

***HERNIARIA GLABRA* L. BİTKİSİNDEN PROBİYOTİK
ÖZELLİKLİ BAKTERİ İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU
VE BU BAKTERİLERİN *IN VITRO* YARA İYİLEŞTİRME
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

AYŞENUR YILMAZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. SERPİL UĞRAŞ**

DÜZCE, 2023

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

***HERNIARIA GLABRA* L. BİTKİSİNDEN PROBİYOTİK ÖZELLİKLİ BAKTERİ
İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE BU BAKTERİLERİN *IN VITRO*
YARA İYİLEŞTİRME ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ayşenur YILMAZ tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Serpil UĞRAŞ

Düzce Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Serpil UĞRAŞ

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Başaran DÜLGER

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Serap DOĞAN

Balıkesir Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 21/06/2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

21 Haziran 2023

Ayşenur YILMAZ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Doç. Dr. Serpil UĞRAŞ' a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili aileme ve çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Düzce Üniversitesi DÜ.BAP-2022.05.01.1290 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

21 Haziran 2023

Ayşenur YILMAZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
KISALTMALAR.....	xii
SİMGELER.....	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. PROBİYOTİK KAYNAKLARI	4
1.1.1. <i>Herniaria glabra</i> L.	5
1.2. PROBİYOTİK BAKTERİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	6
1.2.1. <i>Enterococcus mundtii</i>	7
1.2.2. <i>Pediococcus pentosaceus</i>	9
1.3. AMAÇ	10
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
2.1. BİTKİ ÖRNEKLERİNİN ELDESİ	11
2.2. BAKTERİ İZOLASYONU VE SAF KÜLTÜRLERİN ELDESİ	11
2.3. İZOLATLARIN MORFOLOJİK KARAKTERİZASYONU.....	11
2.4. İZOLATLARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU	12
2.4.1. İzolatların Genomik DNA İzolasyonu	12
2.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi	13
2.4.3. İzolatların 16S rDNA Gen Analizleri.....	13
2.4.4. Elde Edilen DNA Baz Dizilimlerinin Analizi	14
2.5. BAKTERİYAL İZOLATLARIN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ	15
2.5.1. Düşük pH Toleranslarının Belirlenmesi	15
2.5.2. Pepsin Toleransının Belirlenmesi	15

2.5.3. Pankreatin Toleransının Belirlenmesi	15
2.5.4. Safra Tuzu Toleransının Değerlendirilmesi.....	16
2.6. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ.....	16
2.7. PROBİYOTİK ÖZELLİK GÖSTEREN BAKTERİYAL İZOLATLARIN GÜVENLİK DEĞERLENDİRMESİ.....	17
2.7.1. Hemolitik Aktivite Testi.....	17
2.7.2. Antibiyotik Duyarlılığın Belirlenmesi.....	18
2.8. PROBİYOTİK ÖZELLİK GÖSTEREN BAKTERİYAL İZOLATLARIN AGREGASYON ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ.....	18
2.8.1. Otoagregasyon Özelliklerinin Belirlenmesi.....	19
2.8.2. Koagregasyon Özelliklerinin Belirlenmesi	19
2.9. PROBİYOTİK ÖZELLİK GÖSTEREN BAKTERİYAL İZOLATLARIN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ	20
2.10. PROBİYOTİK ÖZELLİK GÖSTEREN BAKTERİYAL İZOLATLARIN YARA İYİLEŞTİRME ETKİSİ	21
2.10.1. Bakteriyal Kültürün Hazırlanması	21
2.10.2. <i>In vitro</i> Yara İyileştirme Testi	21
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
3.1. VERİLER.....	23
3.1.1. Bakterilerin İzolasyonu	23
3.1.2. Bakteriyal İzolatların Tanımlanması.....	24
3.1.3. <i>P. pentosaceus</i> AF2 ve <i>E. mundtii</i> AF1 Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi	26
3.1.3.1. Düşük pH Toleranslarının Belirlenmesi.....	26
3.1.3.2. Pepsin Toleransının Belirlenmesi	28
3.1.3.3. Pankreatin Toleransının Belirlenmesi.....	29
3.1.3.4. Safra Tuzu Toleransının Belirlenmesi	30
3.1.4. <i>P. pentosaceus</i> AF2 ve <i>E. mundtii</i> AF1 Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktivite Potansiyellerinin Belirlenmesi	31
3.1.5. <i>P. pentosaceus</i> AF2 ve <i>E. mundtii</i> AF1 Bakterilerinin Hemolitik Aktivite Özelliklerinin Belirlenmesi	32

3.1.6. <i>P. pentosaceus</i> AF2 ve <i>E. mundtii</i> AF1 Bakterilerinin Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin Belirlenmesi	32
3.1.7. <i>P. pentosaceus</i> AF2 ve <i>E. mundtii</i> AF1 Bakterilerinin Agregasyon Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	34
3.1.8. <i>P. pentosaceus</i> AF2 ve <i>E. mundtii</i> AF1 Bakterilerinin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	35
3.1.9. Bakterilerin Yara İyileştirme Aktivitesi	35
3.1.9.1. <i>P. pentosaceus</i> AF2 Bakterisinin Yara İyileştirme Aktivitesi	35
3.1.9.2. <i>E. mundtii</i> AF1 Bakterisinin Yara İyileştirme Aktivitesi.....	40
3.2. TARTIŞMA	45
4. SONUÇ.....	55
5. Kaynaklar.....	56
ÖZGEÇMİŞ	64

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1.1. Probiyotiklerin gastrointestinal sistem sağlığı üzerindeki iyileştirici potansiyellerine dair mekanizma tasviri. P, patojen; DC, dendritik hücre; TC, lenfosit.....	4
Şekil 1.2. <i>Herniaria glabra</i> L.	6
Şekil 1.3. <i>E. mundtii</i> bakterisinin taramalı elektron mikrografı (SEM görüntüsü) [39]	8
Şekil 1.4. <i>P. pentosaceus</i> bakterisinin taramalı elektron mikrografı (SEM görüntüsü)....	9
Şekil 3.1. Bakteriyal izolatların koloni morfolojileri.....	23
Şekil 3.2. Bakteriyal izolatların PCR profili. A. Marker (M) B. Bakteriyal izolatların 16s rDNA dizisinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	24
Şekil 3.3. <i>E. mundtii</i> AF1 için filogenetik ağaç modeli.....	25
Şekil 3.4. <i>P. pentosaceus</i> AF2 için filogenetik ağaç modeli.....	26
Şekil 3.5. <i>E. mundtii</i> AF1 bakterisine ait pH duyarlılık sonuçları (spektrofotometrik)..	27
Şekil 3.6. <i>P. pentosaceus</i> AF2 bakterisine ait pH duyarlılık sonuçları (spektrofotometrik).....	27
Şekil 3.7. <i>E. mundtii</i> AF1 bakterisine ait pepsin duyarlılık sonuçları (spektrofotometrik).....	28
Şekil 3.8. <i>P. pentosaceus</i> AF2 bakterisine ait pepsin duyarlılık sonuçları (spektrofotometrik).....	28
Şekil 3.9. <i>E. mundtii</i> AF1 bakterisine ait pankreatin duyarlılık sonuçları (spektrofotometrik).....	29
Şekil 3.10. <i>P. pentosaceus</i> AF2 bakterisine ait pankreatin duyarlılık sonuçları (spektrofotometrik).....	29
Şekil 3.11. <i>E. mundtii</i> AF1 bakterisine ait safra tuzu duyarlılık sonuçları (spektrofotometrik).....	30
Şekil 3.12. <i>P. pentosaceus</i> AF2 bakterisine ait safra tuzu duyarlılık sonuçları (spektrofotometrik).....	30
Şekil 3.13. <i>E. mundtii</i> AF1 ve <i>P. pentosaceus</i> AF2 bakterilerine ait hemolitik aktivite A: <i>E. mundtii</i> (γ -Hemolitik aktivite), B: <i>P. pentosaceus</i> (γ -Hemolitik aktivite), C: <i>Staphylococcus epidermidis</i> (β - Hemolitik aktivite), D: <i>Bacillus cereus</i> (β - Hemolitik aktivite).....	32
Şekil 3.14. <i>E. mundtii</i> AF1 antibiyotik duyarlılık analizi.....	33
Şekil 3.15. <i>P. pentosaceus</i> AF2 antibiyotik duyarlılık analizi.....	34

Şekil 3.16. <i>P. pentosaceus</i> AF2 canlı bakteri örneklerinin in vitro yara üzerindeki %kapanma ifadesi.....	35
Şekil 3.17. <i>P. pentosaceus</i> AF2 canlı bakteri örneklerinin in vitro yara üzerine uygulanmasının ardından oluşan yaradaki açık kalan yüzey alanının % ifadesi	36
Şekil 3.18. <i>P. pentosaceus</i> AF2 canlı bakteri örneğinin 1×10^{10} seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü.	36
Şekil 3.19. <i>P. pentosaceus</i> AF2 canlı bakteri örneğinin 1×10^9 seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü.	37
Şekil 3.20. <i>P. pentosaceus</i> AF2 canlı bakteri örneğinin 1×10^8 seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü	37
Şekil 3.21. <i>P. pentosaceus</i> AF2 lizat örneklerinin in vitro yara üzerindeki % kapanma ifadesi.....	38
Şekil 3.22. <i>P. pentosaceus</i> AF2 lizat örneklerinin in vitro yara üzerine uygulanmasının ardından oluşan yaradaki açık kalan yüzey alanının % ifadesi.	38
Şekil 3.23. <i>P. pentosaceus</i> AF2 lizat örneğinin 1×10^{10} seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü.	39
Şekil 3.24. <i>P. pentosaceus</i> AF2 lizat örneğinin 1×10^9 seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü.	39
Şekil 3.25. <i>P. pentosaceus</i> AF2 lizat örneğinin 1×10^8 seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü.	40
Şekil 3.26. <i>E. mundtii</i> AF1 canlı bakteri örneklerinin in vitro yara üzerindeki % kapanma ifadesi.....	40
Şekil 3.27. <i>E. mundtii</i> AF1 canlı bakteri örneklerinin in vitro yara üzerine uygulanmasının ardından oluşan yaradaki açık kalan yüzey alanının % ifadesi.	41
Şekil 3.28. <i>E. mundtii</i> AF1 canlı bakteri örneğinin 1×10^{10} seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü.	41
Şekil 3.29. <i>E. mundtii</i> AF1 canlı bakteri örneğinin 1×10^9 seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü.	42
Şekil 3.30. <i>E. mundtii</i> AF1 canlı bakteri örneğinin 1×10^8 seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü.	42
Şekil 3.31. <i>E. mundtii</i> AF1 lizat örneklerinin in vitro yara üzerindeki % kapanma ifadesi	43
Şekil 3.32. <i>E. mundtii</i> AF1 lizat örneklerinin in vitro yara üzerine uygulanmasının ardından oluşan yaradaki açık kalan yüzey alanının % ifadesi.....	43
Şekil 3.33. <i>E. mundtii</i> AF1 lizat örneğinin 1×10^{10} seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü.	44

Şekil 3.34. *E. mundtii* AF1 lizat örneğinin 1×10^9 seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü 44

Şekil 3.35. *E. mundtii* AF1 lizat örneğinin 1×10^8 seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü 45



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Kullanılan primerler.....	13
Çizelge 2.2. PCR reaksiyonunda kullanılan mix içeriği.....	14
Çizelge 2.3. PCR program koşulları.....	14
Çizelge 2.4. İndikatör mikroorganizmalar	17
Çizelge 2.5. Kullanılan antibiyotik çeşitleri.....	18
Çizelge 3.6. Bakteriyal izolatların morfolojik karakterizasyonu.....	22
Çizelge 3.7. Tanımlanan bakteriler.....	24
Çizelge 3.8. <i>P. pentosaceus</i> AF2 ve <i>E. mundtii</i> AF1 in düşük pH varlığında canlı koloni sayıları.....	27
Çizelge 3.9. <i>P. pentosaceus</i> AF2 ve <i>E. mundtii</i> AF1 için pepsin duyarlılıklarına karşı canlı koloni sayıları.....	28
Çizelge 3.10. <i>P. pentosaceus</i> AF2 ve <i>E. mundtii</i> AF1 için pankreatin duyarlılıklarına karşı canlı koloni sayıları.....	29
Çizelge 3.11. <i>P. pentosaceus</i> AF2 ve <i>E. mundtii</i> AF1 için safra tuzu duyarlılıklarına karşı canlı koloni sayıları.....	31
Çizelge 3.12. <i>P. pentosaceus</i> AF2 ve <i>E. mundtii</i> AF1 in antimikrobiyal aktivitesi.....	31
Çizelge 3.13. <i>E. mundtii</i> AF1 in antibiyotik duyarlılık profili.....	31
Çizelge 3.14. <i>P. pentosaceus</i> AF2 antibiyotik duyarlılık profili.....	34

KISALTMALAR

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CFU	Koloni oluşturan birim
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
<i>E. mundtii</i>	<i>Enterococcus mundtii</i>
<i>Enterococcus</i> sp	<i>Enterococcus</i> species
EtBr	Etidyum bromür
FBS	Fetal bovine serum
GİS	Gastrointestinal sistem
KOH	Potasyum hidroksit
KH ₂ PO ₄	Potasyum di hidrojen fosfat
LAB	Laktik asit bakterileri
<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Lactobacillus</i> species
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MRS	De Man, Rogosa ve Sharpe
NA	Nutrient Agar
Na ₂ HPO ₄	Sodyum hidrojen fosfat
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
rDNA	Ribozomal DNA
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskop
TAE	Tris acetate EDTA
TE	Tris EDTA
UV	Ultraviyole

SİMGELER

°C	Derece celsius
g	Gram
L	Litre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
rpm	Revolution per minute
%	Yüzde



ÖZET

***HERNIARIA GLABRA* L. BİTKİSİNDEN PROBİYOTİK ÖZELLİKLİ BAKTERİ İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE BU BAKTERİLERİN *IN VITRO* YARA İYİLEŞTİRME ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ayşenur YILMAZ

Düzce Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Serpil UĞRAŞ

Haziran 2023, 63 sayfa

Probiyotikler, immünomodülatör, antikanserojen, enfeksiyon önleyici, patojen baskılayıcı gibi üstün özellikleri sebebiyle, yeni probiyotik adayların keşfi terapötik açıdan önem taşımaktadır. Bu bağlamda, bu çalışmada yeni probiyotik adaylarının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Probiyotik adayı bakteri eldesinde *H. glabra* bitkisi tercih edilmiştir. Öncelikle bitkiden bakteri izolasyonu ve izole edilen bakterilerin 16s rRNA dizilemesi ile moleküler düzeyde tanımlanması, ardından tercih edilen bakterilerin probiyotik karakterizasyonu ve hücre kültürü çalışmaları ile yara iyileştirme etkisi analiz edilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda, iki önemli laktik asit bakterisinin [*Enterococcus mundtii* (*E. mundtii*) AF1 ve *Pediococcus pentosaceus* (*P. pentosaceus*) AF2] karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. İki bakterinin de gastrointestinal sistem (GIS) koşullarına oldukça dayanıklı oldukları tespit edilmiştir. Güvenilirlik testlerinde iki bakterinin γ -hemolitik aktiviteye sahip oldukları ve genel olarak test edilen antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Bakteri süpernatantlarının antimikrobiyal metabolit içerme yetenekleri agar kuyu difüzyon yöntemi ile değerlendirilmiş ve *E. mundtii* bakterisinin *B. subtilis*, *K. pneumoniae* ve *Y. pseudotuberculosis* bakterisine karşı, *P. pentosaceus* bakterisinin ise *E. coli*, *B. subtilis*, *P. vulgaris*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* ve *Y. pseudotuberculosis* bakterisine karşı inhibisyon aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Otoagregasyon değerleri *P. pentosaceus* için % 73,44 ve *E. mundtii* için % 72,46 olarak hesaplanmıştır. *P. pentosaceus* örneğinin *E. coli* ve *L. monocytogenes* bakterilerine karşı koagregasyon değerleri % 56,8 ve %57,38 ve *E. mundtii* örneğinin ise % 70,77 ve % 63,78 olarak hesaplanmıştır. Son olarak hücre kültürü ortamında (L929 hücre hattı) *in vitro* olarak oluşturulan yara üzerinde izolatların iyileştirme etkisi test edilmiş ve probiyotik adayı bakterilerin yara kapanmasını teşvik edici iyileşme aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışma *E. mundtii* AF1 ve *P. pentosaceus* AF2 bakterilerinin güçlü probiyotik adaylar olarak kullanımının değerlendirilebileceğini ortaya çıkarmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Enterococcus mundtii*, *Herniaria glabra* L., *Pediococcus pentosaceus*, Probiyotik, Yara iyileştirme

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PROBIOTIC BACTERIA FROM THE PLANT *HERNIARIA GLABRA* L. AND DETERMINATION OF THE IN VITRO WOUND HEALING PROPERTIES

Ayşenur YILMAZ

Düzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biology

Master's Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Serpil UGRAS

June 2023, 63 pages

Discovery of new probiotic candidates is therapeutically important because of their superior properties such as probiotics, immunomodulators, anticarcinogens, anti-infectives, and pathogen suppressors. In this context, it was aimed to identify new probiotic candidates in this study. *H. glabra* plant was preferred to obtain probiotic candidate bacteria. First of all, bacterial isolation from the plant and identification of isolated bacteria at molecular level by 16s rRNA sequencing, then probiotic characterization of preferred bacteria and their wound healing effect were analyzed by cell culture studies. As a result of these studies, the characterization of two important lactic acid bacteria [*Enterococcus mundtii* (*E. mundtii*) AF1 and *Pediococcus pentosaceus* (*P. pentosaceus*) AF2] was performed. It has been determined that both bacteria are quite resistant to gastrointestinal system (GIS) conditions. In the safety tests, it was determined that two bacteria had γ -hemolytic activity and were generally sensitive to the tested antibiotics. The ability of bacterial supernatants to contain antimicrobial metabolites was evaluated by agar well diffusion method, and *E. mundtii* bacteria against *B. subtilis*, *K. pneumoniae* and *Y. pseudotuberculosis* bacteria, and *P. pentosaceus* bacteria *E. coli*, *B. subtilis*, *P. vulgaris*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* and *Y. pseudotuberculosis* bacteria were determined to show inhibition activity. Autoaggregation values were calculated as 73.44 % for *P. pentosaceus* and 72.46 % for *E. mundtii*. Coaggregation values of *P. pentosaceus* sample against *E. coli* and *L. monocytogenes* bacteria were calculated as 56,8 % and 57,38 %, and *E. mundtii* sample as 70,77 % and 63,78 %. Finally, the healing effect of isolates on the wound formed in vitro in cell culture medium (L929 cell line) was tested and it was determined that probiotic candidate bacteria showed wound closure promoting healing activity. This study revealed that the use of *E. mundtii* AF1 and *P. pentosaceus* AF2 bacteria as potent probiotic candidates can be evaluated.

Keywords: *Enterococcus mundtii*, *Herniaria glabra* L., *Pediococcus pentosaceus*, Probiotic, Wound healing

1. GİRİŞ

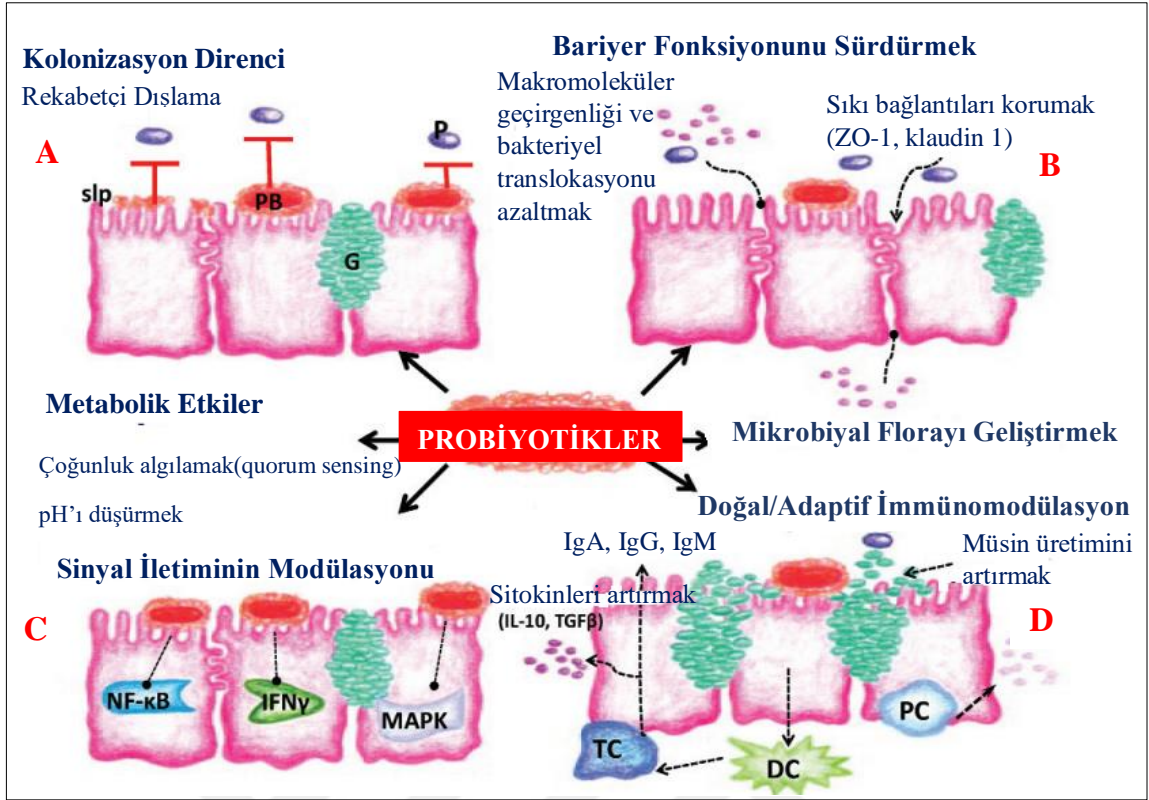
Probiyotikler; günlük yaşamımızda devamlı iç içe olduğumuz, bağırsak floramızda aktif olarak yer alan dost bakteri sınıfını içermektedir. Probiyotiklerin ilk olarak 1953'te Werner Kollath tarafından ortaya çıkarıldığı bilinse de terim olarak 'Probiyotik' ilk kez 1965 yılında Lilly ve Stillwell tarafından 'bir mikroorganizma tarafından salgılanan ve diğerinin büyümesini uyaran maddeleri' tanımlamak için kullanılmıştır. Takip eden yıllarda Parker (1974) probiyotikler için 'bağırsak mikrobiyal dengesine katkıda bulunan organizmalar ve maddeler' tanımını yaparken, Salminen ve ark. (1998) bu mikroorganizmaları 'sağlığa faydalı canlı bakteri içeren gıda' olarak belirtmiştir. Marteau ve ark. (2001) için ise bu canlılar 'sağlık üzerinde yararlı etkisi olan mikrobiyal hücre preparatları veya mikrobiyal hücrelerin bileşenleri' olarak belirtilmiştir. Yıllar içerisinde değişim gösteren bu gibi pek çok modernize edilmiş probiyotik tanımlaması mevcuttur. Ancak güncel olarak kabul edilen ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan tanıma göre probiyotikler, "yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalardır" ve kelime olarak 'yaşam için' anlamına gelmektedir [1], [2].

20. yüzyılın başlarına kadar tam olarak aydınlatılamayan bağırsak mikrobiyotası çalışmaları ile birlikte probiyotiklerin de asıl araştırma tarihi 1900'lü yılların başına dayanmaktadır. Paris'teki Pasteur Enstitüsü'nde çalışmalarını sürdüren Nobel ödüllü Elie Metchnikoff bu alandaki öncü çalışmalarıyla bilinir. Metchnikoff, bu mikroorganizmaların insan sağlığı üzerindeki etkilerine yönelik yaptığı çalışmalarla 'probiyotik kavramının' oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Bu kapsamda Metchnikoff, sağlık ve uzun ömürlülüğü yoğurttaki bulunan bakterilerin yutulmasına bağlamıştır. Bunun yanı sıra insan ve probiyotik ilişkisi yukarıda bahsedilen bilimsel tarihten daha eskiye, milattan öncesine uzanmaktadır. Tam olarak insanların fermente gıda ile tanışma tarihi bilinmiyor olsa da eski Mısır kalıntılarına bakıldığında, günümüz Orta Doğu'sunda hala yaygın olan fermente süt ürünlerinin de MÖ 3500 gibi erken bir tarihte kullanımda olduğu görülmektedir [3], [4].

Günlük yaşamımızda da genel olarak fermente gıdalar ile tanıdığımız probiyotikler, süt, yoğurt, peynir, turşu, bira, tereyağı, şarap ve boza gibi besinlerde bulunur. Sıkça tüketilen bu fermente gıdaların içeriğindeki probiyotiklerin sağlık üzerindeki etkisine yönelik pek çok araştırma yapılmıştır. Bu bağlamda yapılan araştırmalarla probiyotiklerin pozitif etkilerine bakıldığında; laktoz intoleransı semptomlarının hafifletilmesi ve rotavirüs ishalinin kısaltılması, *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarını önleme gibi özellikleri artık yaygın olarak bilinen olumlu etkileri olarak görülmektedir. [5]. Bununla birlikte serum kolesterol düzeyi ve kan basıncının azaltılması gibi pek çok etkileri de kanıtlanmıştır [6]. Aynı zamanda probiyotiklerin immünomodülasyon özelliğe sahip oldukları bilinmektedir. Bu bağlamda, probiyotikler bağışıklık sistemi hücrelerinin aktivasyonunu ve sitokin salını ile karakterize edilen bağışıklık tepkisini arttırmaktadır. Probiyotikler konakta epitel ile etkileşime girerek bağışıklık hücrelerini enfeksiyon bölgesine migrasyonunu sağlamakta ve bağışıklık belirteçlerini indüklemektedir [7]. Bu bağlamda probiyotik bakterilerin immüoglobulin üretimini de modüle ettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar ile IgA üreten hücrelerin sayısındaki artışın probiyotik organizmalar tarafından indüklendiği ortaya çıkarılmıştır [8], [9], [10]. Bununla birlikte, probiyotikler immünomodülasyon özellikleriyle antikanserijen etki de gösterebildikleri tespit edilmiştir. Bu bağlamda, probiyotikler karsinogenezin önlenmesinde önemli rol oynayan antiinflamatuvar sitokinlerin üretimini artırmakta veya azaltabilmektedir. Ayrıca probiyotikler erken evre kanser hücrelerini hem yok etmek için fagositleri aktive edebilmekte hem de kanser hücrelerinin tutunma ve çoğalma özelliklerini önleyebilmektedir [11]. Aynı zamanda probiyotiklerin kadın ürogenital sistem ve mesane enfeksiyonlarını önlemeye yönelik etkili sonuçlar sundukları da kanıtlanmıştır [12]. Sayılan tüm etkileriyle birlikte probiyotik temelli tedavi yaklaşımı, diğer antibiyotik kullanımı, immünosüpresif tedavi ve ışınlama gibi yöntemlerin bileşimde değişikliklere sebep olabilme ve gastrointestinal sistem (GİS) mikrobiyotası üzerinde bir etkiye sahip olabilme ihtimallerine karşın daha çekici atfedilmektedir. Bu gibi faydalı etkilerinden dolayı probiyotiklerin, takviye olarak kapsül şeklinde yoğurt mayası, süt ve süt ürünleri üretimi için starter kültür olarak kullanımları, bağışıklık destekleyici olarak alınmaları, sentezledikleri bakteriyosinlerle raf ömrünü uzatma amacıyla kullanımları ve kapsül formlarının kalın bağırsak enfeksiyonu önleyici olarak kullanımları bulunmaktadır [13], [14]. Tüm bu etkilerine ek olarak probiyotikler, antibiyotiklerin bilinçsiz tüketimi sonucu sağlık açısından büyük tehdit olarak

değerlendirilen antibiyotik dirençli patojenlerin mücadelesinde de alternatif tedavi yöntemi olarak değerlendirilmektedir.

