

ANNE SÜTÜ İLE BESLENEN BEBEKLERİN DIŞKISINDAN İZOLE EDİLEN *LACTOBACİLLUS* TÜRLERİNİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Leila Mehrnia¹, Zehra Nur Yüksekdağ^{2*}, Belma Aslım²

Özet:

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan ve anne sütü ile beslenen yeni doğan bebeklerin dışkısından izole edilerek moleküler tanımlamaları yapılan laktobasil cinsine ait 15 bakterinin laktik asit, hidrojen peroksit, ekzopolisakkarit üretimleri, antibiyotik duyarlılıkları, antimikrobiyal aktiviteleri, asit direnci ve safra toleransı gibi bazı probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Ayrıca, yüksek ekzopolisakkarit üretimine sahip olan 2 suşun (*Lactobacillus casei* LB74 ve *L. casei* LB61) agregasyon ve hidrofobisite yetenekleri belirlenmiştir. Suşların asit üretim miktarının belirlenebilmesi için farklı iki besi yeri kullanılmış ve skim milk besi yerinde daha yüksek asit üretiminin olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Bakterilerin hidrojen peroksit üretim miktarları 0,68–3,83 µg/mL arasında değişirken, ürettiği ekzopolisakkarit miktarlarının 142,99–425,16 mg/L arasında değiştiği tespit edilmiştir. Suşların penisilin, kloramfenikol ve amoksisilin antibiyotiklerine %100 duyarlı, streptomisin ve vankomisin antibiyotiklerine ise %100 dirençli olduğu ve tüm suşların *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. typhimurium* CCM5445, *P. aeruginosa* ATCC 27853 patojen bakterileri üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Bakterilerin artan asitlik ve safra konsantrasyonlarında hücre gelişimlerinde azalma olduğu ve bu azalmanın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Yüzde otoagregasyon değerleri *L. casei* LB74 (%28,91) suşunda, yüzde koagregasyon değerleri ise *S. enteritidis* test bakterisinin kullanımıyla *L. casei* LB61 (%31,08) suşunda yüksek bulunmuştur. Suşlar, kloroform ve toluen hidrokarbonları ile hidrofobisite göstermişlerdir.

Anahtar kelimeler: *Lactobacillus* sp., EPS, antimikrobiyal aktivite, asit ve safra dirençliliği, agregasyon, hidrofobisite

*¹Molana Mohteşem, Asivandzade C., No:115, Behdari, Urmiyeh, İran, ²Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji AbD., Teknikokullar, Ankara. Bu araştırma birinci yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir. Yazışmalardan sorumlu yazar: zehranur@gazi.edu.tr

GİRİŞ

Probiyotikler, insan ve hayvanların doğal mikroflorasına ait, özellikleri geliştiren, tüketimleri sonucunda ağızda, sindirim sisteminde, üst solunum yollarında ya da ürogenital kanallarda yararlı etkileri ile konakçının sağlığını koruyan, buralarda oluşan enfeksiyonların iyileşmesine katkıda bulunan, tek veya karışık mikroorganizma kültürleridir (1, 2). Probiyotik olarak kullanılacak bir ürünün güvenilir olması, kullanıldığı insan ve hayvanda yan etkisi olmaması, stabil olması, düşük pH ve safra tuzları gibi olumsuz çevre koşullarından etkilenmeden midede canlı kalabilmesi ve bağırsakta metabolize olması, antimikrobiyal maddeler üreterek patojenik bakterilere antimikrobiyal etki göstermesi, antibiyotiklere dirençli olması istenmektedir. Antibiyotiğe bağlı ortaya çıkan hastalıklarda bağırsak florasını düzeltmek amacı ile kullanılabileceklerinden, bağırsaktaki antibiyotiklerden etkilenmemeli ve gıdalara ilave edildiğinde kaliteyi düşürmemelidirler (3,4).

Doğumda bebeğin bağırsakları steril olmasına rağmen, doğumdan hemen sonra çevrede bulunan mikroorganizmalar ile hızlı bir şekilde kolonize olur. Florayı oluşturacak bakterilerin başlıca kaynakları anne doğum kanalında bulunan mikroorganizmalar ile bebeğin yakın çevresinde ve bu çevrede temas ettiği kişilerde olan mikroorganizmalardır. Doğumdan hemen sonra bağırsak florasında *E. coli* ve streptokoklar baskındır. Bebek anne sütü aldıkça *E. coli*, streptokoklar ve clostridia'lar azalırken, laktobasil ve bifidobakteriler artmaya başlar. Anne sütünden kesildikten sonra erişkin florası yönünde değişiklikler olmaya başlar ve ikinci yılın sonuna doğru erişkin florasının benzeri bir flora oluşur ve yaşam boyu sabit kalır. Mide, duodenum ve jejunumda peristaltizmin daha hızlı olması, asidik ortam (mide) ve safra asitleri (duodenum) nedeni ile daha az sayıda bakteri barındırır (10^{2-3}). İleumdan itibaren geçiş yavaşladığından bakterilerin sayısı (10^{3-7}) ve çeşitliliği kolondakine benzer görünüm kazanmaya başlar. Metabolik olarak aktif olan bu flora diğer bakteriler, mukozal immün sistem ve bağırsak epitel hücreleri ile sürekli iletişim halinde olduğundan bebeğin postnatal gelişimini ve fizyolojisini etkilemesi beklenir (5-7).

Doğumdan sonra florayı oluşturan bakterilerin türü ve miktarına etki eden çok sayıda faktör vardır. Annenin aldığı besinler, probiyotik alıp almaması, doğum şekli (vajinal veya cerrahi), gebelik yaşı ve bebeğin primer beslenme şekli (anne sütü veya mama) gibi ekstrensek faktörler yanı sıra yeni doğan bebeğin sağlık durumu, immünolojik durumu, gastrointestinal sistem geçiş zamanı, pH'sı ve stres gibi intrinsek faktörler de kolonizasyonu etkiler. Doğum kanalından geçmediklerinden sezaryenle doğan bebeklerde flora gelişimi geç olur ve daha çok çevreden alınan mikroorganizmaları içerir (6). Yaşamın ilk haftalarında anne sütü ile beslenen bebeklerin bağırsak florasında, bifidobakteriler ve laktobasiller baskın iken mama ile beslenen bebeklerin bağırsaklarında enterobakter türleri baskındır. Altı ay dolayında mama ile beslenen bebeklerin florasında, laktobasiller ve bifidobakteriler bulunmasına rağmen anne sütü alanlarındakinden bu oran daha azdır ve flora dağılımı oldukça karmaşıktır. Bir yaşında anne sütü ve mama ile beslenen çocukların bağırsak florası biri birine benzer ve erişkin florasına yakındır (6,7). Gastrointestinal florasını çevresel stres, iklim, antibiyotikler, emosyonel faktörler ve diyetel değişiklikler de etkileyebilmektedir (8). Bebekler üzerinde probiyotiklerin etkileri arasında rotavirus ishallerinin süresinin kısaltılması, bağırsak florasının gelişimi, alerjik hastalıkların azaltılması, immün modülasyonda ve prematüre bebeklerde nekrotizan enterokolit sıklığının azaltılması olduğu rapor edilmektedir (1, 9-11).

