

**VAJENDEN PROBİYOTİK BAKTERİLERİN
İZOLASYONU VE BUNLARIN
ANTİKANSEROJEN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sevda ER

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Şubat, 2016

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1305F089**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sevda ER'in “**Vajenden Probiyotik Bakterilerin İzolasyonu ve Bunların Antikanserojen Etkisinin Araştırılması**” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalı'ndaki, Doktora Tezi 26/01/2016 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. Merih KIVANÇ
Üye :	Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK
Üye :	Doç. Dr. Miriş DİKMEN
Üye :	Doç. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ
Üye :	Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET
Doktora Tezi

VAJENDEN PROBİYOTİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU
VE
BUNLARIN ANTİKANSEROJEN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevda ER
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ
Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL
2016, 163 sayfa

İnsan mikrobiyomu, insan vücudunda kolonize olan trilyonlarca mikroorganizmadan oluşmuştur. Farklı mikrobiyal topluluklar vajina, ağız, deri, gastrointestinal bölge, burun, üretra ve vücudun diğer bölgelerinde yerleşim göstermektedir. Sağlıklı kadınlarda vajinal mikrobiyotanın büyük bir kısmı laktik asit bakterileri tarafından oluşturulmakta olup, bu bakteriler vajinal mikrobiyotanın dengesini sağlamaktadır. Son zamanlarda dikkat, laktik asit bakterilerinin, kanser riskini azaltması üzerine çekilmektedir. Laktik asit bakterilerinin antikanser aktiviteleriyle ilgili literatürde çalışmalar yer almaktadır.

Çalışmamızda, sağlıklı kadınların vajinasından izole edilen laktik asit bakterileri, diğer bakteriler ve mayalar, API CHL-50, VITEK II, 16s rRNA dizi analizi ve MALDI-TOF Kütle Spektrometre Tekniği'yle tanımlanmıştır. Tanımlanan laktik asit bakterilerinden yüksek hidrojen peroksit ve laktik asit üretim miktarına sahip 2 izolat seçilmiş; bu izolatlardan ekzopolisakkarit elde edilmiştir. Sonrasında, 2 izolatın (*Enterococcus faecalis* 3M2 ve *Enterococcus faecalis* 8M10) ekzopolisakkaritlerinin, HeLa hücreleri (serviks karsinoma hücreleri) ve HUVEC hücreleri (insan göbek kordon ven hücreleri) üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi (tetrazolyum testi) uygulanarak araştırılmıştır. Bu sitotoksik aktiviteyi belirlerken HeLa ve HUVEC hücreleri üzerine, farklı konsantrasyonlarda (20mg/mL, 15mg/mL, 10mg/mL, 7.5mg/mL, 5mg/mL ve 2.5mg/mL) laktik asit bakteri ekzopolisakkaritleri uygulanmıştır. Yapılan çalışmada uygulanan 2 bakterinin ekzopolisakkaritlerinin doza bağlı olarak, hücre sayısında farklı etki gösterdiği saptanmıştır. İstatistiksel sonuçlardan elde edilen veriler, *Enterococcus faecalis* 3M2 ekzopolisakkaritinin en yüksek dozunun (20mg/mL), 24 saatte hücre sayısının azaltılmasında en etkili olduğu sonucunu ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Ekzopolisakkarit, HeLa hücreleri, laktik asit bakterileri, MTT testi, vajina florası.

ABSTRACT
PhD. Thesis

**ISOLATION OF PROBIOTIC BACTERIA FROM THE VAGINA
AND
INVESTIGATION OF THEIR ANTICARCINOGENIC EFFECTS**

Sevda ER
Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program

Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ
Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL
2016, 163 pages

In healthy women, the vaginal microbiota is dominated by lactobacilli and these bacteria provide balance of vaginal microbiota. Recently, studies on the anticancer activity of lactic acid bacteria have been focused.

In this study, examining probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from vagina of healthy woman, aims to investigate the anticancer activity of selected lactic acid bacteria. Microorganisms (326 bacteria and 18 yeast) were isolated from vagina of healthy women (20-40 ages). Lactic acid bacteria, other bacteria and yeast isolated from vagina were identified with API CHL-50, VITEK II, 16s rRNA sequence analysis and MALDI-TOF Mass Spectrometry Techniques. Performing antibiotic susceptibilities, antimicrobial activities, autoaggregation, coaggregation, hydrophobicity assays, acid and bile salt resistivity, hydrogen peroxide, lactic acid and proteolytic quantitations of identified lactic acid bacteria have been determined probiotic properties of these bacteria. Two isolates were chosen from identified bacteria that have high production rate of hydrogen peroxide and lactic acid. Exopolysaccharides were obtained from these bacteria. Afterwards, cytotoxic effects of exopolysaccharides of two lactic acid bacteria (*Enterococcus faecalis* 3M2 and *Enterococcus faecalis* 8M10) were studied on HeLa cells (servix carcinoma cells) and HUVEC cells (human umbilical vein endothelial cells) by MTT Assay (tetrazolium assay). To determine this cytotoxic effect, exopolysaccharides of these bacteria were applied on HeLa cells and HUVEC cells at different concentrations (20mg/mL, 15mg/mL, 10mg/mL, 7,5mg/mL, 5mg/mL and 2,5mg/mL). In this study, we determined these exopolysaccharides of two bacteria exerted different effects on cell viability depending on dose. Data from obtained statistical results revealed that maximum dose of exopolysaccharide of *Enterococcus faecalis* 3M2 (20mg/mL) were the most efficient bacteria on HeLa cell viability at 24h incubation.

Keywords: Exopolysaccharide, HeLa cells, lactic acid bacteria, MTT assay, vaginal flora.

TEŞEKKÜR

Tezım süresince her an yanımda olan, benden desteğini esirgemeyen Sayın Danışman Hocam Prof.Dr. Merih KIVANÇ'a, yine tüm iyi niyeti ve olumlu yaklaşımlarıyla bana destek veren Sayın Danışman Hocam Prof. Dr. A. Tansu KOPARAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezım süresince 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında, burs desteğini esirgemeyen TÜBİTAK Eğitim Bursları Müdürlüğü'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Sayın Prof. Dr. A.Yavuz KILIÇ, Sayın Doç. Dr. Meral YILMAZ CANKILIÇ ve Sayın Uzm. Erdoğan ÇAKIR hocalarıma çok teşekkür ediyorum. Ayrıca her zaman beni anlayışla karşılayan, bana destek olan ve bir dekandan öte bana babalık yapan, İstanbul Medipol Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanım Sayın Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK hocama, yine İstanbul Medipol Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ahmet Zeki ŞENGİL hocama ve Yard. Doç. Dr. Sine Özmen Toğay hocama teşekkürlerimi sunarım. Yine, bana güzel bir eğitim verdiğine inandığım Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü hocalarıma bir borç bilirim.

Deneylerimin yapılması aşamalarında göstermiş oldukları yardımlarından dolayı sevgili arkadaşlarım Banu BARUTÇA, GİZEM ARIK, Ümit Can ERİM, Emine DİNÇER, öğrencim Fatma KOÇ'a çok teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvar desteğini esirgemeyen sevgili hocalarım Doç. Dr. Mesut YILMAZ, Yard. Doç. Dr. Ayşe İSTANBULLU ve Dr. Çağlar MACİT Hocam'a teşekkürlerimi sunuyorum. Tezım süresince bana sürekli güç veren canım arkadaşım Neslihan ÜSTÜNDAĞ'a, ayrıca beni sabırla dinleyen Duygu ÖZEL, Metin UYAR ve Merve ERTAŞ'a çok teşekkür ediyorum.

Canım kardeşlerime, bugüne kadar ne olursa olsun yılmamam gerektiğini her defasında bana hatırlatan ve daima arkamda olan canım annem ve babama, teşekkürü bir borç bilirim. Tezimi, akademisyenlik adımı atmama en büyük destek veren canım annem ve babama armağan ediyorum.

Sevda ER

Mart, 2016

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Vajinal Flora.....	2
1.1.1. Vajinal flora üyeleri.....	3
1.1.2. Vajinadaki laktik asit bakterileri.....	3
1.1.3. Vajinadaki LAB'lerinin önemi.....	4
1.2. Probiyotikler.....	4
1.2.1. Probiyotik mikroorganizmaların özellikleri.....	4
1.2.2. Probiyotiklerin etkileri.....	5
1.3. Vajinal Florayı Etkileyen Faktörler.....	5
1.3.1. Adezyon.....	6
1.3.2. Östrojen miktarı.....	6
1.3.3. Antimikrobiyal madde üretimi.....	7
1.3.4. Vajinal enfeksiyonlardan korunmada LAB'lerinin rolü.....	9
1.4. Bakteriyal Ekzopolisakkaritler	10
1.4.1. Ekzopolisakkarit tanımı ve tarihçesi	10
1.4.2. Ekzopolisakkarit oluşumu	10
1.4.3. Ekzopolisakkaritlerin yapısı	10
1.4.4. Ekzopolisakkaritlerin fonksiyonları	11
1.4.5. Ekzopolisakkaritlerin kullanım alanları	12
1.4.6. Ekzopolisakkarit üreten laktik asit bakterileri	14
1.4.7. Ekzopolisakkarit miktarını etkileyen faktörler	14

1.5. Laktik asit bakterilerinin ve bunlara ait ekzopolisakkaritlerin antitümöral etkileri.....	15
1.6. Kanser	16
1.6.1. Rahim ağzı kanseri	17
2. MATERYAL ve YÖNTEM	18
2.1. Materyal.....	18
2.1.1. Vajina örneklerinin temini ve laboratuvara getirilmesi	18
2.1.2. Hücre hatları	18
2.1.3. Besi ortamları ve kimyasallar	18
2.1.3.1. MRS agar	18
2.1.3.2. M17 agar	19
2.1.3.3. Hareketlilik nitrat ortamı	19
2.1.3.4. MRS agar % 6,0 tuz ilaveli	20
2.1.3.5. MRS agar % 7,5 tuz ilaveli	20
2.1.3.6. MRS agar % 10 tuz ilaveli	20
2.1.3.7. Üç şekerli demirli (TSI) agar	20
2.1.3.8. Arjinin dihidrolaz broth	21
2.1.3.9. Beyin kalp infüzyon (BHI) agar	21
2.1.3.10. Nutrient agar	22
2.1.3.11. Endo agar	22
2.1.3.12. Beyin kalp infüzyon (BHI) broth	23
2.1.3.13. Patates dekstroz broth (PDB)	23
2.1.3.14. Patates dekstroz agar (PDA)	23
2.1.3.15. Tween 80 agarlı besiyeri	24
2.1.3.16. Egg yolk besiyeri	24
2.1.3.17. Mueller hinton agar (MHA)	24
2.1.3.18. MRS broth	25
2.1.3.19. M17 broth	25
2.1.3.20. Mueller hinton yumuşak agar	26

2.1.3.21. Patates dekstroz yumuşak agar	26
2.1.3.22. Mikrobiyoloji deneylerinde kullanılan diğer kimyasallar ve besiy ortamları	26
2.1.3.23. Hücre kültüründe kullanılan diğer kimyasallar ve besiy ortamları	27
2.1.4. Kullanılan çözeltiler	27
2.1.4.1. %20'lik gliserol çözeltisi	27
2.1.4.2. %15'lik gliserol çözeltisi	27
2.1.4.3. Fosfat buffer saline (PBS)	27
2.1.4.4. Fizyolojik tuzlu su	28
2.1.4.5. Hidrojen peroksit tespiti için standart çözelti	28
2.1.4.6. 0,1M Sodyum hidroksit çözeltisi	28
2.1.4.7. 1N H ₂ SO ₄ çözeltisi	28
2.1.4.8. Amonyum molibden çözeltisi	28
2.1.4.9. Potasyum iyodür çözeltisi	29
2.1.4.10. Proteolitik aktivite tayini için standart çözelti.....	29
2.1.4.11. 0,72 N Triklorasetik asit çözeltisi.....	29
2.1.4.12. Na ₂ CO ₃ .Na ₄ P ₂ O ₇ çözeltisi.....	29
2.1.4.13. Fenol ayıracağı.....	29
2.1.4.14. 0,05 M K ₂ HPO ₄ tamponu (pH 6,5).....	30
2.1.4.15. PBS EDTA	30
2.1.4.16. 1xTripsin EDTA	30
2.1.5. Kullanılan antibiyotikler	30
2.2. Yöntem	31
2.2.1. Vajinadan alınan örneklerden mikroorganizmaların izolasyonu.....	31
2.2.2. İzole edilen mikroorganizmaların tanımlanmaları	32

2.2.2.1. Gram boyama	32
2.2.2.2. Katalaz testi	33
2.2.2.3. Oksidaz testi	33
2.2.2.4. Hareketlilik testi	33
2.2.2.5. Farklı sıcaklıklarda gelişim	34
2.2.2.6. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim	34
2.2.2.7. Farklı pH 'larda gelişim	34
2.2.2.8. Hidrojen sülfür oluşumu	34
2.2.2.9. Arjininden amonyak (NH ₃) oluşumu	35
2.2.2.10. İzolatların mikrotitre plaka yöntemi ile biyofilm oluşumlarının belirlenmesi	35
2.2.2.11. Hemolitik aktivite tayini	36
2.2.2.12. Lipolitik enzim aktivitesi	36
2.2.2.13. Fosfolipaz enzim aktivitesi	36
2.2.2.14. Laktik asit bakteri izolatlarının API CHL 50 ile karbonhidrat kullanma durumlarının belirlenmesi.....	37
2.2.2.15. Laktik asit bakteri izolatlarının 16S rRNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyonlarının belirlenmesi	38
2.2.2.16. Diğer bakteri izolatlarının VITEK II ile tanımlanmaları.....	39
2.2.2.17. Maya izolatlarının MALDI – TOF Kütle Spektrometre Tekniği'yle tanımlanması	40
2.2.3. LAB izolatlarının metabolik ürünlerinin belirlenmesi	40
2.2.3.1. Laktik asit üretiminin tayini	40
2.2.3.2. Hidrojen peroksit üretiminin tayini	41
2.2.3.3. Proteolitik aktivite tayini.....	42
2.2.4. LAB izolatlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi	42

2.2.4.1. Antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi.....	42
2.2.4.2. Antifungal aktivite tayini.....	43
2.2.4.3. Antibakteriyal aktivite tayini	44
2.2.4.4. Antibakteriyal aktiviteye bazı enzimlerin etkisi.....	45
2.2.4.5. Otoagregasyon	45
2.2.4.6. Koagregasyon	46
2.2.4.7. Hidrofobisite.....	46
2.2.4.8. Asit direncinin belirlenmesi	47
2.2.4.9. Safra tuzu direncinin belirlenmesi	47
2.2.5. Laktik asit bakteri izolatlarından ekzopolisakkarit izolasyonu.....	48
2.2.6.LAB'lerinden izole edilen EPS'lerin sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi	48
2.2.6.1. HeLa hücre (insan serviks kanser hücresi) hattı.....	48
2.2.6.2. HUVEC hücre (insan göbek kordonu endotel hücresi) hattı.....	49
2.2.6.3. HeLa ve HUVEC hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlanması	50
2.2.6.4. Test maddelerinin (EPS) dozlarının hazırlanması	51
2.2.6.5. Hücrelerin test için hazırlanması	51
2.2.6.6. Mitokondriyal aktiviteye bağlı MTT testi	52
2.2.6.7. Mikroskopi	52
2.2.6.8. Fotoğrafi	52
2.2.6.9. İstatistiki değerlendirme	53
3. BULGULAR	54
3.1. Vajina Örneklerinden Mikroorganizmaların İzolasyonu	54
3.2. İzole Edilen Mikroorganizmaların Tanımlama Test Sonuçları	57
3.2.1.İzole edilen mikroorganizmaların biyokimyasal aktivite sonuçları..	58

3.2.2. Mikrotitre plaka yöntemi ile biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi.....	71
3.2.3. Maya izolatlarının hemolitik aktivite sonuçları	75
3.2.4. Maya izolatlarının lipolitik enzim aktivite sonuçları	76
3.2.5. Maya izolatlarının fosfolipaz enzim aktivite sonuçları	77
3.2.6. LAB izolatlarının API CHL 50 ile karbonhidrat kullanma durumlarının belirlenmesi.....	77
3.2.7. LAB izolatlarının 16S rRNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyon sonuçları.....	79
3.2.8. Diğer bakteri izolatlarının VITEK II ile tanımlanmaları	79
3.2.9. Maya izolatlarının MALDI – TOF Kütle Spektrometre Tekniği'yle tanımlanmaları	81
3.3. LAB izolatlarının metabolik ürünlerinin belirlenmesi.....	81
3.4. LAB İzolatlarının Probiyotik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi	85
3.4.1. LAB izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları	85
3.4.2. LAB izolatlarının antifungal aktivite sonuçları	91
3.4.3. LAB izolatlarının antibakteriyal aktivite	96
3.4.4. Bazı enzimlerin antibakteriyal etki sonuçları.....	100
3.4.5. LAB izolatlarının otoagregasyon ve koagregasyon sonuçları.....	100
3.4.6. LAB izolatlarının hidrofobisite değerleri.....	103
3.4.7. LAB izolatlarının asit dirençlilikleri	104
3.4.8. LAB izolatlarının safra tuzu dirençlilikleri	104
3.5. LAB'lerinden Ekzopolisakkarit Eldesi	107
3.6. MTT Sonuçları	107
3.6.1. 3M2 izolatının HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri	107
3.6.2. 3M2 izolatının HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri....	108
3.6.3. 8M10 izolatının HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri.....	109
3.6.4. 8M10 izolatının HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri..	110

3.7. Hücre Morfolojilerinin İncelenmesi	111
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	118
KAYNAKLAR	138

ŞEKİLLER DİZİNİ

3.1.Gram (+) kok izolatı.....	56
3.2.Gram (+) kokobasil izolatı.....	56
3.3.Gram (+) basil izolatı.....	56
3.4.Kanlı agarda hemolitik aktivitenin belirlenmesi	76
3.5.Tween 80 agarlı besiyerinde lipolitik enzim aktivitesi.....	76
3.6.Hidrojen peroksit üretimi standart eğrisi (350 nm)	82
3.7.Proteolitik aktivite standart eğrisi (650 nm).....	82
3.8.LAB izolatlarının <i>Candida</i> izolatları üzerindeki antifungal aktiviteleri.....	91
3.9.LAB izolatlarının Agar Difüzyon Tekniği'yle antibakteriyal aktiviteleri.....	96
3.10.3M2 izolatının HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri.....	108
3.11.3M2 izolatının HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri.....	109
3.12.8M10 izolatının HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri.....	110
3.13.8M10 izolatının HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri.....	111
3.14.HeLa hücrelerinin normal morfolojileri X100 (ölçü birimi 100µm).....	114
3.15.3M2 izolatının ekzopolisakkaritinin 24 saat inkübasyon sonrası HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin morfolojik görünümü X100 (ölçü birimi 100µm).....	113
3.16.8M10 izolatının ekzopolisakkaritinin 24 saat inkübasyon sonrası HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin morfolojik görünümü X100 (ölçü birimi 100µm).....	114
3.17.HUVEC hücrelerinin normal morfolojileri X100 (ölçü birimi 100µm).....	115
3.18.3M2 izolatının ekzopolisakkaritinin 24 saat inkübasyon sonrası HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin morfolojik görünümü X100 (ölçü birimi 100µm).....	116

3.19.8M10 izolatının ekzopolisakkaritinin 24 saat inkübasyon sonrası HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin morfolojik görünümü X100 (ölçü birimi 100µm).....	117
---	-----

ÇİZELGELER DİZİNİ

3.1.İzolatların kodları	54
3.2.Vajinadan izole edilen bakteri izolatları.....	55
3.3.Katalaz (-) Gram (+) basil bakterileri izolatlarının biyokimyasal aktivite testleri.....	58
3.4.Katalaz (-) Gram (+) kokobasil bakterileri izolatlarının biyokimyasal aktivite testleri	65
3.5.Katalaz (-) Gram (+) kok bakterilerin biyokimyasal aktivite testleri	68
3.6.Katalaz (-) Gram (+) bakteri izolatlarının mikrotitre plaka yöntemi ile glukoz ortamındaki biyofilm oluşumları	72
3.7.Katalaz (+) Gram (+) bakteri izolatlarının mikrotitre plaka yöntemi ile glukoz ortamındaki biyofilm oluşumları.....	74
3.8.Maya izolatlarının mikrotitre plaka yöntemi ile glukoz ortamındaki biyofilm oluşumları.....	75
3.9.Maya izolatlarının aktivite ve tanımlama sonuçları.....	77
3.10.Laktik asit bakteri izolatlarının API CHL 50 sistemi ile tanımlanmaları.....	78
3.11.Laktik Asit Bakteri izolatlarının 16S rRNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyon sonuçları.....	79
3.12.Katalaz pozitif bakterilerin VITEK II testi tanımlanmaları.....	80
3.13.LAB 'lerinin laktik asit, hidrojen peroksit ve proteolitik aktivite miktarları.	83
3.14.LAB izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları.....	86
3.15.LAB izolatlarının antifungal aktiviteleri.....	92
3.16.LAB izolatlarının antibakteriyal aktiviteleri.....	97
3.17.LAB izolatlarının otoagregasyon ve koagregasyon aktiviteleri	101
3.18.LAB izolatlarının asit dirençlilikleri.....	105
3.19.LAB izolatlarının safra tuzu dirençlilikleri	106

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DMEM-F12	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Hams F-12
EDTA	: Etilen-diamin tetra asetik asit
FBS	: Fetal Bovine Serum
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate buffer saline)
MRS Broth	: Man Rogosa Sharpe Broth
FAO / WHO	: Food and Agriculture Organization / World Health Organization
µg	: Mikrogram
g	: Gram
µg	: Mikrogram
mL	: Mililitre
nm	: Nanometre
kob	: Koloni oluşturan birim

1. GİRİŞ

İnsan vücudunda kolonize olan insan mikrobiyomu, trilyonlarca mikroorganizmadan oluşmaktadır. Farklı mikrobiyal topluluklar, vajina, ağız, deri, gastrointestinal bölge, burun, üretra ve vücudun diğer bölgelerinde yer edinmiştir. Vücudun diğer bölgeleriyle karşılaştırıldığında, vajinada daha az bakteri türü bulunmaktadır (Fettweis ve ark., 2012). Sağlıklı bir kadının vajinal ekosisteminde laktobasiller hakimdir (Mårdh, 1991). Laktobasiller, patojen ve fırsatçı organizmaların gelişimini engelleyerek, normal vajinal mikrobiyotanın korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Kaewsrichan ve ark., 2006; Rönnqvist ve ark., 2006).

Laktik asit bakterileri (LAB) asit ve safra tuzuna tolerans gösterme, insan bağırsak mukozasına yapışma, insan gastrointestinal bölgesinin geçici kolonizasyonu, antimikrobiyal maddelerin üretimi ve patojen mikroorganizma gelişiminin inhibisyonunu gibi özelliklere sahiptir (Salminen ve ark., 1998). Ayrıca, bu bakterilerin immün sistemin stimülasyonu, serum kolesterol seviyesinin düşürülmesi, kanser riskinin azaltılması gibi yararları da bulunmaktadır. Son zamanlarda bazı LAB'lerinin anti-ageing ve anti-oksidan aktiviteleri gibi diğer önemli biyolojik fonksiyonları da ortaya konmuştur (Li ve ark., 2012).

Bazı LAB'leri, ya bakteriyi saran ya da hücre dışına salınan ekstraselüler polisakkaritleri (EPS) üretme yeteneğindedir (Böke ve ark., 2010). LAB'lerinden elde edilen EPS'ler, gıda katkı maddeleri ya da fonksiyonel gıda tamamlayıcıları olarak hem sağlık alanında hem de ekonomik anlamda önemli potansiyele sahiptir (Zhang ve ark., 2013). LAB'leri farklı kimyasal kompozisyon ve yapıya sahip EPS'ler üreterek gıda sistemlerinde yararlı fonksiyonel özellikler sunmaktadır (Bhaskaracharya ve Shah, 2000). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin, gıda endüstrisinde kıvam arttırıcı, stabilize edici ya da emulsifiye edici ajan olarak kullanıldığı ve bu yüzden eşsiz fiziksel ve reolojik özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir (Hassan, 2008).

Ayrıca EPS'lerin, birtakım sağlığa yararlı etkilere de sahip olduğu da gösterilmiştir (Ruas-Madiedo ve ark., 2008). Fermente günlük ürünlerinden elde edilen hem bakteri hücrelerinin tamamı, hücre komponentleri ve EPS gibi metabolitlerin probiyotik etkileri ortaya konmuştur. LAB'leri tarafından üretilen

EPS'ler, potansiyel yararlı etkileri nedeniyle giderek artan ilgi kazanmıştır (Wu ve ark., 2010). *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarından izole edilen EPS'lerin bakteriyal toksinlerin ve enteropatojenlerin toksik etkilerini etkisizleştirebildiği ve böylece konak üzerine yararlı etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Lopez ve ark., 2012).

Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalardan elde edilen verilerle, belli LAB suşlarının, belli kanser tiplerinin riskini azaltabileceği ve tümörün gelişimini inhibe edebileceği ortaya konmuştur (Kato ve ark., 1994). LAB'lerinin antikanser etkileriyle ilgili çalışmaların çoğunluğu, kolorektal kanser ile ilgilidir (Thirabunyanon ve Hongwittayakorn, 2013; Nami ve ark., 2014). Ancak literatürde az da olsa rahim ağzı kanseriyle ilgili çalışmalar da yer almaktadır. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* ve *Bifidobacterium* gibi çeşitli LAB suşlarının hücre duvarı peptidoglukanının ya da membran komponentlerinin antikanser aktiviteleri değerlendirilmiştir (Fichera ve Giese, 1994; ve ark., 2004). Buna ek olarak, vajinadaki *Lactobacilli*'nin rahim ağzı kanserini önlemeye yönelik antitümör aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Motevaseli ve ark., 2013). Ancak, literatürde EPS ve kanser üzerine yapılmış çok çalışma yer almamaktadır.

Araştırmada, sağlıklı kadınların vajinasından izole edilen LAB'leri öncelikle tanımlanmış ve tanımlanan bakterilerden yüksek hidrojen peroksit ve laktik asit üretim miktarına sahip 2 izolat seçilmiş; bu izolatlardan ekzopolisakkarit izolasyonu yapılmıştır. Sonrasında, bu 2 izolattan elde edilen ekzopolisakkaritlerin serviks (rahim ağzı) karsinoma hücreleri olan HeLa hücrelerine ve sağlıklı hücre olarak da HUVEC hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri MTT testi ile araştırılmıştır.

1.1. Vajinal Flora

İnsan vücudunda kolonize olan mikrobiyota, trilyonlarca mikroorganizmalardan oluşmuştur. Farklı mikrobiyal topluluklar, vajina, ağız, deri, gastrointestinal bölge, burun, üretra ve vücudun diğer bölgelerinde yer edinmiştir (Fettweis ve ark., 2012).

1.1.1. Vajinal flora üyeleri

Sağlıklı kadınların vajinal ekosisteminde *Lactobacillus* türleri baskın haldedir (Antonio ve ark.,1999). Bunun dışında *Staphylococcus* spp., *Ureaplasma* spp., *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* spp., *Mycoplasma* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Veillonella* spp., *Bifidobacterium* spp. and *Candida* spp. gibi diğer mikroorganizma üyeleri de yer almaktadır (Larsen ve Monif, 2001; Quayle, 2002). Vajinal sıvının her mL 'sinde 10^{10} kadar *Lactobacillus* spp.'nin bulunduğu saptanmıştır (Redondo-Lopez ve ark., 1990). 1892 yılında Alman doktor Albert S. Döderlein, hamile bir kadının vajinal örneğinden izole ettiği bir bakteriyi Döderlein'in basili olarak isimlendirmiştir. Daha sonrasında bu bakterinin ismi *Lactobacillus* olarak değiştirilmiştir (Lepargneur ve Rousseau, 2002).

Vajina örneklerinden 20'nin üzerinde laktobasil türü izole edilmiştir. Vajinal florada en yaygın olarak *Lactobacillus crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. fermentum* ve *L. acidophilus* türleri yer almaktadır (Giorgi ve ark., 1987; Srinivasan ve Fredricks, 2008; Ravel ve ark., 2011). *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. cellobiotus*, *L. oris*, *L. reuteri*, *L. ruminis*, *L. salivarius*, *L. brevis*, *L. delbrueckii* ve *L. vaginalis* türlerinin de bulunduğu ortaya konmuştur (Giorgi ve ark. 1987; Antonio ve ark., 1999; Martín ve ark., 2008).

1.1.2. Vajinadaki laktik asit bakterileri

Laktik asit bakterileri, Gram – pozitif, çubuk ya da yuvarlak şeklinde, spor oluşturmeyen, aside dirençli, katalaz negatif, düşük GC (guanin sitozin) oranına sahip, anaerobik ya da mikroaerofil, şekeri laktik aside fermente edebilen mikroorganizmalardır. LAB'leri yaygın bir şekilde *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* ve *Streptococcus* türlerini içermektedir. Daha az oranda da *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* türlerini içermektedir (Patel ve ark., 2012).

Lactobacillus gibi LAB'leri sağlıklı insan mikroflorasında bulunan önemli mikroorganizmalardır (Macfarlane and Cummings 2002). Ayrıca, LAB'leri çeşitli probiyotik özelliklerle ilişkilendirilen yararlı mikroorganizmalardır (Fuller 1989).

1.1.3. Vajinadaki LAB'lerinin önemi

Vajinal mikrobiyota, ürogenital sağlığın korunmasında önemli bir role sahiptir (Jespers ve ark., 2012). Lactobacilli, patojenik ve fırsatçı organizmaların aşırı gelişmesini önleyerek vajinal mikrobiyotanın korunmasında rol oynamaktadır (Kaewsrichan ve ark., 2006). Vajinadaki laktobasiller, patojenlerle yarışıp onların epitel hücelere adezyonunu engelleyerek, vajinada iyi bir koruma sağlamaktadır (Kaewnopparat ve ark., 2013). Dahası, *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, üropatojenik *Escherichia coli* biyofilminin oluşumunu engellemiştir (McMillan ve ark., 2011).

LAB'leri immün hücrelerin etkileşimleri aracılığıyla immün sistemi sitümüle etmektedir (Lebeer ve ark., 2008). Ayrıca laktik asit bakterileri, H₂O₂ üreterek granülosit koloni - stimüle edici faktörlerin, savunma hücrelerinin ya da diğer mediyatörlerin indüksiyonunu düzenleme potansiyeline sahiptir (Miller ve Reid, 2012).

Premenopozal dönemdeki kadınlarda vajinadaki laktobasiller, vajinadaki patojenlerin gelişimini inhibe etmektedir. Bunu, vajinal epitel hücelere adezyonda, patojenlerle yarışarak ve bakteriyosin, hidrojen peroksit (H₂O₂) ve laktik asit gibi antimikrobiyalleri üreterek gerçekleştirdiği öne sürülmüştür. Vajinadaki laktik asit bakterileri kısa zincirli yağ asitleri ve biyosülfektan üreterek patojenleri inhibe etmektedirler (Boris ve Barbes, 2000). Birçok çalışmada, *Lactobacillus* türlerinin konak epitel hücre reseptörlerine bağlanmasıyla, B *Streptococcus* türleri, *Staphylococcus aureus* (Za'rate ve Nader-Macias, 2006), *Gardnerella vaginalis* (Boris ve Barbes, 1998), *Neisseria gonorrhoeae* (Vielfort ve ark., 2008), *Pseudomonas aeruginosa*, ve *Klebsiella pneumoniae* gibi çeşitli ürogenital patojenlerin, epitel hücelere bağlanmasını engellediği bildirilmiştir (Osset ve ark., 2001a).

1.2. Probiyotikler

1.2.1. Probiyotik mikroorganizmaların özellikleri

Probiyotikler 2001'de FAO/WHO tarafından "yeterli miktarlarda alındığında konak sağlığına bir yarar sunan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlanmıştır (Anonim, 2001). Pekçok probiyotik mikroorganizma, *Lactobacillus* sp.,

Bifidobacterium sp. ve *Enterococcus* sp. gibi Laktik Asit Bakterileri'ne aittir (Bergonzelli ve ark., 2005). LAB'leri yararlı bir etki sergilemesi için, insan gastrointestinal sisteminde varlığını sürdürebilmesi gereklidir. Bunun için de düşük pH'ya ve safra asidine dirençli olmalı, mukus ya da epitel hücrelere adezyon yeteneğine sahip olmalıdır (Böke ve ark., 2010; Pelinescu ve ark., 2011; Nikolic ve ark., 2012).