Bundan başka, klinik etkileri ve günlük kullanımlarının yanında probiyotiklerin *in vitro* ve *in vivo* olarak yara iyileştirme sürecindeki olumlu etkileri de bilinmektedir. Probiyotikler ayrıca toksin reseptörlerini modifiye etmek ve toksin aracılı patolojiyi bloke etmek için enzimatik mekanizmalar kullanabilir [15]. Aşağıda Şekil 1.1.1.'de probiyotiklerin vücuttaki tedavi yaklaşımlarına yönelik bazı mekanizmalar tasvir edilmiştir. Şekilde yer alan A mekanizmasında, probiyotiklerin (PB) ve yüzey tabakası proteinlerinin (slp), patojenleri mukozal yüzeylerden rekabetçi bir şekilde dışlaması gösterilmektedir. B mekanizmasında, probiyotikler sayesinde, zona oklüdinler (ZO)-1 ve klaudin1 gibi sıkı bağlantılı proteinlerin bozulmadan kalır ve böylece hem bozulmamış makromoleküllerin alımı hem de canlı organizmaların mezenterik lenf düğümlerine translokasyonunu önlenmesi gösterilmektedir. Mekanizma C de probiyotiklerin, nükleer faktör-kappa B (NF- κ B), transkripsiyon faktörü, interferon- γ (IFN γ) ve mitojenle aktive olan protein kinazların (MAPK) çekirdeğine aktivasyonu ve translokasyonu bloke etmek için sinyal iletim yollarını modüle etme yeteneğine sahip olduğu gösterilmektedir. D mekanizması ise probiyotiklerin, bir dizi sinyalleşme yoluyla, dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ve interlökin-10 (IL 10) dahil olmak üzere anti-inflamatuar sitokinlerin üretimini ve salgılanmasını, T düzenleyici hücreler olarak adlandırılan bağışıklık hücresi tarafından artırabileceği göstermektedir. Ek olarak, immünoglobulin A (sIgA) dahil olmak üzere, immün globulinlerin artan üretimini sağlayabilmektedirler. Probiyotiklere doğuştan gelen bağışıklık yanıtları, goblet hücreleri (G) tarafından artan müsin üretimini ve Paneth hücreleri (PC) ile bağırsak epiteli tarafından geliştirilmiş antibakteriyel defensin üretimini içermektedir.



Şekil 1.1.1. Probiyotiklerin gastrointestinal sistem sağlığı üzerindeki iyileştirici potansiyellerine dair mekanizma tasviri. P, patojen; DC, dendritik hücre; TC, lenfosit [16].

Yukarıda sayılan faydalı etkileri göz önüne alındığında probiyotikler; insan sağlığı açısından antibiyotiklere alternatif tedavi ajanları, sağlık açısından vazgeçilmez koruyucu unsurlar ve gıda endüstrisinde lezzet kaynağı olarak kabul edilmekte ve hayatımızın bir parçası olmaya devam etmektedir.

1.1. PROBİYOTİK KAYNAKLARI

Mevcut probiyotik kaynakların insanlar için günlük diyetle süt, peynir ve yoğurt gibi süt ürünlerinden oluştuğu, hayvanlar için ise kendi sindirim yollarının en iyi kaynaklar olduğu görülmektedir [17], [18]. Örneğin fermente bir süt ürünü olan kefir içeriğinde laktik asit bakterileri (LAB) bulunduran güçlü bir probiyotik kaynak olarak görülmektedir [19]. Bunların yanı sıra yapılan çalışmalar ile probiyotik mikroorganizmaların; meyve suları, tahıllar ve bal peteği gibi farklı kaynaklardan da elde edilebileceği ortaya çıkarılmıştır [20], [21], [22]. Yapılan bir çalışmada meyve sularında en yaygın tür *Lactobacillus plantarum* bulunurken, domateslerde ise

Leuconostoc mesenteroides bakterisinin en yaygın bulunan tür olarak ifade edilmektedir [20]. Dev bal arılarının balında taranan izolatların çoğu, başta *Lactobacillus kunkeei* olmak üzere *Lactobacillus* spp. olarak bulunmuştur [22]. Bu gibi süt ürünleri dışındaki kaynaklardan da probiyotikler elde edilmektedir. Bu kaynaklar yukarıda örneklendiği üzere, süt ürünü olmayan fermente edilmiş yiyecek ve içecekleri ya da taze meyve ve sebzeler gibi süt ürünü olmayan ve fermente olmayan besinleri de kapsamaktadır [23].

Bununla birlikte, literatüre bakıldığında bitkilerin de probiyotik kaynağı olabileceğine dair birçok çalışma bulunmaktadır. Bitki yüzeylerinde veya dokularında konaklayabilen mikroorganizmalar için bu ortamlar besin tedariki açısından çekici bir barınak olmaktadır. Bu kapsamda bitki ile mutualist bir etkileşim içinde olan bazı bakteriler patojenlerle rekabet, bitkiyi don olaylarına karşı koruma gibi bitki sağlığı açısından da faydalı etkiler sunmaktadır [24]. Bitki ile bu gibi etkileşimler içinde olan bazı bakteriler arasında probiyotik potansiyeli ihtiva eden türlerin mevcut olduğu görülmektedir. Örneğin bitki mikrobiyotasını aydınlatmaya yönelik çalışmalar incelendiğinde, yapılan bir çalışmada papaya (*Carica* sp.), manyok (*Manihot* sp.), şeker kamışı (*Saccharum* sp.), yam (*Dioscorea* sp.) ve taro (*Colocasia* sp.) gibi bitkilerin yapraklarından *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus paraplantarum* ve *Weissella paramesenteroides* izole edilmiş ve bu bakterilerin probiyotik potansiyeli ortaya çıkarılmıştır [25]. Farklı bir çalışmada asma bitkilerinin üzüm, yaprak ve topraklarından bakteri toplulukları izole etmiştir. İzole edilen bakterilerin özellikle yaprak ve üzüm kısımlarında en yaygın olarak *Pseudomonas* ve *Sphingomonas* cinsleri olduğu belirtilmiştir [26]. Bitki kaynaklı probiyotik mikroorganizma eldesine örnek diğer bir çalışmada, muz, ananas ve papayanın bitki yapraklarından pek çok LAB suşu izole edilmiştir [27].

Bahsedilen literatürlere paralel olarak bu çalışmada da bitkisel kökenli kaynak aracılığı ile probiyotik bakteri eldesi amaçlanmıştır. Çalışmada yerel halk tarafından yoğurt yapımında kullanıldığı bildirilen *Herniaria glabra* L. bitkisi probiyotik bakteri kaynağı olarak seçilmiştir.

1.1.1. *Herniaria glabra* L.

Herniaria glabra L. bitkisi Caryophyllaceae familyasına ait bir bitkidir. Tek yıllık veya çok yıllık bir bitki olup, sarımsı yeşil bir renge sahiptir. Şekil 1.2.'de görüldüğü gibi, tüysüz veya ince tüylü olarak yayılım gösteren saplar 5-18 cm boylarındadır. Temmuz

ve ağustos aylarında açan bitki çiçekleri hermafrodit (hem erkek hem de dişi üreme organı bulunduran bitki) özelliğe sahiptir. Bitki yüzeyinde 8-10 adet olacak şekilde kümelenmiş halde bulunmaktadır. İnce uzun yapraklar eliptik veya oval bir yapı gösterip $3-7 \times 1-3$ mm çapındadır. Bitki kökleri yatay yayılım göstermektedir [28], [29].



Şekil 1.2. *Herniaria glabra* L.

Bitki kumlu, killi ve tınlı topraklarda yetişmeye elverişlidir. Güneşli bölgelerde yetişebilmesinin yanı sıra yarı gölge ortam şartlarında da yetişebilmektedir. Bitkinin coğrafi yelpazesine bakıldığında kuzeyde Finlandiya ve İsveç'ten doğuda Batı Sibirya'ya ve güneyde İran'a kadar uzandığı görülmektedir [30]. Afrika Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika gibi pek çok coğrafyada farklı ülkede de yetişebilmektedir.

Pek çok ülkenin resmi tıbbında kullanılan *Herniaria glabra* bu bağlamda yapılan araştırmalarda idrar yolu enfeksiyonu [31], diyabet, hipertansiyon [32], ürolitiazis [33] gibi hastalıklarda olumlu etkileri kanıtlanmış bir bitkidir. Aynı zamanda farmakolojik üstün niteliklerinin yanı sıra Bolu'nun Kıbrısçık ilçesinde yerel halk tarafından yoğurt mayası olarak kullanıldığı bildirilmekte ve bu özelliği konakçısı olabileceği bakteriler konusunu daha da dikkat çekici hale getirmektedir.

1.2. PROBİYOTİK BAKTERİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Laktik asit bakterileri (LAB) ilk olarak 1907'de kaydedilmiş olup başlangıç kültürleri olarak kullanılmakta ve uzun süredir gıda katkı maddeleri ile sağlığı geliştiriciler olarak uygulanmaktadırlar [34]. Ancak günümüzde insanlar ve endüstri için kullanılan probiyotiklerden daha fazlası ve çeşitlisi önem arz etmektedir. Bu nedenle,

probiyotiklerin uygulama spektrumunu ve bunların gıda ve tarımdaki uygulamalarını zenginleştirmek için farklı probiyotiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bir bakterinin probiyotik olarak kabul edilebilmesi için bir takım önemli özelliklere sahip olması gerekir. Bu özellikler arasında;

- Patojenik olmamaları,
- Toksin üretmemeleri,
- Gastrointestinal sistem koşullarına dirençli olmaları (düşük pH, safra tuzu, pepsin, pankreatin),
- Konak canlıda bağırsak hücrelerine adhezyon gösterebilmeleri,
- Antibiyotiklere duyarlı olması gerekmektedir [35].

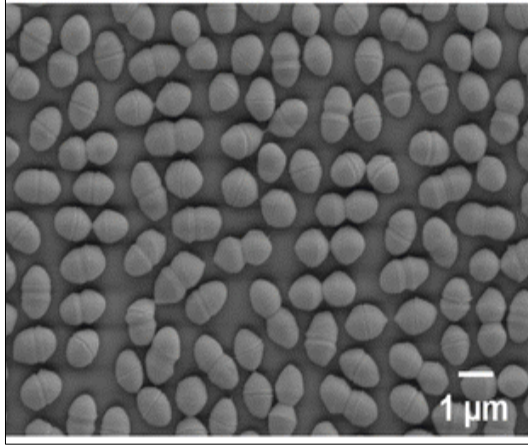
Probiyotik olarak değerlendirilen mikroorganizmalar arasında *Lactobacillus* türleri en sık kullanılan türlerdir. Bunun yanı sıra *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Saccharomyces*, *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* ve *Enterococcus* cinslerinin bazı türleri de probiyotik olarak değerlendirilen bakteriler arasında yer almaktadır [36]. Bu bağlamda, bu çalışmada probiyotik cinsler içerisinde yukarıda sıralanan *E. mundtii* ve *P. pentosaceus* türlerinin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

1.2.1. *Enterococcus mundtii*

Probiyotik türler arasında yer alan *Enterococcus* spp. daha önceleri *Streptococcus* cinsinin bir parçası olarak kabul edilse de patojenitenin yanı sıra pek çok faydalı etkileri de bulunan bu mikroorganizmalar ayrı bir başlık altında ele alınmaktadır [37]. Laktik asit bakterileri grubuna dahil olan enterokoklar 20'den fazla tür içerip çeşitli yararlı etkilere sahip oldukları görülmektedir. Su, toprak, fermente gıdalar ve süt ürünleri gibi çok çeşitli konakçıda ve bağırsak mikrobiyotasında büyük ölçüde değiştirilmiş üyeleri çağlar boyunca evrimleşmiştir. *E. faecium* ve *E. faecalis* gıdalarda en yaygın bulunan türlerdir. Aynı zamanda yüksek asit ve tuz toleransı nedeniyle enterokoklar süt ürünleri sektöründe başlangıç kültürleri olarak gıda fermantasyonları için kullanılabilirler.

Enterokokların organik asitler, hidrojen peroksit ve enterosinler olarak adlandırılan antibakteriyel peptitler (bakteriyosinler) ürettikleri bilinmektedir [38]. Bu grubun bir üyesi olan *E. mundtii* ise % 38 ila % 39 arasında değişen düşük GC içeriğine sahiptir. Katalaz ve sitokrom-C oksidaz enzimlerinden yoksun olmasının yanı sıra, laktik asit üretmek için karbonhidrat fermantasyonuna katkıda bulunabildiği bildirilmiştir.

Fakültatif anaerob özellikteki bu koklar Şekil 1.3'te de görüldüğü üzere tipik olarak tek başına, çiftler halinde veya zincirler halinde bulunmaktadır.

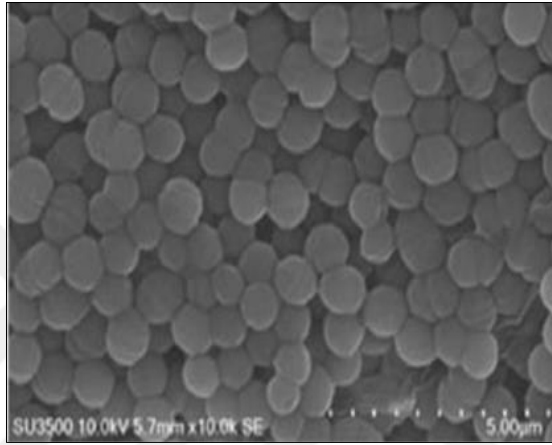


Şekil 1.3. *E. mundtii* bakterisinin taramalı elektron mikrosafı (SEM görüntüsü) [39]

Enterokoklar, 60°C'de 30 dakikaya kadar canlı kalabilen, spor oluşturmeyan bakterilerdir. Çoğu tür, 35-37 °C'de optimum büyüme göstermektedir [40]. *Enterococcus* sp. arasında *E. mundtii* çiğ süt, bitkiler, insan ve hayvan bağırsak yolları ile ilişkilendirilmiştir. *E. mundtii* bakterisinin peynirin olgunlaşması, aroması ve lezzet oluşumunda rol oynadığı ve süt ürünlerinde önemli folat üretimi kaynakları oldukları bilinmektedir [41], [42]. Nükleotitler, amino asitler, hücre bölünmesi gibi pek çok temel hücre fonksiyonu için gerekli olan folat memeli hücrelerinde üretilemez [43]. Bu bağlamda gıdadaki mevcudiyetleriyle folat eksikliğinde ortaya çıkabilecek alzheimer hastalığı ve kalp hastalıkları gibi olumsuzluklara karşı koruyucu etkilerinden bahsedilebilmektedir. Ek olarak ürettikleri bakteriyosin metabolitleriyle de anti-patojenik etki ve gıda koruması işlevi göstermektedir [38] [44]. *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Acinetobacter* ve *Lactobacillus* vb. bakterilere karşı oldukça aktif olan Bacterocin ST15 gibi enterosinler üretmektedir [45], [46], [47]. Yapılan çalışmalarda *E. mundtii* bakterisine ait bakteriyosinlerin ineklerde mastitisin önlenmesinde kullanıldığı bildirilmektedir. Örneğin bu kapsamda yapılan bir çalışmada *E. mundtii* H81 bakterisinin *S. aureus* tarafından indüklenen bir fare mastitis modeli üzerinde koruyucu etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar, *E. mundtii* H81'in tarafından meme bezi dokusundaki patojenik hasarın iyileştirdiğinden inflamatuvar hastalıkların tedavisi için makul bir probiyotik referans olarak görülebileceğini öne sürülmektedir [48].

1.2.2. *Pediococcus pentosaceus*

LAB içerisinde yer alan *P. pentosaceus*, fakültatif anaerobik bir bakteri olup kok şeklinde, hareketsiz ve homofermentatif özelliklere sahiptir [49]. *Pediococcus*, Lactobacillacea familyasına ait Gram pozitif laktik asit bakterilerinin bir cinsi olup, *Pediococcus acidilactici*, *P. claussenii*, *P. dextrinicus*, *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus* ve *P. pentosaceus* türlerinden oluşmaktadır [51]. Şekil 1.4'de görülen *P. pentosaceus* bakterisinin hayvan büyüme biyopromotörü ve bir probiyotik olarak fermantasyonda kullanılabileceği yapılan bazı çalışmalar ile kanıtlanmıştır [52].



Şekil 1.4. *P. pentosaceus* bakterisinin taramalı elektron mikrografı (SEM görüntüsü)
[50]

Günümüzde ise *P. acidilactici* ve *P. pentosaceus* türlerinin etlerin, sebzelerin, silajın fermantasyonu ve peynir üretimi için yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir [53]. Literatürde, yapılan çalışmalarda, *in vivo* olarak kolesterol düşürücü etkisi [54], immünomodülatör etkisi [55] ve anti-enflamasyon etkileriyle *P. pentosaceus* bakterisinin bir probiyotik aday olarak değerlendirilebileceğini öne süren kanıtlar bulunmaktadır. İlave olarak *P. pentosaceus* bakterisinin Amerika Birleşik Devletleri, Çin Tayland, Avrupa Birliği, Avustralya ve Yeni Zelanda'da bir hayvan yemi katkı maddesi olarak onaylandığı bilinmektedir [56]. Ek olarak literatüre bakıldığında, bakterinin; yiyeceklerin lezzet dinamiği üzerine iyileştirici etkisi [57], [58], biyolojik büyüme ve depolamayı teşvik etmesi [59], [60], enflamasyonu engellemek [61], [62], bazı suşlarında antioksidan etkilerinin doğrulanması [63], [64], antikanser özellik göstererek CRC'yi inhibe etmek, panzehir etkisi göstererek toksik maddeleri antagonize etmek gibi pek çok faydalı etkilerinin doğrulandığı gösterilmiştir [65].

1.3. AMAÇ

Günümüzde, probiyotiklerin uygulama spektrumunu genişletmek ve gıda, sağlık, tarım gibi uygulama alanlarını zenginleştirmek için farklı bakteri türlerinin keşfedilmesi gerekmektedir [65]. Bununla birlikte, her geçen gün gelişen dünyayla birlikte insan sağlığı için, halihazırdaki tedavi yöntemlerine ek veya daha dinamik farklı potansiyel tedavi araçları geliştirmek oldukça elzemdir. Antikanser, antimikrobiyal, immunomodulator, antioksidan gibi terapötik etkilerinin yanında probiyotikleri fermente edilmiş süt ürünleri dışındaki doğal bir bitki kaynağı üzerinden elde ederek kaynak alternatifini sunmak amacıyla tasarlanan bu çalışmada, bulunduğu lokasyonda (Bolu, Kıbrısçık) yerel halk tarafından yoğurt mayalama aracı olarak kullanıldığı bilinen *Herniaria glabra* bitkisinin probiyotik bakteri içeriğinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda bu çalışmada sırasıyla;

- Yerel halk tarafından yoğurt yapımında kullanıldığı bilinen *Herniaria glabra L.* bitkisinden bakteri izolasyonunun yapılması,
- İzole edilen bakterilerin probiyotik özelliklerinin incelenmesi,
- Probiyotik potansiyeli olan bakterilerin moleküler karakterizasyonu,
- Ve güçlü probiyotik adayları oldukları tespit edilen bakterilerin in vitro olarak oluşturulan yara üzerindeki iyileştirici etkisinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. BİTKİ ÖRNEKLERİNİN ELDESİ

Bitki örnekleri ağustos ayında Bolu ilinin Kıbrıscık ilçesinden temin edilerek steril falkonlar ile laboratuvara taşınmıştır. Bitki, Dr. Öğr. Üyesi Didem Ambarlı tarafından *Herniaria glabra* L. olarak tanımlanmıştır. Örnek yüzeyinden steril swap yardımıyla doğrudan sürüntü ekim ve yıkama ekimi gerçekleştirilmiştir. Yıkama ekim için bitkinin yaprakları bölünerek öncelikle tween 80 ce distile su ile 10 dakika muamele edilmiştir. Daha sonra örnek 10 dakika sodyum hipoklorit bulunan beherde bekletilmiştir. Ardından 1 dakika boyunca % 70 etanol ile muamele edilmiştir. Son olarak steril su ile yıkanarak ve son yıkama sıvısı yapılarak De Man Rogosa ve Sharpe (MRS) Agar, Nutrient Agar, M17 Agar gibi çeşitli besiyerlerine 100 µL den ekim gerçekleştirilmiştir. Örnekler 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

2.2. BAKTERİ İZOLASYONU VE SAF KÜLTÜRLERİN ELDESİ

Örneklerin inkübasyon sonucunda her besiyeri üzerinde gözlenen farklı morfolojideki kolonileri tespit edilmiştir. Bu koloniler ayrılarak saf kültürler elde etmek amacıyla ayrılarak büyüdükleri ilgili agar tipinde tekrar ekimleri gerçekleştirilmiştir. 37 °C de 24 saat inkübasyonun sonucunda saf kültürler sonraki çalışmalarda kullanılmak amacıyla % 20 lik steril gliserol içerikli besiyerinde -20 °C' de stoklanmıştır.

2.3. İZOLATLARIN MORFOLOJİK KARAKTERİZASYONU

Bakteri örneklerinin gram özelliklerini belirlemek amacıyla potasyum hidroksit (KOH) tayini kullanılmıştır. Taze olarak hazırlanan % 3 KOH çözeltisinde bir damla steril pastör pipet yardımıyla lam üzerine damlatılmıştır. Üzerine steril kürdan yardımıyla petriden alınan bakteri örneği koyularak süspanse edilmiştir. Eğer örnek gram negatif özellikte bir bakteri ise peptidoglikan tabakası parçalanarak hücre içeriği dışarı dağılacığından karışım yoğunlaşarak yukarı doğru iplik şeklinde bir uzama göstermektedir. Gram pozitif özellikte bir bakteri ise kalın peptidoglikan tabakasından

dolayı potasyum hidroksit çözeltisi sıvı formunu korur ve uzama gözlenmemektedir. [66]. Buradan yola çıkarak bakterilerin hücre duvar özellikleri tespit edilmiştir.

2.4. İZOLATLARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

2.4.1. İzolatların Genomik DNA İzolasyonu

Bakteri örneklerinin genomik DNA izolasyonu manuel yöntem ile yapılmış olup Pitcher ve arkadaşları (1989) tarafından açıklanan metoda göre gerçekleştirilmiştir [67]. Bakteri örnekleri uygun broth ortamında (Nutrient Broth, M17 Broth, MRS Broth) bir gün önceden 37 °C'de büyütülmüştür. Gece kültürleri DNA izolasyonu için ependorflara aktarılarak 13.000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant kısımları dökülerek pellet üzerine tekrar örnekler eklenip santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Devamında pellet üzerine 500 µL TE tamponu ilave edilerek çözülmüştür. Sonra her tüpe 10 µg lizozim ilave edilerek vortekslendi ve 37 °C'de 1 saat bekletildi. Hücrelerdeki proteinlerin parçalanması için bekleme sonunda her bir örneğe 50 µL %10'luk SDS eklenerek 37 °C'de 30 dakika daha beklemeye bırakılmıştır. Ardından 3M 0,1 hacimde sodyum asetatın 55 µL ilave edilerek 65 °C'de 30 dakika her 10 dakikada bir alt üst edilerek hücre parçalanması gerçekleştirilmiştir. Üzerine 500 µL fenol:kloroform:izomil alkol ilave edilmiştir. Alt üst edilen örnekler 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst kısımdaki şeffaf bölüm alınarak yeni steril tüplere aktarılmıştır. Ek olarak tüplere 500 µL kloroform eklenir ve alt üst edilerek 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Yine üst kısım yeni tüplere alınarak üzerine 1/10 hacim sodyum asetat ve 2 hacim % 96'lık etanol ilave edilerek -20 °C'de 45 dakika bekletilerek beklemenin ardından örnekler 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek üst kısımdaki sıvılar boşaltılmıştır. Kalan pellete 500 µL % 70'lik etanol (-20°C) eklenerek tekrar 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Üst sıvı uzaklaştırılarak pelletler açık havada kurutulmuştur. Elde edilen DNA pelleti 100 µL distile su (dH₂O) ile çözülmüştür. DNA örneklerinin varlığını doğrulamak amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Doğrulan DNA örnekleri devam çalışmalarında kullanılmak amacıyla +4 °C' de saklanmıştır.

2.4.2. Agaroz Jel Elektrofözezi

Elde edilen DNA örneğlerinin ilk aşamada varlığını doğrulamak, yapılan devam çalışmalarıyla PCR sonucunda ise DNA fragment büyüklüğünü görmek adına agaroz jel elektrofözezi yönteminden yararlanılmıştır. Steril bir erlen içerisine 0,4 G agaroz tartılarak eklenmiştir. Üzerine 50ml tampon 1xTAE ilave edilmiştir. Karışım kaynayanaya dek ısıtılıp devamında soğuduktan sonra çeker ocak altında üzerine 5 µL Etidyum bromür (EtBr) eklenmiştir. Tarakları takılmış elektroföze tankına dökülerek donması beklenerek ardından tarak yardımıyla jelde oluşturulan kuyucuklara DNA yüklemesi gerçekleştirilmiştir. Yükleme için 5 µL loading dye ile 5 µL DNA örneği bir tüpte hazırlanarak kuyulara yüklenerek işlemin ardından UV altında DNA görüntülenerek doğrulanmıştır. Marker olarak ise Thermo Scientific Gene Ruler 100bp kullanılarak ilk kuyucuğa yüklenmiştir.