Bu çalışmada, anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkılarından izole edilen laktobasil türlerinin bazı probiyotik özelliklerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, moleküler yöntemlerle tanımlamaları yapılmış bakterilerin laktik asit, hidrojen peroksit ve EPS üretimleri, antimikrobiyal aktiviteleri, antibiyotik duyarlılıkları, asitliğe ve safra tuzlarına karşı duyarlılıkları belirlenmiştir. Ayrıca, yüksek EPS üretimine sahip iki adet suşun agregasyon-koagregasyon ve hidrofobisite yetenekleri tespit edilmiştir. Tüm çalışmaların sonucunda bazı probiyotik özellikler açısından üstün nitelikli olan insan kaynaklı laktobasil cinsi bakterilerin bulunarak, bu bakterilerin probiyotik olarak kullanılabilirliğinin açığa çıkartılması hedeflenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Fermantasyon ürünlerinin kimyasal analizi

Araştırma, G. Ü. Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan, anne sütü ile beslenen yeni doğan bebeklerin dışkılarından izole edilen ve 16S rDNA bölgesine göre moleküler tanımlamaları yapılan laktobasil cinsine ait 15 bakteri ile yürütülmüştür.

Skimmilk (SM) ve MRS sıvı besi yerlerinde 24 saat ve 37°C geliştirilen bakterilerin laktik asit üretimleri titre edilebilir yüzde asitlik olarak hesaplanmıştır (12).

Laktobasil bakteri kültürlerinin hidrojen peroksit üretimi Gilliland (13)'in metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Ölçümler MRS sıvı besiyerinde 24 saatlik inkübasyondan sonra gerçekleştirilmiş ve üretim 400 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) belirlenmiştir. 1-10 µg/mL arasında değişen oranlarda hazırlanan standart ile sonuçlar karşılaştırılarak, hidrojen peroksit miktarları µg/mL olarak saptanmıştır.

Laktobasil suşlarının *Escherichia coli* ATCC11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* CCM5445 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri agar difüzyon yöntemine göre belirlenmiştir (14).

Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi

Bakterilerin EPS üretimleri, MRS sıvı besi ortamında 24 saatlik kültürlerde Torino ve ark. nın (15) fenol/sülfürik asit tekniğine göre belirlenmiştir. Kültürlerin ürettiği EPS miktarları standart olarak 5-100 mg/L arasında değişen oranlarda glikoz (Merck) çözeltisi kullanılarak tespit edilmiştir (16).

Antibiyotik duyarlılık

Antibiyotik duyarlılık testi, Charteris ve ark. (17) tarafından belirtilen disk difüzyon yöntemi ile 0,5 Mac Farland bulanıklılığına eşdeğer olarak ayarlanan aktif kültürlerde tespit edilmiştir.

Duyarlılık testi sistein-MRS katı besi yerinde yapılmış ve disk difüzyon testinde kullanılan antibiyotikler aşağıdaki konsantrasyonlarda Oxoid'den temin edilmiştir: penisilin (10 unit), amoksisilin (30 µg), vankomisin (30 mcg), azitromisin (15 µg), teikoplanin (30 µg), eritromisin (15 µg), streptomisin (10 µg), gentamisin (10 µg), kloramfenikol (30 µg), siprofloksasin (5 µg). Sonuçlar Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) kriterlerine değerlendirilmiştir (18).

Asit ve safra toleransı

37°C'de iki kez ard arda MRS sıvı besi ortamında aktiveleştirilen kültürlerin optikal yoğunlukları spektrofotometrede (600 nm) 0,600'e ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan bakterilerden %2 oranında, pH'sı 4 M HCl (Merck) ile 2, 3, 4 ve 5'e ayarlanan MRS sıvı besi yerlerine ve %0,06, 0,15 ve 0,30 oranlarında safra (Sigma) içeren MRS sıvı besi yerlerine inoküle edilerek 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücre gelişimi 24 saat sonrasında 600 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür (19).

Agregasyon

Bu test için, EPS üretimleri yüksek olan *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşları seçilmiştir. Otoagregasyon yeteneklerinin belirlenmesinde, MRS sıvı besi yerinde 18-20 saatlik aktif kültürler 10000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet, iki defa fosfat tamponu (PBS: 130 mM sodyum klorür, 10 mM sodyum fosfat, pH 7,2) ile yıkanarak süspansiyon edilmiştir. Yıkanan kültürlerin optik yoğunlukları 0,600'e ayarlanmış ve 4 saat sonunda kültürlerin yüzde otoagregasyon değerleri $[1 - (A_{\text{üstteki süspansiyon}} / A_{\text{toplam bakteri süspansiyonu}})] \times 100$ formülüne göre hesaplanmıştır.

Koagregasyon testinde, bakteriler yukarıda belirtilen şekilde hazırlanmış ve laktobasil bakteri kültürleri ile *E. coli* ATCC 11229, *S. enteritidis* ATCC 13076 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 test bakterileri eşit hacimde karıştırılmıştır. 4 saat sonunda kültürlerin %koagregasyon yetenekleri

$[(A_{\text{test bakterisi}} + A_{\text{laktobasil}}) - 2(A_{\text{karışık süspansiyon}}) / (A_{\text{test bakterisi}} + A_{\text{laktobasil}})] \times 100$ formülüne göre hesaplanmıştır (20).

Hidrofobisite

MRS sıvı besi yerindeki aktif kültürlerinin 10000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmesi ile elde edilen pellet, iki kez fosfat tamponu ile yıkanmış ve 0,1 M KNO₃ (pH 6,2) tamponu içinde çözülerek spektrofotometrede OD'si 0,06'ya ayarlanmıştır (A₀). Bakteri süspansiyonundan 2 mL alınarak, 0,5 mL p-ksilen (polar olmayan nötral çözücü), kloroform (monopolar asidik çözücü), etil asetat (monopolar bazik çözücü) ve toluen (unipolar bazik çözücü) hidrokarbonlarının üzerine konularak oda sıcaklığında 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra sulu fazın OD'si spektrofotometrede 600 nm de tekrar ölçülmüştür (A₁). Laktobasil suşlarının hidrokarbonlara mikrobiyal tutunma yüzdesi $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır (21).

