E.Ü. TIP Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Enterococcus faecalis</i> AEÜ4	TSB	37°C	A.E.Ü. TIP Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Tablo 3.1. (devam) Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri, gelişme ortamları ve uygun gelişim sıcaklıkları

<i>Klebsiella pneumoniae</i> AEÜ5	TSB	37°C	A.E.Ü. TIP Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Proteus mirabilis</i> AEÜ6	Kanlı Agar	37°C	A.E.Ü. TIP Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Staphylococcus aureus</i> AEÜ7 (MRSA)	TSB	37°C	A.E.Ü. TIP Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı

TSB: Tryptic Soy Broth; PDA: Potato Dextrose Agar.

3.1.2. Vajinal LAB Kültürlerinin Saklanması

İzole edilen bakteri kültürlerinin saklanması için %20 oranında gliserol içeren TSB (Tryptic Soy Broth, Sigma- Aldrich) besiyeri hazırlanmış ve 1.5 mL'lik ağzı kapaklı ependorf tüplerine yaklaşık 1.5 mL aktarılarak 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. MRS sıvı besiyerinde 18 saat aktiveleştirilen bakteri kültürleri daha sonra MRS katı besiyerine inoküle edilerek 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Katı besiyerlerinde geliştirilen kültürlerden birer koloni alınarak %20'lik gliserol içeren TSB besiyerine aktarılmıştır. Tüpler daha sonra -20°C'de ve -80°C'de (Nüve DF 490) muhafaza edilmiştir. İzolatlar 4 ayda bir aktiveleştirilmiş ve tekrardan aynı şartlarda muhafaza edilmiştir⁴¹.

3.1.3. Kültür Ortamları

LAB'nin ve diğer bakterilerin gelişimleri için kullanılan besiyerlerinin isimleri ve içerikleri EK 1'de verilmiştir.

3.1.4. Tampon ve Çözeltiler

Laboratuvar çalışmaları süresince kullanılan kristal violet stok, bazik fuksin stok ve diğer çözeltilerin içeriği EK 2'de gösterilmiştir.

3.1.5. Moleküler Markörler

Moleküler çalışmada kullanılan moleküler markörler EK 3'te gösterilmiştir.

3.1.6. Çözelti ve Malzemelerin Sterilizasyonu

Laboratuvar çalışmalarında kullanılan cam malzemelerin sterilizasyonu için 180°C'de 1,5 saat kuru hava sterilizatörü (Elektromag M5040) kullanılırken besiyerler, tampon ve solüsyonların sterilizasyonu da otoklavda (Nüve OT40L) 121°C'de 15 dakika tutularak gerçekleştirilmiştir⁴¹.

3.2. METOD

3.2.1. Materyallerin Toplanması

Çalışmamızda kullanılan LAB sağlıklı kadınların vajinal bölgelerinden sürüntü örnekleri alınarak temin edilmiştir. Vajinal sürüntü örnekleri stuart besiyerli transport eküvyonları (Lp İtaliana Spa) kullanılarak kadın hastalıkları ve doğum polikliniğinde görev yapmakta olan Yard. Doç. Dr. Selda Songur Dağlı tarafından alınmıştır. Alınan numuneler, steril koşullarda Ahi Evran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirilerek aynı gün içerisinde analize alınmıştır.

Vajinal sürüntü alınması planlanan hastalara kısa bir anket yapılarak; kaç yaşında oldukları, daha önce vajinal bir enfeksiyon geçirip geçirmediği, geçirmiş ise ne kadar süre önce geçirdikleri, en son ne zaman antibiyotik kullandıkları ve vajinal bölgelerinde herhangi bir kaşıntı veya ağrı olup olmadığı soruları sorulmuştur. Hastaların vermiş olduğu cevaplara göre uygun bulunan ve gönüllü olan hastalara gönüllü olur formu okutularak formun imzalanması sağlanmıştır. Hasta bilgi formu EK 4'de verilmiştir.

Proje kapsamında farklı hastalardan alınan 60 adet vajinal sürüntü örneği arasından LAB'si olduğu düşünülen 20 adet beyaz opak kolonileri olan, gram pozitif basil izole edilmiş ve çalışmada değerlendirmeye alınmıştır.

3.2.2. Vajinal LAB'nin İzolasyonu ve İdentifikasyonu

3.2.2.1. Vajinal LAB'nin kısmi karakterizasyonu

İzolatların kısmi karakterizasyonu; Gram boyanma özellikleri ile katalaz testi sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Gram boyama işlemi için MRS katı besiyerinde geliştirilen kültürlerden öze ile bir miktar alınarak bir damla steril su damlatılmış lama eşit bir şekilde yayılması sağlanmıştır. Havada kurutma işleminden sonra alevden 3-5 kez geçirilerek fiksasyon işlemi tamamlanmış ve takiben Gram boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Gram boyamada kullanılan çözeltiler ve içerikleri EK 2'de verilmiştir. Boyamada ilk olarak lamin üzerine kristal viyole boyası dökülerek 1 dakika bekletilmiş ardından distile su ile yıkanıldıktan sonra lügol çözeltisinde de 1-2 dakika bekletilmiştir. Tekrar distile su ile yıkanmasının ardından 15 saniye boyunca saf etanole tabi tutulmuş ve yıkanmış en son olarak da 30 saniye safranin boyası ile muamele edilmiştir. Su ile yıkanmasından sonra lamlar kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamin üzerine immersiyon yağı damlatılarak izolatların morfolojisi ve gram boyama özellikleri 100x büyütme ışık mikroskopunda (LEICA DM500) gözlenmiştir. Mor renkli olanlar Gram pozitif bakteri olarak değerlendirilmiştir.

Katalaz testini gerçekleştirmek için, MRS agar besiyerinde geliştirilen kolonilerin üzerine %3'lük H₂O₂ damlatılmış ve mikroskop altında gaz kabarcıklarının çıkışı gözlemlenmiştir⁴⁸. Çalışmada pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 suşu kullanılmıştır.

3.2.2.2. Vajinal LAB'nin biyokimyasal testleri

Vajinal sürüntülerden izole edilen LAB'nin biyokimyasal olarak tanımlanabilmesi için API (Analytical Profile Index) 50 CHL test kiti (BioMerieux, Inc., France) kullanılmıştır¹⁶⁴. API 50 CHL tanımlama kiti; farklı biyokimyasal test substratlarını dehidre olarak içeren 1 tanesi kontrol tüpü olmak üzere 50 adet mikrotüp içermektedir. Kit içeriğinde bulunan 10 ml hacimdeki steril besi ortamına (API 50 CHL Medium) MRS sıvı besiyerinde 37°C'de 18 saat aktifleştirilmiş bakteri kültürlerinden aktararak bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyonun yoğunluğu hücre dansitometre cihazı (DEN-1B McFarland Densitometer Biosan) ile McFarland 2'ye ayarlanarak steril mikropipet yardımı ile 50 mikrotüpe inokülasyon işlemleri yapılmıştır. Daha sonra kuyucukların üstü mineral yağ (BioMerieux) ile kapatılarak 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bromkresol moru indikatörü içeren mikrotüplerdeki besi ortamı renginin söz konusu karbonhidrat fermantasyonuna (asit üretimine) bağlı olarak mordan sarıya dönüşmesi durumunda sonuç pozitif, rengin değişmemesi durumunda ise sonuç negatif olarak değerlendirilmiştir. Eskülin testi gerçekleştirilen 25 nolu mikrotüpte ise besi ortamı renginin siyaha dönüşmesi durumunda sonuç pozitif, aynı kalması durumunda ise sonuç negatif olarak değerlendirilmiştir. İnkübasyonun 24. ve 48. saatlerinde, her test için kuyucuklardaki renk değişimleri pozitif (+), negatif (-) ve şüpheli (?) olarak kaydedilmiştir. Kontrol suş olarak *Lactobacillus rhamnosus* Gorbach-Goldin (GG) kullanılmıştır. Sonuçlar "API Identification Software (API Lab Plus Program, bioMerieux)" programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.3. Vajinal LAB'nin genotipik karakterizasyonu

İzole edilen suşların 16S rDNA dizi analizine göre tanımlamalarının yapılabilmesi için ilk olarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir. Daha sonra izolatların 16S rDNA dizi analizine göre tanımlanabilmeleri için 16S ileri (5'-3') ve geri (3'-5') primerleri kullanılarak 16S rDNA bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmış ve baz dizileri belirlenerek elde edilen dizilerin veri tabanında bulunan mikroorganizmalara ait baz dizileri ile karşılaştırılarak tanımlamaları yapılmıştır.

3.2.2.3.1. Vajinal LAB'nin genomik DNA izolasyonu

Tez çalışmamızda kullanılan suşların genomik DNA izolasyonları Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kiti (Kit No: #K0721) kullanarak gerçekleştirilmiştir. 37°C'de 18 saat süre ile geliştirilen aktif kültürlerden 2 ml alınarak 5.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj edildikten sonra üst sıvı ortamdan uzaklaştırılmış ve kit içeriğinde belirtilen prosedür aşamalarına göre işlemler takip edilmiştir. Öncelikle çalışmaya başlamadan önce gram pozitif bakteriler için liziz buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA pH 8.0, %1.2 Triton X-100 ve 20 mg/mL lizozim) hazırlanmış ve bakteri pelletlerinin üzerine 180 µl eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında pelletlerin çözülmesinin ardından kit içerisinde yer alan liziz solüsyonundan 200 µl ve 20 µl Proteinaz K eklenerek pipetleme işlemi ile solüsyonların karışması sağlanmıştır. Ardından her bir örnek ısıtıcı kuru blok (IKA Dry Block Heater 1) içerisine yerleştirilerek 56°C'de 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem esnasında örnekler 10 dk ara ile ters düz edilerek karışması sağlanmıştır. Inkübasyonun ardından her bir örneğe 20 µl RNase A solüsyonu eklenerek vorteks yardımıyla iyice karışması sağlanmış ve oda ısısında 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra üzerine %50'lik etanolden 400 µl eklenerek vortekslenmiştir. Prosedürün bir sonraki aşamasında hazırlanan lizatlar kit içerisinde bulunan toplama tüplerinin içine yerleştirilmiş DNA saflaştırma kolonlarına aktarılmış ve üzerine 500 µl Wash buffer I (etanol eklenmiş) eklenerek 8000 x g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Bu aşamada prosedürde bazı değişiklikler yapılarak bir sonraki aşama olan Wash buffer II eklenmemiş DNA saflaştırma kolonlarında tutunmuş olan DNA'nın, elüsyon buffer ile geri alımı iki seferde sağlanmıştır. Bu aşamada her seferde 50 µl elüsyon buffer eklenerek 12.000 x g'de 3 dk santrifüj edilerek toplamda 100 µl DNA elde edilmiştir. Elde edilen DNA daha sonraki çalışmalarda kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.2.3.2. Vajinal LAB'nin agaroz jel elektroforezi

Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kiti kullanımıyla izole edilen DNA numunelerinin elektroforezleri % 1 agaroz (Sigma) içeren jelde gerçekleştirilmiştir¹⁶⁵. Agaroz jel elektroforezi için öncelikle 1 g agaroz 100 ml 1xTAE

(Tris Asetat EDTA) elektroforez tamponu içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak çözülmüştür. 1xTAE tamponu 40xTAE (1.6 M Tris Base, 40 M EDTA, pH 7.2) stok solüsyondan gerekli seyreltmeler yapılarak hazırlanmıştır. 40xTAE tamponun hazırlanışı EK 2’de verilmiştir. Jelin sıcaklığı yaklaşık 40°C’ye kadar soğuduktan sonra %2 Etidyum bromit (10 mg/ml) çözeltisi eklenmiş ve homojen bir karışım sağlandıktan sonra tarakların yerleştirilmiş olduğu elektroforez tankına hava kabarcığı kalmayacak şekilde yavaşça dökülerek, jelin polimerizasyonu için yarım saat beklenmiştir. Süre sonunda elektroforez tankına, jelin yüzeyini kapatacak şekilde “tampon çözelti” (1xTAE) ilave edilmiştir. Daha sonra jelde bulunan taraklar jelin hasar görmemesine dikkat edilerek uzaklaştırılmıştır. -20°C’de saklanan DNA örnekleri bir süre oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4 µl DNA numunesi üzerine 1 µl yükleme boya çözeltisi olan “loading dye” ilave edilerek mikropipet yardımıyla DNA örnekleri kuyucuklara yüklenmiştir. DNA’nın büyüklüğünü belirlemek amacıyla jelin bir kuyucuğuna da 2-10 kb’lik süper sarmal DNA (scDNA) tanımlama çözeltisi (Marker, Promega) yüklenmiştir. Yükleme işleminden sonra tank kapatılarak güç kaynağına bağlanmış DNA örneklerinin 100 V’da 1.5 saat süreyle jelde yürütmesi sağlanmıştır. Süre sonunda jel elektroforez tankından çıkarılarak jel görüntüleme sisteminde UV ışık altında DNA örneklerinin jeldeki görünümü incelenmiştir.

3.2.2.3.3. Vajinal LAB DNA’larının PZR ile çoğaltılması

İzole edilen DNA örneklerindeki tekrarlayan, 16S rDNA dizi bölgeleri; 27F ileri (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG3') ve 1429R geri (3' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T5') universal primerleri kullanılarak, PZR işlemi Thermo Fisher Scientific Arktık Thermal Cycler 5020 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR işlemi için 500 µl’lik PCR tüplerine toplam hacim 50 µl olacak şekilde sırasıyla 31.6 µl moleküler çalışmalar için üretilmiş su, 5 µl PCR tamponu, 3 µl 1,5 mM MgCl₂ (PCR tamponu içerisinde yoksa), 5 µl deoksinükleotidtrifosfat (dNTP, Promega) karışımı (dATP, dCTP, dGTP, dTTP’lerden her birinin konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde hazırlanan karışım), 1 µl 16S geri ve 1 µl 16S ileri primerleri (her biri 0.2 pmol/µl) ile 3 µl kalıp DNA, ve 0,4 µl 2 U Taq DNA polimeraz (Eppendorf) enzimi eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışım PZR’in haznesine yerleştirildikten sonra amplifikasyon işlemi aşağıdaki gibi tamamlanmıştır¹⁶⁴.

1. Denatürasyon	95 °C’de 3dk	
2. Primer eşleşmesi	95 °C’de 45 sn	} 34 siklus
	48 °C’de 45 sn	
	72 °C’de 2 dk	
3. Primer uzaması	72 °C’de 5 dk	

3.2.2.3.4. Vajinal LAB’nin 16S rDNA bölgesinin baz dizisinin belirlenmesi ve izolatların tanımlanması

Vajinal sürüntülerden izole edilen LAB’nin dizi analizleri MacroGen (Amsterdam, Hollanda) firması tarafından yapılmıştır. Dizi analizi sonuçları, BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) programı kullanılarak veritabanları ile karşılaştırılmış ve tarama sonucunda dizinin hangi mikroorganizmaya ait olduğu benzerlik yüzdesiyle belirlenmiştir. İzolatların 16S rDNA bölgesinin bazdizisi ve BLAST tarama sonuçları EK 5’ da verilmiştir. Tanımlanan suşların evrimsel akrabalıklarını belirlemek amacı ile oluşturulan filogenetik ağaç MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı ile Jukes-Cantor Model algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Filogenetik ağaç oluşumunda kullanılan suşlar ve benzerlik oranları EK 6’da verilmiştir.

3.2.2.4. Vajinal LAB’nin probiyotik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.2.4.1. Vajinal LAB’nin hemolitik aktivite testi

İzole edilen LAB’nin hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, 37 °C’de 18 saat geliştirilen kültürlerin, ticari olarak temin edilen ve %5 koyun kanı içeren Colombia-agar (bioMerieux, Inc. France) besiyerine çizgi ekimleri yapılmıştır. Kontrol bakterileri olarak *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır. 37°C’de 24 saat inkübasyonun ardından, kolonilerin etrafında parlak-yeşil zon oluşturan koloniler α -hemolitik, berrak zon oluşturanlar β -hemolitik, zon oluşturmayanlar ise γ -hemolitik olarak değerlendirilmiştir¹⁶⁶.

3.2.2.4.2. Vajinal LAB'nin asit ve safra toleransı

-Asidik tolerans: Tanımlaması yapılan LAB'nin düşük pH'da hayatta kalma oranı Maragkoudakis vd. (2006)¹⁶⁷ tarafından belirtilen yöntemler modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Probiyotik karakterdeki mikroorganizmaların midenin yüksek asitli ortamından geçerek bağırsaklara ulaşabilme yeteneğini belirlemek amacıyla mide sıvısı koşullarına benzer bir ortam oluşturulmaya çalışılmıştır. MRS sıvı besiyerleri önceden pH 5.7'ye (1 N HCl ve 1 N NaOH) ayarlanarak otoklavda sterilize edilmiştir. 5 ml MRS sıvı besiyeri 18 saatlik aktifleştirilmiş olan kültürler 3000 x g'de 15 dakika (4°C) santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Çökelti sterilfosfat tamponlu tuz çözeltisi [phosphate-buffered saline (PBS)] ile iki kez yıkanmış ve tekrar yeniden fosfat tamponunda (pH 7.2) süspanse edilerek 8.5±9.1 log cfu/ml'ye ayarlanmıştır. Daha sonra PBS tamponun pH'sı 2.0, 2.5 ve 3.0 olacak şekilde hazırlanmış 3 farklı PBS tamponunda 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Kontrol için pH değeri 7.2 olan PBS kullanılmıştır. İnkübasyonun 0. ve 3. saatlerinde örneklerden numune alınarak 10⁻⁷ düzeyine kadar seridilüsyonlardan geçirilerek seyreltilmiş ve MRS katı besiyerlerine yayma ekimleri 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. Suşların 37°C'de 24-48 saat inkübasyonun sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılarak, log cfu/mL olarak sayıları belirlenmiş ve aşağıdaki formülden % canlılık oranları tespit edilmiştir.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{X}{X_0} \times 100$$

X : Test grubu canlı mikroorganizma sayısı

X₀: Kontrol grubu canlı mikroorganizma sayısı

-Safra tuzu toleransı: İzole edilen LAB'nin safra tuzuna karşı direnç özelliğinin belirlenmesi amacıyla daha önceden %0.3, %0.5 ve %1 oranında safra tuzu (oxgall, Sigma) içeren MRS sıvı besiyerleri hazırlanmış ve otoklavda 121°C'de 15 dakika tutularak sterilize edilmiştir. 5 ml besiyeri içinde bir gece aktifleştirilmiş olan kültürler 10.000x g'de 5 dakika 4°C'de santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırılmış ve çökelti PBS (pH 7.2) ile iki sefer yıkanmış ve tekrar yeniden fosfat tamponunda süspanse edilerek

8.5-9.1 log cfu/ml'ye ayarlanmıştır. Ardından farklı oranlarda safra tuzu içeren MRS sıvı besiyerine 100 µl aşılama yapılmıştır. Kültürler 37°C'de 3 saat inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyonun 0. ve 3. saatlerinde örneklerden numune alınarak 10⁻⁷ düzeyine kadar seri dilüsyonlardan geçirilerek seyreltilmiş ve MRS katı besiyerlerine yayma ekimleri 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. Suşların 37°C' de 24-48 saat inkübasyonun sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılarak, log cfu/mL olarak sayıları belirlenmiş ve aşağıdaki formülden % canlılık oranları tespit edilmiştir^{168,169}.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{X}{X_0} \times 100$$

X : Test grubu canlı mikroorganizma sayısı

X₀: Kontrol grubu canlı mikroorganizma sayısı

3.2.2.4.3. Vajinal LAB'nin pH değişimi üzerine etkisi

MRS sıvı besiyerinde (pH 6.5) 37°C'de 18 saat geliştirilmiş bakteri kültürlerinin asidik pH'sını belirlemek amacı ile bakteri kültürlerinin pH'sı pH metre (HANNA instruments HI 2211 pH/ORP Meter) ile ölçülmüştür⁵⁸. Ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.4.4. Vajinal LAB'nin laktik asit miktarlarının belirlenmesi

MRS sıvı besiyerinde 37°C'de 18 saat geliştirilmiş LAB kültürlerinin laktik asit üretim miktarlarını belirlemek amacı ile klinik kimya cihazında (Abbott Architect C8000) laktik asit miktarları tespit edilmiştir. Ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir⁵⁸.

3.2.2.4.5. Vajinal LAB'nin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

LAB'nin duyarlılık testi agar disk difüzyon yöntemine göre belirlenmiştir. İzole edilmiş LAB 37°C'de MRS sıvı besiyerinde art arda iki kez aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen kültürlerin yoğunluğusteril tuzlu su içeren tüplerde 0.5 McF'a (625nm absorbans= 0,08-0,1) ayarlanmış ve MRS agar plaklarına aktararak steril drigalski spatülü ile MRS agar üzerine homojen bir şekilde yayılması sağlanmıştır. Petri plakları bir süre oda ısısında bekletildikten sonra plaklara uygun aralıklar ile diskler yerleştirilmiş ve 37 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda antibiyotik disklerinin etrafında oluşan zonların çapları kumpas ile milimetrik olarak ölçülmüştür. Suşların antibiyotik duyarlılık düzeyleri NCCLS (Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi) kriterlerine göre yapılmış ve değerlendirilmiştir. Standartlara göre Dirençli (R), Yarı hassas (I) ve Hassas (S) olarak değerlendirilmiştir¹⁶³. *E. coli* ATCC 25922 pozitif kontrol suş olarak kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan antibiyotik diskler (Oxoid) vancomycin (VA) 30 (mcg), teicoplanin (TEC) 30 mcg, penicillin (P) (10U), ampicillin (AM) (10 mcg), tetracycline (TE) (30 mcg), rifampin (R) (5 mcg), chloramphenicol (C) (30 mcg), eritromisin (E) (15 mcg), ciprofloxacin (CIP) (5 mcg), gentamisin (CN) (10 mcg) cefazolin (CZ), 30 mcg, clindamycin (DA) 2 mcg, tobramycin (TOB) 10 mcg, amikacin (AK) 30 mcg, cefoperazone (CEP) 75 mcg, aztreonam (ATM) 30 mcg, streptomycin (S) 300 mcg, netilmicin (NET) 10 µg, imipenem (IMP) 10 mcg ve ceftazidime (CAZ) 30 mcg şeklindedir.

3.2.2.4.6. Vajinal LAB'nin patojen mikroorganizmalar üzerindeki antagonistik aktivitesinin belirlenmesi

LAB'nin klinik olarak önemi olan insan patojenlerine karşı antagonistik aktivitesi kuyu difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmada indikatör suş olarak *B. cereus* (709) Roma, *B. cereus* CU1065, *B. subtilis* ATCC 6633, *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* 10098, *C. albicans* Y-1200-NIH, *C. tropicalis* ATCC 13803, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *P.*

aeruginosa ATCC 27853 ve *S. aureus* ATCC 29213 tip suşlarının yanında Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine ürogenital enfeksiyon şikayeti ile çeşitli polikliklere başvuran hastaların idrarlarından izole edilen patojen bakterilerde kullanılmıştır. Bu bakteriler Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen bakteriler olup *Candida glabrata* AEÜ1, *E. coli* AEÜ2, *E. coli* AEÜ3 (GSBL+), *E. faecalis* AEÜ4, *K. pneumoniae* AEÜ5, *P. mirabilis* AEÜ6, *S. aureus* AEÜ7 (MRSA) suşlarından oluşmaktadır.

LAB 37°C'de MRS sıvı besiyerinde art arda iki defa aktifleştirilmiştir. Aktif kültürler 10.000 x g'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant steril şartlarda 0.45 µm'lik (Milipore, USA) disposable filtreden geçirilerek mikrofiltrasyon yolu ile sterilize edilmiştir.

Patojen test bakterileri uygun besiyerlerinde 37°C'de MRS sıvı besiyerinde 18 saat aktifleştirildikten sonra kültürlerin son konsantrasyonu 1 x 10⁹ CFU/mL olacak şekilde Mueller Hinton Agar (Merck) ve Potato Dextrose Agar (Merck) besiyerlerine steril drigalski spatülü ile homojen bir şekilde yayılması sağlanmıştır. Ekimleri yapılan kültür plaklarının üzerine 6 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. LAB'inden elde edilen steril süpernatantlardan 100 µL alınarak, açılan kuyucuklara aktarılmıştır. Plakların 2 saat oda ısısında bekletilmesinin ardından bakteriler 37°C'de ve mayalar 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Antimikrobiyal aktivite, kuyucukların çevresinde oluşan zon çapının mm olarak ölçülmesiyle ve üç çalışmanın ortalamasının alınmasıyla değerlendirme yapılmıştır^{159,170}.

3.2.2.4.7. Vajinal LAB'nin hidrojen peroksit üretim yeteneklerinin belirlenmesi

LAB'nin hidrojen peroksit üretim yeteneklerini semikantitatif olarak belirlemek amacıyla Wilks vd. (2004)¹⁷¹ önermiş oldukları yöntem kullanılmıştır. MRS sıvı besiyerinde 37°C de 24 saat geliştirilen kültürlerden 100 µL alınarak MRS katı besiyerine çizgi ekimleri gerçekleştirilmiş ve 37°C de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Seçilen koloniler (Quantofix Peroxide, Germany) peroksidaz içeren

sitripler ile muamele edilmiş ve test stripinde mavinin farklı tonlarında elde edilen görüntü, üreticinin tavsiye ettiği renk skalası ile kıyaslanarak yapılmıştır. Sonuçlar test kiti üzerinde belirtilen negatif, 1-3, 3-10, 10-30 ve 30-100 mg/L test aralıkları göz önüne alınarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.4.8. Vajinal LAB'nin kolesterol asimilasyon kapasitelerinin belirlenmesi

LAB'nin kolesterol asimilasyon kapasitelerinin belirlenmesi amacı ile Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran ve serum kolesterol seviyesi 250-300 mg/dL olan hastaların serumları toplanmıştır. % 0.3'lük (Oxgall, Sigma) safra tuzu içeren MRS sıvı besiyerlerine son konsantrasyonu 100 mg/mL olacak şekilde 0.45 µm'lik disposable filtreden geçirilerek mikrofiltrasyon yolu ile sterilize edilmiş (Milipore, USA) kolesterol eklenmiştir. Hazırlanan karışım steril tüplere dağıtılmış ve ardından bir gece önceden aktifleştirilmiş kültürlerden 100 µl alınarak tüplere inoküle edilmiştir. Kültürler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücreler 4°C'de 5,000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları steril ependorf tüplerine alınmıştır. Çalışmada kontrol olarak bakteri hücresi inoküle edilmemiş % 3'lük safra tuzu ve kolesterol içeren örnek kullanılmıştır. Ölçüm değerleri Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında Cobas 8000 (Roche, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. Sıvı besiyerinde giderilen % kolesterol miktarı, örneklerin inkübasyon öncesindeki kolesterol miktarı ile inkübasyon sonrası kolesterol miktarı karşılaştırılarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Kolesterol azalma oranı (\%)} = \frac{\text{İlk kolesterol} - \text{Son kolesterol}}{\text{İlk kolesterol}} \times 100$$

İlk kolesterol: Bakteri hücresi inoküle edilmemiş % 3'lük safra tuzu ve kolesterol içeren besiyeri.

Son kolesterol: % 3'lük safra tuzu ve kolesterol içeren besiyerine bakteri hücresi inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyonun ardından besiyerinde kalan kolesterol miktarı

3.2.2.4.9. Vajinal LAB'nin enzim profillerinin belirlenmesi

MRS besiyerinde 18 saat geliştirilen kültürler 10.000 x g' de 10 dk santrifüj edilip sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra, 2 mL steril tuzlu su (% 0,89 NaCl) solusyonu ile süspansiyon edilen bakteri kültürlerinden 5-6 McFarland standardı bulanıklığında bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. API ZYM kiti (Biomérieux, France) içerisinde bulunan enzim emdirilmiş striplerdeki kuyucukların içerisine hazırlanan süspansiyondan 65 µL ilave edilerek kitler 37°C'de 4-5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kit içindeki test edilen enzimlerin listesi Tablo 3.2'de gösterilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucukların içerisine, sırasıyla, 1 damla ZYM A ve 1 damla ZYM B reaktifleri damlatılarak 5 dk bekletilmiş ve 10 sn 1000 W ışık kaynağı altında tutulmuştur¹⁷². Striplerdeki renk değişimleri ve yoğunlukları üretici firmanın önerilerine göre değerlendirilmiştir.

Tablo. 3.2. API-ZYM ile test edilen enzimlerin listesi

API-ZYM Test Kitinde Bulunan Enzimlerin Numara Karşılıkları			
1	Kontrol	11	Asit fosfataz
2	Alkalin fosfataz	12	Naftol -AS-BI- fosfohidrolaz
3	Esteraz (C 4)	13	α- Galaktosidaz
4	Esteraz lipaz (C 8)	14	β-Galaktosidaz
5	Lipaz (C 14)	15	β- Glukuronidaz
6	Lösin arilamidaz	16	α- Glukozidaz
7	Valin arilamidaz	17	β-Glukozidaz
8	Sistin arilamidaz	18	N-Asetil-β- glukozaminidaz
9	Tripsin	19	α- Mannosidaz
10	α- Kimotripsin	20	α- Fukosidaz

3.2.2.4.10. Vajinal LAB'nin otoagregasyon ve koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi

Sağlıklı kadınların vajinal mikroflorasından izole edilen LAB'nin otoagregasyon özelliğinin belirlenmesinde Juárez Tomás vd. (2005)¹⁷³ tarafından uygulanan yöntem kullanılmıştır. %1 oranında MRS sıvı besiyerine inoküle edilen

kültürlerin 37°C’ de 18 saat aktifleştirilmesinin ardından 6000 x g’ de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Çökelti iki kez PBStamponu (pH 6.2) ile yıkandıktan sonra 600 nm’de optik dansite (OD) 0.6 olacak şekilde ayarlandıktan sonra aynı PBS ile yeniden süspanse edilmiştir. Bu şekilde 4 ml olacak şekilde hazırlanan kültürler 10 saniye vortekslenerek, otoagregasyon özelliğini tespit etmek için 4 saat süresince oda sıcaklığında hareket ettirmeden bekletilmiştir. Her saat başlarında kültürlerin üst kısmından 0.1 ml alınarak 3.9 ml MRS sıvı besiyeri ile seyreltilerek kültürün bekletme öncesi ve bekletme sonrası OD’leri 600nm’de UV spektrofotometrede (Thermo Scientific Evolution 60S UV Spektrofotometre) okunmuştur (Juárez Tomás, 2005)¹⁷³. Otoagregasyon için kullanılan formül aşağıdaki şekildedir.

$$\text{Otoagregasyon (\%)} = \frac{\text{OD başlangıç} - \text{ODson}}{\text{OD başlangıç}} \times 100$$

OD_{başlangıç}: Otoagregasyonun başlangıç zamanı (t=0)

OD_{son}: Her saat sonundaki OD değeri (t =1, 2, 3, 4).

Koagregasyon özelliğinin belirlenmesinde de otoagregasyon yönteminde olduğu gibi Juárez Tomás vd. (2005)¹⁷³ tarafından verilen yöntem kullanılmıştır. %1 oranında MRS besiyerine inoküle edilen kültürler 37°C’ de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 6000g’ de 15 dakika santrifüj edilerek iki kez PBS ile yıkanmasının ardından 600 nm’de optik dansite (OD) 0.6 olacak şekilde MRS besiyerinde çözülmüştür. Koagregasyon yeteneğini belirlemek için kullanılacak olan patojen bakterilerin hücre süspanسیونlarında uygun sıvı besiyerlerinde aktifleştirildikten sonra aynı şekilde hazırlanmıştır.

Koagregasyon için *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 numaralı suşlar kullanılmıştır. Patojen her suşdan 2 ml alınarak diğer hücre süspanسیونu ile eşit miktarda karıştırılarak, 15 saniye vortekslenmiş ve koagregasyon özelliği için 4 saat süresince oda sıcaklığında hareket ettirmeden bekletilmiştir. Her saat başında üst fazdan 0.1 ml alınarak 3.9 ml MRS sıvı besiyeri ile seyreltilerek kültürün bekletme öncesi ve bekletme sonrası optik yoğunlukları 600nm’ ye ayarlanmış spektrofotometrede

(Thermo Scientific Evolution 60S UV Spektrofotometre) okunmuştur. Koagregasyon yüzdesinin belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Koagregasyon \%} = \frac{(AX + AY/2) - A(x + y)}{AX + AY/2} \times 100$$

x ve y: Kontrol tüplerindeki 2 tür

x+y: Karışım

3.2.2.4.11. Vajinal LAB'nin üroepitelyal hücrelere bağlanması

Üroepitelyal hücreler Kırşehir ili, Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran epitel hücre yoğunluğu fazla olan sağlıklı kadınların idrarından elde edilmiştir. İdrarlar PBS ile iki kez yıkanmış ve yaklaşık olarak 0.5 McF'a (625nm= 0.08-0.1) yoğunluğu olacak şekilde PBS ile yeniden süspanse edilmiştir. 1 gece önceden aktifleştirilmiş LAB'de aynı şekilde PBS ile iki kez yıkanarak PBS ile yeniden bakteri yoğunluğu 0.5 McF'a ayarlanmıştır. Negatif kontrol olarak bakteri kültürü eklenmemiş üroepitelyal hücre kullanılmıştır. Hazırlanan bakteri hücreleri ile üroepitelyal hücreler eşit hacimler de karıştırılarak 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından epitel hücrelere bağlı olmayan bakterileri elimine etmek karışımın PBS ile yıkanmasının ardından tekrardan PBS ile süspanse edilmiştir. LAB'nin epitel hücrelere bağlanma yeteneklerinin gözlemlenmesi amacı ile PBS ile süspanse edilen epitel hücrelerin Gram boyaması yapılmış ve boyama yapılan preparatlar ışık mikroskobu (Leica DM500) altında 100x büyütmede gözlemlenmiştir. Bakteri hücrelerinin epitel hücrelere bağlanma dereceleri +1 ile +4 arasında derecelendirilmiştir¹⁷⁴.