1.2.1. Probiyotiklerin etkileri

Yapılan çalışmalarla probiyotiklerin, diyarenin önlenmesi ve tedavisi, sistemik enfeksiyonların önlenmesi, inflamatuvar bağırsak hastalıklarının kontrol edilmesi, immün sistemin düzenlenmesi, alerjinin tedavi edilmesi ve önlenmesi, kolesteroleminin tedavi edilmesi, laktoz intoleransının azaltılması ve antikanser etkileri gibi yararlı etkileri ortaya konmuştur (Gill ve Guarner, 2004). Son zamanlarda anti – ageing ve antioksidan aktiviteleri de ortaya konmuştur (Li ve ark., 2012). Ancak, probiyotik etki suşa özgüdür (Paolillo ve ark., 2009). Bir probiyotik suş, sunulan tüm yararlı etkilere sahip olmayabilmektedir. (Shah, 2007). Farklı suşlar, farklı mekanizmaları hedeflemektedir. Bu amaçla, probiyotik amaçla kullanılacak suşun, tüm karakterizasyonun yapılması gerekmektedir (Rafter, 2003).

Probiyotikler, son zamanlarda terapötik preparasyonlarda kullanılmaktadır. Ayrıca, yoğurt ve diğer fermente edilmiş günlük ürünlere eklenerek, gıda tamamlayıcısı olarak da kullanılmaktadır (Pereira ve Gibson, 2002a; Penna ve ark., 2007; Shah, 2007).

1.3. Vajinal Florayı Etkileyen Faktörler

Vajinada yer alan farklı mikroorganizmalar arasındaki denge, homeostazisin korunması için önemlidir (Boskey ve ark., 2001). Diyet, stres, sigara, vajinal duş, doğum kontrol hapları, jinekolojik cerrahi, rahim içi araçlar, cinsel ilişki, kişisel hijyen, rahim ağzı kanseri, antibiyotikler, mikrobiyal enfeksiyonlar, hormon seviyelerinin değişimi, menstruasyon, immünsupresyon, vajinadaki mikrobiyal dengeyi bozmaktadır; özellikle laktobasil, bifidobakteri ve streptokok popülasyonunun azalmasına neden olmaktadır (Silvester ve Dicks, 2003; Todorov ve ark., 2007).

1.3.1. Adezyon

Sağlıklı kadınlarda serviks, uterus ve vajina için koruyucu bir bariyer görevi gören yoğun olarak musinden oluşan mukus üretmektedirler. Böylece musine iyi bir adezyon, probiyotik laktobasillerin vajinada kalma süresini arttırdığından bu bakterilerde istenen bir özelliktir (Martı'n ve ark., 2012).

1.3.2. Östrojen miktarı

Östrojen, vajinal florayı etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Fettweis ve ark., 2012). Lactobacilli, sağlıklı kadın vajinasında baskın halde olmasına rağmen, bu bakterilerin varlığı ve sayıları yaşa ve regli, hamilelik ve menopoza bağlı menstrual döngüdeki değişimlere bağlı bir şekilde östrojen miktarıyla etkilenmektedir (Mastromarino ve ark., 2002; Fettweis ve ark., 2012).

Kadınların yaşam döngülerine bağlı olarak, hormon seviyelerinde özellikle de östrojen seviyelerindeki değişikliklerle vajinal mikrobiyatada değişiklikler meydana gelmektedir. Östrojen, lactobacilli tarafından kullanılabilen, glukoza metabolize edilerek kullanılabilen glikojeni üretmek için, epitel hücreleri stimüle etmektedir. Ergenlikten önce östrojen seviyeleri düşük ve vajinal epitelyum kalın ve glikojence eksiktir. Bu dönemde lactobacilli yoğunluğu azdır ve özellikle Gram – negatif çubuk ve Gram – pozitif kok bakteriler baskın haldedir. İlk regli döneminden sonra östrojen seviyesindeki artış, mikrobiyotada değişikliğe yol açmaktadır. Böylelikle lactobacilli baskın hale gelmeye başlamaktadır (Miller ve Reid, 2012). Vajinal florada en çok ergenlik döneminde değişim olmaktadır. Bu dönemde östrojen seviyeleri yükselir, vajinal epitel kalınlaşır ve glikojen miktarı da artmaktadır (Silvester ve Dicks, 2003).

Menopoz öncesi sağlıklı bir kadının vajinal sıvısında $10^7 - 10^8$ kob/g laktobasil bulunmaktadır (Sobel ve Chaim, 1996). Menopoz döneminde östrojen seviyeleri giderek düştüğü için, vajinal epitelyal hücrelerindeki glikojen miktarı da azalır ve bu durum Lactobacilli 'nin azalmasına yol açmaktadır. Ayrıca bu dönemde vajinal epitelyum kalınlaşır ve elastikiyetini kaybeder, vajinal kan akışı azalır ve vajinal sekresyonlarda da belirgin bir düşüş gözlenmektedir. Bu yüzden vajinadaki laktobasil sayısı azalmaktadır (Fettweis ve ark., 2012). Bunun sonucunda da bakteriyal vajinozis riski artmaktadır (Heinamann ve Reid, 2005).

1.3.3. Antimikrobiyal madde üretimi

Vajinal *Lactobacillus* suşları, vajinal pH'yı düşürerek ve hidrojen peroksit, laktik asit ve bakteriyosin gibi antibakteriyal moleküller üreterek, vajinada patojen bakterilerin gelişimini inhibe etmektedirler (Reid ve Burton, 2002; Servin, 2004).

Laktik asit bakterileri, laktik asit fermantasyonu sırasında laktik asit gibi bazı organik asitler, diasetil, hidrojen peroksit, bakteriyosin ya da bakterisidal bileşikler üretmektedir (Zhennai, 2000). Organik asitler, vajinal pH'nın 4.5'in altında tutulmasını sağlayarak, patojenlerin bu ortamda gelişmesini engeller (Choe ve ark., 2004). Fermantasyon sonrasında üretilen antimikrobiyal maddeler, vajinal floranın korunmasında önemlidir (Fettweis ve ark., 2012).

Bakteriyosin üretimi

Bakteriyosinler, Gram – pozitif ve gram – negatif bakteriler tarafından üretilen, hassas suşlar üzerine inhibitör etkisi olan antimikrobiyal protein yapılarıdır (Tagg ve ark., 1976). Bakteriyosinler antimikrobiyal ajan olup, etkileri sadece *in vitro* olarak ortaya çıkarılmıştır (Ocaña ve ark., 1999). Bakteriyosinlerin ürogenital sağlığın korunmasında öneme sahip olduğu bildirilmiştir (Wescombe ve ark., 2009). Ancak, birkaç ürogenital bakteriyosin tanımlanmış ve çalışılmıştır (Miller ve Reid, 2012).

Bir bakteriyel ürünün bakteriyosin olarak tanımlanabilmesi için biyolojik yönden aktif bir proteine sahip olması, bakterisit etki göstermesi, dar bir inhibisyon spektrumuna sahip olması, spesifik hücre reseptörlerine tutunması, üretimin ve konakçı hücre bağışıklılığının plazmid kökenli genetik determinantlara bağlı olması, üretimin lethal biyosentez yoluyla gerçekleşmesi gereklidir (Demir, 2014). Vajinal *Lactobacillus* suşlarından en az 2 bakteriyosin tanımlanmıştır (Fettweis ve ark., 2012). Laktasin B, *L. acidophilus* tarafından üretilen ve bir bakteriyosin olarak tanımlanmış ilk antimikrobiyal peptiddir (Pascual ve ark., 2008). *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* HV219 tarafından üretilen diğer bir bakteriyosin olan bacHV219'un ise; *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Listeria innocua*, *Proteus vulgaris* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antibakteriyal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Todorov ve ark., 2006).

Laktik asit üretimi ve vajinal pH

Laktik asit oluşumu ve vajinal epitelyuma geçişi, vajinal homeostazisin korunması açısından önemli olmuştur (Melis ve ark., 2000). Lactobacilli, karbonhidrat metabolizmasıyla laktik asit üretmektedir, bu durum da vajinal pH'nın 4.5'in altında tutulmasını sağlamaktadır (Matu ve ark., 2010).

LAB'leri tarafından üretilen laktik asit, vajinal pH'yı düşürmesi sebebiyle bazı patojenlere karşı inhibitör aktiviteye sahiptir. (Boskey ve ark., 2001). Bu asiditenin ise HIV (insan immün yetmezlik virüsü)'i de içeren ürogenital patojenler üzerine sidal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (McGroarty, 1993). Tomas ve arkadaşları (2003), vajinal pH'nın 4.5'in altında olduğunda, *E. coli*'nin kolonizasyonunu engellediğini ortaya koymuşlardır.

Hidrojen peroksit üretimi

Hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimi ilk olarak, vajinal orijinli *Lactobacillus* 'larda rapor edilmiştir (Eschenbach ve ark., 1989). Antonio ve arkadaşları (2005), *L. crispatus*'un % 95, *L. jensenii*'nin ise % 94 oranında hidrojen peroksit ürettiğini bulmuştur.

H_2O_2 üreten Lactobacilli'nin floradaki kaybı, genital ve üriner enfeksiyonların artışına neden olmaktadır (Hawes ve ark., 1996). H_2O_2 'nin, vajinal mikrofloranın korunmasında endojen patojenleri baskıladığı, ayrıca *G. vaginalis*'in *in vitro* gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Matu ve ark., 2010). Özellikle H_2O_2 üreten Lactobacilli'nin, bakteriyel vajinozis, muhtemel bir şekilde HIV ve gonoreye neden olan patojenlerin, vajinal kolonizasyonuna engelleyici bir etkisinin olabildiği öne sürülmektedir (Hawes ve ark., 1996). H_2O_2 üreten *Lactobacillus* türlerinin HIV'i de içeren çeşitli mikroorganizmaların gelişimini inhibe ettiği *in vitro* deneylerle gösterilmiştir (Jespers ve ark., 2012). Ayrıca, hidrojen peroksit üreten Lactobacilli'nin, reaktif oksijen türleriyle spesifik etkileşime girerek vajinal kanser üzerine de etki gösterebildiği bildirilmiştir (Aroutcheva ve ark., 2001).

L. crispatus ve *L. jensenii*'nin ürettiği hidrojen peroksit, mikrobiyal antagonistik etkiye sahip olduğu; ancak aynı oranda antagonistik etki göstermedikleri ortaya konmuştur (Martín ve ark., 2008).

L. salivarius FV2 ve *L. gasseri* MB 335 suşları güçlü H₂O₂ üreticilerdir ve *L. gasseri* MB 335 aynı zamanda epitelyal hücrelere güçlü adezyon özelliği göstermektedir. Ayrıca bu suşların *G. vaginalis* ve *Candida albicans* ile etkili bir koagregasyon gösterdiği ortaya konmuştur (Mastromarino ve ark., 2002). Yapılan diğer bir çalışmada ise sağlıklı kadınların vajinasından izole edilen *Lactobacillus* suşlarının, vajinozisle ilişkili *G. vaginalis* ve *Prevotella bivia*'ya karşı antagonistik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Atassi ve ark., 2006). Yine, LAB'lerinin bazı suşları tarafından üretilen hidrojen peroksitin, *S. aureus* ve *Pseudomonas* spp.'yi etkili bir şekilde inhibe ettiği rapor edilmiştir (Dicks ve Botes, 2010).

1.3.4. Vajinal enfeksiyonlardan korunmada LAB'lerinin rolü

Laktobasillerin ürogenital patojenlere karşı mikrobiyolojik bir bariyer olduğu uzun süredir düşünülmekte olup, vajinadaki enfeksiyon hastalıklarının önlenmesi ya da azaltılmasında önemli bir role sahip oldukları ortaya konmaktadır. (Okkers, 1999; Reid ve ark., 2003a). Çalışmalar, normal genital mikrofloranın özellikle de *Lactobacillus* türlerinin kaybı ya da bozulmasının, genital enfeksiyonların insidansını arttırdığını göstermiştir (Reid, 2002; Reid ve Burton, 2002).

Vajinal floradaki laktobasiller, bakteriyal vajinozis, üriner bölge enfeksiyonları (UTI), vulvovajinal kandidiyazis (VVC) ve HIV gibi diğer cinsel yolla bulaşan enfeksiyon etkenlerinin kolonizasyonuna karşı florayı korumaktadır (Matu ve ark., 2010).

Bazı probiyotik *Lactobacillus* suşlarıyla yapılan çalışmalarda, bu suşların *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Enterobacter*'in bazı türleri gibi patojenler üzerine inhibitör aktivite gösterdiği ortaya konmuştur (Iordache ve ark., 2008). Ayrıca, literatürde *Bacteroides*, *S. aureus* inhibisyonu ile de çalışmalar yer almaktadır (Atassi ve ark., 2006). Yine yapılan bir çalışmada, probiyotik özelliğe sahip *L. fermentum* SK5'in vajinal enfeksiyon kaynağı olan *E. coli* ve *G. vaginalis*'i inhibe ettiği ortaya konmuştur (Kaewnopparat ve ark., 2013).

Bunlara ek olarak vajinadan izole edilen *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* ve *L. crispatus* 'un, *G. vaginalis* ve *P. bivia*'nın canlılığını azalttığı rapor edilmiştir (Atassi ve ark., 2006). Ayrıca bazı laktobasillerin, *E. coli*, *C. albicans*, ve *G. vaginalis* gibi bazı patojenlere karşı koagregasyon yeteneğine sahip olduğu da ortaya konmuştur (Boris ve ark., 1998; Osset ve ark., 2001a).

1.4. Bakteriyal Ekzopolisakkaritler

1.4.1. Ekzopolisakkarit tanımı ve tarihçesi

Mikrobiyal ekzopolisakkaritler, mikroorganizmalar tarafından salgılanan çözünebilir ya da çözünemez polimerlerdir (Kumar ve ark., 2007). Bir başka deyişle EPS ağırlıklı olarak bakteri, mantar ve mavi – yeşil alglerin gelişimleri sırasında salgılanan uzun zincirli polisakkaritlerdir (Ye ve ark., 2012). Pekçok gram – pozitif ve gram – negatif bakteri EPS üretmektedir (Kumar ve ark., 2007). Son yıllarda laktik asit bakterilerinin sentezlediği EPS üzerinde odaklanılmıştır (Guo ve ark., 2013). Bakteriyal EPS, hücre çevresine salgılanarak hücre yüzeyiyle kovalent bir şekilde bağlanarak, kapsül bir yapı oluşturan karbonhidrat polimerleridir. Ayrıca bu maddeler üretici mikroorganizma tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmamaktadır (Ruas-Madiedo ve ark.,2008).

LAB'leri çok iyi bilinen polisakkarit üreticileridir (Monsan ve ark., 2001). Bakteriyal EPS'nin tarihi 19. yüzyılın ortalarında, şarapta bir laktik asit bakterisi olan *Leuconostoc mesenteroides* tarafından üretilen daha sonraları dekstran olarak isimlendirilen bir ekzopolisakkaritin keşfiyle başlamıştır (Nwodo ve ark., 2012).

1.4.2. Ekzopolisakkarit oluşumu

Hücre dışı EPS'ler hücre duvarında yapısal ve koruyucu amaçlı oluşturulmakta olup, teikoik asit yapısı içinde bir bileşen gibi bulunmaktadır (Nwodo ve ark., 2012). Bakteriyal EPS 2 formda oluşmaktadır; biri bakteri yüzeyiyle sıkı bir şekilde bağlanan kapsüler polisakkarit (CPS, K – antijenleri) diğeri ise; bakteriyal yüzeyle gevşek bir şekilde bağlanan slime polisakkaritidir (Kumar ve ark., 2007; Wu ve ark., 2010). Bu yapılar sıklıkla yüzeye yapışmada görev almaktadırlar (Nwodo ve ark., 2012). Belli bakteriyal ekstraselüler polisakkaritler, L - fukoz, L - ramnoz, L - altroz, D – mannoz gibi monosakkaritlerin kaynak materyalleridir; bu maddelerin bitki ve hayvan dokularından laboratuvar ortamında ekstraksiyonu ve kimyasal sentezi zor ve pahalıdır (Kumar ve ark., 2007).

1.4.3. Ekzopolisakkaritlerin yapısı

LAB 'leri tarafından sentezlenen EPS, kimyasal kompozisyon, yapı ve moleküler ağırlık bakımından büyük ölçüde değişkenlik göstermektedir (Werning

ve ark., 2012). EPS, şeker ya da şeker türevlerinden oluşan uzun zincirli polisakkaritlerdir. Bu yapı içerisinde, başlıca glukoz, galaktoz, mannoz, N – asetil glukozamin, N – asetil galaktozamin ve ramnoz gibi şekerler farklı oranlarda yer almaktadır (Looijesteijn ve ark., 2001). Kimyasal kompozisyonuna göre EPS, heteropolisakkaritler (HePS) ve homopolisakkaritler (HoPS) olarak sınıflandırılmaktadır. Homopolisakkarit EPS'ler sadece monosakkaritten oluşmaktadır: D - glucopyranose (glukanlar) ya da D – fructopyranose (fruktanlar). Fruktanlar da yapılarına göre inülinler (β -2,1 bağlı) ve levanlar (β -2,6 bağlı) olmak üzere 2 grupta incelenmektedir. Bu maddeler başlıca *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Weissella* cinsleri tarafından sentezlenmektedir (Ruas-Madiedo ve ark., 2002; Werning ve ark., 2012).

1.4.4. Ekzopolisakkaritlerin fonksiyonları

EPS, biyolojik ve terapötik aktivitelere sahip, önemli ekstraselüler biyoaktif moleküllerdir (Liu ve ark., 2011a). Bu moleküllerin fizyolojik rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. EPS, hücre tanınması ve etkileşimi, yüzeylere yapışma, ve biyofilm oluşumu gibi fonksiyonlara sahiptir (Werning ve ark., 2012). Ayrıca, kuruma, fagositoz, protozoa ve faj saldırısı, antibiyotik, toksik bileşikler ve ozmotik stres gibi çevresel etkenlere karşı da hücreyi korumaktadır (Ruas-Madiedo ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2013). EPS, katı yüzeylere yapışma tutunmada da önemli bir rol oynamaktadır (Patel ve ark., 2012).

Probiyotik bakterilerden izole edilen EPS'nin kolera toksininin nötralizasyonunu sağlamanın yanında, antitümöral ve antibiyofilm aktivitelerine de sahip olduğu ortaya konmuştur (Kim ve ark., 2010). Ayrıca antioksidan ve immünomodülatör etkilere de sahiptir (Ooi ve Liu, 2000; Liu ve ark., 2010). Bunun yanında antiviral, antibakteriyal ve antifungal özellikler sergilemektedir (Chen ve ark., 2012). EPS'nin ülseri engelleyici ve kolesterol düşürücü etkileri de bulunmaktadır (De Vuyst ve Degeest, 1999; Ruas-Madiedo ve ark., 2002). EPS'nin diğer fizyolojik yararlı etkisi ise gastrointestinal bölgedeki probiyotik kolonizasyonunun arttırılmasında rol oynamasıdır (Looijesteijn ve ark., 2001).

İntestinal *Lactobacilli* ve bifidobakteriler tarafından üretilen EPS'nin intestinal mukusa yapışma ve de enteropatojenlerle etkileşim gibi fonksiyonlarının var olduğu öne sürülmüştür (Ruas-Madiedo ve ark., 2006). *Lactobacillus* 'lardan

izole edilen EPS'nin bakteriyal toksin ve enteropatojenlerin toksik etkilerini etkisiz hale getirebildikleri gösterilmiştir (Lopez ve ark., 2012).

EPS'nin belli tipleri, kolon kanseri tedavisinde, kolon mikroflorası için bir substrat gibi görev alan, kaplama ve matriks ajanı olarak kullanılmaktadır. LAB'lerinden elde edilen bazı EPS türevleri, T ve B lenfositlerinin proliferasyonu, makrofaj aktivasyonu ve sitokin üretiminin indüklenmesi gibi fonksiyonlara sahiptir (Mozzi ve ark., 2009; Patel ve ark., 2012). Ayrıca LAB ekzopolisakkaritleri, dendritik hücreler gibi antijen sunan hücreleri stimüle etmektedir (Liu ve ark., 2011a). *L. lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495'in ekzopolisakkaritinin, farelerde spesifik antikör üretimini arttırdığı ortaya konmuştur (Ruas-Madiedo ve ark., 2002).

Looijesteijn ve arkadaşları (2001), *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ4010 tarafından üretilen EPS'nin, bakteriyofajlar, metal iyonları, nisin ve lizozim gibi çeşitli antimikrobiyal faktörlere karşı olduğunu ortaya koymuştur.

1.4.5. Ekzopolisakkaritlerin kullanım alanları

Lactobacilli, fermente gıda endüstrisinde hijyenik güvenilirlik, saklama stabilitesinin korunması ve tad özelliklerinin artırılması amacıyla probiyotik olarak kullanılmaktadır. Bu bakteriler fermantasyon işleminde starter (başlangıç) kültürü olarak kullanılıp, işlem boyunca ürün elde edilinceye kadar optimal dengenin korunmasını sağlar. Ayrıca, bu bakteriler son zamanlarda probiyotik olarak vajinada kullanılacak aday mikroorganizma olarak desteklenmiştir (Ocana ve Nader – Macias, 2002; Liu ve ark., 2011a).

Laktik asit bakterilerinden elde edilen ekzopolisakkaritler son yıllarda endüstriyel alanda da büyük öneme sahiptir (Patel ve ark., 2012). EPS üreten suşlar, endüstride biyolojik stabilizatör, emülgatör, viskoz arttırıcı ve jelleştirici ajan olarak kullanılmaktadır (Ruas – Madiedo ve ark., 2010).

LAB'leri gıdalarda kullanılabilen GRAS (generally recognised as safe = genellikle güvenilir olarak tanımlanan) bakteriler olup, bu bakterilerin ekzopolisakkaritleri de gıdalara eklenmektedir (Ruas-Madiedo ve ark., 2008; Badel ve ark., 2011). Üretim maliyetini düşürmesi ve de kolay izolasyonu sebebiyle EPS'nin gıda katkı maddesi olarak kullanılması avantaj sağlamaktadır. LAB'leri

tarafından *in situ* olarak üretilen EPS, bitkilerden ya da GRAS olmayan bakterilerden üretilen biyopolimerlerin kullanımına bir alternatif olabilmektedir (Werning ve ark., 2012).

LAB'lerinden elde edilen EPS, gıda katkı maddesi ya da fonksiyonel gıda içeriği olarak da kullanılarak ekonomiye katkı sunmaktadır (Zhang ve ark., 2013). EPS'nin yararı, molekül ağırlığına, monosakkarit kompozisyonuna ve bunların bağlanma şekillerine bağlıdır (Iliev ve ark., 2006).

EPS üreten LAB'leri gıda endüstrisinde fermente ve fonksiyonel gıdaların tad, tekstür gibi reolojik özelliklerinin geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Bu polisakkarit yapılar gıdalara eklendiğinde, gıdaya kıvamlaştırıcı, dengeleyici, emülsiyonlaştırıcı ve jelleştirici özellik kazandırmaktadır (Werning ve ark., 2012).

3 bakteriyel polimer (ksantan, jellan ve kurdlan) gıda endüstrisinde gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında, bakteriyel selüloz kozmetik endüstrisinde medikal uygulamalarda kullanılmak üzere yapay deri üretiminde ve ayrıca emülsiyonların stabilizörü olarak da kullanılmaktadır. Bakteriyel selülozun gerilme gücünün, bitkisel kaynaklı selülozdan daha yüksek olması sebebiyle de önem arz etmektedir (Badel ve ark., 2011).

EPS gıda endüstrisinde, yoğurt, peynir, acidophilus sütü, krema, ayran ve sütlü tatlılarda kullanılmaktadır (Duboc ve Mollet, 2001; Doleyses ve ark., 2005). Ayrıca düşük kalorili ürünlerde yağ yerine geçici olarak da kullanılabilir (Hongpattarakere ve ark., 2011). İskandinav ülkelerinde viili ve langmjolk, aynı zamanda kefir, yoğurt, düşük yağlı mozzarella ve cheddar peyniri gibi ürünlere de katılmaktadır (Werning ve ark., 2012). Viili, *Lactococcus*'un EPS üreten suşları tarafından üretilen günlük bir içecektir (Ruas – Madiedo ve ark., 2002). Ayrıca fırınlarda ekşi hamur üretiminde *Lactobacillus* ya da *Weissella* suşları tarafından *in situ* şekilde üretilen glukoz ya da fruktanlar kullanılmaktadır (Tieking ve ark., 2003).

Yoğurt, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* gibi EPS üreten kültürlerin (sırasıyla 60 – 150 mg ve 30 – 890 mg/L heteropolisakkarit) fermantasyonundan elde edilen en iyi bilinen EPS ürünüdür. (Marshall ve Rawson, 1999). Yine, *L. lactis* subsp. *cremoris*, özel reolojik özellikleri nedeniyle endüstride

yoğurt üretiminde kullanılmaktadır (Nwodo ve ark., 2012). Yine *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, yoğurtlara viskozitenin artırılması amacıyla endüstride başlangıç kültürü olarak kullanılmaktadır (Looijesteijn ve ark., 2001; Ruas- Madiedo ve ark., 2002).

Saf EPS'nin rolü çalışılmamış olmasına rağmen, yapılan çalışmalar sonrasında EPS'nin kazeinle etkileşimi sonucu tekstürteyi sağladığı kararına varılmıştır. *In situ* EPS üretiminin diğer önemli bir örneği ise kefirdir. Kefir, Doğu Avrupa'da çok önemli bir içecek olup, farklı bakteri ve maya türleri tarafından üretilen fermente bir süt ürünüdür (Pelinescu ve ark., 2011).

Yine, *Lactobacillus helveticus*'un birkaç suşunun ekzopolisakkariti, mozzarella peynirinin üretiminde kullanılmaktadır (Jolly ve ark., 2002). Ayrıca mikrobiyal polisakkaritler son dönemde biyotopaklaştırıcı (biofluccant), biyoabsorban, ağır metal kaldırıcı ajan, ilaç salınım ajanı gibi amaçlarla da kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2008).

1.4.6. Ekzopolisakkarit üreten laktik asit bakterileri

Birçok LAB'sinin EPS ürettiği bilinmektedir. Heteropolisakkarit üreten LAB'leri çoğunlukla *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Lactococcus* cinsine aittir (Jolly ve ark., 2002).

Lactobacilli 'nin yaklaşık 30 türü EPS üretici olarak tanımlanmıştır. Bunlar arasında en iyi bilinenleri; *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* ve *L. johnsonii*'dir (Badel ve ark., 2011).

1.4.7. Ekzopolisakkarit miktarını etkileyen faktörler

Üretilen EPS miktarı, bakteri türüne göre değişkenlik göstermektedir. Ancak, pH, sıcaklık, inkübasyon süresi ve besiyeri kompozisyonu (karbon, azot ve katyon kaynakları) gibi fizikokimyasal faktörler de ürün eldesinde önemli bir rol oynamaktadır (Heumann ve ark., 1994; Degeest ve ark., 2008). Ayrıca EPS üretimi, bakteriyal gelişim fazına da bağlıdır (Petry ve ark., 2000). Kültür ortamındaki EPS miktarı, durgun fazın sonunda maksimuma ulaşmakta (32 saat) ve ölüm fazının başında azalmaya başlamaktadır (Zhang ve ark., 2013).

Pektaş (2014), süt ve süt ürünlerinden izole ettiği LAB'lerinin EPS üretim miktarlarının 46.65 mg/L - 53.17 mg/L arasında değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Ancak, fermente sütün viskozitesi ile EPS konsantrasyonu arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır. Van Marle ve Zoon (1995), kıvamsız (non-ropy) LL kültürüyle, kıvamlı (ropy) RR kültürünün yaklaşık aynı miktarda (sırasıyla 90 mg/mL, 101 mg/mL) polimer ürettiğini ortaya koymuştur (Van Marle ve Zoon, 1995).

1.5. Laktik Asit Bakterilerinin Ve Bunlara Ait Ekzopolisakkaritlerin Antitümöral Etkileri

Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalardan elde edilen veriler LAB suşlarının ya da fermente günlük ürünlerin alınmasının, belli kanser tiplerinin riskini azaltabileceğini ve tümörün gelişimini inhibe edebileceğini ortaya çıkarmaktadır. Ancak LAB'lerinin göstermiş olduğu antikanser etkilerin mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Choi ve ark., 2006).

Pekçok kanser terapi ajanı, normal hücre ve dokulara toksik etkiler göstermesi sebebiyle sınırlı kullanıma sahiptir (Damia ve Brogini, 2004). *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* ve *Bifidobacterium* gibi çeşitli LAB suşlarının hücre duvarı peptidoglukanının ya da membran komponentlerinin antikanser aktiviteleri değerlendirilmiştir. (Fichera ve Giese 1994; Lee ve ark., 2004).

L. casei'nin sitoplazmik ekstraktının *in vivo* antikanser etkiler sergilediği gösterilmiştir (Lee ve ark., 2004). Ayrıca Orlando ve arkadaşları (2009), *Lactobacillus* homojenatlarının, kolon kanser hücre hattında antiproliferatif etkiler sergilediğini göstermiştir. Yine, Er ve arkadaşları (2015) da, et ürünlerinden izole edilen LAB'lerinin hücre dışı filtratının Caco – 2 kolon kanser hücre hattına karşı sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

Kitazawa ve arkadaşları (1991), *L. lactis* subsp. *cremoris* KVS 20 liyofilizatının, farelerde Sarcoma – 180 kanser gelişimini inhibe ettiğini; ancak *in vitro* sitotoksik etki göstermediğini ortaya koymuştur.

Son zamanlarda ise laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin de antitümöral aktivitelerine dikkat çekilmektedir (Arena ve ark., 2006; De Stefano

Tommonaro ve ark., 2007). Yapılan birkaç çalışmada bakteriyal EPS'nin tümör proliferasyonunu azalttığı desteklenmiştir (Lopez ve ark., 2012). Bu konuda *in vivo* oral yolla EPS alımıyla yapılan deney az sayıdadır. Yapılan bir çalışmada kefirden elde edilen suda çözünebilir EPS (KGF – C)'nin oral olarak alındığında tümör gelişimini yavaşlattığı gösterilmiştir (Ruas – Madieto ve ark., 2002).

Yoğurt üretiminde başlangıç kültürü olarak kullanılan *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073R-1 ekzopolisakkaritinin, konak aracılı antitümör aktivite sergilediği ortaya konmuştur. (Kitazawa ve ark., 1998).

Ayrıca, Choi ve arkadaşları (2006), *L. acidophilus*'un çözünebilir polisakkaritlerinin, bazı tümör hücre hatlarında apoptozu indüklediğini ortaya koymuştur. Kim ve arkadaşları (2010), *L. acidophilus* polisakkaritlerinin *in vitro* ortamda tümör hücrelerinde inhibitör etki sergilediğini ortaya koymuştur.

Yine, EPS üreten ve yoğurt başlangıç kültürü olarak kullanılan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073R-1'in konak-aracılı antitümör aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Kitazawa ve ark., 1998). *Lactobacillus casei* 01 EPS'sinin, HT-29 kolon kanser hücrelerinin canlılığını inhibe ettiği rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2011b). Ayrıca, Lopez ve arkadaşları (2012), pek çok *Bifidobacterium* suşunun EPS'sinin kolon kanser hücresi olan HT-29 hücre sayısını anlamlı şekilde azalttığı sonucuna varmışlardır.

1.6. Kanser

Normal vücut hücreleri büyür, bölünür ve sonunda ölür. Yaşamın ilk yıllarında, hücre bölünmesi çok hızlı olmasına karşın yetişkinlikten sonra hücrelerin bölünme hızı giderek yavaşlamaktadır. Dokulardaki normal hücreler, yıpranmış veya yaşam faaliyetini yitirmiş hücrelerin yerini doldurmak için bölünmekte, gelişmekte ve böylece doku bütünlüğü korunmaktadır. Kanserli hücrelerde böyle kontrollü bir bölünmeden ve doku bütünlüğünden bahsetmek mümkün değildir (Çelik, 2011).

Kanserin kökeni, hangi dokudan tüvelendiğine bağlıdır. Kanser hücrelerinin yaklaşık % 85'i epitel hücrelerinden oluşmakta ve karsinoma olarak sınıflandırılmaktadır. Mezoderm hücrelerinden (kemik, kas hücreleri) tüvelenenler

sarkoma olarak sınıflandırılırken, bezsel dokulardan türevlenenler ise adenokarsinoma olarak isimlendirilmektedir (Güney, 2011).

1.6.1. Rahim ağzı kanseri

Rahim ağzı kanseri, dünya çapında insidans ve mortalite bakımından göğüs, kolorektal ve akciğer kanserinden sonra 4. en yaygın görülen kanser olup, yıllık 265.700 ölümlerle sonuçlanmaktadır (Torre ve ark., 2012). Rahim ağzı kanserinin nedeni genellikle, insan papilloma virüsüdür (HPV) ve bu virüsün şimdiye kadar tanımlanmış 100 farklı türü olduğu bilinmektedir. Bu türlerin çoğu düşük risk içermektedir. Ancak, yüksek riskli türleri rahim ağzı kanserine yol açabilen, anormal hücrelerin gelişmesine neden olabilmektedir. Rahim ağzı kanseri vakalarının çoğuna iki tür HPV (HPV 16 ve 18) sebep olmaktadır. Rahim ağzı kanseri olgularının yaklaşık % 70'inde bu iki virüs türü bulunmuştur (Önder, 2013).