2.4.3. İzolatların 16S rDNA Gen Analizleri

Bakteri örneğlerinin manuel DNA izolasyonu sonucu elde edilen genomik DNA'larının 16S rDNA bölgesinin çoğaltılması için PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizi yapılmıştır. Örneğlerin PCR analizini gerçekleştirmek amacıyla thermal cycler block (Thermo, 5020) cihazı kullanılmış olup hazırlanan 50 µL hacimdeki PCR mix içeriği ve PCR program şartları aşağıda verilmiştir (Çizelge 2.1, 2.2 ve 2.3). Reaksiyon sonucunda örneğler yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan agaroz jel de yürütülerek görüntüleme sağlanmıştır. Jele yüklenen marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo) dikkate alınarak DNA molekül büyüklüğü gözlenmiştir. PCR örneğleri +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 2.1. Kullanılan primerler

Ad	Uzunluk (bp)	Tm (°C)	GC İçeriği (%)	Dizi
16s rDNA Forward	24	47	38	5'-ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA-3'
16s rDNA Revers	27	59	59	5'-ATG GTA CCG TGT GAC GGG CGG TGT GTA-3'

Çizelge 2.2. PCR reaksiyonunda kullanılan mix içeriği

İçerik	Miktar
dH ₂ O	36 µL
Tampon	5 µL
MgCl ₂	3 µL
Primer R	1,25 µL
Primer F	1,25 µL
dNTP	1 µL
Enzim	0,5 µL
DNA	2 µL
Toplam	50 µL

Çizelge 2.3. PCR program koşulları

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	95 °C	2 dakika
2	36	94 °C	1 dakika
		50 °C	1 dakika
		72 °C	2 dakika
3	1	72 °C	5 dakika

2.4.4. Elde Edilen DNA Baz Dizilimlerinin Analizi

Elde edilen DNA fragmentlerin dizilenmesi Letgen Biyoteknoloji (İzmir, Türkiye) tarafından gerçekleştirilmiştir. 16S rDNA gen dizilerinin GenBank veri tabanındaki girişlerle karşılaştırılması için National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri tabanındaki Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı kullanılmıştır. Filogenetik analiz Neighbor-Joining metodu kullanılarak MEGA 5 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir [68].

2.5. BAKTERİYAL İZOLATLARIN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

2.5.1. Düşük pH Toleranslarının Belirlenmesi

Örneklerin düşük pH direnç özelliklerinin belirlenebilmesi için HCL yardımı ile pH seviyeleri 1, 2 ve 3'e ayarlanmış PBS (PBS: % 0,024 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), % 0,144 disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), % 0,02 g potasyum klorür (KCl), % 0,8 g sodyum klorür (NaCl) tamponu kullanılmıştır. İlk olarak bir gün öncesinden 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılan örnekler pH değeri 7,2 olan PBS tamponu ile iki kez yıkanmıştır. Üst kısım uzaklaştırılarak deney gruplarına pH değeri 1, 2 ve 3 olarak ayarlanmış PBS tamponlarından 1 ml ilave edilip çözülmüştür. Ardından 37 °C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0., 1. ve 3. saatlerinde örneklerin seri dilüsyonları yapıp 10^5 oranındaki seyreltiklerinden 100 µL MRS Agara ekim gerçekleştirilmiştir. Ayrıca inkübasyonun 0, 1 ve 3. saatlerinde örneklerin 600 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır [69].

2.5.2. Pepsin Toleransının Belirlenmesi

Bakteri örneklerinin pepsine karşı direnç özelliklerinin belirlenmesi için 3g/L pepsin içeren pH 2 ve pH 3 değerinde hazırlanan PBS çözeltisi kullanılarak in-vitro koşullarda gastrik ortamın sağlanması amaçlanmıştır. Çözeltiler 0,22 µm mikro filtreler yardımı ile sterilize edilmiştir. Bir gün önceden 37 °C'de 24 saat büyümeye bırakılan aktif bakteri kültürlerinden 1ml alınarak ependorflara aktarılmış ve 10000 g'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülüp üst faz uzaklaştırılmıştır. Örnekler iki kez pH değeri 7.2 olan PBS tamponu ile aynı şekilde santrifüj edilerek yıkanmış ve üst faz tekrar uzaklaştırılarak örneklerin üzerine pepsin içeren PBS çözeltileri (pH2 ve 3) eklenmiştir. 37 °C'de 3 saat boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyonun her saat aralığında 0, 1 ve 3. saatlerde örneklerden alınan numunelere seri dilüsyonlar yapılarak 10^5 seyreltikleri için MRS Agar ortamına ekim gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrik ölçüm için inkübasyonun 0, 1 ve 3. saatlerinde örneklerin 600 nm'deki absorbans değerleri kaydedilmiştir [69].

2.5.3. Pankreatin Toleransının Belirlenmesi

Bakteri örneklerinin pankreatine karşı toleranslarının belirlenmesi amacıyla 1g/L pankreatin içeren PBS (pH 8) çözeltisi kullanılmıştır. Çözelti 0.22 µm mikro filtreler

yardımıyla sterilize edilmiştir. Bakteri kültürlerinden 1 ml alınarak 10000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. İşlem iki kez tekrarlanarak üst faz uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine pankreatin içeren PBS tamponu ilave edilerek örnekler 4 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0. ve 4. Saatlerinde örneklerin seri dilüsyonları yapıp 10^5 seyreltiklerinden, 100 µL alınıp MRS Agar ortamına ekimleri gerçekleştirilmiş ve ekimler 37 °C'de 24 saat koloni gelişimi için inkübasyona bırakılmıştır [69].

2.5.4. Safra Tuzu Toleransının Değerlendirilmesi

Örneklerin safra tuzuna karşı direnç profilinin değerlendirilmesi amacıyla % 0,3; % 0,5 ve % 1 (w/v) oranında safra tuzuyla zenginleştirilmiş MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. Bir gün önceden 37 °C'de 24 saat büyümeye bırakılan aktif bakteri örneklerinden 1 ml alınarak 10000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak, pellet iki kez PBS (pH 7,2) tamponu ile tekrar santrifüj edilerek yıkanmıştır. Pelletler % 0,3; % 0,5 ve % 1 oranında safra tuzu içeren MRS besiyeri ortamında çözülerek 37 °C'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0. Ve 4. Saatlerinde kontrol ve deney gruplarından örnekler alınarak seri dilüsyonları yapıp 10^5 seyreltiklerinin MRS katı besiyerine ekimleri gerçekleştirilmiştir. Örnekler, 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır [69].

2.6. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ

Bakteri izolatlarının inhibisyon etkisini değerlendirmek için, özellikle bağırsak florasında negatif etkilere sahip olan başta *Escherichia coli* olmak üzere Çizelge 2.4'de yer alan test mikroorganizmalarına karşı agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Yöntem iki aşamadan meydana gelmektedir. İlk aşamada, bakteri örnekleri 37 °C'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun 24., 48. ve 72. saatlerinde kültürlerden örnekler alınarak 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Elde edilen süpernatantlar filtreden geçirilerek +4°C'de muhafaza edilmiştir. İkinci aşamada ise; Çizelge 2.4'de yer alan 12 bakteri ve 2 adet maya olmak üzere toplamda 14 test mikroorganizması spesifik besiyerlerinde 37 °C 16-18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından İndikatör mikroorganizmalar 1×10^8 koloni oluşturan birim (CFU)/mL olacak şekilde dilüe edilmiştir ve dilüsyonlardan agar ortamına 100 µL olacak şekilde yayılmıştır. Ekimi yapılan katı besiyerleri üzerine kuyucuklar açılmış ve

bu kuyucuklara 100 µL olacak şekilde birinci aşamada anlatıldığı şekilde elde edilen süpernatantlar yüklenmiştir. Ardından besiyeri test mikroorganizmalarının gelişimi için 37 °C’de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar etrafında oluşan inhibisyon zonları değerlendirilmiştir [70].

Çizelge 2.4. Test mikroorganizmaları

Test Mikroorganizmaları	Kaynak
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATCC 911
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 13315
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028
<i>Candida parapsilosis</i>	Klinik izolat

2.7. PROBİYOTİK ÖZELLİK GÖSTEREN BAKTERİYAL İZOLATLARIN GÜVENLİK DEĞERLENDİRMESİ

Bir probiyotik adayı suşun seçiminde güvenliğinin değerlendirilmesi amacıyla suşun çeşitli klinik antibiyotiklere duyarlılığı ve gama hemolitik özellikte olması beklenmektedir.

2.7.1. Hemolitik Aktivite Testi

Hemolitik aktivite testi için, % 5 insan kanı içeren Colombia Agar ortamına 37 °C’de aktiveleştirilen izolatın çizgi ekimi yapılmış ve yine 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonucunda koloni etrafında parlak yeşil zon oluşturan

koloniler α -hemolitik, berrak zon oluşturanlar β -hemolitik, zon oluşturmayanlarsa γ -hemolitik olarak değerlendirilmiştir [71].

2.7.2. Antibiyotik Duyarlılığın Belirlenmesi

Probiyotik suş olarak değerlendirilecek bakterinin antibiyotik direnç profili güvenlik açısından önem taşımaktadır. Bu bağlamda bakteriyal izolatların antibiyotik duyarlılığının belirlenebilmesi için antibiyotik disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Öncelikle probiyotik özelliği test edilen bakteriyal izolatların taze kültürünün hücre yoğunluğu 10^8 CFU/mL olacak şekilde ayarlanmış ve 100 μ L'si MRS Agar besiyerine yayılmıştır. Ardından Çizelge 2.5'de görülen sekiz farklı antibiyotik diski agar üzerine yerleştirilerek, 37 °C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonucunda antibiyotiklere karşı bakterin oluşturduğu zon çapları ölçülerek duyarlılık oranları belirlenmiştir [72].

Çizelge 2.5. Kullanılan antibiyotik çeşitleri

Antibiyotik	Disk Miktar	Marka
İmipenem/silastatin (IMC20)	10/10 μ g	Bioanalyse
Tobramisin (TOB30)	30 μ g	Bioanalyse
Azitromisin (AZM30)	30 μ g	Bioanalyse
Gentamisin (CN30)	30 μ g	Bioanalyse
Eritromisin (E15)	15 μ g	Oxoid
Siprofloksasin (CIP30)	30 μ g	Bioanalyse
Sefdinir (CD30)	30 μ g	Bioanalyse
Streptomisin (S25)	25 μ g	Bioanalyse

2.8. PROBİYOTİK ÖZELLİK GÖSTEREN BAKTERİYAL İZOLATLARIN AGREGASYON ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Probiyotik aday bakteri örneklerinin bağırsağa ulaştığında burada kolonize olabilmeleri ve patojen mikroorganizmaları ortamdaki dışlamaları gerekmektedir. Örneklerin bu özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla *in vitro* olarak bakterilerin oto-agregasyon ve ko-agregasyon yetenekleri değerlendirilmektedir.

2.8.1. Otoagregasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteriyal izolatların otoagregasyon özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla probiyotik özelliği test edilen bakteriyal izolatlar MRS sıvı besiyerinde 37 °C’de 16-18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonucunda kültürler 5000 rpm’de 15 dakika +4°C santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak bakteriler pH 7.2 olan PBS tamponu ile iki kez yıkama işlemine tabi tutularak santrifüj ile çöktürülmüştür. Pelletler PBS tamponu ile süspanse edilerek konsantrasyonlar spektrofotometre yardımıyla 600 nm’de 0.6 olacak şekilde dilüe edilmiştir. Dilüe edilen bakteri örneklerinden 2 şer mL alınarak vortekslenmiştir. Devamında tüpler 37 °C’de 4 saat boyunca hareketsiz olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon öncesi örneklerin OD₆₀₀ değerleri spektrofotometre ile tespit edilmiştir. Bekletme süresinin sonunda örnek tüplerinden hareketsiz bir şekilde 0,3 mL alınarak PBS çözeltisi ile 3 mL olacak şekilde tamamlanıp OD₆₀₀ değerleri kaydedilmiştir. Örneklerin otoagregasyon değerlerinin yüzde olarak belirlenmesi için aşağıdaki formül kullanılmıştır [73];

$$\% \text{ Otoagregasyon} = [(OD1 - OD2)/OD1 \times 100]$$

(2.1.)

OD1: İnkübasyon öncesi optik yoğunluk, OD2: İnkübasyon sonrası optik yoğunluk

2.8.2. Koagregasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteri örneklerinin koagregasyon özelliklerinin değerlendirilmesinde *E. coli* ve *L. monocytogenesis* bakterileri kullanılmıştır. Probiyotik özelliği test edilen bakteriyal izolatlar ve patojen mikroorganizmalar MRS/NB sıvı besiyerinde 37 °C’de 16-18 s inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonucunda kültürler 5000 rpm’de 15 dakika +4°C’de santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatant kısım uzaklaştırılarak pellet iki kez PBS tampon ile yıkanmıştır. Ardından pelletler yine PBS tampon içerisinde çözdürülerek konsantrasyonları 600 nm’de 0.6 olacak şekilde spektrofotometre yardımıyla dilüe edilmiştir. Dilüe edilen patojen mikroorganizmalar ile probiyotik özelliği test edilen bakteriyal izolatlardan 1 er mL alınarak her izolat için farklı tüplerde patojen ile karışık bakteri kültürleri oluşturulmuş ve vorteks yapılmıştır. İnkübasyon öncesi OD₆₀₀ değerleri tespit edilmiştir. Devamında tüpler 37 °C’de 4 saat hareketsiz olarak inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hareketsiz bir şekilde üst fazdan 0,3 mL

alınarak PBS ile 3 mL olacak şekilde tamamlanmış ve inkübasyon sonrası 600 nm’de OD değerleri tespit edilmiştir [73]. Kör olarak yalnızca PBS çözeltisi içeren tüp esas alınmıştır. Örneklerin koagregasyon değerlerinin yüzde olarak belirlenmesi için aşağıdaki formül kullanılmıştır

$$\% \text{ Koagregasyon} = \frac{(OD1+OD2)-2(OD3)}{OD1+OD2} \times 100 \quad (2.2.)$$

OD 1: İnkübasyon öncesi örnek optik yoğunluk, OD 2: İnkübasyon öncesi patojen optik yoğunluk, OD 3: inkübasyon sonrası örnek + patojen mikroorganizma optik yoğunluk

2.9. PROBİYOTİK ÖZELLİK GÖSTEREN BAKTERİYAL İZOLATLARIN ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Öncelikle MRS broth’a inoküle edilen probiyotik özelliği test edilen bakteriyal izolatlar 37 °C’de 16-18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası elde edilen bakteri kültürü 5000 rpm’de 15 dakika +4 °C’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak elde edilen pellet iki kez pH 7,2 PBS tampon ile yıkanmış ve bakteriyal pellet hücre yoğunluğu 10⁸ CFU/mL olacak şekilde pH 7,2 PBS ile dilue edilmiştir. Ardından 0,002 g DPPH alınarak 100 ml metanolde çözülmüştür. Dilüe edilen 0,8 ml bakteri kültüründen alınarak üzerine 1ml DPPH çözeltisi ilave edilmiştir. Karışım vortekslenerek oda sıcaklığında, 30 dakika, karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Kör olarak PBS, negatif kontrol olarak ise PBS ve DPPH çözeltileri kullanılmıştır [74]. Reaksiyon süresi sonunda tüplerdeki DPPH serbest radikalinin mor renginin laktik asit bakterileri tarafından giderilmesine göre antioksidan aktivite yorumlanmış ve inkübasyonun sonunda OD₅₁₇ nm’deki absorban değerleri kaydedilerek % DPPH serbest radikali süpürme kapasitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ DPPH süpürme kapasitesi} = \frac{1-OD2}{OD1} \times 100 \quad (2.3.)$$

OD1: Kontrolün (PBS+ DPPH) optik yoğunluğu; OD2: Probiyotik özelliği test edilen bakteriyal izolatın optik yoğunluğu

2.10. PROBİYOTİK ÖZELLİK GÖSTEREN BAKTERİYAL İZOLATLARIN YARA İYİLEŞTİRME ETKİSİ

Probiyotiklerin bilindiği üzere hücreler üzerinde immunomodülatör etkileri kanıtlanmıştır. Bu doğrultuda probiyotik aday olduğu düşünülen bakteri örneklerinin hücre kültürü ortamında *in vitro* olarak oluşturulan yara modeli üzerindeki iyileştirici etkisini test etmek amaçlanmıştır.

2.10.1. Bakteriyal Kültürün Hazırlanması

Bu çalışmada probiyotik özellik gösteren bakteriyal izolatların canlı hücre ve lizat olmak üzere iki farklı şekilde örnekleri hazırlanmıştır. Canlı hücre örnekleri; probiyotik özellik gösteren bakteriyal izolatlar MRS Broth besi ortamında 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi sonucunda kültürler 5000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak pellet üzerine 5 mL PBS ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra tüpün içindeki bakteriyal pellet PBS çözeltisi ile homojenize edilerek bakteriyal konsantrasyon 10^8 , 10^9 ve 10^{10} hücre/mL olacak şekilde üç farklı konsantrasyon elde edilmiştir [75]. Lizat örnekleri; canlı hücre eldesinde anlatıldığı gibi elde edilen 10^8 , 10^9 ve 10^{10} hücre/ml olmak üzere üç farklı konsantrasyonda hazırlanan vejetatif hücrelerden alınan örnekler 15 saniye sonikasyona tabi tutulmuş ve hemen ardından 15 saniye de buzda bekletilmiştir. İşlem bu sıra ile 25 tekrar olarak uygulanmıştır [76]. Son olarak elde edilen lizatlar 0,22 µm filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

2.10.2. *In vitro* Yara İyileştirme Testi

In vitro olarak yara iyileştirme testinde fare fibroblast (L929) hücreleri kullanılmıştır. Hücreler, RPMI 1640 içerisine % 10 FBS (fetal bovin serumu), % 1 L-Glutamin, % 1 antibiyotik (penisilin/streptomisin) eklenerek hazırlanmış besi ortamı içinde flasklarda, 37 °C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde geliştirilmiştir. Hücreler 12 kuyulu kültür kabı için her birine 2×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde sayılarak kuyulara eklenmiştir. Ardından hücreler 24 saat süresince 37 °C'de % 5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. Ardından besi ortamı uzaklaştırılmış ve *in vitro* yara modeli oluşturmak amacıyla steril 200 µL pipet ucu kullanılarak kuyucuklarda çizik oluşturulmuştur. Kuyular hücre kalıntılarının uzaklaştırılması için steril PBS ile nazıkçe yıkanmıştır. 10^8 , 10^9 ve 10^{10} hücre/ml yoğunluktaki canlı bakteri örneklerinden ve lizat örneklerinden, 10 µL ve 990 µL

besiyeriden olacak şekilde kuyucuklara eklenmiş ve plateler 37 °C, % 5 CO₂ inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar, dijital kamera sistemi kullanılarak kaydedilmiştir. Yaraların kapanma yüzdesinin hesaplanmasında oluşan hücre göçü ile yara kapanma miktarı, yara iyileşme deneylerini otomatik olarak analiz etmek için geliştirilmiş bir yazılım aracı olan Image J programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir [77].

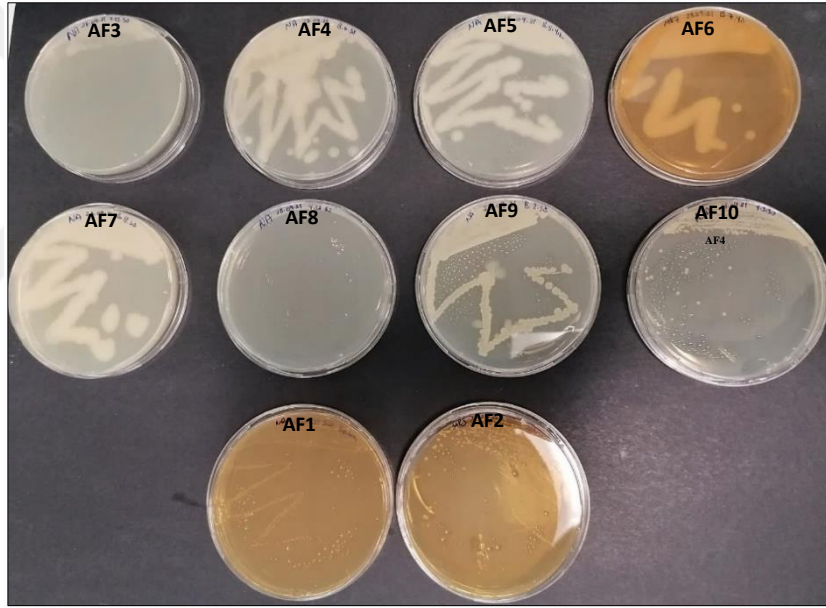


3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. VERİLER

3.1.1. Bakterilerin İzolasyonu

Çalışmanın sonucunda, bitki örneklerinden 10 farklı morfolojide bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunlardan 7 tanesi Nutrient Agar, 1 tanesi M17 Agar ve 2 tanesi MRS Agar ortamında izole edilmiştir. Şekil 3.1'de katı besiyeri ekimleri verilen bakteriler AF1, AF2, AF3, AF4, AF5, AF6 AF7, AF8, AF9 VE AF10 şeklinde numaralandırılmıştır.



Şekil 3.1. Bakteriyal izolatların koloni morfolojileri

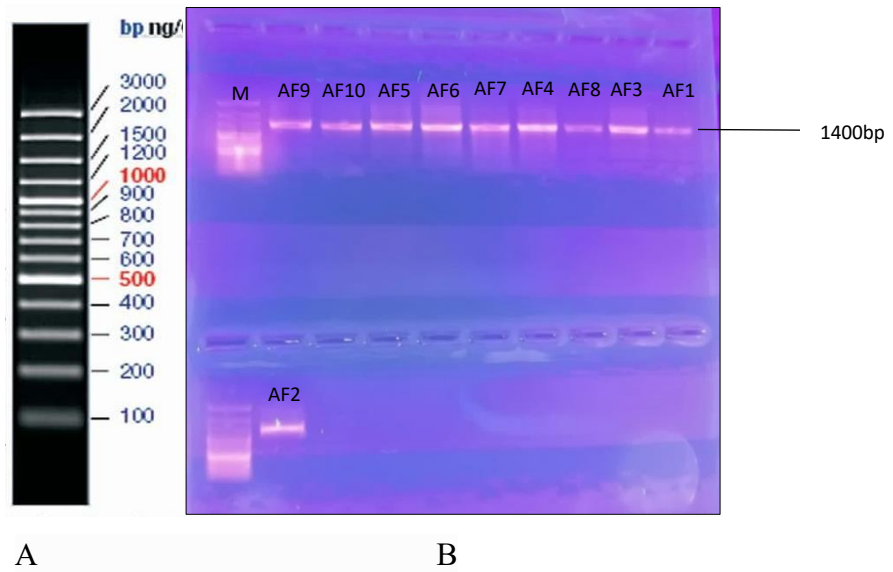
İzole edilen bakterilerin morfolojik karakterizasyon, gram özellik ve hücre morfolojisi verilerini içeren Çizelge 3.1 aşağıda bulunmaktadır.

Çizelge 3.1. Bakteriyal izolatların morfolojik karakterizasyonu

Bakteri Örneği	Gram Özelliği	Koloni Morfolojisi	Hücre Morfolojisi
Bakteri AF1	+	Beyaz, düzgün kenarlı, küçük, yuvarlak	Kok şeklinde, çiftler halinde veya zincir formunda
Bakteri AF2	+	Beyaz, düzgün kenarlı, yuvarlak	Kok şeklinde, hareketsiz
Bakteri AF3	+	Beyaz	İpliksi yapıda,
Bakteri AF5	+	Beyazımsı, opak, yuvarlak, büyük ve yoğun	Çubuk şeklinde, opak, krem rengi
Bakteri AF8	+	Beyaz, yuvarlak, küçük	İpliksi
Bakteri AF9	+	Sarı, düzensiz yuvarlak kenarlı	Opak, kok şeklinde, düzgün kenarlı
Bakteri AF10	+	Beyaz, yuvarlak, küçük	Kok şeklinde, tek veya çiftler halinde

3.1.2. Bakteriyal İzolatların Tanımlanması

Elde edilen bakteri kültürlerinin tanımlanması amacıyla gerçekleştirilen manuel DNA izolasyonu sonucunda, DNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak PCR analizi yapılmıştır. PCR sonucunda örneklerin DNA varlığı ve baz çifti aralığı (1400bp) agaroz jel elektroforezi yöntemi ile Şekil 3.2’de belirtildiği gibi görüntülenerek doğrulanmıştır.



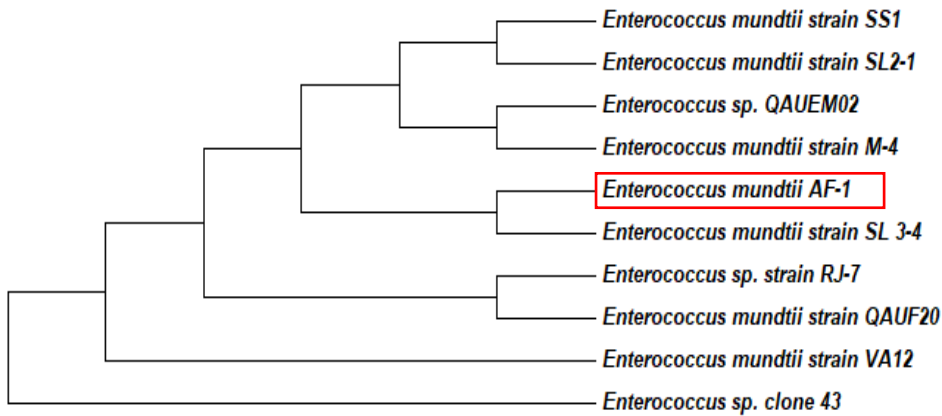
Şekil 3.2. Bakteriyal izolatların PCR profili. A. Marker (M) B. Bakteriyal izolatların 16s rDNA dizisinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

Görüntülenen 1400bp büyüklüğündeki PCR örnekleri dizileme için Letgen Biyoteknoloji (İzmir, Türkiye) merkezine gönderilmiştir. Gönderilen bakteri örneklerinin 7 tanesi ifade edilen yüzdeler oranında tanımlanmıştır. Diğer 3 bakteri ise dizileme sonucunda tanımlanamamıştır. Çizelge 3.2’de tanımlanan izolatların tanımlandıkları bakteri örneğine benzerlik yüzdeleri ifade edilmiştir.