3.2.2.5. Kanser hücre hatları ve gelişim koşulları

Sağlıklı kadınların vajinal mikrofloralarından izole edilen bütün suşların probiyotik özelliklerinin belirlenmesinin ardından suşların sekresyon metabolitlerinin tümör hücreleri üzerindeki antikanser aktivitesini belirlemek amacı ile HeLa ve Caco-

2 hücre hatları kullanılmıştır. Bütün deneyler Ahi Evran Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

HeLa hücreleri rutin olarak %10'luk fetal bovin serum, gentamisin, penisilin ve streptomisin antibiyotikleri içeren RPMI 1640 besiyerinde; Caco-2 hücreleri ise L glutamin, NaHCO₃, Na piruvat, esansiyel olmayan aminoasit, %20 fetal bovin serum içeren EMEM besiyerinde CO₂'li inkübatörde (Nüve EC 160) geliştirilmiştir. Bütün deneyler 37°C' de %5 CO₂'li ortamda gerçekleştirilmiştir Merghoub vd. (2009)¹⁷⁵.

Hücre kültürlerinin pasajlanması sırasında hücre hatları, kültür kabı yüzeyini kapladıkça besiyeri pipetlenerek atılmış ve kültür kabı yüzeyi PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra yıkama tamponu uzaklaştırılmış ve hücre tipine bağlı olarak 1-2mL 0.25% Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 5 dakika boyunca hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ve birbirlerinden ayrılması sağlanmıştır. Tripsini inaktive etmek amacı ile 4-5mL besiyeri eklenmiş ve istenen oranda pasajlama yapılarak, hücreler yeni kültür ortamlarına aktarılmıştır¹⁷⁶.

3.2.2.6. Vajinal LAB'nin kültür süpernatantlarının hazırlanması

Probiyotik özelliğe sahip suşların HeLa ve Caco-2 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi ya da sitotoksitesinin değerlendirilmesi amacı ile suşların sekresyon metabolitlerinin liyofilizasyon işlemi Ahi Evran Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

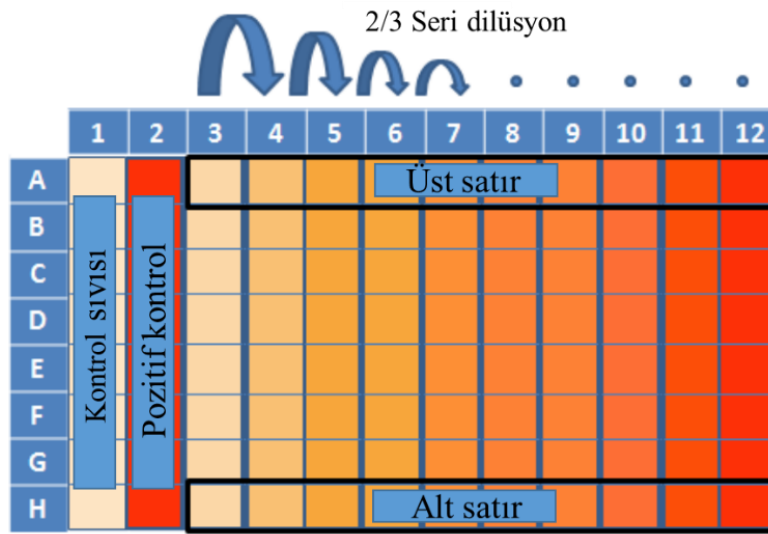
Bakteri kültür süspansiyonlarının hazırlanması amacı ile durgun faz evresinde olan kültürler (37°C' de 18 saat inkübasyonun ardından) 5.000 x g'de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Bakteri süpernatantları pellet kısmından ayrılarak pH'sı 7.2'ye ayarlanmış ve 0.22 µm'lik (Milipore, USA) filtrelerden geçirilerek sterilize edilmiştir. Steril edilen süpernatantların liyofilizasyon işlemi -58°C' de liyofilizasyon cihazında (Labfreez FD-10-R) gerçekleştirilmiştir¹⁶² (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Labfreez FD-10-R liyofilizasyon cihazının görüntüsü

3.2.2.7. Vajinal LAB'nin XTT (Hücre proliferasyon kiti) testi

Vajinal LAB'nin HeLa ve Caco-2 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi ya da sitotoksitesinin değerlendirilmesi amacı ile XTT [(2,3-Bis (2-metoksi- 4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum), Biological Industries, İsrail] kiti kullanılmıştır. Hücreler 96 kuyulu plakalara ekilerek bir gece boyunca (24 saat) karbondioksit inkübatöründe büyütülmüştür. 24 saat sonra liyofilize edilen kültür süpernatantları 72 saat hücrelerle muamele edilmiştir. Göreceli büyüme miktarları, kuyulara eklenen XTT ajanı (fenazin metosülfat) ile saptanmıştır. Şekil 3.2'de XTT hücre proliferasyon kitinin şematik görünümü verilmiştir¹⁷⁶.



Şekil 3.2. 96 kuyucuklu plak üzerinde XTT hücre proliferasyon kitinin şematik görünümü

4. BULGULAR

4.1. VAJİNAL SÜRÜNTÜLERDEN ELDE EDİLEN LAB'NİN İZOLASYONU

4.1.1. Vajinal LAB Seçimi Yapılan Hastalar

Çalışmamızda kullanılan LAB sağlıklı kadınların vajinal bölgelerinden izole edilmiştir. Çalışmaya dahil edilecek hastalar son üç ay içerisinde vajinal bir enfeksiyon geçirmemiş ve antibiyotik kullanmamış kişiler arasından seçilmiştir. Seçilen örneklere ait kişisel bilgiler Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Vajinal LAB’nin izole edildiği hastalara ait bazı bilgiler

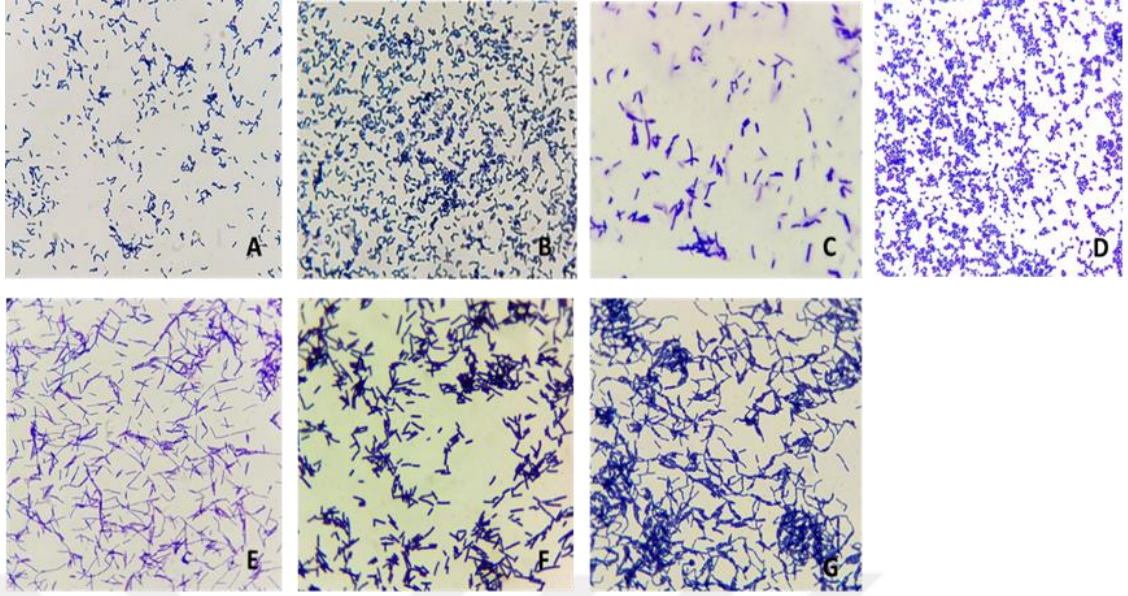
Seçilen suşların kodları	Yaş	Son üç ayda antibiyotik kullanımı	Son üç ayda geçirilmiş vajinal enfeksiyon	Son üç ayda geçirilmiş başka bir hastalık
L1	24	-	-	-
L2	22	-	-	-
L3	19	-	-	-
L5	23	-	-	-
L6	18	-	-	-
L7	27	-	-	-
L8	25	-	-	-
L9	22	-	-	-
L10	23	-	-	-
L11	19	-	-	-
L12	21	-	-	-
L13	22	-	-	-
L14	18	-	-	-
L15	26	-	-	-
L16	24	-	-	-
L17	25	-	-	-
L18	23	-	-	-
L19	22	-	-	-
L20	22	-	-	-
L21	24	-	-	-

Tablo 4.1’de görüldüğü gibi seçilen 20 adet izolatın elde edildiği hastaların bilgileri incelendiğinde hastaların ortalama 18-27 yaşları arasında olduğu ve yaş ortalamasının 22 olduğu gözlemlenmiştir.

Seçilen hastalardan alınan 60 adet vajinal sürüntü örnekleri Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirilerek aynı gün değerlendirilmeye alınmıştır. Suşların gelişimi için MRS besiyeri kullanılmıştır. MRS katı besiyerine çiftlerli ekimleri gerçekleştirilen örnekler anaerobik jar kavonozlarının içinde 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İzolatların koloni morfolojisi, Gram reaksiyonları ve katalaz aktiviteleri incelenmiş ve değerlendirme sonucunda LAB olduğu düşünülen Gram pozitif basil, saf, beyaz, opak görünümlü ve saf olan 20 adet izolat seçilmiştir.

4.1.2. Vajinal LAB’nin Morfolojik Karakterizasyonu

Vajinal sürüntülerden elde edilen izolatların Gram boyama işlemleri yapılarak 100x büyütme ışık mikroskopunda gözlemlenmiştir. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi LAB grubunda yer alan *Lactobacillus* spp. türlerinin uzun çubuk şekilli olduğu gözlemlenirken *Pediococcus acidilactici* türü kok şekilli, tetrad yapıda ve mor renkte olduğu gözlemlenmiştir. Bütün suşlar Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1. Vajinal mikrofloradan izole edilen 7 farklı türün gram boyama görüntüleri; A: L1: *L. paracasei*, B: L9: *L. plantarum*, C: L5: *L. crispatus*, D:L7: *P. acidilactici*, E: L11: *L. gassei*, F: L14: *L. acidophilus*, G: L15: *L. rhamnosus*.

4.1.3. Vajinal LAB'nin Biyokimyasal Karakterizasyonu

Vajinal sürüntülerden izole edilen LAB'nin biyokimyasal olarak tanımlanabilmesi için API 50 CHL test kiti kullanılmıştır. Şekil 4.2'de bazı suşlara ait API 50 CHL test kiti görüntüleri, Tablo 4.2'de LAB'nin API 50 CHL sonuçları, Tablo 4.3'de API 50 CHL sonuçlarına göre tanımlanan suşların listesi verilmiştir.



Şekil 4.2. Vajinal mikrofloradan izole edilen bazı suşlara ait 24. saat API 50 CHL test kiti görüntüleri; A: 0. saat kit görüntüsü, B: L1, C: L5, D:L6, E: L12, F: L21.

Tablo 4.2. Vajinal LAB'nin API 50 CHL sonuçları

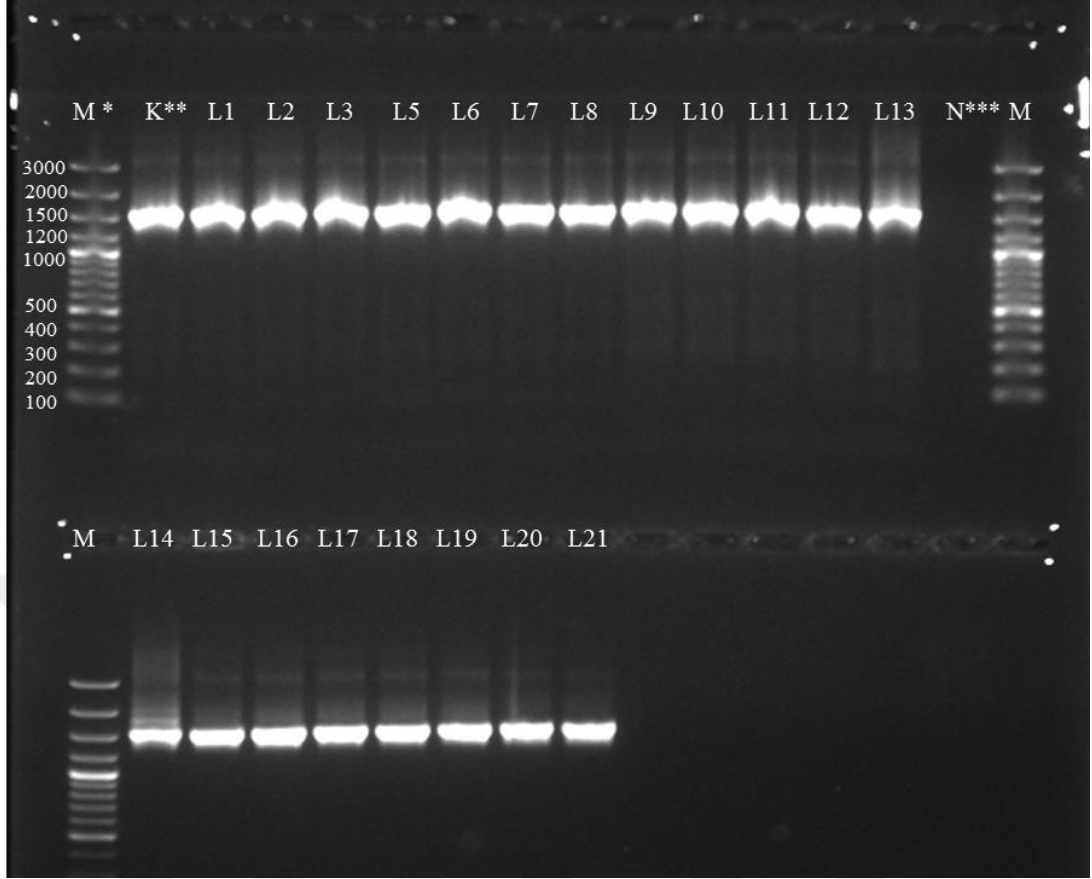
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49					
	0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLG	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNL	2KG	5KG					
L1	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	?	-	-	+	+	?	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	?	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-					
L2	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	?	-	-	+	+	?	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	?	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-				
L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	?	+	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	?	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
L5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	?	?	+	+	+	-	+	+	+	?	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
L6	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	?	-	?	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	?	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-			
L7	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	?	-	?	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	?	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-			
L8	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	?	-	?	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	?	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-			
L9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	?	-	?	+	-	-	-	?	+	-	-	-	+	+	?	+	-	-	-	-	-	?	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
L10	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	?	?	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-			
L11	-	-	-	?	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	?	-	?	+	+	-	-	+	+	-	+	+	?	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	?	-	-	-	-	-	-			
L12	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	?	-	?	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	?	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-		
L13	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	?	-	?	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	?	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	?	-	-	-	-	-	-		
L14	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
L15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	?	?	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	?	?	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	?	-	+	+	+	-	+	+	+	?	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	?	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	?	?	+	+	+	-	+	+	?	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L20	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	?	-	-	+	+	?	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	?	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
L21	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	?	-	-	+	+	?	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	?	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 4.3. Vajinal LAB'nin API 50 CHL sonucuna göre tanımlama sonuçları

İzolat Kodu	Tanımlama Sonucu	%
L1	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	99.9
L2	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	99.9
L3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	97.6
L5	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.5
L6	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	92.6
L7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	93.5
L8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	92.1
L9	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.2
L10	<i>Lactobacillus gasseri</i>	92.6
L11	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	93.4
L12	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	94.2
L13	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	93.8
L14	<i>Lactobacillus gasseri</i>	89.7
L15	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	98.6
L16	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.7
L17	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.8
L18	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.7
L19	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.7
L20	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99.9
L21	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	98.7

4.1.4. Vajinal LAB'nin Genotipik Karakterizasyonu

İzolasyonu gerçekleştirilen suşların DNA'sı Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kiti kullanılarak elde edilmiştir. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Vajinal LAB'ne ait PZR ürünlerinin 1600 bp uzunluğundaki 16S rDNA gen bölgesi. M*: Markır, K**: Pozitif kontrol, N***: Negatif kontrol

Çoğaltılan bu 16S rDNA bölgelerinin dizi analizi sonucunda elde edilen baz dizileri NCBI BLAST veri tabanında gerçekleştirilen karşılaştırmalı analiz neticesinde kesin tanıya varılmıştır. Suşların dizi analiz sonuçları EK5'de verilmiştir. 16S rDNA dizi analizi sonucunda elde edilen veriler ile API 50 CHL kit sonucunda elde edilen verilerin karşılaştırılmalı tablosu Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Vajinal LAB'nin API 50 CHL ve 16S rDNA gen bölgesi dizi analizi sonucuna göre elde edilen türlerin karşılaştırılmalı tablosu

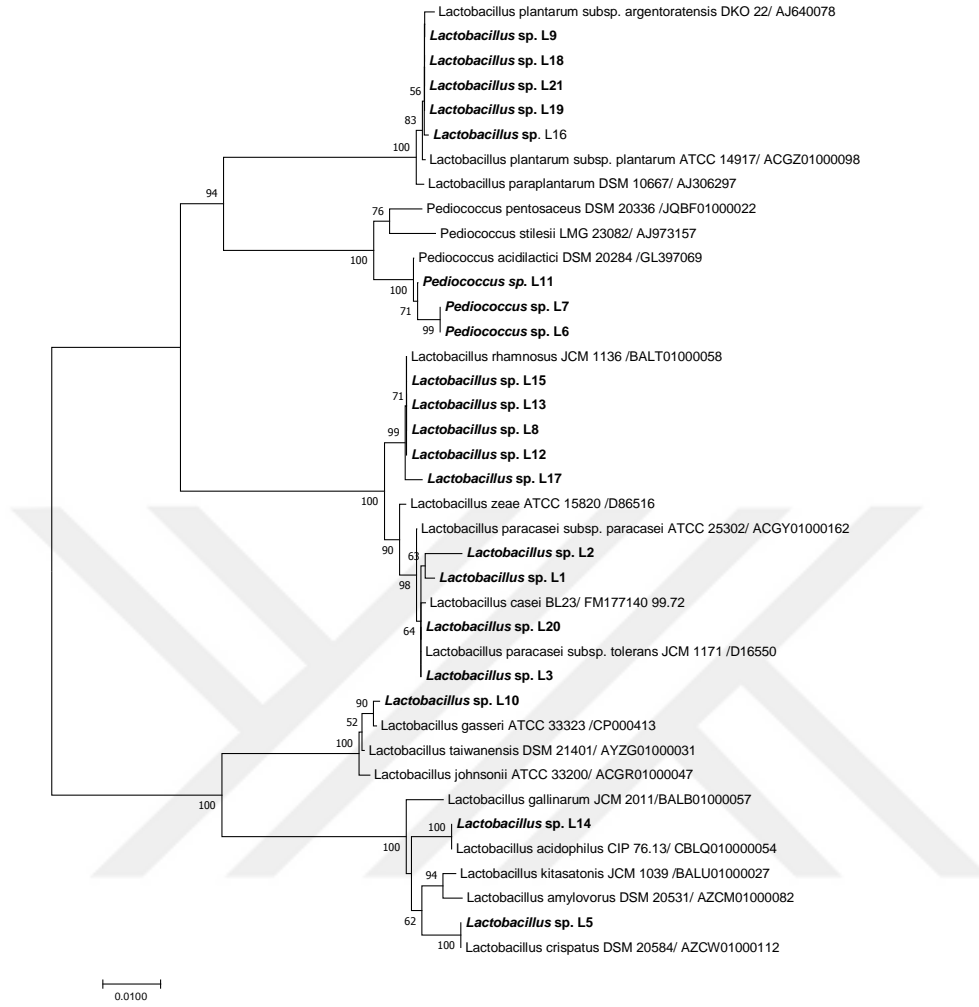
Suş Numarası	API 50 CHL Sonuçları	16S rDNA Dizi Analizi Sonuçları
L1	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	<i>Lactobacillus paracasei</i>
L2	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	<i>Lactobacillus paracasei</i>
L3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
L5	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	<i>Lactobacillus crispatus</i>
L6	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
L7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
L8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
L9	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
L10	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
L11	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
L12	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
L13	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
L14	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
L15	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
L16	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
L17	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	<i>Lactobacillus</i> spp.
L18	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
L19	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
L20	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
L21	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	<i>Lactobacillus plantarum</i>

16S rDNA dizi analizi sonucunda elde edilen sonuçlar biyokimyasal tanımlama sonuçları ile karşılaştırıldığında, bazı türlerin uyuşmadığı görülmektedir. *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* suşlarının genellikle API ve dizi analizi sonuçları ile uyuştugu görülürken *P. acidilactici* suşlarının API sonucunda *L. rhamnosus* olarak tanımlandığı görülmüştür. Yine benzer olarak 16S rRNA dizi analizinde *L. paracasei* olarak belirlenen 4 tür arasından API sonucunda üç suşun *L. paracasei* ssp. *paracasei*, iki suşun da *L. paracasei* olarak belirlendiği gözlemlenmiştir. İzolasyonun ilk

aşamasından beri uygulanan morfolojik ve biyokimyasal uygulamalar 16S rDNA dizi analizinden elde edilen sonuçlar ile kesinleştirilmiş olup tanımlanan türlerin suş numaraları ve GenBank accession numaraları Tablo 4.5’de suşların filogenetik ağaç üzerindeki görünümleri ise Şekil. 4.4’de verilmiştir.

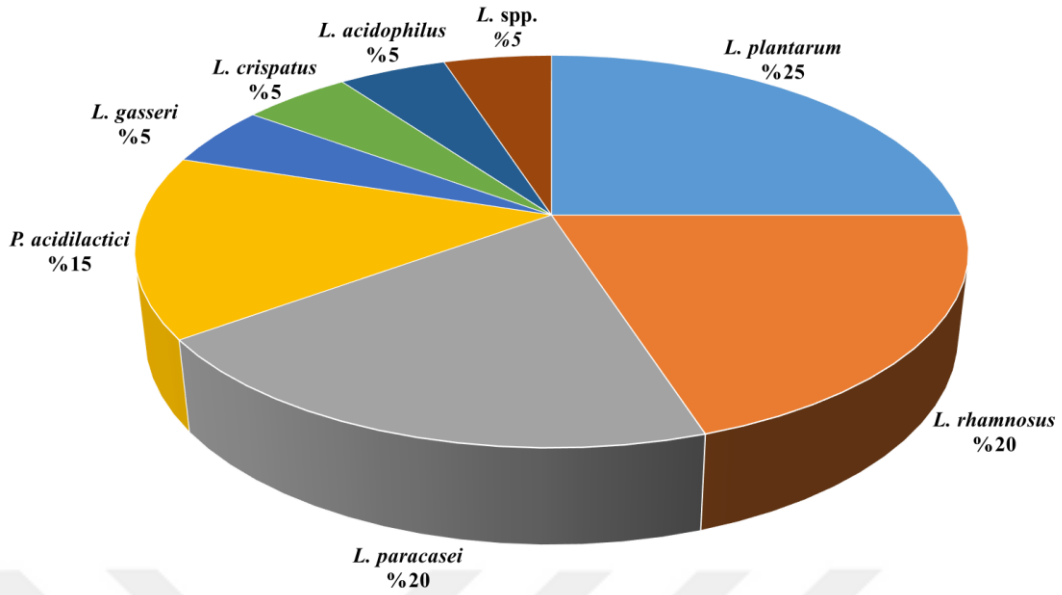
Tablo 4.5. DNA dizi analizi sonucunda tanımlanan vajinal LAB’nin suş numaraları ve GenBank accession numaraları

	Suş Adı	Suş Numaraları	GenBank numaraları	Baz sayısı
1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	L1	MF155761	1430
2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	L2	MF155762	1430
3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	L3	MF155763	1437
4	<i>Lactobacillus crispatus</i>	L5	MF155765	1426
5	<i>Pediococcus acidilactici</i>	L6	MF155766	1453
6	<i>Pediococcus acidilactici</i>	L7	MF155767	1381
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	L8	MF155768	1379
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	L9	MF155769	1438
9	<i>Lactobacillus gasseri</i>	L10	MF155770	1372
10	<i>Pediococcus acidilactici</i>	L11	MF155771	1393
11	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	L12	MF155772	1433
12	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	L13	MF155773	1344
13	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	L14	MF155774	1433
14	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	L15	MF155775	1375
15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	L16	MF155776	1441
16	<i>Lactobacillus spp.</i>	L17	MF155777	1437
17	<i>Lactobacillus plantarum</i>	L18	MF155778	1411
18	<i>Lactobacillus plantarum</i>	L19	MF155779	1438
19	<i>Lactobacillus paracasei</i>	L20	MF155780	1435
20	<i>Lactobacillus plantarum</i>	L21	MF155781	1368



Şekil 4.4. Vajinal mikrofloradan izole edilen suşların yakın ilişkili türler ile Jukes – Cantor modele dayalı fiolgenetik ağaç görüntüsü

16S rDNA gen bölgesi dizi analizi sonuçlarına göre vajinal mikrofloradan izole edilen 20 adet suşdan 7 farklı tür elde edilmiştir. Çalışmamızda en sık görülen türü %25 oranla *L. plantarum* oluşturmuştur. Bu suşu %20 oranla *L. rhamnosus* ve *L. paracasei*, %15 oranla *P. acidilactici* ve %5 oranla *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. crispatus* ve *L. spp.* suşları takip etmektedir. Seçilen 20 adet suştan sadece bir tanesinin tür düzeyinde tanımlaması yapılamamış ve *L. spp.* olarak isimlendirilmiştir. Suşların tamamı daha önceki çalışmalar ile kanıtlanmış vajinal mikroflora üyeleridir¹. Elde edilen suşların dairesel grafikteki gösterimi Şekil 4.5’de sunulmuştur.



Şekil 4.5. 16S rDNA gen bölgesi dizi analizi sonuçlarına göre LAB'nin tür düzeyindeki dağılımının dairesel grafik üzerindeki görünümü

4.2. VAJİNAL LAB'NİN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

4.2.1. Vajinal LAB'nin Hemolitik Aktivite Testi

Tanımlanan suşların hemolitik aktivite testinde kontrol suş olarak kullanılan *Escherichia coli* ATCC 25922'nin bulunduğu ortamlarda kolonilerin etrafında parlak yeşil zon (α -hemolitik) oluşurken, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213'un geliştiği ortamda, kolonilerin etrafında berrak zon (β -hemolitik) meydana geldiği tespit edilmiştir. Probiyotik mikroorganizmaların seçiminde, hemolitik aktivitenin belirlenmesi önemli bir kriter olup probiyotik olarak kullanım potansiyeli olan mikroorganizmaların, hemolize neden olmayan suşlar olması gerekmektedir. Çalışmamız kapsamında izole edilen suşların tamamında yeşil zon gözlenmiş olup α -hemolitikdir ve probiyotik olarak kullanım açısından bir sorun teşkil etmeyeceğini göstermektedir. Kontrol suşda ve L11 suşuna ait hemolitik zonlar Şekil 4.6'da verilmiştir. Çalışmamızda elde edilen veriler bu alanda yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermekte olup Maragkoudakis vd. (2006)¹⁶⁷ süt ürünlerinden izole ettikleri probiyotik karakterdeki LAB'nin α -hemolitik olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 4.6. Kontrol suş olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 29213'un kolonilerinin etrafında oluşan berrak β -hemolitik zon (a), L11 kodlu *P. acidilactici* suşun kolonilerinin etrafında oluşan yeşil α - hemolitik zon (b)

4.2.2. Vajinal LAB'nin Asit ve Safra Toleransı

Vajinal sürüntülerden izole edilen LAB'nin asit ve safra tuzlarına direnç özelliklerinin belirlenmesinde suşlar pH (pH 2.0, 2.5 ve 3.0) ayarlı PBS'ye maruz bırakılarak in vitro bir deneyle değerlendirilmiştir. Çalışmamızda elde edilen 20 adet suş arasından *L. plantarum* L9 suşlarınınpH 2.0 ortamında 3. saat sonunda %32.9 oranında canlılığını koruyabildiği tespit edilirken diğer 19 adet suşun 3. saat sonunda canlılıklarını kaybettiği belirlenmiştir.

Çalışmamızda *L. plantarum* L9 dışında pH 2.0'de canlılığını sürdüremeyen suşların pH 2.5 ortamında canlılığını koruduğu tespit edilmiş ve bütün suşların pH 2.5 ortamında canlı kalma oranı ise %68.3 oranında belirlenmiştir.

Araştırmada kullanılan tüm suşların 3 saat süreyle gerçekleştirilen pH 3.0 uygulamasında ortalama %90.3 oranında canlılıklarını korudukları tespit edilmiştir. Özellikle elde edilen veriler neticesinde Tablo 4.6'de görüldüğü gibi *L. paracasei* L2, *P. acidilactici* L6, *P. acidilactici* L7, *L. rhamnosus* L8, *L. plantarum* L9, *P. acidophilus* L11, *L. rhamnosus* L15, *L. plantarum* L18 ve *L. paracasei* L20 suşlarının gastrik koşullarda canlılığını yüksek düzeyde sürdürebildiği ve dolayısı ile sindirim sistemine ulaştığında patojen bakterileri ile yarışma ve tutunma için yeterli sayıyı koruyabildiği saptanmıştır.

Nami vd. (2014b)¹⁷⁷ sağlıklı kadınların vajinal mikrofloralarından izole ettikleri *L. plantarum* 5BL suşunun pH 3.0'de 3. saat sonunda %88 gibi yüksek bir oranda dirençli olduğu tespit edilmiş olup elde edilen bu sonuç çalışmamızdaki sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

İn-vitro koşullar altında ince bağırsak sistemini simüle eden farklı oranlarda safra tuzu konsantrasyonlarına *L. plantarum* L9, *L. plantarum* L16, *L. plantarum* L18, *L. plantarum* L19 ve *L. plantarum* L21 suşlarının yüksek oranda dirençli olduğu görülmüştür. Bütün *L. plantarum* suşlarının %0.3'lük safra tuzu ortamında oldukça yüksek olarak görülen canlılık oranlarının %0.5 ve %1'lik ortamlarda da yüksek olduğu ve bazı suşlarda çok az bir düşüşün olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda *L. paracasei* L1, *L. paracasei* L2, *L. paracasei* L3, *L. crispatus* L5, *L. gasseri* L10, *L. acidophilus* L14 suşlarının ve *L. paracasei* L20 suşlarının %0.3'lik safra tuzu ortamında 3. saatin sonunda ortalama %75.9 oranında canlılık tespit edilirken *L. paracasei* L1, *L. gasseri* L10 ve *L. paracasei* L20 suşlarının %0.5'lik safra tuzu ortamında canlılıklarını yitirdikleri görülmüştür. *L. paracasei* L2, *L. paracasei* L3, *L. crispatus* L5 ve *L. acidophilus* L14 suşlarının ise %0.5'lik safra tuzu ortamındaki hayatta kalma oranları ise ortalama %64.0 dir. Bu suşların % 1'lik safra tuzu ortamında ise canlılıklarını koruyamadıkları tespit edilmiştir.

L. paracasei L1, *L. gasseri* L10 ve *L. paracasei* L20 suşlarının ise sadece %0.3'lük safra tuzu ortamında canlılıklarını koruyabildiği tespit edilmiştir. Bu suşlar dışında Tablo 4.7'de görüldüğü gibi diğer bütün suşların bütün safra tuzu ortamlarına karşı azalan oranda da olsa dirençli oldukları belirlenmiştir.

Bu alanda yapılan çalışmalar dikkate alındığında çalışmamız kapsamında incelenen suşların, düşük pH değerlerine direnç özellikleri, yukarıda tanımlanan sınırlar içerisinde olup elde edilen bu değerler suşların mideden bağırsaklara geçişi sırasında canlılığını sürdürülebilmesi için yeterli görülmektedir^{159,177}.