Rahim ağzı kanserinin mortalitesi, insidansından önemli ölçüde daha düşüktür; dünya çapındaki mortalitesinin insidansına oranı % 55'tir (Kyriquo ve ark., 2014). Rahim ağzı kanserinden hastanın hayatta kalması çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu faktörlerden en önemlilerinden biri de hastalığın tanısının konduğu safhadır. Safha I için 5 yıllık tahmin edilen hayatta kalma oranı % 84 – 93 arasında, safha II için % 73 – 75, safha III için % 59 – 68 ve safha IV için % 35'tir (Miglierini ve ark., 2014).

Rahim ağzı kanserinde skuamöz hücre karsinomları % 90 gibi büyük çoğunluğu oluşturmaktadır; kalan % 10'luk kısmı adenokarsinomlar oluşturmaktadır. Ancak son yıllarda adenokarsinomların insidansı giderek artmaktadır (Guitarte ve ark., 2014).

Rahim ağzı kanserinin oluşumundaki en büyük faktör; cinsel aktivitedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, evlilik, bozulmuş evlilik, çoklu evlilik, evlilik dışı cinsel birliktelik, evlilik öncesi cinsel birliktelik, erken yaşta yapılan evlilik, erken yaşta yaşanan cinsel birliktelik, gayrimeşruluk, çoklu cinsel partnerlik, kişinin fuhuş ve sifiliz geçmişinin olması, düşük sosyoekonomik statü gibi faktörlerin de rahim ağzı kanserini arttıran faktörlerden olduğunu göstermiştir (Beral, 2015).

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Vajina örneklerinin temini ve laboratuvara getirilmesi

İstanbul Medipol Üniversitesi Hastanesi Kadın Doğum Kliniği'nde hekim aracılığıyla 20-40 yaş aralığındaki sağlıklı 30 kadından eküvyonla örnek alınmış ve alınan vajen örnekleri soğuk zincir aracılığıyla hemen laboratuvara getirilerek ekimleri yapılmıştır. Çalışmamızın etik kurul kararı, 11/04/2013 tarihinde 38 numaralı karar numarasıyla İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

2.1.2. Hücre hatları

Bu çalışmada Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvar'ına ait hücre stokları kullanılmıştır. HeLa (insan serviks kanser hücresi) ve HUVEC (insan göbek kordonu endotel hücresi) hücre hatları sıvı azottan çıkarılarak çalışmalara alınmıştır.

2.1.3. Besi ortamları ve kimyasallar

2.1.3.1. MRS agar (Merck)

Diamonyum hidrojen sitrat	2 g
Dipotasyum hidrojen fosfat	2 g
Glukoz	20 g
Magnezyum sülfat	0,2 g
Mangan sülfat	0,04 g
Et ekstraktı	8 g
Pepton	10 g
Sodyum asetat	5 g
Maya ekstraktı	4 g

Tween 80	1 mL
Agar	14 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 5,4± 0,2' ye ayarlanmış ve 121 ° C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.2. M17 agar (Difco)

Kazein	5 g
Soya peptonu	5 g
Et ekstraktı	5 g
Maya ekstraktı	2,5 g
Askorbik asit	0,5 g
Magnezyum sülfat	0,25 g
Disodyum-β-gliserofosfat	19 g
Agar	11 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 5,4± 0,2' ye ayarlanmış ve 121 ° C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.3. Hareketlilik nitrat ortamı

Et ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
Sodyum nitrat	1 g
Gliserol	5 mL
Galaktoz	5 g

Agar	3 g
Distile su	995 mL

Besiyeri içeriği, distile suda çözülecek, ısıtılmış ve pH 7,0±0,2'ye ayarlandıktan sonra, tüplere aktanlarak, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak kullanılmıştır.

2.1.3.4. MRS agar % 6,0 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan MRS agar (Merck) ortamı içerisine 60g/1000 mL olacak şekilde sodyum klorür ilavesi yapılmış, içerik distile suda çözüldükten sonra 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.5. MRS agar %7,5 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan MRS agar (Merck) ortam içeriğine 75g / 1000 mL olacak şekilde sodyum klorür ilavesi yapılmış, içerik distile suda çözüldükten sonra 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.6. MRS agar %10 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilmiş olan MRS agar (Merck) ortamı içerisine 100g/1000 mL olacak şekilde tuz ilavesi yapılmış, içerik distile suda çözüldükten sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.7. Üç şekerli demirli (TSI) agar (Merck)

Pepton (kazeinden)	15 g
Pepton (etten)	5 g
Et ekstraktı	3 g
Maya ekstraktı	3 g
Sodyum klorür	5 g
Laktoz	10 g
Sukroz	10 g

D (+) Glukoz	1 g
Demir (III) amonyum sitrat	0,5 g
Sodyum tiyosülfat	0,5 g
Fenol kırmızısı	0,024 g
Agar	12 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $7,4 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış, içeriğin tam olarak homojen hale getirilmesi için besiyeri kaynatılmış ve test tüplerine 15 mL koyularak $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan tüpler eğimli bir zemin üzerine yatırılarak dondurulmuş ve yatık agar şeklinde kullanılmıştır.

2.1.3.8. Arjinin dihidrolaz broth (D2935, Fluka)

Pepton	1 g
Sodyum klorür	5 g
Potasyum hidrojen fosfat	0,3 g
Fenol red	0,01 g
L-arjinin HCl	10 g

Besiyeri içeriği distile su ile 1000 mL'ye tamamlanıp çözüldükten sonra, pH $7,4 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.9. Beyin kalp infüzyon (BHI) agar (Merck)

Sığır kalbi	5 g
Dana beyni	12,5 g
Di sodyum hidrojen fosfat	2,5 g
D-(+) Glukoz	2 g

Pepton	10 g
Sodyum klorür	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $7,4 \pm 0,2$ ' ye ayarlanmış ve 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.10. Nutrient agar (Merck)

Et ekstraktı	3 g
Pepton	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $6,8 \pm 0,2$ ' ye ayarlanmış ve 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.11. Endo agar (Merck)

Pepton	10 g
K_2HPO_4	2,5 g
Laktoz	10 g
Na_2SO_3 (susuz)	3,3 g
Fuksin	0,3 g
Agar	12,5 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $7,4 \pm 0,2$ ' ye ayarlanmış ve 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.12. Beyin kalp infüzyon (BHI) broth (Merck)

Sığır kalbi	5 g
Dana beyni	12,5 g
Di sodyum hidrojen fosfat	2,5 g
D-(+) Glukoz	2 g
Pepton	10 g
Sodyum klorür	5 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 7,4± 0,2'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.13. Patates dekstroz broth (PDB) (Merck)

Patates ekstraktı	4 g
D-(+) Glukoz	20 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.14. Patates dekstroz agar (PDA) (Merck)

Patates ekstraktı	4 g
D-(+) Glukoz	20 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.15. Tween 80 agarlı besiyeri

Pepton	10 g/L
NaCl	5 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 g/L
Tween 80	10 mL
Agar	20 g/L

Besiyeri içeriği distile su ile 1000 mL'ye tamamlanıp çözüldükten sonra, pH 6,0'a ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.16. Egg yolk besiyeri

Saboroud dekstrozu agar	65 g/L
NaCl	58,4 g/L
CaCl ₂	5,5 g/L
Egg yolk tellurit solüsyonu	0,2 mL/L

Besiyeri içeriği distile su ile 1000 mL'ye tamamlanıp çözüldükten sonra, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.17. Mueller hinton agar (MHA) (Merck)

Sığır eti-kalp ekstraktı	4 g
Kazein hidrolizat	17,5 g
Nisasta	1,5 g
Agar	17 g
Distile su	1000 mM

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 6,8 ± 0,2'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.18. MRS broth (Merck)

Dipotasyum hidrojen fosfat	2 g
Glukoz	20 g
Magnezyum sülfat heptahidrat	0,2 g
Mangan sülfat tetrahidrat	0,05 g
Et ekstraktı	8 g
Pepton	10 g
Sodyum asetat trihidrat	5 g
Triamonyum sitrat	2 g
Yeast ekstraktı	5 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $6,2 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmış, 1 mL Tween 80 eklenmiş ve 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.19. M17 broth (Difco)

Kazein	5 g
Soya peptonu	5 g
Et ekstraktı	5 g
Maya ekstraktı	2,5 g
Askorbik asit	0,5 g
Magnezyum sülfat	0,25 g
Disodyum- β -gliserofosfat	19 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 5,4± 0,2'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.20. Mueller hinton yumuşak agar

Sığır eti-kalp ekstraktı	4 g
Kazein hidrolizat	17,5 g
Nisasta	1,5 g
Agar	7 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 6,8 ± 0,2'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.21. Patates dekstrozu yumuşak agar

Patates ekstraktı	4 g
D-(+) Glukoz	20 g
Agar	7 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.3.22. Mikrobiyoloji deneylerinde kullanılan diğer kimyasallar ve besi ortamları

Glukoz (Merck), NaCl (Merck), HCl (Merck), NaOH (Merck), glasiyal asetik asit (Merck), fenol fitalein indikatörü (Merck), kristal viyole (Merck), lugol (Merck), etil alkol (Merck), bazik fuksin (Merck), trikloroasetik asit (Sigma), hidrojen peroksit (Merck), safra tuzu (Sigma), kanlı agar, çikolata agar, oksidaz kitleri (Merck), anaerob ortam kiti (Merck), API CHL 50 kitleri (BioMerieux) sistemi, oksidaz kitleri (Merck), tirozin (Sigma), katalaz (Sigma), proteinaz K

(Sigma), n-hexadecane (Merck), Sodyum fosfat (Merck), GeneJET genomik DNA saflaştırma kiti (ThermoFischer Scientific).

2.1.3.23. Hücre kültüründe kullanılan diğer kimyasallar ve besi ortamları

DMEM F12 (Sigma), Ham's F12 (Sigma), Penisilin-Streptomisin (Gibco), Tripsin-EDTA solüsyonu (Gibco), endothelial cell growth supplement (Sigma), heparin (Sigma), Sodyum bikarbonat (Sigma), Dimethyl sulfoxide (Sigma), KCl (Sigma), NaCl (Merck), KH_2PO_4 (Merck), Na_2HPO_4 (Merck), EDTA (Merck), MTT (Sigma), Sıvı azot.

2.1.4. Kullanılan çözeltiler

2.1.4.1. %20'lik gliserol çözeltisi

Gliserol	20 mL
Distile su	80 mL

Gliserol ve distile su karıştırılıp 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

2.1.4.2. %15'lik gliserol çözeltisi

Gliserol	15 mL
Distile su	85 mL

Gliserol ve distile su karıştırılıp 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

2.1.4.3. Fosfat buffer saline (PBS)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na_2HPO_4	1,44 g
KH_2PO_4	0,24 g
Distile su	1000 mL

PBS hazırlandıktan sonra, 50°C'de 30 dakika karıştırılıp, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

2.1.4.4. Fizyolojik tuzlu su

Sodyum klorür	85 g
Distile su	1000 mL

Fizyolojik tuzlu su çözeltisi sodyum klorür distile su içerisinde çözülerek kullanılmıştır.

2.1.4.5. Hidrojen peroksit tespiti için standart çözelti

0,1 mL saf (% 35) hidrojen peroksit alınıp distile su ilavesi ile 30 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 1 mL başka bir erlene alınmış ve tekrar distile su ile 30 mL'ye tamamlanmıştır.

2.1.4.6. 0,1M Sodyum hidroksit çözeltisi

Sodyum hidroksit	4 g
Distile su	100 mL

Çözelti, sodyum hidroksitin distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Molaritesi, ayarlı hidroklorik asitle ayarlanmıştır.

2.1.4.7. 1N H₂SO₄ çözeltisi

Sülfürik asit	1,67 mL
Distile su	100 mL

Saf sülfürik asitten distile su ilavesi ile 1N olacak şekilde çözelti hazırlanmıştır.

2.1.4.8. Amonyum molibden çözeltisi

Amonyum molibden	0,12 g
Distile su	100 mL

Çözelti amonyum molibden ((NH₄)₆Mo₇O₂₄) distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

2.1.4.9. Potasyum iyodür çözeltisi

Potasyum iyodür 16,6 g

Distile su 100 mL

Çözelti, potasyum iyodürün (KI) distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

2.1.4.10. Proteolitik aktivite tayini için standart çözelti

Proteolitik aktivite tayini için kullanılacak olan standart eğri için sırasıyla 0,02, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 mg tirozin /mL olacak şekilde tirozin standart çözeltisini hazırlanmış ve 5 ml' lik MRS broth ortamı içeren tüplere ilave yapılmıştır.

2.1.4.11. 0,72 N Trikloroasetik asit çözeltisi

Trikloroasetik asit 118 g

Distile su 1000 mL

Trikloroasetik asit (TCA) distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile çözülerek kullanılmıştır.

2.1.4.12. Na₂CO₃.Na₄P₂O₇ çözeltisi

Sodyum bikarbonat 150 g

Sodyum difosfat 20 g

Distile su 1000 mL

Sodyum bikarbonat (Na₂CO₃) ve sodyum di fosfat (Na₄P₂O₇) uygun miktarlarda karıştırıldıktan sonra distile su içinde çözülerek kullanılmıştır.

2.1.4.13. Fenol ayırıcı

Folin ciocalteus çözeltisi 50 mL

Distile su 100 mL

Proteolitik aktivite tayini için Folin Ciocalteus çözeltisinin 1:2 oranında distile su ile karıştırılmasıyla fenol ayracı hazırlanmıştır. Bu çözelti kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanmalıdır. Stok solüsyonu hazırlanmamalıdır.

2.1.4.14. 0,05 M K₂HPO₄ tamponu (pH 6,5)

K ₂ HPO ₄	0,096 g
Distile su	10 mL

Dipotasyum fosfat (K₂HPO₄), distile su içerisinde çözüldükten sonra pH 6,5'e ayarlanmıştır. Tampon çözelti +4 °C' de buzdolabı koşullarında saklanmıştır.

2.1.4.15. PBS EDTA

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
EDTA	0,372 g
Distile su	1000 mL

PBS EDTA hazırlandıktan sonra, 50°C'de 30 dakika karıştırılıp, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

2.1.4.16. 1xTripsin EDTA

Tripsin EDTA solüsyonu	5 mL
PBS EDTA	5 mL

Tripsin ve PBS EDTA steril bir falkonda karıştırıldıktan sonra kullanılmıştır.

2.1.5. Kullanılan antibiyotikler

Ampisilin (AM 10 µg/disk BBL)

Eritromisin (E 15 µg/disk BBL)
Gentamisin (GM 10 µg/disk BBL)
Klindamisin (CC 2 µg/disk BBL)
Metisilin (M 5 mcg/disk HIMEDIA)
Metronidazol (MET 80 µg/disk BD)
Okzasilin (OX 1 µg/disk BBL)
Penisilin (P 10 IU/disk BBL)
Sefalotin (CF 30 µg/disk BBL)
Sülfometoksazol + trimetoprim (SXT 23,75 µg + 1,25 µg/disk BBL)
Tetrasiklin (Te 30 µg/disk BBL)
Vankomisin (VA 30 µg/disk BBL)

2.2. Yöntem

2.2.1. Vajinadan alınan örneklerden mikroorganizmaların izolasyonu

Laboratuvara getirilen vajina örneklerinin, kanlı agar, çikolata agar, beyin kalp infüzyon agar (BHI agar), potato dekstroz agar (PDA), saboroud dekstroz agar (SDA), Endo agar, MRS agar ve M17 agara ekimleri yapılmıştır. Her bir besiyerinden 2 petri kutusuna ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petrilere biri aerob koşullarda 37°C’de 48 - 72 sa inkübe edilmiştir. Diğerleri ise; anaerobik jar içinde 37°C’ de 48 - 72 sa inkübe edilmiştir. Küf ve maya üremesi için PDA ve SDA petrilere 30 °C’ de 5 gün inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrası petrilere gelişen koloniler incelenmiştir. Üreme görülen petrilere morfolojik olarak birbirinden farklılık gösteren 10 koloni seçilip, saf kültür elde etmek amacıyla tek koloni ekimi ile aynı besiyerini içeren yeni bir petriye ekilerek uygun koşullarda inkübe edilmiştir. Saf olan kültürler stoklanmıştır. MRS VE M17 agardan izole edilenler % 20, diğerleri ise % 15

gliserol içeren ependorfa alınmış ve - 85°C’de stoklanmıştır. Karışık olan kültürlerden tekrar örnek alınarak saflaştırılmıştır.

2.2.2. İzole edilen mikroorganizmaların tanımlanmaları

İzole edilen mikroorganizmaların, öncelikle gram boyamaları ve katalaz testleri yapılmıştır. Gram pozitif, katalaz negatif bakteri izolatları, laktik asit bakterisi olarak ayrılmış ve bu izolatlara oksidaz, hareketlilik testleri, farklı sıcaklıklarda gelişim, farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim, farklı pH’larda gelişim, H₂S oluşumu, arjininden amonyak oluşumu, biyofilm oluşumlarına bakılmıştır. Gram pozitif, katalaz pozitif bakterilerin ise biyofilm oluşumlarına bakılmıştır. Ayrıca izole edilen maya izolatlarına ise lipolitik ve fosfolipaz enzim aktivite testleri, biyofilm oluşumu ve hemolitik aktivite testleri yapılmıştır.

2.2.2.1. Gram boyama

Gram boyama, bakterilerin hücre duvar yapılarının farklı olması temeline dayanarak, bakterileri Gram pozitif ve Gram negatif olarak sınıflandırabilmemizi sağlayan bir boyama yöntemidir.

Boyama işleminin yapılabilmesi amacıyla, izolatlar hangi besiyerinden izole edildiyse o besiyerinde çoğaltılmış ve boyamada 18 – 24 saatlik taze kültürler kullanılmıştır. İlk önce preparat hazırlanmıştır. Temiz bir lam yüzeyine 1 damla distile su konmuştur. Katı besiyerinde çoğaltılan mikroorganizma örneğinden öze yardımıyla bir miktar alınıp, distile su içerisinde dağıtılıp, havada kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparat ateşten 2 – 3 kez geçirildikten sonra boyama işlemine geçilmiştir. İlk olarak preparat üzerine kristal viyole damlatılıp 1 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda lam distile suyla yıkanıp, üzerine lugol damlatılıp yine 1 dakika bekletilmiştir. Sonrasında yine preparat suyla yıkanıp, üzerine alkol döküp, dekolorizasyon işlemine geçilmiştir. Burada preparat 10-15 saniye % 95 ‘lik alkol ile muamele edildikten sonra preparat suyla yıkanıp üzerine bazik fuksin boyası damlatılmıştır ve 30 saniye bekletilmiştir. Süre sonunda preparat suyla yıkanıp, kurutma kağıdıyla kurutularak mikroskopta incelenmiştir. Gram pozitif kontrol örneği olarak *Staphylococcus aureus*, Gram negatif örneği olarak da *Escherichia coli* bakterisi kullanılmıştır. Preparatlar ışık mikroskobunda (Leica

DM500) immersiyon yağı kullanılarak 100'lük objektifte mevcut renk ve bakteri morfolojileri incelenmiştir. İnceleme sonrasında mor renge boyanan bakteriler Gram pozitif, pembe renge boyanan bakteriler ise Gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

2.2.2.2. Katalaz testi

Bakterilerde katalaz enziminin varlığının ya da yokluğunun araştırılmasını sağlayan katalaz testi, hidrojen peroksitin bu enzim yardımıyla su ve oksijene ayrılması temeline dayanmaktadır. Bu amaçla kültürler MRS agar ve M17 agarlı besiyerlerinde geliştirildikten sonra ve küçük bir kültür örneği lam yüzeyine alınıp üzerine % 3'lük H₂O₂ damlatılmıştır. *Staphylococcus aureus* test sırasında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Gaz çıkışının olduğu kültürler katalaz pozitif, gaz çıkışının olmadığı kültürler ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Akçelik ve ark., 2000).

2.2.2.3. Oksidaz testi

Oksidaz testi, bakterilerde oksidaz enziminin varlığının ya da yokluğunun araştırılması esasına dayanan bir testtir. Bu işlem için oksidaz kitleri (Merck) kullanılmıştır. Kit protokolüne göre, LAB kültürleri, MRS agar ve M17 agarda geliştirildikten sonra steril kürdan yardımıyla mikroorganizma örneği oksidaz striplerinin üzerine yayılmış ve 20 – 60 saniye beklenmiştir. Süre sonunda renk değişikliğine bağlı olarak yorum yapılmıştır. Mavi – mor rengin gözlenmesi oksidaz pozitif, rengin değişmemesi oksidaz negatif olarak yorumlanmıştır. *Staphylococcus aureus* test sırasında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

2.2.2.4. Hareketlilik testi

Hareketlilik testi, bakterilerin hareket yeteneğinin olup olmadığının ortaya çıkarılması amacıyla yapılan bir testtir. Bu amaçla bu testte hareketlilik nitrat ortamı kullanılmıştır. MRS agar ve M17 agarlı besiyerlerinde geliştirilen taze LAB kültürü örneğinden iğne uçlu öze yardımıyla örnek alınıp, dik dondurulmuş hareketlilik nitrat ortamı bulunan besiyerine batırma ekim tekniğiyle ekimi yapılmıştır. %5 CO₂ ortamında 37°C'de 48 sa inkübasyon sonrasında ekim

çevresindeki üremenin olup olmadığı ve de tüpün alt yüzeyinde ya da üst yüzeyinde var olan üreme gözlemlenip sonuçlar kaydedilmiştir (Banerjee ve Sarkar, 2003).

2.2.2.5. Farklı sıcaklıklarda gelişim

Elde edilen bakteri izolatlarının farklı sıcaklıklarda gelişimlerinin olup olmadığını belirlemek amacıyla canlandırılması yapılmış taze LAB kültür örneklerinden MRS agar ve M17 agara ekim yapılmıştır. Petriler 4°C, 15°C ve 45°C’de 2 – 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, petrilerde üreme olup olmadığı değerlendirilip, sonuçlar kaydedilmiştir (Holt ve ark., 2000).

2.2.2.6. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim

Elde edilen bakteri izolatlarının farklı tuz konsantrasyonlarında gelişimlerinin olup olmadığını belirlemek amacıyla 18 – 24 saatlik LAB kültür örneğinden %6, %7,5 ve %10 tuz içeren MRS agarlı besiyerine ekimleri yapılmıştır. Ekimleri yapılan petriler 2 – 7 gün süreyle %5 CO₂ ortamında 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, petrilerde üreme olup olmadığı değerlendirilip, sonuçlar kaydedilmiştir (Holt ve ark., 2000).

2.2.2.7. Farklı pH’larda gelişim

Bakteri izolatlarının yüksek asidik ya da yüksek bazik ortamda gelişip gelişmediğinin belirlenmesi amacıyla, 1M HCl ve 1M NaOH ile pH’sı 3,9 ve 9,6’ya ayarlanan MRS agarlı besiyerlerine, 18 – 24 saatlik LAB kültüründen, tüplere ekimleri yapılmıştır. Tüpler, %5 CO₂ ortamında 37°C’de 2 – 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında bulanıklık görülen kültürler pozitif, bulanıklık görülmeyen kültürler ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak ise ekim yapılmamış tüpler kullanılmıştır (Holt ve ark., 2000).

2.2.2.8. Hidrojen sülfür oluşumu

LAB izolatlarının, şekerleri fermantasyonu sonucu gaz ve hidrojen sülfür (H₂S) oluşumunu gözlemlemek amacıyla, üç şekerli (glukoz, laktoz, sükroz) – demirli (TSI) besiyeri kullanılmıştır. Bu amaçla MRS agar ve M17 agarda 48 saat

inkübasyona bırakılan kültür örneklerinden iğne uçlu öze yardımıyla örnek alınıp, TSI bulunan tüpün dibine batırma ekim tekniğiyle, kültürlerin ekimi yapılmıştır. %5 CO₂ ortamında 37°C'de 48 – 96 saat inkübasyon sonrasında, tüplerdeki gaz çıkışı ve renk değişimi gözlemlenmiştir. Bu testte pozitif kontrol olarak *Salmonella typhimurium* kültürü kullanılmıştır. Tüplerde siyah rengin oluşması ortamda H₂S varlığına işaret ettiği için, pozitif olarak yorumlanmıştır, tüpün dip kısmında besiyerinin yukarı doğru kalkması ise glukozdan gaz çıkışının olduğunu göstermektedir. Bu doğrultuda tüpler incelenmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir (Halkman, 2005).

2.2.2.9. Arjininden amonyak (NH₃) oluşumu

LAB izolatlarının arjininden amonyak oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi amacıyla MRS agar ve M17 agarlı besiyerlerinde geliştirilen bakteri kültürlerinden örnek alınıp, arjinin dihidrolaz brothlu besiyerlerine homojen süspansiyon ekim tekniğiyle ekimleri yapıp, tüplerin kapağı sıkıca katılmıştır. %5 CO₂ ortamında 37°C'de 7 – 9 gün inkübasyon sonrasında, tüplerdeki renk değişimleri gözlemlenmiştir. İnkübasyon sonrası tüpte, pembe renk gözlenmesi pozitif, sarı rengin gözlenmesi negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda izolatların tüplerde oluşturduğu renk değişimleri incelenip, sonuçlar kaydedilmiştir (Papamanoli ve ark., 2003).

2.2.2.10. İzolatların mikrotitre plaka yöntemi ile biyofilm oluşumlarının belirlenmesi biyofilm oluşumlarının belirlenmesi

İzolatların biyofilm oluşturma derecelerinin belirlenmesi amacıyla LAB izolatları, %2,5 glukoz içeren MRS broth ve M17 brothda, diğer bakteri izolatları, %2,5 glukoz içeren BHI brothda, maya izolatları ise, yine %2,5 glukoz içeren patates dekstroz brothda uygun koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, 200µL kültür örneği 96'lı plakaya ekilmiş 24 - 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası plakaların içi boşaltılıp her bir kuyu, 3 kez steril fizyolojik tuzlu su ile yıkanmıştır. Daha sonra kuyucuklar 200µL %99'luk metanol ile 15 dakika fikse edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklar boşaltılıp kurumaya bırakılmıştır. Sonrasında yine her bir kuyu, 200µL %2'lik kristal viyole ile 5 dakika

boyanmıştır. Süre bittiğinde kuyucuklar distile su ile yıkanıp, kurutulmuştur. Daha sonra yine kuyucuklar 160µL %33'lük glasiyel asetik asit ile stabilize edilip, ELISA cihazında 570 nm'de plaka okuması yapılmıştır ve herbir izolataın OD değeri kaydedilmiştir. Okuma sonucunda OD değerlerine göre ((OD570<0,120 (-), OD570<0,240 (+), OD570<0,500 (++) , OD570>0,500 (+++)) biyofilm oluşumu hakkında yorum yapılmıştır. Test 8 paralel, çift tekrarlı olarak yapılmıştır (Stepanovic, 2000).

2.2.2.11. Hemolitik aktivite tayini

Vajinadan izole edilen maya izolatlarının hemolitik aktivite varlığının belirlenmesi amacıyla, aktiveleştirilen kültürlerin kanlı agarlı besiyeri üzerine tek koloni ekim tekniğiyle ekimleri yapılmıştır ve uygun koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, koloni çevresine beta hemolitik aktivitenin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, ışığı geçiren şeffaf zon varlığı, alfa hemolitik aktivitenin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, koyu yeşil üreme varlığı, non - hemolitik aktivitenin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, zon oluşumunun olmaması, sadece üremenin olması gözlenmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir (Luo ve ark., 2001).

2.2.2.12. Lipolitik enzim aktivitesi

Maya izolatlarının lipolitik enzim aktivitelerinin ortaya konması amacıyla lipolitik enzim aktivite deneyi yapılmıştır. Bu amaçla, maya izolatları sabouraud dekstroz brothda 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası maya izolarının %0,85'lik fizyolojik tuzlu suda 10⁷ kob/mL olacak şekilde bulanıklık ayarlamaları yapılmıştır. Bulanıklığı ayarlanan maya izolatından, tween 80 agarlı besiyeri üzerine 5 µL damlatılmıştır. Petriler 37°C'de 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası koloni çevresindeki zon oluşumları gözlenmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir. Deney, çift paralel halinde yapılmıştır (Slifkin, 2000).

2.2.2.13. Fosfolipaz enzim aktivitesi

Maya izolatlarının fosfolipaz enzim aktivitelerinin ortaya konması amacıyla fosfolipaz enzim aktivite deneyi yapılmıştır. Bu amaçla, maya izolatları sabouraud

dekstroz brothda 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, egg yolk agarlı besiyeri üzerine maya izolatından 5 µL damlatılmıştır. Petriler 37°C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası koloni çevresindeki zon oluşumları gözlenmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir. Deney, çift paralel halinde yapılmıştır. Presipitasyon zonunun hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır (Borstt ve Fluit, 2003);

Koloni çapı

$$\text{Fosfolipaz aktivitesi (mm)} = \frac{\text{Koloni çapı}}{\text{Koloni çapı} + \text{Presipitasyon zonu}}$$

2.2.2.14. Laktik asit bakteri izolatlarının API CHL 50 ile karbonhidratları kullanma durumlarının belirlenmesi

API CHL 50 (bioMerieux) sistemi, karbonhidrat fermantasyonuna dayalı olarak, laktik asit bakterilerinin tür düzeyinde tanımlanmasını sağlayan bir testtir. Test, hazır olarak bulunan kitler aracılığıyla yönetici talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmekte ve mikroorganizmalar kullandıkları karbonhidrat kaynaklarına göre sınıflandırılmaktadır. API CHL 50 testinde gliserol, eritritol, D-arabinoz, L-arabinoz, riboz, D-ksiloz, L-ksiloz, adonitol, inositol, galaktoz, glukoz, fruktoz, mannoz, sorboz, ramnoz, dulcitol, salisin, sellobioz, maltoz, laktoz, melibioz, sukroz, trehaloz, inulin, melezitose, rafinoz, nisasta, glikojen, ksilitol, gentiobiose, D-turanoz, D-lyxose, D-tagatoz, eskulin, α-metil-D-mannosid, α-metil-Dglukozid, N-asetil-glukozamin, amigidalin, arbutin, D-arabitol, L-arabitol, glukonat, 2-keto-glukonat, 5-keto glukonat, mannitol, sorbitol, D-fukoz, L-fukoz, b-metil-D-ksilosid içeren kuyucuklara, mikroorganizma örneği ekilmektedir (Yiğit, 2009).

Bu amaçla, MRS agarlı besiyeri ortamında %5 CO₂ ortamında 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılan kültürlerden, eküvyon yardımıyla 2 mL'lik API süspansiyon ortamına aktarılmıştır ve sonrasında, Biomerieux Mc. Farland 2 bulanıklığını elde edebilmek için 5 mL'lik API süspansiyon ortamında elde edilen bulanıklığın miktarı tespit edilmiştir. Daha sonra 10 mL 'lik API CHL 50

süspansiyon ortamına, tespit edilen miktarın 2 katı, steril pastör pipetiyle damlatılmıştır. Elde edilen süspansiyon iyice vortekslendikten sonra, kuyucuklarda şeker içeren kitlere aktarılmıştır. Sonrasında kuyucukların üzeri mineral yağ ile kaplanıp, 37°C’de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 24. ve 48. saatlerinde kuyucuklarda meydana gelen renk değişimleri kaydedilmiştir. Koyu mavi renkte olan kuyucukların sarı renge dönmesi pozitif, değişmeden kalması negatif olarak değerlendirilmiştir. İzolatların renk değişim sonuçları kaydedildikten sonra, yönetici firma tarafından optimize edilmiş veri tabanına girilerek, % oranda tür tayinleri elde edilmiştir.

2.2.2.15. Laktik asit bakteri izolatlarının 16S rRNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyonlarının belirlenmesi

Seçilen LAB izolatlarının tanımlanması amacıyla 16s rRNA dizi analizi yapılmıştır. İzolatların genomik DNA’sı GeneJET genomik DNA saflaştırma kiti (ThermoFischer Scientific) kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu amaçla aşağıda yer alan kit protokolü kullanılmıştır.

- 24 saatlik taze kültür 5000 x g’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır.
- Pelet 180 µL liziz tamponunda (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, %1,2 Triton X-100, 20 mg/mL lizozim, pH: 8.0) resüspanse edildikten sonra 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- 200 µL liziz solüsyonu ve 20 µL Proteinaz K eklenmiş ve vortekslenmiştir. Homojen bir süspansiyon elde edildikten sonra 56°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- 20 µL RNase A solüsyonu eklenmiş, vortekslenerek karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 400 µL %50 etanol eklenmiş ve vortekslenmiştir.
- Lizat kolona transfer edilmiş ve 6000 x g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırılmıştır.
- 500 µL yıkama solüsyonu I eklenmiş ve 8000 x g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırılmıştır.

- 500 µL yıkama solüsyonu II eklenmiş ve 3 dakika 12000 x g'de santrifüj edilmiştir.
- 50 µL elüsyon tamponu kolonun merkezine eklenmiş, 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen DNA -20°C'de saklanmıştır (www.thermoscientific.com/onebio).