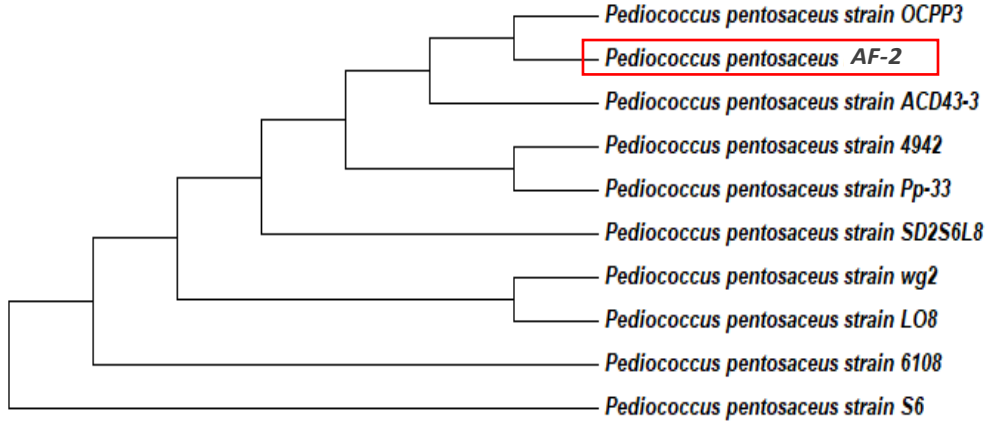
Çizelge 3.2. Tanımlanan bakteriler

Bakteri Örneği	Tanımlanan Bakteri	Benzerlik Yüzdesi
AF1	<i>Enterococcus mundtii</i>	%100
AF2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	%100
AF3	<i>Streptomyces lilaceus</i>	%99.63
	<i>Streptomyces lavendulocolor</i>	%99.61
	<i>Streptomyces luridus</i>	%99.61
AF5	<i>Bacillus thurgiensis</i>	%99.92
AF8	<i>Streptomyces ossamyceticus</i>	%99.84
	<i>Streptomyces torulosus</i>	%99.77
AF9	<i>Bacillus pumilis</i>	%100
AF10	<i>Streptomyces scabies</i>	%100

Bu bakteriler içerisinde iki bakterinin AF1 ve AF2’nin laktik asit bakterisi olduğu belirlenmiş ve bu bakterilerin probiyotik potansiyelleri dikkate alınarak, iki bakteri ile çalışmaya devam edilmiştir. Bu bağlamda öncelikle *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 bakterilerinin filogenetik olarak benzerlikleri tespit edilmesi amacıyla filogenetik ağaç tasarımı yapılmıştır.



Şekil 3.3. *E. mundtii* AF1 için filogenetik ağaç modeli.



Şekil 3.4. *P. pentosaceus* AF2 için filogenetik ağaç modeli

3.1.3. *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

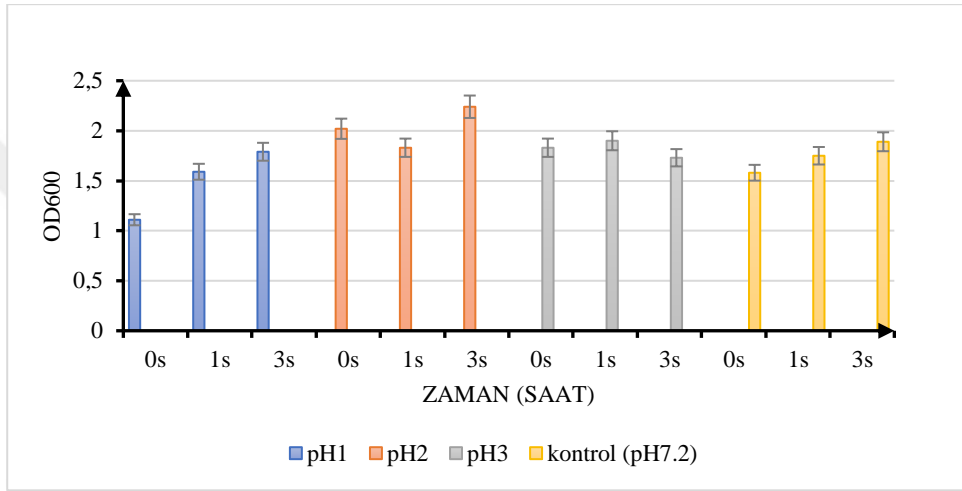
H. glabra bitkisinden izole edilen bakteri örnekleri arasından MRS Agar ortamında gelişen *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 bakterilerinin probiyotik özelliklerini tespit etmek amacıyla aşağıda testler uygulanmış ve bulgular aşağıda ifade edilmiştir. Bakteri örneğini gastrointestinal koşullara maruz bırakmak amacıyla düşük pH, safra, pepsin ve pankreatin içeren ortamlara dair ölçümler aşağıda verilmiştir. Bu koşullara dayanıklılık, probiyotik değerlendirmesinde vücuttaki konumu ve izlediği yolak açısından önem taşımaktadır.

3.1.3.1. Düşük pH Toleranslarının Belirlenmesi

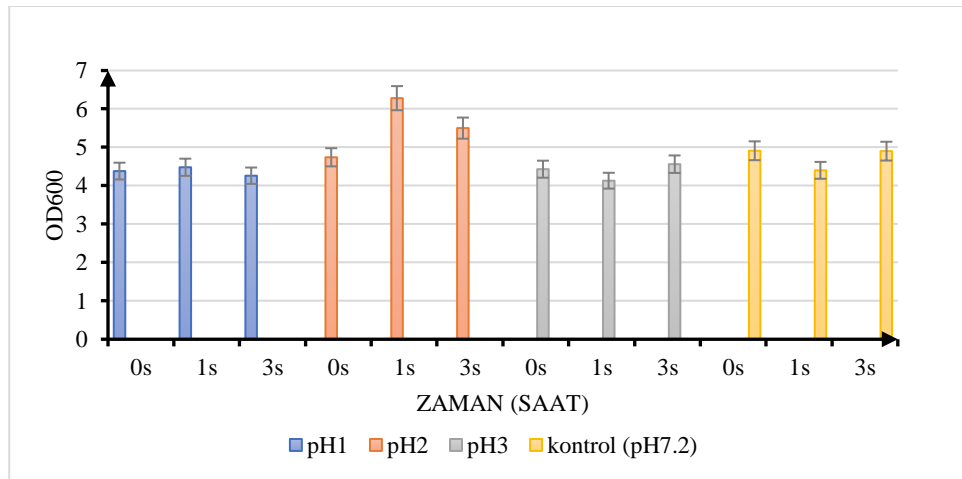
Elde edilen *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 bakteri örneklerinin düşük pH koşullarına karşı direnç profilleri aşağıda spektrofotometrik ve canlı koloni sayısı olarak yansıtılmıştır. Çizelge 3.3’de görüldüğü üzere pH 1 değerinde zamana bağlı olarak her iki bakteri örneğinin de canlı koloni sayılarında düşüş gözlenmiştir. Ancak her iki bakteri örneği için pH1, pH2 ve pH3 olmak üzere üç farklı düşük pH içeren ortamda gelişimin devam ettiği görülmektedir. Bulgular Şekil 3.5 ve 3.6’da spektrofotometrik olarak Çizelge 3.3’ de ise canlı koloni sayısı olarak aşağıda ifade edilmiştir.

Çizelge 3.3. *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 bakterilerine ait pH duyarlılık sonuçları (canlı koloni sayıları)

Bakteri	pH 1			pH 2			pH 3		
	0.saat	1.saat	3.saat	0.saat	1.saat	3.saat	0.saat	1.saat	3.saat
<i>E. mundtii</i> AF1	=26	=3	=0	=155	=177	=3	=171	=158	=203
<i>P. pentosaceus</i> AF2	>300	=5	=5	>300	>300	=30	>300	>300	=300



Şekil 3.5. *E. mundtii* AF1 bakterisine ait pH duyarlılık sonuçları (spektrofotometrik)



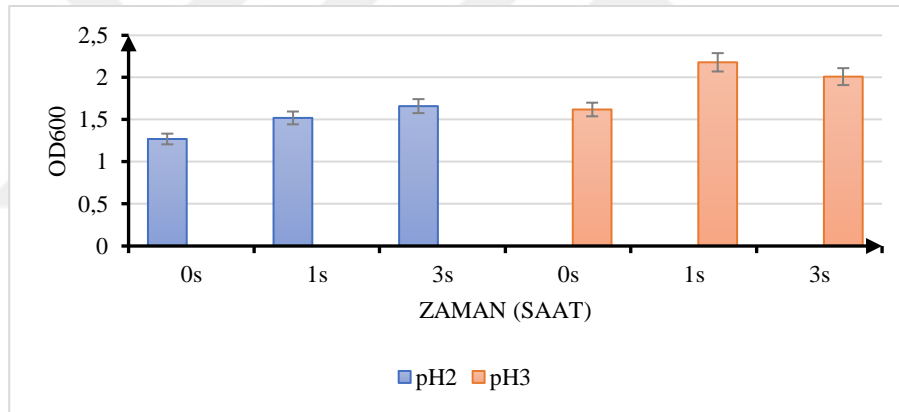
Şekil 3.6. *P. pentosaceus* AF2 bakterisine ait pH duyarlılık sonuçları (spektrofotometrik)

3.1.3.2. Pepsin Toleransının Belirlenmesi

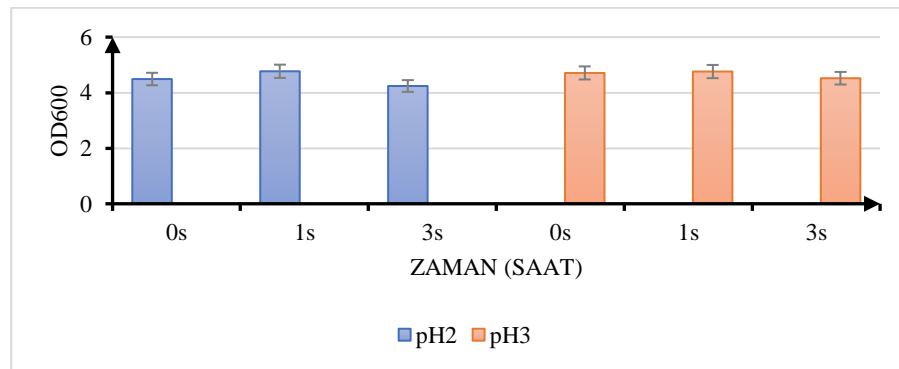
Canlı koloni sayımı açısından *P. pentosaceus* AF2 her iki pH değerinde de Çizelge 3.4’de belirtildiği gibi pepsine yüksek direnç göstermiştir. Spektrofotometrik (Şekil 3.7 ve 3.8) ve koloni sayısı olarak sonuçlar incelendiğinde iki bakteri örneğinin de tüm değerlerde gelişimini sürdürdüğü görülmektedir.

Çizelge 3.4. *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 bakterilerine ait pepsin duyarlılık sonuçları (canlı koloni sayıları)

Bakteri	Pepsin + pH 2			Pepsin + pH 3		
	0.saat	1.saat	3.saat	0.saat	1.saat	3.saat
<i>P. pentosaceus</i> AF2	>300	>300	>300	>300	>300	>300
<i>E. mundtii</i> AF1	=159	=163	=14	=160	=237	>300



Şekil 3.7. *E. mundtii* AF1 bakterisine ait pepsin duyarlılık sonuçları (spektrofotometrik)



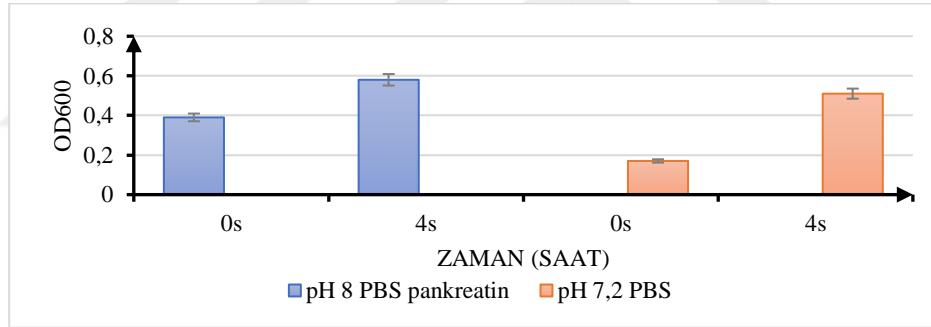
Şekil 3.8. *P. pentosaceus* AF2 bakterisine ait pepsin duyarlılık sonuçları (spektrofotometrik)

3.1.3.3. Pankreatin Toleransının Belirlenmesi

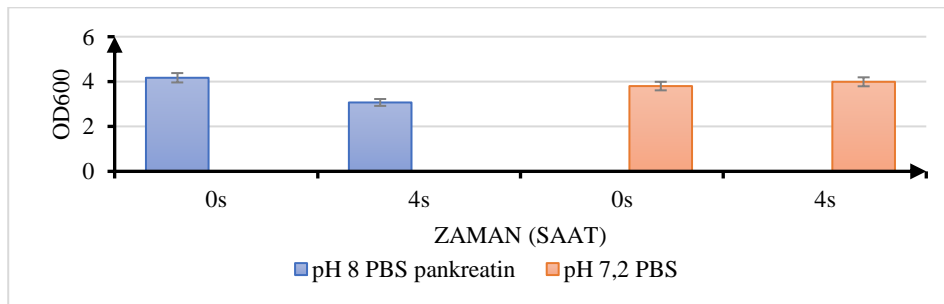
Probiyotik adayı bir bakterinin GİS koşullarında karşılaşacağı bir diğer parametre olan pankreatine karşı örnek bakterilerimizin gösterdiği duyarlılık sonuçları Şekil 3.9, 3.10 ve Çizelge 3.5’de belirtilmiştir. Her iki bakteri örneği de 4 saatlik inkübasyon sonucunda pankreatin varlığında koloni sayısını artırarak gelişime devam etmiştir. Spektrofotometre ölçümlerinde ise yine her iki bakteri örneğinin de pankreatin varlığına karşı canlı kalarak gelişimi devam ettirdiği görülmektedir.

Çizelge 3.5. *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 bakterilerine ait pankreatin duyarlılık sonuçları (canlı koloni sayıları)

Bakteri	PBS (pH 8) + Pankreatin	
	0.saat	4.saat
<i>P. pentosaceus</i> AF2	247	257
<i>E. mundtii</i> AF1	42	76



Şekil 3.9. *E. mundtii* AF1 bakterisine ait pankreatin duyarlılık sonuçları (spektrofotometrik)



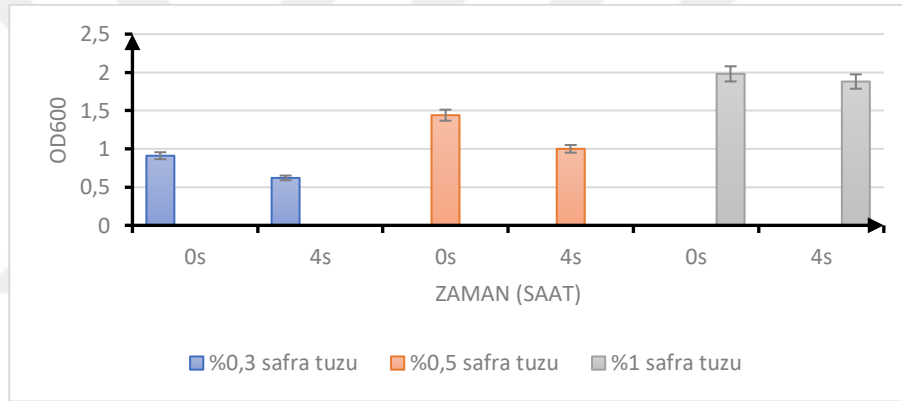
Şekil 3.10. *P. pentosaceus* AF2 bakterisine ait pankreatin duyarlılık sonuçları (spektrofotometrik)

3.1.3.4. Safra Tuzu Toleransının Belirlenmesi

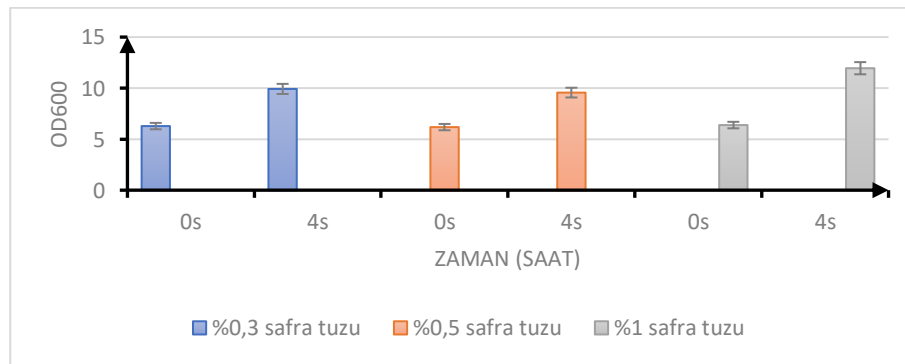
Bu çalışmanın sonucunda, probiyotik adayı her iki bakteri örneğinin spektrofotometrik ve koloni sayımı ölçümlerinde safra tuzuna tolerans gösterebildikleri tespit edilmiştir (Şekil 3.11 ve 3.12), (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 bakterilerine ait safra tuzu duyarlılık sonuçları (canlı koloni sayıları)

Bakteri	% 0,3 safra tuzu		% 0,5 safra tuzu		% 1 safra tuzu	
	0.saat	4.saat	0.saat	4.saat	0.saat	4.saat
<i>P. pentosaceus</i> AF2	>300	>300	>300	>300	>300	>300
<i>E. mundtii</i> AF1	=87	=262	=92	>300	=209	>300



Şekil 3.11. *E. mundtii* AF1 bakterisine ait safra tuzu duyarlılık sonuçları (spektrofotometrik)



Şekil 3.12. *P. pentosaceus* AF2 bakterisine ait safra tuzu duyarlılık sonuçları (spektrofotometrik)

3.1.4. *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktivite Potansiyellerinin Belirlenmesi

Bakteriyal izolatların antimikrobiyal metabolit üretme kapasitesini araştırmak amacıyla yapılan bu çalışmanın sonucunda *E. mundtii* AF1 bakterisinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonları sonucunda elde edilen süpernatantlarının *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Yersinia pseudotuberculosis* bakterilerine karşı inhibisyon aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Çizelge 3.7’de belirtildiği gibi *P. pentosaceus* AF2 bakterisinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonları sonucunda elde edilen süpernatantlarının ise *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* ve *Yersinia pseudotuberculosis* olmak üzere 8 farklı test bakteriye karşı inhibisyon aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.7. *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 in antimikrobiyal aktivitesi

Test Mikroorganizmaları	İnhibisyon Zonu					
	<i>E. mundtii</i> AF1			<i>P. pentosaceus</i> AF2		
	24 saat	48 saat	72 saat	24 saat	48 saat	72 saat
<i>E. coli</i>	-	-	-	14mm	15mm	15mm
<i>B. subtilis</i>	11mm	13mm	14mm	16mm	16mm	15mm
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. vulgaris</i>	-	-	-	14mm	17mm	17mm
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	17mm	19mm	19mm
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	16mm	15mm	15mm
<i>K. pneumoniae</i>	9mm	11mm	13mm	15mm	15mm	16mm
<i>E. cloacae</i>	-	-	-	14mm	17mm	16mm
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	BS	-	-	15mm	16mm	16mm
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-	-	-

BS; Bakteriyostatik

3.1.5. *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 Bakterilerinin Hemolitik Aktivite Özelliklerinin Belirlenmesi

Bu çalışmanın sonucunda Şekil 3.13'de görüldüğü üzere, *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 kolonileri etrafında herhangi bir hemolitik zon gözlenmemiş ve gama hemolitik bakteri oldukları tespit edilmiştir.



Şekil 3.13. *E. mundtii* AF1 ve *P. pentosaceus* AF2 bakterilerine ait hemolitik aktivite A: *E. mundtii* (γ -Hemolitik aktivite), B: *P. pentosaceus* (γ -Hemolitik aktivite), C: *Staphylococcus epidermidis* (β - Hemolitik aktivite), D: *Bacillus cereus* (β - Hemolitik aktivite)

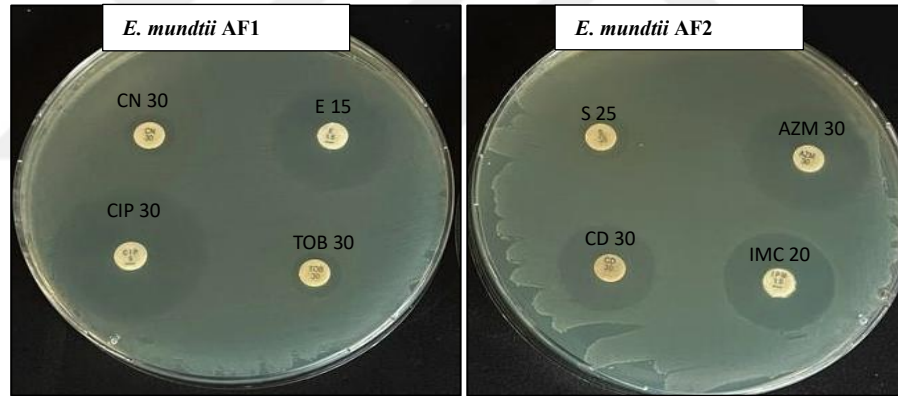
3.1.6. *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 Bakterilerinin Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin Belirlenmesi

Bu çalışmanın sonucunda elde edilen iki probiyotik aday bakterinin antibiyotiklere karşı göstermiş olduğu duyarlılık yanıtları Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9'da gösterilmektedir. Bu çalışmada antibiyotik duyarlılık testi iki kez uygulanmış olup, oluşan inhibisyon zonlarının standart sapma değerleri hesaplanmıştır. *E. mundtii* AF1 bakterisinin tobramisin, gentamisin ve streptomisin olmak üzere üç farklı antibiyotiğe karşı dirençli olduğu, imipenem, eritromisin ve siprofloksasin e karşı ise duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3.8. *E. mundtii* AF1 antibiyotik duyarlılık profili

Antibiyotik Disk	Duyarlılık	İnhibisyon zon(mm)+standart sapma
IMC20	S	20±1,41
TOB30	R	8,5±4,24
AZM30	IR	18±7,07
CN30	R	8,5±3,5
E15	S	22,5±2,12
CIP30	S	23,5±2,12
CD30	IR	17,5±4,24
S25	R	9,5±2,12

İnhibisyon bölgeleri şu şekilde değerlendirildi: Duyarlı (S) >20, Orta duyarlılıkta (IR) \cong 15–19, Dirençli (R) \leq 14. IMC: Imipenem/ silastatin(10/10 μ g), E: eritromisin(15 μ g), CIP: siprofloksasin(30 μ g), S: streptomisin(25 μ g), CD: sefdinir(30 μ g), AZM: azitromisin(30 μ g), TOB: tobramisin(30 μ g), CN: gentamisin(30 μ g)



Şekil 3.14. *E. mundtii* AF1 antibiyotik duyarlılık analizi

P. pentosaceus AF2 bakterisinin ise azitromisin ve sefdinir olmak üzere iki antibiyotik için orta duyarlığa sahip oldukları tespit edilmiştir

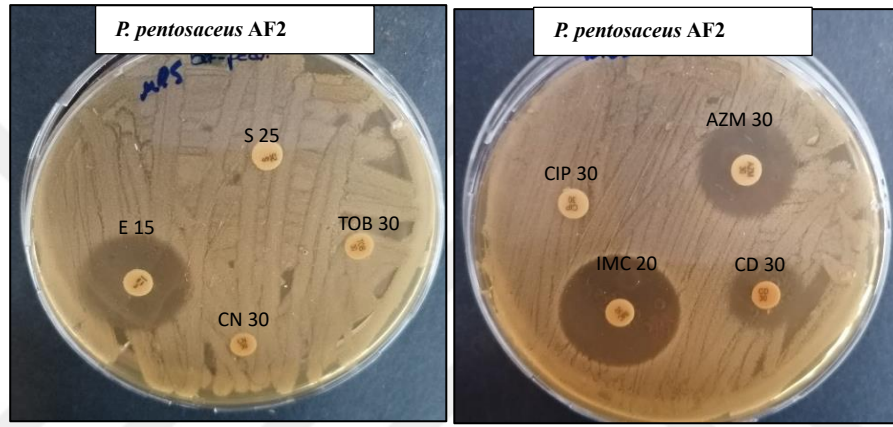
Çizelge 3.9. *P. pentosaceus* AF2 antibiyotik duyarlılık profili

Antibiyotik Disk	Duyarlılık	İnhibisyon zon(mm)+standart sapma
IMC20	S	23±2,83
TOB30	R	-
AZM30	IR	19,5±0,71
CN30	R	-

Çizelge 3.10. (devam) *P. pentosaceus* AF2 antibiyotik duyarlılık profili

E15	S	22±0
CIP30	R	-
CD30	IR	14,5±0,71
S25	R	-

İnhibisyon bölgeleri şu şekilde değerlendirildi: Duyarlı (S) >20, Orta duyarlılıkta (IR) \cong 15–19, Dirençli (R) \leq 14. IMC: Imipenem/ silastatin(10/10 μ g), E: eritromisin(15 μ g), CIP: siprofloksasin(30 μ g), S: streptomisin(25 μ g), CD: sefdınır(30 μ g), AZM: azitromisin(30 μ g), TOB: tobramisin(30 μ g), CN: gentamisin(30 μ g)



Şekil 3.15. *P. pentosaceus* AF2 antibiyotik duyarlılık analizi

3.1.7. *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 Bakterilerinin Agregasyon Kapasitelerinin Belirlenmesi

Bu çalışmanın sonucunda Çizelge 3.10'da görüldüğü üzere, *P. pentosaceus* AF2 bakterisinin % 73,44 hesaplanan otoagregasyon değerleri ile *E. coli* ve *L. monocytogenes* bakterilerine karşı koagregasyon değerleri % 56,8 ve % 57,38 olarak belirlenmiştir. *E. mundtii* AF1 bakterisinin ise % 72,46 hesaplanan otoagregasyon değeri ile *E. coli* ve *L. monocytogenes* bakterilerine karşı koagregasyon değerleri % 70,77 ve % 63,78 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3.11. *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 bakterilerinin agregasyon profili

Bakteri	% Otoagregasyon	% Koagregasyon	
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>E. mundtii</i> AF1	72,46	70,77	63,78
<i>P. pentosaceus</i> AF2	73,44	56,8	57,38

3.1.8. *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 Bakterilerinin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi

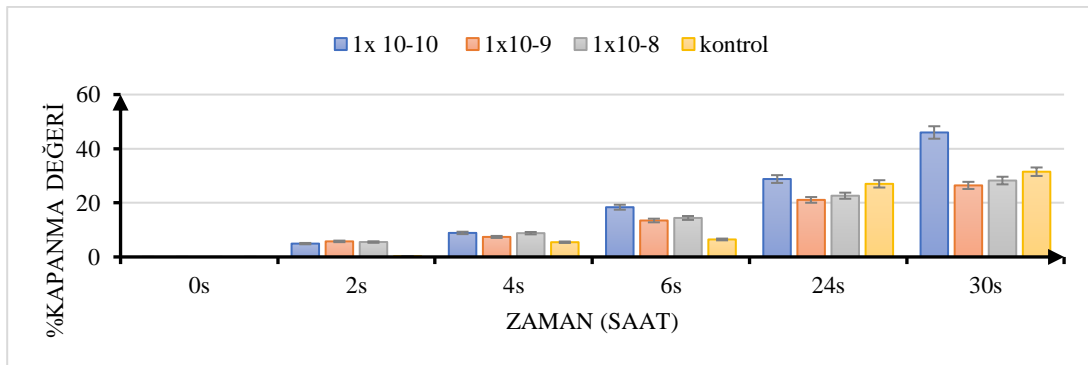
Çalışmamızda bakterilerin antioksidan aktivite tayini DPPH serbest radikali süpürme kapasitesi ile belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda *P. pentosaceus* AF2 bakterisinin % DPPH süpürme kapasitesi % 56 ve *E. mundtii* AF1 bakterisinin % DPPH süpürme kapasitesi % 40 olarak hesaplanmıştır.