İstatistiksel analizler

Tüm çalışmalarda iki farklı çalışmanın üç farklı paralelinin ortalama sonuçları verilmiştir.

İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (15.0 Versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Pearson korelasyonuna göre, suşların yüzde asit-hidrojen peroksit üretimi arasında korelasyon olup olmadığı incelenmiş ve iki farklı besiyerindeki asit üretim sonuçları t-testi ile analiz edilmiştir. Ayrıca azalan pH/artan safra konsantrasyonu ve bakteri gelişimi arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla SPSS 15.0 bilgisayar programıyla regresyon analizi uygulanmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Fonksiyonel gıda bileşenleri olarak değerlendirilen probiyotik bakterilerin insan mide bağırsak sistemi açısından önemli etkileri bulunmaktadır. Probiyotiklerin farklı nedenlere bağlı bağırsak rahatsızlıkları, *Helicobacter pylori* kaynaklı mide rahatsızlıkları, laktoz intoleransı, kolon kanseri, alerjik reaksiyonlar ve yüksek kolesterol seviyeleri gibi çeşitli rahatsızlıklar üzerinde iyileştirici etkilere sahip olduklarını rapor edilmektedir (22-24). Probiyotiklerin temel özellikleri doğal olarak kalın bağırsak florasında bulunmaları, non-patojen olmaları, teknik işlemlerle harabiyete ve mide asidine ve safra tuzlarına dirençli olmaları, gastrointestinal sistem duvarına tutunarak geçici bir süre intestinal epitele kolonize olarak konakçıya belirli bir fayda sağlamalarıdır (25). Probiyotikler bugün antibiyotiğe bağlı ishalin önlenmesinden, atopik çocuklarda atopik dermatitin önlenmesine kadar çok geniş bir alanda alternatif tıp alanı olarak koruyucu ve tedavi edici amaçla kullanılmaya başlanmıştır (26).

Laktik asit, laktik asit bakterilerinin fermantasyon yolu ile ürettikleri primer üründür. Patojen bakterileri ve küfleri inhibe eden zayıf bir asittir (27,28). Bakteri kültürlerinin SM ve MRS besi yerlerinde ürettiği yüzde asitlik değerleri Çizelge 1’de verilmiştir. Her iki besi yerinde de yüzde asit üretimi en yüksek *L. casei* LB74 (SM’de %2,79; MRS’de %1,50) ve *L. casei* LB61 (SM’de %2,72; MRS’de %1,23) suşların da belirlenmiştir. Çalışmada, SM besi yerinde üretilen yüzde laktik asit miktarı MRS besi yerine göre daha fazla olduğu görülmüş ve bunun nedeninin, SM besi yerinin bileşiminde bulunan laktozdan kaynaklı olduğu düşünülmüştür. İstatistik analiz sonucu (çift örnekli t-testi) iki besi yerindeki asit üretimleri arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Yapılan çalışmalarda, süt ve süt ürünlerinden izole edilen laktobasillerin SM’de daha yüksek laktik asit ürettiği (27, 29), vajenden izole edilen suşların ise MRS besi yerinde daha yüksek laktik asit ürettikleri (30) rapor edilmektedir. Buda bize izolasyon kaynağının ve besi yerlerinde bulunan kimyasal maddelerin, üretilen laktik asit miktarını etkilediğini göstermektedir.

Spektrofotometrik olarak belirlenen laktobasil suşlarının oluşturduğu hidrojen peroksit üretim miktarları 0,68 (*L. casei* LB17)–3,83 (*L. casei* LB74) $\mu\text{g/mL}$ arasında değişmektedir (Çizelge 1). Yüzde asitliği yüksek olan suşların hidrojen peroksit üretimlerinin de yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu laktik asidin yanında, hidrojen peroksit ve bakteriyosin ve/veya bakteriyosin benzeri maddeler gibi antimikrobiyal maddelerin de florayı korumada önemli etkileri mevcuttur (24). Pridmore ve ark., (31) insan bağırsağından izole edilmiş 11 laktobasil suşunun hidrojen peroksit üretim miktarının 617-1400 $\mu\text{g/mL}$ olduğunu bildirirken, Millsap ve ark., (32) insan idrarından izole ettikleri suşların ürettikleri H_2O_2 miktarları 25-75 $\mu\text{g/mL}$ arasında olduğunu, Sabir ve ark., (33) kefirde izole edilmiş laktobasil suşlarında H_2O_2 miktarının ise 0,45-3,18 $\mu\text{g/mL}$ arasında olduğunu rapor etmişlerdir.

İnsan kaynaklı izolatlarda hidrojen peroksit üretimlerinin süt ürünleri kaynaklı izolatlardan daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada suşların diğer insan kaynaklı izolatlardan daha düşük hidrojen peroksit üretimine sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı cinse aitte dahi olsalar, farklı suşların ürettikleri H₂O₂ miktarlarının farklılığı, oksidoredüktazlardan laktat dehidrogenaz enziminin aktivitesinin farklılığından kaynaklandığı bilinmektedir ve bu enzimin aktivitesinin de bakterinin bulunduğu ortamdan etkilendiği rapor edilmektedir (14).

Çizelge 1. Laktobasil suşlarının metabolik aktiviteleri

Bakteriler	Laktik asit (%)		H ₂ O ₂ (µg/mL)	EPS üretimi (mg/L)
	MRS	SM		
<i>L. casei</i> LB17	1,44±0,06	0,73±0,02	0,68±0,02	142,99±6,38
<i>L. casei</i> LB19	1,84±0,01	1,10±0,00	0,99±0,01	258,57±2,61
<i>L. casei</i> LB74	2,79±0,03	1,50±0,13	3,83±0,00	425,16±2,03
<i>L. casei</i> LB61	2,72±0,03	1,23±0,07	3,22±0,02	383,99±1,75
<i>L. casei</i> LB64	2,12±0,01	1,20±0,01	1,02±0,00	317,01±2,32
<i>L. casei</i> LB83	1,05±0,03	0,45±0,00	0,87±0,03	278,30±5,00
<i>L. casei</i> LB68	1,36±0,01	0,85±0,00	0,86±0,02	275,50±1,42
<i>L. casei</i> LB65	1,61±0,01	1,01±0,01	1,68±0,02	183,06±6,50
<i>L. casei</i> LE4	1,26±0,01	0,63±0,00	2,15±0,03	329,26±1,49
<i>L. casei</i> LB49	1,73±0,03	1,09±0,05	2,24±0,02	369,19±3,17
<i>L. casei</i> LB23	2,11±0,03	1,12±0,00	0,76±0,00	186,63±6,99
<i>L. casei</i> LE7	1,20±0,01	0,81±0,00	1,54±0,01	319,37±1,39
<i>L. casei</i> LB6	1,35±0,03	0,82±0,02	1,06±0,02	294,46±3,42
<i>L. brevis</i> LB63	1,44±0,04	0,67±0,01	1,78±0,00	348,30±2,13
<i>L. fermentum</i> LB16	1,61±0,01	1,03±0,00	0,97±0,02	326,63±3,81