Elde edilen genomik DNA, kalıp DNA olarak kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi için PCR kurulmuştur. Bu amaçla 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' ve 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' evrensel primerleri kullanılmıştır. Reaksiyon bileşenleri olarak, 10X TaqBuffer (+KCl-MgCl₂), 2,5 µL; 25 mM MgCl₂, 2,5 µL; 2,5 mM dNTP mix, 2,5 µL; 2,5 mM 27F primer, 2,5 µL; 2,5 mM 1492R primer 2,5 µL; Taq polimeraz (5 u/µL), 0,25 µL; nükleaz içermeyen distile su, 11,75 µL; kalıp DNA, 1 µL kullanılmıştır. PCR işleminde, ön denatürasyon basamağı 94°C'de 3 dak.; denatürasyon basamağı 94°C'de 30 sn., bağlanma basamağı 55°C'de 1 dak., uzama basamağı 72°C'de 2 dak., 35 döngü; son uzama basamağı ise 72°C'de 5 dak. olarak yapılmıştır.

Reaksiyon sonucunda elde edilen PCR ürünü %1'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Elde edilen yaklaşık 1400 baz çiftlik bölgenin dizi analizinde 1492R ve 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3') primerleri kullanılmıştır (Doi ve ark., 2013). İzolatların dizi analizleri, MEDSANTEK Laboratuvar Malzemeleri Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi tarafından yapılmıştır.

2.2.2.16. Diğer bakteri izolatlarının VITEK II ile tanımlanmaları

İzole edilen Gram pozitif katalaz pozitif bakteri izolatları VITEK II cihazı kullanılarak tanımlanmıştır. Bu amaçla tanımlanacak kültürler, BHI agarlı besiyerinde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında PBS bulunan tüplerde bulanıklık ayarı yapılmıştır. Gram pozitif kok bakteriler, Gram pozitif kok tanımlama kartlarıyla, Gram pozitif basil bakteriler ise, Gram pozitif basil

tanımlama kartlarıyla tanımlanmıştır. Test sonucunda bakteri izolatları % oranda tür düzeyinde tanımlanmış ve sonuçlar kaydedilmiştir.

2.2.2.17. Maya izolatlarının MALDI – TOF Kütle Spektrometre Tekniği'yle tanımlanması

MALDI – TOF kütle spektrometre tekniği, mikroorganizmaların 2 dakika gibi hızlı bir sürede tanımlanmasını sağlamaktadır. Bu işlem mikroorganizmanın protein yüklerine bağlı ayırma giderek identifikasyonunu gerçekleştirmektedir. Bu amaçla, maya izolatlarımızın tanımlanmaları bu teknik kullanılarak yapılmıştır.

Bu işlemde, patates dekstrozu agarda aktif hale getirilen maya izolatından koloni örneği alınıp, 48 pozisyonlu plağa ekilmiştir. Plak yüzeyine 0.3µL matris solüsyonu eklenmiştir. Cihazda, mikroorganizmanın sağlam protein iyonizasyonu ve moleküler ağırlık ölçümünü yapmasıyla elde edilen sonuç, veritabanı ile karşılaştırılarak, mikroorganizmanın tanımlanması esasına dayanmaktadır. Çalışmanın bu kısmı, BioMérieux Diagnostik Anonim Şirketi tarafından yapılmıştır.

2.2.3. LAB izolatlarının metabolik ürünlerinin belirlenmesi

Laktik asit ve hidrojen peroksit üretimi, probiyotik özelliğin belirlenmesinde büyük bir önem arz etmektedir. Bu amaçla, vajinadan izole edilen LAB izolatlarının laktik asit ve hidrojen peroksit miktar tayinleri yapılmıştır.

2.2.3.1. Laktik asit üretiminin tayini

LAB izolatları MRS broth ortamında 37°C'de %5 CO₂ ortamında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası yine MRS broth ortamına %1'lik ekimleri yapıp tekrar inkübe edilmişlerdir.

Taze LAB kültüründen 1 mL temiz bir erlene alınıp, 99 mL steril distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Üzerine 2-3 damla fenol fitalein indikatörü damlatılarak 0,1 M NaOH çözeltisi ile titrasyonları yapılmıştır. Harcanan NaOH miktarları kaydedilmiştir. Kültürlerin ürettiği asit, titre edilebilir yüzde asitlik olarak hesaplanmıştır. Aşağıda yer alan formül kullanılarak bakterilerin ürettiği

laktik asit miktarları hesaplanmıştır. Çalışma çift paralel halinde yapılmıştır (Demirci ve Gündüz, 1994).

$$\% \text{ Asitlik: Harcanan } 0,1 \text{ N NaOH (mL)} \times 0,9/\text{mL}$$

2.2.3.2. Hidrojen peroksit üretiminin tayini

LAB izolatları MRS broth ortamında 37°C 'de %5 CO₂ ortamında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası yine 5 mL MRS broth ortamına %1'lik ekimleri yapıp tekrar inkübe edilmişlerdir.

İnkübasyon süresi sonunda kültürlerin üzerlerine 5 mL distile su eklenmiş ve kültürler 5000 rpm.'de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte oluşan berrak sıvı alınmış ve Whatman 42 no.'lu filtre kağıdından süzölmüştür. Süzme işleminden sonra elde edilen filtratın 4 mL'si ayrı bir tüpe alınmıştır.

Alınan bu filtratın üzerine sırası ile 0,5 mL sülfürik asit, 0,5 mL amonyum molibden ve 0,5 mL potasyum iyodür çözeltisi ilave edilmiş, her kimyasal ilavesinden sonra örnekler vorteks yardımı ile iyice karıştırılmıştır. Tüm bu işlemler gerçekleştirildikten sonra elde edilen sıvının 350 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu, UV - 1800) optik yoğunlukları belirlenmiştir. Elde edilen optik yoğunluk (OD) değerleri; daha önceden hazırlanan, standart eğriye göre µg/mL cinsinden hesaplanmıştır. Çalışma, çift paralel olarak yapılmıştır. Çalışma sırasında her örnek için 3 okuma yapıp, standart sapmaları hesaplanmıştır.

Hidrojen peroksit tayininde kullanılan standart eğrinin oluşturulabilmesi için; 0,1 mL saf (%35) hidrojen peroksit alınıp distile su ilavesi ile 30 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 1 ml başka bir erlene alınmış ve tekrar distile su ile 30 mL'ye tamamlanarak standart çözelti hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti bir izolat gibi düşünölüp, izolatlar için uygulanan işlemler bire bir standart çözeltiye de uygulanmış bu sayede hidrojen peroksit standart eğrisi çıkarılmıştır. Standart eğriden 1 µg/mL hidrojen peroksite karşılık gelen hidrojen peroksit değeri hesaplanmış ve bu sayede izolatların okunan değerleri standart ile kıyaslanarak µg/mL cinsine çevrilmiştir (Mumcu, 1997; Dinçer, 2007).

2.2.3.3. Proteolitik aktivite tayini

Proteolitik aktivite tayininde, oluşan aminoasitlere eş değer tirozin aminoasidi temel alınmıştır. İzolatlar MRS broth ortamında 37°C 'de %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kültürlerin 5 mL yağsız süt sıvı besiyeri ortamına %1'lik ekimleri yapılarak 48 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Çalışma çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Kültürlerin üzerine 1 mL distile su, daha sonra 10 mL 0,72 N trikloro asetik asit (TCA) ilave edilmiş ve örnekler iyice karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika süreyle bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler, Whatman 1 nolu filtre kâğıdından geçirilerek süzölmüşlerdir. Oluşan süzüntüden 2,5 mL ayrı bir tüp içersine alınıp ve üzerine 5 mL Na₂CO₃.Na₄P₂O₇ çözeltisinden konularak iyice çalkalanmıştır. Daha sonra üzerlerine 1,5 mL Fenol ayırıcı konularak koyu mavi bir renk oluşuncaya kadar çalkalanmıştır. Renk oluşumunun gözlemlenmesinden sonra örnekler 8000 rpm' de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısım alınarak 650 nm dalga boyunda spektrofotometrede 3 kez okutulmuş ve değerler kaydedilmiştir. Elde edilen değerler proteolitik aktivite için çıkarılan standart eğriye göre, µg / mL cinsinden değerlendirilmiştir (Aslım, 1994).

Bu tayinde standart eğri oluşturmak için tirozin aminoasidi kullanılmıştır. İçerisinde 5 mL skim milk besiyeri içeren tüplere sırasıyla 0,02, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1 mg tirozin /mL olacak şekilde tirozin eklenerek çözelti serisi elde edilmiştir. Serideki her bir tüp birer izolat gibi düşünülüp, izolatlar için uygulanan işlemler çözeltilere de uygulanmıştır ve yine 650 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. Daha sonra elde edilen OD değerleri grafik üzerine yerleştirilerek standart eğri oluşturulmuştur (Aslım, 1994).

2.2.4. LAB izolatlarının probiyotik özelliklerinin belirlenmesi

2.2.4.1. LAB izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

LAB izolatlarının, çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını belirlemek amacıyla Kirby - Bauer Disk Difüzyon Yöntemi kullanılmıştır. Kullanılacak antibiyotiklerin seçiminde literatür göz önünde bulundurulmuştur. Bunun sonrasında, ampisilin, eritromisin, gentamisin, klindamisin, metisilin,

metronidazol, okzasilin, penisilin, sefalotin, sülfometoksazol + trimetoprim, tetrasiklin ve vankomisin olmak üzere toplam 12 antibiyotik test edilmiştir.

LAB izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla MRS agar besiyerinde 48 saat geliştirilmiş olan LAB'leri, %0,85'lik fizyolojik tuzlu su içerisinde Mc Farland 0,5 (10^8 kob/mL) bulanıklığına ayarlanmıştır. Hazırlanan mikrobiyal süspansiyondan Mueller Hinton agarlı besiyeri üzerine eküvyonla tüm yüzeye ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriyerler 15 dakika kurumaları amacıyla bekletilmiştir. Süre sonunda, aseptik koşullarda pens yardımıyla antibiyotik diskleri alınıp, petri yüzeyine yerleştirilmiştir. Petri yüzeyine yerleştirirken, diskin petri kenarından 1,5 cm ilerde ve her bir disk arasında 2 cm boşluk olmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca, her bir petriye maksimum 5 antibiyotik diski yerleştirilmiştir. Disklerin yerleştirilmesi sonrasında petriyerler 15 dakika bekletildikten sonra, 24 – 48 saat uygun koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, disklerin çevresinde oluşan zon çapları cetvelle ölçülerek kaydedilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Deney, çift paralel olarak yapılmıştır (Kaevnopparat ve ark., 2013).

2.2.4.2. Antifungal aktivite tayini

Bu çalışmada LAB izolatlarının, yine vajinadan izole edilen ve tanımlanan 18 *Candida* izolatına (*C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis*) karşı antimikrobiyal aktivite varlığı, agar damlatma tekniğiyle araştırılmıştır. Bu amaçla, LAB'leri MRS ve M17 broth ortamında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası MRS ve M17 broth ortamına %1'lik ekimleri yapıp tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında LAB'lerinin %0,85'lik fizyolojik tuzlu suda 0.5 McFarland bulanıklığına göre ayarlamaları yapılmıştır. Bulanıklığı ayarlanan LAB örneğinden 5 µL, glukoz içeren Mueller Hinton yumuşak agarlı besiyeri üzerine damlatılmıştır. 1 petri yüzeyine 8 bakteri ekimi yapılmıştır. 30 dakika petriyerler oda sıcaklığında bekletildikten sonra 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, PDB broth ortamında uygun koşullarda geliştirilen *Candida* izolatlarının %0,85'lik fizyolojik tuzlu su ortamında 0.5 McFarland bulanıklığına göre ayarlamaları yapılmıştır. Bulanıklığı ayarlanan *Candida* izolatlarından patates dekstroz yumuşak agara inokülasyonu yapılmıştır.

Yumuşak agar iyice karıştırıldıktan sonra, LAB'lerinin bulunduğu petrilerin yüzeyine yavaşça 7 mL dökülmüştür. Agarın donması beklendikten sonra petriler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, LAB'lerinin etrafında oluşan zonlar gözlemlenmiş ve zon çapları ölçülerek kaydedilmiştir (Pascual ve ark., 2008). Deney çift paralel olarak yapılmıştır.

2.2.4.3. Antibakteriyal aktivite tayini

Bu çalışmada vajinadan izole edilen LAB izolatlarının, yine vajinadan izole edilen ve tanımlanan 13 patojene karşı antimikrobiyal aktivite varlığı, agar difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. Bu amaçla, LAB'leri MRS ve M17 broth ortamında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası MRS ve M17 broth ortamına %1'lik ekimleri yapıp tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında LAB'leri 5000 rpm.'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısımları 0.22µm'lik membran filtrelerden geçirilmiştir. Patojen bakteri izolatları ise BHI broth ortamında aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerin, %0,85'lik fizyolojik tuzlu suda 0,5 McFarland bulanıklığına göre ayarlamaları yapılmıştır. Bulanıklığı ayarlanan patojen kültürden 0,5 mL kültür örneği alınıp, 20 mL Mueller Hinton agar içeren sıcak su banyosunda bekletilen agar içine eklenip, iyice karıştırılıp, dökme plak yöntemiyle petrilere dökülmüş ve ağarın donması beklenmiştir. Donan petrilerin yüzeyine steril mantar deliciyle kuyucuklar açılmıştır. Açılan her kuyucuğa LAB süpernatantından 100 µL eklenmiş ve aerob ortamda 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Testin sonucu, filtratların etrafında zon oluşup oluşmamasına göre + veya - biçiminde değerlendirilmiştir (Bhunja ve ark., 1988; Ryan ve ark., 1996; Choi ve ark., 1999; Zhu ve ark., 2000). Deney çift paralel olarak yapılmıştır.

Ayrıca, antibakteriyal aktivitenin laktik asit bakterilerinin oluşturdukları laktik asitten kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenmesi için, hazırlanan filtratların pH değerleri pH 5,5'e ayarlanarak, antibakteriyal aktivite tespiti agar difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Testin sonucu, filtratların etrafında zon oluşup oluşmamasına göre + veya - biçiminde değerlendirilmiştir (Bhunja ve ark., 1988; Ryan ve ark., 1996; Choi ve ark., 1999; Zhu ve ark., 2000). Deney çift paralel olarak yapılmıştır.

2.2.4.4. Antibakteriyal aktiviteye bazı enzimlerin etkisi

Laktik asit bakterilerinin antibakteriyal aktivite gösteren maddelerinin protein karakterinde bir madde olup olmadığının belirlenmesi amacıyla proteinaz K enzimi, antibakteriyal etkinin hidrojen peroksit aracılı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla ise, katalaz enzimi kullanılarak antibakteriyal etki araştırılmıştır.

Proteinaz K enzimi, pH'sı 7,5 olan 0,05 M sodyum fosfat içinde çözüldükten sonra, bölüm 2.2.4.3'te anlatıldığı gibi hazırlanan filtratlara 1mg/mL olacak şekilde eklenmiştir. Daha sonra inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, proteinaz K eklenmiş filtratların antibakteriyal aktivite tespiti bölüm 2.2.4.3'te anlatıldığı şekilde agar difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Testin sonucu, filtratların etrafında zon oluşup oluşmamasına göre + veya - biçiminde değerlendirilmiştir (Bhunja ve ark., 1988; Ryan ve ark., 1996; Choi ve ark., 1999; Zhu ve ark., 2000). Deney çift paralel olarak yapılmıştır.

Katalaz enzimi, bölüm 2.2.4.3'te anlatıldığı gibi hazırlanan filtratlara 5µg/mL olacak şekilde eklenmiştir. Daha sonra filtratlar, inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, katalaz enzimi eklenmiş filtratların antibakteriyal aktivite tespiti bölüm 2.2.4.3'te anlatıldığı şekilde agar difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Testin sonucu, filtratların etrafında zon oluşup oluşmamasına göre + veya - biçiminde değerlendirilmiştir (Bhunja ve ark., 1988; Ryan ve ark., 1996; Choi ve ark., 1999; Zhu ve ark., 2000). Deney çift paralel olarak yapılmıştır.

2.2.4.5. Otoagregasyon

Bu test, LAB'lerinin otoagregasyon yeteneğinin olup olmadığının araştırılması amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla LAB izolatları 37°C'de %5 CO₂ ortamında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası pH'sı 6,2 olan PBS (phosphate buffer saline)'te final konsantrasyonu 10⁸ kob/mL'ye ayarlanmıştır. Daha sonra, mikrobiyal süspansiyon lam üzerine damlatılıp, ışık mikroskopunda 100'lük objektifte gözlem yapılmıştır. Hücreler 2 dakika içerisinde agrege olurlarsa, otoagregasyon test sonucu pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitif değerler, bakterilerin agregasyon hızına bağlı olarak düşük (+), orta (++) ve yüksek

(+++)
olarak sınıflandırılmıştır. Elde edilen sonuçlar kaydedilmiştir (Pascual ve ark., 2008).

2.2.4.6. Koagregasyon

Koagregasyon testi, LAB izolatlarının patojen bir bakteri örneğiyle agregasyon yapıp yapmadığının ortaya konulması amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla *E. coli* ATCC 25922 suşu, test mikroorganizması olarak kullanılmıştır. Testte, LAB izolatları anaerobik koşullarda 37°C'de 48 saat, *E. coli* ATCC 25922 ise BHI brothda 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, PBS içinde 10⁹ kob/mL'a ayarlı LAB'si ile, yine PBS içinde 10⁹ kob/mL'a ayarlı *E. coli* ATCC 25922 bakterisi ayrı bir tüpe alınıp, tüp vorteksle 15 saniye karıştırılmıştır. Daha sonra 24 kuyucuklu plakalarda her iki bakteri örneği ekilip, 37 °C'de 4 sa hafifçe karıştırılarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında preparat hazırlanıp, gram boyama yapılarak preparatların mikroskopta incelenmeleri yapılmıştır. *E. coli* ATCC 25922 ile koagregasyon yapan LAB'leri kaydedilmiştir (Pascual ve ark., 2008).

2.2.4.7. Hidrofobisite

LAB'lerinin hidrofobisite yeteneklerinin araştırılması amacıyla, test edilecek LAB izolatları MRS sıvı besiyeri içeren tüplerde 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 24 saat süreyle inkübasyona bırakılarak aktif hale getirilmiştir. İnkübasyon sonrası kültürler, 12.000 g 5°C'de 5 dak. süreyle santrifüj edilerek 0,05 M K₂HPO₄ (pH: 6,5) tamponuyla 2 kez yıkanmış ve en son aynı tamponda çözdürülmüştür ve hücre süspansiyonu A560 nm'de yaklaşık olarak 1,0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen karışımdan 3 mL ayrı bir falkona alındıktan sonra üzerine 0,6 mL n-hexadecane ilave edilerek 120 saniye süreyle vortekslenmiştir. Vorteksleme işlemi tamamlandıktan sonra örneklerde üstte berrak bir sıvı olacak şekilde iki ayrı faz gözlenmiştir. Üst faz pipet yardımıyla alındıktan sonra A560 nm'de spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır (Vinderola ve Reinheimer, 2003).

Hidrofobisite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% = (A_0 - A)A_0 \times 100$$

A_0 : İlk absorbans değeri

A : Son absorbans değeri

2.2.4.8. Asit direncinin belirlenmesi

LAB izolatları 5mL MRS brothda, 37°C’de %5 CO₂ ortamında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası yine 5 mL MRS broth ortamına %1’lik ekimleri yapılıp tekrar inkübe edilmişlerdir.

İnkübasyon sonrası, 1mol/L HCl yardımı ile pH’sı 2 ve 3’e ayarlanmış MRS broth ortamına bakteri ekimleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak pH’sı 7,2’ye ayarlı MRS broth kullanılmıştır. Sonrasında, 0. saatte ve 1., 2., ve 3. saatin sonunda örnekler alınmış ve seri dilüsyonlar yapılarak MRS agar içeren petrilere 10µL ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan petriler, 37°C’de %5 CO₂ ortamında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, kob/mL cinsinden değerler hesaplanmıştır (Claire ve ark., 2006).

2.2.4.9. Safra tuzu direncinin belirlenmesi

LAB izolatları 5mL MRS brothda, 37°C’de %5 CO₂ ortamında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası yine 5 mL MRS broth ortamına %1’lik ekimleri yapılıp 4 saat 37°C ‘de %5 CO₂ ortamında tekrar inkübe edilmişlerdir.

İnkübasyon sonrası, %0,1 ve %0,03 safra tuzu içeren MRS broth ortamına bakteri ekimleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak sadece MRS broth kullanılmıştır. Sonrasında, 0. saatte ve 1., 2., 3. ve 4. saatin sonunda örnekler alınmış ve seri dilüsyonlar yapılarak MRS agar içeren petrilere 10µL ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan petriler, 37°C’de %5 CO₂ ortamında 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, kob/mL cinsinden değerler hesaplanmıştır (Pereira ve Gibson, 2002b).

2.2.5. Laktik asit bakteri izolatlarından ekzopolisakkarit izolasyonu

Hücre kültürü deneylerinde kullanılmak üzere, LAB izolatlarından EPS izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, hidrojen peroksit ve laktik asit üretim miktarları yüksek 2 izolat (*E. faecalis* 3M2 ve *E. faecalis* 8M10) seçilmiştir.

EPS eldesi için LAB'leri, M17 brothlu besiyerlerinde geliştirildikten sonra, %20 glukoz içeren M17 brothlu besiyerlerine %1'lik ekimleri yapılmıştır. 37°C'de %5 CO₂ ortamında 48 saat inkübasyon sonrasında, kültürler 15.000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant üzerine %4 TCA (trikloro asetik asit) eklenip, iyice karıştırılıp, 1 gece + 4°C'de bekletilmiştir. Ertesi gün örnek 15.000 g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, süpernatant üzerine 1/1 oranında soğuk etil alkol eklenip, iyice karıştırıldıktan sonra yine 1 gece + 4 °C'de bekletilmiştir. Ertesi gün örnek, 15.000 g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet üzerine sıcak ultra saf su eklenip, elde edilen ürün temiz bir falkonda toplanıp iyice vortekslenmiştir. Sonrasında, temiz bir ependorfun darası alındıktan sonra, ependorfa 0,5 mL EPS örneği konmuştur ve sıvının uçması beklenmiştir. EPS örneği iyice kurduğunda tartım yapılarak, mL'deki EPS miktarı hesaplanmıştır. Elde edilen EPS örneğinin, hücre kültüründe kullanılmak üzere 110°C'de 15 dakika otoklavda sterilizasyonu yapıldıktan sonra kullanılıncaya kadar +4°C'de saklanmıştır (Dubois ve ark., 1956).

2.2.6. LAB'lerinden izole edilen EPS'lerin sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi

2.2.6.1. HeLa hücre hattı (insan epitelyal karsinoma hücreleri – insan servikal kanser hücreleri)

İlk defa 1951 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Baltimore'da rahim ağzı kanseri nedeniyle takip edilen Afrika kökenli Amerikalı bir hastanın kanser dokularının, laboratuvarında kültürü başarılabildiği. Henrietta Lack adındaki hasta, kanserin yayılması sonucu ölmüş ancak ölümsüz hücrelerinin kültürü adına atfen HeLa adı ile dünya genelindeki laboratuvarlara talep nedeniyle dağıtılmıştır (Akçalı, 2010). Böylece HeLa hücreleri, ilk kez laboratuvar ortamında sürekli kültüre edilebilecek insan hücreleri olmuştur. (Jones, 1997). HeLa hücrelerinin

dublikasyon süresi yaklaşık 23 saat olup, bulunduğu kültürdeki diğer hücre hatlarını kolayca kontamine edebilmekte ve diğer hücre hatlarına oranla oldukça hızlı proliferasyon olmaktadır (Önder, N. İ., 2013).

HeLa hücreleri vajina ve serviks uygulanan kemoterapötik ajanların etkisinin araştırılması amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Shiraishi ve ark., 2005). Ayrıca bu hücreler, *in vitro* çalışmalarda probiyotik bakterilerin vajinaya bağlanması amacıyla da kullanılmaktadır (dakis ve ark., 2000).

Hücre stoklarımızda bulunan HeLa hücre dizileri bu çalışmada kullanılmıştır. HeLa hücreleri inaktif hale getirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum içeren DMEM ve %1 (v/v) Penisilin – Streptomisin içeren besiyerinin bulunduğu 25 cm²'lik flasklarda %95 hava ve % 5CO₂'li gaz ortamında, 37°C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir. Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı stoklanarak tez çalışmasının sonraki deneyleri için depolanmıştır.

2.2.6.2. HUVEC (İnsan göbek kordonu endotel hücresi) hücre hattı

In vitro olarak kültüre edilen insan göbek kordonu endotel hücreleri (HUVEC), birçok avantaja sahip olması nedeniyle, biyofarmasötik endüstri ve prelinik testler olmak üzere birtakım deneysel çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. HUVEC hücreleri, insan orjinli ölümsüzleştirilmemiş hücrelerdir (Jimenez ve ark., 2013).

Hücre stoklarımızda bulunan HUVEC (İnsan göbek kordonu endotel hücresi) hücre dizileri bu çalışmada kullanılmıştır. HUVEC hücreleri ise; inaktif hale getirilmiş %20'luk Fetal Bovine Serum içeren Ham's F12 (F12 nutrient mixture), %1 (v/v) Penisilin – Streptomisin, endotelial cell growth supplement ve heparin (0,03 g/L) içeren besiyerinin bulunduğu 75 cm²'lik flasklarda %95 hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında, 37°C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir. Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı stoklanarak tez çalışmasının sonraki deneyleri için depolanmıştır.

2.2.6.3. HeLa ve HUVEC hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlanması

Stoktan hücre çıkarılması

Azot tankından (-196°C) çıkarılan HeLa ve HUVEC hücrelerini içeren vialler, hızla eritildikten sonra, içinde 7 mL soğuk besiyeri bulunan santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Santrifüj tüpleri, 1200 rpm'de 5 dak. santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım dikkatlice çekildikten sonra tüpün dibine birkaç kez elle vurarak peletin dağıtılması sağlanmıştır. Daha sonra pelet üzerine 6 mL besiyeri eklenmiştir. Elde edilen besiyeri-hücre karışımı otomatik pipet yardımıyla, santrifüj tüpünden alınarak, 25 cm²'lik hücre kültür kaplarına (flasklara) aktarılmış ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde, inkübasyona bırakılmıştır.

HeLa ve HUVEC hücre dizilerinin pasajlanması

Hücre kültür kabında en az %70 oranında hücre çoğalması meydana geldiğinde pasajlama işlemi yapılmıştır. Bunun için flask içindeki kullanılmış hücre besiyeri cam pastör pipeti yardımıyla atılmış ve kültür kabına yapışmış olan hücreler, öncelikle PBS yardımıyla, sonra PBS-EDTA ile yıkanmıştır. Hücrenin yoğunluğuna bağlı olarak, 25 cm²'lik hücre kültür kabı için 200 - 250 µL, 25 cm²'lik hücre kültür kabı için 600 - 750 µL 1x tripsin PBS-EDTA konmuş, bir iki dakika inkübatörde bekletilerek hücrelerin yapıştıkları flasktan kalkmaları sağlanmıştır. Daha sonra invert mikroskopta hücreler kontrol edilerek ayrılma gözlenince, elle flask kenarına birkaç kez vurularak hücrelerin ayrılması sağlanmıştır. Tripsinin etkisini nötralize etmek için, kalkan hücrelerin üzerine, hücre kültür kabının büyüklüğüne göre 25 cm²'lik için 6 mL besiyeri, 75 cm²'lik için ise 17 mL besiyeri eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır. Santrifüj tüpünde homojen olarak dağılan hücreler, pipet yardımıyla hücre kültür kaplarına paylaştırılmıştır.

HeLa ve HUVEC hücrelerinin stoklanması

Hücreler, PBS ve PBS-EDTA ile yıkandıktan sonra, 1x tripsin PBS-EDTA yardımıyla kaldırılarak, santrifüj tüpü içerisine aktarılmış, 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında pelet üzerine her bir kriyotüp (vial) için

850 µL hücre besiyeri, 100 µL fetal bovin serum ve 50 µL dimetilsülfoksit (DMSO) çözeltisi konularak, homojen bir karışım elde edene dek pipetleme yapılmıştır. Hücre, besiyeri, serum ve DMSO çözeltisi karışımından her bir vialle 1 mL aktarılmış ve vialler Mr. Frosty'ye yerleştirilip -80°C'ye kaldırılmıştır. Ertesi gün vialler sıvı azot tankına (-196°C) yerleştirilerek, stoklama işlemi tamamlanmıştır.

2.2.6.4. Test maddelerinin (EPS) dozlarının hazırlanması

HeLa hücreleri için kullanılacak test maddeleri 20, 15, 10, 7,5, 5 ve 2,5 mg/mL dilüsyonlar halinde DMEM besiyeri içerisinde 6 doz şeklinde hazırlanmıştır.

HUVEC hücreleri için kullanılacak test maddeleri ise 20, 15, 10, 7,5, 5 ve 2,5 mg/mL dilüsyonlar halinde Ham's F12 besiyeri içerisinde 6 doz şeklinde hazırlanmıştır.

2.2.6.5. Hücrelerin test için hazırlanması

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman 1 x tripsin PBS-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT testi için 96 kuyucuklu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğunda belirlenen sayıda (5.000 hücre/100µL) hücre olacak şekilde FBS içeren besiyerinde süspansiyon haline getirildikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 0,1 mL hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama alışması için 37°C'de 24 saat inkübe edilmişlerdir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine test maddelerinin sitotoksik etkilerini belirlemek üzere, test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilip 24 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

3M2 ve 8M10 bakteri EPS'lerinin belirlenen dozları hazırlanmıştır. DMEM ve Ham's F12 besiyerleri içerisinde 20, 15, 10, 7,5, 5 ve 2,5 mg/mL'lik dilüsyonlar hazırlanmıştır. EPS ultra saf suda çözüldüğünden, negatif kontrol olarak en yüksek dozun sadece besiyeri ve ultra saf su ile hazırlanmış çözeltileri kullanılmıştır.

2.2.6.6. Mitokondriyal aktiviteye bağlı MTT testi

LDH (laktat dehidrogenaz) testi, nötral red testi ve MTT testi gibi sitotoksosite testleri *in vitro* toksikoloji çalışmalarında, yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Fotakis ve Timbrell, 2006). MTT testi, ilk olarak Mosmann tarafından tanımlanmış kolorimetrik bir testtir. MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrozolyum bromür; Thiazolyl blue), sarı renkli olup hücelere aktif olarak absorbe olur ve kültür ortamındaki mitokondriyal aktivitesi devam eden canlı hücelerin kantasyonunu sağlar (Mosmann, 1983). Canlı hücelerin mitokondrilerinde yer alan mitokondriyal dehidrogenaz enzimi, MTT boyasındaki tetrazolium halkasını parçalar. Bunun sonucunda MTT, suda çözünmeyen mor renkli formazana dönüşür. Oluşan bu formazan, izopropanol veya DMSO gibi başka bir çözücü yardımı ile suda çözünebilir hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir. Dolayısıyla bu yöntem sadece canlı hüceleri saptar (Freshney, 2005; Oktar, 2009).

Test maddeleri ile 24 saat muamele edilen hücelerden inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hüceler 5 mg/mL MTT solüsyonu ile canlı hücelerin mitokondriyal metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözünmeyen formazan tuzuna dönüşebilmesi için 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hüceler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için her bir kuyucuğa 0,1 mL DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilerek, deney hücelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test, 8 paralel 3 kez tekrar edilmiştir.

2.2.6.7. Mikroskopi

Hüceler Olympus IX71 inverted mikroskobu altında incelenmiştir.

2.2.6.8. Fotoğrafı

Hüceler Olympus DP70 kamera kullanılarak fotoğraflanmışlardır.