3.1.9. Bakterilerin Yara İyileştirme Aktivitesi

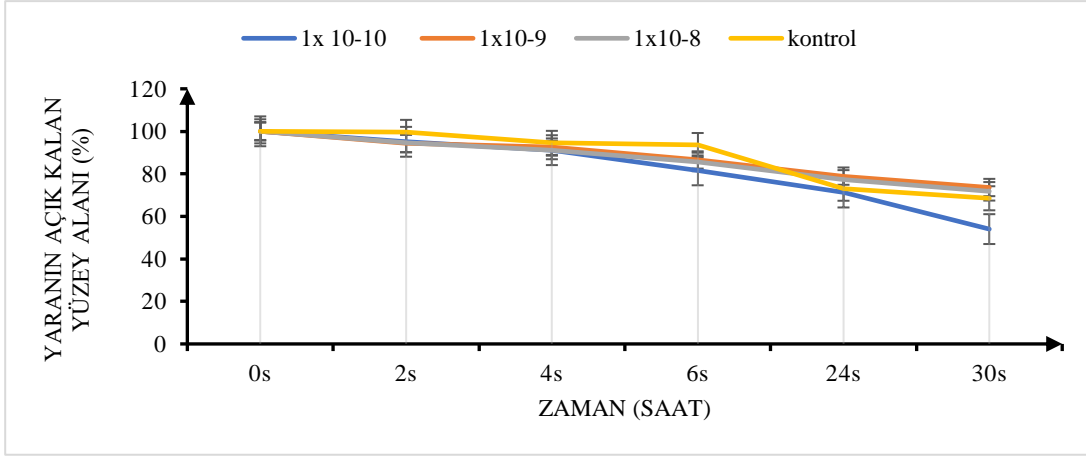
Bu çalışmada probiyotik aday bakteri örneklerinin (*E. mundtii* AF1 ve *P. pentosaceus* AF2) *in vitro* yara üzerindeki iyileştirici aktivitesini test etmek amacıyla lizat ve canlı form şeklinde bakterilerin uygulanması üzere iki yöntem kullanılmıştır.

3.1.9.1. *P. pentosaceus* AF2 Bakterisinin Yara İyileştirme Aktivitesi

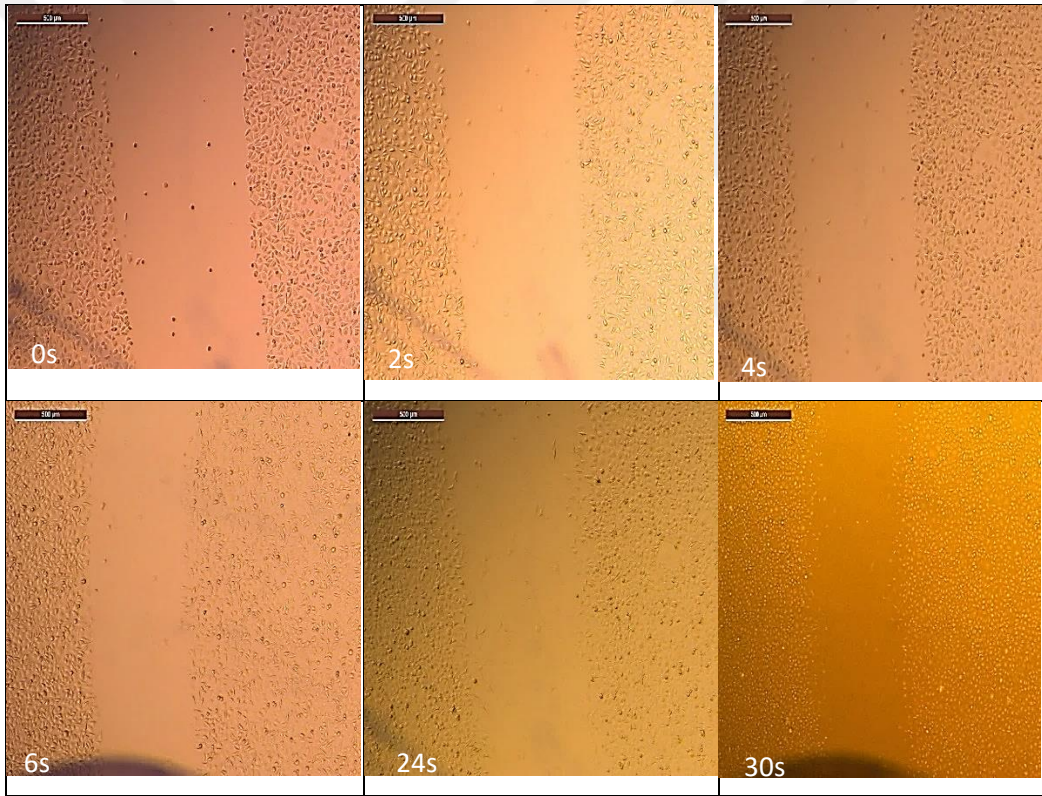
In vitro olarak oluşturulan yara üzerine *P. pentosaceus* AF2 bakterisinin canlı hücre olarak farklı dozajlarda zamana bağlı etkisi Şekil 3.18, 3.19 ve 3.20’de görülmektedir. Image J program aracılığı ile hesaplanan veriler sonucunda *P. pentosaceus* AF2 bakterisinin en yüksek yara kapanma yüzdesine 1×10^{10} CFU/mL dozajda canlı hücrenin sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.16)



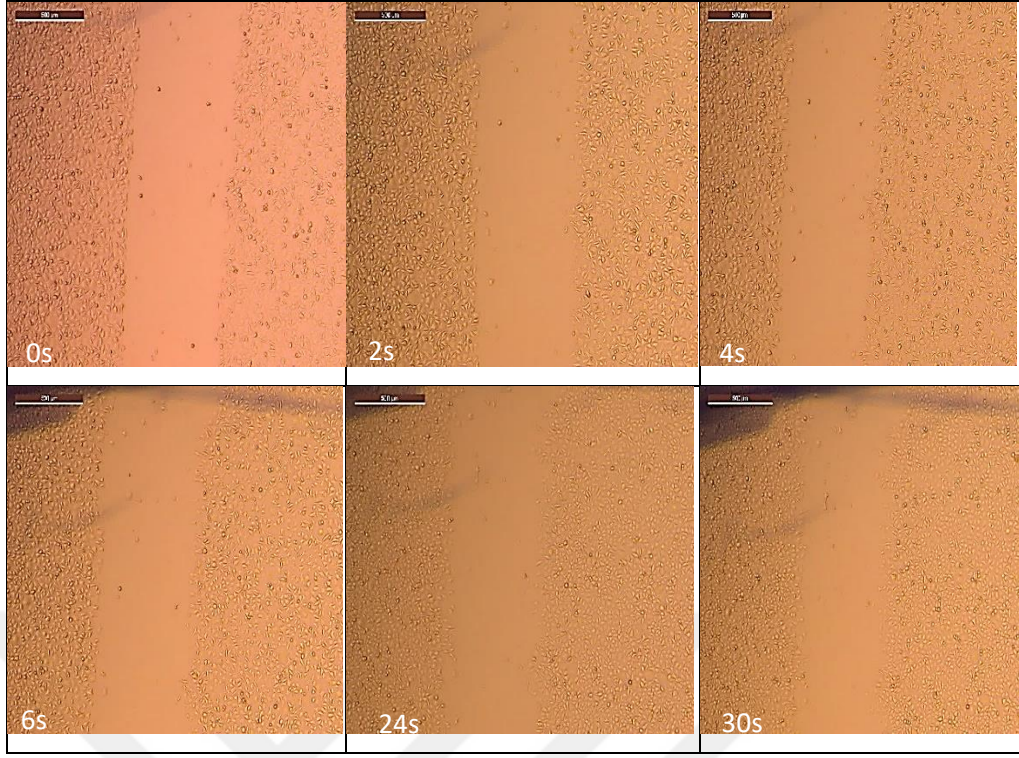
Şekil 3.16. *P. pentosaceus* AF2 canlı bakteri örneklerinin *in vitro* yara üzerindeki %kapanma ifadesi



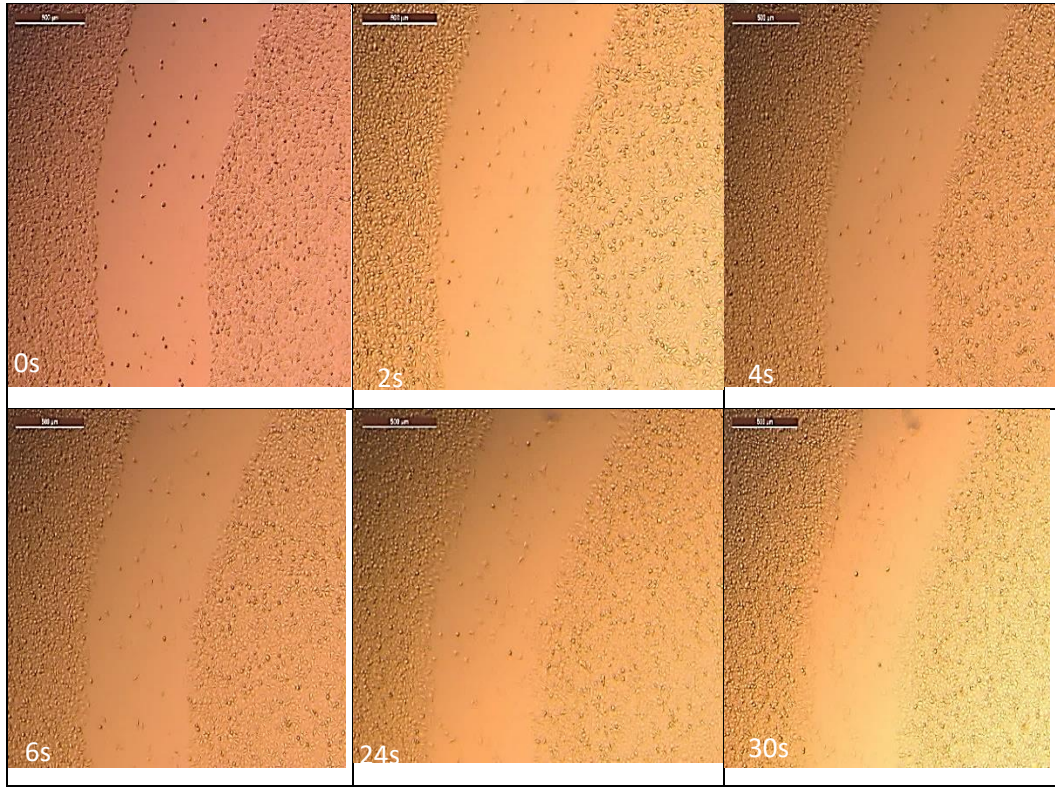
Şekil 3.17. *P. pentosaceus* AF2 canlı bakteri örneklerinin in vitro yara üzerine uygulanmasının ardından oluşan yaradaki açık kalan yüzey alanının % ifadesi



Şekil 3.18. *P. pentosaceus* AF2 canlı bakteri örneğinin 1×10^{10} seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, Image J programı 5x büyütme görüntüsü.



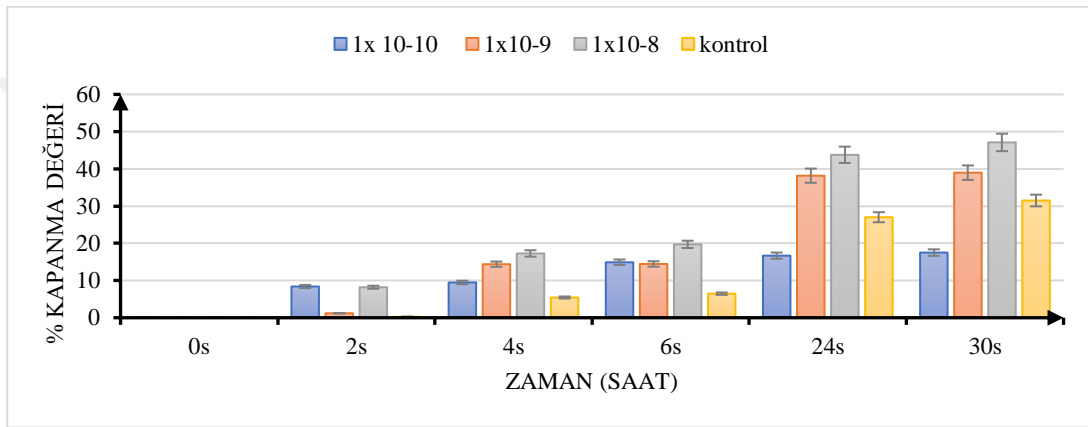
Şekil 3.19. *P. pentosaceus* AF2 canlı bakteri örneğinin 1×10^9 seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü.



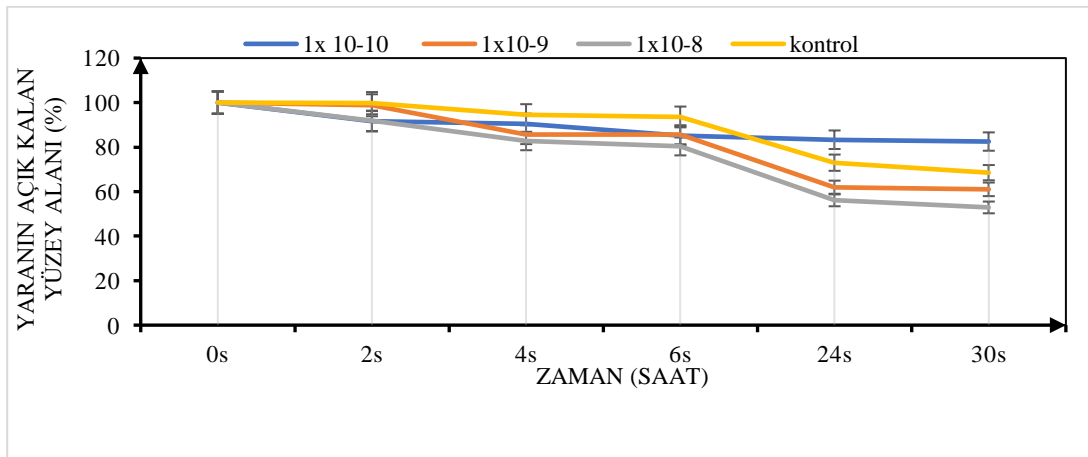
Şekil 3.20. *P. pentosaceus* AF2 canlı bakteri örneğinin 1×10^8 seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü

P. pentosaceus AF2 lizat örnekleri için yara iyileştirme kapasitesi Şekil 3.23, 3.24 ve 3.25’de gösterilmiştir. Image J program aracılığı ile hesaplanan veriler sonucunda Şekil 3.21’de yara kapanma yüzdeleri grafiksel olarak ifade edilmiştir. Şekil 3.22’de ise oluşturulan yara üzerine bakteri formlarının etkisinin ardından yara da açık kalan yüzey alanının yüzde ifadesi verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde lizat örneklerinden en iyi yara kapanma yüzdesi 1×10^8 konsantrasyonda elde edilmiştir.

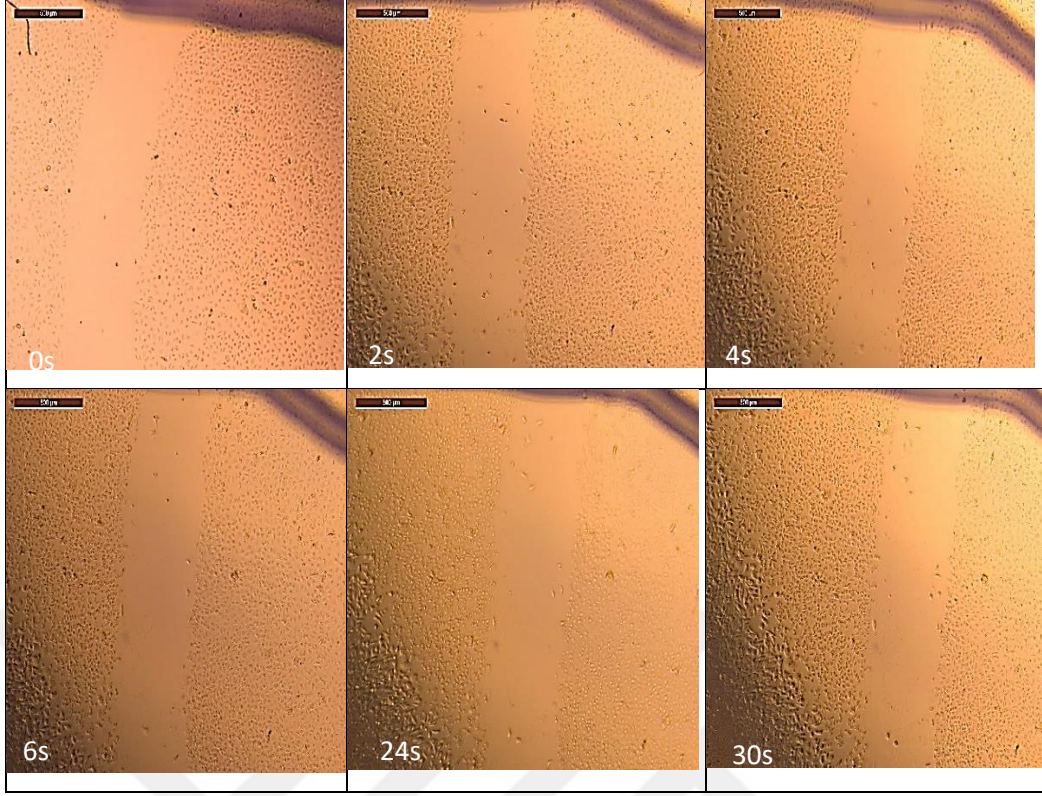
P. pentosaceus AF2 için, canlı ve lizat olarak her iki test şekli değerlendirildiğinde 1×10^8 seyretlmede % 47,10 ile lizat formun iyileştirme etkisinin daha yüksek olduğu ifade edilebilir.



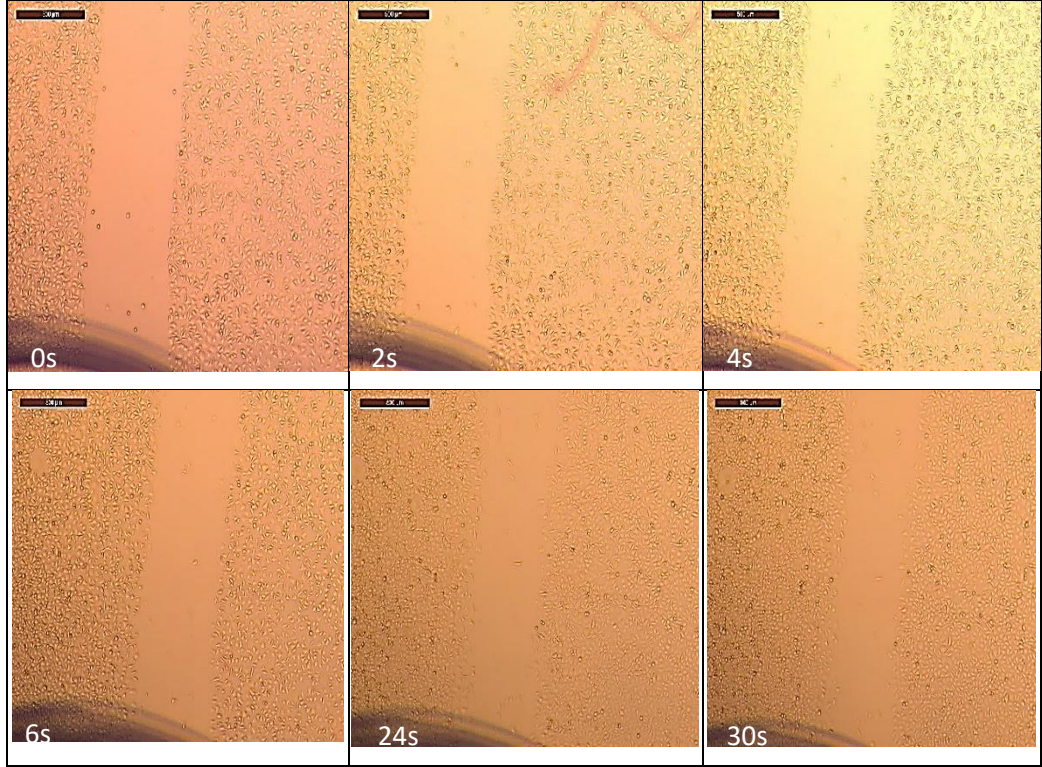
Şekil 3.21. *P. pentosaceus* AF2 lizat örneklerinin in vitro yara üzerindeki % kapanma ifadesi



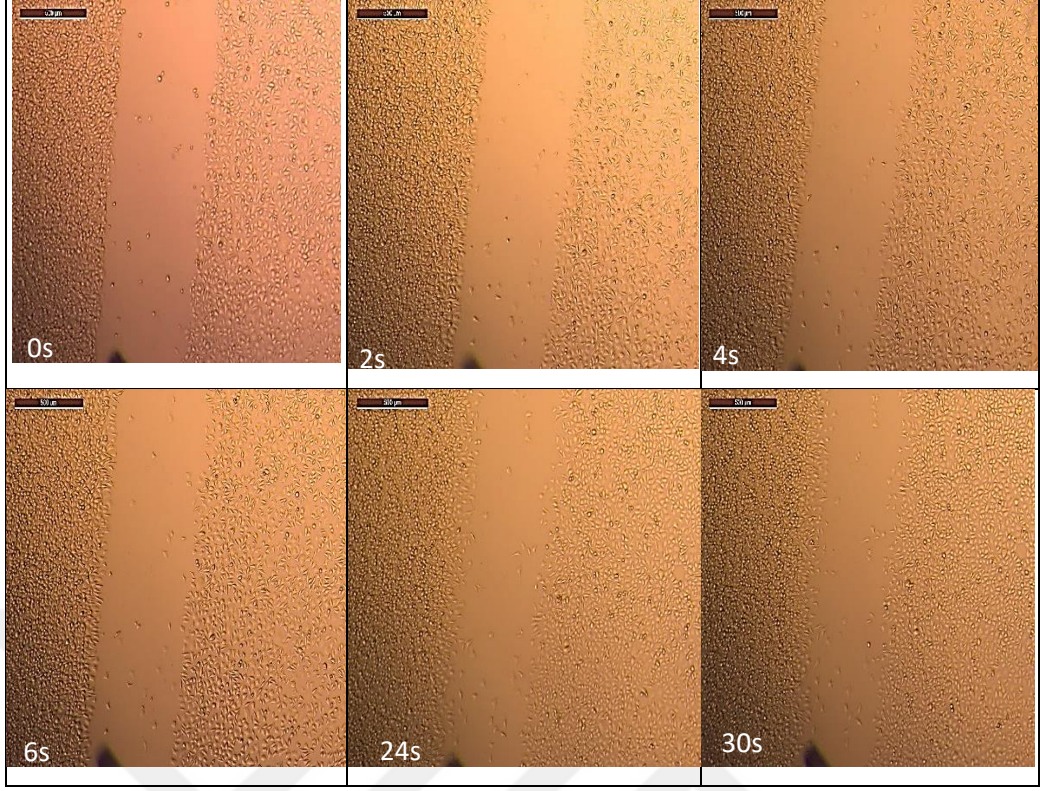
Şekil 3.22. *P. pentosaceus* AF2 lizat örneklerinin in vitro yara üzerine uygulanmasının ardından oluşan yaradaki açık kalan yüzey alanının % ifadesi.



Şekil 3.23. *P. pentosaceus* AF2 lizat örneğinin 1×10^{10} seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, Image J programı 5x büyütme görüntüsü.