Probiyotik bakteriler bağırsak yüzeyine yerleşerek istenmeyen bakterilerin tutunmasını engellemekte ve ürettikleri antimikrobiyal aktiviteye sahip organik moleküller (laktik, asetik, formik, propiyonik asit) ve antimikrobiyal bileşikler (hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriyosin/bakteriyosin benzeri maddeler), bakterilerin çoğalmalarını kontrol altına almaktadır (34). Kültür koleksiyonundan temin edilen 15 laktobasil suşunun agar difüzyon tekniği ile patojen bakterilere karşı inhibisyon kapasiteleri değerlendirilmiştir (Çizelge 2). Laktobasil suşlarının %100'ü *S. enteritidis* ATCC 13076, *S. typhimurium* CCM5445 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 test bakterilerine karşı inhibisyon etkisi gösterirken, denenen tüm test bakterileri içerisinde en yüksek inhibisyon zonuna *L. monocytogenes* ATCC 7644'e karşı *L. casei* LB61 (21,8 mm) suşunun sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, yüzde asit ve hidrojen peroksit üretimleri yüksek olan *L. casei* LB74 ve LB61 kodlu suşların, tüm patojen bakterilere karşı (LB74 suşu için, *L. monocytogenes* hariç) inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.

EPS'ler bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadır. Bakteriler tarafından polisakkaritler katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı değildirler, buna karşılık mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korur, zararlı veya düşman bir ortamdan uzaklaştırırlar (1). EPS'nin bakteriyi koruma özelliği ayrıca antibiyotiklere karşıda fiziksel bir koruyuculuk şeklinde de ortaya çıkmaktadır (35). Yüksek EPS üretimine sahip olan bakterilerin probiyotik olarak uygun olacağı vurgulanmaktadır.

Yuksekdag ve Aslim (36), yoğurt kaynaklı laktobasil suşlarında EPS miktarını 116 - 255 mg/L olarak rapor ederken, Sabir ve ark., (33) kefirde izole edilmiş *Lactococcus* spp. ve *Pediococcus* spp. suşlarının EPS üretim miktarının 173-378 mg/L arasında değiştiği bildirilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada, vajen kaynaklı 57 laktobasil suşlarının ürettikleri EPS miktarının ise 20-368 mg/L arasında olduğu rapor edilmiştir (37). Bu çalışmada, bakterilerin EPS üretim miktarları 142,99 (*L. casei* LB17)–425,16 (*L. casei* LB74) mg/L arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 1). *L. casei* LB61 (383,99 mg/L), *L. casei* LB49 (369,19 mg/L) ve *L. brevis* LB63 (348,3 mg/L) suşlarının diğer suşlardan EPS üretimlerinin yüksek olduğu da belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, insan kaynaklı izolatların EPS üretiminin, süt ve süt ürünleri kaynaklı izolatların ürettiği EPS miktarından fazla olduğu dikkat çekicidir. Bu çalışmada da, kullanılan bakterilerin EPS üretim miktarlarının diğer çalışmalardan yüksek olduğu görülmektedir. Çalışmalarda elde edilen sonuçlarda EPS üretimlerinin türler ve hatta suşlar arasında farklılık gösterdiği görülmektedir. Araştırmacılar bunun nedeninin izolasyon kaynağı, fermantasyon şartları (sıcaklık, inkübasyon süresi ve pH) ve besiyeri kompozisyonunun (karbon ve nitrojen kaynağı) farklı olmasından dolayı olduğunu ifade etmektedirler (36, 38, 39).

Çizelge 2. Laktobasil suşlarının test bakterileri üzerindeki aktimikrobiyal aktivitesi (mm).

Bakteriler	Test Bakterileri					
	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. casei</i> LB17	3,4±0,0	2,8±0,0	5,1±0,0	2,7±0,0	5,0±0,1	-
<i>L. casei</i> LB19	5,6±0,0	15,2±0,0	7,5±0,2	2,8±0,0	2,8±0,0	5,0±0,0
<i>L. casei</i> LB74	4,8±0,1	-	5,2±0,0	2,8±0,0	4,7±0,0	2,7±0,0
<i>L. casei</i> LB61	5,2±0,0	21,8±0,0	7,0±0,0	5,4±0,0	5,0±0,0	3,4±0,0
<i>L. casei</i> LB64	5,2±0,0	12,6±0,0	8,9±0,0	6,9±0,0	5,3±0,0	6,0±0,0
<i>L. casei</i> LB83	3,5±0,0	-	2,7±0,0	3,8±0,0	2,9±0,0	2,7±0,0
<i>L. casei</i> LB68	5,7±0,0	16,7±0,0	2,8±0,0	2,8±0,0	2,8±0,0	7,3±0,0
<i>L. casei</i> LB65	4,6±0,0	16,6±0,0	5,2±0,0	7,2±0,0	9,3±0,0	4,8±0,0
<i>L. casei</i> LE4	4,6±0,0	14,6±0,1	7,3±0,0	7,7±0,0	5,0±0,0	-
<i>L. casei</i> LB49	-	7,4±0,1	5,0±0,0	7,2±0,1	6,5±0,0	2,9±0,0
<i>L. casei</i> LB23	2,8±0,0	4,7±0,0	5,4±0,1	7,3±0,0	5,5±0,0	4,7±0,0
<i>L. casei</i> LE7	4,9±0,0	7,3±0,0	5,7±0,0	9,6±0,1	7,1±0,3	-
<i>L. casei</i> LB6	5,2±0,0	5,2±0,0	5,5±0,0	5,2±0,0	3,8±0,0	3,8±0,0
<i>L. brevis</i> LB63	4,6±0,0	4,7±0,0	2,8±0,0	5,1±0,0	2,7±0,0	1,8±0,0
<i>L. fermentum</i> LB16	3,3±0,0	1,8 ±0,0	2,8±0,0	5,5±0,0	1,7±0,0	-