2.2.6.9. İstatistiki değerlendirme

MTT deneylerinin sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde (Statistical Package for the Social Sciences) SPSS 21 programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Vajina Örneklerinden Mikroorganizmaların İzolasyonu

İstanbul Medipol Üniversitesi Hastanesi Kadın Doğum Kliniği'nde hekim aracılığıyla 20 - 40 yaş aralığındaki sağlıklı 30 kadından alınan örneklerden, laktik asit bakterisi, patojen bakteri ve maya izolasyonu yapılmıştır. Sağlıklı kadının hamile olmaması ve de son 2 ayda antibiyotik kullanmamış olması dikkate alınmıştır. Çalışmamızın etik kurul kararı, 11/04/2013 tarihinde 38 numaralı karar numarasıyla İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

Yapılan çalışma sonucunda toplamda 346 izolat elde edilmiştir. İzolat numarası verirken hangi besiyerinden izolasyon yapıldıysa, kod olarak o besiyerinin baş harfi verilmiştir (Çizelge 3.1). Bu izolatların 65 tanesi MRS agardan, 77 tanesi M17 agardan, 48 tanesi çikolata agardan, 29 tanesi kanlı agardan, 53 tanesi BHI agardan, 37 tanesi nutrient agardan, 11 tanesi Endo agardan ve 23 tanesi PDA'dan izole edilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1. İzolatların kodları

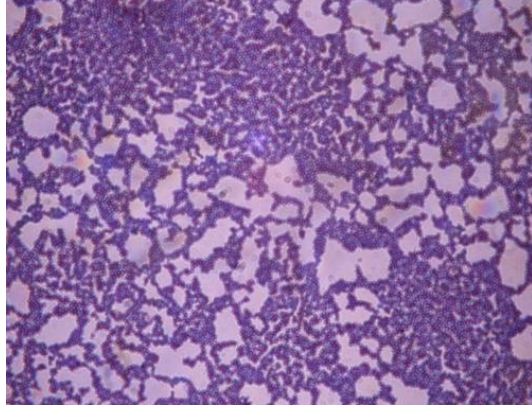
Besiyerinin adı	İzolat Kodu
MRS agar	MR
M17 agar	M
Çikolata agar	Ç
Kanlı agar	K
BHI agar	B
Nutrient agar	N
Endo agar	E
PDA	P

Toplamda 346 izolata ilk olarak Gram boyama yapılmıştır. Bu doğrultuda, 346 izolattan 326 tanesi Gram pozitif (+) bakteri özelliğinde olup, 174 tanesinin katalaz negatif (-), 152 tanesinin ise, katalaz pozitif (+) özellik gösterdiği ortaya konmuştur (Çizelge 3.2). Diğer 18 izolatın ise (8MR11, 13P1, 15P1, 18P1, 19P3,

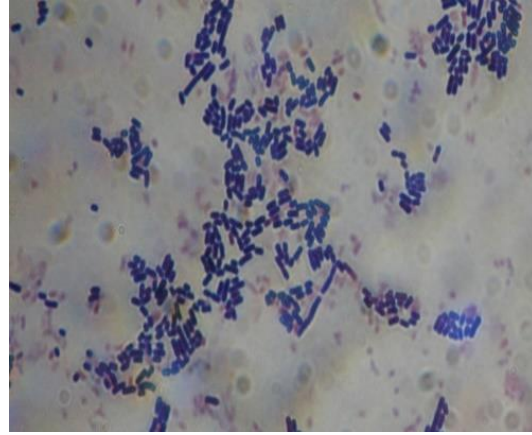
21P2, 24P1, 29P1, 30P1, 14P1, 27P2, 13P2, 17P2, 25P1, 16P1, 1Ç2, 1Ç3, 5MR2 izolatları) maya olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.2. Vajinadan izole edilen bakteri izolatları

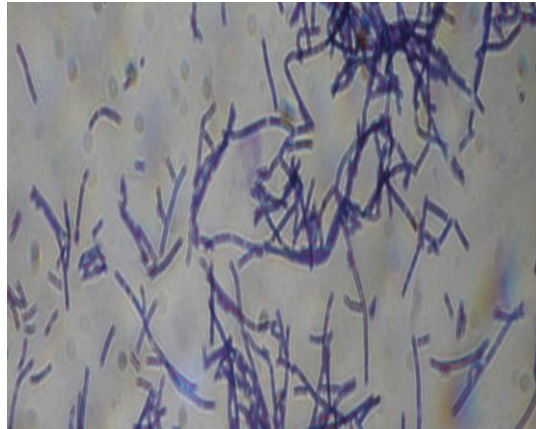
İzolat numarası	Gram özelliği	Hücre şekli	Katalaz
1MR3, 1MR1.1, 2B1, 2B4, 2B5.1, 2B6, 2MR1, 2MR2, 2MR4, 2M2, 2Ç2, 2Ç3, 2Ç4, 2Ç7, 3M1, 3M2, 3M4.1, 3M6, 3M8, 3M9, 4B2, 4B4, 4B6, 4B9, 4M1, 7MR1, 7MR3, 7MR4, 7MR5, 7MR7, 7MR8, 7MR13.1, 8MR1, 8MR2, 8MR3, 8MR4, 8MR5, 8MR6, 8MR7, 8MR8, 8MR9, 8MR10, 8MR12, 8MR13, 8MR14, 8MR19, 8MR20, 8M1, 8M2, 8M4, 8M5, 8M7, 8M8, 8M9, 8M10, 8B1, 8Ç5, 8Ç6, 9B4, 10MR1, 10MR2, 10MR3, 10MR4, 10MR5, 10MR6, 10MR12, 10MR13, 10MR14, 10MR15, 10MR16, 11MR3, 11MR4, 11MR12, 11MR19, 11MR20, 11M6, 11M10, 1MR2, 1M2, 1M1.2, 1M2.1, 4M2, 4M5, 4M10, 5MR1, 5MR3, 5MR4, 5MR6, 5MR8, 5MR9, 6M3, 6M4, 6M8.1, 9M1, 9M2, 9M3, 9M4, 9M5, 9M6, 9M7, 9M8, 9M9, 9M10, 10MR7, 10MR8, 10MR9, 10MR10, 10MR18, 10MR20, 10M3, 10M5, 10M6, 10M7, 10M10, 12M1, 12M2, 12M3, 12M5, 12M6, 12M7	(+)	basil	(-)
4N3, 4N8, 4N10, 4B7, 5N7, 6B5, 6B6.1, 10K4, 10K5, 10K6, 10K9, 10K10, 10Ç7, 10Ç8, 10Ç9, 10Ç10,	(+)	kokobasil	(-)
2MR3, 2MR5, 9B1, 9B3, 9N1, 9N2, 9N4, 9N5, 9N6, 9N7, 9N9, 9N10, 9K1, 9K2, 9K3, 9K4, 9K5, 9K7, 9K8, 9Ç1, 9Ç2, 9Ç4, 9Ç5, 9Ç6, 9Ç7, 9Ç8, 9Ç9, 9Ç10, 10B4, 10B5, 10B7, 10B8, 10N4, 10N5, 10N6	(+)	kok	(-)
1K6, 1K7, 3B7, 5B3, 5B4, 5B5, 5B6, 5B7, 5B9, 5B10, 5M1, 5M2, 5M3, 5M4, 5M5, 5M6, 5M7, 5M9, 5N6, 5P1, 5P2, 5P3, 5P4, 5P5, 7Ç4, 7Ç7, 7Ç9, 8Ç1, 10B2, 10B3, 10E1, 10E2, 10E3, 11B6, 11N7, 11Ç3, 11Ç4, 10K3, 2B1.2, 2B5.1.1, 19P1, 21P1, 24P2, 11Ç3.1, 14P2	(+)	basil	(+)
5N8, 5N9, 5N10, 6M5, 10M1, 10M4, 10M8, 11M3	(+)	kokobasil	(+)
1B1, 1Ç1, 1K1, 1K2, 1K3, 1B1.1, 1B2, 1K5, 1K8, 1Ç5.1, 2B9, 2M7, 2Ç5, 3B2, 6N1, 6N2, 6N3, 6N4, 6N8, 6N10, 6B1, 6B2, 6B4, 6B8, 6M2, 6M6, 6M9, 6M10, 6MR4, 6MR5, 6MR8, 6MR9, 7M2, 7M3, 7M4, 7M5, 7M6, 7M7, 7M8, 7M9, 7M10, 7B2, 7B3, 7B5, 7B8, 7B10, 7N1, 7N4, 7N5, 7N6, 7N9, 7N10, 7N2, 7N3, 7E1, 7E2, 7E4, 7E5, 7E6, 7E7, 7E9, 7E10, 7Ç5, 7Ç6, 7Ç1, 7Ç2, 7Ç3, 7Ç8, 7Ç10, 7K7, 7K8, 7K9, 7K10, 10B6, 10Ç6, 10Ç5, 11B2, 11B3, 11B4, 11B7, 11N1, 11N2, 11N3, 11N4, 11N6, 11Ç1, 11Ç2, 11Ç5, 11Ç6, 11Ç7, 11Ç8, 11K1, 11K2, 11K3, 11K8, 12B5, 12N1, 12N2, 12K2	(+)	kok	(+)



Şekil 3.1. Gram (+) kok izolatu



Şekil.3.2. Gram (+) kokobasil izolatu



Şekil 3.3. Gram (+) basil izolatu

3.2. İzole Edilen Mikroorganizmaların Tanımlama Test Sonuçları

3.2.1. İzole edilen mikroorganizmaların biyokimyasal aktivite sonuçları

Çizelge 3.3'te 115 tane katalaz (-) Gram (+) basil bakteri izolatının oksidaz, hareketlilik, farklı sıcaklıklarda gelişim, farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim, hidrojen sülfür oluşumu ve arjininden amonyak oluşumu test sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlara göre 115 izolatın 5 tanesinin hareketli, 14 izolatın oksidaz (+), diğerlerinin ise oksidaz (-) olduğu belirlenmiştir.

Farklı pH 'lardaki gelişimlerine bakacak olursak, pH 3,9'da 89 izolat gelişim gösterirken, 26 izolat gelişim göstermemiştir. Ayrıca, pH 9,6'da 107 izolat gelişim göstermiş, 8 tanesi ise gelişmemiştir. Farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişimleri ise; %6 NaCl içeren ortamda 44 izolat üremiş, 68 izolat ürememiş, 3 izolat ise belirsiz sonuç vermiştir. %7,5 NaCl içeren ortamda 31 izolat üremiş, 82 izolat ürememiş, 2 izolat ise belirsiz sonuç vermiştir. %10 NaCl içeren ortamda ise 18 izolat üremiş, 94 izolat ürememiş, 3 izolat ise belirsiz sonuç vermiştir. Farklı sıcaklıklardaki gelişimlerine bakacak olursak, 4°C'de 35 izolat gelişim göstermiş, 80 tanesi gelişim göstermemiştir. 15°C'de 36 izolat gelişim göstermiş, 79 tanesi gelişim göstermemiştir. 45°C'de ise; 104 izolat gelişim göstermiş, 11 tanesi gelişim göstermemiştir. Hidrojen sülfür oluşumunda ise; 115 izolatın hepsinde de hidrojen sülfür ve gaz oluşumu gözlenmemiştir. Ayrıca 50 izolat arjininden amonyak oluşturmuş, 62 izolat arjininden amonyak oluşturmamış, 3 izolat ise belirsiz sonuç vermiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Katalaz (-) Gram (+) basil bakterileri izolatlarının biyokimyasal aktivite testleri. (+): pozitif, (-): negatif, (±): belirsiz

KATALAZ (-) GRAM (+) BASİL													
	İzolat numarası	oksidaz	hareketlilik	pH 3,9 'da gelişim	pH 9,6 'da gelişim	%6 NaCl 'de gelişim	% 7.5 NaCl 'de gelişim	% 10 NaCl 'de gelişim	4°C 'de gelişim	15°C 'de gelişim	45°C 'de gelişim	H2S oluşumu	Arjininden amonyak oluşumu
1	1MR3	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
2	1MR1.1	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
3	2B1	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
4	2B4	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
5	2B5.1	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
6	2B6	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
7	2MR1	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
8	2MR2	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
9	2MR4	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
10	2M2	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
11	2Ç2	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
12	2Ç3	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
13	2Ç4	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
14	2Ç7	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)

Çizelge 3.3. (Devam) Katalaz (-) Gram (+) basil bakterileri izolatlarının biyokimyasal aktivite testleri. (+): pozitif, (-): negatif, (±): belirsiz

15	3M1.1	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
16	3M2	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
17	3M4.1	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
18	3M6	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
19	3M8	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
20	3M9	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
21	4B2	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
22	4B4	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
23	4B5	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
24	4B6	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
25	4B9	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
26	4M1	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
27	7MR1	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
28	7MR3	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
29	7MR4	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
30	7MR5	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
31	7MR7	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
32	7MR8	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
33	7MR13.1	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
34	8MR1	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
35	8MR2	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
36	8MR3	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)

Çizelge 3.3. (Devam) Katalaz (-) Gram (+) basil bakterileri izolatlarının biyokimyasal aktivite testleri. (+): pozitif, (-): negatif, (±): belirsiz

37	8MR4	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
38	8MR5	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(±)
39	8MR6	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
40	8MR7	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(±)
41	8MR8	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
42	8MR9	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
43	8MR12	(-)	(-)	(+)	(+)	(±)	(±)	(±)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
44	8MR13	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(±)
45	8MR14	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
46	8MR17	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
47	8MR19	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
48	8MR20	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
49	8M1	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
50	8M4	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
51	8Ç5	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
52	8Ç6	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
53	9B4	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
54	10MR1	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(±)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
55	10MR2	(-)	(-)	(+)	(+)	(±)	(±)	(±)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
56	10MR3	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
57	10MR4	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
58	10MR5	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)

Çizelge 3.3. (Devam) Katalaz (-) Gram (+) basil bakterileri izolatlarının biyokimyasal aktivite testleri. (+): pozitif, (-): negatif, (±): belirsiz

59	10MR6	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
60	10MR12	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
61	10MR13	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
62	10MR14	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
63	10MR15	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
64	10MR16	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
65	11MR3	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
66	11MR4	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
67	11MR12	(-)	(-)	(+)	(-)	(±)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
68	11MR13	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
69	11MR15	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
70	11MR16	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
71	11MR19	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
72	11MR20	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
73	1MR2	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
74	1M2	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
75	1M1.2	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
76	1M2.1	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
77	4M2	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
78	4M5	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
79	4M10	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
80	5MR1	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
81	5MR3	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)

Çizelge 3.3. (Devam) Katalaz (-) Gram (+) basil bakterileri izolatlarının biyokimyasal aktivite testleri. (+): pozitif, (-): negatif, (±): belirsiz

82	5MR4	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
83	5MR6	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
84	5MR8	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
85	5MR9	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
86	6M3	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
87	6M4	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
88	8M6	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
89	9M1	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
90	9M2	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
91	9M3	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
92	9M4	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
93	9M5	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
94	9M6	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
95	9M7	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
96	9M8	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
97	9M9	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
98	9M10	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
99	10MR7	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
100	10MR8	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
101	10MR9	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
102	10MR10	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
103	10MR18	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Çizelge 3.3. (Devam) Katalaz (-) Gram (+) basil bakterileri izolatlarının biyokimyasal aktivite testleri. (+): pozitif, (-): negatif, (±): belirsiz

104	10MR20	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
105	10M3	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
106	10M5	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
107	10M6	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
108	10M7	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
109	10M10	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
110	12M1	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
111	12M2	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
112	12M3	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
113	12M5	(-)	(-)	(±)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
114	12M6	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
115	12M7	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)

Çizelge 3.4'te 19 tane katalaz (-) Gram (+) kokobasil bakteri izolatının oksidaz, hareketlilik, farklı sıcaklıklarda gelişim, farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim, hidrojen sülfür oluşumu ve arjininden amonyak oluşumu test sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlara göre 19 izolatın 10 tanesinin hareketli, 9 tanesinin hareketsiz, ayrıca hepsinin oksidaz (-) olduğu gözlenmiştir.

Farklı pH 'lardaki gelişimlerine bakacak olursak, pH 3,9'da 17 izolat gelişim göstermiş, 2 tanesi gelişim göstermemiştir. Ayrıca, pH 9,6'da 18 izolat gelişim göstermiş, 1 tanesi gelişim göstermemiştir. Farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişimleri ise; %6 NaCl içeren ortamda 17 izolat üremiş, 2 izolat ürememiştir. %7,5 NaCl içeren ortamda 9 izolat üremiş, 10 izolat ürememiştir. %10 NaCl içeren ortamda ise 4 izolat üremiş, 15 izolat üreme göstermemiştir. Farklı sıcaklıklardaki gelişimlerine bakacak olursak, 4°C 'de 17 izolat gelişim göstermiş, 2 tanesi gelişim göstermemiştir. 15°C 'de 16 izolat gelişim göstermiş, 2 tanesi gelişim göstermemiş ve 1 tanesi belirsiz sonuç vermiştir. 45°C 'de ise; tüm izolatlarda gelişim gözlenmiştir. Hidrojen sülfür oluşumunda ise; tüm izolatlarda hidrojen sülfür ve gaz oluşumu gözlenmemiştir. Ayrıca izolatların hepsinin arjininden amonyak oluşturduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Katalaz (-) Gram (+) kokobasil bakterileri izolatlarının biyokimyasal aktivite testleri. (+): pozitif, (-): negatif, (±): belirsiz

KATALAZ (-) GRAM (+) KOKOBASİL													
	izolat numarası	oksidaz	hareketlilik	pH 3,9 'da gelişim	pH 9,6 'da gelişim	%6 NaCl 'de gelişim	%7.5 NaCl 'de gelişim	%10 NaCl 'de gelişim	4°C 'de gelişim	15°C 'de gelişim	45°C 'de gelişim	H2S oluşumu	Arjinden amonyak oluşumu
1	4N3	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(±)	(-)	(+)
2	4N8	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
3	4N10	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
4	4B7	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
5	4B10.1	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
6	5B10	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
7	5N7	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
8	6B5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
9	6B6.1	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
10	6B7	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
11	10K4	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
12	10K5	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
13	10K6	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
14	10K9	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
15	10K10	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
16	10Ç7	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)

Çizelge 3.4. (Devam) Katalaz (-) Gram (+) kokobasil bakterileri izolatlarının biyokimyasal aktivite testleri. (+): pozitif, (-): negatif, (±): belirsiz

17	10Ç8	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
18	10Ç9	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
19	10Ç10	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(±)	(+)	(-)	(+)

Çizelge 3.5'te 40 tane katalaz (-) Gram (+) kok bakteri izolatının oksidaz, hareketlilik, farklı sıcaklıklarda gelişim, farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim, hidrojen sülfür oluşumu ve arjininden amonyak oluşumu test sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlara göre 40 izolatın 12 tanesinin hareketli, 28 tanesinin hareketsiz, 11 izolatın oksidaz (+) diğerlerinin ise oksidaz (-) olduğunu söyleyebiliriz.

Farklı pH 'lardaki gelişimlerine bakacak olursak, pH 3,9'da 3 izolat gelişim göstermiş, 37 tanesi gelişim göstermemiştir. Ayrıca, pH 9,6'da 38 izolat gelişim göstermiş, 2 tanesi gelişim göstermemiştir. Farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişimleri ise; %6 NaCl içeren ortamda 9 izolat üremiş, 31 izolat ürememiştir. %7.5 NaCl içeren ortamda 8 izolat üremiş, 32 izolat ürememiştir. %10 NaCl içeren ortamda ise 4 izolat üremiş, 36 izolat üreme göstermemiştir. Farklı sıcaklıklardaki gelişimlerine bakacak olursak, 4°C'de 7 izolat gelişim göstermiş, 33 tanesi gelişim göstermemiştir. 15°C'de 8 izolat gelişim göstermiş, 32 tanesi gelişim göstermemiştir. 45°C'de ise; 22 izolat gelişim göstermiş, 18 tanesinde gelişim gözlenmemiştir. Hidrojen sülfür oluşumunda ise; 40 izolatın hepsinde de hidrojen sülfür ve gaz oluşumu gözlenmemiştir. Ayrıca, 40 izolatın hepsinin arjininden amonyak oluşturabildiği sonucuna varılmıştır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Katalaz (-) Gram (+) kok bakterilerin biyokimyasal aktivite testleri. (+): pozitif, (-): negatif, (±): belirsiz

KATALAZ (-) GRAM (+) KOK													
	izolat numarası	oksidaz	hareketlilik	pH 3,9 'da gelişim	pH 9,6 'da gelişim	%6 NaCl 'de gelişim	%7.5 NaCl 'de gelişim	%10 NaCl 'de gelişim	4°C 'de gelişim	15°C 'de gelişim	45°C 'de gelişim	H ₂ S oluşumu	Arjinden amonyak oluşumu
1	2MR3	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
2	2MR5	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
3	9B1	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
4	9B2	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
5	9B3	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
6	9B8	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
7	9B9	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
8	9B10	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
9	9N1	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
10	9N2	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
11	9N4	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
12	9N5	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
13	9N6	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
14	9N7	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)

Çizelge 3.5. (Devam) Katalaz (-) Gram (+) kok bakterilerin biyokimyasal aktivite testleri. (+): pozitif, (-): negatif, (±): belirsiz

15	9N9	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
16	9N10	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
17	9K1	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
18	9K2	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
19	9K3	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
20	9K4	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
21	9K5	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
22	9K6	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
23	9K7	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
24	9K8	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
25	9Ç1	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
26	9Ç2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
27	9Ç4	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
28	9Ç5	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
29	9Ç6	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
30	9Ç7	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
31	9Ç8	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
32	9Ç9	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
33	9Ç10	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
34	10B4	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
35	10B5	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
36	10B7	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)

Çizelge 3.5. (Devam) Katalaz (-) Gram (+) kok bakterilerin biyokimyasal aktivite testleri. (+): pozitif, (-): negatif, (±): belirsiz

37	10B8	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
38	10N4	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
39	10N5	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
40	10N6	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)

3.2.2. Mikrotitre plaka yöntemi ile biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi

Çizelge 3.6'da 138 Katalaz (-) Gram (+) bakteri izolatının, mikrotitre plaka yöntemi ile glukoz ortamındaki biyofilm oluşum sonuçları verilmiştir. Optik dansite (OD) sonuçlara bakıldığında, 77 izolatın (11M10, 2MR5, 2MR2, 8MR3, 8M7, 1MR2, 5MR6, 5MR8, 5MR4, 11MR4, 7MR4, 8MR4, 7MR1, 1MR3, 10MR4, 1MR1.1, 8MR14, 2MR1, 8M1, 11MR20, 10MR8, 10MR3, 10MR15, 10MR14, 10MR12, 10MR13, 7MR8, 7MR13, 11M6.2, 11M6.1, 8M5.1, 2M2.1, 10MR6.1, 10MR6.2, 8MR20.1, 11MR16.1, 11MR16.2, 11MR15.2, 8MR20.2, 11MR19.1, 11MR19.2, 9M3.1, 8MR9.2, 8M2, 8MR5, 9M7, 5MR3, 10M3, 10M10, 10MR2.1, 4M10, 8MR9.1, 8MR2.1, 8MR12.1, 8MR17.1, 11MR15.1, 10MR5.1, 3M6, 1M1.2, 9M8, 4M5, 2MR4, 8MR7, 10MR7, 10M7, 2M7.1.1, 5M2.2, 5B10.1, 6B3.1, 9K6.1, 9Ç2, 9B9, 10B7, 2B5.1, 10MR2.2, 8M10.2 ve 8MR6.1 izolatları) OD değerinin 120'nin altında, 26 izolatın (4B1, 4B10, 2B6, 4B8, 2B4, 5B10, 6B3, 6B9, 4B4, 2B5, 4B6, 2B8, 4B5, 6B7, 6B3.2, 8M6.1, 10M2.2, 5MR1, 8MR2.2, 7MR7.4.2, 8MR14, 11MR12.2, 8M4.2, 11MR12.1, 7MR7.4.1, 1M2.1 izolatları) OD değerinin 240'ın altında, 12 izolatın (8MR8, 8MR12.2, 10MR16, 8M10.1, 2Ç5.2, 9B8.1, 9K2, 9N6, 9Ç8, 9B3, 9N5 ve 10N4 izolatları) OD değerinin 500'ün altında, 23 izolatın ise (3M2, 10B4, 10N6, 6B9.2, 9K6.2, 9B8.2, PB1, 9K4, 9K5, 10N5, 9K3, 9Ç5, 10B5, 9Ç1, 9Ç4, 9Ç6, 9Ç10, 9B10, 9B2, 9Ç9, 9Ç7, 9N7 ve 4B5.2 izolatları) ise OD değerinin 500'ün üzerinde olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 3.6. Katalaz (-) Gram (+) bakteri izolatlarının mikrotitre plaka yöntemi ile glukoz ortamındaki biyofilm oluşumları. OD570<0,120 (-), OD570<0,240 (+), OD570<0,500 (++) , OD570>0,500 (+++)

KATALAZ (-) BAKTERİ İZOLATLARI	
İzolat numarası	Biyofilm oluşumu
11M10, 2MR5, 2MR2, 8MR3, 8M7, 1MR2, 5MR6, 5MR8, 5MR4, 11MR4, 7MR4, 8MR4, 7MR1, 1MR3, 10MR4, 1MR1.1, 8MR14, 2MR1, 8M1, 11MR20, 10MR8, 10MR3, 10MR15, 10MR14, 10MR12, 10MR13, 7MR8, 7MR13, 11M6.2, 11M6.1, 8M5.1, 2M2.1, 10MR6.1, 10MR6.2, 8MR20.1, 11MR16.1, 11MR16.2, 11MR15.2, 8MR20.2, 11MR19.1, 11MR19.2, 9M3.1, 8MR9.2, 8M2, 8MR5, 9M7, 5MR3, 10M3, 10M10, 10MR2.1, 4M10, 8MR9.1, 8MR2.1, 8MR12.1, 8MR17.1, 11MR15.1, 10MR5.1, 3M6, 1M1.2, 9M8, 4M5, 2MR4, 8MR7, 10MR7, 10M7, 2M7.1.1, 5M2.2, 5B10.1, 6B3.1, 9K6.1, 9Ç2, 9B9, 10B7, 2B5.1, 10MR2.2., 8M10.2, 8MR6.1	(-)
4B1, 4B10, 2B6, 4B8, 2B4, 5B10, 6B3, 6B9, 4B4, 2B5, 4B6, 2B8, 4B5, 6B7, 6B3.2, 8M6.1, 10M2.2, 5MR1, 8MR2.2, 7MR7.4.2, 8MR14, 11MR12.2, 8M4.2, 11MR12.1, 7MR7.4.1, 1M2.1	(+)
8MR8, 8MR12.2, 10MR16, 8M10.1, 2Ç5.2, 9B8.1, 9K2, 9N6, 9Ç8, 9B3, 9N5, 10N4	(++)
3M2, 10B4, 10N6, 6B9.2, 9K6.2, 9B8.2, 9B1, 9K4, 9K5, 10N5, 9K3, 9Ç5, 10B5, 9Ç1, 9Ç4, 9Ç6, 9Ç10, 9B10, 9B2, 9Ç9, 9Ç7, 9N7, 4B5.2,	(+++)

Çizelge 3.7’de 82 Katalaz (+) Gram (+) bakteri izolatının mikrotitre plaka yöntemi ile glukoz ortamındaki biyofilm oluşum sonuçları verilmiştir. Optik dansite (OD) sonuçlara bakıldığında, 15 izolatın (14P1, 7E3.1, 7E3.2, 12K1.1, 3B7, 6MR4, 6B2, 5M9, 5M4, 5M2, 5M1, 6M10, 5M6, 2M7 ve 6M9 izolatları) OD değerinin 120’nin altında, 17 izolatın (11K1, 1K2, 1K3, 1K1, 1Ç5, 6N3, 5N8, 6N2, 5N10, 2B9, 5B5, 1B2, 1B1.1, 6MR5, 5B3, 6M2 ve 5M7 izolatları) OD değerinin 240’ın altında, 24 izolatın (11K3, 11Ç3.2, 5B4, 1B2, 1K8, 1Ç1, 6N4, 3B2, 3B7, 1B2, 5N6, 6N8, 5N9, 6N1, 6B8, 6B4, 6B1, 6MR8, 5P3, 5P1, 5P4, 5P5, 5M5 ve 6M6 izolatları) OD değerinin 500’ün altında, 26 izolatın (6B8, 1K5.1, 7Ç7, 5P3, 1K8, 7N2, 5M5, 2B9.1, 1B1.1, 19P1, 24P2, 14P2, 21P1, 7B6.1, 7B6.2, 6N10.2, 1K5, 2Ç5, 6N10, 5B10, 5B6, 5B4 ve 5B9 izolatları) ise OD değerinin 500’ün üzerinde olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 3.7. Katalaz (+) Gram (+) bakteri izolatlarının mikrotitre plaka yöntemi ile glukoz ortamındaki biyofilm oluşumları. OD570<0,120 (-), OD570<0,240 (+), OD570<0,500 (++) , OD570>0,500 (+++)

KATALAZ (+) GRAM (+) BAKTERİ İZOLATLARI	
İzolat numarası	Biyofilm oluşumu
14P1, 7E3.1, 7E3.2, 12K1.1, 3B7, 6MR4, 6B2, 5M9, 5M4, 5M2, 5M1, 6M10, 5M6, 2M7, 6M9	(-)
11K1, 1K2, 1K3, 1K1, 1Ç5, 6N3, 5N8, 6N2, 5N10, 2B9, 5B5, 1B2, 1B1.1, 6MR5, 5B3, 6M2, 5M7	(+)
11K3, 11Ç3.2, 5B4, 1B2, 1K8, 1Ç1, 6N4, 3B2, 3B7, 1B2, 5N6, 6N8, 5N9, 6N1, 6B8, 6B4, 6B1, 6MR8, 5P3, 5P1, 5P4, 5P5, 5M5, 6M6	(++)
6B8, 1K5.1, 7Ç7, 5P3, 1K8, 7N2, 5M5, 2B9.1, 1B1.1, 19P1, 24P2, 14P2, 21P1, 7B6.1, 7B6.2, 6N10.2, 1K5, 2Ç5, 6N10, 5B10, 5B6, 5B4, 5B9, 5B7, 6MR9, 5M3	(+++)

Çizelge 3.8’de 18 maya izolatının mikrotitre plaka yöntemi ile glukoz ortamındaki biyofilm oluşum sonuçları verilmiştir. Optik dansite (OD) sonuçlara bakıldığında, 7 izolatın (27P2, 21P2, 18P1, 24P1, 14P1, 15P ve 25P1 izolatları) OD değerinin 500’ün altında, 11 izolatın (19P3, 13P1, 13P2, 16P3, 17P2, 30P, 29P, 1Ç3, 5MR2, 8MR11 ve 16P izolatları) ise OD değerinin 500’ün üzerinde olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 3.8. Maya izolatlarının mikrotitre plaka yöntemi ile glukoz ortamındaki biyofilm oluşumları. OD570<0,120 (-), OD570<0,240 (+), OD570<0,500 (++) , OD570>0,500 (+++)

MAYA İZOLATLARI	
İzolat numarası	Biyofilm oluşumu
27P2, 21P2, 18P1, 24P1, 14P1, 15P, 25P1	(++)
19P3, 13P1, 13P2, 1Ç2, 17P2, 30P, 29P, 1Ç3, 5MR2, 8MR11, 16P	(+++)

3.2.3. Maya izolatlarının hemolitik aktivite sonuçları

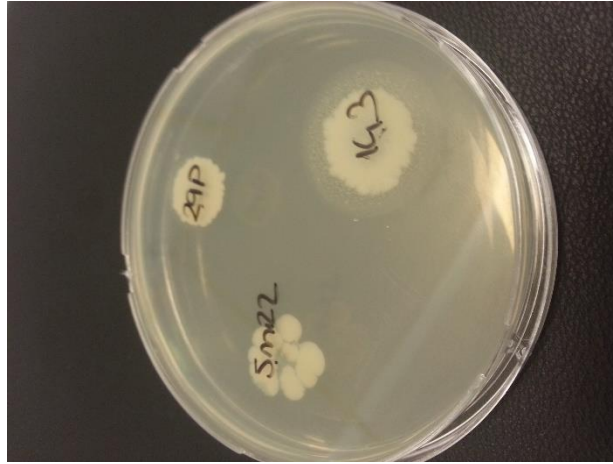
Çizelge 3.9’da vajinadan izole edilen maya izolatlarının hemolitik aktivite sonuçları verilmiştir. Çalışma sonucunda maya izolatlarında; 27P2, 15P, 16P, 19P3, 14P1, 1Ç2, 21P2, 17P2, 23P izolatlarında yeşil zon, 29P, 18P1, 24P1, 30P, 14P3, 8MR14, 13P1, 13P2, 5MR2 izolatlarında ise zon oluşumunun ortaya çıkmadığı rapor edilmiştir.



Şekil 3.4. Kanlı agarda hemolitik aktivitenin belirlenmesi

3.2.4. Maya izolatlarının lipolitik enzim aktivite sonuçları

Çizelge 3.9’da vajinadan izole edilen 18 maya izolatının, tween 80 agarlı besiyeri yüzeyindeki zon oluşumları verilmiştir. Çalışma sonucunda 21P2, 24P1, 25P, 5MR2, 14P1, 19P3, 27P2, 1Ç2, 17P2 ve 16P izolatlarının agar yüzeyinde zon oluşturmadığı ortaya konmuştur. Diğer 8 izolatın ise 4 – 20 mm aralığında değişen oranlarda zon oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 3.5). En küçük zon çapı 4 mm ile 29P izolatına, en düşük zon çapı 20 mm ile 13P2 izolatına ait olduğu rapor edilmiştir.