Tablo 4.6. Vajinal LAB'nin düşük pH ortamlarındaki canlılık düzeyleri

Farklı pH Değerindeki Ortamlarda 3. Saat Sonunda İzolatların Canlı Kalma Sayısı (log cfu/ml) ve Oranı (%)

Laktik asit bakterileri	pH 2.0			pH 2.5			pH 3.0		
	Başlangıç Sayısı	Uygulama Sonrası Sayı	% Canlı Kalma Oranı	Başlangıç Sayısı	Uygulama Sonrası Sayı	% Canlı Kalma Oranı	Başlangıç Sayısı	Uygulama Sonrası Sayı	% Canlı Kalma Oranı
<i>L. rhamnosus</i> GG (Kontrol)	8.50	7.49	88.1	8.75	7.82	89.3	8.92	8.28	92.8
<i>L. paracasei</i> L1	8.86	-	-	8.97	5.68	63.3	8.97	7.83	87.2
<i>L. paracasei</i> L2	8.92	-	-	8.89	6.27	69.8	8.89	7.98	90.1
<i>L. paracasei</i> L3	8.64	-	-	8.78	6.87	78.2	8.78	8.12	89.6
<i>L. crispatus</i> L5	9.10	-	-	8.94	5.21	58.2	8.94	7.88	87.8
<i>P. acidilactici</i> L6	8.93	-	-	8.96	6.85	76.4	8.66	7.95	91.8
<i>P. acidilactici</i> L7	8.75	-	-	8.68	5.76	66.3	8.98	8.16	90.8
<i>L. rhamnosus</i> L8	8.68	-	-	8.75	5.56	63.5	8.75	8.29	94.7
<i>L. plantarum</i> L9	8.57	2.82	32.9	8.98	7.17	79.8	8.88	8.65	97.4
<i>L. gasei</i> L10	8.64	-	-	9.03	6.32	69.9	9.03	8.11	89.8
<i>P. acidilactici</i> L11	8.91	-	-	8.89	5.84	65.6	8.89	8.08	94.3
<i>L. rhamnosus</i> L12	8.95	-	-	8.92	6.52	73.0	8.92	7.62	85.4
<i>L. rhamnosus</i> L13	8.67	-	-	8.76	5.95	67.9	8.76	8.16	89.6
<i>L. acidophilus</i> L14	9.02	-	-	9.01	6.28	69.7	9.01	8.07	89.5
<i>L. rhamnosus</i> L15	9.08	-	-	9.04	5.97	66.0	9.04	8.24	92.5
<i>L. plantarum</i> L16	8.95	-	-	8.94	6.58	73.6	8.94	8.11	90.9
<i>L. spp.</i> L17	8.93	-	-	8.87	6.39	72.0	8.87	7.42	83.6
<i>L. plantarum</i> L18	8.98	-	-	8.95	6.65	74.3	8.95	8.46	94.9
<i>L. plantarum</i> L19	8.79	-	-	8.78	5.47	62.3	8.78	7.36	84.7
<i>L. paracasei</i> L20	8.89	-	-	8.91	5.21	58.4	8.95	8.25	92.1
<i>L. plantarum</i> L21	9.01	-	-	8.95	5.32	59.4	8.88	7.98	89.8

Tablo 4.7. Vajinal LAB'nin farklı safra tuzlarındaki canlılık oranları

Farklı Safra Tuzu Ortamlarda 3. Saat Sonunda İzolatların Canlı Kalma Sayısı (log cfu/ml) ve Oranı (%)									
Laktik asit bakterileri	Safra tuzu (%0.3)			Safra tuzu (%0.5)			Safra tuzu (%1)		
	Başlangıç Sayısı	Uygulama Sonrası Sayı	% Canlı Kalma Oranı	Başlangıç Sayısı	Uygulama Sonrası Sayı	% Canlı Kalma Oranı	Başlangıç Sayısı	Uygulama Sonrası Sayı	% Canlı Kalma Oranı
<i>L. rhamnosus</i> GG (Kontrol)	9.01	8.22	91.2	8.84	7.87	89.0	8.97	8.02	89.4
<i>L. paracasei</i> L1	8.87	7.65	86.2	8.68	-	0.00	8.72	-	0.00
<i>L. paracasei</i> L2	9.01	5.16	57.2	8.96	5.08	56.6	8.98	-	0.00
<i>L. paracasei</i> L3	8.85	7.42	83.4	8.86	6.42	72.4	8.96	-	0.00
<i>L. crispatus</i> L5	8.88	7.82	88.0	8.78	4.98	56.7	9.01	-	0.00
<i>P. acidilactici</i> L6	8.67	6.95	80.1	8.69	5.89	67.7	8.97	5.45	60.7
<i>P. acidilactici</i> L7	8.94	7.52	84.1	8.94	5.47	61.1	8.92	4.21	47.1
<i>L. rhamnosus</i> L8	8.79	6.86	78.0	8.91	4.82	54.0	9.00	4.78	53.1
<i>L. plantarum</i> L9	9.10	9.12	>100	9.05	9.02	99.6	9.06	7.96	87.8
<i>L. gasseri</i> L10	8.96	5.47	61.0	8.79	-	0.00	8.79	-	0.00
<i>P. acidilactici</i> L11	8.74	7.45	85.2	8.94	5.46	61.0	8.75	5.23	59.7
<i>L. rhamnosus</i> L12	8.91	6.98	78.3	8.76	6.65	75.9	9.02	5.41	59.9
<i>L. rhamnosus</i> L13	8.85	7.05	79.6	8.98	5.00	55.6	8.97	5.07	56.5
<i>L. acidophilus</i> L14	8.96	7.49	83.5	8.87	6.26	70.5	8.98	-	0.00
<i>L. rhamnosus</i> L15	8.79	6.78	77.1	8.94	5.87	65.6	8.84	3.14	35.5
<i>L. plantarum</i> L16	9.11	9.08	99.6	9.08	9.05	99.6	9.06	7.93	87.5
<i>L. spp.</i> L17	8.97	6.97	77.7	8.96	5.46	60.9	8.97	3.16	35.2
<i>L. plantarum</i> L18	9.05	9.02	99.6	9.01	8.74	97.0	8.91	7.45	83.6
<i>L. plantarum</i> L19	9.04	9.12	>100	9.00	9.02	>100	8.96	7.79	86.9
<i>L. paracasei</i> L20	8.96	6.46	72.0	8.96	-	0.00	8.86	-	0.00
<i>L. plantarum</i> L21	9.06	9.10	>100	9.07	9.08	>100	9.01	7.94	88.1

4.2.3. Vajinal LAB'nin pH Değişimi Üzerine Etkisi ve Laktik Asit Miktarlarının Belirlenmesi

MRS sıvı besiyerinde 37°C'de 18 saat geliştirilmiş olan bakteri kültürlerinin pH değişimi üzerine etkisi ve Abbott architect C8000 cihazında ölçülen bakteri kültürlerinin ürettiği laktik asit miktarları Tablo 4.8'de gösterilmiştir.

Tablo: 4.8. MRS sıvı besiyerinde 37°C'de 18 saat geliştirilmiş olan vajinal LAB'nin besiyerindeki pH değişimi üzerine etkisi ve ürettikleri laktik asit miktarları

Laktik asit bakterileri	pH	Laktik asit miktarı (mg/dL)
<i>L. rhamnosus</i> GG (Kontrol)	4.21±0.01	630±8
<i>L. paracasei</i> L1	4.20±0.07	489±5
<i>L. paracasei</i> L2	4.06±0.01	613±4
<i>L. paracasei</i> L3	4.19±0.02	315±3
<i>L. crispatus</i> L5	4.53±0.02	650±5
<i>P. acidilacitici</i> L6	4.14±0.04	682±7
<i>P. acidilacitici</i> L7	4.11±0.03	815±6
<i>L. rhamnosus</i> L8	4.25±0.08	535±5
<i>L. plantarum</i> L9	4.02±0.04	630±8
<i>L. gasseri</i> L10	4.48±0.01	330±3
<i>P. acidilacitici</i> L11	4.18±0.05	551±5
<i>L. rhamnosus</i> L12	4.22±0.03	623±4
<i>L. rhamnosus</i> L13	4.40±0.05	620±6
<i>L. acidophilus</i> L14	4.18±0.02	245±3
<i>L. rhamnosus</i> L15	4.32±0.04	565±5
<i>L. plantarum</i> L16	4.32±0.02	625±2
<i>L. spp.</i> L17	4.18±0.01	412±7
<i>L. plantarum</i> L18	4.08±0.06	514±6
<i>L. plantarum</i> L19	4.10±0.04	466±8
<i>L. paracasei</i> L20	4.21±0.02	418±7
<i>L. plantarum</i> L21	4.11±0.01	359±3

Çalışma sonunda 37°C’de 18 saat geliştirilmiş olan bakteri kültürlerinin pH’sının ortalama 4.21 olduğu görülmüştür. Elde edilen bu değer vajinal pH’nın ortalama 3.8-4.2 arasında olduğunu belirten çalışmaları kanıtlar niteliktedir⁴⁴.

Vajinal LAB’nin 37°C’de 18 saat geliştirilmiş olan bakteri kültürlerinde görülen laktik asit miktarlarının ortalama 522.8 mg/dL olduğu ve en yüksek laktik asit üretim kapasitesinin 815 mg/dL ile *P. acidilacitici* L7 suşuna ait olduğu görülmüştür.

4.2.4. Vajinal LAB’nin Antibiyotik Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi

Suşların antibiyotik dirençliliği hücre duvar sentezini, protein ve nükleik asit sentezini inhibe eden antibiyotikler kullanılarak, disk difüzyon yöntemi ile 37°C’de 18 saat inkübasyonun ardından 20 farklı antibiyotik disklerinin etrafında oluşan zonların çapları ölçülerek değerlendirilmiş ve sonuçlar CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, ISSN 558-6502, 2015) kriterleri esas alınarak, Dirençli (R), Yarı hassas (I), Hassas (S) olarak sınıflandırılmış ve Tablo 4.9’da verilmiştir.

Çalışmamızda hücre duvar sentezini inhibe eden penisilin, ampisilin, sefazolin ve imipenem antibiyotiklerine karşı bütün suşların duyarlı oldukları görülürken glikopeptit grubundan vankomisin ve teikoplanin antibiyotiklerine karşı 20 adet suşdan sadece dört suş (*L. crispatus* L5, *L. gasseri* L10, *L. acidophilus* L14 ve *L. plantarum* L21) duyarlı, diğer bütün suşlar dirençli bulunmuştur. Sefalosporin grubundan olan sefoperazon ve saftazidim antibiyotiğine karşı ise dirençlilik dereceleri suştan suşa farklılık göstermekle birlikte suşların sefoperazon antibiyotiğine ortalama %75 ve seftazidime karşı %35 oranlarında dirençli oldukları görülmüştür.

Çalışmamızda yine protein sentezini inhibe eden aminoglikozidler grubundan gentamisin, tobramisin ve amikasin antibiyotiklerine karşı bütün suşların dirençli olduğu görülürken, netilmisin antibiyotiğine karşı sadece bir suşun duyarlı, streptomisin antibiyotiğine karşıda suşların %75’nin duyarlı olduğu görülmüştür.

Ribozomların 50S alt ünitesine bağlanarak protein sentezini inhibe eden kloramfenikol ve eritromisin antibiyotiklerine karşı ise bütün suşların duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Yine bu gruptan olan klindamisin antibiyotiğine karşı suşların %40'ı duyarlı, %25'i dirençli ve %35'i de yarı hassas bulunmuştur.

DNA giraz enzimini inhibe ederek nükleik asit sentezini inhibe eden kinolonlar grubundan siprofloksasin antibiyotiğine karşı suşların %85'inin dirençli, DNA'ya bağımlı RNA polimeraza bağlanarak RNA sentezinin başlamasını inhibe eden rifampin antibiyotiğine suşların %85'inin duyarlı ve protein sentezini inhibe eden tetrasiklinler grubundan tetrasiklin antibiyotiğine karşı da suşların %80'inin duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bazı vajinal izolatların antibiyogram görüntüleri Şekil 4.7'de verilmiştir.

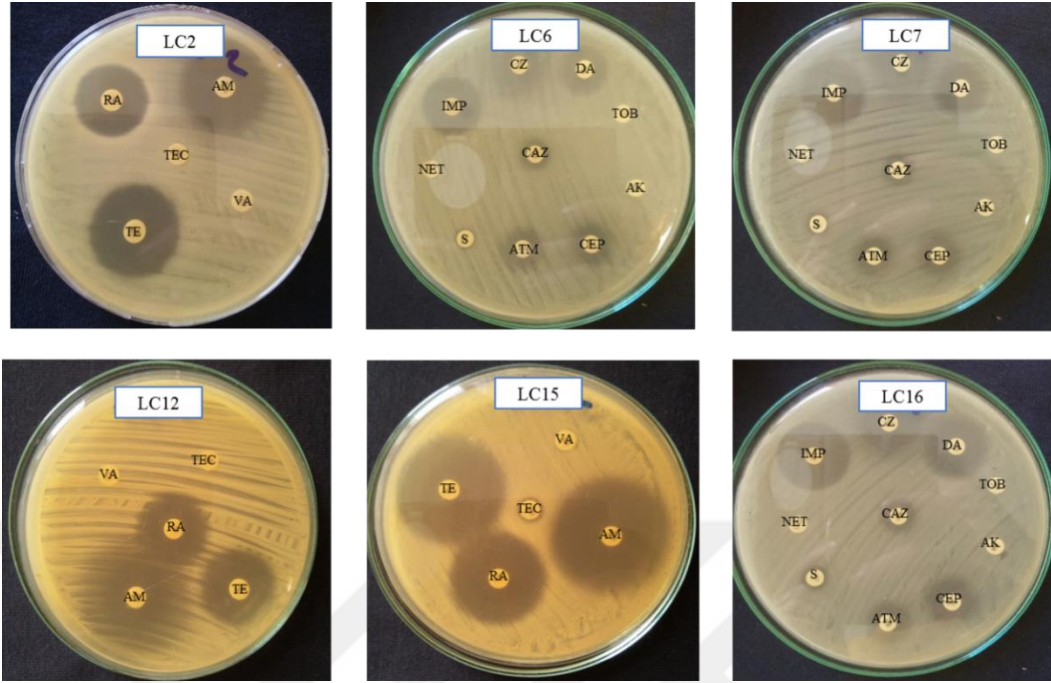
Çalışmamızda LAB izolatlarının ampisilin, eritromisin, penisilin ve imipenem antibiyotiklerine karşı yüksek duyarlılık gösterirken siprofloksasin ve teikoplanine daha dirençli, vankomisin, gentamisin, tobramisin ve amikasin antibiyotiklerine karşı yüksek dirençlilik gözlemlenmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada elde ettiğimiz vajinal LAB'nin antibiyotik direnç yüzdeleri Şekil 4.8'de verilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda probiyotik karakterdeki LAB'nin vankomisin ve teikoplanine yüksek oranda dirençli olduğu Mackey vd. (1993)¹⁷⁸, ayrıca *Lactobacillus*'ların genellikle aminoglikozidler, beta- laktam antibiyotikler, sefalosporinler ve glikopeptit antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu bildirilmiştir¹⁷⁹. Çalışmamız sonucunda antibiyotiklere karşı elde edilen direnç göstergelerinin bu veriler ile benzerlik gösterdiği görülmüştür.

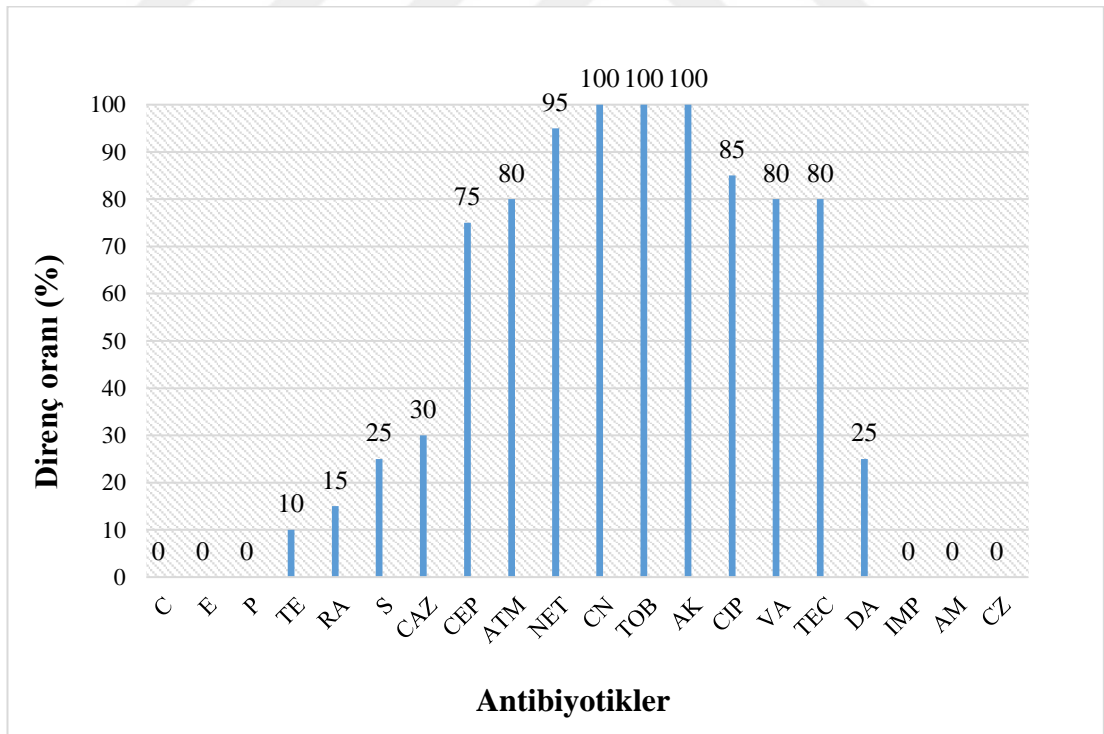
Tablo 4.9. Vajinal LAB'nin antibiyotik duyarlılık profili

İZOLATLAR	ANTİBİYOTİKLER*																			
	C	E	CIP	P	CN	TE	VA	RA	TEC	AM	CZ	DA	TOB	AK	CEP	ATM	S	NET	IMP	CAZ
<i>L. rhamnosus</i> GG (Kontrol)	S**	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	I	R	R	S	R	R	R	S	R
<i>L. paracasei</i> L1	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S	R	S	S
<i>L. paracasei</i> L2	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R	S	R	S	S
<i>L. paracasei</i> L3	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R
<i>L. crispatus</i> L5	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S	R	S	R	S	S
<i>P. acidilacitici</i> L6	S	S	I	S	R	S	R	S	R	S	S	I	R	R	R	R	R	R	S	R
<i>P. acidilacitici</i> L7	S	S	I	S	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R
<i>L. rhamnosus</i> L8	S	S	I	S	R	S	R	S	R	S	S	I	R	R	R	S	S	R	S	S
<i>L. plantarum</i> L9	S	S	R	S	R	I	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S
<i>L. gasseri</i> L10	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S
<i>P. acidilacitici</i> L11	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	I	R	R	R	R	R	R	S	R
<i>L. rhamnosus</i> L12	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	I	R	R	R	S	S	R	S	S
<i>L. rhamnosus</i> L13	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	I	R	R	R	S	S	R	S	S
<i>L. acidophilus</i> L14	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S
<i>L. rhamnosus</i> L15	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	I	R	R	R	R	S	R	S	S
<i>L. plantarum</i> L16	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	I	R	R	R	S	R	R	S	I
<i>L. spp.</i> L17	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S
<i>L. plantarum</i> L18	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S
<i>L. plantarum</i> L19	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S
<i>L. paracasei</i> L20	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R
<i>L. plantarum</i> L21	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	I	R	S	R

*: Antibiyotikler: C: Chloramphenicol (30 mcg), E: Eritromisin (15 mcg), CIP: Ciprofloksacin (5 mcg), P: Penisilin(10 U), CN: Gentamicin (10 mcg), TE: Tetracycline (30 mcg), VA: Vancomycin (30 mcg), RA: Rifampicin (5 mcg), TEC: Teicoplanin (30 mcg), AMP: Amfisilin (10 mcg), CZ: Cefazolin (30 mcg), DA: Clindamisin (2 mcg), TOB: Tobramycin (10 mcg), AK: Amikacin (30 mcg), CEP: Cefoperazone (75 mcg), ATM: Aztreonam (30 mcg), S: Streptomycin (300 mcg), NET: Netilmicin (10 µg), IMP: İmipenem (10 mcg), CAZ: Ceftazidime (30 mcg), **: S: Hassas, I: Yarı Hassas, R: Dirençli



Şekil. 4.7. Bazı vajinal LAB'nin antibiyogram görüntüleri



Şekil 4.8. Vajinal LAB'nin antibiyotiklere karşı direnc yüzdeleri

Antibiyotikler: C: Chloramphenicol, E: Eritromisin, P: Penisilin, TE: Tetracycline, RA: Rifampicin, S: Streptomycin, CAZ: Ceftazidime, CEP: Cefoperazone, ATM: Aztreonam, NET: Netilmicin, CN: Gentamicin, TOB: Tobramycin, AK: Amikacin, CIP: Ciprofloxacin, VA: Vancomycin, TEC: Teicoplanin, DA: Clindamisin, IMP: Imipenem, AMP: Amfisilin, CZ: Cefazolin

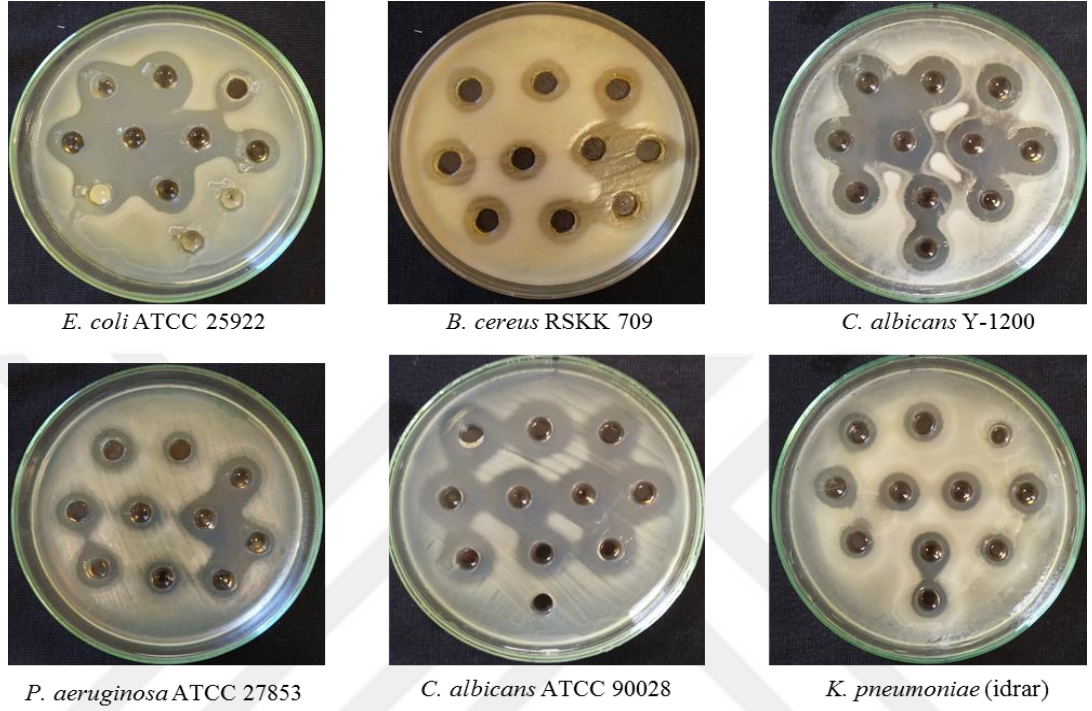
4.2.5. Vajinal LAB'nin Patojen Mikroorganizmalar Üzerinde Antagonistik Aktivitesinin Belirlenmesi

LAB izolatlarının ürogenital enfeksiyonlara sebep olan ve klinik olarak önemi olan patojenlere karşı antagonistik aktivitesi kuyu difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmada *B. cereus* RSKK 709, *B. cereus* CU1065, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. subtilis* W168, *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 10098, *C. albicans* Y-1200-NIH, *C. tropicalis* ATCC 13803, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213 tip suşlarının yanında Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine ürogenital enfeksiyon şikayeti ile çeşitli polikliklere başvuran hastaların idrarlarından izole edilen klinik önemi olan *Candida glabrata* AEÜ1, *E. coli* AEÜ2, *E. coli* AEÜ3 (GSBL+), *E. faecalis* AEÜ4, *K. pneumoniae* AEÜ5, *P. mirabilis* AEÜ6, *S. aureus* AEÜ7 (MRSA) suşları olmak üzere toplam 19 adet indikatör bakteri kullanılmıştır.

Çalışma sonucunda suşlarımızın %95'i gibi oldukça yüksek bir oranla *C. albicans* Y-1200-NIH, *B. cereus* CU1065 ve *B. cereus* RSKK 709 suşlarına karşı antagonistik aktivite göstermiş ancak *C. tropicalis* ATCC 13803 suşuna karşı hiçbir suşun inhibisyon zonu oluşturmadığı görülmüştür. Suşlarımızın ayrıca *B. subtilis* ATCC 6633 suşuna karşı %70, *B. subtilis* W168 suşuna karşı %65, *C. albicans* ATCC 90028 suşuna karşı %85, *C. albicans* ATCC 10098 suşuna karşı %60 oranla direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Vajinal suşlarımız tarafından en zayıf antimikrobiyal aktivite %15 oranla *S. aureus* ATCC 29213 suşuna karşı oluşturulmuştur.

Üriner sistem enfeksiyonlarına sebep olan fırsatçı patojenlerden olan *E. coli* ATCC 25922 tip suşuna karşı 20 izolattan 13'ü (%65), *P. aeruginosa* ATCC 27853 tip suşuna karşı %45 oranla 9 suşun antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca idrarlardan izole edilen patojen mikroorganizmalara karşı oluşan antagonistik etkiyi değerlendirecek olursak suşlarımızın hepsinin *K. pneumoniae* AEÜ5 suşuna karşı antagonistik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Vajinal izolatların genişlemiş-spektrumlu beta-laktamaz antibiyotiklerine dirençli olan *E. coli* AEÜ3 suşuna karşı suşların %90'ının, *C. glabrata* AEÜ1'e karşı %80'inin, *E. faecalis* AEÜ4 ve *S. aureus*

AEÜ7 suşuna karşı %65'inin inhibisyon zon gösterdiği tespit edilmiştir. Suşların antagonistik aktivite görüntüleri Şekil 4.9'da, inhibisyon zon ölçümleri Tablo 4.10'da verilmiştir.



Şekil: 4.9. Vajinal LAB'nin bazı patojen mikroorganizmalar üzerindeki inhibisyon zonlarının görüntüleri

Çalışmamızda L1, L8, L9 ve L16 suşları indikatör mikroorganizmaların %80'ine inhibitör etki göstererek en geniş spektrumlu mikroorganizmalar olarak belirlenirken; bu suşları %75 oran ile L5, L6 suşları ile %70 oran ile L12 ve L15 suşları takip etmektedir. L21 suşu ise indikatör mikroorganizmalar üzerinde %30 oran ile en düşük antagonistik aktiviteye sahip suş olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar vajinal mikrofloradan izole ettiğimiz 20 adet suşun geniş bir spektrumdaki patojen mikroorganizmalar üzerine antagonistik aktiviteye sahip olduğunun göstergesidir.

Tablo 4.10. Vajinal LAB'nin antimikrobiyal etkinliği

İndikatör Bakteriler	Test Edilen Suşların İnhibisyon Zon Çapı (mm)									
	L1	L2	L3	L5	L6	L7	L8	L9	L10	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	14	15	-	-	14	12	
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	18	18	16	17	14	-	12	18	14	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	14	12	16	13	20	11	10	16	-	
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	14	-	13	-	-	
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	13	-	15	12	14	12	12	16	16	
<i>B. subtilis</i> W168	10	11	-	12	-	-	11	-	-	
<i>B. cereus</i> RSKK 709	14	14	13	19	14	13	16	18	15	
<i>B. cereus</i> CU1065	18	18	16	22	20	18	17	16	16	
<i>C. tropicalis</i> ATCC13803	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	20	21	16	22	12	17	18	19	18	
<i>C. albicans</i> ATCC 10098	12	12	-	17	15	13	12	13	11	
<i>C. albicans</i> Y-1200-NIH	17	16	15	21	18	18	16	16	16	
<i>C. glabrata</i> AEÜ1	12	13	12	-	-	-	12	11	11	
<i>E. coli</i> AEÜ2	12	12	12	-	12	-	11	11	-	
<i>E. coli</i> AEÜ3 (GSBL+)	14	15	14	14	15	-	13	14	13	
<i>E. faecalis</i> AEÜ4	12	15	14	14	13	-	14	17	14	
<i>K. pneumoniae</i> AEÜ5	15	20	14	14	15	13	15	17	17	
<i>P. mirabilis</i> AEÜ6	15	14	15	12	12	10	-	14	13	
<i>S. aureus</i> AEÜ7 (MRSA)	11	-	-	13	-	12	12	12	13	

Tablo 4.10. (devam) Vajinal LAB'nin antibakteriyel etkinliği

İndikatör Bakteriler	Test Edilen Suşların İnhibisyon Zon Çapı (mm)										
	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	17	20	14	17	23	20	14	17	20	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	15	19	12	14	-	15	18	20	16	14
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	14	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	-	-	-	-	-	14	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	17	12	-	17	14	15	17	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> W168	-	12	12	-	13	14	12	12	11	15	12
<i>B. cereus</i> RSKK 709	15	14	16	16	17	17	19	16	18	17	-
<i>B. cereus</i> CU1065	16	15	16	-	15	17	16	17	15	16	16
<i>C. tropicalis</i> ATCC13803	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	-	13	14	-	14	14	13	14	-	15	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10098	-	-	-	-	12	14	12	-	-	13	-
<i>C. albicans</i> Y-1200-NIH	16	17	17	-	16	15	17	17	14	16	15
<i>C. glabrata</i> AEÜ1	-	14	15	14	12	12	13	14	15	15	16
<i>E. coli</i> AEÜ2	14	11	-	-	13	11	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> AEÜ3 (GSBL+)	14	15	14	13	13	15	14	13	16	15	-
<i>E. faecalis</i> AEÜ4	14	15	13	-	-	15	-	-	14	-	-
<i>K. pneumoniae</i> AEÜ5	13	14	12	12	13	15	14	15	16	17	12
<i>P. mirabilis</i> AEÜ6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> AEÜ7 (MRSA)	-	12	11	-	12	12	12	13	13	-	-

Vajinal mikrofloradan izole edilen suşların değerlendirildiği literatürlerde vajinal suşların genellikle *C. albicans*, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *S. aureus* gibi patojen mikroorganizmalar üzerinde antagonistik aktivite gösterdiği görülmektedir^{152,166,180}. Bu veriler çalışma sonucunda elde ettiğimiz veriler ile benzerlik göstermektedir.

4.2.6. Vajinal LAB'nin Hidrojen Peroksit Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi

Vajinal LAB suşları tarafından üretilen H₂O₂ oranını semikantitatif bir yöntem ile belirlediğimiz çalışmamızda bütün izolatlarımızın H₂O₂ üretmediğini *L. paracasei* L1, *L. paracasei* L3, *L. crispatus* L5, *L. gasseri* L10 ve *L. plantarum* L19 suşların 10 mg/L değerinde en yüksek seviyede H₂O₂ ürettiği tespit edilmiştir. *P. acidilacitici* L7, *L. plantarum* L9, *P. acidilacitici* L11, *L. acidophilus* L14, *L. plantarum* L16, *L. spp.* L17 ve *L. plantarum* L2 suşlarının ise 3 mg/L H₂O₂ ürettiği diğer suşların üretmediği belirlenmiştir. Vajinal izolatların H₂O₂ üretim miktarları Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.11. Vajinal LAB'nin hidrojen peroksit üretim miktarları

Laktik asit bakterileri	H ₂ O ₂ miktarı mg/L	Laktik asit bakterileri	H ₂ O ₂ miktarı mg/L
<i>L. rhamnosus</i> GG (Kontrol)	10		
<i>L. paracasei</i> L1	10	<i>L. rhamnosus</i> L12	-
<i>L. casei</i> L2	-	<i>L. rhamnosus</i> L13	-
<i>L. paracasei</i> L3	10	<i>L. acidophilus</i> L14	3
<i>L. crispatus</i> L5	10	<i>L. rhamnosus</i> L15	1
<i>P. acidilacitici</i> L6	-	<i>L. plantarum</i> L16	3
<i>P. acidilacitici</i> L7	3	<i>L. spp.</i> L17	3
<i>L. rhamnosus</i> L8	-	<i>L. plantarum</i> L18	1
<i>L. plantarum</i> L9	3	<i>L. plantarum</i> L19	10
<i>L. gasseri</i> L10	10	<i>L. paracasei</i> L20	-
<i>P. acidilacitici</i> L11	3	<i>L. plantarum</i> L21	3

Vajinal LAB'nin semikantitatif yöntem ile H₂O₂ üretim yeteneklerinin araştırıldığı çalışmalar dikkate alındığında en yüksek H₂O₂ üretim yeteneğine sahip

suşların *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. acidophilus* ve *L. vaginalis* olduğu görülmektedir. Bu veriler bizim çalışma sonucunda elde ettiğimiz veriler ile benzerlik göstermektedir^{126,171}.

4.2.7. Vajinal LAB'nin Kolesterol Asimilasyon Kapasitelerinin Belirlenmesi

Vajinal sürüntülerden izole edilen LAB'nin kolesterol asimilasyon kapasitelerinin belirlenmesi amacı ile Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran ve serum kolesterol seviyesi 250-300 mg/dL olan hastalardan serum örnekleri toplanmış. Toplanan bu serumlar son konsantrasyonu 100 mg/mL olacak şekilde % 0.3'lük safra tuzu içeren MRS sıvı besiyerlerine eklenerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından kontrol örneklerine kıyasla, suşların süpernatant kısımlarındaki giderilen % kolesterol miktarları modüler analizörler sayesinde tespit edilmiştir. Vajinal LAB'nin % kolesterol giderim oranları Tablo 4.12'de, kolesterol asimilasyonunun % değerlerinin grafik üzerinde gösterimi Şekil 4.10'da verilmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışmamızda bütün suşların kolesterol asimilasyonu yaptığı ancak % kolesterol asimilasyon değerlerinin türden türe ve türler arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada en yüksek kolesterol giderimi %39.65 oranla *L. gasseri* L10 ve *L. paracasei* L20 suşlarında görülürken bu suşları takiben *L. plantarum* L16 ve *L. plantarum* L19 suşlarının ise %37.93 oranla serum kolesterol seviyesini düşürdüğü tespit edilmiştir. Yine *L. plantarum* L18 suşunun %33.62 ve *P. acidilacitici* L11 suşunun %32.75 oranında kolesterol asimilasyonu yaptığı belirlenmiştir.