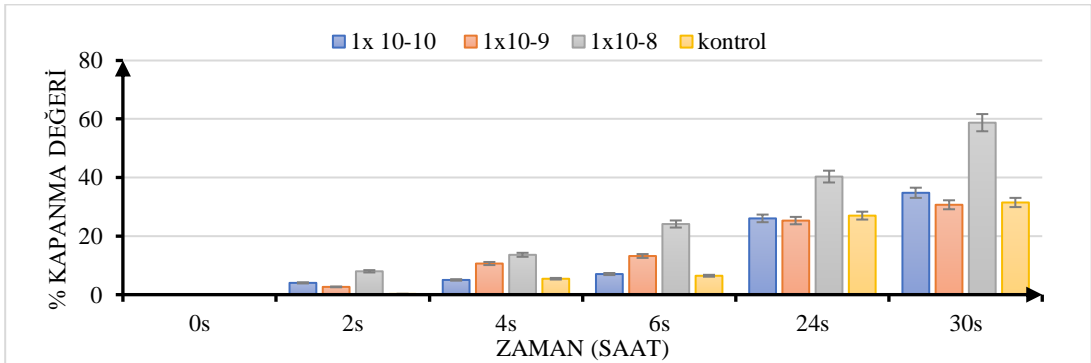
Şekil 3.24. *P. pentosaceus* AF2 lizat örneğinin 1×10^9 seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, Image J programı 5x büyütme görüntüsü.



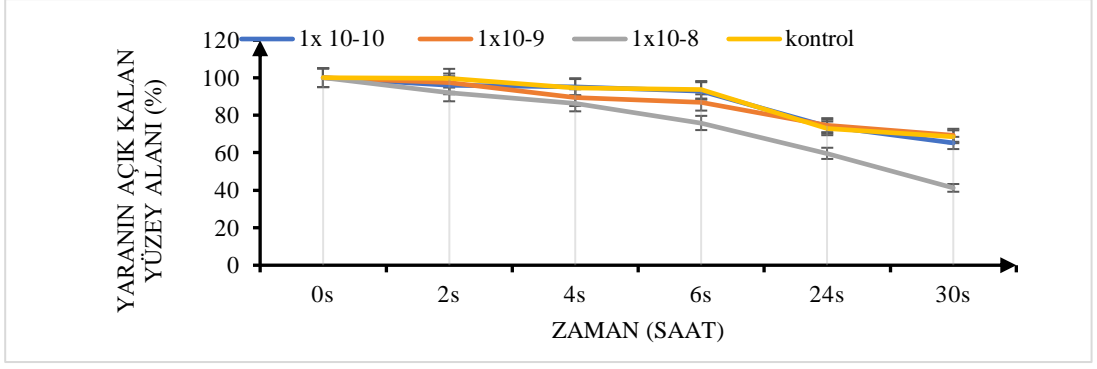
Şekil 3.25. *P. pentosaceus* AF2 lizat örneğinin 1×10^8 seyreltmede, *in vitro* yara üzerindeki etkisi, Image J programı 5x büyütme görüntüsü.

3.1.9.2. *E. mundtii* AF1 Bakterisinin Yara İyileştirme Aktivitesi

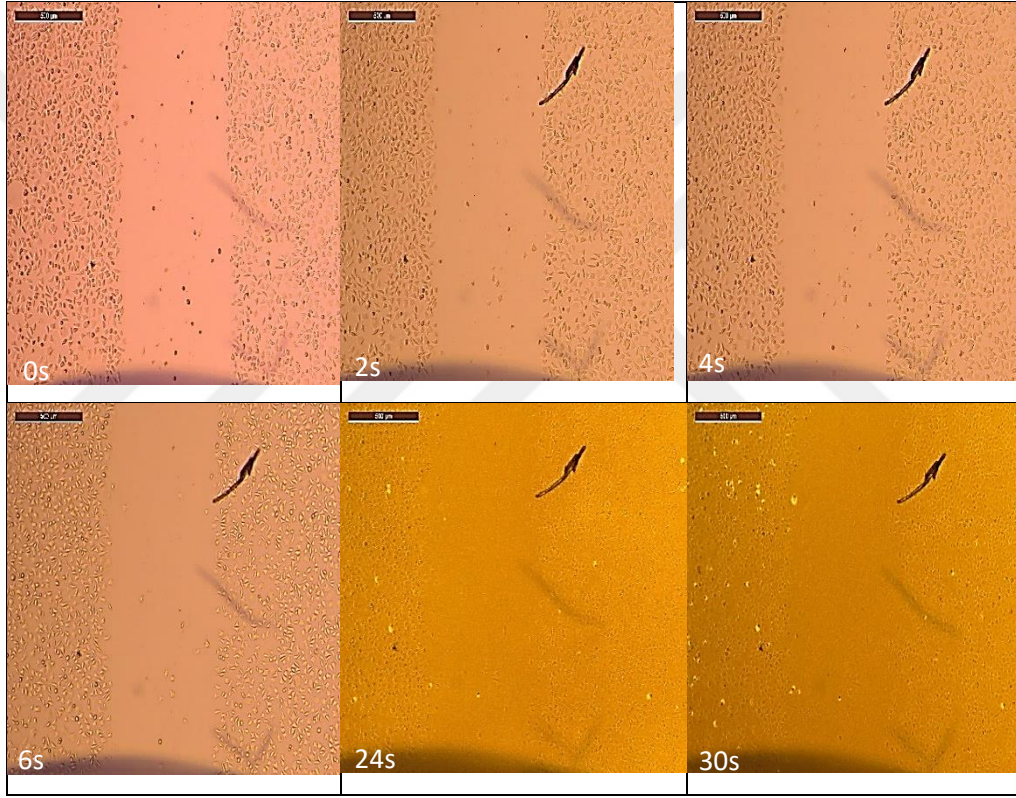
Farklı seyreltiklerde canlı *E. mundtii* AF1 bakterilerin *in vitro* yara üzerine etkileri ise Şekil 3.28, 3.29 ve 3.30’da verilmiştir. Image J program aracılığı ile ölçülen canlı *E. mundtii* AF1 in yara kapanma alanları üzerine ifadesi Şekil 3.26’da gösterilmiştir. *E. mundtii* AF1 canlı örneklerin 1×10^8 dozajda zamana bağlı olarak en yüksek kapanma değerini verdiği tespit edilmiştir.



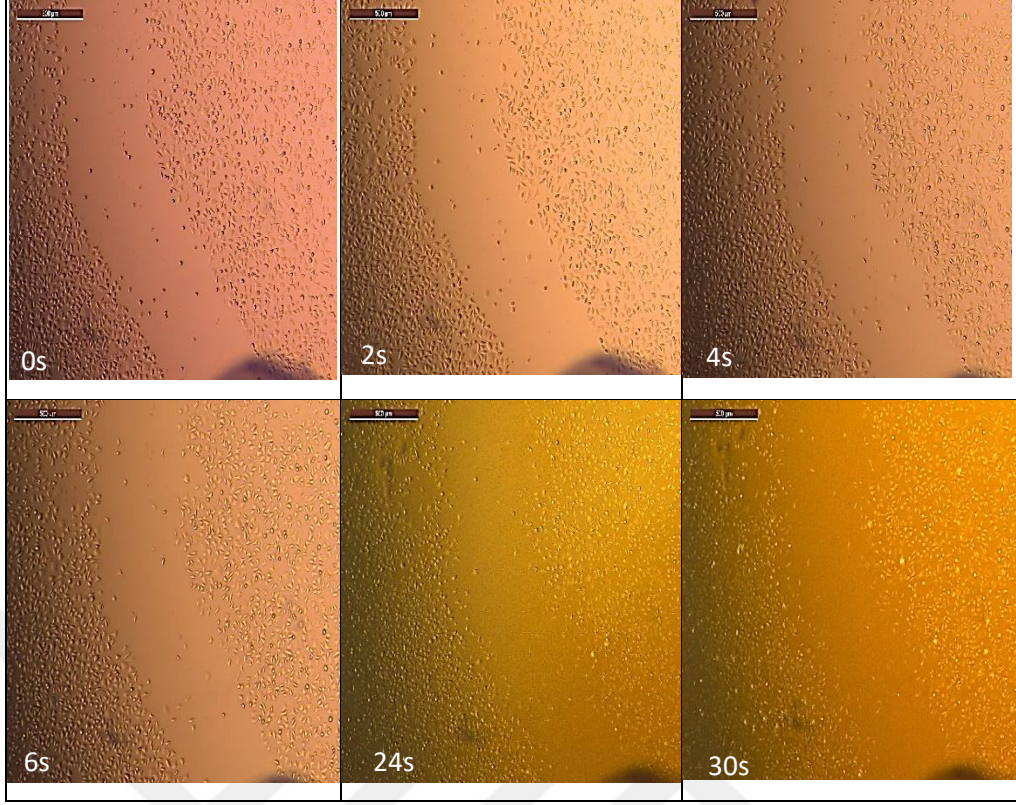
Şekil 3.26. *E. mundtii* AF1 canlı bakteri örneklerinin *in vitro* yara üzerindeki % kapanma ifadesi



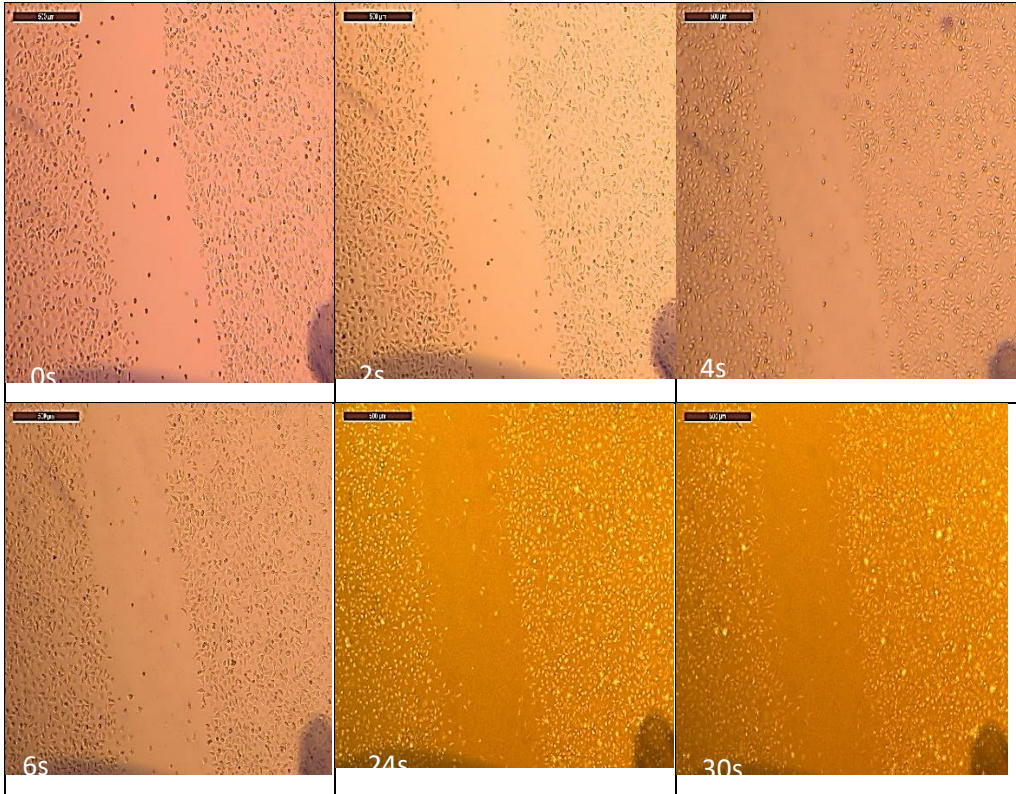
Şekil 3.27. *E. mundtii* AF1 canlı bakteri örneklerinin in vitro yara üzerine uygulanmasının ardından oluşan yaradaki açık kalan yüzey alanının % ifadesi.



Şekil 3.28. *E. mundtii* AF1 canlı bakteri örneğinin 1x10¹⁰ seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, Image J programı 5x büyütme görüntüsü.



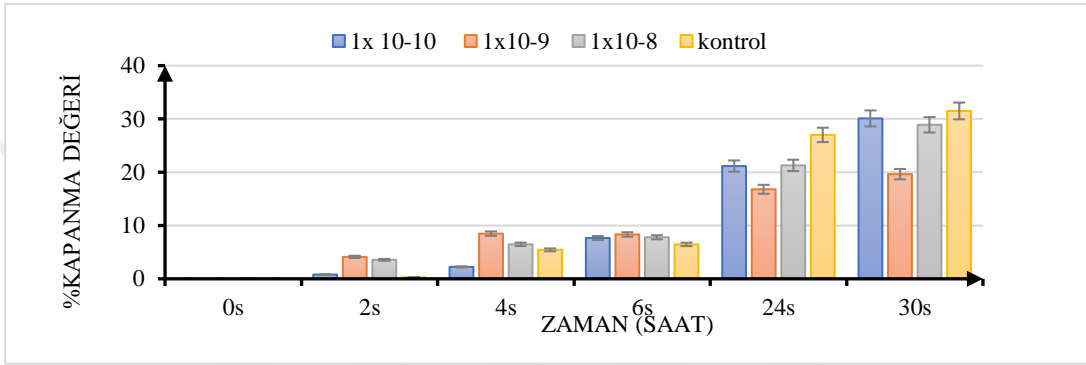
Şekil 3.29. *E. mundtii* AF1 canlı bakteri örneğinin 1×10^9 seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, Image J programı 5x büyütme görüntüsü.



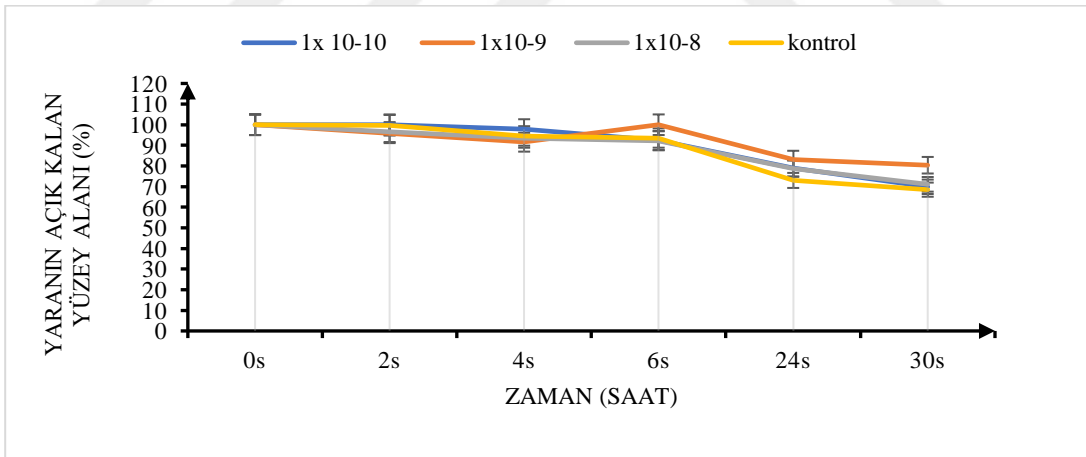
Şekil 3.30. *E. mundtii* AF1 canlı bakteri örneğinin 1×10^8 seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, Image J programı 5x büyütme görüntüsü.

E. mundtii AF1 bakteri lizat örneklerinin *in vitro* model olarak yara oluşturulan hücre kültürü ortamındaki iyileşme profilleri Şekil 3.33, 3.34 ve 3.35’de belirtilmiştir. Image J program ile yara kapanma alanlarının hesaplanmasının ardından veriler Şekil 3.31 ve 3.32’de belirtilmiştir. Yara üzerine uygulanan *E. mundtii* AF1 bakteri lizat örneklerinden dozaja bağlı olarak en yüksek kapanma yüzdesi 1×10^{10} seyreltikte belirlenmiştir.

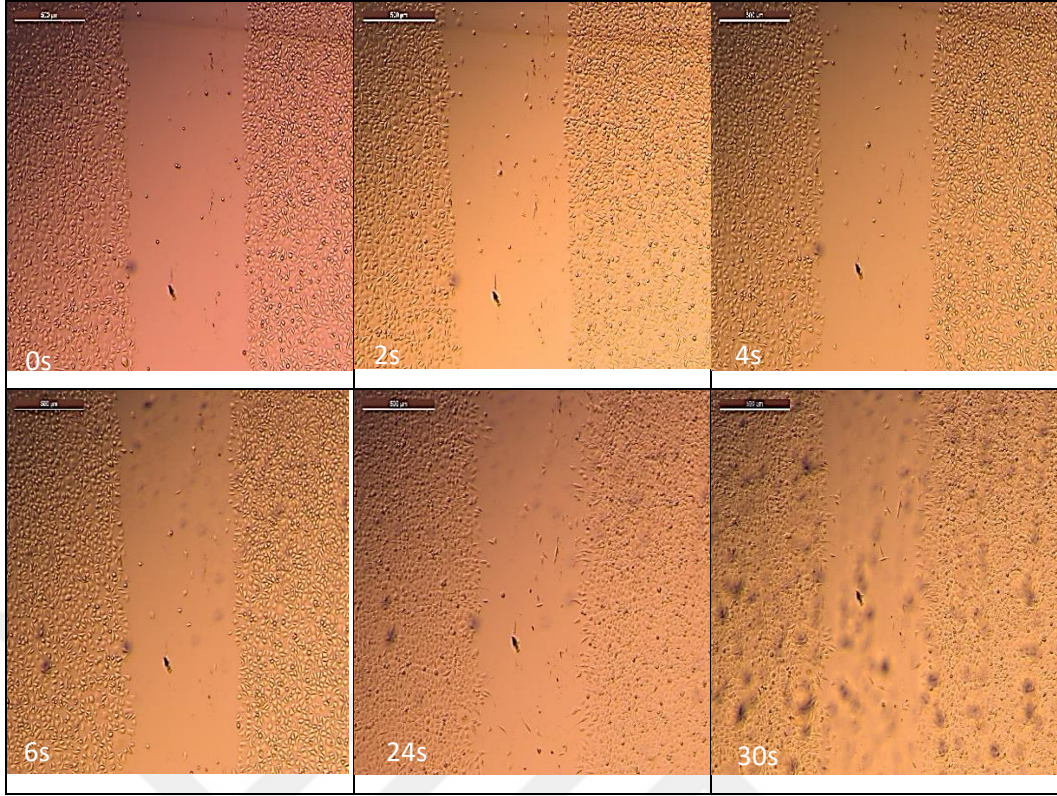
Bu çalışmanın sonucunda yara iyileştirmede *E. mundtii* AF1 in canlı ve lizat olarak yara üzerine uygulanan örneklerinden en iyi yara iyileşme yüzdesini 1×10^8 konsantrasyonda % 58,76 olarak canlı bakteri formunun sağladığı ifade edilebilir.



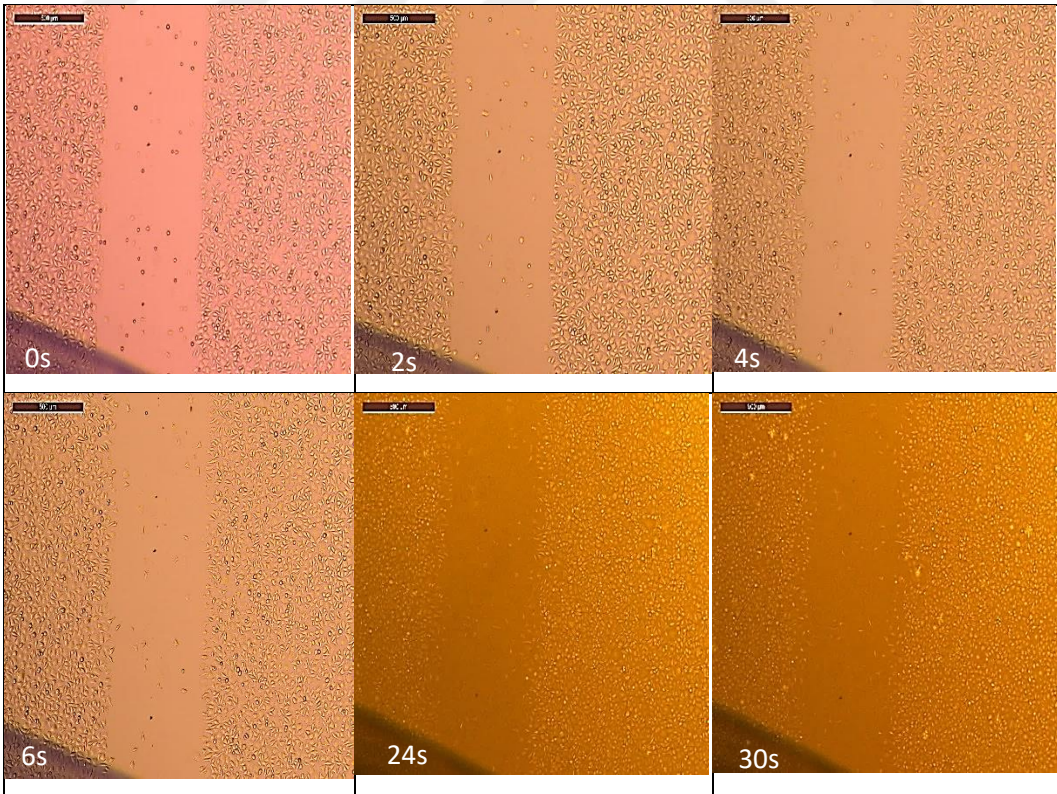
Şekil 3.31. *E. mundtii* AF1 lizat örneklerinin *in vitro* yara üzerindeki % kapanma ifadesi



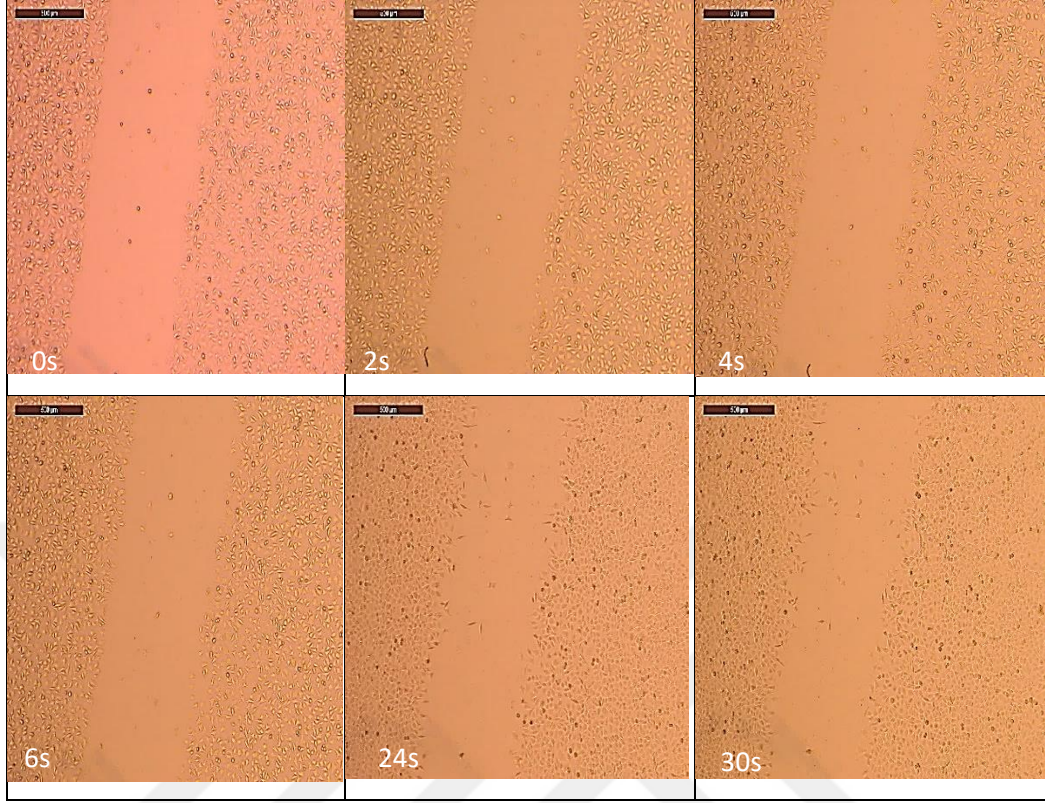
Şekil 3.32. *E. mundtii* AF1 lizat örneklerinin *in vitro* yara üzerine uygulanmasının ardından oluşan yaradaki açık kalan yüzey alanının % ifadesi.



Şekil 3.33. *E. mundtii* AF1 lizat örneğinin 1×10^{10} seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü.



Şekil 3.34. *E. mundtii* AF1 lizat örneğinin 1×10^9 seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü



Şekil 3.35. *E. mundtii* AF1 lizat örneğinin 1×10^8 seyreltmede, in vitro yara üzerindeki etkisi, İmage J programı 5x büyütme görüntüsü

3.2. TARTIŞMA

Bakteriler, dost bakteri sınıfı olarak bilinen ve probiyotik olarak adlandırılan önemli bakteriyel grubu ihtiva etmektedir. Bu probiyotik mikroorganizmalar bulunduğu üzere yüzyıllardır fermentasyon süreçleri ile tükettiğimiz gıdalarda iç içe olduğumuz canlı grubunu oluşturmaktadır. Özellikle *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* cinslerini içeren LAB peynir, yoğurt, ayran ve kefir gibi süt ürünlerinin üretiminde kullanılan önemli probiyotik mikroorganizmalardır. Probiyotiklerin birçok farklı sağlık alanında koruyucu ve tedavi edici etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Bağırsak florasının değişimiyle GİS üzerinde meydana gelen hastalıkların önlenmesinde yeterli miktardaki probiyotikler koruyucu bariyer etkisi gösterebilmektedir. Buna yönelik ishal, bağırsak iltihaplanması, karın ağrısı ve düzensiz bağırsak hareketleri gibi semptomlara neden olan bir dizi GİS rahatsızlığı üzerinde (*Helicobacter pylori* enfeksiyonu, antibiyotikle ilişkili ishal, enfeksiyöz ishal gibi) probiyotik etkisi çalışılmış ve uygulanan çeşitli probiyotik türlerinin genel anlamda

hastalıkları iyileştirici pozitif etkiler meydana getirdiği belirtilmiştir [78]. Probiyotiklerin antiviral etkilerinden de bahsetmek mümkündür. Virüslerin dünya çapında zaman zaman sebep olduğu yaygın hastalık ve beraberindeki ölümlerin önüne geçilmesi için de probiyotik ajanlar önerilmektedir. Pandemi süreçlerine yönelik geliştirilen ilaç ve aşuların sınırlı etkinliği, tedavilerin ardından direnç suşlarının gelişimi gibi kısıtlamalara da sahiptir. Bu nedenle antiviral savaşta etkili tedavi yöntemi sağlayacak alternatif yolların keşfi önem arz etmektedir. Bu kapsamda literatüre bakıldığında probiyotiklerin antiviral etkilerinin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak test edildiği görülmektedir. Örneğin, *in vitro* ortamda *Bifidobacterium* suşlarının rotavirüs kaynaklı viral enfekteyi etkili bir şekilde azalttığını kaydedilmiştir [79]. Farklı bir çalışmada ise on dokuz gün boyunca LAB ile oral olarak desteklenen farelerin, influenza virüsüne karşı klinik semptomlarında ve viral titrede anlamlı azalmalar kaydettiği ifade edilmiştir [80].