Şekil 3.5. Tween 80 agarlı besiyerinde lipolitik enzim aktivitesi

3.2.5. Maya izolatlarının fosfolipaz enzim aktivite sonuçları

Çizelge 3.9’da vajinadan izole edilen 18 maya izolatının, fosfolipaz enzim aktiviteleri verilmiştir. Çalışma sonucunda izolatların 0,33 – 0,42 mm arasında zon oluşturduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3.9. Maya izolatlarının aktivite ve tanımlama sonuçları. Değerler mm cinsinden verilmiştir

	İzolat numarası	Lipolitik aktivite	Fosfolipaz aktivitesi	Hemolitik aktivitesi	MALDI-TOF sonucu
1	21P2	(-)	0.36	Alfa hemoliz	<i>Candida albicans</i>
2	24P1	(-)	0.4	Non-hemoliz	<i>C. albicans</i>
3	25P1	(-)	0.42	Alfa hemoliz	<i>C. albicans</i>
4	5MR2	(-)	0.39	Non-hemoliz	<i>C. albicans</i>
5	14P1	(-)	0.4	Alfa hemoliz	<i>C. albicans</i>
6	19P3	(-)	0.36	Non-hemoliz	<i>C. albicans</i>
7	27P2	(-)	0.38	Alfa hemoliz	<i>C. albicans</i>
8	1Ç2	(-)	0.4	Alfa hemoliz	<i>C. albicans</i>
9	17P2	(-)	0.42	Alfa hemoliz	<i>C. albicans</i>
10	16P	(-)	0.38	Alfa hemoliz	<i>C. albicans</i>
11	1Ç3	8	0.39	Alfa hemoliz	<i>C. albicans</i>
12	15P	16	0.4	Alfa hemoliz	<i>Candida</i>
13	8MR11	16	0.36	Non-hemoliz	<i>C. glabrata</i>
14	13P1	16	0.33	Non-hemoliz	<i>C. glabrata</i>
15	13P2	20	0.38	Non-hemoliz	<i>C. glabrata</i>
16	18P1	10	0.41	Non-hemoliz	<i>C. tropicalis</i>
17	30P	8	0.4	Non-hemoliz	<i>C. tropicalis</i>
18	29P	4	0.39	Non-hemoliz	<i>C. tropicalis</i>

3.2.6. LAB izolatlarının API CHL 50 ile karbonhidrat kullanma durumlarının belirlenmesi

Çizelge 3.10’da izole edilen 76 katalaz negatif (-) bakteri izolatının API CHL50 sistemi ile tanımlama sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlara göre; 76 izolatın 9 tanesi *Lactobacillus acidophilus*, 2 tanesi *Lactobacillus plantarum*, 6 tanesi *Lactobacillus pentosus*, 10 tanesi *Lactobacillus fermentum*, 16 tanesi *Lactobacillus paracesei* spp. *paracesei*, 18 tanesi *Lactobacillus crispatus* olarak tanımlanmıştır. 15 izolat ise tanımlanamamıştır.

Çizelge 3.10. Laktik asit bakteri izolatlarının API CHL 50 sistemi ile tanımlanmaları

İzolot numaraları	API CHL 50 sonucu	% benzerlik
7MR4,7MR13.3	<i>Lactobacillus crispatus</i>	99,9
7MR3, 8MR8, 7MR5, 7MR8, 7MR1,8MR9,8MR1 8MR6, 10MR3, 8MR3, 8MR4, 8MR1	<i>L. crispatus</i>	99,7
7MR7.4	<i>L. crispatus</i>	99,3
8MR12	<i>L. crispatus</i>	99,0
8MR19, 8MR20	<i>L. crispatus</i>	98,4
2MR5	<i>Lactobacillus fermentum</i>	97,3
5MR3, 5MR1, 5MR8, 5MR4, 5MR6,11MR4, 11MR5, 11MR20	<i>L. fermentum</i>	95,3
1MR1.1	<i>L. fermentum</i>	88,9
1MR3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	98,6
10MR5, 10MR15, 10MR16, 10MR4, 10MR14	<i>L. acidophilus</i>	97,4
8MR14, 8MR2, 10MR6	<i>L. acidophilus</i>	95,3
2MR4, 2MR1, 2MR2, 8MR5, 8MR7	<i>L. acidophilus</i>	58,8
10MR7, 4M5, 8M4	<i>L. paracesei</i> spp. <i>paracesei</i>	99,9
10MR2, 10MR8, 3M2, 3M6, 8M9, 8M5, 8M2, 11M6, 11M10, 10M7	<i>Lactobacillus paracesei</i> spp. <i>paracesei</i>	99,6
8M1	<i>L. paracesei</i> spp. <i>paracesei</i>	97,7
1M2.1	<i>L. paracesei</i> spp. <i>paracesei</i>	88,1
10MR9, 10MR18	<i>L. paracesei</i> spp. <i>paracesei</i>	80,5
2M2	<i>L. paracesei</i> spp. <i>paracesei</i>	78,1
8M7, 4M10, 1M1.2, 8M10, 11MR12, 11MR19	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99,9
8M8	<i>L. pentosus</i>	94,9
10M10, 10M10	<i>L. pentosus</i>	92,0
9M8	<i>L. pentosus</i>	88,9
9M3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,2
9M7	<i>L. plantarum</i>	80,5
9M1	<i>L. plantarum</i>	72,6
10MR12, 10MR13	<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>delbrueckii</i>	92,8
10MR1	<i>Lactobacillus</i>	45

3.2.7. LAB izolatlarının 16S rRNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyonlarının belirlenmesi

Çizelge 3.11’de seçilen LAB izolatlarının 16S rRNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyon sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlara göre; 14 LAB’sinden 3 tanesi *Lactobacillus crispatus* (1MR3, 2MR5, 7MR5), 5 tanesi *L. jensenii* (2MR1, 5MR1, 10MR5, 10MR6, 10MR14) ve 6 tanesi de %99 benzerlikle *Enterococcus faecalis* (3M2, 5MR6, 8M10, 9M3, 9M8, 11M10) olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.11. Laktik Asit Bakteri izolatlarının 16S rRNA dizi analizi ile genotipik karakterizasyon sonuçları

İzolat Numarası	16s rRNA sonucu	% benzerlik	Accession
1MR3	<i>L. crispatus</i>	%99	LC065039.1
2MR1	<i>L. jensenii</i>	%99	KF740715.1
2MR5	<i>L. crispatus</i>	%99	LC065039.1
3M2	<i>E. faecalis</i>	%99	KT260534.1
5MR1	<i>L. jensenii</i>	%99	AF243159.1
5MR6	<i>E. faecalis</i>	%99	LC096215.1
7MR5	<i>L. crispatus</i>	%99	LC065039.1
8M10	<i>E. faecalis</i>	%99	LC096215.1
9M3	<i>E. faecalis</i>	%99	LC096215.1
9M8	<i>E. faecalis</i>	%99	LC096215.1
10MR5	<i>L. jensenii</i>	%99	KF740715.1
10MR6	<i>L. jensenii</i>	%99	KF740715.1
10MR14	<i>L. jensenii</i>	%99	AF243159.1
11M10	<i>E. faecalis</i>	%99	LC096215.1

3.2.8. Diğer bakteri izolatlarının VITEK II ile tanımlanmaları

Çizelge 3.12’de katalaz pozitif bakterilerin VITEK II ile tanımlanma sonuçları verilmiştir. VITEK – II ile toplam 63 katalaz pozitif bakteri izolatı tanımlanmak üzere test edilmiştir. Çalışma sonucunda 63 izolattan 10 tanesi *Bacillus vallismortis*, 1 tanesi *Staphylococcus caprae*, 1 tanesi *Staphylococcus sciuri*, 1 tanesi *Staphylococcus hominis* ssp. *hominis*, 8 tanesi *Staphylococcus epidermidis*, 8 tanesi *Staphylococcus lentus*, 10 tanesi *Staphylococcus lugdunensis*,

23 tanesi *Staphylococcus haemolyticus* ve 1 tanesi *Kocuria kristinae* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.12. Katalaz pozitif bakterilerin VITEK II ile tanımlanmaları

İzolat numaraları	VITEK - II sonucu	% Benzerlik
7Ç7	<i>Bacillus vallismortis</i>	%89
5M6	<i>B. vallismortis</i>	%87
5B6, 5P2, 5B3	<i>B. vallismortis</i>	%86
5N8, 10E3, 5M1,5B5, 5M7	<i>B. vallismortis</i>	%85
6M2.2, 6M9.2, 6MR5.2, 1K2.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	%99
6N10, 6N4	<i>E. faecalis</i>	%98
6N8.2	<i>E. faecalis</i>	%97
1B1.1	<i>E. faecalis</i>	%94
11M3	<i>Kocuria kristinae</i>	%92
11N4	<i>Staphylococcus caprae</i>	%99
1Ç1, 7K9, 11Ç8, 7N6, 12K2.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	%99
7N5	<i>S. epidermidis</i>	%98
7Ç5	<i>S. epidermidis</i>	%96
11K8	<i>S. epidermidis</i>	%91
7 E2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	%99
7K10.1, 7M10, 7N3, 7N10, 7M5, 7Ç3, 7M9, 7Ç2, 7M8, 7B3.1, 7M7, 7M6, 7E9.1, 7E6.1, 7E5.1, 7Ç6, 7Ç8, 7K7, 7B10, 7B2	<i>S. haemolyticus</i>	%98
7M2	<i>S. haemolyticus</i>	%96
7M3	<i>S. haemolyticus</i>	%95
7 E10	<i>Staphylococcus hominis ssp. hominis</i>	%92
10M1	<i>Staphylococcus lentus</i>	%94
11Ç6, 11K1	<i>S. lentus</i>	%92
12N1	<i>S. lentus</i>	%89
7B5	<i>S. lentus</i>	%88
7N4, 11N6	<i>S. lentus</i>	%87
10M8	<i>S. lentus</i>	%85
11Ç7, 11N3, 7Ç1.1, 11N2.1, 12B5.1, 11Ç5.1, 7Ç10.1, 11K2, 11K3, 11N1	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	%99
7 E4	<i>Staphylococcus sciuri</i>	%88
7K8.1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	%85

3.2.9. Maya izolatlarının MALDI – TOF Kütle Spektrometre Tekniği'yle tanımlanmaları

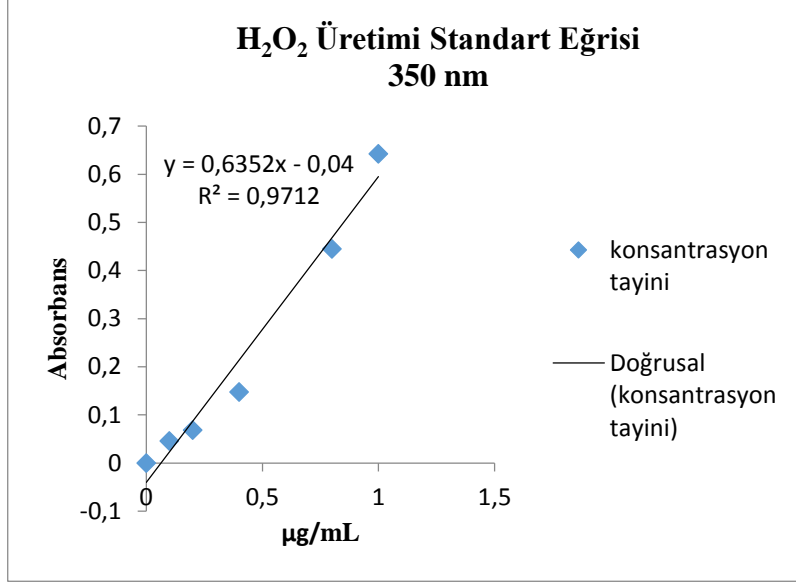
Çizelge 3.9'da maya izolatlarının MALDI – TOF Kütle Spektrometre Tekniği'yle tanımlanma sonuçları verilmiştir. Bu test sonucunda 18 maya izolatının 11 tanesi *C. albicans*, 3 tanesi *C. glabrata*, 3 tanesi *C. tropicalis* ve 1 tanesi de *Candida* cinsi olarak tanımlanmıştır.

3.3. LAB izolatlarının metabolik ürün sonuçları

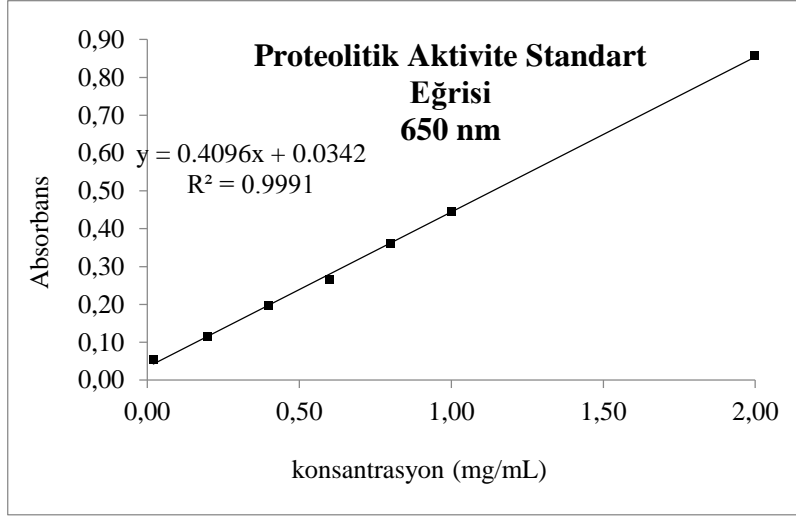
Vajinadan izole edilip tanımlanan 76 laktik asit bakterisinden zaman içerisinde ancak 72 izolat stoktan gelişirken diğerleri gelişmemiştir. Dolayısıyla bazı çalışmalarda bu 72 izolatla deneyler gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.13'te vajinadan izole edilen LAB 'lerinin laktik asit, hidrojen peroksit ve proteolitik aktivite miktarları verilmiştir.

Laktik asit üretim miktarı sonuçlarına baktığımızda, 72 izolatın laktik asit üretimi %0,91 – 2,684 arasında bulunurken, 10M7 izolatı en düşük, 5MR6 izolatı ise en yüksek laktik asit üretimine sahip izolat olarak belirlenmiştir. Ayrıca Şekil 3.6'da hidrojen peroksit üretiminin belirlenmesi için kullanılan standart eğri gösterilmiştir. Hidrojen peroksit üretim miktarı sonuçlarına baktığımızda ise, 72 izolatın hidrojen peroksit üretimi 0,308 – 0,934 µg/mL arasında bulunurken, 5MR8 izolatı en düşük, 11M10 izolatı ise en yüksek hidrojen peroksit üretimine sahip izolat olarak belirlenmiştir. Proteolitik aktivite miktar tayininde ise, izolatların proteolitik aktivite miktarları 1,047±0,000 ile 14,438±0,003 mg/mL arasında değişkenlik göstermiştir. 11MR20 izolatı en düşük, 10MR6 izolatı ise en yüksek proteolitik aktivite miktarına sahip izolat olarak belirlenmiştir. Ayrıca Şekil 3.7'de proteolitik aktivite miktarının belirlenmesi için kullanılan standart eğri gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Hidrojen peroksit üretimi standart eğrisi (350 nm)



Şekil 3.7. Proteolitik aktivite standart eğrisi (650 nm)

Çizelge 3.13. LAB izolatlarının laktik asit, hidrojen peroksit ve proteolitik aktivite miktarları

İzolat numarası	% Asitlik	Hidrojen Peroksit Miktarı (µg/mL)	Proteolitik Aktivite Miktarı Tirozin (mg/mL)
1MR3	1,41	0,569±0,016	8,693±0,000
1MR1.1	2,093	0,499±0,199	3,898±0,001
1M1.2	1,001	0,787±0,002	9,663±0,001
1M2.1.1	0,955	0,878±0,030	10,264±0,002
2MR1	2,184	0,608±0,016	11,562±0,000
2MR2	1,274	0,423±0,080	1,621±0,001
2MR5	2,275	0,334±0,075	2,131±0,000
2M2	1,092	0,829±0,030	11,650±0,000
3M2	1,183	0,808±0,040	11,079±0,000
3M6	1,41	0,778±0,022	9,047±0,003
4M5	1,592	0,807±0,025	1,721±0,275
4M10	1,228	0,770±0,026	1,672±0,000
5MR1	2,229	0,620±0,060	3,481±0,000
5MR3	1,911	0,389±0,106	11,303±0,012
5MR4	1,956	0,572±0,006	10,724±0,002
5MR6	2,684	0,555±0,164	1,442±0,001
5MR8	2,002	0,308±0,079	1,736±0,001
7MR1	2,184	0,680±0,025	1,640±0,000
7MR4	2,275	0,589±0,000	4,472±0,000
7MR5	2,366	0,629±0,034	1,976±0,000
7MR7.4	2,093	0,584±0,166	1,724±0,000
7MR8	1,865	0,525±0,172	5,236±0,002
7MR13.3	1,911	0,507±0,144	1,656±0,000
8MR1	1,547	0,705±0,080	1,144±0,001
8MR2	1,365	0,389±0,030	1,747±0,000
8MR3	1,41	0,406±0,001	10,671±0,004
8MR4	1,82	0,502±0,123	1,518±0,001
8MR5.1	2,002	0,595±0,014	1,940±0,000
8MR5.2	1,82	0,480±0,215	1,852±0,000
8MR6.1	1,729	0,557±0,053	7,527±0,002
8MR7	1,456	0,595±0,087	13,046±0,003
8MR9	1,911	0,607±0,123	1,868±0,001
8MR19	2,138	0,620±0,064	1,998±0,000
8MR20	2,502	0,682±0,019	2,244±0,000
8M1	1,001	0,756±0,019	1,815±0,000
8M2	1,001	0,866±0,020	11,225±0,000

Çizelge 3.13. (Devam) LAB izolatlarının laktik asit ve hidrojen peroksit üretim miktarları

8M4	1,183	0,764±0,036	11,607±0,002
8M5	1,092	0,724±0,028	11,782±0,000
8M7	0,978	0,778±0,002	12,324±0,000
8M8	1,046	0,788±0,049	8,798±0,003
8M9	0,955	0,720±0,069	12,265±0,000
8M10	1,001	0,747±0,004	9,887±0,003
9M1	1,092	0,793±0,001	1,845±0,000
9M3	1,092	0,836±0,034	1,754±0,000
9M7	0,955	0,802±0,047	6,054±0,000
9M8	1,046	0,805±0,046	7,667±0,002
10MR1	2,002	0,606±0,050	2,118±0,002
10MR2	2,275	0,730±0,000	1,313±0,000
10MR3	2,184	0,473±0,074	1,572±0,001
10MR4	1,911	0,773±0,000	1,132±0,000
10MR5	2,366	0,663±0,079	1,862±0,000
10MR6	2,548	0,584±0,043	14,438±0,003
10MR8	1,456	0,699±0,068	1,394±0,000
10MR9	1,683	0,607±0,017	1,267±0,000
10MR12	1,638	0,707±0,160	1,349±0,000
10MR13	1,911	0,364±0,041	2,006±0,000
10MR7	1,274	0,392±0,008	3,552±0,001
10MR14	1,82	0,597±0,066	4,233±0,000
10MR15	1,638	0,628±0,077	1,662±0,000
10MR16.1	2,093	0,524±0,059	1,444±0,000
10MR16.2	2,138	0,584±0,046	1,552±0,000
10MR18	1,729	0,652±0,071	1,695±0,000
10M3	1,274	0,863±0,096	2,021±0,000
10M7	0,91	0,822±0,059	1,367±0,000
10M10	1,137	0,834±0,027	2,127±0,002
11MR4	1,797	0,602±0,079	13,496±0,000
11MR12	1,865	0,672±0,001	2,054±0,000
11MR19	1,365	0,411±0,000	10,966±0,003
11MR20	2,093	0,633±0,049	1,047±0,000
11M6	1,228	0,750±0,047	11,494±0,003
11M10	1,183	0,934±0,132	3,251±0,000
12M6.1	1,046	0,776±0,047	11,821±0,003

3.4. LAB İzolatlarının Probiyotik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

3.4.1. LAB izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Çizelge 3.14’te tanımlanan LAB izolatlarının Kirby- Bauer disk difüzyon yöntemiyle test edilmiş antibiyotik duyarlılıkları verilmiştir. Ampisilin, eritromisin, gentamisin, klindamisin, metisilin, metronidazol, okzasilin, penisilin, sefalotin, sülfometoksazol + trimetoprim, tetrasiklin ve vankomisin olmak üzere toplam 12 farklı antibiyotik kullanılmıştır. Çalışma sonucunda LAB izolatlarının antibiyotiklere olan duyarlılıkları birbirinden farklılık göstermiş olmasına rağmen, izolatların en az metronidazole, en fazla ise vankomisine duyarlılık gösterdiği bulunmuştur. 4M5, 4M10 ve 8M1 izolatları tüm antibiyotiklere karşı duyarlılık gösterirken, 8MR4, 8MR5.1, 10MR5, 10MR6, 10MR19 ve 11MR4 izolatları tüm antibiyotiklere dirençlilik göstermiştir.

Çizelge 3.14. LAB izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları. Değerler mm cinsinden verilmiştir (R: dirençli)

İZOLAT NUMARASI	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Klindamisin	Metisilin	Metronidazol	Okzasilin	Penisilin	Sefalotin	Sülfometoksazol + Trimetoprim	Tetrasiklin	Vankomisin
1MR3	6	6	2	4	2	R	R	R	6	R	R	8
2MR1	R	R	6	R	5	R	R	R	R	R	R	12
2MR5	30	30	18	32	R	R	R	32	32	R	24	18
2M2	22	44	28	14	R	R	R	30	30	10	20	20
3M2	24	R	4	R	R	R	6	10	R	R	R	10
3M6	24	R	4	R	R	R	4	10	8	R	R	12
4M5	24	10	6	6	4	6	8	14	12	2	6	18
4M10	20	2	2	2	6	6	4	12	5	2	2	10
5MR1	R	R	6	R	R	R	R	R	R	R	18	18
5MR4	38	46	30	30	R	R	R	42	36	R	20	22
5MR6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2

Çizelge 3.14. (Devam) LAB izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları. Değerler mm cinsinden verilmiştir (R: dirençli)

5MR8	22	34	26	30	R	R	R	12	12	R	24	R
7MR4	R	22	R	R	R	R	R	R	R	R	R	8
7MR5	R	26	R	R	R	R	R	R	R	R	R	24
7MR7.4	R	24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12
7MR8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	24	R
7MR13.1	20	R	20	R	R	R	R	12	10	R	4	12
7MR13.3	8	R	R	R	R	10	R	8	R	16	14	8
8MR1	26	28	16	R	R	R	14	40	26	R	12	22
8MR4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
8MR5.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
8MR5.2	R	R	R	R	R	R	20	24	R	R	24	22
8MR7	24	10	8	R	R	R	R	16	10	R	4	14
8MR8	16	14	12	R	R	R	R	26	10	R	18	24
8MR9	6	R	8	R	R	R	R	24	4	R	12	20
8MR19	8	4	6	6	4	R	R	R	6	R	R	4

Çizelge 3.14. (Devam) LAB izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları. Değerler mm cinsinden verilmiştir (R: dirençli)

8MR20	R	14	R	R	R	R	R	R	R	R	R	10
8M1	12	6	6	6	4	4	2	16	8	3	4	10
8M2	20	12	4	R	R	R	R	14	10	R	14	10
8M4	22	R	6	R	R	R	R	14	10	R	R	12
8M7	22	R	6	4	2	R	R	18	4	4	R	12
8M8	22	R	6	R	R	R	R	18	8	R	4	12
8M10	12	6	8	R	R	R	R	14	8	R	4	12
9M1	20	R	4	R	2	R	R	14	4	R	2	12
9M3	R	10	6	R	8	R	R	18	10	R	4	12
9M7	18	10	6	R	2	2	R	14	10	14	4	12
9M8	26	14	6	6	R	R	4	12	8	R	3	12
10MR1	R	R	16	R	R	R	R	R	R	R	18	26
10MR2	24	44	16	R	R	R	10	16	4	R	6	16
10MR3	42	48	26	38	R	R	8	42	38	R	22	26
10MR4	R	R	16	R	R	R	R	20	R	R	20	R
10MR5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
10MR6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Çizelge 3.14. (Devam) LAB izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları. Değerler mm cinsinden verilmiştir (R: dirençli)

10MR7	28	18	12	R	R	R	R	20	8	R	10	R
10MR8	R	14	12	R	R	R	R	18	14	24	6	20
10MR12	R	50	20	R	R	R	R	R	R	R	26	26
10MR13	28	4	14	28	R	R	R	38	30	R	14	22
10MR14	22	12	10	R	R	R	R	12	10	R	4	12
10MR15	R	12	R	R	R	R	R	16	10	20	2	12
10MR16.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	10	R
10MR16.2	40	24	10	6	10	R	R	26	14	R	16	R
10MR18	R	16	22	R	R	R	R	6	14	R	10	R
10MR19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
10M3	14	12	R	R	R	4	R	16	12	R	R	12
10M7	11	12	4	R	R	4	4	12	8	2	4	12
10M10	14	10	6	R	R	R	R	16	8	18	3	12
11MR4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
11MR12	18	20	12	24	R	R	R	8	10	R	R	R
11MR19	24	R	14	R	R	R	R	10	10	R	10	R

Çizelge 3.14. (Devam) LAB izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları. Değerler mm cinsinden verilmiştir (R: dirençli)

11MR20	28	16	10	R	R	R	R	18	12	R	R	R
11M6	18	4	6	R	8	2	6	14	8	4	8	8
11M10	28	12	6	R	R	R	R	16	12	R	4	12
12M6.1	22	2	4	R	6	R	R	12	4	R	4	12

3.4.2. LAB izolatlarının antifungal aktivite sonuçları

Çizelge 3.15'te vajinadan izole edilip tanımlanan 72 LAB'sinin yine vajinadan izole edilen 18 *Candida* türüne (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*) karşı göstermiş olduğu antifungal aktivite sonuçları verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, 2MR5, 7MR8, 7MR13.1 ve 7MR13.3 izolatlarının hiçbir *Candida* türüne karşı antifungal aktivite göstermediği gözlenmiştir. Ayrıca tüm LAB izolatının *C. tropicalis* 1Ç2, *C. tropicalis* 29P ve *C. albicans* 25P1 izolatlarına karşı zon oluşturmadığı gözlenmiştir. Diğer LAB izolatlarında ise zon oluşumlarının 2 – 38 mm arasında değişkenlik gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 3.8). En düşük zon oluşumunun (2 mm) 10MR14 izolatının, 30P *C. albicans* 30P üzerine, en yüksek zon oluşumunun (38 mm) ise; 10MR5 izolatının, *C. glabrata* 16P izolatı üzerine olduğu saptanmıştır.



Şekil 3.8. LAB izolatlarının *Candida* izolatları üzerindeki antifungal aktiviteleri

Çizelge 3.15. LAB izolatlarının antifungal aktiviteleri. Zon çapları mm cinsinden verilmiştir

İzolat numarası	<i>C. tropicalis</i> 1Ç3	<i>C. glabrata</i> 5MR2	<i>C. glabrata</i> 16P	<i>C. glabrata</i> 17P2	<i>Candida</i> 15P	<i>C. albicans</i> 8MR11	<i>C. albicans</i> 13P1	<i>C. albicans</i> 13P2	<i>C. albicans</i> 14P1	<i>C. albicans</i> 18P1	<i>C. albicans</i> 19P3	<i>C. albicans</i> 21P2	<i>C. albicans</i> 24P1	<i>C. albicans</i> 27P2	<i>C. albicans</i> 30P
2MR5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7MR7.4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	8	8	10	(-)
7MR8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7MR13.1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
7MR13.3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
10MR9	(-)	(-)	12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	12	10	14	(-)
5MR1	(-)	(-)	18	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	8	8	10	(-)
8MR20	(-)	(-)	8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	6	4	8	(-)
5MR6	(-)	(-)	18	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	18	12	8	(-)
10MR12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	10	6	(-)
8MR1	(-)	(-)	14	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	12	12	4	(-)
8MR3	(-)	(-)	18	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	8	14	4	(-)
10MR5	(-)	(-)	38	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	10	14	8	(-)
1MR1.1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	4	4	10	(-)
10MR16.2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	14	10	8	(-)
10MR18	(-)	(-)	16	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	20	10	10	(-)

Çizelge 3.15. (Devam) LAB izolatlarının antifungal aktiviteleri. Zon çapları mm cinsinden verilmiştir

5MR8	(-)	(-)	18	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	16	6	8	(-)
8MR2	(-)	(-)	14	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	26	10	4	(-)
5MR4	(-)	(-)	12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	18	8	10	(-)
8MR19	(-)	(-)	10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	10	8	(-)	(-)
10MR2	(-)	(-)	16	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	16	8	12	(-)
10MR13	(-)	(-)	12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	8	6	12	(-)
7MR1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	6	4	6	(-)
10MR16.1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	4	(-)	(-)
8MR7	(-)	(-)	12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	14	24	12	(-)
8MR5.1	(-)	(-)	16	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	14	24	10	(-)
10MR8	(-)	(-)	22	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	14	20	10	(-)
10MR4	(-)	(-)	22	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	10	18	10	(-)
10MR1	(-)	(-)	20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	10	12	14	(-)
11MR19	(-)	(-)	14	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	8	12	10	(-)
10MR7	(-)	(-)	16	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	14	10	10	(-)
8MR9	(-)	(-)	18	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	18	18	12	(-)
8MR4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	14	8	8	(-)
8MR6.1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	14	10	6	(-)
8MR5.2	(-)	(-)	18	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	8	8	6	(-)
7MR5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	8	4	10	(-)
7MR4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	14	(-)	(-)	(-)
10MR15	(-)	(-)	18	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	10	8	12	(-)

Çizelge 3.15. (Devam) LAB izolatlarının antifungal aktiviteleri. Zon çapları mm cinsinden verilmiştir

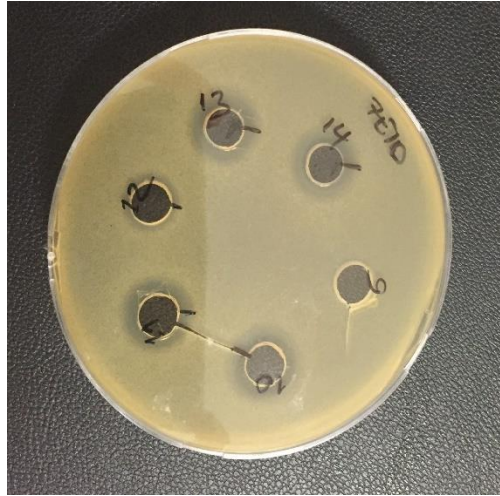
1MR3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	10	14	10	(-)
11MR4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	12	12	8	(-)
8M1	8	6	(-)	(-)	(-)	8	4	5	(-)	6	4	8	6	6	(-)
4M5	6	4	(-)	(-)	4	5	4	6	(-)	4	6	6	4	8	(-)
4M10	6	6	(-)	(-)	4	6	6	5	(-)	5	6	6	7	6	6
11M6	6	6	(-)	(-)	4	7	6	6	(-)	5	4	4	6	4	(-)
8M8	6	4	(-)	(-)	6	6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	6	8	5	(-)
8M10	6	(-)	(-)	(-)	6	6	2	(-)	(-)	4	(-)	5	6	4	(-)
2M2	10	(-)	(-)	(-)	6	7	4	6	(-)	6	(-)	8	7	4	(-)
1M2.1.1	10	(-)	(-)	(-)	(-)	5	4	(-)	(-)	6	2	5	6	6	(-)
11M10	8	(-)	(-)	(-)	(-)	5	8	3	4	5	6	6	5	(-)	6
8M5	8	(-)	(-)	(-)	(-)	2	4	4	(-)	8	6	5	6	6	4
3M6	10	(-)	(-)	(-)	(-)	6	6	8	(-)	6	8	5	5	(-)	4
9M8	10	(-)	(-)	(-)	(-)	4	4	(-)	4	6	8	6	4	8	4
10M7	8	(-)	(-)	(-)	(-)	4	6	4	(-)	6	6	5	4	6	6
9M7	10	(-)	(-)	4	(-)	6	6	(-)	6	5	6	5	6	6	6
3M2	6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	4	4	6	9	6	4	8	5	6
9M3	6	(-)	(-)	(-)	(-)	3	8	4	6	8	6	6	4	11	4
8M7	8	(-)	(-)	(-)	4	(-)	(-)	(-)	4	4	6	4	4	6	6
8M4	6	(-)	(-)	(-)	3	(-)	(-)	(-)	6	4	8	5	6	4	4
10M10	4	(-)	(-)	5	3	(-)	(-)	(-)	6	(-)	8	4	6	4	6
10M3	4	(-)	(-)	4	4	(-)	(-)	(-)	4	4	8	6	4	4	6

Çizelge 3.15. (Devam) LAB izolatlarının antifungal aktiviteleri. Zon çapları mm cinsinden verilmiştir

8MR8	8	(-)	(-)	(-)	4	(-)	(-)	(-)	6	4	10	7	7	4	4
8MR12	10	(-)	(-)	(-)	6	(-)	6	(-)	(-)	(-)	10	4	4	9	6
11MR12	6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	10	5	5	11	6
10MR3	6	(-)	(-)	(-)	4	(-)	(-)	(-)	4	(-)	10	5	6	6	6
2MR2	8	(-)	(-)	(-)	6	8	6	7	6	8	6	7	6	(-)	4
8MR14	8	(-)	(-)	8	4	8	4	8	6	6	12	7	5	(-)	4
8M9	4	(-)	(-)	(-)	5	8	6	8	4	9	6	5	8	(-)	4
12M6.1	10	(-)	(-)	(-)	6	8	6	6	4	10	6	4	5	(-)	4
9M1	8	(-)	(-)	(-)	4	7	6	(-)	4	4	6	6	5	(-)	4
8M2	10	(-)	(-)	(-)	4	6	6	(-)	(-)	7	4	4	4	4	4
2MR1	8	(-)	(-)	(-)	3	8	8	(-)	6	7	(-)	4	6	6	4
11MR20	10	(-)	(-)	(-)	6	6	6	(-)	6	6	8	5	8	(-)	6
5MR3	6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	4	6	8	6	3	8	4
10MR14	8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	8	5	4	8	2
10MR6	6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	4	4	10	6	6	10	6
8MR6.1	8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	4	6	6	8	5	10	5

3.4.3. LAB izolatlarının antibakteriyal aktivite sonuçları

Çizelge 3.16’da vajinadan izole edilen 76 LAB’sinden yüksek hidrojen peroksit ve laktik asit miktarına sahip 12 LAB’sinin yine vajinadan izole edilen 13 patojen bakteriye (*Staphylococcus intermedius*, *S. epidermidis*, *S. pasteurii*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. hominis*, *S. caprae*, *S. lugdunensis*, *S. caprae*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus vallismortis*, *Enterococcus faecalis* ve *Kocuria kristinae*) karşı göstermiş olduğu antibakteriyal aktivite sonuçları verilmiştir. Çalışmada ayrıca *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşları da test edilmiştir. Çalışma sonucunda, 11M10, 9M3 ve 3M2 LAB izolatu, hiçbir patojen bakteriye karşı zon oluşturmamıştır. Diğer patojen bakterilere karşı oluşan zon çapları ise 2 – 10 mm arasında değişkenlik göstermiştir (Şekil 3.9). 2MR5 LAB izolatının, tüm patojen bakteriler üzerinde en yüksek zon oluşumuna neden olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca tüm LAB’lerinin, en fazla *Streptococcus agalactiae* 7K8.1 izolatına karşı inhibisyon zonu oluşturduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.9. LAB izolatlarının Agar Difüzyon Tekniği’yle antibakteriyal aktiviteleri

Çizelge 3.16. LAB izolatlarının Agar Difüzyon Tekniği'yle antibakteriyal aktiviteleri

izolat numarası	Enzimler	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>S. intermedius</i> 1K5.1	<i>S. epidermidis</i> 1K8	<i>S. pasteurii</i> 2Ç5	<i>S. haemolyticus</i> 7B2	<i>S. sciuri</i> 7 E4	<i>S. hominis</i> 7 E10	<i>S. caprae</i> 7N4	<i>S. lugdunensis</i> 11N1	<i>S. caprae</i> 11N4	<i>S. agalactiae</i> 7K8.1	<i>B. vallismortis</i> 5M5	<i>E. faecalis</i> 6N10	<i>K. kristinae</i> 11M3
9M8	Saf Filtrat	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nötralizasyon Filtratı (pH 5.5)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	Proteinaz K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Katalaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
11M10	Saf Filtrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nötralizasyon Filtratı (pH 5.5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Proteinaz K	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Katalaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9M3	Saf Filtrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nötralizasyon Filtratı (pH 5.5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Proteinaz K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Katalaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Çizelge 3.16. (Devam) LAB izolatlarının Agar Difüzyon Tekniği'yle antibakteriyal aktiviteleri

8M10	Saf Filtrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Nötralize Filtrat (pH 5.5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Proteinaz K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Katalaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2MR1	Saf Filtrat	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	Nötralize Filtrat (pH 5.5)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	Proteinaz K	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
	Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5MR1	Saf Filtrat	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	Nötralize Filtrat (pH 5.5)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	Proteinaz K	+		+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+
	Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2MR5	Saf Filtrat	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nötralize Filtrat (pH 5.5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	Proteinaz K	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Çizelge 3.16'da pH'sı 5,5'e ayarlanmış LAB filtratının, yine vajinadan izole edilen 13 patojen bakteriye (*Staphylococcus intermedius*, *S. epidermidis*, *S. pasteurii*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. hominis*, *S. caprae*, *S. lugdunensis*, *S. caprae*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus vallismortis*, *Enterococcus faecalis* ve *Kocuria kristinae*) karşı göstermiş olduğu antibakteriyal aktivite sonuçları verilmiştir. Çalışmada ayrıca *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşları da test edilmiştir. Çalışma sonucunda, tüm LAB filtratının, 1K5.1, 1K8, 7E4, 11N1, 11N4, 5M5, 6N10 ve 11M3 patojenlerine karşı zon oluşturmadığı, bunun dışındaki patojenlere karşı da bazı LAB filtratlarının etkisi olduğu gözlenmiştir. Zon oluşumunun 2-10 mm arasında değişkenlik gösterdiği gözlenmiştir.