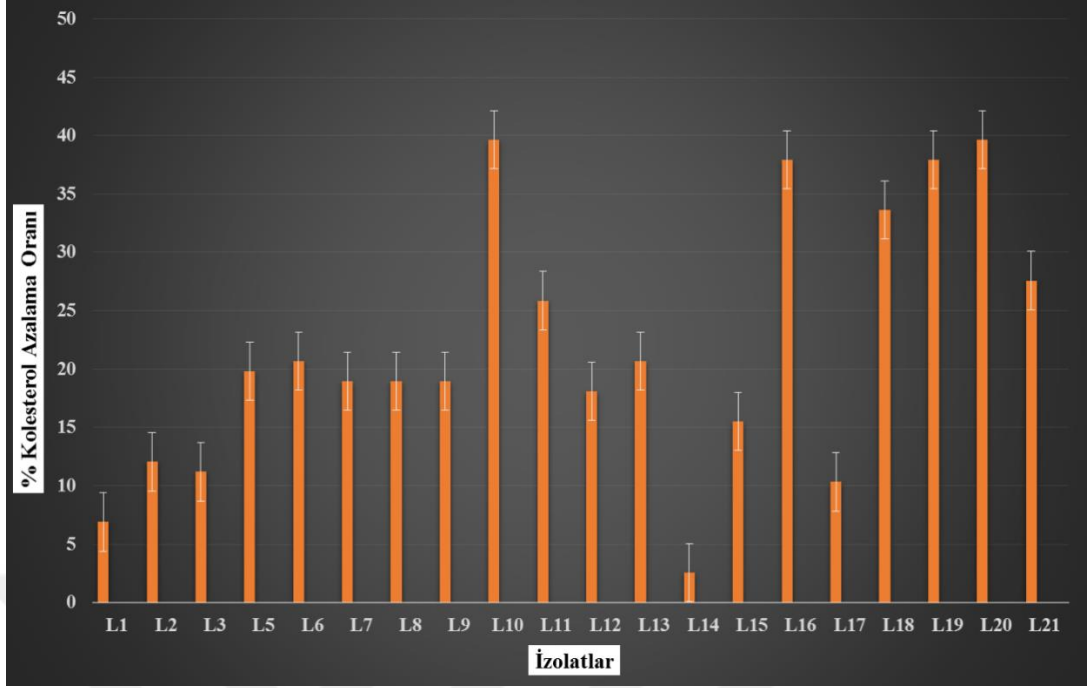
Farklı ortamlardan izole edilen LAB'nin kolesterol asimilasyon yeteneklerinin araştırıldığı çalışmalar dikkate alındığında *L. gasseri* suşunun başlangıç konsantrasyonunda göre sıvı besiyerinde %65 oranında kolesterol konsantrasyonunu düşürdüğü belirtilmiştir¹⁸¹. Bu veriler her ne kadar bizim çalışma sonucunda %39.65 oranla en yüksek oranda elde ettiğimiz veriden daha yüksek olsa da *L. gasseri* türünün

iyi bir kolesterol asimilasyon yeteneğine sahip olduğu bizim çalışmamızca da kanıtlanmıştır.

Tablo 4.12. Vajinal LAB'nin % kolesterol giderim oranları

Laktik asit bakterileri	Kolesterol oranı (mg/dL*)	% Kolesterol giderimi
Kontrol değeri **	58	
<i>L. paracasei</i> L1	52.5	9.48
<i>L. paracasei</i> L2	51	12.06
<i>L. paracasei</i> L3	51.5	11.20
<i>L. crispatus</i> L5	46.5	19.82
<i>P. acidilacitici</i> L6	46	20.68
<i>P. acidilacitici</i> L7	47	18.96
<i>L. rhamnosus</i> L8	47	18.96
<i>L. plantarum</i> L9	47	18.96
<i>L. gasseri</i> L10	35	39.65
<i>P. acidilacitici</i> L11	39	32.75
<i>L. rhamnosus</i> L12	47.5	18.10
<i>L. rhamnosus</i> L13	46	20.68
<i>L. acidophilus</i> L14	56.5	2.58
<i>L. rhamnosus</i> L15	49	15.51
<i>L. plantarum</i> L16	36	37.93
<i>L. spp.</i> L17	52	10.34
<i>L. plantarum</i> L18	38.5	33.62
<i>L. plantarum</i> L19	36	37.93
<i>L. paracasei</i> L20	35	39.65
<i>L. plantarum</i> L21	47	18.96

* İki çalışmanın ortalama sonuçları, ** Kolesterol giderim oranının kıyaslanarak hesaplandığı ilk kolesterol değeri



Şekil 4.10. Vajinal LAB'nin % kolesterol asimilasyon değerlerinin grafik üzerinde gösterimi

4.2.8. Vajinal LAB'nin Enzim Profillerinin Belirlenmesi

Vajinal LAB'nin enzim profillerinin belirlenmesinde yarı kantitatif, 19 enzimatik reaksiyonun hızlı ve sistematik çalışmasına olanak sağlayan, içerisinde enzimatik substrat ve tamponu içeren 20 mikrokuyucuklu bir stripe sahip olan API-ZYM (Biomérieux) test kiti kullanılmıştır. Tablo 4.13'de API-ZYM test kitinde bulunan enzimlerin isimleri, Şekil 4.11'de de bazı LAB'nin API ZYM test striplerindeki reaksiyon görüntüleri ve verilmiştir.

Tablo 4.13. API-ZYM Test Kitinde Bulunan Enzimler ve Numara Karşılıkları

API-ZYM Test Kitinde Bulunan Enzimlerin Numara Karşılıkları			
1	Kontrol	11	Asit fosfataz
2	Alkaleen fosfataz	12	Naftol -AS-BI- fosfohidrolaz
3	Esteraz (C 4)	13	α - Galaktosidaz
4	Esteraz lipaz (C 8)	14	β - Galaktosidaz
5	Lipaz (C 14)	15	β - Glukuronidaz
6	Lösin arilamidaz	16	α - Glukozidaz
7	Valin arilamidaz	17	β - Glukozidaz
8	Sistin arilamidaz	18	N-Asetil- β - glukozaminidaz
9	Tripsin	19	α - Mannosidaz
10	α - Kimotripsin	20	α - Fukosidaz



Şekil 4.11. Bazı vajinal LAB'nin API ZYM test striplerindeki reaksiyon görüntüleri

Çalışmada test edilen vajinal LAB'nin API ZYM test striplerindeki enzimler ile girdiği reaksiyon sonuçları Tablo 4.14'de özetlenmiştir. Oluşan renk tonlarının yoğunluğuna göre yapılan numaralandırmalar sonucunda; suşların çoğunun (%80.9 - 90.4 arasında değişen değerler ile) lösin arilamidaz, valin arilamidaz, asit fosfataz,

naftol -AS-BI- fosfohidrolaz ve α - glukozidaz enzimleri ile enzim aktivitelerinin yüksek düzeyde olduğu görülmüştür. Vajinal LAB'nin esteraz (C 4), esteraz lipaz (C 8), sistin arilamidaz, β - galaktosidaz ve β - glukozidaz enzimleri ile suşların ortalama %66'sının orta derecede rekaksiyona girdiği tespit edilmiştir. Alkalen fosfataz, N-asetil- β - glukozaminidaz ve α - fukosidaz enzimleri ile bazı suşların reaksiyona girdiği görülürken, α - kimotripsin ile L8 suşunun ve α - galaktosidaz ile de sadece L10 suşunun reaksiyona girdiği belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan hiçbir suşun tripsin, α -mannosidaz ve β - glukuronidaz enzimleri ile reaksiyon göstermediği tespit edilmiştir.

L. plantarum ve *P. acidilacitici* suşlarının karaciğerde bulunan proteolitik enzimlerden biri olan lösin arilamidaz ve valin arilamidaz enzimi ile yüksek oranda reaksiyon girdiği; *L. plantarum* suşlarının alkalen fosfataz, tripsin, α - kimotripsin, α -galaktosidaz, β - galaktosidaz ve β - glukuronidaz enzimleri ile hiçbir aktivite göstermediği görülmüştür. *L. rhamnosus* suşlarının ise lösin arilamidaz, valin arilamidaz, hipertansiyonun patogenezinde aminopeptidaz aktivitesi içeren sistin arilamidaz, tıpta prostat hastalıklarının tanı ve tedavisinde kullanılan asid fosfataz, naftol -AS-BI- fosfohidrolaz ve yine hidrolaz enzimlerinden olan ve laktozun glikoz ve galaktoza parçalanmasını sağlayan β - balaktosidaz enzimi ile yüksek derecede reaksiyona girdiği tesit edilmiştir. *L. rhamnosus* suşlarının tripsin, α - kimotripsin, α -galaktosidaz, β - glukuronidaz, N-Asetil- β - glukozaminidaz ve α - mannosidaz enzimleri ile hiçbir şekilde reaksiyona girmediği görülmüştür. Vajinal sürüntülerden izole edilen *L. paracasei* suşlarının ise lösin arilamidaz, valin arilamidaz, asit fosfataz, β - galaktosidaz ve α - glukozidaz enzimleri ile enzim aktivitelerinin yüksek düzeyde buna rağmen tripsin, α - kimotripsin, α - galaktosidaz, β - glukuronidaz, β - glukozidaz, N-Asetil- β -glukozaminidaz, α - mannosidazve α - fukosidazile hiçbir enzim reaksiyonu göstermediği tespit edilmiştir.

Çalışma verileri genel olarak değerlendirildiğinde; *L. plantarum* L21 suşunun dışında bütün LAB'inde lösin arilamidaz ve valin arilamidaz enzim aktivitelerinin iyi düzeyde olduğu belirlenirken suşların hiçbirinde de lipaz, tripsin, α - mannosidaz ve β - glukuronidaz enzim aktivitelerine rastlanılmamıştır.

Tablo 4.14. Vajinal LAB'nin API ZYM test kitinde bulunan enzimlere ile girdikleri reaksiyon oranları

Laktik asit Bakterileri	Test Enzimleri (0-5 Puan*)																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>L. paracasei</i> L1	0	2	4	3	1	5	5	2	0	0	5	4	0	5	0	5	0	0	0	0
<i>L. paracasei</i> L2	0	2	3	3	2	5	5	3	0	0	4	3	0	5	0	5	0	0	0	0
<i>L. paracasei</i> L3	0	2	3	3	2	5	5	2	0	1	4	3	0	5	0	5	0	0	0	0
<i>L. crispatus</i> L5	0	0	3	2	1	5	2	2	0	0	4	4	2	3	0	5	3	0	0	0
<i>P. acidilacitici</i> L6	0	3	4	3	2	5	5	4	0	2	5	5	0	4	0	4	3	0	0	4
<i>P. acidilacitici</i> L7	0	3	4	3	2	5	5	3	0	0	3	3	0	3	0	3	3	0	0	3
<i>L. rhamnosus</i> L8	0	3	4	4	2	5	5	3	0	3	5	4	0	4	0	4	5	0	0	4
<i>L. plantarum</i> L9	0	0	1	2	0	5	4	3	0	0	1	3	0	0	0	3	4	3	0	0
<i>L. gasseri</i> L10	0	0	1	1	1	2	1	1	0	1	3	4	5	0	0	0	1	0	0	0
<i>P. acidilacitici</i> L11	0	4	5	4	0	5	5	3	0	1	5	3	0	3	0	3	3	0	0	3
<i>L. rhamnosus</i> L12	0	3	3	3	0	5	5	5	0	2	5	5	0	5	0	3	3	0	0	4
<i>L. rhamnosus</i> L13	0	3	3	3	0	5	4	5	0	2	5	5	0	4	0	3	3	0	0	4
<i>L. acidophilus</i> L14	0	1	3	3	1	5	4	3	0	0	4	3	0	3	0	3	3	0	0	2
<i>L. rhamnosus</i> L15	0	2	3	3	2	5	5	5	0	2	5	4	0	5	0	5	5	0	0	4
<i>L. plantarum</i> L16	0	1	1	1	0	2	1	1	0	0	3	2	0	0	0	3	5	4	0	0
<i>L. spp.</i> L17	0	5	3	3	0	5	3	4	0	0	5	5	0	5	0	5	0	0	0	4
<i>L. plantarum</i> L18	0	0	1	2	0	4	3	3	0	0	2	0	0	0	0	3	4	3	0	0
<i>L. plantarum</i> L19	0	2	2	2	0	5	4	2	0	0	4	3	0	0	0	3	5	5	0	0
<i>L. paracasei</i> L20	0	0	3	3	1	4	4	3	0	0	4	3	0	5	0	4	0	0	0	0
<i>L. plantarum</i> L21	0	2	5	3	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0

*: Vajinal LAB ile test enzimleri arasında görülen enzim reaksiyonlarının renk tonlarına göre numaralandırılması

Farklı ortamlardan izole edilen LAB'nin API-ZYM kiti ile enzim aktivitelerinin araştırıldığı çalışmalar dikkate alındığında fermente sebzelerden izole ettikleri *L. plantarum*, *P. acidilactici*, *L. brevis* ve *P. pentosaceus* türlerin asit fosfataz, β galaktozidaz ve β gulukozydaz aktivitesine sahip olduğu, *L. plantarum* ve *P. acidilactici* suşlarının yüksek lösin arilamidaz, valin arilamidaz aktivitesi gösterirken düşük β galaktosidaz aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir¹⁸². Literatürde belirtilen bu veriler ile bizim çalışma sonucunda elde ettiğimiz veriler ile benzerlik göstermektedir.

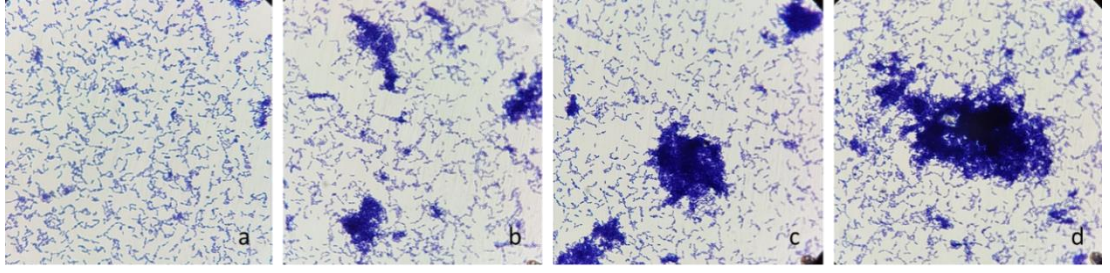
4.2.9. Vajinal LAB'nin Otoagregasyon ve Koagregasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

Vajinal floradan izole edilen bütün LAB'nin 1. saatten 4. saate % otoagregasyon değerleri Tablo 4.15'de, *L. paracasei* L2 ve *L. rhamnosus* L13 suşlarının ışık mikroskopundaki otoagregasyon görüntüleri Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de verilmiştir.

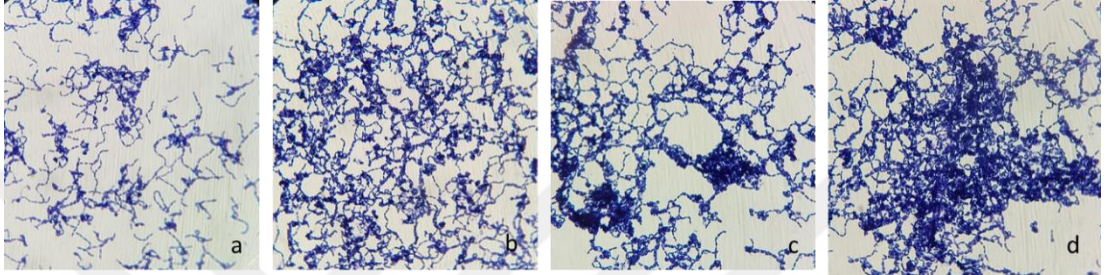
Vajinal LAB'nin 4. saatin sonunda ortalama %70.9 oranla otoagregasyon özelliği gösterdiği, özellikle *L. plantarum* L16 suşunun %85.2 gibi oldukça yüksek bir oranda otoagregasyon kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. En düşük otoagregasyon kapasitesine sahip suşun ise %47.2 oranla *L. gasseri* L10 suşu olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonunda pek çok suşun 1. saatten 4. saate kadar belli bir artan oranda otoagregasyon özelliği gösterdiği ancak *L. crispatus* L5, *P. acidilactici* L6, *L. rhamnosus* L13, *L. plantarum* L18, *L. paracasei* L20 ve *L. plantarum* L21 suşlarının 3. saatten sonra otoagregasyon yüzdesinde pek bir değişiklik olmadığı gözlemlenmemiştir.

Tablo 4.15. Vajinal LAB'nin % otoagregasyon değerleri

Vajinal LAB'nin % otoagregasyon değerleri				
Laktik asit bakterileri	1. saat	2. saat	3. saat	4. saat
<i>L. rhamnosus</i> GG (kontrol)	41.8	58.0	74.0	80.0
<i>L. paracasei</i> L1	35.7	45.3	66.2	79.2
<i>L. paracasei</i> L2	22.5	65.7	68.5	71.4
<i>L. paracasei</i> L3	54.2	70.0	72.0	78.0
<i>L. crispatus</i> L5	49.6	63.8	72.3	72.4
<i>P. acidilacitici</i> L6	49.5	73.4	81.6	81.8
<i>P. acidilacitici</i> L7	53.2	62.1	67.5	70.2
<i>L. rhamnosus</i> L8	45.9	60.0	62.5	65.0
<i>L. plantarum</i> L9	47.0	70.3	72.2	74.0
<i>L. gasseri</i> L10	30.3	41.2	46.4	47.2
<i>P. acidilacitici</i> L11	44.1	56.4	58.7	72.6
<i>L. rhamnosus</i> L12	38.2	52.5	67.9	67.9
<i>L. rhamnosus</i> L13	37.5	60.9	70.7	70.7
<i>L. acidophilus</i> L14	34.1	56.7	59.6	70.2
<i>L. rhamnosus</i> L15	10.8	56.8	63.6	68.1
<i>L. plantarum</i> L16	27.2	79.6	90.7	85.2
<i>L. spp.</i> L17	44.5	63.6	67.2	69.0
<i>L. plantarum</i> L18	31.4	60.9	70.3	70.7
<i>L. plantarum</i> L19	39.0	56.8	68.8	70.6
<i>L. paracasei</i> L20	34.4	63.6	70.9	70.9
<i>L. plantarum</i> L21	44.5	53.6	63.4	63.6



Şekil 4.12. *L. paracasei* L2 suşunun 1.(a), 2.(b), 3.(c), 4.(d) saatlerdeki otoagregasyonun ışık mikroskopundaki görüntüleri (100x)



Şekil 4.13. *L. rhamnosus* L13 suşunun 1.(a), 2.(b), 3.(c), 4.(d) saatlerdeki otoagregasyonun ışık mikroskopundaki görüntüleri (100x)

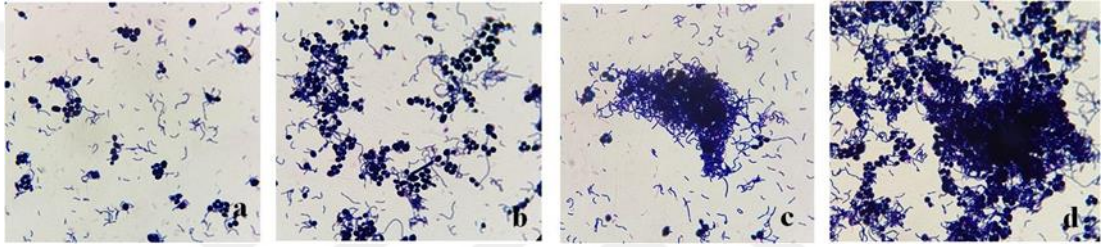
Vajinal LAB'nin koagregasyon (birliktelik oluşturma, yapışma v.s) yeteneğini araştırdığımız çalışmamızda test suşları olarak *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 mikroorganizmaları kullanılmıştır. Çalışma sonunda vajinal LAB'nin pek çoğunun *C. albicans* ve *E. coli* ile iyi koagregasyon oldukları belirlenirken *P. aeruginosa* ile koagregasyon yeteneklerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. En iyi koagregasyon özelliğine sahip suşların L9, L13, L16, L19 ve L21 nolu suşlar olduğu belirlenmiştir. Vajinal LAB'nin 4. saatin sonundaki % koagregasyon değerleri Tablo 4.16'da ve grafik üzerindeki görünümü Şekil 4.17'de verilmiştir.

Tablo 4.16. Vajinal LAB'nin çeşitli patojenlere karşı 4. saatin sonundaki % koagregasyon değerleri

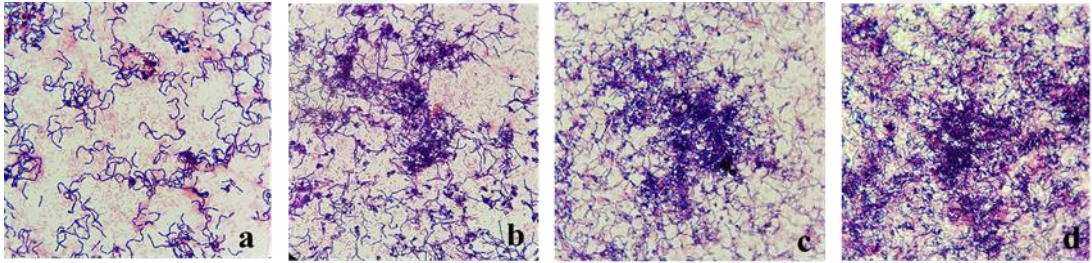
Laktik asit bakterileri	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>L. rhamnosus</i> GG (kontrol)	63.07	58.14	47.08
<i>L. paracasei</i> L1	24.69	35.63	19.21
<i>L. paracasei</i> L2	36.85	27.58	18.69
<i>L. paracasei</i> L3	34.29	29.38	18.36
<i>L. crispatus</i> L5	52.05	37.56	26.17
<i>P. acidilacitici</i> L6	47.63	38.17	23.46
<i>P. acidilacitici</i> L7	41.23	40.64	21.55
<i>L. rhamnosus</i> L8	44.56	38.47	35.16
<i>L. plantarum</i> L9	51.07	47.32	28.79
<i>L. gasseri</i> L10	24.17	37.14	14.23
<i>P. acidilacitici</i> L11	46.82	33.17	22.14
<i>L. rhamnosus</i> L12	47.63	35.65	31.45
<i>L. rhamnosus</i> L13	50.41	38.14	30.47
<i>L. acidophilus</i> L14	17.08	25.87	15.58
<i>L. rhamnosus</i> L15	46.38	41.25	34.65
<i>L. plantarum</i> L16	48.02	37.85	34.33
<i>L. spp.</i> L17	23.68	36.41	28.47
<i>L. plantarum</i> L18	41.34	39.47	27.34
<i>L. plantarum</i> L19	46.25	44.36	31.22
<i>L. paracasei</i> L20	29.56	34.11	17.96
<i>L. plantarum</i> L21	49.36	41.38	37.61

Vajinal LAB'nin *C. albicans* ATCC 10231 suşu ile ortalama %40.15 oranında koagregasyon oldukları ve en iyi koagregasyon olan suşun da %52.05 ile *L. crispatus* L5 suşu olduğu belirlenmiştir. En düşük koagregasyon özelliği gösteren suşun ise %17.08 ile *L. acidophilus* L14 nolu suş olduğu tespit edilmiştir. *L. paracasei* L1 suşunun *C. albicans* ATCC 10231 suşu ile olan koagregasyon görüntüleri Şekil 4.14'de verilmiştir.

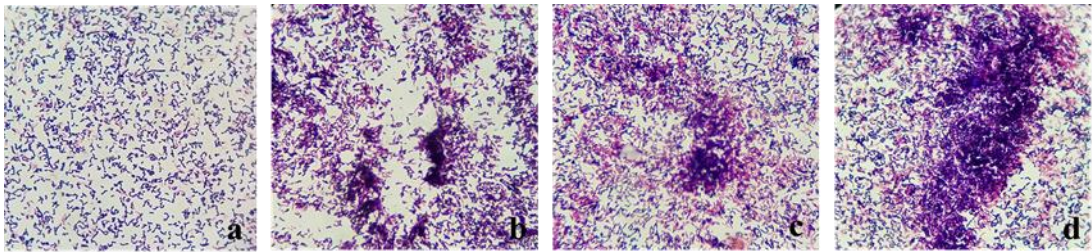
Vajinal mikrofloradan izole etmiş olduğumuz LAB'nin *E. coli* ATCC 25922 ile olan koagregasyon özelliği değerlendirildiğinde suşların ortalama %36.97 oranla koagre oldukları gözlemlenmiş, en iyi koagrege olan suşun %47.32 ile *L. plantarum* L9 nolu suş olduğu belirlenmiştir. En iyi bağlanma yeteneğine sahip olan suşun da *L. plantarum* suşu olduğu görülmektedir. *L. rhamnosus* L13 suşunun *E. coli* ATCC 25922 suşu ile olan koagregasyon görüntüleri Şekil 4.15'de verilmiştir. Suşların *P. aeruginosa* suşuna karşı % koagregasyon oranlarını düşük olarak belirlediğimiz çalışmamızda *P. aeruginosa* ile en iyi koagregasyon özelliği gösteren suşun ise %37.61 ile *L. plantarum* L21 nolu suş olduğu (Şekil 4.16) ve bu suşu takiben %35.16 oran ile *L. rhamnosus* L8 suşu olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.14. *L. paracasei* L1 suşunun *C. albicans* ATCC 10231 suşu ile 1.(a), 2.(b), 3.(c), 4.(d) saatlerdeki koagregasyonunun ışık mikroskopundaki görüntüleri (100x)

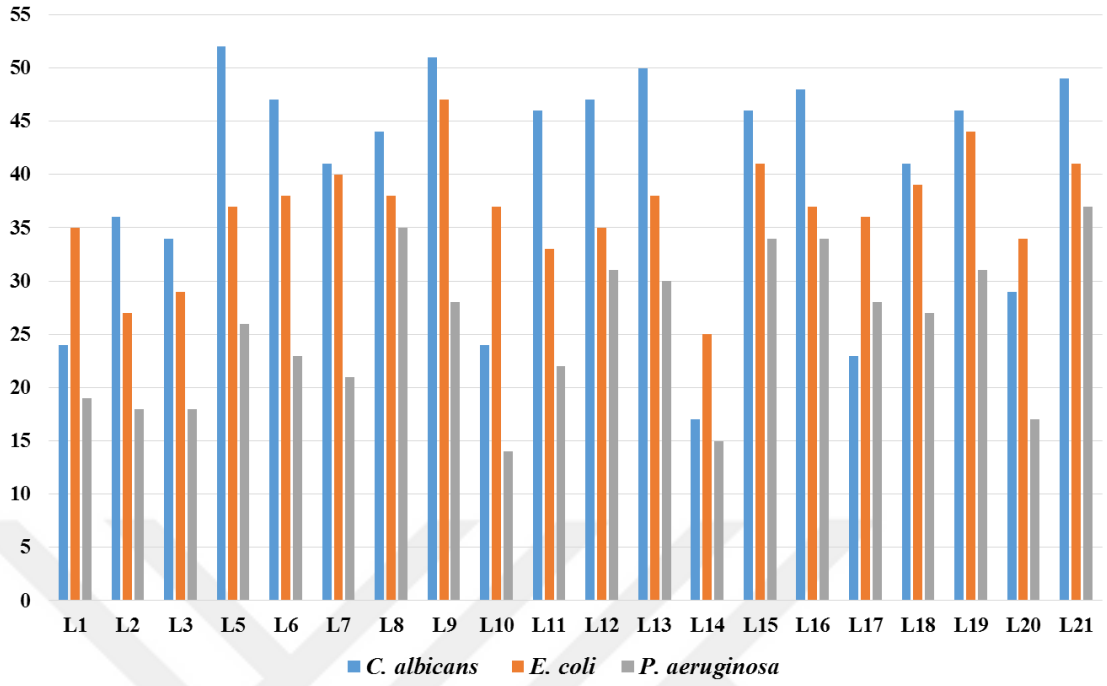


Şekil 4.15. *L. rhamnosus* L13 suşunun *E. coli* ATCC 25922 suşu ile 1.(a), 2.(b), 3.(c), 4.(d) saatlerdeki koagregasyonunun ışık mikroskopundaki görüntüleri (100x)



Şekil 4.16. *L. plantarum* L21 suşunun *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu ile 1.(a), 2.(b), 3.(c), 4.(d) saatlerdeki koagregasyonunun ışık mikroskopundaki görüntüleri (100x)

% Koagregasyon



Şekil 4.17. Vajinal LAB'nin 4. saatin sonundaki % koagregasyon oranlarının grafik üzerindeki görünümü

Vajinal LAB'nin otoagregasyon kapasitelerinin araştırıldığı çalışmalar dikkate alındığında *L. acidophilus* suşunun %76.2 oranla en yüksek otoagregasyon kapasitesine sahip olduğunu bu suşu %70.4 oran ile *L. platarum* suşunun takip ettiğini bildirmişlerdir¹⁸⁰. Elde edilen bu sonuçlar çalışma verilerimiz ile benzerlik göstermektedir. Yine koagregasyon çalışmalarında araştırmacılar vajinal LAB'nin *Candida* türleri ile yüksek oranda koagregasyon özelliği gösterdiğini bildirmişlerdir^{8,126}. Bu veriler çalışmamız sonucunda vajinal izolatlarımızın en iyi koagregasyon özelliği gösterdiği *C. albicans* sonucunu kanıtlar niteliktedir.

4.2.10. Vajinal LAB'nin Üroepitelyal Hücrelere Bağlanma Özelliğinin Belirlenmesi

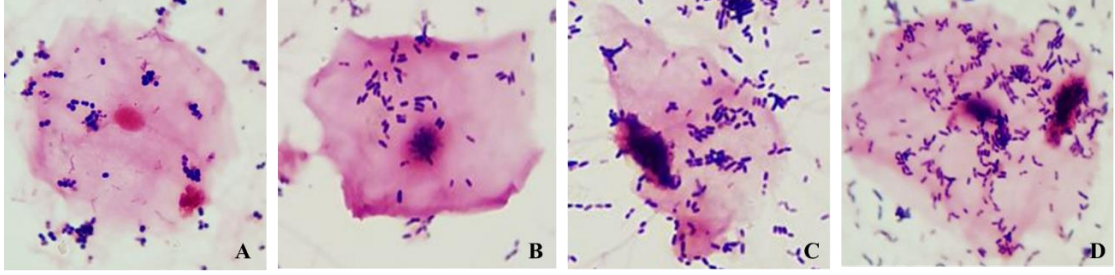
Vajinal mikrofloradan izole edilen 20 adet LAB suşlarının sağlıklı kadınların idrarından elde edilen üroepitelyal hücrelere 3. saatin sonundaki bağlanma dereceleri Tablo 4.17'de ve bazı suşlara ait Gram boyama görüntüleri Şekil 4.18'de verilmiştir.

Çalışma sonucunda üroepitelyal hücrelere en iyi bağlanma oranı olan suşlar L9, L16, L19 ve L21 olarak belirlenmiş ve +4 şeklinde değerlendirilmiştir. L2, L8, L10, L13, L17 ve L20 suşlarının bağlanma oranları ise +3 olarak tespit edilmiştir. Tür bazında değerlendirildiğinde ise çalışmamızda en iyi bağlanma özelliğine sahip suşun *L. plantarum* suşu olduğu görülürken *P. acidilactici* suşlarının bağlanma oranlarının ise düşük olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.17. Vajinal LAB'nin üroepitelyal hücrelere bağlanma dereceleri

Laktik asit Bakterileri	Üroepitelyal hücrelere bağlanma oranları	Laktik asit bakterileri	Üroepitelyal hücrelere bağlanma oranları
<i>L. rhamnosus</i> GG	+4*		
<i>L. paracasei</i> L1	+2	<i>L. rhamnosus</i> L12	+2
<i>L. casei</i> L2	+3	<i>L. rhamnosus</i> L13	+3
<i>L. paracasei</i> L3	+2	<i>L. acidophilus</i> L14	+2
<i>L. crispatus</i> L5	+2	<i>L. rhamnosus</i> L15	+2
<i>P. acidilactici</i> L6	+1	<i>L. plantarum</i> L16	+4
<i>P. acidilactici</i> L7	+2	<i>L. spp.</i> L17	+3
<i>L. rhamnosus</i> L8	+3	<i>L. plantarum</i> L18	+2
<i>L. plantarum</i> L9	+4	<i>L. plantarum</i> L19	+4
<i>L. gasseri</i> L10	+3	<i>L. paracasei</i> L20	+3
<i>P. acidilactici</i> L11	+2	<i>L. plantarum</i> L21	+4

* Vajinal LAB ile üroepitelyal hücrelerin 3. saatin sonundaki Gram boyama görüntülerinin ışık mikroskobu altında (100x büyütmede) +1 ile +4 arasındaki derecelendirilme numaraları

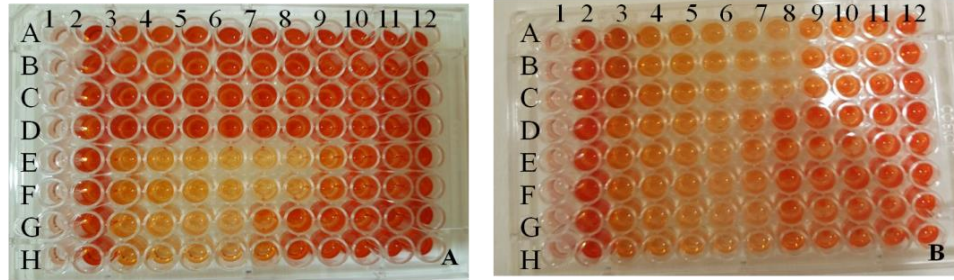


Şekil 4.18. Bazı vajinal LAB'nin üroepitelyal hücrelerle 3. saatin sonundaki gram boyama görüntüleri; A (+1); L6: *P. acidilacitici*, B (+2); L1: *L. paracasei*, C (+3); L16: *L. plantarum*, D (+4); L9: *L. plantarum*

4.2.11. Vajinal LAB'nin HeLa ve Caco-2 Hücre Hatları Üzerindeki Antiproliferatif Etkisi

Sağlıklı kadınların vajinal mikrofloralarından izole edilen LAB'nin sekresyon metabolitlerinin HeLa ve Caco-2 hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkisini belirlemek amacı ile XTT yöntemi kullanılmıştır. İzole edilen suşların ekstrakte edilen metabolit ürünlerinin HeLa hücreleri üzerindeki anti proliferatif etkisi 72 saat inkübasyonun sonunda değerlendirilmeye alınmıştır. Şekil 4.19'da XTT kit sonucuna göre 96 kuyulu plaklardaki hücre proliferasyon görüntüsü verilmiştir Toksikolojide toksik bir maddenin ortalama öldürücü dozunun belirlendiği LD₅₀ (%50 öldürücü dozun kısaltması) programı ile *L. paracasei* L1 (LD₅₀:0,006 gr/ml), L6: *P. acidilacitici* (LD₅₀: 0,006 gr/ml), *L. rhamnosus* L8 (LD₅₀:0,008 gr/ml) *L. rhamnosus* L12 (LD₅₀: 0,009 gr/ml), *L. rhamnosus* L13 (LD₅₀: 0,009 gr/ml) ve *L. plantarum* L19 (LD₅₀: 0,007 gr/ml) suşlarının HeLa üzerinde önemli bir antiproliferatif etki yarattığı gözlemlenmiştir. Vajinal LAB'nin HeLa hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkilerini gösteren LD₅₀ değerleri Tablo 4.18'de verilmiştir. Bir tetrazolyum tuzu olan XTT, canlı hücrelerin işlevsel mitokondrileri tarafından kırmızı renkli formazan bileşenlerine dönüştürüldüğünden, oluşan renk kuyu içindeki canlı hücre miktarıyla orantılı olmaktadır. Şekil 4.20'da görüldüğü gibi L1 suşunun HeLa hücreleri üzerinde en büyük antiproliferatif etkisi metabolitin 0.16 gr/ml'lik en yüksek dozunda %90-95 düzeyinde ölüm görülürken, L8 suşunun 0.05gr/ml'lik en yüksek dozunda ise yaklaşık %70 oranında ölüm görülmüştür. Yine L12 metabolitinin 0.04 gr/ml'likdozunun HeLa hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinde yaklaşık %75 ölüm oranı görülürken,

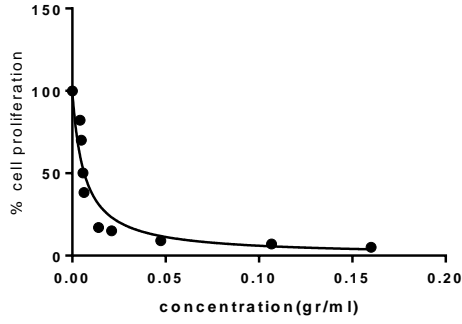
L13 suşunun 0.06 gr/ml'lik, L19 suşunun da 0.07 gr/ml'lik dozunda ise yaklaşık %90 oranında ölüm oranı gözlemlenmiştir.