-: inhibisyon yok

İnsanın doğal florasında bulunan laktobasil cinsi bakterilerinin üstün özelliklere sahip suşlarının probiyotik olarak kullanılması ile hastalıkların tedavisinde antibiyotiklere alternatif olabileceği düşünülmektedir. Araştırmacılar probiyotiklerin sadece tedavi amaçlı olmayıp, bazı enfeksiyonlar için koruyucu amaçlı da kullanılabileceğini bildirmişlerdir (40). Normal mikrofloranın antibiyotik tedavilerinden etkilenmemesi için seçilecek suşların antibiyotiklere dirençli olması önemli bir kriterdir. Antibiyotik uygulamalar sırasında probiyotikler kullanılarak mikrofloranın koruyuculuğunun devam edebileceği vurgulanmaktadır (4). Çalışmada, protein sentezini inhibe eden streptomisin (%100), gentamisin (%99), hücre duvar sentezini inhibe eden vankomisin (%100) ve teikoplanin (%98) antibiyotikleri laktobasil suşlarının yüksek

dirençlilik gösterdikleri antibiyotikler olarak tespit edilirken, suşların hücre duvar sentezini inhibe eden penisilin (%100), amoksisilin (%100), azitromisin (%98) ve eritromisin (%95), protein sentezini inhibe eden kloramfenikol (%100) antibiyotiklerine ise duyarlı oldukları belirlenmiştir (Çizelge 3). Bu çalışmada, bakterilerin klinikte yaygın olarak kullanılan glikopeptid yapısındaki vankomisin ve aminoglikozit yapısındaki streptomisin antibiyotiklerine dirençli bulunmuştur. Glikopeptid grubundan teikoplanin (TEC) antibiyotiği, aerop ve anaerop Gram pozitif bakterilere etkilidir ve bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar için klinik uygulamalarda kullanılmaktadır (41). Bu araştırmada, teikoplanin antibiyotiğine bakterilerin %98'inin dirençli olduğu bulunmuştur. Özellikle klinik uygulamalarda sıklıkla kullanılan glikopeptid yapısındaki antibiyotiklere bu çalışmada kullanılan bakterilerin dirençli olması, seçilecek bakterilerin probiyotik olarak kullanımlarını ön plana çıkaracaktır.

Çizelge 3. Laktobasil suşlarının antibiyotiklere gösterdiği duyarlılık test sonuçları

Bakteriler	Antibiyotikler										
	P	S	CN	C	VA	AMC	E	CIP	TEC	AZM	
<i>L. casei</i> LB17	S	R	R	S	R	S	S	R	R	R	
<i>L. casei</i> LB19	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S	
<i>L. casei</i> LB74	S	R	R	S	R	S	I	R	R	S	
<i>L. casei</i> LB61	S	R	R	S	R	S	I	I	R	S	
<i>L. casei</i> LB64	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	
<i>L. casei</i> LB83	S	R	R	S	R	S	S	I	S	S	
<i>L. casei</i> LB68	S	R	R	S	R	S	S	I	R	R	
<i>L. casei</i> LB65	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	
<i>L. casei</i> LE4	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	
<i>L. casei</i> LB49	S	R	R	S	R	S	I	R	R	S	
<i>L. casei</i> LB23	S	R	R	S	R	S	S	I	R	S	
<i>L. casei</i> LE7	S	R	I	S	R	S	I	R	R	S	
<i>L. casei</i> LB6	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S	
<i>L. brevis</i> LB63	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	
<i>L. fermentum</i> LB16	S	R	R	S	R	S	I	R	R	S	

R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta Derece Duyarlı,

P: Penisilin, VA: Vankomisin, AMC: Amoksisilin, AZM: Azitromisin, TEC: Teikoplanin, E: Eritromisin, CN: Gentamisin, S: Streptomisin, C: Kloramfenikol, CIP: Siprofloksasin

Dışarıdan vücuda verilen yararlı probiyotik mikroorganizmaların faydalı olabilmesi için, midedeki düşük asitlik ve bağırsaktaki safra tuzu gibi öldürücü etkiler karşısında canlılıklarını muhafaza edebilmelidirler (1, 42). Sonuçta faydalı mikroorganizma bağırsağa ulaştığında, canlı ve belli bir sayının üzerinde kalabilmelidir (22, 43). Çizelge 4'de laktobasil suşlarının düşük pH değerlerinde (2, 3, 4, 5) ve farklı safra konsantrasyonlarında (%0,06, 0,15, 0,30) hücre yoğunlukları verilmiştir. Ortamdaki asitlik oranı arttıkça, bakterilerin hücre yoğunluğunda önemli oranda düşme meydana gelmiştir. Suşların pH değerindeki azalmaya bağlı olarak optikal yoğunluklarındaki azalma arasındaki korelasyon regresyon analizi ile belirlenmiş ve multipli R değerleri 0,75'den yüksek çıktığından güçlü bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4). Tüm suşlardan elde edilen verilere göre bakterilerin bağırsaklarda bulunan safraya olan toleransı, safra oranına göre değişmekte olup, safra oranının %0,06; %0,15 ve %0,30 artan konsantrasyona bağlı olarak tüm suşların hücre yoğunluğunda düşme gözlenmiştir.

Suşların safra konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak optikal yoğunluklarındaki azalma arasındaki korelasyon regresyon analizi ile belirlenmiş ve bu ilişkinin yüksek derecede ve negatif yönde bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4). Bu çalışmada, bakterilerin buldukları ortamda asitlik miktarının ve safra konsantrasyonunun artması nedeni ile hücre yoğunluğunda ve yüzde canlılıklarında azalma görülmüştür. Laktobasiller arasında safraya karşı en dirençli suşların *L. casei* LB74, *L. casei* LB61, *L. casei* LB64 ve *L. brevis* LB63 olduğu belirlenmiştir. Bu suşların yüzde asit, hidrojen peroksit, EPS üretimleri ve antimikrobiyal aktivitelerinin de yüksek olması dikkat çekicidir. İnsandaki safra konsantrasyonuna yakın bir değer olan % 0,30'luk safra konsantrasyonda bakterilerin canlılık oranları %9,27-39,39 arasında değiştiği belirlenmiştir. Alp ve Aslim (42), bifidabakterilerin % 0,30 konsantrasyonundaki safrayı % 12,35–80,66 arasındaki oranlarda tolere edebildiklerini, Sabir ve arkadaşları (33) ise laktobasil suşlarının bu konsantrasyonundaki safrayı % 72–92 arasında değişen oranlarda tolere ettikleri bildirmişlerdir. Sabir ve ark., (33) aynı zamanda pH 3,5 gibi asidik bir ortamda bakterilerin yüzde canlılıklarının %85-96'lık bir orana sahip olduğunu da rapor etmişlerdir. Elde edilen verilere göre, laktobasil cinsine ait farklı suşların asit ve safraya olan dirençliliklerinin literatür taramalarında belirlenen laktobasillere göre düşük olduğu tespit edilmiştir.