3.4.4. Bazı enzimlerin antibakteriyal etki sonuçları

Çizelge 3.16'da proteinaz K enzimi ilaveli LAB filtratının, yine vajinadan izole edilen 13 patojen bakteriye (*Staphylococcus intermedius*, *S. epidermidis*, *S. pasteurii*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. hominis*, *S. caprae*, *S. lugdunensis*, *S. caprae*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus vallismortis*, *Enterococcus faecalis* ve *Kocuria kristinae*) karşı göstermiş olduğu antibakteriyal aktivite sonuçları verilmiştir. Çalışmada ayrıca *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşları da test edilmiştir. Çalışma sonucunda, 9M8, 9M3 ve 8M10 LAB'lerinin hiçbir patojene karşı zon oluşturmadığı, ayrıca tüm LAB izolatlarının da 6N10 ve 2Ç5 izolatlarına karşı zon oluşturmadığı gözlenmiştir. Zon oluşumlarının ise 1 – 28 mm arasında değişkenlik gösterdiği ortaya konmuştur. En düşük zon çapını (1 mm) 5MR6 izolatının, 1K5.1 patojenine karşı oluşturduğu, en yüksek zon çapını (28 mm) ise 7MR5 izolatının, 7E4 patojenine karşı oluşturduğu rapor edilmiştir.

Ayrıca Çizelge 3.16'da katalaz enzimi ilaveli LAB filtratının, yine vajinadan izole edilen 13 patojen bakteriye (*S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. pasteurii*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. hominis*, *S. caprae*, *S. lugdunensis*, *S. caprae*, *S. agalactiae*, *B. vallismortis*, *E. faecalis* ve *K. kristinae*) karşı göstermiş olduğu antibakteriyal aktivite sonuçları da verilmiştir. Çalışmada ayrıca *E. coli* ATCC 25922 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşları da test edilmiştir. Çalışma sonucunda, 3M2, 8M10 ve 11M10 LAB'lerinin hiçbir patojene karşı zon oluşturmadığı gözlenmiştir. Zon oluşumlarının ise 1 – 20 mm arasında değişkenlik gösterdiği ortaya konmuştur. En düşük zon çapını (1 mm) 10MR14 izolatının, *L. monocytogenes* ATCC 7644 patojenine karşı oluşturduğu, en yüksek zon çapının (20 mm) ise 2MR1 izolatının, 11M3 patojenine karşı oluşturduğu rapor edilmiştir.

3.4.5. LAB izolatlarının otoagregasyon ve koagregasyon aktivite sonuçları

Çizelge 3.17'de tanımlanan LAB izolatlarının otoagregasyon ve koagregasyon aktivite sonuçları verilmiştir. Otoagregasyon aktivitesi sonuçlarına baktığımızda, 76 LAB izolatının 17 tanesi (1M1.2, 2M2, 3M6, 4M5, 4M10, 8MR3, 8MR6.1, 8M2, 8M4, 8M7, 8M8, 8M9, 9M1, 10M3, 11MR19, 11M6 ve 5M7

izolatları) otoagregasyon aktivitesi göstermemiştir. Diğer 60 LAB izolatının ise 22 tanesi (1MR3, 1M2.1.1, 3M2, 7MR13.3, 8MR19, 8MR20, 8M1, 8M5, 8M10, 9M3, 9M7, 9M8, 10MR3, 10MR4, 10MR7, 10MR18, 10M7, 10M10, 11MR4, 11MR12, 11M10 ve 12M6.1 izolatları) zayıf, 18 tanesi orta (2MR1, 2MR5, 5MR1, 5MR3, 5MR6, 5MR8, 7MR1, 8MR1, 8MR5.1, 8MR5.2, 8MR9, 10MR2, 10MR5, 10MR9, 10MR16.1, 11MR20, 7MR13.1 ve 8MR14 izolatları) ve 19 tanesi de kuvvetli (1MR1.1, 2MR2, 5MR4, 7MR4, 7MR5, 7MR7.4, 7MR8, 8MR4, 8MR7, 10MR6, 10MR8, 10MR12, 10MR13, 10MR14, 10MR15, 10MR16.2, 7MR7.1, 8MR12 ve 8MR8 izolatları) otoagregasyon aktivitesi göstermiştir.

Koagregasyon aktivitesi sonuçlarına baktığımızda, 76 LAB izolatının 31 tanesi (1MR3, 1MR1.1, 2MR1, 2MR2, 5MR1, 5MR3, 5MR4, 7MR1, 7MR13.3, 8MR1, 8MR3, 8MR4, 8MR5.1, 8MR20, 8M1, 8M7, 9M1, 10MR4, 10MR7, 10MR12, 10MR13, 10MR15, 10MR16.1, 10MR16.2, 10MR18, 11MR4, 11MR12, 11MR19, 11MR20, 8MR12 ve 8MR8 izolatları) *E. coli* ATCC 25922 suşuyla koagregasyon aktivitesi göstermemiştir. Diğer 45 LAB izolatı ise (1M1.2, 1M2.1.1, 2MR5, 2M2, 3M2, 3M6, 4M5, 4M10, 5MR6, 5MR8, 7MR4, 7MR5, 7MR7.4, 7MR8, 8MR5.2, 8MR6.1, 8MR7, 8MR9, 8MR19, 8M2, 8M4, 8M5, 8M8, 8M9, 8M10, 9M3, 9M7, 9M8, 10MR2, 10MR3, 10MR5, 10MR6, 10MR8, 10MR9, 10MR14, 10M3, 10M7, 10M10, 11M6, 11M10, 12M6.1, 7MR7.1, 7MR13.1, 8MR14 ve 5M7 izolatları) koagregasyon aktivitesi göstermiştir.

Çizelge 3.17. LAB izolatlarının otoagregasyon ((-): otoagregasyon aktivitesi yok; (+): zayıf, (++) orta, (+++): kuvvetli otoagregasyon aktivitesi) ve koagregasyon aktiviteleri ((-): koagregasyon aktivitesi yok; (+): koagregasyon aktivitesi var)

İzolat numarası	Otoagregasyon	Koagregasyon
1MR3	(+)	(-)
1MR1.1	(+++)	(-)
1M1.2	(-)	(+)
1M2.1.1	(+)	(+)
2MR1	(++)	(-)
2MR2	(+++)	(-)
2MR5	(++)	(+)
2M2	(-)	(+)

Çizelge 3.17. (Devam) LAB izolatlarının otoagregasyon ((-): otoagregasyon aktivitesi yok; (+): zayıf, (++): orta, (+++): kuvvetli otoagregasyon aktivitesi) ve koagregasyon aktiviteleri ((-): koagregasyon aktivitesi yok; (+): koagregasyon aktivitesi var)

3M2	(+)	(+)
3M6	(-)	(+)
4M5	(-)	(+)
4M10	(-)	(+)
5MR1	(++)	(-)
5MR3	(++)	(-)
5MR4	(+++)	(-)
5MR6	(++)	(+)
5MR8	(++)	(+)
7MR1	(++)	(-)
7MR4	(+++)	(+)
7MR5	(+++)	(+)
7MR7.4	(+++)	(+)
7MR8	(+++)	(+)
7MR13.3	(+)	(-)
8MR1	(++)	(-)
8MR3	(-)	(-)
8MR4	(+++)	(-)
8MR5.1	(++)	(-)
8MR5.2	(++)	(+)
8MR6.1	(-)	(+)
8MR7	(+++)	(+)
8MR9	(++)	(+)
8MR19	(+)	(+)
8MR20	(+)	(-)
8M1	(+)	(-)
8M2	(-)	(+)
8M4	(-)	(+)
8M5	(+)	(+)
8M7	(-)	(-)
8M8	(-)	(+)
8M9	(-)	(+)
8M10	(+)	(+)
9M1	(-)	(-)
9M3	(+)	(+)
9M7	(+)	(+)
9M8	(+)	(+)
10MR2	(++)	(+)

Çizelge 3.17. (Devam) LAB izolatlarının otoagregasyon ((-): otoagregasyon aktivitesi yok; (+): zayıf, (++): orta, (+++): kuvvetli otoagregasyon aktivitesi) ve koagregasyon aktiviteleri ((-): koagregasyon aktivitesi yok; (+): koagregasyon aktivitesi var)

10MR3	(+)	(+)
10MR4	(+)	(-)
10MR5	(++)	(+)
10MR6	(+++)	(+)
10MR7	(+)	(-)
10MR8	(+++)	(+)
10MR9	(++)	(+)
10MR12	(+++)	(-)
10MR13	(+++)	(-)
10MR14	(+++)	(+)
10MR15	(+++)	(-)
10MR16.1	(++)	(-)
10MR16.2	(+++)	(-)
10MR18	(+)	(-)
10M3	(-)	(+)
10M7	(+)	(+)
10M10	(+)	(+)
11MR4	(+)	(-)
11MR12	(+)	(-)
11MR19	(-)	(-)
11MR20	(++)	(-)
11M6	(-)	(+)
11M10	(+)	(+)
12M6.1	(+)	(+)
7MR7.1	(+++)	(+)
7MR13.1	(++)	(+)
8MR14	(++)	(+)
5M7	(-)	(+)
8MR12	(+++)	(-)
8MR8	(+++)	(-)

3.4.6. LAB izolatlarının hidrofobisite değerleri

Çalışma sonucunda, test edilen 12 LAB izolatından 7 izolatın (1MR3, 9M3, 2MR1, 5MR1, 10MR14, 10MR6 ve 8M10 izolatları) hidrofobisite yeteneğinin

olduğu, 5 izolatın ise (2MR5, 9M8, 5MR6, 3M2 ve 11M10) ise hidrofobisite yeteneğinin olmadığı gözlenmiştir.

3.4.7. LAB izolatlarının asit dirençlilikleri

Çizelge 3.18’de vajinadan izole edilen 12 LAB izolatının, pH 2 ve pH 3 MRS broth ortamında 0. sa, 1. sa, 2. sa ve 3. saatin sonundaki canlılıkları verilmiştir. Çalışma sonucunda pH 2 ortamında test edilen tüm LAB izolatlarınının 3. saatin sonunda üreme göstermedikleri ortaya konmuştur. Ayrıca pH 3 ortamında ise 2MR1, 8M10, 9M8, 10MR14 ve 11M10 izolatları dışındaki diğer test edilen LAB izolatlarında üreme gözlenmiştir.

3.4.8. LAB izolatlarının safra tuzu dirençlilikleri

Çizelge 3.19’da vajinadan izole edilen 12 LAB izolatının, %0,1 ve %0,3 safra tuzu içeren MRS broth ortamında 0. sa, 1. sa, 2. sa ve 4. saatin sonundaki canlılıkları verilmiştir. Çalışma sonucunda, %0,1 ve %0,3 safra tuzu ortamında da tüm LAB izolatlarında sayılarında azalma olsa da 3. saatin sonunda test edilen tüm izolatlarda üreme gözlenmiştir.

Çizelge 3.18. LAB izolatlarının asit dirençlilikleri

İzolat numarası	Bakteri sayısı (kob/mL)							
	pH 2				pH 3			
	0. sa	1. sa	2. sa	3. sa	0. sa	1. sa	2. sa	3. sa
1MR3	2,07x10 ⁷	(-)	(-)	(-)	6,75x10 ⁸	7x10 ⁸	9x10 ⁹	4,25x10 ⁹
2MR1	1x10 ⁸	(-)	(-)	(-)	2x10 ⁸	1x10 ⁸	(-)	(-)
2MR5	5,55x 10 ⁸	(-)	(-)	(-)	5,1x10 ⁸	6,5x10 ⁸	2x10 ⁸	0,7x10 ⁸
3M2	1,54x10 ⁶	(-)	(-)	(-)	23x10 ⁵	9x10 ⁸	3,37x10 ⁸	0,14x10 ⁸
5MR1	1,4x10 ⁷	(-)	(-)	(-)	2,5x10 ⁸	5,8x10 ⁸	0,41x10 ⁸	0,3x10 ⁸
5MR6	3,35x10 ⁸	0,03x10 ⁸	(-)	(-)	7x10 ⁸	8,7x10 ⁸	4,6x10 ⁸	1,83x10 ⁸
8M10	1x10 ⁸	2x10 ⁸	(-)	(-)	27,5x10 ⁵	4,75x10 ⁸	(-)	(-)
9M3	29,5x10 ⁸	2,3x10 ⁸	3x10 ⁸	(-)	18x10 ⁵	65x10 ⁸	10,5x10 ⁹	0,95x10 ⁹
9M8	85x10 ⁸	1x10 ⁸	(-)	(-)	2,93x10 ⁶	1,5x10 ⁸	(-)	(-)
10MR6	5,25x10 ⁸	(-)	(-)	(-)	5,35x10 ⁸	7,5x10 ⁸	1,5x10 ⁹	1,85x10 ⁹
10MR14	32,5x10 ⁸	(-)	(-)	(-)	6,8x10 ⁷	(-)	(-)	(-)
11M10	(-)	(-)	(-)	(-)	11,6x10 ⁶	(-)	(-)	(-)

Çizelge 3.19. LAB izolatlarının safra tuzu dirençlilikleri

İzolat numarası	Bakteri sayısı (kob/mL)							
	% 0,1 safra tuzu				% 0,3 safra tuzu			
	0. sa	1. sa	2. sa	3. sa	0. sa	1. sa	2. sa	3. sa
1MR3	6,75x10 ⁷	4,33x10 ⁷	17,3x10 ⁷	34,15x10 ⁵	4,2x10 ⁷	9x10 ⁷	5,5x10 ⁷	23,5x10 ⁷
2MR1	5,25x10 ⁷	13x10 ⁷	3,4x10 ⁶	1,58x10 ⁵	4,53x10 ⁷	12,9x10 ⁷	15,5x10 ⁷	12,8x10 ⁶
2MR5	19x10 ⁷	10,5x10 ⁷	6,5x10 ⁷	4,2x10 ⁵	17,5x10 ⁷	9,2x10 ⁷	10x10 ⁷	9x10 ⁶
3M2	>10 ⁸	>10 ⁸	11,2x10 ⁵	120x10 ⁵	>10 ⁸	>10 ⁸	80x10 ⁵	160x10 ⁵
5MR1	120x10 ⁷	32,5x10 ⁷	5,5x10 ⁵	7x10 ⁵	61x10 ⁷	27x10 ⁷	48x10 ⁶	34x10 ⁵
5MR6	11,6x10 ⁷	10,25x10 ⁷	21,7x10 ⁷	41,6x10 ⁷	13x10 ⁷	7,25x10 ⁷	3,97x10 ⁶	2x10 ⁵
8M10	>10 ⁸	>10 ⁸	100x10 ⁵	110x10 ⁵	>10 ⁸	>10 ⁸	90x10 ⁵	150x10 ⁵
9M3	>10 ⁸	>10 ⁸	40x10 ⁵	90x10 ⁵	>10 ⁸	>10 ⁸	110x10 ⁵	110x10 ⁵
9M8	>10 ⁸	>10 ⁸	27,7x10 ⁵	76x10 ⁵	>10 ⁸	>10 ⁸	25,5x10 ⁵	180x10 ⁵
10MR6	33,5x10 ⁷	15x10 ⁷	44x10 ⁷	55,5x10 ⁷	12,65x10 ⁷	20,5x10 ⁷	16x10 ⁶	3,97x10 ⁵
10MR14	17x10 ⁷	16,8x10 ⁷	13,35x10 ⁷	9x10 ⁷	1,37x10 ⁷	67x10 ¹⁰	80x10 ¹⁰	30x10 ⁶
11M10	>10 ⁸	12x10 ⁷	27x10 ⁶	58,6 x10 ⁵	>10 ⁸	>10 ⁸	15x10 ⁵	65x10 ⁵

3.5. LAB'lerinden Ekzopolisakkarit Eldesi

3M2 LAB izolatından 60 mg/mL EPS, 8M10 izolatından ise 80 mg/mL EPS elde edilmiştir. Toplam mL'deki EPS miktarından yola çıkarak, hücre kültüründe kullanılacak dozlara bağlı gerekli hesaplamalar yapılmıştır.

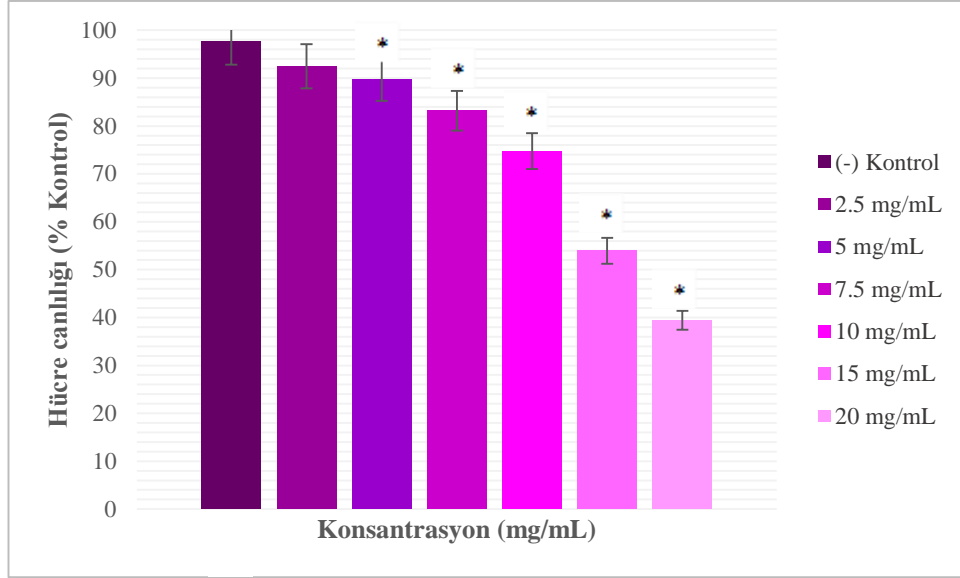
3.6. MTT Sonuçları

3M2 ve 8M10 LAB izolatlarının ekzopolisakkaritlerinin, 6 farklı dozda (2,5 – 5 – 7,5 -10 – 15 - 20 mg /mL) kanserli hücre olarak HeLa ve sağlıklı hücre olarak da HUVEC hücreleri üzerine uygulanmasının ardından, 24 saat sonrasında ELISA cihazında hücrelerin MTT okumaları yapılmıştır. MTT deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde (Statistical Package for the Social Sciences) SPSS 21 programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0,05$ kabul edilmiştir.

MTT testi sonucunda, HeLa ve HUVEC hücreleri üzerinde zamana ve doza bağımlı olarak en düşük dozdan itibaren genellikle hücre canlılığında bir azalma azalma olduğu gözlenmiştir. Tez çalışmasında hücre sayısı olarak 5.000 hücre/kuyucuk (96 kuyucuklu plaka) sonuçları değerlendirmeye alınmıştır. Deneyle 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.6.1. 3M2 izolatının HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri

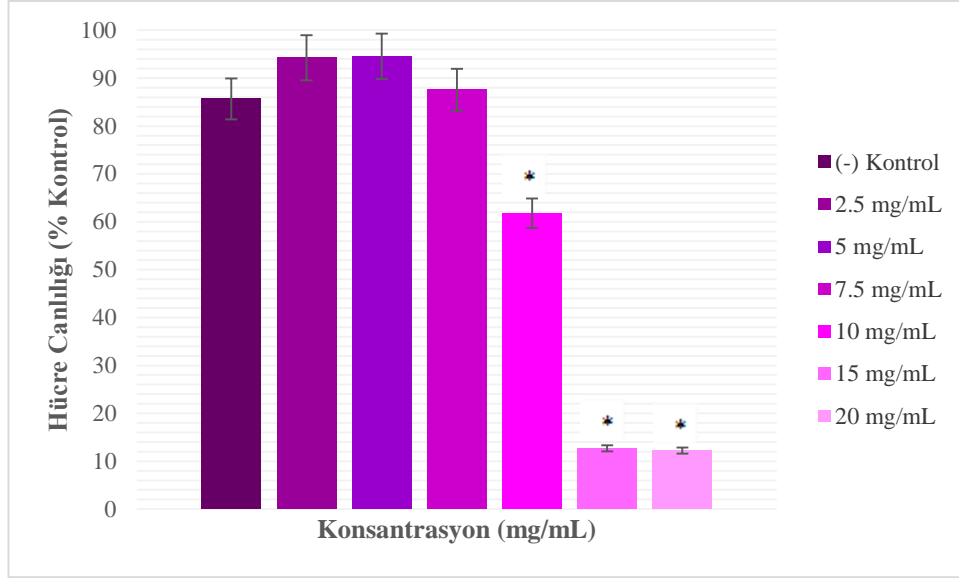
Şekil 3.10'da 3M2 izolatının ekzopolisakkaritinin 24 saat inkübasyon sonrasındaki, HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, hücrelere sadece ultra saf suyun uygulandığı negatif kontrolde, hücre sayısında %2 oranında azalma gözlenmiştir. En düşük EPS dozu olan 2,5 mg/mL'de hücre sayısında %7.5 oranında azalma saptanmıştır. 5 mg/mL'lik dozda %10, 7,5 mg/mL'lik dozda %17, 10 mg/mL'lik dozda %25, 15 mg/mL'lik dozda %46 ve en yüksek doz olan 20 mg/mL'lik dozda ise hücre sayısında %61 oranında anlamlı bir azalma belirlenmiştir.



Şekil 3.10. 3M2 izolatının HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

3.6.2. 3M2 izolatının HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri

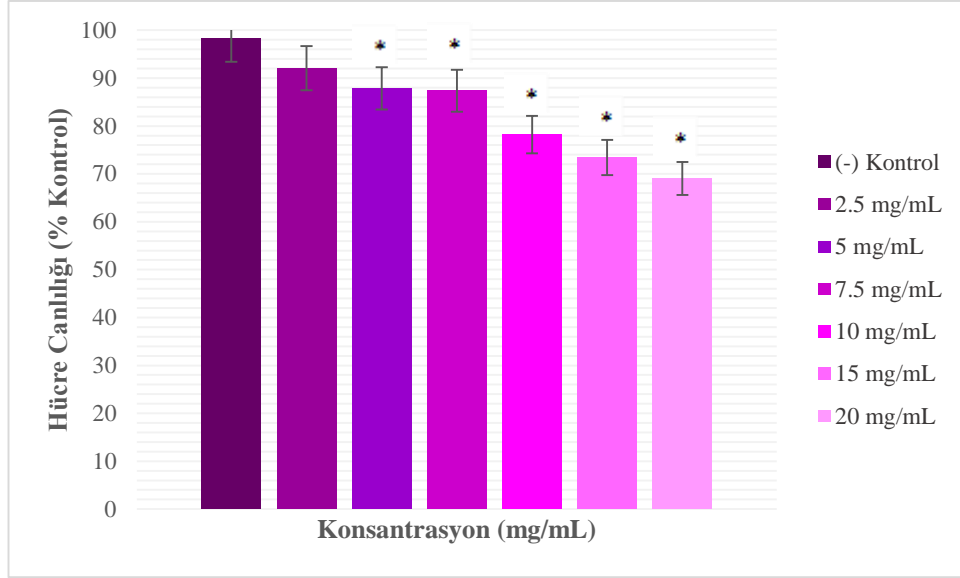
Şekil 3.11’de 3M2 izolatının ekzopolisakkaritinin 24 saat inkübasyon sonrasındaki, HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, negatif kontrolde hücre sayısında % 14 azalma saptanmıştır. En düşük EPS dozu olan 2,5 mg/mL’de hücre sayısında %6, 5 mg/mL’lik dozda %5, 7,5 mg/mL’lik dozda %12 azalma meydana gelmiştir. 10 mg/mL’lik dozun %38, 15 mg/mL’lik dozda %87 ve en yüksek doz olan 20 mg/mL’lik dozun ise hücre sayısında %88 oranında anlamlı bir azalmaya neden olduğu ortaya konmuştur.



Şekil 3.11. 3M2 izolatının HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

3.6.3. 8M10 izolatının HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri

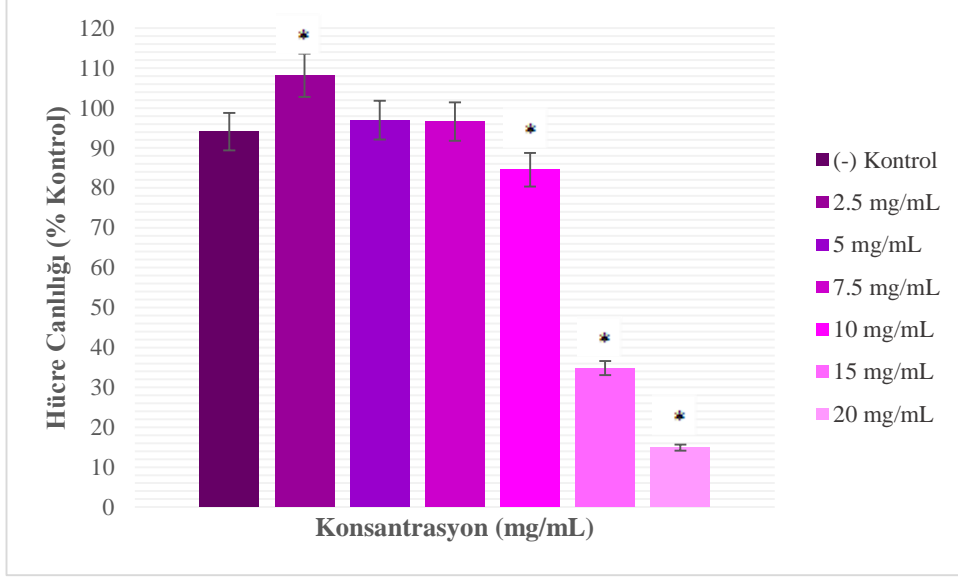
Şekil 3.12’de 8M10 izolatının ekzopolisakkaritinin 24 saat inkübasyon sonrasındaki, HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, negatif kontrolde hücre sayısında %2 oranında azalma gözlenmiştir. En düşük EPS dozu olan 2,5 mg/mL’de hücre sayısında %8 oranında azalma saptanmıştır. 5 mg/mL’lik dozda %12, 7,5 mg/mL’lik dozda %13, 10 mg/mL’lik dozda %22, 15 mg/mL’lik dozda %27 ve en yüksek doz olan 20 mg/mL’lik dozda ise hücrelerde %31 oranında anlamlı bir azalma belirlenmiştir.



Şekil 3.12. 8M10 izolatının HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

3.6.4. 8M10 izolatının HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri

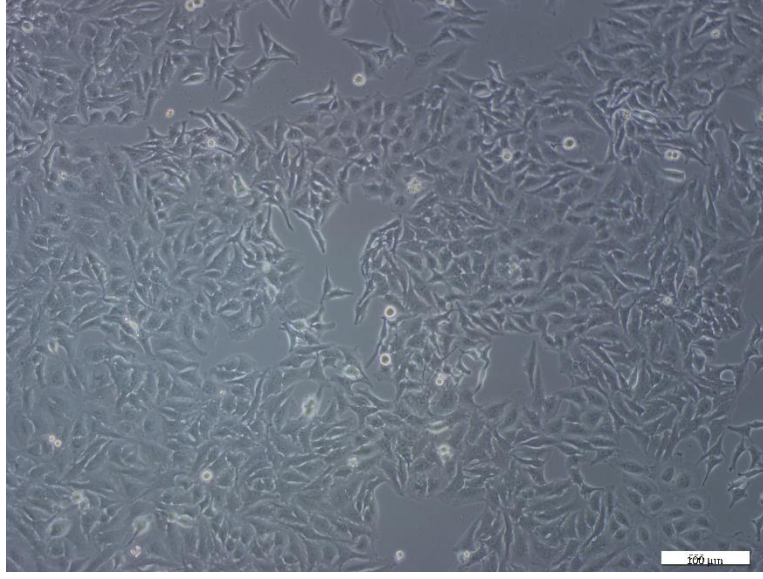
Şekil 3.13'te 8M10 izolatının ekzopolisakkaritinin 24 saat inkübasyon sonrasındaki, HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, negatif kontrolde hücrelerde %6 oranında azalma meydana gelmiştir. En düşük EPS dozu olan 2,5 mg/mL'de hücre sayısında anlamlı bir şekilde %8 oranında artış saptanmıştır. 5 ve 7,5 mg/mL'lik dozlarda, hücre sayısında %3 oranında azalma meydana gelmiştir. Ayrıca, 10 mg/mL'lik dozda %15, 15 mg / mL'lik dozda %65 ve en yüksek doz olan 20 mg/mL'lik dozda ise hücre sayısında %85 oranında anlamlı bir azalma belirlenmiştir.