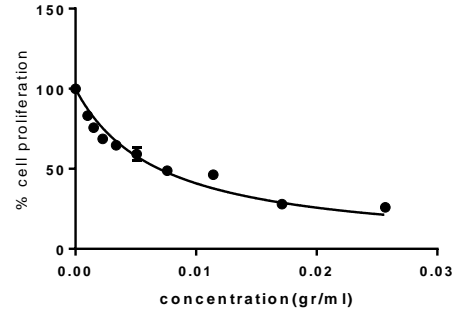
Şekil 4.19. 96 kuyulu plaklarda A: L8 suşunun ve B: L1 suşunun HeLa XTT kiti sonuçlarının görüntüsü

Tablo 4.18. Vajinal LAB'nin HeLa hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkilerini gösteren LD50 değerleri

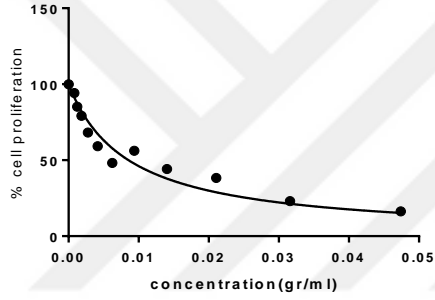
Laktik asit bakterileri	LD ₅₀ (gr/ml)
<i>L. paracasei</i> L1	0,0063
<i>L. paracasei</i> L2	0,0302
<i>L. paracasei</i> L3	0,0280
<i>L. crispatus</i> L5	0,0355
<i>P. acidilacitici</i> L6	0,0069
<i>P. acidilacitici</i> L7	0,0232
<i>L. rhamnosus</i> L8	0,0085
<i>L. plantarum</i> L9	0,0157
<i>L. gasseri</i> L10	0,0223
<i>P. acidilacitici</i> L11	0,0325
<i>L. rhamnosus</i> L12	0,0097
<i>L. rhamnosus</i> L13	0,0094
<i>L. acidophilus</i> L14	0,0118
<i>L. rhamnosus</i> L15	0,0170
<i>L. plantarum</i> L16	0,0230
<i>L. spp.</i> L17	0,0114
<i>L. plantarum</i> L18	0,0124
<i>L. plantarum</i> L19	0.0078
<i>L. paracasei</i> L20	0,0264
<i>L. plantarum</i> L21	0,0169



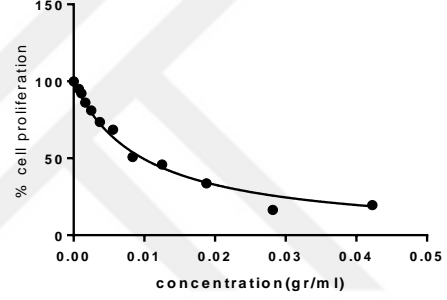
L1: LD₅₀: 0,0063 gr/ml



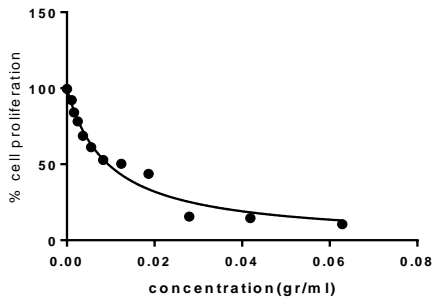
L6: LD₅₀: 0,0069 gr/ml



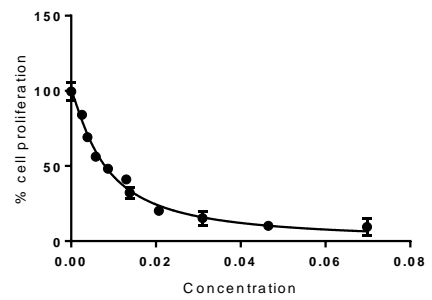
L8: LD₅₀: 0,0085 gr/ml



L12: LD₅₀: 0,0097 gr/ml



L13: LD₅₀: 0,009 gr/ml



L19: LD₅₀ : 0.007gr/ml

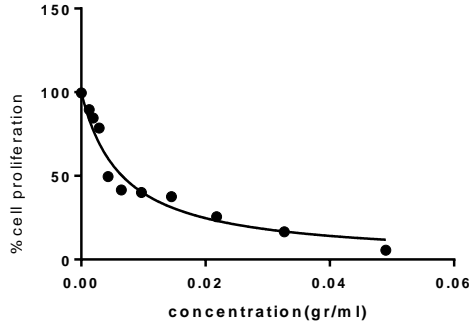
Şekil 4.20. XTT hücre proliferasyon kiti kullanılarak L1, L6, L8, L12, L13 ve L19 suşlarının ekstrakte metabolit ürünlerinin HeLa hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinin grafik olarak gösterimi.

Vajinal LAB'nin HeLa hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkilerinin değerlendirilmesinin ardından anlamlı HeLa hücre hattı üzerinde anlamlı sitotoksik etki gösteren L1, L6, L8, L12, L13 ve L19 suşlarının Caco-2 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi 72 saat inkübasyonun sonunda değerlendirilmeye alınmış ve çalışma sonucunda *L. paracasei* L1 (LD₅₀: 0,0055 gr/ml), L6: *P. acidilacitici* (LD₅₀: 0,0056 gr/ml), *L. rhamnosus* L8 (LD₅₀: 0.0075gr/ml), *L. rhamnosus* L12 (LD₅₀: 0,0048 gr/ml), *L. rhamnosus* L13 (LD₅₀: 0,0032 gr/ml) ve *L. plantarum* L19 (LD₅₀: 0,0014 gr/ml) suşlarının Caco-2 üzerinde önemli bir antiproliferatif etki yarattığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.21). Bu suşların HeLa ve Caco-2 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkilerini gösteren LD₅₀ değerlerinin karşılaştırmalı tablosu Tablo 4.19'de verilmiştir. Şekil 4.21'de görüldüğü gibi L1 suşunun Caco-2 hücreleri üzerinde en büyük antiproliferatif etkisi metabolitin 0.05 gr/ml'lik en yüksek dozunda %90-95 düzeyinde ölüm görülürken, L8 suşunun 0.025gr/ml'lik en yüksek dozunda ise yaklaşık %75 oranında ölüm görülmüştür. Yine L12 metabolitinin 0.018 gr/ml'lik dozunun HeLa hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinde yaklaşık %80 ölüm oranı görülürken, L13 suşunun 0.012 gr/ml'lik, L19 suşunun da 0.006 gr/ml'lik dozunda ise yaklaşık %75 oranında ölüm oranı gözlemlenmiştir.

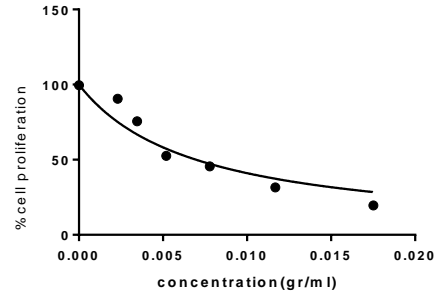
Tablo 4.19'da görüldüğü gibi LD₅₀ değerlerine göre HeLa hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkisi olan suşların Caco-2 hücre hattı üzerinde daha etkili olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, anlamlı bulunan bu suşların kolorektal kanser üzerindeki antikanser etkinliğinin servikal kansere göre daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.19. Bazı LAB'nin HeLa ve Caco-2 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkilerini gösteren LD₅₀ değerlerinin karşılaştırmalı tablosu

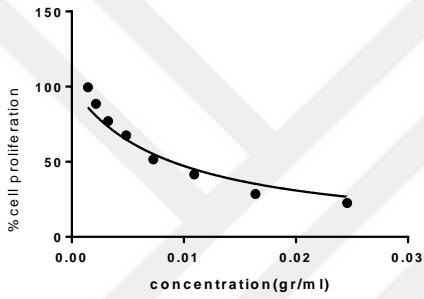
Bazı vajinal suşlar	HeLa (gr/ml)	Caco-2 (gr/ml)
<i>L. paracasei</i> L1	0,0063	0,0055
<i>P. acidilacitici</i> L6	0,0069	0,0056
<i>L. rhamnosus</i> L8	0,0085	0.0075
<i>L. rhamnosus</i> L12	0,0097	0,0048
<i>L. rhamnosus</i> L13	0,0094	0,0032
<i>L. plantarum</i> L19	0.0078	0,0014



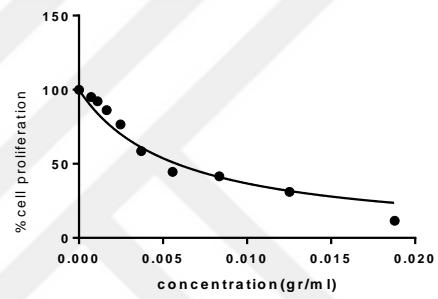
L1: LD₅₀: 0,0055 gr/ml



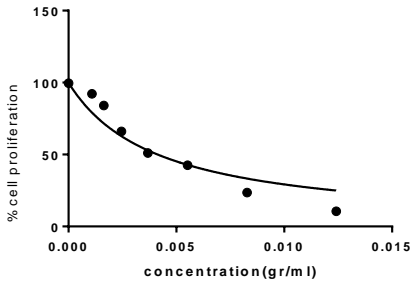
L6: LD₅₀:0,0056gr/ml



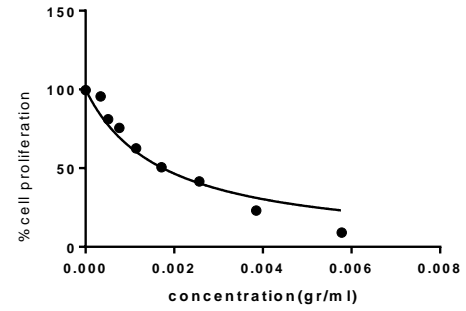
L8: LD₅₀: 0.0075 gr/ml



L12: LD₅₀: 0,0048gr/ml



L13: LD₅₀: 0,0032gr/ml



L19: LD₅₀:0,0014gr/ml

Şekil 4.21. XTT hücre proliferasyon kiti kullanılarak L1, L6, L8, L12, L13 ve L19 şuşlarının ekstrakte metabolit ürünlerinin Caco-2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinin grafik olarak gösterimi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sağlıklı bir kadının vajinal mikroflorasında *Lactobacillus*'lar en yaygın ve sayıca baskın olan mikroorganizmalardır¹. Yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda vajinal mikroflorada yerleşik bulunan *Lactobacillus*'ların bakteriyel vajinit, üriner sistem enfeksiyonları, maya vajiniti ve cinsel yolla bulaşan hastalıklardan korunmada önemli rol oynadıkları gösterilmiştir^{46,47}. *Lactobacillus*'lar vajinal mikroflorada organik asitler, hidrojen peroksit, karbondioksit, diasetil, asetaldehit, reuterin, bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri antimikrobiyal bileşikler üreterek patojen mikroorganizmaların gelişimlerini inhibe ederek çoğalmalarını kontrol altına alırlar^{5,6,7}.

Günümüzde probiyotik içeren ürünlerin ürogenital enfeksiyonların tedavisinde ve tekrarlayan vajinal enfeksiyonlardan korunmadaki etkinliğinin belirlenmesi amacı ile yapılan klinik çalışmalarda probiyotiklerin etkinliği kanıtlanmıştır. Endüstriyel bakımdan maliyeti düşük, üretimi kolay ve vajinal mikroflorada potansiyel probiyotik etkinliğe sahip mikroorganizmaların belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmalar etkin bir şekilde devam etmektedir.

Bu çalışmada, sağlıklı 60 kadının vajinal mikroflorasından izole edilen 20 adet LAB örneği hem API-50 CHL kiti kullanımı hem de 16S rDNA dizi analiz sonuçlarına göre analiz edilerek tür tanımlaması yapılmış ve düşük pH ve safra tuzlarına karşı dirençleri antagonistik aktiviteleri, üroepitelyal hücrelere bağlanma özellikleri gibi bazı probiyotik özellikleri ile hemolitik aktiviteleri, antibiyotik duyarlılık seviyeleri, otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri belirlenmiştir. Ayrıca izolatların HeLa ve Caco-2 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi araştırılmıştır.

16S rDNA gen bölgesi dizi analizi sonuçlarına göre vajinal mikrofloradan izole edilen 20 adet suşun tür tanımlaması sonuçlarında 7 farklı türe ait oldukları belirlenmiştir. *L. plantarum* türü %25 oranla en yüksek oranda görülen tür olurken *L. rhamnosus* ve *L. paracasei* türleri ise %20 oranla en sık görülen ikinci tür olarak belirlenmiştir. Bu türleri takiben *P. acidilactici* %15 oranla ve *L. gasseri*, *L. crispatus*

ve *L. acidophilus* suşları ise %5 oranla görülen türler olarak tespit edilmiş olup sadece bir suşun tür tanımlaması yapılamamıştır. Tanımlanan bu suşların tamamı daha önce yapılan benzer çalışmalarda kanıtlanmış vajinal mikroflora üyeleridir¹.

Ülkemizde vajinal mikrofloradan izole edilen LAB'nin probiyotik karakterleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Aslım ve Kılıç (2006)¹⁶⁶ sağlıklı 19 kadın arasından 10'nun vajinal duvarından izole ettikleri 58 adet suşun %21'ini *L. gasseri*, %16'sını *L. vaginalis* ve *L. acidophilus*, %14'ünü *L. crispatus* ve *L. delbrueckii* spp. *lactis*, %5'ini *L. plantarum*, %3'ünü *L. jensenii*, *L. salivarius* ve *L. cellobiosus* ve %2'sini *L. brevis*, *L. oris* ve *L. curvatus* suşlarından oluştuğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda *L. plantarum* suşu %25 oranla en yüksek oranda tespit edilmiştir. Oysa Aslım ve Kılıç tarafından yapılan çalışmada *L. plantarum* suşu %5 olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda farklı coğrafik bölgelerde, ırk ve etnik duruma göre kadınların vajinal sistemlerinin kompozisyonunda *Lactobacillus* türlerinde bireysel farklılıklar gözlenmiştir. Ravel vd. (2011)³⁹ Kuzey Amerika'da yaşayan 4 farklı etnik grup (beyaz, siyah, İspanyol ve Asya'lı) üzerinde yapmış olduğu çalışmada aynı bölgede yaşayan dört farklı etnik grup arasında vajinal mikrofloranın farklı olduğunu bildirmiştir.

Mousavi vd. (2016)⁵⁹ sağlıklı İran kadınlarının vajinal mikrofloralarından izole ettikleri 50 örnek arasından 33 örneğin idenfikasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu suşların %42'sini *L. crispatus*, %27'sini *L. rhamnosus* %18'ini *L. gasseri*, %6'sını *L. plantarum* olarak belirlemişlerdir. Elde edilen bu değerler %20 oranında *L. rhamnosus* suşunu tespit ettiğimiz çalışmamız ile benzerlik göstermektedir.

Yine Hindistan'da yapılan bir başka çalışmada *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. reuteri* ve *L. fermentum* suşları vajinal mikroflorada en yaygın *Lactobacillus* suşları olarak rapor edilmiştir ki bu dağılım ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir¹⁴⁵. Bu çeşitli çalışmaların sonuçları birlikte ele alındığında kişinin genetik yapısı, beslenme,

kişisel hijyen ve cinsel aktivite gibi bazı faktörlerin sağlıklı kadınların vajinalarında kolonize olan *Lactobacillus* türlerini etkilediği görülmektedir¹⁸³.

Çalışmamızda en yüksek oranla tespit ettiğimiz *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* suşları kadınlar ile ilişkili enfeksiyonların tedavisinde özellikle BV'nin tedavisinde probiyotik suşlar olarak kullanılmaktadır. *L. plantarum* suşları hidrojen peroksit gibi patojen mikroorganizmaların üremesini engelleyen antimikrobiyal ajanlar üretme, insan epitel hücrelerine bağlanabilme ve vajinal patojenlere karşı koagregasyon özelliği gösterebilme yeteneğine sahip suşlar olup sağlıklı kadınların vajinal mikroflorasında bulunmaktadır ve günümüz vajinal probiyotik tabletlerde en sık kullanılan suşlar arasındadır^{184,185,186}.

L. rhamnosus suşları da yaygın olarak sağlıklı kadınların genitoüriner sisteminde bulunmakta ve bağırsak sisteminde meydana gelen aktif bir enfeksiyon süresince bakterilerin gelişimini kontrol altına almada yardımcı olarak kullanılan suşlardandır.

L. rhamnosus fermente ve pastörize olmamış süt ve yarı sert peynir gibi yoğurt ve süt ürünlerinde de kullanılmaktadır¹⁸⁶. Yapılan çalışmalar *L. rhamnosus* suşunun pek çok yararlı etkisini ortaya koymuştur. Özellikle çeşitli gruplar tarafından yapılan araştırmalarda *L. rhamnosus* Gorbach-Goldin (LGG) suşunun bağırsak sistemi üzerinde, mukozal immünite üzerinde, ishal tedavisinde, kronik remisyonda, ülseratif kolit hastalığında ve bağırsak bariyer fonksiyonlarının düzenlenmesi üzerinde yararlı etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır¹⁸⁷.

Probiyotiklerin mide asitliğinden geçebilmeleri ve etkinliklerini gösterecekleri bağırsak sistemine ulaşabilmeleri gerekmektedir. Bağırsak sistemine ulaştığında ise safra tuzlarına karşı dirençli olmaları bakterilerin hayatta kalması ve büyümesi için önemli olduğundan bu iki özellik en önemli probiyotik mikroorganizma seçim kriterini oluşturur. Besinlerin sindirim sisteminden geçerken, midede kalma süresi ortalama 3 saattir^{177,188}. Bu süre zarfında midenin pH'sı 1-4 arasında değişse de genellikle araştırmacılar tarafından in vitro deneylerde pH 3.0 seçilir⁸⁷. Potansiyel probiyotik

karakterdeki suşları seçmek için çalışmamızda seçilen pH değerleri pH 2.0, 2.5 ve 3.0 dür. Çalışmamızda elde edilen 20 adet suş arasından L9 suşunun pH 2.0 ortamında 3. saat sonunda %32.9 oranında canlılığını koruyabildiği tespit edilirken diğer 19 adet suşun 3. saat sonunda canlılıklarını kaybettiği belirlenmiştir. pH 2.0’de canlılığını sürdüremeyen suşların pH 2.5 ortamında hayatta kalma oranı ise %68.3 oranında tespit edilmiştir.

Araştırmada kullanılan tüm suşların pH’ya dirençli olduğu ve 3 saat süreyle gerçekleştirilen pH 3.0 uygulamasında ortalama %90.3 oranında canlılıklarını korudukları belirlenmiştir. Elde edilen veriler neticesinde L2, L6, L7, L8, L9, L11, L15, L18 ve L20 suşlarının gastrik koşullarda canlılığını yüksek düzeyde sürdürebildiği ve dolayısı ile sindirim sistemine ulaştığında patojen bakteriler ile yarışma ve tutunma için yeterli sayıyı koruyabildiği saptanmıştır. Bu sonuçlar daha önceden yapılmış çalışmalara benzerlik göstermektedir¹⁷⁷.

Bebek gaitasından izole edilen LAB için pH 2.0, letal pH değeri olarak tanımlanmıştır. Bütün bu çalışmalar, LAB’nin asit toleranslarının; H⁺- ATPaz enzimi, bakteri türü, gelişme ortamı ve inkübasyon koşullarına göre farklılık gösteren sitoplazmik membran yapısına bağlı olarak değiştiğini belirtmektedirler¹⁸⁹.

Jonganurakkum vd. (2008)¹⁹⁰ tarafından farklı LAB’nin mide koşullarına toleranslarının araştırıldığı bir başka çalışmada, pH 3.0’de ve 3 saat sonunda *Pediococcus* üyelerinin diğer suşlara göre daha fazla direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda da elde edilen üç adet *P. acidilactici* L6, L7 ve L11 suşlarının pH 3.0’de 3. saat sonunda %91.8, 90.8 ve 94.3 gibi oldukça yüksek oranda canlılıklarını korudukları tespit edilmiş ve düşük pH’a dirençli olduğu saptanmıştır. Eryılmaz, (2011)⁴¹ çalışmalarında vajinal mikrofloradan izole ettiği *P. acidilactici* OZV suşunun pH 3.0’ de 3. saatin sonunda %70.62 oranında canlılık gösterdiğini belirtmiştir. Nami vd. (2014b)¹⁷⁷ sağlıklı kadınların vajinal mikrofloralarından izole ettikleri *L. plantarum* 5BL suşunun pH 3.0’de 3. saat sonunda %88 gibi yüksek bir oranda dirençli olduğu tespit edilmiş olup elde edilen bu sonuç çalışmamızda *L. plantarum* L9 ve *L. plantarum* L18 suşlarının pH3.0’de 3. saat sonundaki canlılık oranları (sırasıyla %97.4

ve 94.9) ile benzer olduğu görülmüştür. Çalışmamızdaki suşların daha yüksek oranda canlılık oranına sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bağırsak sistemdeki safra tuzunun fizyolojik konsantrasyonu %0.3-0.5 arasında değişmektedir⁸⁶. Yapılan çeşitli çalışmalarda, insandaki safra konsantrasyonuna yakın bir değer olmasından dolayı safraya dirençli olan suşların belirlenmesinde özellikle %0.3'lük safra konsantrasyonunun kritik bir değer olduğu bildirilmiştir¹⁶⁵. Çalışmamızda safra tuzuna dirençli en iyi probiyotik karakterdeki suşları belirlemek amacı ile %0.3, %0.5 ve %1'lik safra tuzu ortamları kullanılmıştır.

İn-vitro koşullar altında ince bağırsak sistemini simüle eden farklı oranlarda safra tuzu konsantrasyonlarına L9, L16, L18, L19 ve L21 suşlarının yüksek oranda dirençli olduğu görülmüştür.

İn-vitro koşullar altında ince bağırsak sistemini simüle eden farklı oranlarda safra tuzu konsantrasyonlarına L1, L2, L3, L5, L10, L14 ve L20 suşlarının suşlarının yüksek oranda dirençli olduğu görülmüştür. L1, L2, L3, L5, L10, L14 ve L20 suşlarının %0.3'lik safra tuzu ortamında 3. saatin sonunda ortalama %75.9 oranında canlılık tespit edilirken L1, L10 ve L20 suşlarının %0.5'lik safra tuzu ortamında canlılıklarını yitirdikleri görülmüştür. L2, L3, L5 ve L14 suşlarının ise %0.5'lik safra tuzu ortamındaki hayatta kalma oranları ise ortalama %64.0 dir. Bu suşların %1'lik safra tuzu ortamında ise canlılıklarını koruyamadıkları tespit edilmiştir. L1, L10 ve L20 suşlarının ise sadece %0.3'lük safra tuzu ortamında canlılıklarını koruyabildiği bu suşlar dışında diğer bütün suşların bütün safra tuzu ortamlarına karşı azalan oranda da olsa dirençli oldukları belirlenmiştir.

Eryılmaz, (2011)⁴¹ yaptıkları benzer bir çalışmada *P. acidilactici* OZV suşunun %0.3'lük safra tuzu ortamında 4. saat sonunda %85.08 oranında canlılık oranlarının olduğunu belirtmişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmamızda da benzer şekilde 3. saat sonunda *P. acidilacitici* L6, L7 ve L11 suşlarının sırasıyla %80.1, 84.1 ve 85.2 oranlarında canlı kaldığı tespit edilmiştir. Bu suşlar %0.5 ve %1'lik safra tuzu

ortamlarında da 3. saatin sonunda canlılık oranlarında düşme olmasına rağmen dirençliliklerini korumuşlardır.

Nami vd. (2014a)¹⁵⁹ sağlıklı kadınların vajinalarından izole ettikleri *L. acidophilus* 36YL suşunun probiyotik potansiyelini ve kanser hücreleri üzerindeki biyoterapötik etkilerini araştırdıkları çalışmada suşun pH 3.0 ortamında 3. saatin sonunda %81 oranla, %0.3'lük safra tuzunun bulunduğu ortamda ise %89 oranla canlılığını koruduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da tek bir suş olan *L. acidophilus* L14 suşu pH 3.0'de %89.5 gibi daha yüksek bir oranla ve %0.3'lük oxgal ortamında ise %83.5 oranla canlı kalabilmişlerdir.

Pithva vd. (2014)⁸⁸ yayınladıkları çalışmada sağlıklı kadınların vajinal mukozasından ve bebek dışkılarından izole ettikleri *L. rhamnosus* Vc ve Fb suşlarının 4. saatin sonunda pH 2.0'de ve %4'lük safra tuzu ortamında canlılıklarını koruyabildiklerini belirtmişlerdir. Benzer olarak çalışmamız sırasında izole ettiğimiz *L. rhamnosus* L8, L12, L13 ve L15 suşlarının hepsinin farklı safra tuzu ortamlarına dirençli olduğu ancak pH 2.0 ortamında canlılıklarını kaybettiği görülmüştür.

Menopoz öncesi dönemde kadınların %75'i hayatlarında en az bir kez BV enfeksiyonu ile karşılaşırken kadınların %45'i iki ya da daha fazla oranda bu enfeksiyonla karşı karşıya kalmaktadır¹³⁷. BV enfeksiyonu tedavisinde kullanılan antibiyotik kullanımının ardından LAB mikrofloranın tekrar eski haline getirilmesinde görev alan bakteri gruplarıdır.

LAB'nin bazı antibiyotiklere dirençli olması istenilen bir özelliktir. Çünkü probiyotik bakteriler yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerden etkilenmemeli veya çok az etkilendiğinde yaşamlarını sürdürerek vajinal mikrofloraya yarar sağlamalıdır. *Lactobacillus*'ların vankomisin ve teikoplanine doğal olarak dirençli olduğu bilinmektedir. Bazı araştırmacılar insan kaynaklı *L. rhamnosus*, *L. paracasei* ve *L. acidophilus* bakterilerinin vankomisin ve teikoplanine yüksek derecede dirençli olduğunu rapor etmişlerdir¹⁷⁸.

Antibiyotik direnç çalışmalarında *Lactobacillus*'ların genellikle aminoglikozidler, beta- laktam antibiyotikler, sefalosporinler ve glikopeptit antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu gösterilmiştir. Bu alanda yapılan çalışmalar da yine *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei* ve *Pediococcus* suşlarının vankomisine karşı dirençli olduğu belirtilmiştir¹⁷⁹. Çalışmamızda da benzer olarak aminoglikozidler grubundan gentamisin, tobramisin ve amikasin antibiyotiklerine karşı bütün suşların dirençli olduğu, sefalosporin grubundan olan sefoperazon ve saftazidim antibiyotiğine karşı ise dirençlilik derecelerinin suştan suşa farklılık gösterdiği ve glikopeptid grubundan vankomisin ve teikoplanin antibiyotiklerine karşı L5, L10, L14 ve L21 suşları hariç diğer bütün suşların dirençli olduğu görülmüştür.

Kattla vd. (2001)¹⁹¹ nın *Lactobacillus* suşlarının tetrasiklin ve kloramfenikol antibiyotiklerine duyarlı olduğunu belirttikleri çalışmalarına benzer olarak bütün suşlarımızın kloramfenikol ve eritromisin antibiyotiklerine karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Yine bu sonuçlar Ammor vd. (2007)¹⁹² tarafından yapılan çalışma sonuçları ile de benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda ayrıca tetrasiklin antibiyotiğine karşı iki suş dışındaki izolatların yüksek duyarlılık gösterdikleri Danielsen ve Wind (2003)¹⁹³ tarafından yapılan çalışmada da gösterilmiştir.

Bizim sonuçlarımız özellikle Gad vd. (2014)¹⁹⁴ tarafından yapılan çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir. LAB'nin antibiyotik dirençliliğini araştırdığı çalışmada 180 süt ürünü ve farmasötük ürünlerden izole edilen 244 LAB'nin penisiline karşı duyarlı olduğunu, *Lactobacillus* cinsi bakterilerin vankomisine karşı dirençli olduğunu ve ayrıca pek çok suşun tetrasiklin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı da geniş çapta duyarlı olduklarını belirtmişlerdir.

Lactobacillus suşlarının, kadınların genital ve ürogenital sistemlerdeki enfeksiyonlara sebep olan bazı patojen mikroorganizmalara karşı çeşitli derecelerde suş-spesifik antibakteriyel aktivite gösterdiği daha önce yapılan çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır⁸⁸. *Lactobacillus* cinsi bakteriler hem patojen mikroorganizmalar ile rekabete girerek hem de organik asitler (laktik ve asetik asit), H₂O₂ ve / veya bakteriosinler, düşük moleküllü peptidler ve antifungal peptidler, fenilaktik asit ve

OH-fenilaktik asit gibi diğer antibakteriyel moleküllerin üretimi ile antimikrobiyal etki göstermektedirler¹⁹⁵. Bu çalışmada en iyi probiyotik karakterdeki vajinal suşun belirlenmesinde geniş bir yelpazede patojen bakteriler incelenmiştir.

Çalışmamızda suşların %95 gibi oldukça yüksek bir oranla *C. albicans* Y-1200-NIH, *B. cereus* CU1065 ve *B. cereus* RSKK 709 suşlarına karşı antagonistik aktivite gösterdiği ancak *C. tropicalis* ATCC 13803 suşuna karşı hiçbir suşun inhibisyon zonu oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Üriner sistem enfeksiyonlarına sebep olan fırsatçı potojenlerden olan *E. coli* ATCC 25922 tip suşuna karşı %65, *P. aeruginosa* ATCC 2785310 tip suşuna karşı %45 oranla antagonistik etkili bulunmuştur. İzolatlarımız ayrıca *B. subtilis* ATCC 6633 suşuna karşı %70, *B. subtilis* W168 suşuna karşı %65, *C. albicans* ATCC 90028 suşuna karşı %85, *C. albicans* ATCC 10098 suşuna karşı %60 oranla antagonistik etki gösterirken en zayıf direnci %15 oranla *S. aureus* ATCC 29213 suşuna karşı oluşturmuşlardır. Çalışmamızda L1, L8, L9 ve L16 suşları indikatör mikroorganizmalar üzerinde en fazla inhibitör etkiye sahip suşlar olarak tespit edilmiştir.

Vajinal mikrofloradan izole edilen suşların değerlendirildiği çalışmalara baktığımızda Kassaa vd. (2014)¹⁶⁵ Lübnanlı sağlıklı 135 kadının vajinal sürüntülerinden izole edilen 53 adet izolatın probiyotik özelliklerinin araştırdıkları çalışmada suşların *E. coli* CIP 103982, *S. aureus* ATCC 33862 ve *C. albicans* ATCC 10231 suşlarına karşı antagonistik aktivite gösterdiği, bir başka çalışmada sağlıklı Bulgar kadınlarının vajinal sürüntülerinden izole edilen 20 adet suşun *E. coli* 2747, *E. coli* 1438, *E. coli* HB 101, *K. pneumoniae* ATCC 10031 ve *B. megatherium* 9885 tip suşlarına karşı antagonistik aktivite gösterirken suşların hiçbirinin *C. albicans*, *Staphylococcus saprophyticus*, *S. epidermitis*, *P. vulgaris* ve *Salmonella typhimurium* suşlarının gelişimini inhibe etmediği gözlemlenmiştir¹⁴⁹. Vajinal mikrofloradan izole edilen *L. rhamnosus* L60 suşunun antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirildiği bir başka çalışmada ise L60 suşunun *C. albicans*, *E. aerogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* suşlarının gelişimini engelleyen büyük inhibisyon zon çapları oluşturduğu belirtilmiştir¹²².