Sayılan tüm bu faydalı etkileri probiyotik mikroorganizmaları ek gıda takviyesi, teropötik ajanlar veya fermente süt ürünleri sağlayıcısı gibi daha pek çok anlamda dikkat çekici kılmaktadır. Yeni ve etkisi kanıtlanmış probiyotiklerin eldesi ise önem taşımaktadır. Böylesi önemli probiyotiklere bir yenisini eklemek amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada yerel halk tarafından (Bolu, Kıbrısçık) yoğurt yapımında kullanıldığı bilinen *Herniaria glabra* bitkisinden *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 olmak üzere iki laktik asit bakterisi izole edilmiş ve probiyotik özellikleri değerlendirilmiştir.

Probiyotik canlılar vücuda alınmaları itibariyle gastrointestinal sistem olarak adlandırdığımız alanda yolculukları sırasında birbirinden farklı koşullara maruz kalmaktadır. Düşük pH da bunlardan biri olup örneğin mide de pH 1,5 olmasına rağmen besinlerin sindirimi boyunca pH değeri 3'e kadar yükselebilmektedir [81]. Dolayısıyla, düşük pH canlılıklarını ve işlevselliklerini garanti altına almak için potansiyel probiyotik suşların seçimi sırasında dikkate alınan genel kriterlerden biri olarak değerlendirilmektedir. Bu bağlamda bu çalışmada GİS simülasyonu yapılmış ve *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 bakterileri pH 1, 2 ve 3 gibi düşük pH'lara maruz bırakılmıştır. Spektrofotometrik ve canlı koloni sayısı olarak iki farklı yöntem ile sonuçlar değerlendirildiğinde her iki bakteri için pH 1 in 1. saati sonundaki canlı koloni sayısındaki düşüş haricinde diğer pH değerleri ve sürelerinde daha yüksek tolerans gösterdikleri kaydedilmiştir. *P. pentosaceus* AF2 bakterisinin koloni gelişimi *E. mundtii*

AF1 bakterisine göre daha yoğun olarak devam etmiştir. İki bakteri arasında üç farklı pH değerinde de 10^5 seyreltmelerde üçüncü saatlere doğru azalarak da olsa bakteri gelişiminin devam ettiği görülmektedir. Bu kapsamda literatüre bakıldığında yapılan çalışmalarda *Bifidobacterium* türlerinin bazılarında bazı düşük pH derecelerine karşı oldukça duyarlı olduklarını belirtmiştir. *Lactobacillus* türlerine bakıldığında ise düşük pH a karşı yüksek direnç gösterdiği görülmektedir. Bazı *Bifidobacterium* türleri de türe bağlı olarak *Lactobacillus* kadar olmasa da düşük oranda düşük pH toleransı gösterebilirler [82]. On bir LAB suşunun probiyotik potansiyelini analiz eden bir çalışmada ise suşların pH 2, pH 2,5 ve pH 3 değerindeki simüle mide asidi ortamına dirençlilikleri kaydedilmiştir. Suşların pH 2’de 45. dakikadan sonra canlılıklarını kaybettiği ancak pH 3 olduğunda canlılık kaybında neredeyse hiçbir önemli fark gözlenmediği belirtilmiştir [83]. Daha önceki literatür çalışmalarıyla da kıyaslandığında *E. mundtii* AF1 ve *P. pentosaceus* AF2 bakterilerinin pH toleransı açısından yüksek kapasiteye sahip oldukları ifade edilebilir.

Safra probiyotik mikroorganizmanın GİS ortamında karşılaştığı diğer önemli parametredir. Safra tuzu, lipofilik bileşiklerin sindirimini kolaylaştırır. İnsan safrasının ilgili fizyolojik konsantrasyonları % 0,3 ila % 0,5 aralığında olduğu bilinmektedir [84]. Bu çalışmada, probiyotik adayları iki bakteri % 0,3; % 0,5 ve % 1 safra içerikli tampon çözeltiler ile muamele edilmiştir. Kolonilerin canlılık oranlarına bakıldığında *P. pentosaceus* AF2 bakterisinin uygulanan tüm safra aralıklarına yüksek tolerans gösterdiği kaydedilmiştir. *E. mundtii* AF1 örneği *P. pentosaceus* AF2’ye oranla canlı koloni sayısında dalgalanmalar ihtiva etse de her safra düzeyi için tolerans göstererek büyümeye devam ettiği gözlemlenmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada emzirilen bir bebeğin dışkılarından elde edilen *Lactobacillus gasseri* izolatlarının karakterizasyonunu yapan bir çalışmada örneklerin safra tuzu tolerans değerlendirmelerine bakılmıştır. % 0,25 safra tuzu içeren ortama dayanıklılık sergilediklerini ancak % 0,5 safra da çoğu örneğin iyi gelişmediği belirtilmiştir [85]. Bir çalışmada *E. faecium* KH24’ün safra tuzu toleransına bakıldığında artan safra konsantrasyonları için davranışında neredeyse hiçbir değişiklik olmadığı ve KH 24’ün canlı koloni sayısının safranın tüm konsantrasyonlarında 1 saat sonra arttığı gözlemlenmiştir [86]. Hyronimus ve diğerleri tarafından incelenen 13 spor oluşturan laktik asit üreten bakteriden ise (farklı *Bacillus laevolacticus*, *B. racemilacticus* ve *B. coagulans* suşları) sadece 5 suş, % 0,3’ün üzerindeki safra konsantrasyonlarına tolerans göstermiştir [87]. Gerçekleştirilen diğer

çalışmalara bakıldığında da bu çalışmada *E. mundtii* AF1 ve *P. pentosaceus* AF2 bakterilerinin yüksek safra tuzu toleransı gösterdiği kanıtlanmıştır.

Midedeki düşük pH gibi pepsinin varlığı da patojenik mikroorganizmaların bağırsak ortamında konumlamasını engelleyen önemli bir faktördür. Dolayısıyla probiyotik özellik gösteren mikroorganizmalarında bu ortam koşullarına tolerans göstermesi beklenir. Bu kapsamda örnekler 3g/L pepsin içeren pH 2 ve pH 3 değerinde simüle edilmiş mide suyuyla muamele edilmiştir. Pepsine maruz kaldıkları süre boyunca *P. pentosaceus* AF2 örneğinin canlı koloni varlığı olarak herhangi bir düşüş göstermediği ancak spektrofotometrik ölçümün nc saatlerinde azalma gösterdiği, *E. mundtii* AF1 rneği için pH 2'de koloni sayılarının zamana bağlı olarak düştüğü ancak spektrofotometrik olarak yansımağı gözlemlenmiştir. Her iki bakteri için de yorumlandığında bakteri gelişiminin durmadığı ve pH 3'te daha iyi olmak şartıyla devam etmiştir. Literatür örneklerine bakıldığında *Enterococcus* suşları ile yapılan bir çalışmada 2, 4, 6, 8 ve 10 g/L olarak artan pepsin maruziyetlerine karşı bakteri canlılığındaki düşüş kaydedilmiştir. Ancak her dozda büyüme devam etmiştir [88]. İnsan anne sütünden elde edilen *Lactobacillus fermentum* suşlarının probiyotik potansiyelini değerlendiren bir çalışmada da suşların pepsin toleransı incelendiğinde pH 3 ortamında artan sağ kalım gözlemlense de pH 2'de de pepsine yüksek tolerans gösterildiği ifade edilmiştir [89]. Dolayısıyla probiyotik adayı *E. mundtii* AF1 ve *P. pentosaceus* AF2 bakterilerinin pepsin içerikli her iki pH aralığında da gelişim göstermeye devam etmeleriyle gastrik geçiş sırasında pepsinin etkilerine karşı direnç gösterebildikleri kaydedilmiştir.

Probiyotik mikroorganizmalar için diğer bir önemli kriter sindirim sistemindeki yolculuklarında karşılaştıkları pankreatindir. Bakterinin GİS ortamında ilerlerken pH değerı yaklaşık 7,8-8,0 olan pankreatik sıvıya dirençli olması gerekir. Çalışmamızda probiyotik adayı bakteriler için bu özelliği test etmek adına pH değerı 8 olan pankreatin içerikli PBS tamponu uygulanmıştır. Pankreatin içeriğine maruziyetleri boyunca *E. mundtii* AF1 in *P. pentosaceus* AF2 bakterisine göre artan bakteri gelişimi gösterdiği ve her iki probiyotik aday bakteri için zamana bağlı olarak koloni gelişiminin devam ettiği görülmektedir. Bir alışmada *Lactobacillus plantarum* suşunun pankreatin toleransının zamana bağlı olarak düştüğünü ancak % 0,5 pankreatin içeriğinde canlılığını devam ettirdiği ifade edilmiştir [90]. Pankreatin toleransı açısından da *E. mundtii* AF1 ve *P.*

pentosaceus AF2 bakterileri yüksek tolerans sergileyerek tüm gastrointestinal ortam koşullarında *in vivo* olarak hayatta kalmıştır.

Öte yandan, bakteri örneğinin probiyotik özellik gösterebilmesi adına patojen bakteri içeriğine karşı antimikrobiyal aktivite özelliğine sahip olması gerekmektedir. Bu çalışmada probiyotik adayı *E. mundtii* AF1 ve *P. pentosaceus* AF2 nin antimikrobiyal metabolit üretim kapasitesini değerlendirmek için 14 farklı test mikroorganizması kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda *E. mundtii* AF1 bakterisinden elde edilen süpernatanın *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Yersinia pseudotuberculosis* bakterisine karşı inhibitör aktivite gösterdiği gözlenmiştir. *P. pentosaceus* AF2 nin ise *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* ve *Yersinia pseudotuberculosis* bakterisine karşı daha geniş kapsamlı bir inhibitör aktivite potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Enterokok izolatlarının çalışıldığı bir araştırmada örneklerin *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* bakterisine karşı iyi bir antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. *Enterococcus* süpernatalarının bu test bakterilerine karşı $34,3 \pm 0,2 / 7,3 \pm 0,3$ mm'lik bir inhibisyon bölgesine sahip olduğu görülmektedir [91]. Bu çalışma ile karşılaştırıldığında, bu izolatların *E. mundtii* AF1'den çok daha güçlü inhibitör aktiviteye sahip metabolitler üretebileceği söylenebilir. Farklı bir araştırmada *E. mundtii* tarafından üretilen bakteriyosin metabolitinin 78 farklı Gram-pozitif indikatör test suştan % 36 sının büyümesi inhibe ettiği bildirilmiştir [92]. Aynı zamanda 15 farklı *E. mundtii* izolatı ile yürütülen bir çalışmada tüm izolatların geniş bir test bakteri spektrumuna karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Özellikle bazı *E. mundtii* suşlarının *B. thuringiensis* ve *P. entomophila* bakterisinin yanı sıra *P. aeruginosa* ve *S. aureus* gibi insan patojenik bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi görülmüştür [93]. *Pediococcus acidilactici* SMVDUDB2 üzerinde yapılan bir çalışmada ise suşun antimikrobiyal etkinliğine bakıldığında, *Bacillus subtilis* (MTCC 121), *Mycobacterium smegmatis* (MTCC 994), *Staphylococcus aureus* (MTCC 3160), *Proteus vulgaris* (MTCC 426), *Escherichia coli* (MTCC 1652) ve *Lactobacillus rhamnosus*'a karşı antimikrobiyal aktivite sergilediği belirtilmiştir [94]. *Salmonella*, *Escherichia coli* ve *Listeria* gibi birçok gıda kaynaklı patojen gıdayı kolonize ederek gıdanın çürümesine neden olacak şekilde çoğalabilmektedir. *P.*

pentosaceus, bu tür zararlı bakterilerle karşılaştığında iyi bir antipatojen ajan gibi davranmaktadır. *P. pentosaceus* türünün *L. monocytogenes* bakterisine karşı sergilediği performansı göstermek adına aşağıda açıklandığı gibi birkaç deney yapılmıştır. *L. monocytogenes* menenjit, septisemi ve kürtaja neden olan en yaygın insan patojenlerinden biridir [95]. Her yerde bulunan *L. monocytogenes*, yiyeceklerde kontamine olur ve çoğalabilir [96]. *P. pentosaceus* LJR1 ve *P. pentosaceus* ATCC43 gibi birkaç *P. pentosaceus* suşunun *Listeria* türlerinin büyümesini kısıtladığı gösterilmiştir [97]. Farklı bir çalışmada *P. pentosaceus* BaltBio02 bakterisinin *Staphylococcus aureus* ve *P. aeruginosa* karşı ümit verici antimikrobiyal aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır. Ek olarak, geleneksel Çin turşusundan izole edilen *P. pentosaceus* SK25 bakterisinin büyük miktarda 3-fenillaktik asit ürettiği, bunun da gıdayı bozan çeşitli bakteri ve mantarlara karşı dahil olmak üzere geniş spektrumlu antibakteriyel özelliklerle sonuçlandığı ifade edilmiştir [98]. Literatüre bakıldığında probiyotik özellikleri açısından *P. pentosaceus* suşlarının *E. mundtii* suşlarına göre daha kapsamlı çalışıldığı görülmektedir. Bu anlamda mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar her iki bakterinin de belirli düzeyde antimikrobiyal etki gösterdiği ancak *E. mundtii* AF1 nin 14 test bakteriden 3 ü üzerinde (% 21,4) bir etki sergilerken *P. pentosaceus* AF2 nin 8 adet (% 57,1) test bakteriye karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür.

Bir diğer parametre probiyotik suşlar için güvenlik koşullarını sağlamaktır. Hemolitik aktivitenin olmaması ve antibiyotik direnci, probiyotik suşların seçimi için güvenlik ön koşulları olarak kabul edilir. Bu sebeple, çalışmada güvenlik testi amacıyla hemolitik aktivite deneyi gerçekleştirmiştir. Hemolitik aktivite patojenik mikroorganizmalarda bulunabilen virülans faktörleriyle ilişkili olup, bu tür mikroorganizmalar tarafından üretilen hemolizinler, hücre parçalanmasından ve komşu hücre ve dokuların yok edilmesinden sorumlu olabilmektedir [71]. Dolayısıyla probiyotik özellikleri araştırılan mikroorganizmaların hemolitik olmayan suşlar olması beklenmektedir. Çalışmamızda *E. mundtii* AF1 ve *P. pentosaceus* AF2 için herhangi bir zon gözlenmemiş gama hemolitik bakteriler olarak tanımlanabilmektedirler. Kontrol olarak kullanılan *B. cereus* şeffaf zon oluşturarak beta hemolitik, *S. epidermidis* ise etrafında şeffaf zon oluşturarak beta hemolitik olarak yorumlanmıştır. Daha önceki çalışmalar değerlendirildiğinde probiyotik özelliğinin değerlendirilmesi için fermente bir gıdadan izole edilen bir *P. pentosaceus* suşuna yapılan güvenlik değerlendirmesinde hemolitik aktivite göstermediğini vurgulamaktadır [99]. Çalışmada probiyotik aday olarak değerlendirilen

E. mundtii AF1 ve *P. pentosaceus* AF2'nin daha önceki çalışmalar ile paralel olarak hemolitik aktivite sergilemediği görülmüştür.

İzolatların güvenlik değerlendirmesi kapsamında devamında antibiyotik direnç profilleri ölçülmüştür. Bilindiği üzere günümüzde antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyonlara karşı savunmamızın temel dayanağını oluştururlar. Ancak ne yazık ki bilinçsiz tüketim sonucu antibiyotik direnci önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiş olup alternatif tedavi yaklaşımları için araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Direnç genlerinin patojenik bakterilere potansiyel yayılması endişe kaynağıdır. Hatta araştırmalar, kısa süreli antibiyotik uygulamasının bile insan bağırsağında yıllarca devam eden dirençli bakteri popülasyonlarının stabilizasyonuna yol açabileceğini göstermiştir [100]. Bu doğrultuda antibiyotik tedavi yaklaşımına alternatif olabilecek probiyotik suşların değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Çalışmada sekiz farklı antibiyotik diskinin karşı [IMC: Silastatin (20mg), E: eritromisin (15mg), CIP: siprofloksasin (30mg), S: streptomisin (25mg), CD: sefdinir (30mg), AZM: azitromisin (30mg), TOB: tobramisin (30 mg), CN: gentamisin(30mg)] izolatların dirençlilik aktivitesi değerlendirilmiştir. *E. mundtii* AF1 için bakıldığında 3 antibiyotik çeşidine karşı duyarlılık, 2 antibiyotiğe karşı orta duyarlılık ve 3 antibiyotiğe karşı ise dirençlilik profili göstermiştir. *P. pentosaceus* AF2 ise dört bakteriye karşı duyarlılık profili meydana gelmiştir. Bunlar, inhibisyon zonları değerlendirildiğinde 2 adet bakteriye karşı duyarlılık, 2 adet bakteriye karşı ise orta duyarlılıkta olduğu görülmektedir. Önceki çalışmalara bakıldığında Haghshenas ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada *E. mundtii* 50H bakterisinin eritromisin, ampisilin, vankomisin, kloramfenikol ve penisiline dirençli olduğu belirtilmiştir [101]. Önceki çalışmalarla birlikte *E. mundtii* AF1 ve *P. pentosaceus* AF2 izolatu değerlendirildiğinde, *E. mundtii* AF1 in antibiyotiklere duyarlılık veya orta duyarlılık gösterdiği, *P. pentosaceus* AF2 bakterisinin ise daha sınırlı antibiyotik duyarlılık ifadesi gösterdiği söylenebilir.

Probiyotik bakterinin mide-bağırsak engelini aştıktan sonra bağırsağa tutunmasını ifade eden agregasyon yeteneği de diğer bir önemli kriteri oluşturmaktadır. Aynı zamanda bu sayede patojenlerin bağırsak yüzeyine tutunmasının engellenmesi sağlanmaktadır. Probiyotiklerin bu tutunumu gerçekleştirmesi için agregasyon özellikleri ölçülür. Aynı türe ait mikroorganizmaların birbirine tutunarak oluşturdukları hücre kolonilerine oto-agregasyon, Farklı türe ait mikroorganizmaların birbirlerine tutunarak meydana getirdiği koloniler ise ko-agregasyon olarak tanımlanmaktadır [76]. Probiyotik

adhezyonunu özellikle insanlarda incelemeye yönelik klinik zorluklar, *in vitro* sistemler ile agregasyon ölçümlerini önemli kılmaktadır. Bu bağlamda *E. mundtii* AF1 ve *P. pentosaceus* AF2 bakterilerinin agregasyon yeteneği test edilmişti ve *E. mundtii* AF1 için oto-agregasyon değeri % 72,46 iken *P. pentosaceus* AF2 için % 73,44 olarak hesaplanmıştır. *P. pentosaceus* için Vidhyasagar ve ark. tarafından yapılan oto-agregasyon testi değerleri incelendiğinde *P. pentosaceus* için elde ettiğimiz yüzdenin benzerliği ve incelenen çalışmadaki suşlara oranla yüksek bir agregasyon değeri olduğu ifade edilebilir [99]. *E. mundtii* ST4SA ve *Lactobacillus plantarum* 423 probiyotik suşlarının oto-agregasyon aktivitelerini test eden bir çalışmada elde edilen % 48 ila % 64 aralığındaki değer ile kıyaslandığında *E. mundtii* AF1 in yüksek oto-agregasyon ifadesi kanıtlanmıştır [102]. Ko-agregasyon değerleri ise *E. Mundtii* AF1 için *L. monocytogenes* e karşı % 63,78 iken *E. coli* için %70,77 olarak hesaplanmıştır. *P. Pentosaceus* AF2 için *L. monocytogenes* e karşı ko-agregasyon ifadesi % 57,38 iken *E. coli* için %56,8 olarak hesaplanmıştır. Probiyotik aday olarak değerlendirilen *P. pentosaceus* AF2 ve *E. mundtii* AF1 izolatların gösterdiği bu yüksek agregasyon yetenekleri GİS üzerinden geçişin ardından bağırsak bariyerine tutunma ve patojen bakterilerin burada yerleşmesini engelleme açısından büyük önem taşımaktadır.

Çalışmada, AF1 ve AF2 izolatu için değerlendirilen diğer bir önemli özellik antioksidan aktivite etkisinin araştırılmasıdır. Hücresel metabolizma sırasında üretilen serbest radikaller fazla üretildiği takdirde hücresel savunma yetersiz olarak oksidatif stres meydana gelebilir. Bu durumda çoğu canlı organizma, oksidatif strese karşı korunmak için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Sentetik antioksidanlara nazaran LAB, doğada yaygın olarak bulunan ve hali hazırda gıda fermantasyonlarında kullanılan antioksidan etkiye sahip mikroorganizmalardır. Bu gibi biyokaynaklardan antioksidan üretimi daha güvenli ve doğal olduğundan son yıllarda büyük ilgi görmüştür [74]. Probiyotik mikroorganizmaların reaktif oksijen türlerini indirgemesi konakçı sağlığı açısından önemli bir tedavi ajanı sunmaktadır. Bu bağlamda çalışmamızda *E. mundtii* AF1 ve *P. pentosaceus* AF2 bakterilerinin antioksidan aktivite yeteneği test edilmiş ve her iki örnekte antioksidan aktivite göstermiştir. İnek, keçi ve deve sütünün *P. pentosaceus* ile 24 saat fermantasyondan önce ve sonra antioksidan aktivitesini değerlendiren bir çalışmada her iki durumda da antioksidan aktivite kaydedilmiştir. Ancak, *P. pentosaceus* ile fermentasyondan sonra antioksidan aktivitede anlamlı bir artış oluşmuştur [103].

Çalışmada son aşama olarak, hücre kültürü ortamında *in vitro* olarak oluşturulan yara üzerine probiyotik adayı bakterilerin etkisi incelenmiştir. Hem lizat form hem de canlı bakteri formu olarak yara üzerine iki farklı aşamada bakteri örnekleri uygulanmıştır. *E. mundtii* AF1 için lizat form değerlendirildiğinde, en iyi % kapanma değeri 1×10^{10} seyreltmede ölçülmüştür. Dolayısıyla yarada açık kalan yüzey alanı en az bu seyreltme değerinde kaydedilmiştir. *E. mundtii* AF1 in canlı bakteri formu olarak uygulanan etkisine bakıldığında, en yüksek % kapanma değerinin ve en düşük açık yara yüzey alanının 1×10^8 seyreltmede kaydedildiği görülmektedir. *P. pentosaceus* AF2 için lizat form değerlendirildiğinde, yara üzerinde en yüksek % kapanma değeri 1×10^8 seyreltmede kaydedilirken en düşük açık yüzey alanı ölçülmüştür. *P. pentosaceus* AF2 canlı bakteri formunun yara üzerine uygulanmasının ardından, 1×10^{10} seyreltmede en iyi % kapanma verisi elde edilmiştir. Literatürde, yapılan farklı çalışmalarda, *in vivo* olarak probiyotiklerin diyabetik yaralar üzerinde enfeksiyonu azaltarak iyileşme sürecinde pozitif etki gösterdiğine yönelik sonuçlar mevcuttur [104]. Pek çok alanda olumlu etkileri kanıtlanan probiyotik bakterilerin farklı bir konu olarak ağız sağlığı açısından da önem taşıdığı kaydedilmiştir. Ağız mukozasında oluşturulan yaralar üzerinde bakteriyal dengeyi sağlamak ve iyileşmeyi teşvik etmek için uygulanan *Lactobacillus reuteri* pozitif sonuçlar vermiştir [105]. *In vitro* çalışmalara bakıldığında ise, CT26 kolon kanseri hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada hücreler üzerinde yapılan çizik ile oluşturulan model yaralar probiyotik ile muamele edilmiştir. Probiyotik bakterilerin yara iyileşmesini teşvik ettiği doğrulanmıştır [106]. Probiyotik bakterilerden *Lactobacillus*'ların yara iyileşmesi üzerine etkileri *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir. Lombardi ve arkadaşları insan keratinosit hücre hattı (HaCaT) üzerinde *L. acidophilus* bakterisinin nitrik oksit sentaz (NOS)₂ ekspresyonunu arttırdığını ve tek sıra HaCaT hücrelerinde reepitelizasyon oluşturduğunu göstermişlerdir. Otte ve arkadaşlarının intestinal hücre hatlarında yaptığı çalışmaya göre *L. acidophilus* verilen hücrelerde COX-2 ekspresyonunu ve PGE2 sekresyonu anlamlı bir şekilde artırmıştır [107]. Tüm veriler ışığında, literatürdeki örnek bakteriler ile kıyaslandığında *E. mundtii* AF1 ve *P. pentosaceus* AF2 probiyotik adayı bakteri örneklerinin oldukça yüksek kapasiteye sahip oldukları ifade edilebilmektedir. Sonuç olarak bir probiyotik aday olarak ele aldığımız *E. mundtii* AF1 ve *P. pentosaceus* AF2 bakterileri GİS koşulları altında hayatta kalma ardından bağırsak bariyerine tutunarak buradaki patojen kolonizasyonunu engelleme, hemolitik ve antibiyotik direnç profili olarak güvenlik değerlendirmeleri açısından bakıldığında güçlü probiyotik olarak

değerlendirilebilmektedir. Aynı zamanda tüm bunlara ek olarak örnekleri in vitro yara iyileştirici etkisi hem probiyotik türler olarak hem de elde edildikleri bitkisel kaynak açısından terapötik ajanlar olarak desteklenerek literatüre kazandırılabilir.



4. SONUÇ

Yapılan çalışmalar sonucunda *E. mundtii* AF1 bakterisi GİS koşullarına dayanıklılık (pH, pankreatin, pepsin, safra tuzu), agregasyon yeteneği, antioksidan, antimikrobiyal, antibiyotik duyarlılık profili ve yara iyileştirme etki sonuçları değerlendirildiğinde oldukça önemli veriler elde edilmiş ve güçlü bir probiyotik adayı olarak tespit edilmiştir.

Yine yapılan çalışmalar sonucunda karakterize edilen *P. pentosaceus* AF2 bakterisinin de GİS koşullarına (pH, pankreatin pepsin, safra tuzu), agregasyon yeteneği, antioksidan, antimikrobiyal, antibiyotik duyarlılık profili ve yara iyileştirme etki sonuçları değerlendirildiğinde desteklenen literatür çalışmaları ile paralel olarak oldukça önemli veriler elde edilmiş ve güçlü bir probiyotik adayı olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışma *E. mundtii* AF1 ve *P. pentosaceus* AF2 bakterilerinin güçlü probiyotik adaylar olarak farklı endüstriyel alanlarda kullanımının değerlendirilebileceğini ortaya çıkarmıştır.