Bakterilerin agregasyon özelliğine sahip olması bulunduğu hücrelere tutunma ve dominant olarak kolonize olmasını sağlayacağından özellikle probiyotik açıdan önemli bir kriterdir. Laktik asit bakterileri agregasyon özelliği nedeniyle bulunduğu yüzeye ve birbirlerine yapışarak biyolojik bir bariyer oluştururlar (22,44). Laktobasillerin bağırsak florasını düzenlenmesi için bağırsak epiteline kolonize olabilmesi gerekmektedir. Bu amaçla bu çalışmada, yüksek EPS üretimine sahip olan *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşlarının agregasyon yetenekleri belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda kültürlerin yüzde otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri Çizelge 5'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, EPS üretimi yüksek olan *L. casei* LB74 suşunun yüzde otoagregasyon değerinin %28,91, *L. casei* LB61 suşunun ise %20,50 olduğu tespit edilmiştir. Collado ve ark. (20), Aslim ve ark. (45) ve Ekmekçi ve ark. (46), farklı kaynaklardan izole ettikleri laktobasil suşlarında, bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Çalışmalar karşılaştırıldığında, agregasyon yeteneğinin izolasyon kaynağına, türe ve suşa göre değişken olduğunu görülmektedir. EPS'nin agregasyonu artırmasından dolayı (42) yüksek EPS üreten ve otoagregasyon gösteren *L. casei* LB74 suşunun epitel yüzeylere daha yüksek oranda kolonize olabileceğini düşündürmüştür. Agregasyon yeteneğinde yüksek EPS üretiminin yanında Agregasyon Promoting Faktör (APF) olarak adlandırılan bir proteininde de sorumlu olduğu rapor edilmektedir. Laktobasil suşları arasındaki agregasyon farklılıklarının üreme ortamı ve sıcaklığı, yüzey hidrofobisitesi ve yükü, ortamın pH'sı, bakteri hücre duvarındaki lipoteikoik asit ve diğer yüzey polimerlerin (glikoprotein, polisakkaritler, lipoprotein, glikolipid, protein gibi) de etkili olduğu bildirilmektedir (47).

Koagregasyon özelliğinden dolayı laktik asit bakterileri bulunduğu ekosisteme giren patojen bakterilere yapışarak onları etkisiz hale getirmekte, böylece olası bir enfeksiyonu ve bakterinin toksik etkisini engelleyebilmektedir (48). Çalışmada, EPS üretimi yüksek olan *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşlarının, *E. coli* ATCC 11229, *S. enteritidis* ATCC 13076 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 test bakterileri ile koagregasyon denemeleri yapılmıştır. *L. casei* LB74 suşunun denenen iki patojen (*E.*

coli ATCC 11229-%14,41 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644-%19,99) ile yüksek oranda koagregasyon olduğu tespit edilirken, *L. casei* LB61 suşu *S. enteritidis* ATCC 13076 bakterisi ile yüksek koagregasyon (%31,08) yeteneği gösterdiği belirlenmiştir. 12 probiyotik bakterin patojen bakteriler ile koagregasyonun değerlendirildiği bir çalışmada, koagregasyon yüzdesinin suşa, inkübasyon süresine ve koşullarına bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (20).

Çizelge 4. Laktobasillerin farklı pH ve safra değerlerine toleransı ve regresyon analiz sonuçları

Bakteriler	pH ^a					Multiple R
	Kontrol ^b	2,0	3,0	4,0	5,0	
LB17	1,98±0,02	0,23±0,00	0,30±0,00	1,89±0,00	1,97±0,00	0,87
LB19	1,98±0,01	0,24±0,01	0,26±0,00	0,74±0,05	1,92±0,00	0,93
LB74	2,02±0,02	0,12±0,01	0,15±0,01	0,64±0,01	1,84±0,08	0,95
LB61	1,94±0,00	0,22±0,00	0,23±0,02	0,64±0,04	1,85±0,02	0,93
LB64	1,91±0,00	0,21±0,00	0,22±0,00	0,64±0,02	1,85±0,01	0,93
LB83	1,99±0,00	0,20±0,00	0,32±0,00	1,87±0,08	1,93±0,05	0,88
LB68	1,97±0,00	0,21±0,00	0,25±0,00	1,92±0,00	1,93±0,01	0,86
LB65	2,01±0,00	0,26±0,00	0,34±0,02	1,91±0,01	1,96±0,02	0,87
LE4	1,97±0,00	0,23±0,00	0,27±0,01	1,92±0,01	1,94±0,00	0,86
LB49	1,96±0,01	0,24±0,00	0,25±0,00	0,99±0,00	1,92±0,00	0,94
LB23	1,94±0,00	0,23±0,01	0,24±0,00	0,62±0,02	1,29±0,00	0,96
LE7	1,97±0,00	0,20±0,00	0,32±0,00	1,81±0,00	1,94±0,00	0,89
LB6	1,94±0,00	0,23±0,00	0,33±0,00	0,81±0,00	1,88±0,00	0,94
LB63	1,98±0,01	0,20±0,00	0,23±0,00	0,98±0,00	1,88±0,02	0,95
LB16	2,00±0,00	0,22±0,02	0,26±0,00	0,51±0,00	1,87±0,03	0,92

Safra Konsantrasyonları ^a				
Kontrol ^b	%0,06	%0,15	0,30%	Multiple R
1,95±0,00	1,93±0,00	1,92±0,00	0,20±0,00	-0,887
2,02±0,02	1,94±0,03	1,74±0,00	0,56±0,00	-0,949
2,00±0,00	1,98±0,01	1,73±0,00	0,63±0,00	-0,949
1,96±0,00	1,92±0,01	1,57±0,03	0,52±0,01	-0,968
1,99±0,00	1,95±0,01	1,72±0,01	0,39±0,00	-0,941
1,99±0,00	1,93±0,00	1,88±0,01	0,20±0,00	-0,904
1,97±0,00	1,95±0,01	1,77±0,00	0,41±0,00	-0,928
1,99±0,00	1,96±0,00	1,74±0,01	0,32±0,04	-0,935
1,94±0,00	1,91±0,00	1,87±0,00	0,30±0,00	-0,897
1,98±0,00	1,94±0,02	1,76±0,00	0,49±0,00	-0,935
2,01±0,00	1,94±0,00	1,77±0,00	0,44±0,00	-0,937
1,94±0,00	1,92±0,00	1,61±0,00	0,18±0,00	-0,946
1,94±0,00	1,92±0,00	1,55±0,00	0,20±0,00	-0,956
1,96±0,02	1,86±0,03	1,79±0,00	0,60±0,01	-0,926
2,01±0,01	1,94±0,01	1,94±0,01	0,45±0,00	-0,897

^a Optik yoğunluk

^b Kontrol; pH 6,2 ve safra içermeyen ortam

Polar özellik taşımayan moleküllerin sıvı ortamda kendiliğinden bir araya gelme eğilimi, hidrofobik etkileşim olarak ifade edilmektedir. Bu etkileşimin arkasındaki itici güç, hidrofobik grupların etrafını çevreleyen su moleküllerinin yer değiştirmesinden kaynaklanan entropi artışıdır.