Ülkemizde yapılan bir çalışmada vajinal sürüntülerden izole edilen 58 adet izolatın %85'nin *P. aeruginosa* ATCC 29212, %48'nin *S. aureus* ATCC 2392, %43'nün *E. coli* ATCC 11230 üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğunu belirlemiştir¹⁶⁶. Yapılan bu çalışmalar sonucunda elde edilen veriler bizim verilerimiz ile benzerlik göstererek en büyük inhibisyon zon çapları *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, *B. cereus* RSKK 709, *B. cereus* CU 1065, *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* Y-1200-NIH ve *K. pneumoniae* suşlarına karşı oluşmuştur. Yine Nami vd. (2014) yılında yayınlanan iki farklı çalışmada araştırmacı vajinal mikrofloradan izole ettiği *L. acidophilus* 36YL ve *L. plantarum* 5BL suşlarının probiyotik potansiyelini araştırmış ve araştırma sonucunda her iki suşunda *E. coli* 026, *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. typhimurium* ATCC 14028 suşlarına karşı etkili olduğunu vurgularken *K. pneumoniae* ATCC 10031 ve *C. albicans* ATCC 10232 suşlarına karşı dirençli olduğunu belirtmiştir^{159,177}.

Hidrojen peroksit *Lactobacillus*'lar tarafından üretilen bir diğer antagonistik bileşiktir. Vajinal sıvıda farklı konsantrasyonlarda birçok mikroorganizmaya karşı toksik etki göstererek vajinal mikroflorada koruyucu bir mekanizma oluşturur. Vajinal salgılarda H₂O₂, çeşitli mikroorganizmalara karşı oldukça toksik olan süperoksit anyonları ve hidroksil serbest radikalleri gibi reaktif oksijen türlerine (ROS) dönüştürülür. Ayrıca, *Lactobacillus*'lar, anaerobik bakterilerin çoğalmasını engelleyen, vajinal ortamda yüksek bir oksidoredüksiyon potansiyeline de sahiptir^{8,126}.

Lactobacillus'lar tarafından H₂O₂ üretimi tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonuna, BV, gonoreve HIV enfeksiyonlarına karşı vajinal mikroflorayı koruduğu çeşitli çalışmalarca kanıtlanmıştır¹⁹⁶.

Hidrojen peroksit üretimi MRS agara tetrametilbenzidin ve peroksidaz enzimleri eklenerek gerçekleştirilen yöntemler gibi kantitatif yöntemler kullanılarak da Gil vd. (2010)¹²⁶ gerçekleştirilebildiği gibi çalışmamızda olduğu gibi semikantitatif bir yöntem ile de gerçekleştirilebilir. Çalışmamız sonucunda L1, L3, L5, L10 ve L19 suşların 10 mg/L değerinde en yüksek seviyede H₂O₂ ürettiği tespit edilmiştir. L9, L11,

L14, L16, L17 ve L21 suşlarının ise 3 mg/L H₂O₂ ürettiği, diğer suşların üretmediği belirlenmiştir.

Wilks vd. (2004)¹⁷¹ yaptıkları çalışmada erken doğum riski olan hamile kadınların vajinal sürüntülerinden izole edilen vajinal *Lactobacillus*'ların semikantitatif yöntem ile H₂O₂ üretim yeteneklerinin araştırıldığı çalışmada 73 *Lactobacillus* türü arasından en yüksek H₂O₂ üretim yeteneğine sahip suşun *L. gasseri* ve *L. crispatus* olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma bizim çalışmamız ile uyumlu sonuçları içermekte olup çalışmamızda da *L. crispatus* L5 ve *L. gasseri* L10 suşları en yüksek H₂O₂ üreten suşlar arasındadır. Yine benzer bir başka çalışmada sağlıklı Brezilyalı kadınlarının vajinal mikrofloralarından izole edilen 11 adet vajinal *Lactobacillus* suşunun semikantitatif yöntem ile H₂O₂ üretim yeteneklerinin araştırıldığı çalışmada ise *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* ve *L. vaginalis* suşlarının (3-10 mg/L) H₂O₂ ürettiği belirtilmiştir¹²⁶. Yine bizim çalışmamızda da vajinal sürüntülerden izole edilen *L. crispatus* L5, *L. gasseri* L10 ve *L. acidophilus* L14 suşları (3-10 mg/L) değer arasında H₂O₂ üretim yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında görülen ölümlerin en önemli sebeplerinden biridir ve en önemli risk faktörünü kandaki yüksek kolesterol miktarı oluşturmaktadır. Bu hastalıkların önlenmesi ve tedavisindeki ilk hedef bireylerde görülen serum kolesterol seviyesini düşürmeye yönelik olup ilaç tedavisi, diyet uygulamaları ve egzersiz gibi hem farmakolojik hem de farmakolojik olmayan yöntemler olmaktadır. Bu yöntemler kandaki kolesterol konsantrasyonlarını düşürmeye yardımcı olsada tedavide yetersiz kalmaktadır. Özellikle uzun süreli ilaç kullanımının çeşitli yan etkilere sebebiyet vermesinden dolayı hastaların pek çoğu kandaki yüksek serum kolesterolünün düşürülmesinde ilaç dışı tedavileri tercih etmektedir^{129,197}.

Bu alanda yapılan in vitro ve hayvan modeli çalışmalarda *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarından bazılarının kandaki yüksek kolesterolü düşürdüğü kanıtlanmıştır¹³⁴. Ancak LAB'nin kolesterol asimilasyonunu nasıl gerçekleştirdiğine yönelik pek çok mekanizma öne sürülsede kolesterol miktarını nasıl düşürdüğü tam

olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle hem kolesterol düşürme yeteneğine sahip özel suşların tespit edilmesi hem de düşürme mekanizmasının belirlenebilmesi için bu alandaki çalışmalar hız kazanmıştır.

Yapmış olduğumuz çalışmamızda bütün suşların kolesterol asimilasyonu yeteneğine sahip olduğu, % kolesterol asimilasyon değerlerinin tür içinde ve türler arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada en yüksek kolesterol giderimi %39.65 oranla L10 ve L20 suşlarında görülürken bu suşları takip eden L16 ve L19 suşlarının ise %37.93 oranla serum kolesterol seviyesini düşürdüğü tespit edilmiştir. Yine L18 suşunun %33.62 ve L11 suşunun %32.75 oranında kolesterol asimilasyonu yaptığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar diğer probiyotik özellikleri ile dikkat çeken bu suşların yüksek kolesterol giderimine sahip olmaları ile de potansiyel bir probiyotik olabileceğine işaret etmektedir.

Baltova ve Dimitrov (2014)¹⁸¹, sağlıklı gönüllülerin dışkısından ve gıdalardan izole ettikleri 17 adet *L. gasseri* suşunun probiyotik özelliklerinin araştırıldığı çalışmada en iyi potansiyel probiyotik özelliklere sahip *L. gasseri* 4/13 suşunun başlangıç konsantrasyonuna göre sıvı besiyerinde %65 oranında kolesterol konsantrasyonunu düşürdüğü tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da en iyi kolesterol asimilasyon yeteneğine sahip suşun % 39.65 oranla *L. gasseri* olduğu belirlenmiştir. Suşların kolestrol giderim oranları arasında farklılıklar görülsede *L. gasseri* suşunun kolesterol giderimi konusunda iyi bir probiyotik mikroorganizma olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Yine *L. gasseri* CHO-220 ve inülininden oluşan sinbiyotik ürün kullanılarak gerçekleştirilen randomize, çift körlü, plasebo kontrollü ve paralel dizayn edilen bir çalışmaya yüksek kolesterol hastalığına sahip farklı cinsiyetlerden oluşan 32 hasta dahil edilmiştir. Tedavi grubu ve plasebo grubu olmak üzere iki gruptan oluşan hasta gruplarının 12 hafta boyunca günde 4 kapsül sinbiyotik alması sağlanmıştır. Sonuçta sinbiyotik kullanan grubun kontrol grubuna kıyasla total plazma kolesterol seviyesinde ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol seviyesinde sırasıyla %9.27 ve 7.84 oranında düşüş olduğu belirlenmiştir¹⁹⁸.

Anandharaj vd. (2015)¹⁹⁹ yapmış oldukları çalışmada, Hindistan’da geleneksel turşulardan izole ettikleri *L. crispatus* suşunun çözülebilir kolesterol ekleyerek gerçekleştirdikleri çalışmada *L. crispatus* GI9 suşunun (58.08 mg/ml) kolesterol azalttığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise vajinal sürüntülerden izole ettiğimiz *L. crispatus* suşunun kolesterol giderimi % 19.82 gibi daha düşük bir oranda bulunmuştur. Bu aradaki farklılık tür içi farklılıklarından olabildiği gibi suşların farklı ortamlardan izole edilen suşlar olmasından ya da çalışmada farklı kolesterollerin kullanılmasından kaynaklanmış olabilir. Çünkü çalışmamızda kolesterolü yüksek hastaların serumlarındaki kolesterol miktarında görülen azalma oranını araştırılırken Anandharaj vd. çalışmalarında çözülebilir kolesterol kullanılarak oluşturulan yapay ortamdaki kolesterol giderim oranını araştırmışlardır.

Bosch vd. (2014)²⁰⁰ sağlıklı çocukların dışkılarından izole ettikleri *L. plantarum* CECT 7527, 7528 ve 7529 suşlarının kolesterol asimilasyon yeteneklerinin araştırıldığı çalışmada çözülebilir kolesterol ve %1’lik safra tuzunun bulunduğu MRS besiyerinde 7527, 7528 suşlarının %42.7 oranında 7529 suşunun ise %42.0 oranında kolesterol giderimi yaptığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar yapmış olduğumuz çalışma sonucunda vajinal sürüntülerden izole edilen *L. plantarum* L16 ve L19 suşlarının %37.93 oranında kolesterol asimilasyonu yaptığı sonucu ile benzerlik göstermektedir. Yapılan literatür taramalarında vajinal mikrofloradan izole edilen *Lactobacillus* türlerinin kolesterol giderim oranlarının araştırıldığı çalışmalara pek rastlanılmamıştır.

Vajinal LAB’nin enzim profillerinin belirlendiği çalışmamızda API-ZYM test kitine göre suşların çoğunun (%80.9 - 90.4) lösin arilamidaz, valin arilamidaz, asit fosfataz, naftol -AS-BI- fosfohidrolaz ve α - glukozidaz enzimleri ile aktivitelerinin yüksek düzeyde olduğu görülmüştür. Tripsin, α - mannosidaz ve β - glukuronidaz enzimleri ile de suşların hiçbirinin reaksiyon göstermediği tespit edilmiştir.

Herreros vd. (2003)²⁰¹ İspanyol keçi peynirinden izole ettikleri *L. plantarum* ve *L. brevis* türlerinin enzim aktivitelerini değerlendirdikleri çalışmada suşların çoğunda lösin aminopeptidaz, valin aminopeptidaz, asit fosfataz, β galaktozidaz, α glukozidaz, β glukozidaz aktivitesi olduğu; alkalın fosfataz, esteraz, esteraz lipaz,

lipaz, tripsin, kimotripsin, α galaktozidaz, β glukoronidaz aktivitesi olmadığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamız sonucunda elde edilen suşların daha fazla oranda enzim aktivitesi gösteren suşlardan oluşmuş olduğu ve bütün *L. plantarum* suşlarımızda bu çalışma ile benzer olarak alkalın fosfataz, esteraz, esteraz lipaz, lipaz, tripsin, kimotripsin, α galaktozidaz ve β glukoronidaz enzim aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir.

Lactobacillus'ların otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri en önemli probiyotik özelliklerden biri olup patojen mikroorganizmaların mukozal yüzeylere kolonizasyonlarına karşı bariyer görevi görmeye olanak sağlamaktadır. Bu bağlanma *Lactobacillus*'ların antimikrobiyal metabolitler sentezlemesine ve koagreg olmuş hücre yüzeyindeki mikroortamın değişmesine katkıda bulunabilmektedir¹²⁶. Bazı LAB, substratları parçalamanın yanında aynı zamanda besin ürünlerinin emilmesine ve bakterilerin insan gastrointestinal sistem (GIS) epitel hücrelerine bağlanmasına yardımcı olan hücre yüzey proteinleri üretebilmektedir. Bu bağlanma olgusu, konakçıdan patojen bakterilerin uzaklaştırılmasında bağışıklık sisteminin düzenlenmesi için gerekli koşulları sağlamaktadır¹⁹⁷.

Otoagregasyon ve koagregasyonun başta *Lactobacillus*'ların vajinal ve GIS yüzeylerine bağlanma ve kolonize olmalarına yardımcı olması, GIS ve diğer yüzeylerin patojen mikroorganizmalara karşı korunması, GIS ve ürogenital sistemde kalma süresinin uzaması ve mikrobiyal dengeyi koruyarak konakçının sağlığını olumlu etkilemek gibi insan sağlığı üzerinde pek çok yararı bulunmaktadır^{88,122,202}.

Çalışmamızda vajinal LAB'nin ortalama %67.9 oranla otoagregasyon özelliği gösterdiği, özellikle L16 suşunun %85.2 gibi oldukça yüksek bir oranda otoagregasyon kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Suşlar tür bazında değerlendirildiğinde ise türler arasında farklılıklar gözlemlendiği gibi tür içinde de farklılıklar göze çarpmaktadır.

Kassaa vd. (2014)¹⁶⁵ sağlıklı Lübnanlı 135 kadının vajinal mikrofloralarından izole ettikleri vajinal *Lactobacillus* suşlarının probiyotik özelliklerini araştırdıkları

çalışmada suşların otoagregasyon özelliklerini de değerlendirmişler ve *L. acidophilus* suşunun %76.2 oranla en yüksek otoagregasyon kapasitesine sahip suş olarak belirlemişlerdir. Bu suşu *L. plantarum* %70.4 oranı ile takip etmiştir. Farklı *L. gasseri* suşlarını ise sırasıyla %62.0, 37.5 ve 31.2 oranlarında otoagregasyon kapasitesine sahip olduklarını bildirmişlerdir. Elde edilen bu sonuçlar çalışma verilerimiz ile benzerlik göstermekte olup, *L. acidophilus* L14 suşunu %70.2 oranında, *L. plantarum* suşlarını %63.6-85.2 arasında değişen oranlarda ve *L. gasseri* L10 suşunu ise %47.2 oranında otoagregasyon kapasitesine sahip olduğunu belirlemiştik. *L. plantarum* suşları arasında görülen bu farklılıklar Collado vd. (2007b)²⁰² tarafından yapılan çalışmada farklı bulunmuş ve *L. plantarum* suşlarının otoagregasyon ve koagregasyon yeteneklerinin suş spesifik olduğu bildirilmiştir.

Ülkemizde yapılan benzer bir çalışmada Eryılmaz'ın 2011 yılında vajinal mikrofloradan izole etmiş olduğu *P. acidilactici* OZV ve *L. brevis* OZV suşlarının 5. saat sonundaki otoagregasyon yüzdesini *P. acidilactici* OZV suşunda %79.49 oranında bulurken *L. brevis* OZV suşunda %78.13 olarak bulduklarını bildirmişlerdir⁴¹. Bu sonuçlar çalışmamızda izole ettiğimiz *P. acidilactici* suşlarının otoagregasyon yüzdeleri ile (ortalama %74.8) benzerdir.

Çalışmamızda en yüksek otoagregasyon kapasitesine (%85.2) *L. plantarum* L16 izolatının sahip bulunması, *L. plantarum* suşlarının hücre yüzeylerine ve N-asetilglukozamin içeren polimerlere bağlanma yeteneğine sahip LysM bölgelerini içermesi olabilir²⁰³. Çalışmamızda farklı otoagregasyon kapasitesine sahip suşların bulunması bunun gibi spesifik bileşiklerin bulunup bulunmaması ile açıklanabilir.

Vajinal LAB'nin *C. albicans* ATCC 10231, *E. coli* ATCC 25922 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 mikroorganizmaları ile koagregasyon özelliklerini araştırdığımız çalışmamızda. LAB'nin *C. albicans* (ortalama %40.15) ve *E. coli* (ortalama %36.9) ile iyi koagregasyon yeteneğine sahip oldukları görülürken *P. aeruginosa* ile koagregasyon yeteneklerinin düşük olduğu belirlenmiştir. Koagregasyon yeteneği en iyi olan suşların L9, L13, L16, L19 ve L21 nolu suşlar olduğu tespit edilmiştir. Tür bazında değerlendirildiğinde ise *L. plantarum* ve *L. rhamnosus*

suşlarının pek çoğunun kontrol suşumuza kıyasla çok iyi koagregasyon özelliği gösterdiği ve en iyi türün *L. plantarum* olduğu belirlenmiştir.

Verdenelli vd. (2014)⁸ beş farklı vajinal *Lactobacillus* suşunun klinik olarak izole edilmiş farklı *Candida* türleri üzerindeki adezyon yeteneklerinin ve antipatojenik aktivitesini araştırdığı çalışmada *Candida* türleri ve *Lactobacillus* türleri arasında *Lactobacillus plantarum* 319 suşunun en yüksek koagregasyon yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir.

Koagregasyon ile patojenler etrafında küçük bir ortam oluşturabilmesi ve yüksek miktarda inhibitör maddeler sentezleyerek patojenlerin yayılımlarını engelleyebilmesi nedeniyle *Lactobacillus* türlerinin *Candida* suşları ile koagregasyonu vajinal maya enfeksiyonlara karşı korunmada oldukça önemlidir⁸. Çalışmamızda da izole edilen suşların pek çoğunun *C. albicans* ile iyi koagregasyonu olduğu, %52.05 oranı ile L5 suşunun en yüksek koagregasyon aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar; L5 suşunun başta olmak üzere çalışmamızda izole edilen pek çok suşun *C. albicans*'ın vajinal invazyon ve adezyonunu engelleyebileceğini ve vajinal *Candida* enfeksiyonuna karşı koruyucu rol üstlenebileceğini göstermektedir.

Gil vd. (2010)¹²⁶ sağlıklı Brezilyalı kadınların vajinal mikrofloralarından izole ettikleri 11 adet vajinal *Lactobacillus* suşlarının farklı *Candida* türleri ile koagregasyon yeteneklerini araştırdıkları çalışmada *L. crispatus* suşunun *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* ve *C. tropicalis* türleri ile yüksek oranda koagregasyon yeteneği gösterdiğini belirlemiştir. Bizim çalışmamızda da benzer olarak *L. crispatus* L5 suşunun %52.05 oranla *C. albicans* ile koagregasyonu olduğu görülmüştür.

Pithva vd. (2014)⁸⁸ bebek dışkılarından ve sağlıklı kadınların vajinal mikrofloralarından izole ettikleri *L. rhamnosus* suşlarının otoagregasyon kapasitesini 24. saatin sonunda %47-87 arasında olduğunu, çalışmada kullanılan *L. rhamnosus* Fb, 231 ve Vc suşlarının koagregasyon yüzdesinde *E. coli* ile sırası ile %36,37 ve 39 ve *C. albicans* ile yine sırası ile %52, 63 ve 52 olduğunu tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Verilen bu sonuçlar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz *L. rhamnosus* L8, L12, L13 ve

L15 suşlarının *C. albicans* ile göstermiş olduğu koagregasyon yüzdeleri (sırası ile %44, 47, 50 ve 46) ve *E. coli* ile göstermiş olduğu koagregasyon yüzdeleri (sırası ile %38, 35, 38 ve 41) ile benzer bulunmuştur.

Potansiyel probiyotik adayların in vitro olarak değerlendirilmesi için FAO (Gıda ve Tarım Organizasyonu / WHO (Dünya Sağlık Organizasyonu) tarafından önemli olarak düşünülen testlerden biri de, müsin ve insan epitel hücrelerine yapışma kapasitesidir²⁰⁴. *Lactobacillus*'ların vajinal epitel hücrelere bağlanması, fırsatçı patojen kolonizasyonunu önlemeye yönelik bir bariyer oluşumundaki ilk adım olarak tanımlanmaktadır. *Lactobacillus*'ların yapışması, vajinal epitelyumda bir bakteri filminin oluşumuna ve patojenlerin vajinal mukozadan çıkarılmasına katkıda bulunabilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda vajinal mikrofloradan izole edilen LAB'nin epitel hücrelere bağlanma kapasitelerinin belirlenmesi amacı ile sağlıklı kadınların idrarından elde edilen üroepitelyal hücreler kullanılmıştır.

Çalışma sonucunda üroepitel hücrelere en iyi bağlanma oranı olan suşlar L9, L16, L19 ve L21 olarak belirlenmiştir. Tür bazında değerlendirildiğinde ise çalışmamızda en iyi bağlanma özelliğine sahip suşun *L. plantarum* suşu olduğu görülürken *P. acidilactici* suşlarının bağlanma oranlarının ise düşük olduğu tespit edilmiştir.

Probiyotikler, sağlık üzerinde yararlı etkileri olan ve farklı terapötik aktivitelere ve anti-karsinogenik özelliklere sahip mikroorganizmalardır. Yapılan çalışmalarda probiyotiklerin göğüs, mesane, kolon, servikal, karaciğer ve mide gibi farklı kanser hücre hatları üzerinde yüksek apoptik ve antiproliferatif etki gösterme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür¹⁶².

Servikal kanser insan papilloma virüsü (HPV) ile ilişkili bir kanser türüdür. HPV enfeksiyonlarının pek çoğu geçici veya aralıklı olarak ve kendiliğinden iyileşebilmektedir. Bu nedenle, *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından kontrol edilen servikal mikroflora, HPV enfeksiyonundan korunma ve enfeksiyon sonrası servikal kanser gelişiminin önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalarda vajinal mikrofloradan izole edilen LAB'nin antitümör etkilerinin

olduğunu ve serviks kanserini önlemesinin olası olduğunu doğrulamaktadır^{150,205}. Bu amaçla çalışmamızda ayrıca vajinal mikrofloradan izole edilen LAB suşlarına ait metabolit sekresyonların HeLa ve Caco-2 kanser hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi araştırılmıştır.

Yapılan literatür çalışmalarında araştırmacıların daha çok probiyotiklerin kolorektal kanser üzerindeki etkinliğine yönelik çalışmalar gerçekleştirdikleri görülmüştür. Biz çalışmamızda; öncelikle vajinal mikrofloradan izole ettiğimiz LAB'nin servikal kanser hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisinin belirlenmesinin ardından, HeLa hücreleri üzerinde antitümör etkinliği olan suşlar daha sonra Caco-2 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkinliği yönünden araştırılmıştır.

Vajinal mikrofloradan izole edilen LAB'nin süpernatantının liyofilizasyonu sonucu elde edilen metabolit ürünlerinin HeLa ve Caco-2 kanser hücre hatları üzerindeki anti proliferatif etkisinde, test edilen metabolitlerin dozunun arttıkça hücreler üzerindeki sitotoksik etkinin arttığı ve hücre hatlarındaki canlılık oranının azaldığı görülmüştür. Çalışma sonucunda bütün suşların HeLa hücre hattı üzerinde belirgin bir antiproliferatif etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Özellikle L1 (LD₅₀: 0,00639 gr/ml), L8 (LD₅₀: 0,008558 gr/ml) L12 (LD₅₀: 0,009768 gr/ml), L13 (LD₅₀: 0,009419 gr/ml) ve L19 (LD₅₀: 0,007 gr/ml) suşlarının anlamlı bir antiproliferatif etki yarattığı gözlemlenmiştir. HeLa hücreleri üzerinde en büyük antiproliferatif etkinin suşlara ait metabolitlerin en yüksek dozlarında %70-95 arasında ölüm oranı görülmüştür.

Çalışmada, HeLa hücre hattı üzerinde anlamlı sitotoksik etki gösteren L1, L6, L8, L12, L13 ve L19 suşlarının Caco-2 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi araştırıldığında ise *L. paracasei* L1 (LD₅₀: 0,0055 gr/ml), L6: *P. acidilacitici* (LD₅₀:0,0056 gr/ml), *L. rhamnosus* L8 (LD₅₀:0,0075gr/ml), *L. rhamnosus* L12 (LD₅₀: 0,0048 gr/ml), *L. rhamnosus* L13 (LD₅₀: 0,0032 gr/ml) ve *L. plantarum* L19 (LD₅₀: 0,0014 gr/ml) suşlarının Caco-2 üzerinde önemli bir sitotoksik etki yarattığı gözlemlenmiştir. Caco-2 hücreleri üzerinde en büyük antiproliferatif etkinin suşlara ait metabolitlerin en yüksek dozlarında %75-95 arasında ölüm oranı görülmüştür.

Vajinal LAB'nin HeLa ve Caco-2 kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği çalışma sonucunda, Caco-2 hücre hattı üzerinde LD₅₀ değerlerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Bu düşüş seçilen vajinal izolatların HeLa hücre hattına göre Caco-2 hücre hattı üzerinde daha etkili olduğunun kanıtıdır. Sonuç olarak seçilen izolatların kolorektal kanser üzerindeki antikanser etkinliği servikal kansere göre daha yüksek bulunmuştur.

Vajinal mikrofloradan izole edilen suşların kullanıldığı çalışmalara baktığımızda Motevaseli vd. (2013)²⁰⁵ vajinal kökenli *L. gasseri* ve *L. crispatus* suşlarının normal servikal hücrelerde ve HeLa hücrelerindeki antitümör etkisini araştırdığı çalışmada vajinal *Lactobacillus*'ların servikal tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği, normal hücrelerde hiçbir değişiklik gözlenmediği belirtilmiştir.

Nami vd. (2014a)¹⁵⁹ sağlıklı İran kadınlarının vajinal mikroflorasından izole ettikleri *L. acidophilus* 36YL suşunun AGS, HeLa, MCF-7, HT-29 ve normal hücre olan HUVEC hücre hatlarından oluşan dört farklı karsinom hücre lizatları üzerindeki anti-kanser aktivitesini zaman ve doza bağımlılığını belirledikleri çalışmada *L. acidophilus* 36YL suşunun hücre süpernatantının liyofilizasyonunu kullanmışlardır. *L. acidophilus* 36YL suşunun hücre hatları üzerinde en yüksek metabolit dozunun uygulandığı çalışmada 24 saat inkübasyonun ardından HT-29, HeLa, MCF-7 ve AGS hücre hatlarında görülen canlı hücre sayısını sıra ile %14, %21, %33 ve %43 olarak tespit etmişlerdir.

Kaewnopparat vd. (2013)¹⁶³ sağlıklı kadınların vajinal mikrofloralarından izole ettikleri *L. fermentum* SK5 suşunun probiyotik özelliklerinin ve HeLa, HT-29 ve Caco-2 hücrelerine bağlanma mekanizmalarının araştırıldığı bir başka çalışmada ise *L. fermentum* SK5 suşunun HeLa, HT-29 ve Caco-2 hücrelerine sırasıyla % 92, 93 ve 93 oranlarında bağlanarak hücrelerin gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Çalışmamızda benzer olarak L1 suşunun HeLa hücreleri üzerinde en büyük antiproliferatif etkinin

metabolitin 0.16 gr/ml'lik en yüksek dozunda %90-95 düzeyinde ölüm oranı gözlemlenirken canlı hücre sayısının %5-10 arasında olduğu görülmüştür.

Thirabunyanon ve Hongwittayakorn (2013)²⁰⁶ bebek gaitalarından izole ettikleri *P. pentosaceus* FP3, *L.salivarius* FP25, *L. salivarius*, FP35 ve *E. faecium* FP51 suşlarının kolon kanseri üzerindeki antiproliferatif etkilerinin araştırdıkları çalışmada hücre canlılık oranlarını %17-35 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da seçilen vajinal izolatların HeLa ve Caco-2 hücre hatları üzerindeki hücre canlılık oranları %5-25 arasında tespit edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ışığında, izole edilen suşların pek çoğunun probiyotik potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Özellikle *L. plantarum* L9 ve L16 suşlarının GIS koşullarında hayatta kalmak için iyi bir kabiliyete sahip olduğu, asit ve safra direnciyle ilgili en iyi özellikleri taşımalarının yanında, iyi bir antagonistik aktivite gösterdiği, çoğu antibiyotiğe karşı dirençlilik spektrumu geliştirdiği ve ayrıca yüksek otoagregasyon ve koagregasyon aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Analiz edilen bazı suşların, tek başına veya diğer *Lactobacillus* suşları ile birlikte oral ya da vajinal preparasyonların (ovul ya da antiseptik su) üretiminde kullanılabilir olası adaylar olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, bu çalışma sayesinde, ürogenital sağlığın iyileştirilmesi ve sürdürülmesine yardımcı olmak ve vajinal enfeksiyonların neden olduğu klinik belirtileri ve semptomları azaltmak için etkili probiyotik özelliklere sahip *Lactobacillus* suşlarının bir karışımını içeren yeni bir probiyotik preparasyon tasarlamak mümkün olabilecektir.

Çalışmamızda izole edilen LAB'i arasından L1, L8, L12, L13 ve L19 suşlarına ait çeşitli metabolit ürünlerin servikal ve kolorektal kanser üzerinde antikanser aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar LAB metabolitlerinin ileride yapılacak olan kapsamlı klinik çalışmaların ardından kanserli hücreleri yok etmek ya da kanserden korunmak amacı ile kullanılabilir olası adaylar olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Suşların oral, vajinal, kuru toz veya süspansiyon olarak kullanımının klinik olarak iyi karakterize edilmesi ve test edilmesi kritik önem taşımaktadır. Bu nedenle probiyotiklerin vajinadaki etki mekanizmaları, savunma özelliklerini aydınlatmak ve sonrasında probiyotiklerin uygulanabilirliği açısından doğru formülasyonları geliştirmek için çok sayıda hasta içeren daha fazla klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır, ancak daha önce yapılan çeşitli klinik çalışmalar potansiyel probiyotik suşların kullanımı ile birçok kadının vajinal sağlığının korunabileceğini ve iyileştirilebileceğini göstermektedir.



6. KAYNAKLAR

1. Borges, S.; Silva, J.; Teixeira, P. *The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health*, *Arch Gynecol Obstet*, **2014**, 289, 479–489.
2. Mardh, P. A. *The vaginal ecosystem*, *Am J Obstet Gynecol*, **1991**, 165, 1163-1178.
3. Bolton, M.; Van Der Straten, A.; Cohen, C. *Probiotics: potential to prevent HIV and sexually transmitted infections in women*, *Sex Transm Dis*, **2008**, 35, 214–225.
4. Donati, L.; Vico, A. D.; Nucci, M.; Quagliozi, L.; Spagnuolo, T.; Labianca, A.; Bracaglia, M.; Ianniello, F.; Caruso, A., Paradisi, G. *Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy*, *Arch Gynecol Obstet*, **2010**, 281, 589–600.
5. Ebrahimi, S. *Ülkemizde Geleneksel Yöntemler İle Üretilen Peynir Çeşitlerinde Lactobacillus Cinsi Bakterilerin Starter Özelliklerinin Araştırılması*, Gazi Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, **2013**.
6. Stoyancheva, G.; Marzotto, M.; Dellaglio, F.; Torriani, S. *Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal Lactobacillus strains*, *Arch Microbiol*, **2014**, 196, 645-653.
7. Kıray, E.; Kariptas, E. *Probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotiklerin kolorektal kanser ilişkisi*, *Elek. Mik. Dergisi TR*, **2015**, 13, 28-46.
8. Verdenelli, M. C.; Coman, M. M.; Cecchini, C.; Silvi, S.; Orpianesi, C.; Cresci, A. *Evaluation of antipathogenic activity and adherence properties of human Lactobacillus strains for vaginal formulations*, *J Appl Microbiol*, **2014**, 116 (5), 1297-1307.
9. Önal, D.; Beyatlı, Y.; Aslım, B. *Probiyotik Bakterilerin Epitel Yüzeylere Yapışması*, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **2005**, 03, 1-10.
10. Shewale, R. N.; Sawale, P. D; Khedkar, C. D.; Singh, A. *Selection Criteria For Probiotics: A Review International Journal of Probiotics and Prebiotics*, **2014**, Vol (9).
11. Desai, A. *Strain Identification, Viability And Probiotics Properties Of Lactobacillus Casei*, PhD Thesis Victoria University, Victoria, Australia, **2008**, 228.
12. Homayouni, A.; Bastani, P.; Ziyadi, S.; Mohammad-Alizadeh-Charandabi, S.; Ghalibaf, M.; Mortazavian, A. M.; Mehrabany, E. V. *Effects of probiotics on the recurrence of bacterial vaginosis: a review*, *J Low Genit Tract Dis*, **2014**, 8 (1), 79-86.

13. Czaja, C. A.; Stapleton, A. E.; Yarova-Yarovaya, Y.; Stamm, W. E. *Phase I trial of a Lactobacillus crispatus vaginal suppository for prevention of recurrent urinary tract infection in women, Infect Dis Obstet Gynecol*, **2007**, 35387.
14. Caretto, M.; Giannini, A.; Russo, E.; Simoncini, T. *Preventing urinary tract infections after menopause without antibiotics, Maturitas*, **2017**, 99, 43-46.
15. Aragón, I. M.; Herrera-Imbroda, B.; Queipo-Ortuño, M. I.; Castillo, E.; Del Moral, J. S.; Gómez-Millán, J.; Yucel, G.; Lara, M. F. *The Urinary Tract Microbiome in Health and Disease. Eur Urol Focus*. **2016**, 16, 30159-30166.
16. Döderlein, A. *Shift Das Scheidensekret und seine Bedeutung für Puerperalheber. ZbL Bald*. **1892**, 11, 699.
17. Hillier, S. L.; Marrazzo, J. M.; Holmes, K. K. Bacterial vaginosis. In: Holmes, KK.; Sparling, PF.; Mardh, PA., et al., editors. *Sexually Transmitted Diseases*. New York, NY: McGraw-Hill; **2008**.
18. Rogosa, B. Y. M. *Species Differentiation of Human Vaginal Lactobacilli, J. Gen. Microbiol*, **1960**, 23, 197-201.
19. Lepargneur, J. P.; Rousseau, V. *Protective role of the Doderlein flora, J Gynecol Obstet Biol Reprod*, **2002**, 31 (5), 485-494.
20. Rogosa, BY. M. *Species Differentiation of Human Vaginal Lactobacilli, J. Gen Microbiol*, **1960**, 23, 197-201.
21. Krönig, I. *Über die Natur der Scheidenkeime, speciell über das vorkommen anaërober Streptokokken im Scheidensekret Schwangerer, Zentralbl Gynäkol*, **1898**, 16, 409-412.
22. Eriksson, K. *Bacterial Vaginosis Diagnosis, Prevalence, and Treatment*. Linköping University Medical Dissertations, Linköping, Phd Thesis, **2011**, 4-9.
23. Menge, C.; Kronig, B. *Bakteriologie des weiblichen genitalkanales, Monatschr Geburtsh*, **1899**, 9, 703.
24. Curtis, A. H. *A motile curved anaerobic bacillus in uterine discharges, J Infect Dis*, **1913**, 12, 165-169.
25. Curtis A. H. *On the etiology and bacteriology of leucorrhoea, Surg Gynecol Obstet*, **1914**; 18, 187-195.
26. David, H.; Martin, M. D. *The Microbiota of the Vagina and Its Influence on Women's Health and Disease, Am J Med Sci*, **2012**, 343 (1), 2-9.