5. KAYNAKLAR

- [1] G. Gasbarrini, F. Bonvicini, and A. Gramenzi, "Probiotics History," *J Clin Gastroenterol*, c. 50, ss. S116–S119, 2016.
- [2] M. E. Sanders, "Probiotics: Definition, sources, selection, and uses," in *Clinical Infectious Diseases*, c. 46, sayı 2, ss. 58-61, 2008.
- [3] S.A. Abou-Donia, "Origin, History and Manufacturing Process of Egyptian Dairy Products: An Overview," *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, c. 5, sayı. 1, ss. 51-62, 2008.
- [4] M. Ozen and E. C. Dinleyici, "The history of probiotics: The untold story," *Beneficial Microbes*, c. 6, sayı. 2. Wageningen Academic Publishers, c. 6, sayı 2, ss. 159–165, 2015.
- [5] A. C. Ouwehand, S. Salminen, and E. Isolauri, "Probiotics: an overview of beneficial effects," In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the seventh Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, Egmond aan Zee, the Netherlands* ss. 279-289, 2002.
- [6] H. S. Lye, C. Y. Kuan, J. A. Ewe, W. Y. Fung, and M. T. Liong, "The improvement of hypertension by probiotics: Effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens," *International Journal of Molecular Sciences*, c. 10, sayı 9. ss. 3755–3775, 2009.
- [7] R. Ashraf and N. P. Shah, "Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms," *Crit Rev Food Sci Nutr*, c. 54, sayı 7, ss. 938–956, 2014.
- [8] E. Isolauri, M. Kaila, W. H. Ling, and S. Salminen, "Oral Bacteriotherapy for Viral Gastroenteritis," *Digestive diseases and sciences*, c. 39, sayı. 12, ss. 2595–2600, 1994.
- [9] H. Szajewska, M. Kotowska, J. Z. Mrukowicz, M. Armńska, and W. Mikolajczyk, "Efficacy of Lactobacillus GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants," *Journal of Pediatrics*, c. 138, sayı 3, ss. 361–365, 2001.
- [10] V. Gupta and R. Garg, "Probiotics," *Indian Journal of Medical Microbiology*, c. 27, sayı 3, ss. 202–209, 2009.
- [11] G. Saxami *et al.*, "Two potential probiotic lactobacillus strains isolated from olive microbiota exhibit adhesion and anti-proliferative effects in cancer cell lines," *J Funct Foods*, c. 24, ss. 461–471, 2016,
- [12] G. Reid, J. Jass, M. T. Sebulsky, and J. K. McCormick, "Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice," *Clinical Microbiology Reviews*, c. 16, sayı 4, ss. 658–672, 2003.
- [13] I. P. Kaur, K. Chopra, and A. Saini, "Probiotics: potential pharmaceutical applications," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, c. 15, sayı 1, ss. 1-9, 2002.

- [14] F. Djadouni and M. Kihal, "Brazilian Archives Of Biology And Technology Antimicrobial Activity Of Lactic Acid Bacteria and the Spectrum of their Biopeptides Against Spoiling Germs in Foods," *Arch. Biol. Technol. c.* 55, sayı 3, ss. 435–443, 2012.
- [15] C. Pothoulakis *et al.*, "Saccharomyces boulardii Inhibits Clostridium difficile Toxin A Binding and Enterotoxicity in Rat Ileum," *Gastroenterology*, c. 104, sayı 4, ss. 1108-1115, 1993.
- [16] P. M. Sherman, J. C. Ossa, and K. Johnson-Henry, "Invited review: Unraveling mechanisms of action of probiotics," *Nutrition in Clinical Practice*, c. 24, sayı 1, ss. 10–14, 2009.
- [17] R. Ben Slama, B. Kouidhi, T. Zmantar, K. Chaieb, and A. Bakhrouf, "Anti-listerial and Anti-biofilm Activities of Potential Probiotic Lactobacillus Strains Isolated from Tunisian Traditional Fermented Food," *J Food Saf*, c. 33, sayı 1, ss. 8–16, 2013.
- [18] B. Turchi *et al.*, "Preliminary evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Italian food products," *World J Microbiol Biotechnol*, c. 29, sayı 10, ss. 1913–1922, 2013.
- [19] A. M. O. Leite *et al.*, "Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains," *J Dairy Sci*, c. 98, sayı 6, ss. 3622–3632, 2015.
- [20] M. Naeem, M. Ilyas, S. Haider, S. Baig, And M. Saleem, "Isolation Characterization And Identification Of Lactic Acid Bacteria From Fruit Juices And Their Efficacy Against Antibiotics," *Pak. J. Bot*, c. 44, sayı 1, ss. 323-328, 2012.
- [21] M. F. Hamet *et al.*, "Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirianofaciens* in microbial consortia present in kefir grains," *Food Microbiol*, c. 36, sayı 2, ss. 327–334, 2013.
- [22] N. Tajabadi, M. Mardan, M. Y. A. Manap, and S. Mustafa, "Molecular identification of *Lactobacillus* spp. isolated from the honey comb of the honey bee (*Apis dorsata*) by 16S rRNA gene sequencing," *J Apic Res*, c. 52, sayı 5, ss. 235–241, 2013.
- [23] P. Sornplang and S. Piyadeatsoontorn, "Probiotic isolates from unconventional sources: a review," *Journal of Animal Science and Technology*, vol. 58. Korean Society of Animal Sciences and Technology, c. 58, sayı 1, ss. 1-11, 2016.
- [24] A. Berlec, "Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: Search for plant probiotics," *Plant Science*, c. 193–194, ss. 96–102, 2012.
- [25] L. Samedi and A. L. Charles, "Isolation and characterization of potential probiotic *Lactobacilli* from leaves of food plants for possible additives in pellet feeding," *Annals of Agricultural Sciences*, c. 64, sayı 1, ss. 55–62, 2019.
- [26] G. Martins *et al.*, "Characterization of Epiphytic Bacterial Communities from Grapes, Leaves, Bark and Soil of Grapevine Plants Grown, and Their Relations," *PLoS One*, c. 8, sayı 8, 2013.

- [27] J. Yang, H. Tan, and Y. Cai, "Characteristics of lactic acid bacteria isolates and their effect on silage fermentation of fruit residues," *J Dairy Sci.* c. 99, sayı 7, ss. 5325–5334, 2016.
- [28] Ş. Üzmez. "*Herniaria glabra* l. bitkisinin biyolojik aktivitesinin belirlenmesi," Yüksek lisans tezi, Kimya Bölümü, Düzce Üniversitesi, Düzce, 2019.
- [29] A.E. Al-Snafi, "Pharmacological importance of *Herniaria glabra* and *Herniaria hirsuta*- A review" *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, c. 5, sayı 4, ss. 2167-2175, 2018.
- [30] S. Kozachok *et al.*, "γ-Pyrone compounds: flavonoids and maltol glucoside derivatives from *Herniaria glabra* L. collected in the Ternopil region of the Ukraine," *Phytochemistry*, c. 152, ss. 213–222, 2018.
- [31] D. Wojnicz, A. Z. Kucharska, A. Sokół-Łętowska, M. Kicia, and D. Tichaczek-Goska, "Medicinal plants extracts affect virulence factors expression and biofilm formation by the uropathogenic *Escherichia coli*," *Urol Res*, c. 40, sayı 6, ss. 683–697, 2012.
- [32] H. Rhiouani, B. Lyoussi, A. Settaf, Y. Cherrah, & M. Hassar, "Antihypertensive effect of *Herniaria glabra* saponins in the spontaneously hypertensive rat. *Annales Pharmaceutiques Francaises* c. 59, sayı 3, ss. 211–214, 2001.
- [33] A. Crescenti, F. Puiggros, A. Colome, J.A. Poch, A. Caimari, J. Bas, N. Boque, L. Arola, "Antirolithiasic effect of a plant formulation of *Herniaria glabra*, *Agropyron repens*, *Equisetum arvense* and *Sambucus nigra* (Herbensurina®) in the prevention of experimentally induced nephrolithiasis in rats," *Archivos Españoles de Urología*, c. 68, sayı 10, ss. 739-749.
- [34] M. Zommiti, M. G. J. Feuilloley, and N. Connil, "Update of probiotics in human world: A nonstop source of benefactions till the end of time," *Microorganisms*, c. 8, sayı 12, ss. 1–33, 2020.
- [35] Y. Koçak, A. Fındık, A. Çiftçi, and G. Tarihi, "Probiyotikler: Genel Özellikleri ve Güvenilirlikleri Probiotics: General Features and Safety," *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* c. 27, sayı 2, ss. 118-122, 2016.
- [36] S. Ebner, L. N. Smug, W. Kneifel, S. J. Salminen, and M. E. Sanders, "Probiotics in dietary guidelines and clinical recommendations outside the European Union," *World Journal of Gastroenterology*, c. 20, sayı 43, ss. 16095–16100, 2014.
- [37] K. H. Schleifer and R. Kılpper-Balz "Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* norn. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. Nov," *International Journal of Systematic Bacteriology*, c. 34, sayı 1, ss. 31-34
- [38] C. M. A. P. Franz, M. J. Van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel, and A. Gálvez, "Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme," *FEMS Microbiology Reviews*, c. 31, sayı 3. ss. 293–310, 2007.
- [39] X. Liang *et al.*, "Insect symbionts as valuable grist for the biotechnological mill: an alkaliphilic silkworm gut bacterium for efficient lactic acid production," *Appl Microbiol Biotechnol*, c. 102, sayı 11, ss. 4951–4962, 2018.

- [40] B. M. Taban, H. B. Dogan Halkman, and A. K. Halkman, "Microflora of the Intestine: Biology of the *Enterococcus* spp.," in *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, Elsevier Inc., ss. 652–657, 2014.
- [41] S. Coppola, F. Villani, R. Coppola, and E. Parente, "Comparison of different starter systems for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture," *Le lait*, c. 70, sayı 5-6, ss. 411-423, 1990.
- [42] M. Hugas, M. Garriga, and M. T. Aymerich, "Functionality of enterococci in meat products," in *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier, c. 88, sayı 2-3, ss. 223–233, 2003.
- [43] P. F. Fox, T. Uniacke-Lowe, P. L. H. McSweeney, and J. A. O'Mahony, "Vitamins in Milk and Dairy Products," in *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Springer International Publishing, ss. 271–297, 2015.
- [44] F. Nawaz *et al.*, "Genomic and functional characterization of *Enterococcus mundtii* QAUEM2808, isolated from artisanal fermented milk product dahi," *Front Microbiol*, c. 10, ss. 234, 2019.
- [45] M. De Kwaadsteniet, S. D. Todorov, H. Knoetze, and L. M. T. Dicks, "Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria," *Int J Food Microbiol*, c. 105, sayı 3, ss. 433–444, 2005.
- [46] A. E. Ferreira, N. Canal, D. Morales, B. Fuentefria, and G. Corção, "BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Characterization of Enterocins Produced by *Enterococcus mundtii* Isolated from Humans Feces," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, c. 50, sayı 2, ss. 249–258, 2007.
- [47] L. Settanni, S. Valmorri, G. Suzzi, and A. Corsetti, "The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) production by *Enterococcus mundtii* strains," *Food Microbiol*, c. 25, sayı 5, ss. 722–728, 2008.
- [48] M. Qiu, L. Feng, Z. Yu, C. Zhao, S. Gao, L. Bao, N. Zhang, Y. Fu, X. Hu, "Probiotic *Enterococcus mundtii* H81 inhibits the NF- κ B signaling pathway to ameliorate *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice," *Microbial Pathogenesis*, c. 164, ss. 105414, 2022.
- [49] W. J. Dobrogosz³ and R. W. Stone, "Oxidative Metabolism In *Pediococcus Pentosaceus* Ii. Factors Controlling The Formation Of Oxidative Activities^{1 2}," *Journal of Bacteriology*, c. 84, sayı 4, ss. 724-729, 2023.
- [50] E. Damayanti, M. Ichsyani, L. Istiqomah, A. S. Anggraeni, and M. Kurniadi, "Fermentation of amylolytic yeast and lactic acid bacteria to improve the quality of modified cassava," in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, IOP Publishing Ltd, c. 1011, sayı 1, ss. 012004, 2021.
- [51] C. M. Dobson, H. Deneer, S. Lee, S. Hemmingsen, S. Glaze, and B. Ziola, "Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus clausenii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer," *Int J Syst Evol Microbiol*, c. 52, sayı 6, ss. 2003–2010, 2002.

- [52] M. Danielsen, P. J. Simpson, E. B. O'Connor, R. P. Ross, and C. Stanton, "Susceptibility of *Pediococcus* spp. to antimicrobial agents," *J Appl Microbiol*, c. 102, sayı 2, ss. 384–389, 2007.
- [53] W. J. Simpson and H. Taguchi, "5 The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetratogenococcus* and *Aerococcus*." *The genera of lactic acid bacteria c. 2* ss. 125-172, 1995.
- [54] K. Damodharan, Y. S. Lee, S. A. Palaniyandi, S. H. Yang, and J. W. Suh, "Preliminary probiotic and technological characterization of *Pediococcus pentosaceus* strain KID7 and in vivo assessment of its cholesterol-lowering activity," *Front Microbiol*, c. 6, ss. 768, 2015.
- [55] O. Osmanagaoglu, F. Kiran, and H. Ataoglu, "Evaluation of *in vitro* Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF Isolated from Human Breast Milk," *Probiotics Antimicrob Proteins*, c. 2, sayı 3, ss. 162–174, 2010.
- [56] A. Lim, H.M. Tan "Probiotics: legal status and regulatory issues section 1.8.2. animal probiotics," *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, eds Lee Y. K., Salminen S. (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.), ss. 123–139, 2009
- [57] Y. Wang *et al.*, "Effect of probiotics on the meat flavour and gut microbiota of chicken," *Sci Rep*, c. 7, sayı 1, ss. 640, 2017.
- [58] M. Montemurro, G. Celano, M. De Angelis, M. Gobbetti, C. G. Rizzello, and E. Pontonio, "Selection of non-*Lactobacillus* strains to be used as starters for sourdough fermentation," *Food Microbiol*, c. 90, ss. 10349, 2020.
- [59] L. Gong *et al.*, "A new isolate of *pediococcus pentosaceus*(SL001) with antibacterial activity against fish pathogens and potency in facilitating the immunity and growth performance of grass carps," *Front Microbiol*, c. 10, ss. 1384, 2019.
- [60] S. Won *et al.*, "Evaluation of potential probiotics *bacillus subtilis* WB60, *Pediococcus pentosaceus*, and *Lactococcus lactis* on growth performance, immune response, gut histology and immune-related genes in whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*," *Microorganisms*, c. 8, sayı 2, ss. 281, 2020.
- [61] J. S. Shin *et al.*, "Exopolysaccharide fraction from *Pediococcus pentosaceus* KFT18 induces immunostimulatory activity in macrophages and immunosuppressed mice," *J Appl Microbiol*, c. 120, sayı 5, ss. 1390–1402, 2016.
- [62] H. K. Kwon, M. J. Song, H. J. Lee, T. S. Park, M. Il Kim, and H. J. Park, "*Pediococcus pentosaceus*-fermented *Cordyceps militaris* inhibits inflammatory reactions and alleviates contact dermatitis," *Int J Mol Sci*, c. 19, sayı 11, ss. 3504, 2018.
- [63] N. Yamamoto *et al.*, "Antioxidant capacity of soymilk yogurt and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria." *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, c. 38, sayı 3, ss. 97-104. 2019.
- [64] X. Lin *et al.*, "Lactic acid bacteria with antioxidant activities alleviating oxidized oil induced hepatic injury in mice," *Front Microbiol*, c. 9, ss. 2684, 2018.
- [65] S. Jiang, L. Cai, L. Lv, and L. Li, "*Pediococcus pentosaceus*, a future additive or probiotic candidate," *Microbial Cell Factories*, c. 20, sayı 1, ss. 1-14, 2021.

- [66] T. Gregersen, "Microbiology and Rapid Method for Distinction of Gram-Negative from Gram-Positive Bacteria," *European journal of applied microbiology and biotechnology*, c. 5, ss. 123-127, 1978.
- [67] D. G. Pitcher, N. A. Saunders, R. J. Owen, P. D. G. N. A. Saunders, and R. J. Slown, "Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate," *Letters in applied microbiology*, c. 8, sayı 4, ss. 151-156, 1989.
- [68] S. Ugras, "Isolation, identification and characterization of probiotic properties of bacterium from the honey stomachs of Yigilca honeybees in Turkey," *Turk Entomol Derg*, c. 41, sayı 3, ss. 253–261, 2017.
- [69] P. A. Maragkoudakis, G. Zoumpopoulou, C. Miaris, G. Kalantzopoulos, B. Pot, and E. Tsakalidou, "Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products," *Int Dairy J*, c. 16, sayı 3, ss. 189–199, 2006.
- [70] R. Campana, S. Federici, E. Ciandrini, and W. Baffone, "Antagonistic activity of *lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 on the growth and adhesion/invasion characteristics of Human *Campylobacter jejuni*," *Curr Microbiol*, c. 64, sayı 4, ss. 371–378, 2012.
- [71] F.T. Eryılmaz, "Vajinal Sekresyondan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerine Ait Bazı Suşların Potansiyel Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi," Doktora tezi, Temel Biyoteknoloji, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 2011
- [72] P. Sharma, S. K. Tomar, P. Goswami, V. Sangwan, and R. Singh, "Antibiotic resistance among commercially available probiotics," *Food Research International*, c. 57. ss. 176–195, 2014.
- [73] B. Kos, "Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92," *Journal of applied microbiology*, c. 94, sayı 6, ss. 981-987, 2002.
- [74] S. Li *et al.*, "Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods," *Food Chem*, c. 135, sayı 3, ss. 1914–1919, 2012.
- [75] F. Lombardi *et al.*, "Soluble fraction from lysates of selected probiotic strains differently influences re-epithelialization of HaCaT scratched monolayer through a mechanism involving nitric oxide synthase 2," *Biomolecules*, c. 9, sayı 12, ss. 756, 2019.
- [76] J. Brandi *et al.*, "Exploring the wound healing, anti-inflammatory, anti-pathogenic and proteomic effects of lactic acid bacteria on keratinocytes," *Sci Rep*, c. 10, sayı 1, ss. 11572, 2020.
- [77] G. Cory, "Scratch-Wound Assay," in *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., ss. 25–30. 2011.
- [78] M. L. Ritchie and T. N. Romanuk, "A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases," *PLoS One*, c. 7, sayı 4, 2012.
- [79] J. A. M. Muñoz *et al.*, "Novel probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 strain active against rotavirus infections," *Appl Environ Microbiol*, c. 77, sayı 24, ss. 8775–8783, 2011.

- [80] M. Kawase, F. He, A. Kubota, G. Harata, and M. Hiramatsu, "Oral administration of lactobacilli from human intestinal tract protects mice against influenza virus infection," *Lett Appl Microbiol*, c. 51, sayı 1, ss. 6–10, 2010.
- [81] S. Lebeer, J. Vanderleyden, and S. C. J. De Keersmaecker, "Genes and Molecules of *Lactobacilli* Supporting Probiotic Action," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, c. 72, sayı 4, ss. 728–764, 2008.
- [82] T. Touret, M. Oliveira, and T. Semedo-Lemsaddek, "Putative probiotic lactic acid bacteria isolated from sauerkraut fermentations," *PLoS One*, c. 13, sayı 9, 2018.
- [83] A. Monteagudo-Mera *et al.*, "In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin," *J Funct Foods*, c. 4, sayı 2, ss. 531–541, 2012.
- [84] L. Fontana, M. Bermudez-Brito, J. Plaza-Diaz, S. Muñoz-Quezada, and A. Gil, "Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics," *British Journal of Nutrition*, c. 109, sayı 2, ss. 35-50, 2013.
- [85] L. R. da Cunha, C. L. L. F. Ferreira, E. Durmaz, Y. J. Goh, R. B. Sanozky-Dawes, and T. R. Klaenhammer, "Characterization of *Lactobacillus gasseri* isolates from a breast-fed infant," *Gut Microbes*, c. 3, sayı 1, ss. 15-24, 2012.
- [86] A. Bhardwaj, H. Gupta, S. Kapila, G. Kaur, S. Vij, and R. K. Malik, "Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under *in vitro* and *in vivo* conditions," *Int J Food Microbiol*, c. 141, sayı 3, ss. 156–164, 2010.
- [87] B Hyronimus, C. Le Marrec, A. H. Sassi, A. Deschamps'', and D. Deschamps'', "Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria," *International journal of food microbiology*, c. 61, sayı 2-3, ss. 193-197, 2000.
- [88] M. Lei, X. Dai, and M. Liu, "Biological Characteristics and Safety Examination of Five Enterococcal Strains from Probiotic Products," *J Food Saf*, c. 35, sayı 3, ss. 324–335, 2015.
- [89] M. Asan-Ozusaglam and A. Gunyakti, "*Lactobacillus fermentum* strains from human breast milk with probiotic properties and cholesterol-lowering effects," *Food Sci Biotechnol*, c. 28, sayı 2, ss. 501–509, 2019.
- [90] S. Nath, J. Sikidar, M. Roy, and B. Deb, "In vitro screening of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented milk product," *Food Quality and Safety*, c. 4, sayı 4, ss. 213–223, 2020.
- [91] Y. Nami, R. V. Bakhshayesh, H. M. Jalaly, H. Lotfi, S. Eslami, and M. A. Hejazi, "Probiotic properties of *enterococcus* isolated from artisanal dairy products," *Front Microbiol*, c. 10, ss. 300, 2019.
- [92] A. Lauková, V. Focková, and M. P. Simonová, "*Enterococcus mundtii* isolated from slovak raw goat milk and its bacteriocinogenic potential," *Int J Environ Res Public Health*, c. 17, sayı 24, ss. 1–11, 2020.
- [93] T. Grau, A. Vilcinskas, and G. Joop, "Probiotic *Enterococcus mundtii* isolate protects the model insect *Tribolium castaneum* against *Bacillus thuringiensis*," *Front Microbiol*, c. 8, ss. 1261, 2017.

- [94] D. Bhagat *et al.*, “Probiotic properties of a phytase producing *Pediococcus acidilactici* strain SMVDUDB2 isolated from traditional fermented cheese product, Kalarei,” *Sci Rep*, c. 10, sayı 1, 2020.
- [95] R. H. Orsi and M. Wiedmann, “Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, c. 100, sayı 12, ss. 5273–5287, 2016.
- [96] M. Lecuit, “*Listeria monocytogenes*, a model in infection biology,” *Cellular Microbiology*, c. 22, sayı 4, ss. e13186, 2020.
- [97] G. Ladha and K. Jeevaratnam, “Characterization of purified antimicrobial peptide produced by *Pediococcus pentosaceus* LJR1, and its application in preservation of white leg shrimp,” *World J Microbiol Biotechnol*, c. 36, sayı 5, ss. 1-12, 2020.
- [98] S. Yu, C. Zhou, T. Zhang, B. Jiang, and W. Mu, “Short communication: 3-Phenyllactic acid production in milk by *Pediococcus pentosaceus* SK25 during laboratory fermentation process,” *J Dairy Sci*, c. 98, sayı 2, ss. 813–817, 2015.
- [99] V. Vidhyasagar and K. Jeevaratnam, “Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties *in vitro*,” *J Funct Foods*, c. 5, sayı 1, ss. 235–243, 2013.
- [100] C. Jernberg, S. Löfmark, C. Edlund, and J. K. Jansson, “Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota,” *ISME Journal*, c. 1, sayı 1, ss. 56–66, 2007.
- [101] B. Haghshenas *et al.*, “Probiotic Assessment of *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Enterococcus mundtii* 50H Isolated from Traditional Dairies Microbiota,” *Adv Pharm Bull*, c. 6, sayı 1, ss. 37–47, 2016.
- [102] M. Botes, B. Loos, C. A. Van Reenen, and L. M. T. Dicks, “Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments,” *Arch Microbiol*, c. 190, sayı 5, ss. 573–584, 2008.
- [103] G. Balakrishnan and R. Agrawal, “Antioxidant activity and fatty acid profile of fermented milk prepared by *Pediococcus pentosaceus*,” *J Food Sci Technol*, c. 51, sayı 12, ss. 4138–4142, 2014.
- [104] M. Mohtashami, M. Mohamadi, M. Azimi-Nezhad, J. Saeidi, F. F. Nia, and A. Ghasemi, “*Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus plantarum* improve diabetic wound healing through modulating inflammatory factors,” *Biotechnol Appl Biochem*, c. 68, sayı 6, ss. 1421–1431, 2021.
- [105] N. Han *et al.*, “Balanced oral pathogenic bacteria and probiotics promoted wound healing via maintaining mesenchymal stem cell homeostasis,” *Stem Cell Res Ther*, c. 11, sayı 1, ss. 1-12, 2020.
- [106] F. Shang *et al.*, “The inhibitory effects of probiotics on colon cancer cells: *In vitro* and *in vivo* studies,” *J Gastrointest Oncol*, c. 11, sayı 6, ss. 1224–1232, 2020.
- [107] J. M. Otte, R. Mahjuri-Namari, S. Brand, I. Werner, W. E. Schmidt, and F. Schmitz, “Probiotics regulate the expression of COX-2 in intestinal epithelial cells,” *Nutr Cancer*, c. 61, sayı 1, ss. 103–113, 2009.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ayşenur YILMAZ

Yabancı Dili : İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi	2020
Lise	Matematik – Fen	Cumhuriyet Anadolu Lisesi	2016

TEZDEN ÇIKAN YAYIN

A. Fidan, ve S. Uğraş. “*Herniaria glabra* L. Bitkisinden *Bacillus* sp. İzolasyonu” Çukurova Üniversitesi, 5. Ulusal Uygulamalı Biyolojik Bilimler Kongresi, 2022

DİĞER YAYINLAR

A. Fidan, ve S. Uğraş, “Bakteriyosinlerin Sağlık Alanında Kullanımı,” *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, c. 52, sayı 3, ss. 145-157, 2022.

S. Uğraş, N. Sipahi, H. Dursun, F. Keçeli, H. M. Eriş Hasırcı, and A. Fidan, “Etkinlik Temelli Bir Öğretim Modeli Mikrodünyaya Yolculuk-3 Projesi,” *Uluslararası Türk Eğitim Bilimleri Dergisi*, 2021.