Çizelge 5. *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşlarının otoagregasyon, koagregasyonu ve hidrofobisite yüzdeleri

Bakteriler	Otoagr (%)	Koagregasyon (%)			Hidrofobisite (%)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. enter.*</i>	<i>L. mono**</i>	Kloroform	Toluen
<i>L. casei</i> LB74	28,91±0,10	14,41±0,10	16,16±0,00	19,99±0,00	67,05±0,30	7,88±0,20
<i>L. casei</i> LB61	20,50±0,20	13,33±0,00	31,08±0,00	14,58±0,10	45,33±0,10	43,83±0,40

* *S. entetiditis*; ** *L. monocytogenes*

Hidrofobik etkileşimlerin biyolojik sistemlerdeki en büyük önemi, mikroorganizmaların yüzeylere tutunmasını sağlamasıdır (49). Probiyotiklerin epitelyum yüzeylere tutunarak kolonize olmaları önemli bir kriterdir. Hidrofobik özelliğe sahip olan probiyotik mikroorganizmaların epitel yüzeylere daha iyi tutundukları rapor edilmektedir (41,50). Bu çalışmada, bakterilerin farklı hidrokarbonlara tutunması, hücre tutunması ile pozitif ilişkisi olan hidrofobisite özelliği ile belirlenmiştir. EPS üretim kapasitesi yüksek olan *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşlarının hücre yüzeyi hidrofobikliği yüzde olarak belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 5'de verilmiştir. EPS üretim kapasitesi yüksek olan *L. casei* LB74 ve *L. casei* LB61 suşlarının nötral çözücü olan p-ksilene ve bazik çözücü olan etil asetata ilgisinin olmadığı tespit edilirken, asidik çözücü olan kloroforma (sırasıyla, %67,05, %45,33) ilgisinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum, kullanılan bakterilerin yüzey yapılarının kompleks olduğunu göstermektedir. Ahumada ve arkadaşları (51), dişten izole ettikleri 13 laktobasil suşunun hemen hepsinin apolar çözücü olan p-ksilene zayıf affinite (%0-35) gösterdiğini, tükürükten izole edilen 17 laktobasil izolatından dokuzunun bazik çözücü olan etil asetata (%0-35) ve asidik çözücü olan kloroforma (%0-35) da zayıf affinite gösterdiklerini bildirmişlerdir. Pelletier ve arkadaşları (52) ise, bu araştırmacılarından farklı olarak kullandıkları *L. casei* ve *L. paracasei* suşlarının kloroforma yüksek affinite, etil asetata ise düşük affinite gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Bu çalışma bulunan sonuçlar ile çalışmadaki sonuçlar örtüşmektedir.

Bu çalışma sonucunda, *L. casei* LB74, *L. casei* LB 61 ve *L. casei* LB64 suşlarının H₂O₂, laktik asit ve EPS üretim kapasitesinin ve safra tuzu toleransının yüksek olması nedeniyle canlılığını koruyarak, bağırsaklara ulaşabileceği düşünülmektedir. Yüksek EPS, agregasyon ve hidrofobisite yetenekleri ile epitel yüzeylere daha kolay kolonize olup, patojenler üzerindeki inhibisyon etkisi sayesinde de epitel yüzeyde *E. coli* ve *Salmonella*'lar gibi patojen mikroorganizmalar için biyolojik bir bariyer oluşturabileceklerdir. Bu suşların sahip oldukları bu üstün özelliklerden dolayı, hayvan denemeleri yapıldıktan sonra potansiyel probiyotik mikroorganizmalar olarak kullanılmaları önerilebilecektir. Bu bakterilerin asit direncinin zayıf olması nedeniyle gelecek çalışmalarda bu özelliğin kapsülleme veya bir başka teknik kullanılarak geliştirilmesi ile probiyotik açıdan daha verimli kültürlerin oluşturulması önerilmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 05/2012-69 kodlu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., Arul, V., 2013. Probiotics and its functionally valuable products—A Review. *Crit Rev Food Sci.* 53: 641–658.
2. Turchi, B., Mancini, S., Fratini, F., Pedonese, F., Nuvoloni, R., Bertelloni, F., Ebani, V.V., Cerri, D., 2013. Preliminary evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Italian food products. *World J Microbiol Biotechnol.* DOI 10.1007/s11274-013-1356-7.
3. Kabore, D., Sawadogo-Lingani, H., Dicko, M., Diawara, B., Jakobsen, M., 2012. Acid resistance, bile tolerance and antimicrobial properties of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional “maari” baobab seeds fermented condiment. *Afr J Biotechnol.* 11: 1197-1206.
4. Verraes, C., Van Boxstael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., de Schaetzen, M.A., Van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J., Herman, L., 2013. Antimicrobial resistance in the food chain: A Review. *Int J Environ Res Public Health.* 10: 2643-2669.
5. Young, R.J., Huffman, S., 2003. Probiotic use in children. *J. Pediatr Health Care,* 17: 277-283.
6. Caicedo, R.A., Schanler, R.J., Li, N., Neu, J., 2005. The developing intestinal ecosystem: implications for the neonate. *Pediatric Res.* 58: 625-628.
7. Guarner, F., Malagelada, J.R., 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet,* 360: 512- 19.
8. <http://www.extension.iastate.edu/Publications/NCR332.pdf> (1996).
9. Johansson, M.A., Sjögren, Y.M., Persson, J.O., Nilsson, C., Sverremark-Ekström, E., 2011. Early colonization with a group of *Lactobacilli* decreases the risk for allergy at five years of age despite allergic heredity. *PLoS ONE.* 6: 1-8.
10. Bezirtzoglou, E., Stavropoulou, E., 2011. Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. *Anaerobe.* 17: 369-374.
11. Girardin, M., Seidman, E.G., 2011. Indications for the use of probiotics in gastrointestinal diseases. *Dig Dis.* 29: 574–587.
12. Demirci, M., Gündüz, H., 1994. Süt Teknolojisi El Kitabı. *Hasad Yayıncılık,* Ankara, 1-184.
13. Gilliland, S.E., 1969. Enzymatic determination of residual hydrogen peroxide in milk. *Dairy Sci.* 52: 321-324.
14. Reinheimer, J.A., Demkow, M.R., Condioti, M.C., 1990. Inhibition of Coliform bacteria by lactic cultures. *Aust J Dairy Technol.* 45: 5-9.
15. Torino, M.I., Taranto, M.P., Sesma, F., de Valdez, G.F., 2001. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in response to environmental pH. *J Appl Microbiol.* 91: 846-852.
16. Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Peters, P., Smith, F., 1956. Colometric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28: 350-356.