27. Schroder, R. *Zur pathogenese and klinik des vaginalen fluors*, *Zentralb Gynakol*, **1921**, 38.
28. Gardner, H. L.; Dukes, C. D. *Haemophilus vaginalis vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis*, *Amer J Obstet and Gyn*, **1955**, 69, 962–976.
29. Mikamo, H.; Sato, Y.; Hayasaki, Y.; Hua, Y. X.; Tamaya, T. *Vaginal microflora in healthy women with Gardnerella vaginalis*, *J Infect Chemother*, **2000**, 6 (3), 173-177.
30. Greenwood, J. R.; Pickett, M. J. *Salient features of Haemophilus vaginalis*, *J Clin Microbiol*, **1979**, 9 (2), 200-204.
31. Vural, Z. T. *Vajinal akıntı şikayeti ile başvuran olgularda bakteriyel vajinozis sıklığının saptanması, tanıda kullanılan amsel kriterlerinin sensitivite spesifisitelerinin belirlenmesi ve bakteriyel vajinozis için risk faktörlerinin değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, İstanbul Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, **2009**.
32. Durieux, R.; Dublanchet, A. *Les “vibrions” anakrobies des leucorrhées I, Technique d’isolement et sensibilité aux antibiotiques. Médecine et Maladies Infectieuses*, **1980**, 10, 109- 115.
33. Spiegel, C. A.; Amsel, R.; Eschenbach, D. A. *Anaerobic bacteria in nonspecific Vaginitis*, *N Engl J Med*, **1980**, 303, 601-607.
34. Eschenbach, D. A. *History and review of bacterial vaginosis*. *Am J Obstet Gynecol*, **1993**, 169 (2), 441-445.
35. Donati, L.; Vico, A. D.; Nucci, M.; Quagliozzi, L.; Spagnuolo, T.; Labianca, A.; Bracaglia, M.; Ianniello, F.; Caruso, A., Paradisi, G. *Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy*, *Arch Gynecol Obstet*, **2010**, 281, 589–600.
36. García-Velasco, J. A.; Menabrito, M.; Catalán, I. B. *What fertility specialists should know about the vaginal microbiome: a review*, *Reprod Biomed Online*, **2017**, 35 (1), 103-112.
37. Cribby, S.; Taylor, M.; Reid, G. *Vaginal microbiota and the use of probiotics*, *Interdiscip Perspect Infect Dis*, **2008**, 256490.
38. Hickey, R. J.; Zhou, X.; Pierson, J. D.; Ravel, J.; Forney, L. J. *Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective*, *Transl Res*, **2012**, 160, 267–282.
39. Ravel, J.; Gajer, P.; Abdo, Z.; Schneider, G. M.; Koenig, S. S. K.; McCulle, S. L.; Karlebach, S.; Gorle, R.; Russell, J.; Tacket, C. O.; Brotman, R. M.; Davis,

- C. C.; Ault, K.; Peralta, L.; Forney, L. J. *Vaginal microbiome of reproductive-age women*, *PNAS*, **2011**, *108*, 4680–4687.
40. Jin, L.; Tao, L.; Pavlova, S. I.; So, J. S.; Kiwanuka, N.; Namukwaya, Z.; Saberbein, B. A.; Wawer, M. *Species diversity and relative abundance of vaginal lactic acid bacteria from women in Uganda and Korea*, *J Appl Microbiol*, **2007**, *102*, 1107–1115.
41. Eryılmaz, F. T. *Vajinal Sekresyondan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerine Ait Bazı Suşların Potansiyel Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi*, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, **2011**.
42. Schwebke, J. R. *Role of vaginal flora as a barrier to HIV acquisition*, *Curr Infect Dis Rep*, **2001**, *3*, 152–155.
43. Yıldırım, R. *18 Yaş Üstü Kadınlarda Vajinal Duşun Kadın Sağlığına Ve Vajen Florasına Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, **2011**.
44. Lopez, R. V.; Cook, L. R.; Sobel, D. J. *Emerging Role of Lactobacilli in The Control and Maintenance of The Vaginal Bacterial Microflora*, *Rev. Infect. Dis*, **1990**, *12* (5), 856- 872.
45. Reid, G.; Bocking, A. *The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor*, *Am J Obstet Gynecol*, **2003**, *189*, 1202–1208.
46. Olsen, P.G. *The Impact of Oral Probiotics on Vaginal Group B Streptococcal Colonisation Rates in Pregnant Women: A Pilot Randomised Control Study*, University of Wollongong, PhD Thesis, **2015**.
47. Bitew, A.; Abebaw, Y.; Bekele, D.; Mihret, A. *Prevalence of Bacterial Vaginosis and Associated Risk Factors among Women Complaining of Genital Tract Infection*, *Int J Microbiol*, **2017**, 4919404.
48. Falagas, M. E.; Betsi, G. I.; Athanasiou, S. *Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis*, *Clin Microbiol Infect*, **2007**, *13*, 657–664.
49. Charlier, C.; Cretenet, M.; Even, S.; Le Loir, Y. *Interactions between Staphylococcus aureus and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives*, *Int J Food Microbiol*, **2009**, *131*, 30–39.
50. Makarova, K.; Slesarev, A.; Wolf, Y.; Sorokin, A.; Mirkin, B.; Koonin, E.; Pavlov, A.; Pavlova, N.; et al. *Comparative genomics of the lactic acid bacteria*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2006**, *103* (42), 15611–15616.
51. Dinçer, E.; Kıvanç, M.; Karaca, H. *Biyokoruyucu Olarak Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosinler*, *Gıda*, **2009**, *3*, 26-34.

52. Evren, M.; Apan, M.; Tutkun, E.; Evren, S. *Geleneksel Fermente Gıdalarda Bulunan Laktik Asit Bakterileri, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, **2011**, 09, 11-17.
53. Yüksekdağ, Z. N.; Beyatlı, Y. *Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Fizyolojik, Biyokimyasal, Plazmit DNA ve Protein Profil Özelliklerinin İncelenmesi, GIDA*, **2009**, 34 (2), 91-98.
54. Esil, H. *Vajen Kaynaklı Lactobacillus Spp.'nin Ekzopolisakkarit (Eps) Üretimlerinin Antibiyotik Dirençliliğine ve Epitel Hücre Yüzeylerine Yapışmadaki Etkisi*, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, **2007**.
55. Yılmaz R.; Temiz A. *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus ve Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus 'un Klasik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanımlanması ve Karakterizasyonu*, Ortaokul On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, **2003**, 01, 19-42.
56. Kılıç, S. *Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri*, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:542, 1. Baskı, İzmir, **2001**.
57. Nessler, S. *Crystallization of D-lactate dehydrogenase from Lactobacillus bulgaricus*, *J. Mol. Biol*, **1994**, 7, (235), 370-371.
58. Zoral, S. *İnsan Kaynaklı Lactobacillus spp. Suşlarının Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ahi Evran Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir, **2013**.
59. Mousavi, E.; Makvandi, M.; Teimoori, A.; Ataei, A.; Ghafari, S.; Najafian, M.; Ourang, Z.; Samarbaf-Zadeh, A. *In vitro adherence of Lactobacillus strains isolated from the vaginas of healthy Iranian women*, *J Chin Med Assoc*, **2016**, 79 (12), 665-671.
60. Arda, M. *Genel Bakteriyoloji*, A. U. Vet. Fak.,Yayın no: 402, (3. Baskı), Ankara, **1985**.
61. Sneath, P. H. A.; Mair, N. S.; Sharpe, M. E.; Holt, J.G. *Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology*, Williams&Wilkins, London, **1986**.
62. De Bartolomeo, A.; Trotta, F.; La Rosa, F.; Saltalamacchia, G.; Mastrandrea, V. *Numerical analysis and DNA base compositions of some thermophilic Bacillus species*, *Int J Syst Bacteriol*, **1991**, 41 (4), 502-509.
63. Ambrosini, V. M.; Gonzales, S.; Holgado, A. P. R.; Oliver, G. *Study of the morphology of the cell walls of some strains of lactic acid bacteria and related species*, *J. Food Prot*, **1998**, 61 (5), 557-562.

64. Zammaretti, P. S.; Ubbink, J. *The Cell Wall of Lactic Acid Bacteria: Surface Constituents and Macromolecular Conformations*. *Biophysical Journal*, **2003**, 85, 4076-4092.
65. Stojanovic, N.; Plecas, D.; Plesinac, S. *Normal vaginal flora, disorders and application of probiotics in pregnancy*, *Arch Gynecol Obstet*, **2012**, 286, 325-332.
66. Koumans, E. H.; Sternberg, M.; Bruce, C.; McQuillan, G.; Kendrick, J.; Sutton, M. *The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001–2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health*, *Sex Trans Dis*, **2007**, 34 (11), 864–869.
67. Vergin, F. *Antibiotics and probiotics*, *Hippokrates*, **1954**, 25, 116-119.
68. Malago, J. J.; Koninkx, J. FJ. G.; Marinsek-Logar, R. *Probiotic bacteria and enteric infections*, Springer, **2011**.
69. Parker, R. B. *The other half of antibiotic story*, *Anim. Nut. Health*, **1974**, 29, 4-8.
70. Fuller, R. *Probiotics in man and animals*, *J. Appl. Bacteriol*, **1989**, 66, 365-378.
71. Göktepe, I.; Juneja, K. V.; Ahmedna, M. *Probiotics in Food Safety and Human Health*, Published in by CRC Press Taylor & Francis Group ABD. **2006**.
72. Demirok, N. T. *Bebeklerden İzole Edilen Lactobacillus spp. 'nin Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, **2014**.
73. Ceyhan, N.; Aliç, H. *Barsak Mikroflorası ve Probiyotikler*, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, **2012**, 5 (1), 107-113.
74. Ewaschuk, J. B.; Dieleman, L.A. *Probiotics and prebiotic synchronous inflammatory bowel disease*, *World J Gastroenterol*, **2006**, 12 (37), 5941-5950.
75. Bruzzese, E.; Volpicelli, M.; Squaglia, M., Tartaglione, A.; Guarino, A. *Impact of prebiotics on human health*, *DigLiverDis*, **2006**, 38 (2), 283-287.
76. Grimoud, J.; Durand, H.; De Souza, S.; Monsan, P.; Ouarné, F.; Theodorou, V.; Roques, C. *In vitro screening of probiotics and synbiotics according to antiinflammatory and anti-proliferative effects*, *Int J Food Microbiol*, **2010**, 144 (1), 42-50.
77. Gülmez, M.; Güven, A. *Probiyotik, Prebiyotik ve Sinbiyotikler*, *Kafkas Üniv.Vet. Fak. Derg*, **2002**, 8 (1), 83-89.

78. Harzallah, D.; Belhadj, H. *Lactic Acid Bacteria – R & D For Food, Health And Livestock Purposes*, Chapter 8, **2013**, 197-2016.
79. Helander, I. M.; Von, Wright, A.; Mattila-Sandholm, T. M. *Potential of Lactic Acid Bacteria and Noval Antimicrobials Against Gram-Negative Bacteria*, *Trends Food Sci*, **1997**, 8, 146-150.
80. Isolauri, E. *The role of probiotics in paediatrics*, *Current Paediatrics*, **2004**, 14, 104–109.
81. Singh, V. P.; Sharma, J.; S. Babu.; Singla A. *Role of probiotics in health and disease: A review*, *J Pak Med Assoc*, **2013**, 253-257.
82. Yağcı, R. V. *Sağlıkta ve Hastalıkta probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotikler. Sağlıklı kalmak için probiyotikler, prebiyotikler*, Editör, M. Özen. 2. Baskı, **2015**.
83. Tulumoğlu, Ş.; Kaya, H. İ.; Şimşek, Ö. *Probiotic characteristics of Lactobacillus fermentum strains isolated from tulum cheese*, *Anaerobe*, **2014**, 30, 120-125.
84. Kara, A.; Özkaya, A. Ö. *Probiyotiklerin anti-efektif özellikleri, Sağlıklı kalmak için prebiyotikler, prebiyotikler*, Editör, M. Özen. 2. Baskı, **2015**, 43-51.
85. Uymaz, B. *Probiyotik Özellik Tasiyan Gıda Ve İnsan Kaynaklı Laktobasillerin İzolasyonu Tanımlanması ve Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, **2009**.
86. Begley, M.; Hill, C.; Gahan, C. G. M. *Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics*, *Applied And Environmental Microbiology*, **2006**, 1729–1738.
87. Dunne, C.; O'Mahony, L.; Murphy, L.; Thornton, G.; Morrissey, D.; O'Halloran, S.; Feeney, M.; Flynn, S.; Fitzgerald, G.; Daly, C.; Kiely, B.; C O'Sullivan, G.; Shanahan, F.; Collins, J. K. *In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings*, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **2001**, 73, 386-392.
88. Pithva, S.; Shekh, S.; Dave, J.; Rajiv, B.; Vyas, M. *Probiotic Attributes of Autochthonous Lactobacillus rhamnosus Strains of Human Origin*, *Appl Biochem Biotechnol*, **2014**, 173, 259–277.
89. Kılıç, E.; Aslım, B. *Laktik Asit Bakterilerinin Vajen Florasındaki Önemi ve Probiyotik Olarak Kullanımı*, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **2003**, 01 (2), 70-82.

90. Tachedjian, G.; Aldunate, M.; Bradshaw, C. S.; Cone, R. A. *The role of lactic acid production by probiotic Lactobacillus species in vaginal health*, *Res Microbiol*, **2017**, (17), 30083-30089.
91. Klaenhammer, T. R.; Kullen, M. J. *Selection and design of probiotics*, *Int J Food Microbiol*, **1999**, 15, 50 (1-2), 45-57.
92. Klebanoff, S. J.; Hillier, S. L.; Eschenbach, D. A.; Waltersdorff, A. M. *Control of The Microbial Flora of The Vagina by H₂O₂-Generating Lactobacilli*, *J. Infect. Dis*, **1991a**, 164, 94-100.
93. Klebanoff, S. J.; Coombs, R. W. *Viricidal effect of Lactobacillus acidophilus on human immunodeficiency virus type 1: possible role in heterosexual transmission*, *J Exp Med*, **1991b**, 174, 289-292.
94. Aroutcheva, A.; Gariti, D.; Simon, M.; Shott, S.; Faro, J.; Simoes, J. A.; Gurguis, A.; Faro, S. *Defense factors of vaginal lactobacilli*. *Am J Obstet Gynecol*, **2001**, 185, 375-379.
95. Ocaña, V. S.; Pesce de Ruiz Holgado, A. A.; Nader-Macias, M. E. *Selection of vaginal H₂O₂-generating Lactobacillus species for probiotic use*, *Curr Microbiol*. **1999**, 38 (5), 279-284.
96. Pashaian, M. M. Oganessian, G. G. *Isolation and characterization of vaginal lactobacilli producing hydrogen peroxide*, *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, **2011**, (6), 90-93.
97. Wasiela, M.; Misiak, G.; Pieczara, A.; Kalinka, J. *Association between hydrogen peroxide Lactobacillus species and bacterial vaginosis-related bacteria in vaginal fluid of pregnant women*, *Arch Perinatol Med*, **2008**, 14, 23-27.
98. Kim, Y. H.; Kim, C. H.; Cho, M. K.; Na, J. H.; Song, T. B.; Oh, J. S. *Hydrogen peroxide-producing lactobacilli in the vaginal flora of pregnant women with preterm labor with intact membranes*, *Int J Gynaecol Obstet*, **2006**, 93, 22-27.
99. Toy, N. *Laktik Asit Bakterileri Serbest Hücre Ekstraktlarının Patojen Bakterilerin Gelişimine Ve Biyojenik Amin Üretimine Etkisinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi-Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2010**.
100. Ruíz, F. O.; Gerbaldo, G.; García, M. J.; Giordano, W.; Pascual, L.; Barberis, I. L. *Synergistic effect between two bacteriocin-like inhibitory substances produced by Lactobacilli Strains with inhibitory activity for Streptococcus agalactiae*, *Curr Microbiol*, **2012**, 64 (4), 349-356.

101. Ruíz, F. O.; Pascual, L.; Giordano, W.; Barberis, L. *Bacteriocins and other bioactive substances of probiotic lactobacilli as biological weapons against Neisseria gonorrhoeae*, *Pathog Dis*, **2015**, 73 (3), 13.
102. Kurt, Ş.; Zorba, Ö. *Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları*, *YYÜ Vet Fak Derg*, **2005**, 16 (1), 77-83.
103. Montalbán-López, M.; Sánchez-Hidalgo, M.; Valdivia, E. *Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials*, *Curr Pharm Biotechnol*, **2011**, 12, 1205–1220.
104. Benmechernene, Z.; Fernandez-No, I.; Kihal, M. *Recent patents on bacteriocins: food and biomedical applications*, *Recent Pat DNA Gene Seq*, **2013**, 7, 66–73.
105. Drider, D.; Bendali, F.; Naghmouchi, K.; Chikindas, M. L. *Bacteriocins: Not Only Antibacterial Agents*, *Probiotics & Antimicro. Prot*, **2016**, 8, 177–182.
106. Gülgör, G.; Özçelik, F. *Bakteriyosin Üreten Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Amaçlı Kullanımı*, *Akademik Gıda*, **2014**, 12 (1), 63-68.
107. Das, D.; Goyal, A. *Characterization of a noncytotoxic bacteriocin from probiotic Lactobacillus plantarum DM5 with potential as a food preservative*, *Food Funct*, **2014**, 5, 2453–2462.
108. Perez, R. H.; Zendo, T.; Sonomoto, K. *Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications*, *Microb Cell Fact*, **2014**, 29 (13) 3.
109. Trivedi, D.; Jena, P. K.; Seshadri, S.; Colicin, E. *Expression in Lactobacillus brevis DT24, A Vaginal Probiotic Isolate, against Uropathogenic Escherichia coli*, *ISRN Urol*, **2014**, 4, 7.
110. Vera Pingitore, E.; Hebert, E. M.; Nader-Macías, M. E.; Sesma, F. *Characterization of salivaricin CRL 1328, a two-peptide bacteriocin produced by Lactobacillus salivarius CRL 1328 isolated from the human vagina*, *Res Microbiol*, **2009**, 160, 401-408.
111. Mathur, H.; Rea, M. C.; Cotter, P. D.; Hill, C.; Ross, R. P. *The efficacy of thuricin CD, tigecycline, vancomycin, teicoplanin, rifampicin and nitazoxanide, independently and in paired combinations against Clostridium difficile biofilms and planktonic cells*, *Gut Pathog*, **2016**, 8, 20.
112. Field, D.; O'Connor, R.; Cotter, P. D.; Ross, R. P.; Hill, C. *In vitro activities of nisin and nisin derivatives alone and in combination with antibiotics against Staphylococcus biofilms*, *Front Microbiol*, **2016**, 18, 508.

113. Lebel, G.; Piche, F.; Frenette, M.; Gottschalk, M.; Grenier, D. *Antimicrobial activity of nisin against the swine pathogen Streptococcus suis and its synergistic interaction with antibiotics*, *Peptides*, **2013**, 50, 19–23.
114. Naghmouchi, K.; Baah, J.; Hober, D.; Jouy, E.; Rubrecht, C.; Sane, F.; Drider, D. *Synergistic effect between colistin and bacteriocins in controlling Gram-negative pathogens and their potential to reduce antibiotic toxicity in mammalian epithelial cells*, *Antimicrob Agents Chemother*, **2013**, 57, 2719–2725.
115. Andreu, A. *Lactobacillus as a Probiotic for Preventing Urogenital Infections*, *Reviews in Medical Microbiology*, **2004**, 15, 1-6.
116. Coudeyras, S.; Jugie, G.; Vermerie, M.; Forestier, C. *Adhesion of human probiotic Lactobacillus rhamnosus to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis-associated pathogens*, *Infect Dis Obstet Gynecol*, **2008**, 549640.
117. Za'rate, G., Nader-Macias, M. E. *Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells*, *Lett Appl Microbiol*, **2006**, 43, 174-180.
118. Collado, M. C.; Meriluoto, J.; Salminen, S. *Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: in vitro evaluation of different methods*, *J. Microbiol Methods*, **2007a**, 71 (1), 71-74.
119. Tuomola, E. M.; Ouwehand, A. C.; Salminen, S. J. *The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogensto human intestinal mucus*, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **1999**, 26, 137-142.
120. Boris, S.; Suárez, J. E.; Vázquez, F.; Barbés, C. *Adherence of Human Vaginal Lactobacilli to Vaginal Epithelial Cells and Interaction with Uropathogens*, *Infection and Immunity*, **1998**, 66 (5), 1985- 1989.
121. Kocatürk, U. *Açıklamalı Tıp Terimleri Sözlüğü*, A. Ü. Basımevi, Ankara, **1991**, 28.
122. Pascual, L. M.; Daniele, M.B.; Ruiz, F.; Giordano, W.; Pajaro, C.; Barberis, L. *Lactobasillus rhamnosus L60, a Potential Probiotic Isolated From The Human Vagina*, *J. Gen. Appl. Microbial*, **2008**, 54, 141-148.
123. Reid, G.; Bruce, A. W.; McGroarty, J. A.; Cheng, K. J.; Costerton, J. W. *Is There a Role for Lactobacilli in Prevention of Urogenital and Intestinal Infection*, *Clinical Microbiological Reviews*, **1990**, 3, 335-344.
124. Kos, B.; Susković, J.; Vuković, S.; Simpraga, M.; Frece, J.; Matosić, S. *Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92*, *J Appl Microbiol*, **2003**, 94 (6), 981-987.

- 125.Chassot, F.;Camacho, D. P.;Patussi, E. V.; Donatti, L.; Svidzinski, T. I.; Consolaro, M. E. *Can Lactobacillus acidophilus influence the adhesion capacity of Candida albicans on the combined contraceptive vaginal ring?*, *Contraception*, **2010**, 81 (4), 331-335.
- 126.Gil, N. F.; Martinez, R. C.; Gomes, B. C.; Nomizo, A.; De Martinis, E. C. *Vaginal Lactobacilli As Potential Probiotics Against Candida spp.*, *Brazilian Journal of Microbiology*, **2010**, 41, 6-14.
- 127.Tok, E. *Probiyotik Olarak Kullanilabilecek Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Kolesterol Giderimi Özellikleri ve Safra Tuzu Dekonjugasyonu Etkilerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi-Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2007**.
- 128.Pan, D. D.; Zeng, X. Q.; Yan, Y. T. *Characterisation of Lactobacillus fermentum SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects*, *J Sci Food Agric*, **2011**, 91 (3), 12-18.
- 129.Ichim, T. E.; Patel, A. N.; Shafer, K. A. *Experimental support for the effects of a probiotic/digestive enzyme supplement on serum cholesterol concentrations and the intestinal microbiome*, *J Transl Med*, **2016**, 22, 14 (1), 184.
- 130.Thushara, R. M.; Gangadaran, S.; Solati, Z.; Moghadasian, M. H. *Cardiovascular benefits of probiotics: a review of experimental and clinical studies*, *Food Funct*, **2016**, 7 (2), 632-642.
- 131.Rossi, E. A.; Vendramini, R. C.; Carlos, I. Z.; Pei, Y. C.; DeValdez, G. F. *Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties*, *Eur. Food Res. Technol*, **1999**, 209, 305-307.
- 132.Tomaro-Duchesneau, C.; Saha, S.; Malhotra, M.; Jones, M. L.; Rodes, L.; Prakash, S. *Lactobacillus fermentum NCIMB 5221 and NCIMB 2797 as cholesterol-lowering probiotic biotherapeutics: in vitro analysis*, *Benef Microbes*, **2015**, 6 (6), 861-869.
- 133.Vaughan, E. E.; Mollet, B.; de Vos, W. M. *Functionally of probiotics and in testinal tract tunnel*, *Food Biotechnology*, **1999**, 10, 505-510.
- 134.Pereira, D. I.; Gibson, G. R. *Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans*, *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **2002**, 37 (4) 259–81.
- 135.Watson, R. R.; Preedy, V.R. *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion* Editör: Ronald Ross Watson, Elseiver, London, **2016**.

136. Reid, J. N.; Bisanz, J. E.; Monachese, M.; Burton, J. P.; Reid, G. *The rationale for probiotics improving reproductive health and pregnancy outcome. Am J Reprod Immunol*, **2013**, 69 (6), 558-566.
137. Davar, R.; Nokhostin, F.; Eftekhari, M.; Sekhvat, L.; Bashiri Zadeh, M.; Shamsi, F. *Comparing the Recurrence of Vulvovaginal Candidiasis in Patients Undergoing Prophylactic Treatment with Probiotic and Placebo During the 6 Months, Probiotics Antimicrob Proteins*, **2016**, 8 (3), 130-3.
138. Parent, D.; Bossens, M.; Bayot, D.; Kirkpatrick, C.; Graf, F. *Therapy of bacterial vaginosis using exogenously-applied Lactobacillus aciophili and a low dose of estriol: a placebocontrolled multicentric clinical trial. Arzneimitell Forschung*, **1996**, 46, 68-73.
139. Mohanty, S.; Sood, S.; Kapil, A.; Mittal, S. *Interobserver variation in the interpretation of Nugent scoring method for diagnosis of bacterial vaginosis, Indian J. Med Res*, **2010**, 131, 88-91.
140. Lamont, R. F.; Sobel, J. D.; Akins, R. A.; Hassan, S. S.; Charworapongsa, T.; Kusanovic, J. P.; Romero, R. *The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques BJOG*, **2011**, 118, 533-549.
141. Bodean, O.; Munteanu, O.; Cirstoiu, C.; Secara, D.; Cirstoiu, M. *Probiotics-a helpful additional therapy for bacterial vaginosis. J Med Life*, **2013**, 6 (4), 434-436.
142. Toma's, M.S. J.; Duhart, C.I.S.; De Gregorio, P. R.; Pingitore, E. V.; Nader-Macías, M.E. *Urogenital pathogen inhibition and compatibility between vaginal Lactobacillus strains to be considered as probiotic candidates, European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **2011**, 159, 399-406.
143. Parma, M.; StellaVanni, V.; Bertini, M.; Candiani, M. *Probiotics in the prevention of recurrences of bacterial vaginosis, Altern Ther Health Med*, **2014**, 20 (1), 52-57.
144. Reid, G. *Probiotics and prebiotics progress and challenges, Int Dairy J*, **2008**, 18, 969-975.
145. Garg, S.; Goldman, D.; Krumme, M.; Rohan, L. C.; Smoot, S.; Friend, D. R. *Advances in development, scale-up and manufacturing of microbicide gels, films, and tablets, Antiviral Res*, **2010**, 88, 19-29.
146. Marcone, V.; Rocca, G.; Lichtner, M.; Calzolari, E. *Long-term vaginal administration of Lactobacillus rhamnosus as a complementary approach to management of bacterial vaginosis, Int J Gynaecol Obstet*, **2010**, 110, 223-226.

147. Martinez, R. C. R. *Improved treatment of vulvovaginitis candidiasis with fluconazole plus probiotic lactobacillus rhamnosus GR-1 and lactobacillus reuteri RC-14*, *Soc Appl Microbiol*, **2009**, 48, 269–274.
148. Heczko, P. B.; Tomusiak, A.; Adamski, P.; Jakimiuk, A. J.; Stefański, G.; Mikołajczyk-Cichońska, A.; Suda-Szczurek, M.; Strus, M. *Supplementation of standard antibiotic therapy with oral probiotics for bacterial vaginosis and aerobic vaginitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*, *BMC Womens Health*, **2015**, 15, 115.
149. Petrova, M. I.; van den Broek, M.; Balzarini, J.; Vanderleyden, J.; Lebeer, S. *Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection*, *FEMS Microbiol Rev*, **2013**, 37 (5), 762-92.
150. Champer, M.; Wong, A. M.; Champer, J.; Brito, I. L.; Messer, P. W.; Hou, J.Y.; Wright, J. D. *The role of the vaginal microbiome in gynaecological cancer*, *BJOG*, **2017**, 14631.
151. Zabihollahi, R.; Motevaseli, E.; Sadat, S. M.; Azizi-Saraji, A. R.; Asaadi-Dalaie, S.; Modarressi, M. H. *Inhibition of HIV and HSV infection by vaginal lactobacilli in vitro and in vivo*, *Daru*, **2012**, 15, 20 (1), 53.
152. Dimitonova, S. P.; Danova, S. T.; Serkedjieva, J. P. & Bakalov, B. V. *Antimicrobial activity and protective properties of vaginal lactobacilli from healthy Bulgarian women*, *Anaerobe*, **2007**, 13, 178–184.
153. Liu, J. J.; Reid, G.; Jiang, Y.; Turner, M. S.; Tsai, C. C. *Activity of HIV entry and fusion inhibitors expressed by the human vaginal colonizing probiotic Lactobacillus reuteri RC-14*, *Cell Microbiol*, **2007**, 9 (1), 120-30.
154. Winawer, S. J.; Sherlock, P. *Best practice and research clinical gastroenterology, Colorectal cancer screening*, **2007**, 6, 103.
155. Ma, E. L.; Choi, Y. J.; Choi, J.; Pothoulakis, C.; Rhee, S. H.; Im, E. *The anticancer effect of probiotic Bacillus polyfermenticus on human colon cancer cells is mediated through ErbB2 and ErbB3 inhibition*, *International Journal of Cancer*, **2010**, 127, 780–790.
156. Shida, K.; Nomoto, K. *Probiotics as efficient immunopotentiators: translational role in cancer prevention*, *Indian J Med Res*, **2013**, 138, (5), 808-814.
157. Ülger, S. *Kanser ve Probiyotikler*, *Klinik Tıp Pediatri Derg*, **2013**, 5 (2), 11-16.
158. Kim, Y.; Lee, D.; Kim, D.; Cho, J.; Yang, J.; Chung, M.; Kim, K.; Ha, N. *Inhibition of proliferation in colon cancer cell lines and harmful enzyme activity*

of colon bacteria by *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212, *Arch Pharm Res*, **2008**, 31 (4), 468-473.

159. Nami, Y.; Abdullah, N.; Haghshenas, B.; Radiah, D.; Rosli, R.; Khosroushahi, A. Y. *Probiotic potential and biotherapeutic effects of newly isolated vaginal Lactobacillus acidophilus 36YL strain on cancer cells*, *Anaerobe*, **2014a**, 28, 29-36.
160. Urbanska, A.M.; Bhathena, J.; Martoni, C.; Prakash, S. *Estimation of the potential antitumoractivity of microencapsulated Lactobacillus acidophilus yogurt formulation in the attenuation of tumorigenesis in Apc (Min/+) mice*, *Dig. Dis. Sci*, **2009**, 54, 264-273.
161. Ishikawa, H.; Akedo, I.; Otani, T.; Suzuki, T.; Nakamura, T.; Takeyama, I.; Ishiguro, S.; Miyaoka, E.; Sobue, T.; Kakizoe, T. *Randomized trial of dietary fiber and Lactobacillus casei administration for prevention of colorectal tumors*, *Int J Cancer*, **2005**, 116 (5), 762-767.
162. Haghshenas, B.; Abdullah, N.; Nami, Y.; Radiah, D.; Rosli, R.; Khosroushahi, A. Y. *Different effects of two newly-isolated probiotic Lactobacillus plantarum 15HN and Lactococcus lactis subsp. Lactis 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines*, *Anaerobe*, **2014**, 30, 51-59.
163. Kaewnopparat, S.; Dangmanee, N.; Kaewnopparat, N.; Srichana, T.; Chulasiri, M.; Settharaksa, S. *In vitro probiotic properties of Lactobacillus fermentum SK5 isolated from vagina of a healthy woman*, *Anaerobe*, **2013**, 22, 6-13.
164. Frank, J. A.; Reich, C. I.; Sharma, S.; Weisbaum, J. S.; Wilson, B. A.; Olsen, G. J. *Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes*, *Appl Environ Microbiol*, **2008**, 74 (8), 2461-2470.
165. Kassaa, A. I.; Hamze, M.; Hober, D.; Chihib, N. E.; Drider, D. *Identification of vaginal lactobacilli with potential probiotic properties isolated from women in North Lebanon*, *Microb Ecol*, **2014**, 67 (3), 722-734.
166. Aslim, B.; Kilic, E. *Some probiotic properties of vaginal lactobacilli isolated from healthy women*, *Jpn J Infect Dis*, **2006**, 59 (4), 249-253.
167. Maragkoudakis, P. A.; Zoumpoulou, G.; Miaris, C.; Kalantzopoulos, G.; Pot, B.; Tsakalidou, E. *Probiotic Potential of Lactobacillus Strains Isolated from Dairy Products*, *International Dairy Journal*, **2006**, 16, 189-199.
168. Chung, H. S.; Kim, Y. B.; Chun, S. L.; Ji, G. E. *Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria*, *Food Microbiol*, **1999**, 47, 25-32.

169. Erkkila, S.; Pithva, E. *Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use*, *Meat Sci*, **2000**, 55 (3), 297-300.
170. Maldonado, N. C.; de Ruiz, C. S.; Otero, M. C.; Sesma, F.; Nader-Macías, M. E. *Lactic acid bacteria isolated from young calves-characterization and potential as probiotics*, *Res Vet Sci*, **2012**, 92 (2), 342-349.
171. Wilks, M.; Wiggins, R.; Whiley, A.; Hennessy, E.; Warwick, S.; Porter, H.; Corfield, A.; Millar, M. *Identification and H₂O₂ production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome*, *J Clin Microbiol*, **2004**, 42 (2), 713-717.
172. Charteris, W. P.; Kelly, P. M.; Morelli, L.; Collins, J. K. *Quality control Lactobacillus strains for use with the API 50CH and API ZYM systems at 37 degrees C*, *J Basic Microbiol*, **2001**, 41 (5), 241-251.
173. Juárez Tomás, M. S.; Wiese, B.; Nader-Macías, M. E. *Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal Lactobacillus johnsonii CRL 1294*, *J Appl Microbiol*, **2005**, 99 (6), 1383-1391.
174. Al-Zubaidy, K. G. H. Sexually transmitted diseases among women with abnormal vaginal discharge in Najaf governorate. M. Sc. Thesis Coll. Med. Univ. Kufa, **2001**.
175. Merghoub, N.; Benbacer, L.; Amzazi, S.; Morjani, H.; Mzibri, M. El. *Cytotoxic effect of some Moroccan medicinal plant extracts on human cervical cell lines*, *J Med Plants Res*, **2009**, 3 (12), 1045-1050.
176. Parsian, M.; Mutlu, P.; Yalcin, S.; Tezcaner, A.; Gunduz, U. *Half generations magnetic PAMAM dendrimers as an effective system for targeted gemcitabine delivery*, *Int J Pharm*, **2016**, 30, (1-2), 104-113.
177. Nami, Y.; Abdullah, N.; Haghshenas, B.; Radiah, D.; Rosli, R.; Khosroushahi, A. Y. *Assessment of probiotic potential and anticancer activity of newly isolated vaginal bacterium Lactobacillus plantarum 5BL*, *Microbiol Immunol*, **2014b**, 58 (9), 492-502.
178. Mackey, T.; Lejeune, V.; Janssens, M.; Wauters, G. *Identification of vancomycin-resistant lactic bacteria isolated from humans*, *J Clin Microbiol*, **1993**, 31 (9), 2499-2501.
179. Swenson, J. M.; Facklam, R. R.; Thornberyy, C. *Antimicrobial susceptibility of vancomycin resistant Leuconostoc, Pediococcus and Lactobacillus species*, *Antimicrob Agents Ch. Vol*, **1990**, 34, 543-549.

180. Strus, M.; Malinowska, M.; Heczko, P. B. *In vitro* antagonistic effect of *Lactobacillus* on organisms associated with bacterial vaginosis, *J Reprod Med*, **2002**, 47 (1), 41-46.
181. Baltova, K.; Dimitrov, Z. Probiotic and cultural characteristic of strain *Lactobacillus gasseri* 4/13 of human origin, *Biotechnol Biotechnol Equip*, **2014**, 28 (6), 1084-1088.
182. Tamang, J. P.; Tamang, B.; Schillinger, U.; Guigas, C. Holzaphel, W.H. *Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Ethnic Fermented Vegetables of the Himalayas*, *International Journal of Food Microbiology*, **2009**, 135, 28-33.
183. Martínez-Peña, M. D. M.; Castro-Escarpulli, G.; Aguilera-Arreola, M. G. *Lactobacillus* species isolated from vaginal secretions of healthy and bacterial vaginosis-intermediate Mexican women: a prospective study, *BMC Infect Dis*, **2013**, 13, 189.
184. Mastromarino, P.; Brigidi, P.; Macchia, S. *Characterization and selection of vaginal Lactobacillus strains for the preparation of vaginal tablets*, *J Appl Microbiol*, **2002**, 93, 884–893.
185. Mastromarino, P.; Macchia, S.; Meggiorini, L.; Trinchieri, V.; Mosca, L.; Perluigi, M.; Midulla, C. *Effectiveness of Lactobacillus-containing vaginal tablets in the treatment of symptomatic bacterial vaginosis*, *Clin Microbiol Infect*, **2009**, 15 (1), 67-74.
186. Avlami, A.; Kordossis, T.; Vrizedis, N.; Sipsas, N. V. *Lactobacillus rhamnosus* endocarditis complicating colonoscopy, *J. Infect*, **2001**, 42 (4), 283–295.
187. Wang, Y.; Liu, Y.; Sidhu, A.; Ma, Z.; McClain, C.; Feng, W. *Lactobacillus rhamnosus* GG culture supernatant ameliorates acute alcohol-induced intestinal permeability and liver injury, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **2012**, 303 (1), 32-41.
188. Vinderola, C. G.; Reinheimer, J. A. *Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative ‘in vitro’ study of probiotic characteristics and biological barrier resistance*, *Food Research International*, **2003**, 36, 895-904.
189. Khalil, R.; Mahrous, H.; El-Halafawy, K.; Kamaly, K.; Frank, J. and El Soda, M. *Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt*, *African J. Biotechnol*, **2007**, 6 (7), 939-949.
190. Jonganurakkum, B.; Wang, Q.; Xu, S.; Tada, Y.; Minamida, K.; Yasakawa, D.; Sugi, M.; Hara, H.; Asano, K. *Pediococcus pentosaceus* NB17 for probiotic use, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2008**, 106, 69-73.

191. Katla, A. K.; Kruse, H.; Johnsen, G.; Herikstad, H. *Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products*, *Int J Food Microbiol*, **2001**, 67, 147–152.
192. Ammor, M. S.; Florez, A. B.; Mayo, B. *Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria*, *Food Microbiol*, **2007**, 24, 559-570.
193. Danielsen, M.; Wind, A. *Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents*, *Int J Food Microbiol*, **2003**, 82, 1-11.
194. Gad, G. F.; Abdel-Hamid, A. M.; Farag, Z. S. *Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products*, *Braz J Microbiol*, **2014**, 45 (1), 25-33.
195. Rodriguez, E.; Arques, J. L.; Rodriguez, R.; Peiroten, A.; Landete, J.M.; Medina, M. *Antimicrobial properties of probiotic strains isolated from breast-fed infants*, *J Funct Foods*, **2012**, 4, 542–551.
196. Knezević, A.; Stepanović, S.; Cupić, M.; Jevtović, D.; Ranin, J.; Jovanović, T. *Reduced quantity and hydrogen-peroxide production of vaginal lactobacilli in HIV positive women*, *Biomed Pharmacother*, **2005**, 59 (9), 521-533.
197. Guan, X.; Xu, Q.; Zheng, Y.; Qian, L.; Lin, B. *Screening and characterization of lactic acid bacterial strains that produce fermented milk and reduce cholesterol levels*, *Braz J Microbiol*, **2017**, 16, 30589-30595.
198. Ooi, L. G.; Ahmad, R.; Yuen, K. H.; Liong, M. T. **Lactobacillus gasserii* [corrected] CHO-220 and inulin reduced plasma total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol via alteration of lipid transporters*, *J Dairy Sci*, **2010**, 93 (11), 5048-5058.
199. Anandharaj, M.; Sivasankari, B.; Santhanakaruppu, R.; Manimaran, M.; Rani, R. P.; Sivakumar, S. *Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing *Lactobacillus* and *Weissella* strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh*, *Res Microbiol*, **2015**, 166 (5), 428-439.
200. Bosch, M.; Fuentes, M. C.; Audivert, S.; Bonachera, M. A.; Peiró, S.; Cuñé, J. **Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529: probiotic candidates to reduce cholesterol levels*, *J Sci Food Agric*, **2014**, 94 (4), 803-809.
201. Herreros, M. A.; Fresno, J. M.; González Prieto, M. J.; Tornadijo, M. E. *Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese)*, *Int Dairy J*, **2003**, 13, 469-479.

202. Collado, M. C.; Meriluoto, J. Salminen, S. *Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus*, *Lett Appl Microbiol*, **2007b**, 45 (4), 454-460.
203. Sánchez, B.; González-Tejedo, C.; Ruas-Madiedo, P.; Urdaci, M. C.; Margolles, A. *Lactobacillus plantarum extracellular chitinbinding protein and its role in the interaction between chitin, Caco-2 cells, and mucin*, *Appl Environ Microbiol*, **2010**, 77, 1123–1126.
204. WHO *Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, London, Ontario, Canada: WHO, **2002**.
205. Motevaseli, E.; Shirzad, M.; Akrami, S. M.; Mousav, A. S.; Mirsalehian, A.; Modarressi, M. H. *Normal and tumour cervical cells respond differently to vaginal lactobacilli, independent of pH and lactate*, *J Med Microbiol*, **2013**, 62, (7), 1065-1072.
206. Thirabunyanon, M.; Hongwittayakorn, P. *Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction*, *Appl Biochem Biotechnol*, **2013**, 169 (2), 511-525.

7. EKLER

EK 1

Besiyerlerinin Kimyasal Bileşenleri

MRS (deMan Rogosa Sharpe)
agarbesiyerinin kimyasal bileşeni

TSB (Tryptic Soy Broth)besiyerinin
kimyasal bileşeni

Bileşen	Miktar (g/L)
Kazein pepton	10 g
Et ekstraktı	10 g
Maya ekstraktı	4 g
D(+) Glukoz	20 g
K ₂ HPO ₄	2 g
di-Ammonium hydrogen citrate	2 g
MgSO ₄	0,2 g
MnSO ₄	0,04 g
Tween 80	1 g
Sodyum asetat	5 g
Agar-agar	14 g
pH 5,7±0,2 (sterilizasyondan önce)	

Bileşen	Miktar (g/L)
Kazein pepton	17 g
Soya pepton	3 g
Glukoz	2,5 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
pH 7.3 ±0,2 (sterilizasyondan önce)	

PDA (Potato Dextrose Agar)

besiyerinin kimyasal bileşeni

Bileşen	Miktar (g/L)
Patates infüzyonu	4 g
Glukoz	20 g
Agar-agar	15 g
pH'sı 5,6±0,2 (sterilizasyondan sonra)	

EK 2

Tampon ve Çözeltiler

Phosphate Buffered Saline (PBS) tamponu

Bileşenler	Konsantrasyon (mmol/L)	Konsantrasyon g/L
NaCl	137	8.0 g
KCl	2.7	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	10	1.44 g
KH ₂ PO ₄	1.8	0.24 g
pH 7.4		

40x TAE tamponu

Bileşenler	Konsantrasyon (M)	Konsantrasyon
Tris-Base	1.6	38.72 g
Na Asetat x3 H ₂ O	0.8	21.78 g
EDTA	40	3.04 g
Distile su		200 ml
pH 7.2		

Gram Boyamada kullanılan çözeltilerin içerikleri

Kristal Violet stok çözeltisi	
Kristal Violet	1g
Etanol	%95
dH ₂ O	100 ml'ye tamamlanır
Bazik Fuksin stok çözeltisi	
Bazik fuksin	3g
Etanol	%95
dH ₂ O	100 ml'ye tamamlanır

Agaroz Jel Elektroforezinde kullanılan tamponlar ve çözeltiler

Tris-Borik asit tampon (1X) pH 8.3	
Tris	10.8 g
Borik Asit	5.5 g
EDTA	0.94 g
Distile su	1000 ml
Yükleme boyası	
Brom fenol blue	0,25g
Sakkaroz	40 g
Distile su	100 ml
Karışım 100ml de çözülerek 0,22 µm çapındaki (Milipore, USA) membran filtreden geçirilmiştir.	
Etidyum bromit çözeltisi	
Etidyum bromit	1 g
Distile su	100 ml
Karışım 100ml de çözülerek 0,22µm çapındaki (Milipore, USA)membrane filtreden geçirilmiştir.	
% 1' lik agaroz jel	
Agaroz	0,7 g
1X TAE	100 ml
EtBr	4 µl

EK 3

DNA ANALİZİNDE KULLANILAN MOLEKÜLER MARKÖRLER

Plus DNA Ladder

#SM0321 50 µg
(for 100 applications)

Lot: 00285307 Expiry Date: 02.2019

Concentration: 0.5 µg/µL
Supplied with: 1 mL 6X DNA Loading Dye

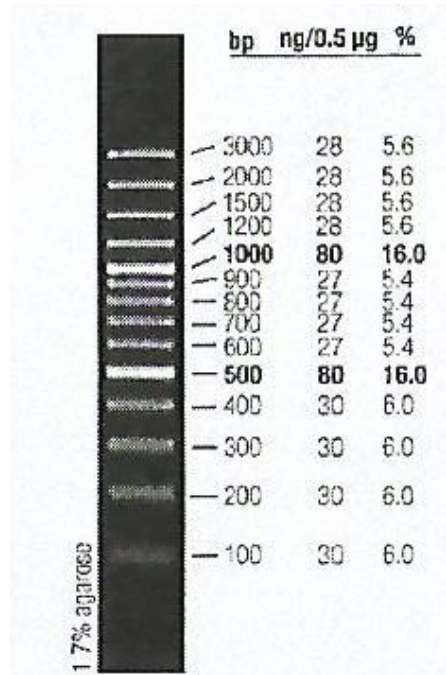
Store at -20°C

Protocol for Loading

Loading mixture for the 5 mm gel lane*:

Components	Gels	
	Agarose	Polyacrylamide
DNA ladder (0.5-1 µg)	1-2 µL	1-2 µL
6X DNA Loading Dye	1 µL	0.5 µL
Deionized water	4-3 µL	1.5-0.5 µL
	6 µL	3 µL

GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder



EK 4

Hasta Bilgi Formu

Tarih:...../...../.....

AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

Bilimsel Araştırmalar Hasta Bilgi Formu

Hasta Bilgileri

Adı:..... Protokol No:.....

Soyadı:..... Tel:.....

Yaşı:.....

-Hastanın en son antibiyotik kullandığı zaman.....

-Hastanın daha önce vajinal bir enfeksiyon geçirip geçirmediği. Geçirmiş ise ne enfeksiyonu olduğu ve süresi.

Evet.....Süre:..... Hayır.....

-Hastanın gebelikten korunup korunmadığı. Korunuyor ise nasıl korunduğu?

Evet..... Hayır.....

-Hasta hamile ise kaç aylık hamile olduğu.....

-Hastanın başka bir hastalığı olup olmadığı.....

- Hasta hakkındaki diğer bilgiler.....

EK 5

16S Dizi analiz ve BLAST sonucu

L1: *Lactobacillus paracasei* suşunun 16S rDNA Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1430

CAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGA
ACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGAT
AACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTT
GGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGT
TGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTACTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
AAGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAG
TAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCAGGGCTAATTACGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTA
AAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGA
GGAAGCGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGA ACTC
CATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC
GGCTGTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGG
TTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACG
ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTT
GATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCAT
GGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCA
AGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACA
CGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCC
GGTGGCGTAACCCTTTTAGGGAGCGA

L2: *Lactobacillus paracasei* suşunun 16S rDNA Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1430

CGTCGTACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGAAC
GAGTGGCGGACGGCTGAGTCACACGTGGGCAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAA
CATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGG
CTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGGCGTATTAGCTAG
TTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGTTG
ATCGGCCACATTGGGACTGAGCCAGGACCAAACCTAATACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA
GAAGGCTTTCGGGTTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTTCGGCAGAGTA
ACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA
GCCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGG
AAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGGCAGTGGAACCTCA
TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
CTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGAT
TAGATAACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTT
TCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGA
CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTG
ATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCATG
GTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG
GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAA
GCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACAC
GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCC
GGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAACACCCGAAGCCG
GTGGTCGTATACTCCGTAGGAGCTAT

L3: *Lactobacillus paracasei* suşunun 16S rDNA Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1437

CATGCAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACAT
GGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGG
GGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGT
TCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGA
GGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG
TGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAG
AGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCG
TAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACC
GAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAC
TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGG
CGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGG
GTTTCCGCCCTTCAGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTAC
GACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGA
GCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTT
TGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCA
TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGT
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT
GGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTC
AAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTAC
ACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTC
CCGGGCCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCGAAGC
CGGTGGCGTAACCCTTTTAGGGAGCGAGCC

L5: *Lactobacillus crispatus* suşunun 16S rDNA Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1426

GCAGTCGAGCGAGCGGAACTAACAGATTTACTTCGGTAATGACGTTAGGAAAGC
GAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCATAGTCTGGGATAC
CACTTGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGATCGCATGATCAGCTT
TTAAAAGGCGGCGTAAGCTGTCGCTATGGGATGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAG
TTGGTAAGGTAAAGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTG
ATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAG
AAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAA
CTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAG
CGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGG
AACTGCATCGGAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAGTCCAT
GTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC
TCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGTTT
CCGCCTCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGAC
CGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTAGTG
CCATTTGTAGAGATACAAAGTTCCCTTCGGGGACGCTAAGACAGGTGGTGCATG
GCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTGTTATTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGG
GCTACACACGTGCTACAATGGGCAGTACAACGAGAAGCGAGCCTGCGAAGGCA
AGCGAATCTCTGAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCA
CGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTCTGCAATGCCCAAAGCC
GGTGGCCTAACCTTCGGGAAGGAG

L6: *Pediococcus acidilactici* suşunun 16S rDNA Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1453

TGCAAGTTCGAACGAAC TTTCCGTTTGATTGATTATGAAGGTGCTTTGCACTGAA
TGAGATTTTAAACACGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC
TGCCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAG
AGAAAACCGCCTGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGA
CCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGATGCG
TAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAG
CAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGA
AGAACGTGGGTGAGAGTAACTGTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCC
ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCC
GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAG
CCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAA
AAGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
ACCAGTGGCGAAAGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTTAGGCTCGAAAGCA
TGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGATTA
CTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAATC
CGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCA
GGTCTTGACATCTTCTGCCAACCTAAGAGATTAGGCGTTCCTTCGGGGACAGA
ATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTA
GTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCA
TGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCG
CGAAACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAACCATTCTCAGTTCGGACTGTAGG
CTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCC
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGGAAG
TTTGTAACAACCCAGAAGCCGGTGGGGGAAACCTTTGAAGGAAGCG

L7: *Pediococcus acidilactici* suşunun 16S rDNA Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1381

TCCGTTTGATTGATTATGAAGGTGCTTTGCACTGAATGAGATTTTAAACACGAAGT
TGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAGCAGGGGAT
AACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCCTGGTTTTTC
TTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAG
TTGGTGGGGTAACGGCTACCAAGGCGATGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTA
ATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAG
AAGGGTTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTGAGAGTAA
CTGTTACCCAGTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAG
CGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGA
AGTGCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAAAAGACAGTGGAAGTCCAT
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGCGGC
TGTCTGGTCTGTAAGTACGCTTAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTT
CCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAATCCGCCTGGGGAGTACGAC
CGCAAGGTTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTTAAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGC
CAACCTAAGAGATTAGGCGTTCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGG
TTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTTATTACTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGAC
AAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
CTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAAACCGCGAGGTTTAG
CTAATCTCTTAAAACCATTTCTCAGTTCGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACG
AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG

L8: *Lactobacillus rhamnosus* suşunun 16S rDNA Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1379

AACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAG
GTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
GGGAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCA
TAAATCCAAGAACC GCATGGTTCTTGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTT
GGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAA
TGATACGTAGCCGAACCTGGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC
CAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTG
ATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGT
TGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAG
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATG
TGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTG
CAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGG
AAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCG
AAAGCATGGGTAGGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGAT
GAATGCTAGGTGTTGGAGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGATTAAGC
ATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAA
AATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTC
TAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT
CATGCCCTTATGACCGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTT
GCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGTGCAAC
TCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGA
ATAGTTCCC GGCCTTGTACACACCGCC

L9: *Lactobacillus plantarum* suşunun 16S rDNA Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1438

ACATGCAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATT
TGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGG
GGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGT
CCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCAGCGGCGTATTA
GCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGA
GGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTGTTAAAGAAGAACATATC
TGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTC
AACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTG
GAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCG
AAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTG
GAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGG
AGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGAC
ATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGT
GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT
GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCG
AGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGGATTGTAGGCTGCAACTCG
CCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCA
AAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCC

L10: *Lactobacillus gasseri* suşunun 16S rDNA Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1372

TGCAAGTCGAGCGAGCTTGCCTAGATGAATTTGGTCTTGCACCAAATGAAACTA
GATACAAGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAAGAG
ACTGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGC
ATGTTAGAGTTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGGATGGACCTGCGGTGCA
TTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTG
AGAGACTGATCGGCCACATTGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG
TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGGTAGTGAAGAAAGATAGAGGT
AGTAACTGGCCTTTATTTGCGGTAATTACTTAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGTGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA
AGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAAGTCTGATGTGAAAGCTCGGCTCAACCGGAGA
ATTGCATCAGAACTGTTGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATG
GTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCCGCTC
TCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGTTTCC
GCCTCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCG
CAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATG
TGGTTTAATTTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGCA
AACCTAAGAGATTAGGAGTTCCTTCGGGGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGC
TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTGTCATTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGC
TACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAACCTGCGAAGGCAAG
CGGATCTCTGAAAGCCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCTACACG
AAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GCCTTGTACACACCGCCCGTCA

L11: *Pediococcus acidilactici* suşunun 16S rDNA Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1393

TACATGCAAGTCGAACGAACCTCCGTTAATTGATTATGACGTGCTTGCACTGAAT
GAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG
CCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAG
AAAACCGCCTGGTTTTCTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACC
CGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGATGCGTA
GCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGC
AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTAAAGAA
GAACGTGGGTGAGAGTAACTGTTACCCAGTGACGGTATTTAACAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCG
GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTAATGTGAAAGC
CTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGA
GGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATG
GGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGATTACT
AAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAATCCG
CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAAAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGT
CTTACATCTTCTGCCAACCTAAGAGATTAGGCGTTCCTTCGGGGACAGAATGAC
AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAGTGAG
ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCC
CTTATGACCTGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAAAC
CGCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAACCATTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAA
CTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG

L12: *Lactobacillus rhamnosus* suşunun 16S rDNA Dizi Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1433

GCAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGAGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTG
AACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGG
ATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTC
TTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAG
CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAACTGAGAG
GTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GAAGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTTCGGCAGA
GTAAGTGTTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGT
AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCG
AGGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACT
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGG
CGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGG
GTTTCCGCCCTTCAGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTAC
GACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGA
GCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTT
TGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCA
TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGT
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT
GGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTC
AAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTAC
ACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTT
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCGAAGC
CGGTGGCGTAACCTTTTAGGGAGCGAG

L13: *Lactobacillus rhamnosus* suşunun 16S rDNA Dizi Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1344

AGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGAGTGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAA
ACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGAT
GGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCAC
ATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTC
GGGTCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCTG
GCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGCGTAAAGCGAGCGCAGGC
GGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGA
AACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGT
AACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGT
GCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC
GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGA
TCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGT
TGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAA
GCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAGTCGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCAGGCCTT

L14: *Lactobacillus acidophilus* suşunun 16S rDNA Dizi Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1433

ATGCAGTCGAGCGAGCTGAACCAACAGATTCACCTTCGGTGATGACGTTGGGAAC
GCGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGGAACCTGCCCATAGTCTGGGAT
ACCACTTGAAACAGGTGCTAATACCGGATAAGAAAGCAGATCGCATGATCAGC
TTATAAAAGGCGGCGTAAGCTGTCGCTATGGGATGGCCCCGCGGTGCATTAGCT
AGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGAC
TGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
AGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGT
AACTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA
AGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGA
GGAAGTGCATCGGAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAGTCC
ATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCG
GCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGT
TTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTAG
TGCAATCCGTAGAGATACGGAGTTCCTTCGGGGACACTAAGACAGGTGGTGCA
TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCTTGTCATTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGT
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCT
GGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGTACAACGAGGAGCAAGCCTGCGAAGG
CAAGCGAATCTCTTAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTG
CACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCTGCAATGCCCAAAG
CCGGTGGCCTAACCTTCGGGAAGGAGCCGTG

L15: *Lactobacillus rhamnosus* suşunun 16S rDNA Dizi Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1375

CAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAA
CGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATA
ACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTG
GCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTT
GATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAA
GAAGGCTTTCGGGTTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTTCGGCAGAGTA
ACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA
GCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGG
AAGTGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCA
TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGG
CTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTT
TCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGA
CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTG
ATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCATG
GTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG
GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAA
GCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACAC
GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCC
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCA

L16: *Lactobacillus plantarum* suşunun 16S rDNA Dizi Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1441

ACATAGCAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACAT
TTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGG
GGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGG
TCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCC GCGGCGTATT
AGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAG
AGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCATACTGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGAAGAAGGGTTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTG
AGAGTAACTGTT CAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGG
CGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAA
CCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGA
ACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAA
GGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAAC
AGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGA
GGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGT
ACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATA
CTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGT
GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCC
GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA
CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAG
AGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCC
TACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAA
AGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCAGATA

L17: *Lactobacillus spp.* suşunun 16S rDNA Dizi Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1437

ACAGTCGAACGAGTTCTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGA
ACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGAT
AACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTT
GGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGT
TGATCGGCCACATTGGGACTGAGCACAGGCCAACTAATACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
AGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGT
AACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAA
AGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAG
GAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCC
ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCG
GCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAAGCATGGGTAGCGAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGT
TTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACG
ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTT
GATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCAT
GGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCA
AGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACA
CGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCC
GGTGGCGTAACCCTTTTAGGGAGCGAGCGACGA

L18: *Lactobacillus plantarum* suşunun 16S rDNA Dizi Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1411

TGCAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGA
GTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGA
TAACACCTGGAAACAGATGCTAATAACCGCATAACAACCTTGGCCGCATGGTCCGA
GTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCC CGGGCGTATTAGCTA
GATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGT
AATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
AGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGT
AACTGTTCAAGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGTTTATTGGGCGTAAA
GCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAG
AAGTGCCGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGA ACTCCATG
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT
GTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCC
GCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCG
CAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG
TGGTTTAATTTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCA
AATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGT
TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACA
AACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAATCGCGAGAGTAAGCTA
ATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTTCGGATTGTAGGCGCAACTCGCCTACATGAAGT
CGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
TTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGG
GTAACCTTT

L19: *Lactobacillus plantarum* suşunun 16S rDNA Dizi Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1438

CATGCAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTT
GAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGG
GATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTC
CGAGTTTCAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCAGCGGCGTATTAG
CTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAG
GGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGA
GTAAGTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT
AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCG
AAGAAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCT
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGG
CGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGG
GTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTAC
GGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA
GCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACT
ATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGC
ATGGTTGTTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCG
CAACCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGG
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACC
TGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAG
TAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA
CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAG
TCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCTACC

L20: *Lactobacillus paracasei* suşunun 16S rDNA Dizi Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1435

CAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGA
ACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGAT
AACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTT
GGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGT
TGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
AGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGT
AACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAA
AGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAG
GAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGA ACTCC
ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCG
GCTGTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCTCGAAAAGCATGGGTAGCGAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA AACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGT
TTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACG
ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTT
GATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCAT
GGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCA
AGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACA
CGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCC
GGTGGCGTAACCCTTTTAGGAGCGAGCCAGC

L21: *Lactobacillus plantarum* suşunun 16S rDNA Dizi Analiz Sonucu

Baz sayısı: 1368

ATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGT
AACACGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGATAAACACCTGGAAACAGATGCT
AATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGC
TACTACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCA
CCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTG
AGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGG
ACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAA
AACTCTGTTGTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGG
TATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTT
TAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGG
AACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATATGGAAGAACACAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACG
CTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCATA
CCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCT
AACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGG
AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCTACG
CGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTT
CCCTTCGGGGACATGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCGCTCGTGTCTGAG
ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTATTATCAGTTGCCAGCATT
AGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACCACGTGCTACAATGGATG
GTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCA
GTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG
CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTC
ACACCATGAGAGTTTGTA

EK 6

Filojenetik ağaç oluşumunda kullanılan suşlar ve benzerlik oranları

<i>Lactobacillus paracasei</i> L1 (MF155761)				
Hit taxon name	Hit strain name	Accession	Similarity (%)	Diff/Total nt
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	JCM 1171(T)	D16550	99.72	4/1428
<i>Lactobacillus casei</i>	BL23(T)	FM177140	99.65	5/1430
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	99.65	5/1430
<i>Lactobacillus paracasei</i> L2 (MF155762)				
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	JCM 1171(T)	D16550	98.11	27/1428
<i>Lactobacillus casei</i>	BL23(T)	FM177140	98.04	28/1430
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	98.04	28/1430
<i>Lactobacillus paracasei</i> L3 (MF155763)				
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	JCM 1171(T)	D16550	100.00	0/1435
<i>Lactobacillus casei</i>	BL23(T)	FM177140	99.93	1/1437
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	99.93	1/1437
<i>Lactobacillus crispatus</i> L5 (MF155765)				
<i>Lactobacillus crispatus</i>	DSM 20584(T)	AZCW01000112	100.00	0/1426
<i>Lactobacillus kitasatonis</i>	JCM 1039(T)	BALU01000027	98.81	17/1425
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	DSM 20531(T)	AZCM01000082	98.74	18/1426
<i>Pediococcus acidilactici</i> L6 (MF155766)				
<i>Pediococcus acidilactici</i>	DSM 20284(T)	GL397069	98.61	20/1442
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSM 20336(T)	JQBF01000022	97.30	39/1442
<i>Pediococcus stilesii</i>	LMG 23082(T)	AJ973157	96.74	47/1440
<i>Pediococcus acidilactici</i> L7 (MF155767)				
<i>Pediococcus acidilactici</i>	DSM 20284(T)	GL397069	99.06	13/1378
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSM 20336(T)	JQBF01000022	97.68	32/1378
<i>Pediococcus stilesii</i>	LMG 23082(T)	AJ973157	97.17	39/1376
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> L8 (MF155768)				
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	JCM 1136(T)	BALT01000058	100.00	0/1379
<i>Lactobacillus zeae</i>	ATCC 15820(T)	D86516	99.13	12/1378
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	98.91	15/1379
<i>Lactobacillus plantarum</i> L9 (MF155769)				
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	ATCC 14917(T)	ACGZ01000098	99.93	1/1435
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>	DKO 22(T)	AJ640078	99.86	2/1430
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	DSM 10667(T)	AJ306297	99.79	3/1435
<i>Lactobacillus gasseri</i> L10 (MF155770)				
<i>Lactobacillus gasseri</i>	ATCC 33323(T)	CP000413	99.85	2/1372
<i>Lactobacillus taiwanensis</i>	DSM 21401(T)	AYZG01000031	99.56	6/1372
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	ATCC 33200(T)	ACGR01000047	99.42	8/1372
<i>Pediococcus acidilactici</i> L11 (MF155771)				
<i>Pediococcus acidilactici</i>	DSM 20284(T)	GL397069	99.78	3/1393
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DSM 20336(T)	JQBF01000022	98.42	22/1393
<i>Pediococcus stilesii</i>	LMG 23082(T)	AJ973157	97.77	31/1391

<i>Lactobacillus rhamnosus</i> L12 (MF155772)				
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	JCM 1136(T)	BALT01000058	100.00	0/1432
<i>Lactobacillus zeae</i>	ATCC 15820(T)	D86516	99.09	13/1431
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	98.88	16/1432
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> L13 (MF155773)				
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	JCM 1136(T)	BALT01000058	100.00	0/1344
<i>Lactobacillus zeae</i>	ATCC 15820(T)	D86516	99.03	13/1343
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	98.81	16/1344
<i>Lactobacillus acidophilus</i> L14 (MF155774)				
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CIP 76.13(T)	CBLQ010000054	99.93	1/1433
<i>Lactobacillus kitasatonis</i>	JCM 1039(T)	BALU01000027	98.53	21/1432
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	JCM 2011(T)	BALB01000057	98.39	23/1431
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> L15 (MF155775)				
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	JCM 1136(T)	BALT01000058	99.93	1/1375
<i>Lactobacillus zeae</i>	ATCC 15820(T)	D86516	98.98	14/1374
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	98.76	17/1375
<i>Lactobacillus plantarum</i> L16 (MF155776)				
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	ATCC 14917(T)	ACGZ01000098	99.44	8/1441
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>	DKO 22(T)	AJ640078	99.37	9/1436
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	DSM 10667(T)	AJ306297	99.31	10/1441
<i>Lactobacillus</i> spp. L17 (MF155777)				
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	JCM 1136(T)	BALT01000058	99.44	8/1437
<i>Lactobacillus zeae</i>	ATCC 15820(T)	D86516	98.54	21/1436
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	98.33	24/1437
<i>Lactobacillus plantarum</i> L18 (MF155778)				
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	ATCC 14917(T)	ACGZ01000098	99.93	1/1411
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>	DKO 22(T)	AJ640078	99.86	2/1406
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	DSM 10667(T)	AJ306297	99.79	3/1411
<i>Lactobacillus plantarum</i> L19 (MF155779)				
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	ATCC 14917(T)	ACGZ01000098	99.72	4/1438
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>	DKO 22(T)	AJ640078	99.65	5/1433
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	DSM 10667(T)	AJ306297	99.58	6/1438
<i>Lactobacillus paracasei</i> L20 (MF155780)				
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	JCM 1171(T)	D16550	99.79	3/1433
<i>Lactobacillus casei</i>	BL23(T)	FM177140	99.72	4/1435
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	ATCC 25302(T)	ACGY01000162	99.72	4/1435
<i>Lactobacillus plantarum</i> L21 (MF155781)				
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	ATCC 14917(T)	ACGZ01000098	99.93	1/1368
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>	DKO 22(T)	AJ640078	99.85	2/1363
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	DSM 10667(T)	AJ306297	99.78	3/1368