17. Charteris, W.P., Kelly, M.P., Morelli, L., Collins, K.J., 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Protect.* 61: 1636–1643.
18. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21st Informational Supplement, S21 M100-S21 Vol. 31 No. 1.
19. Chung, H.S., Kim, Y.B., Chun, S.L., Ji, G.E., 1999. Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. *Food Microbiol.* 47: 25-32.
20. Collado, M.C., Meriluoto, J., Salminen, S., 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur Food Res Technol.* 226: 1065–1073.
21. Gusils, C., Cuzzo, S., Sesma, F., Gonzalez, S., 2002. Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken. *Microbiol.* 48: 34-42.
22. Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J.M., Dousset, X., 2013. *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbio.*, 36: 296-304.
23. Yuksekdağ, Z.N., Aslim, B., 2010. Assessment of potential probiotic- and starter properties of *Pediococcus* spp. isolated from Turkish-type fermented sausages (sucuk). *J Microbiol Biotechnol.* 20: 161-168.
24. Aslim, B., Onbasili, D., Yuksekdağ, Z.N., 2011. Determination of lactic acid production and antagonistic activity against *Helicobacter pylori* of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus* strains. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 17: 609-614.
25. Dixit, G., Samarth, D., Tale, V., Bhadekar, R., 2013. Comparative studies on potential probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* strains. *Eur Asian J Bio Scis.* 7: 1-9.
26. Gorbach, S.L., 2002. Probiotics in the third millennium. *Digest Liver Dis.* 34: 2-7.
27. Yüksesdağ, Z.N., Beyatlı, Y., Aslım, B., 2004. Metabolic activities of *Lactobacillus* spp. strains isolated from kefir. *Nahrung/FOOD.* 48: 218–220.
28. Yeniel, N., Aslim, B., Beyatlı, Y., Yuksekdağ, Z.N., 2007. Determination of lactic acid and exopolysaccharides production in low-cost raw materials by some *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains. *Deut Lebensm Rundsch.* 103: 574–579.
29. Beyatlı, Y., Aslım, B., Onal, D., Bozkurt, H., 2007. Determination of some characteristic properties of lactic acid bacteria isolated from traditional hand-made yogurts, *Deut Lebensm Rundsch.* 103: 517-521.
30. Aroutcheva, A., Gariti, D., 2001. Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol.* 185: 375-379.
31. Pridmore, R.D., Pittet, A.C., Praplan, F., Cavadini, C., 2008. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti *Salmonella* activity. *FEMS Microbiol Lett.* 283: 210-215.

32. Millsap, K., Reid, G., Van, H., Mei, H., 1996. Adhesion of *Lactobacillus* species in urine and phosphate buffer to silicone rubber and glass under flow. *Biomaterials*. 18: 87–91.
33. Sabir, F., Beyatli, Y., Cokmus, C., Onal-Darilmaz, D., 2010. Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. strains isolated from kefir. *J Food Sci*. 75: M568-M573.
34. Mohammadi, F., Mohammadi, M., Bagheri, A., Roozbahani, H., 2013. Probiotics in human health. *Eur J Exp Biol*. 3: 116-120.
35. Darilmaz, D., Aslım, B., Suludere, Z., Akca, G., 2011. Influence of gastrointestinal system conditions on adhesion of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains to caco-2 cells. *Braz Arch Biol Technol*. 54: 917-926.
36. Yuksekdağ, Z., Aslım, B., 2008. Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). *Braz Arch Biol Technol*. 51: 581-585.
37. Halit, H., 2007. Vajen kaynaklı *Lactobacillus* spp.'nin ekzopolisakkarit (EPS) üretimlerinin antibiyotik dirençliliğine ve epitel hücre yüzeylerine yapışmadaki etkisi. *Y Lisans Tezi, G Ü Fen Bil Ens, Ankara*, 43-55.
38. Aslım, B., Yüksekdağ, Z.N., Beyatli, Y., Mercan, N., 2005. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth conditions. *World J Microbiol Biotechnol*. 21: 673–677.
39. Raus-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., De Los Reyes-Gavilan, C.G., Salminen, S., 2006. Effect of exopolysaccharide isolated from “villi” on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. *J Dairy Sci*. 89: 2355-2358.
40. Madureira, A.R., Amorim, M., Gomes, A.M., Pintado, M.E., Malcata, F.X., 2011. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Res Int*. 44: 465-470.
41. Ustaçelebi, Ş., 1999. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. *Güneş Kitabevi, Ankara* 1083.
42. Alp, G., Aslım, B., 2010. Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*. 16: 101–105.
43. Darilmaz, D.O., Beyatli, Y., 2011. Acid-bile, antibiotic resistance and inhibitory properties of propionibacteria isolated from Turkish traditional home-made cheeses. *Anaerobe*. 18: 122-127.
44. Darilmaz, D., Beyatli, Y., Yuksekdağ, Z.N., 2012. Aggregation and hydrophobicity properties of 6 dairy propionibacteria strains isolated from homemade Turkish cheeses. *J Food Sci*. 71: 20-24.
45. Aslım, B., Onal, D., Beyatli, Y., 2007. Factors influencing autoaggregation and aggregation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolated from handmade yogurt. *J Food Protect*. 70: 223-227.
46. Ekmekçi, H., Aslım, B., Darilmaz, D.O., 2009. Some factors affecting the autoaggregation ability of vaginal *Lactobacillus* isolated from Turkish women. *Arch Biol Sci*. 61: 407-412.

47. Boris, S., Suarez, J.E., Barbes, C., 1997. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, vaginal isolate. *J Appl Microbiol.* 83: 413-420.
48. Lang, C., Böttner, M., Holz, C., Veen, M., Ryser, M., Reindl, A., Tanzer, J.M., 2010. Specific lactobacillus/mutans streptococcus co-aggregation. *J Dental Res.* 89: 175-179.
49. Grover, S., Rashmi, H.M., Srivastava, A.K., Batish, V.K., 2012. Probiotics for human health—new innovations and emerging trends. *Gut pathogens.* 4: 1-14.
50. Salminen, S., Nybom, S., Meriluoto, J., Collado, M.C., Vesterlund, S., El-Nezami, H., 2010. Interaction of probiotics and pathogens—benefits to human health. *Curr Opin Biotechnol.* 21: 157-167.
51. Ahumada, M., Del, C., Bru, E., Colloca, M.E., Lopez, M.E., Nader Macias, M.E., 2001. Lactobacilli isolation from dental plaque and saliva of a group of patients with caries and characterization of their surface properties. *Anaerobe.* 7: 71-77.
52. Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P., Bellon-Fontaine, M.N., 1997. Cell surface characteristics of *L. casei* ss *casei*. *L. paracasei* ss *paracasei* and *L. rhamnosus* strains. *Appl Environ Microbiol.* 63: 1725–1731.