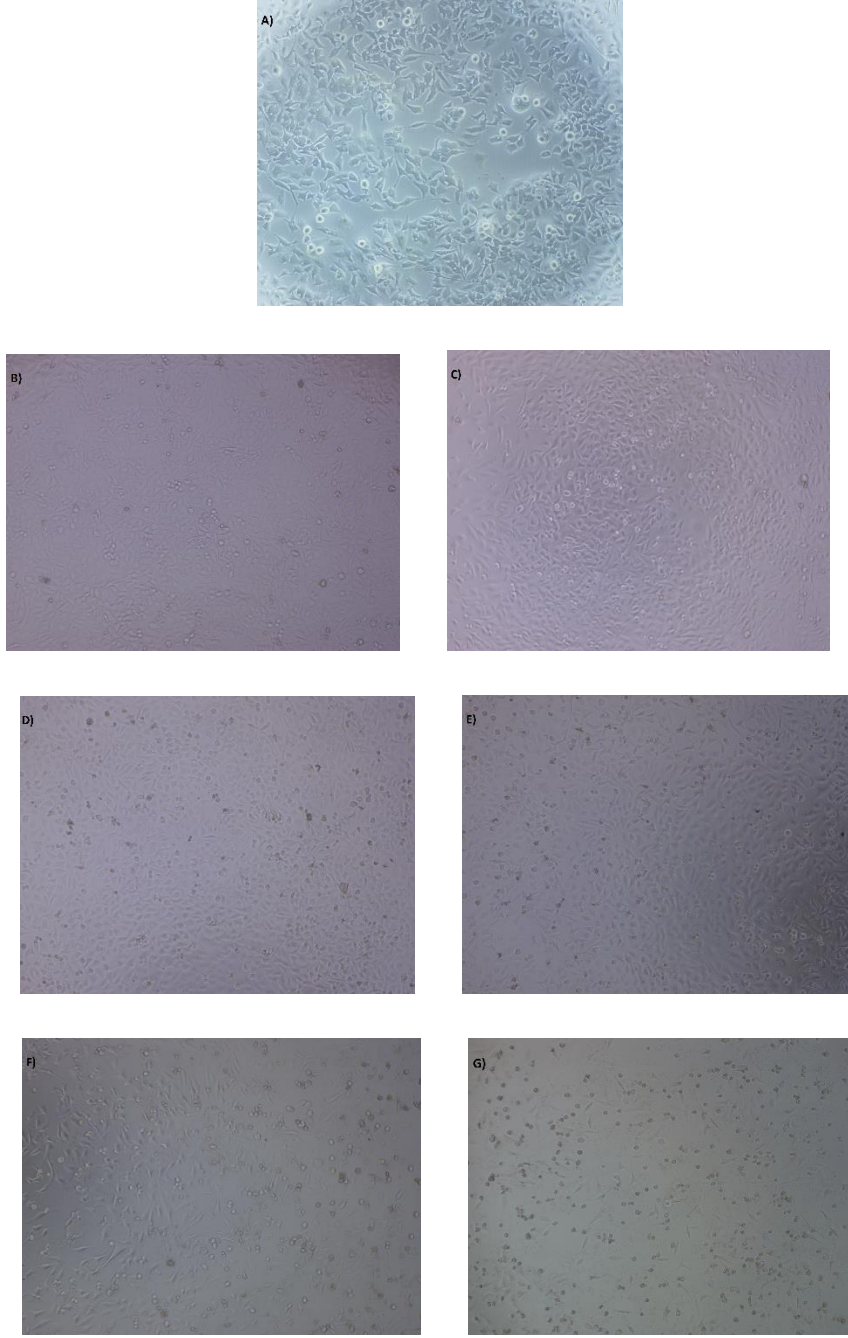
Şekil 3.13. 8M10 izolatının HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

3.7. Hücre Morfolojilerinin İncelenmesi

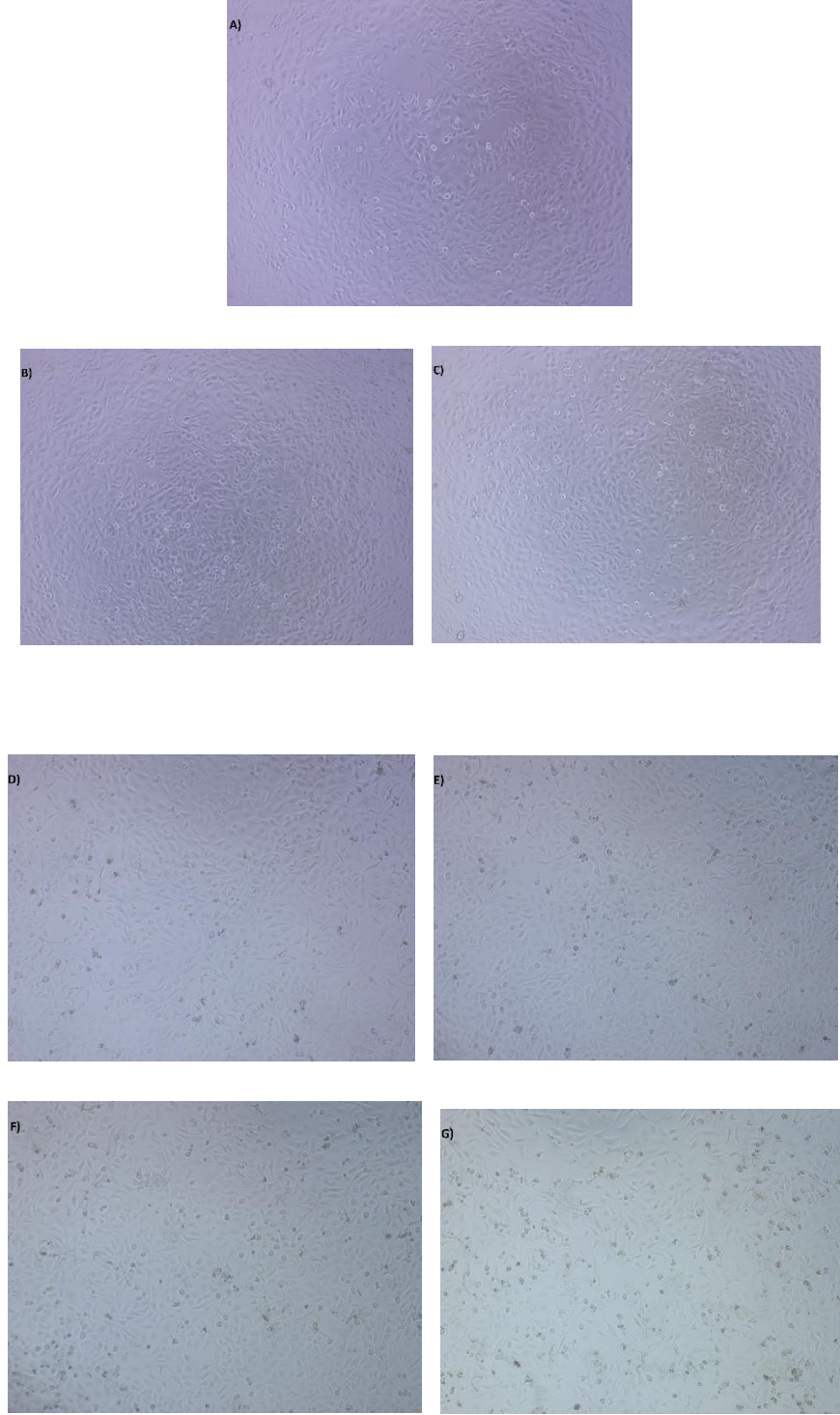
Olympus IX71 inverted mikroskobunda hücrelerin gelişim morfolojileri, madde öncesi morfolojileri, madde sonrası morfolojileri incelenip, Olympus DP70 kamera yardımı ile fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 3.14-3.19.)



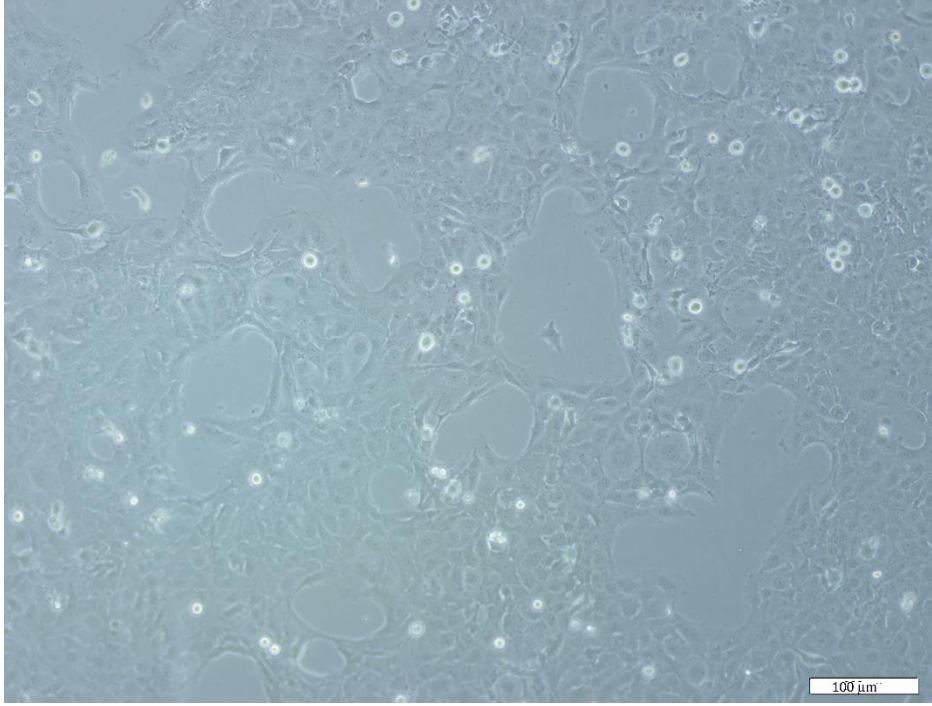
Şekil 3.14. HeLa hücrelerinin normal morfolojileri X100 (ölçü birimi 100μm)



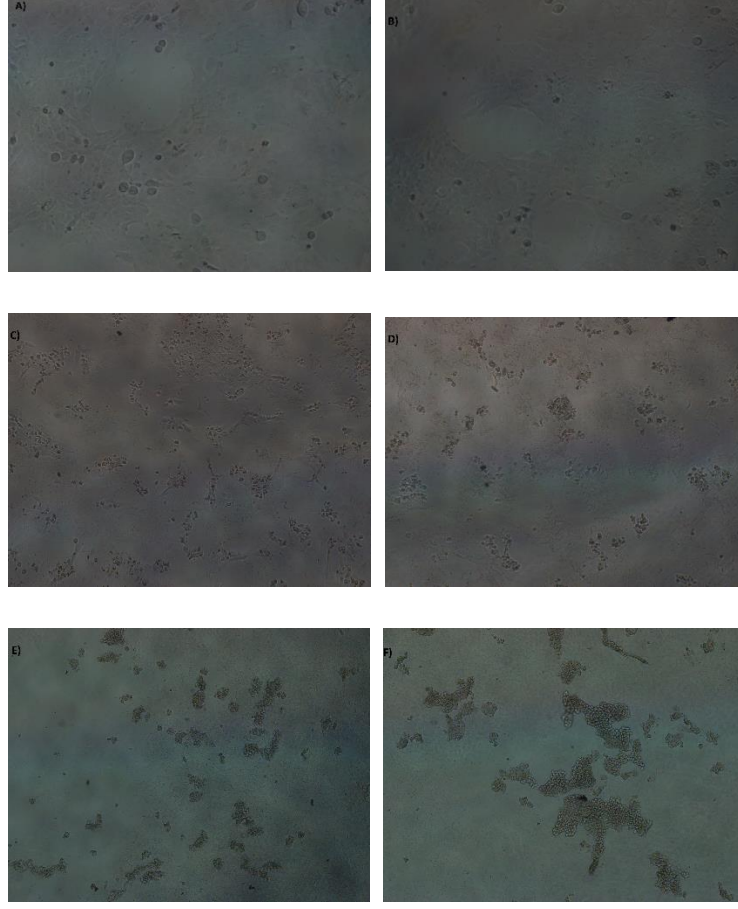
Şekil 3.15. 3M2 izolatının ekzopolisakkaritinin 24 saat inkübasyon sonrası HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin morfolojik görünümü X100 (ölçü birimi 100µm), A) + Kontrol B) 2,5 mg/mL EPS C) 5 mg/mL EPS D) 7,5 mg/mL EPS E) 10 mg/mL EPS F) 15 mg/mL EPS G) 20 mg/mL EPS



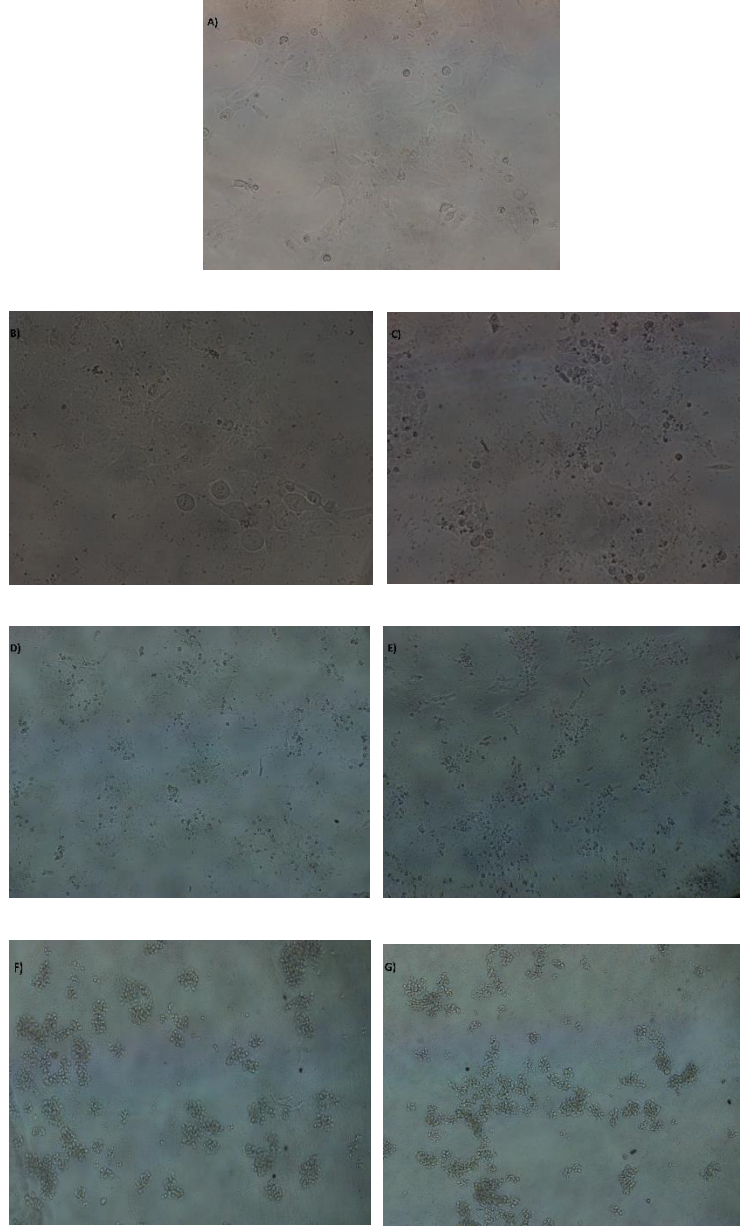
Şekil 3.16. 8M10 izolatının ekzopolisakkaritinin 24 saat inkübasyon sonrası HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin morfolojik görünümü X100 (ölçü birimi 100µm), A) + Kontrol B) 2,5 mg/mL EPS C) 5 mg/mL EPS D) 7,5 mg/mL EPS E) 10 mg/mL EPS F) 15 mg/mL EPS G) 20 mg/mL EPS



Şekil 3.17. HUVEC hücrelerinin normal morfolojileri X100 (ölçü birimi 100μm)



Şekil 3.18. 3M2 izolatının ekzopolisakkaritinin 24 saat inkübasyon sonrası HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin morfolojik görünümü X100 (ölçü birimi 100µm), A) + Kontrol B) 2,5 mg/mL EPS C) 5 mg/mL EPS D) 7,5 mg/mL EPS E) 15 mg/mL EPS F) 20 mg/mL EPS



Şekil 3.19. 8M10 izolatının ekzopolisakkaritinin 24 saat inkübasyon sonrası HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin morfolojik görünümü X100 (ölçü birimi 100µm), A) + Kontrol B) 2,5 mg/mL EPS C) 5 mg/mL EPS D) 7,5 mg/mL EPS E) 10 mg/mL EPS F) 15 mg/mL EPS, G) 20 mg/mL EPS

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda vajinadan mikroorganizmalar izole edilerek, bunların içinden laktik asit bakterilerinin, diğer bazı bakterilerin ve mayaların biyokimyasal aktiviteleri incelenmiş ve bazı izolatların biyokimyasal ve moleküler tanımlamaları yapılmıştır. Ayrıca laktik asit bakteri izolatlarından yüksek laktik asit ve hidrojen peroksit üretim miktarlarına sahip 2 izolatın, rahim ağzı kanser hücre hattı olan HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. Kontrol grubu olarak sağlıklı hücre hattı olan HUVEC hücreleriyle çalışılmıştır. Çalışma için 30 sağlıklı kadından toplam 346 mikroorganizma izole edilmiştir. Bunların 174 tanesi katalaz negatif Gram pozitif bakteri (115'i basil, 19'u kokobasil ve 40'ı kok), 152 tanesi katalaz pozitif Gram pozitif bakteri (45'i basil, 8'i kokobasil ve 99'u kok) ve 18 tanesi maya izolatu olarak sınıflandırılmıştır (Çizelge 3.2).

Sağlıklı bir kadının vajinal ekosisteminde, vajinada önemli yararlı etkilere sahip, *Lactobacillus* türleri baskın haldedir. Vajinal ekosistem sağlığının korunması, kişinin vajinal ve genel sağlığı açısından da önem taşımaktadır (Aroutcheva ve ark., 2001). Sağlıklı premenopozal kadınların vajinal sıvısının 1 gramında 10^7 – 10^8 kob laktobasil bulunmaktadır (Sobel ve Chaim, 2006). *Lactobacillus* türleri, katalaz negatif, oksidaz negatif, gram pozitif, çubuk şeklinde, fakültatif aerotolerant, hareketsiz ve spor oluşturmeyen bakterilerdir. Bu bakteriler glukoz fermantasyonuyla laktik asit üretmektedirler (Hanghshenas ve ark., 2014). Çalışmamızda 346 bakteri izolatından 174 tanesinin gram pozitif, katalaz negatif olduğu bulunmuş ve bu izolatlardan 111 tanesi MRS ve M17 agardan izole edildiği için, LAB'si olarak belirlenmiştir. LAB izolatlarının hepsinin hareketsiz olup, 14 tanesinin oksidaz pozitif, 97 tanesinin de oksidaz negatif olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.4).

Çalışmamızdaki LAB'lerinin farklı pH'lardaki gelişimlerine bakılmıştır. 111 LAB'sinden 87 tanesinin pH 3,9'da gelişim gösterdiği, 23 tanesinin ise pH 3,9'da gelişim göstermediği, 1 tanesinin ise belirsiz sonuç verdiği gözlenmiştir. Ayrıca, 111 LAB izolatından 105 izolatın pH 9,6'da gelişim gösterdiği, 6 izolatın ise pH 9,6'da gelişim göstermediği saptanmıştır (Çizelge 3.4). Aroutcheva ve

arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2001), vajinadan izole edilen LAB izolatlarının çoğunun pH 4 – 5'te en iyi gelişim gösterdiği, başka bir çalışmada da vajinal laktobasillerin en iyi pH 4,5'te geliştikleri rapor edilmiştir (Voravuthikunchai ve ark., 2006). Ayrıca farklı bir çalışmada da pekçok ticari üründen izole edilen LAB'lerinin pH 3,2'de zayıf gelişim gösterdiği bildirilmiştir (Lin ve ark., 2006).

LAB'lerinin farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişimlerine bakıldığında, 111 LAB'sinden %6 NaCl içeren ortamda 40'ının ürettiği, 57 izolatın ümediği, 4 izolatın belirsiz sonuç verdiği, %7,5 NaCl içeren ortamda 28 izolatın ürettiği, 69 izolatın ümediği, 4 izolatın belirsiz sonuç verdiği, %10 NaCl içeren ortamda ise 18 izolatın ürettiği, 90 izolatın ümediği ve 3 izolatın ise belirsiz sonuç verdiği bulunmuştur (Çizelge 3.4.). Dinçer'in yaptığı bir çalışmada (2007), 39 LAB'sinden %6 NaCl içeren ortamda 25'inin ürettiği, 8'inin ümediği, 6'sının belirsiz sonuç verdiği, %7,5 NaCl içeren ortamda 14'ünün ürettiği, 22'sinin ümediği, 3'ünün belirsiz sonuç verdiği, %10 NaCl içeren ortamda ise sadece 1 tanesinin ürettiği, 35'inin ümediği ve 3'ünün belirsiz sonuç verdiği bildirilmiştir (Dinçer, 2007). Her iki çalışmadaki sonuçlara bakıldığında, tuz konsantrasyonunun artmasıyla bakteri üremesinin azaldığı gözlenmiştir.

Çalışmamızda LAB izolatlarının farklı sıcaklıklardaki gelişimleri de değerlendirilmiştir. 111 LAB izolatından 4°C'de 27'si gelişim göstermiş, 84 tanesi gelişim göstermemiş, 15°C'de 28 izolat gelişim göstermiş, 83 tanesi gelişim göstermemiş, 45°C'de ise; 99 izolat gelişim göstermiş, 12 tanesi gelişim göstermemiştir (Çizelge 3.4). Yapılan bir çalışmada, 4°C'de 34 LAB'sinin gelişim gösterdiği, 102 tanesinin gelişim göstermediği, 45°C'de ise; 101 izolatın gelişim gösterdiği, 9 izolatın gelişim göstermediği ortaya konmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkılarak, LAB'lerinin en iyi gelişimlerinin, 45°C'de olduğu gözlenmiştir (Pektaş, 2014).

LAB izolatlarının hiçbirinin H₂S üretmedikleri saptanmıştır (Çizelge 3.4). Pektaş'ın yaptığı bir çalışmada da 136 LAB izolatlarından hepsinin H₂S üretmediği bildirilmiştir (Pektaş, 2014).

LAB'lerinin arjininden amonyak oluşumları değerlendirildiğinde, 111 LAB'sinden 60 tanesinin arjininden amonyak oluşturmadığı, 48 izolatın arjinininden amonyak oluşturduğu, 3 izolatın ise belirsiz sonuç verdiği gözlenmiştir (Çizelge 3.4). Homofermantatif şarap laktobasili *L. delbrueckii* ve *L. plantarum*'un arjinini parçalayamadığı ortaya konmuştur (Edwards ve ark., 1993). Ayrıca bazı laktobasillerin süt fermantasyonundan da arjinini parçalayamadığı rapor edilmiştir. Ancak, peynirden *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, ve balıktan *L. plantarum* arjinini parçalayabilmektedir. Bunun yanında, *L. hilgardii*, *L. buchneri* ve *L. brevis* gibi heterofermantatif laktobasillerin arjinini hidrolize edebildiği bildirilmiştir (Liu ve Pilone, 1998). Dolayısıyla, LAB'lerinin arjininden amonyak oluşturmasının, mikroorganizmanın bulunduğu kaynağa ve de fermantasyon şekline göre değişebildiği sonucuna varılmıştır.

Bakterilerin su, toprak, canlı dokular, cerrahi aletler, endüstriyel ve içilebilir su pompalama sistemleri gibi farklı yüzeylerde biyofilm geliştirebildiği ortaya konmuştur (Vu ve ark., 2009). Mikroorganizmalar biyofilm oluştururken, kendi ürettiği bir matriks tabaka içinde gömülü şekilde yer almaktadır. (McDougald ve ark., 2011). LAB'lerinin bazı türlerinin biyofilm oluşturduğu rapor edilmiştir ve birkaç raporda da biyofilm oluşumdan sorumlu genler tanımlanmıştır. (Kubota ve ark., 2008). Lebeer ve arkadaşları (2007), probiyotik bir LAB'si olan *Lactobacillus rhamnosus* GG'nin luxS geninin biyofilm oluşumundan sorumlu olduğunu bildirmiştir. Ancak, laktik asit bakterilerinin biyofilm oluşumları üzerine literatürde çok çalışma yer almamaktadır (Lebeer ve ark., 2007; Kubota ve ark., 2008). Çalışmamızda LAB'lerinin biyofilm oluşumları mikrotitre plakada değerlendirilmiştir. Katalaz (-) Gram (+) bakteri izolatlarının mikrotitre plaka yöntemiyle biyofilm oluşumları değerlendirildiğinde, 138 izolattan 77 tanesinin biyofilm oluşturmadığı (-), 26 tanesinin zayıf derecede (+), 12 izolatın orta derecede (++) ve 23 izolatın ise yüksek derecede (+++) biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.6). Pektaş'ın yaptığı bir çalışmada 125 LAB izolatının mikrotitre plaka yöntemiyle glukoz ortamındaki biyofilm sonuçlarına bakıldığında, 91 izolatın biyofilm oluşturmadığı (-), 23 izolatın zayıf derecede (+), 5 izolatın orta derecede (++) ve 16 izolatın da yüksek derecede (+++) biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir (Pektaş, 2014).

API CHL 50 testi, API CHL 50 (bioMerieux) kitleri ile yönetici talimatları doğrultusunda karbonhidrat fermantasyon testlerine bağlı olarak, bakterinin biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin tanımlanmasına dayalı bir testtir. 111 laktik asit bakterisinden ancak 100 izolat stoktan gelişirken, diğerleri gelişmemiştir. Bu testin sonucunda ise 100 LAB izolatından ancak 76'sı tanımlanabilmiştir. Tanımlanan bakterilerin en fazla oranda *L. fermentum* (%32,8 oranında), sonrasında sırasıyla, *L. crispatus* (%29,5 oranında), *L. paracesei* spp. *paracesei* (%26,2 oranında), *Lactobacillus acidophilus* (%14,7 oranında), *Lactobacillus pentosus* (%9,8 oranında) ve *Lactobacillus plantarum* (%3,3 oranında)'a ait olduğu saptanmıştır (Çizelge 3.10). Tannock (1999), laktobasillerin sınıflandırılmasında genotipik identifikasyonun daha güvenilir olduğunu bildirmiştir (Tannock, 1999). Bu amaçla, çalışmamızda bazı LAB izolatlarının 16s rRNA dizi analizi ile tanımlanmaları yapılmıştır. Bu sonuçlara göre ise 14 LAB izolatından 3 tanesi *Lactobacillus crispatus* (1MR3, 2MR5, 7MR5), 5 tanesi *L. jensenii* (2MR1, 5MR1, 10MR5, 10MR6, 10MR14) ve 6 tanesi de %99 benzerlikle *Enterococcus faecalis* (3M2, 5MR6, 8M10, 9M3, 9M8, 11M10) olarak tanımlanmıştır (Çizelge 3.11). 16s rRNA dizi analizi ile tanımlanan türlerin, API CHL 50 testiyle sonuçlarının farklılık gösterdiği gözlenmiştir.

Çalışmamıza benzer olarak yapılan çalışmalarda da vajinadan, yaygın olarak *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. cellobiotus*, *L. oris*, *L. reuteri*, *L. ruminis*, *L. salivarius*, *L. brevis*, *L. delbrueckii* ve *L. vaginalis* türlerinin izole edildiği bildirilmiştir (Silvester ve Dicks, 2003; Atassi ve ark., 2006; Martı'n ve ark., 2012). Çalışmamızda, vajinada yaygın bulunan bu LAB'lerinin çoğu izole edilmiştir (Çizelge 3.10).

Japon kadınların vajinal florasında *L. gasseri* ve *L. crispatus*'un baskın olduğu (Song ve ark., 1999), beyaz popülasyonun vajinal florasında ise *L. acidophilus*, *L. fermentum* başta olmak üzere, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. jensenii*, *L. casei*, *L. delbrueckii* ve *L. salivarius*'un bulunduğu (Redondo-Lopez ve ark., 1990), en düşük oranda da *L. iners*'in bulunduğu bildirilmiştir (Reid ve Bruce, 2003b).

Çalışmamızda ayrıca 152 tane gram pozitif katalaz pozitif bakteri izolasyonu yapılmıştır (Çizelge 3.2). Seçilmiş olan 82 izolatın mikrotitre plaka yöntemiyle biyofilm sonuçlarına bakıldığında, 15 izolatın (14P1, 7E3.1, 7E3.2, 12K1.1, 3B7, 6MR4, 6B2, 5M9, 5M4, 5M2, 5M1, 6M10, 5M6, 2M7 ve 6M9 izolatları) biyofilm oluşturmadığı, 17 izolatın (11K1, 1K2, 1K3, 1K1, 1Ç5, 6N3, 5N8, 6N2, 5N10, 2B9, 5B5, 1B2, 1B1.1, 6MR5, 5B3, 6M2 ve 5M7 izolatları) zayıf derecede (+), 24 izolatın (11K3, 11Ç3.2, 5B4, 1B2, 1K8, 1Ç1, 6N4, 3B2, 3B7, 1B2, 5N6, 6N8, 5N9, 6N1, 6B8, 6B4, 6B1, 6MR8, 5P3, 5P1, 5P4, 5P5, 5M5 ve 6M6 izolatları) orta derecede (++) , 26 izolatın (6B8, 1K5.1, 7Ç7, 5P3, 1K8, 7N2, 5M5, 2B9.1, 1B1.1, 19P1, 24P2, 14P2, 21P1, 7B6.1, 7B6.2, 6N10.2, 1K5, 2Ç5, 6N10, 5B10, 5B6, 5B4 ve 5B9 izolatları) ise yüksek derecede (+++) biyofilm oluşturduğu sonucuna varılmıştır (Çizelge 3.7).

Gram pozitif katalaz pozitif bakterilerinin tanımlanmaları VITEK – II testi aracılığıyla yönetici talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Seçilmiş olan 63 izolatın 10 tanesinin *Bacillus vallismortis*, 1 izolatın *Staphylococcus caprae*, 1 izolatın *Staphylococcus sciuri*, 1 izolatın *Staphylococcus hominis* ssp. *hominis*, 8 izolatın *Staphylococcus epidermidis*, 8 izolatın *Staphylococcus lentus*, 10 izolatın *Staphylococcus lugdunensis*, 23 izolatın *Staphylococcus haemolyticus* ve 1 izolatın *Kocuria kristinae* 'ye ait olduğu rapor edilmiştir (Çizelge 3.12).

Çalışmada ayrıca 18 maya izole edilmiştir. Elde edilen maya izolatlarının da mikrotitre plakada biyofilm oluşumları araştırılmıştır. Bu izolatların mikrotitre plaka yöntemiyle biyofilm oluşumlarına bakıldığında, 7 izolatın (27P2, 21P2, 18P1, 24P1, 14P1, 15P ve 25P1 izolatları) orta derecede (++) , 11 izolatın (19P3, 13P1, 13P2, 16P3, 17P2, 30P, 29P, 1Ç3, 5MR2, 8MR11 ve 16P izolatları) ise yüksek derecede (+++) biyofilm oluşturduğu saptanmıştır (Çizelge 3.8).

Yine maya izolatlarının hemolitik aktiviteleri değerlendirildiğinde, *C. tropicalis* 29P, *C. albicans* 18P1 - 24P1 - 30P - 19P3 - 8MR11 - 13P1 - 13P2 ve *C. glabrata* 5MR2 izolatlarının hemolitik aktivite göstermediği *C. albicans* 27P2, 19P3, 14P1 ve 21P2, *Candida tropicalis* 1Ç2 ve 1Ç3, *C. glabrata* 17P2 ve 16P ve *Candida* sp. 15P izolatlarının ise alfa hemolitik aktiviteye sahip olduğu sonucuna

varılmıştır (Çizelge 3.9). Luo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada insandan izole edilen *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* izolatlarının hepsinin alfa hemolitik aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. Yine yapılan başka bir çalışmada, 63 *C. albicans* izolatından 4 tanesinin alfa hemoliz gösterdiği, 53 tanesinin alfa + beta hemoliz gösterdiği, 6 tanesinin ise hemoliz göstermediği, 2 *C. tropicalis* izolatının da hemolitik aktiviteye sahip olmadığı bildirilmiştir (Özekinci ve ark., 2007).

Çeşitli *Candida* izolatlarının lipolitik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Patojenik *Candida* türlerinin çoğunun esteraz ve fosfolipazlar gibi birtakım lipolitik enzimleri salgıladığı ortaya konmuştur (Slifkin, 2000). Maya izolatlarının lipolitik enzim aktivitelerine baktığımızda; çalışma sonucunda *C. albicans* 21P2, 24P1, 25P1, 14P1, 19P3 ve 27P2, *C. glabrata* 5MR2, 17P2 ve 16P, *C. tropicalis* 1Ç2 izolatlarının agar yüzeyinde zon oluşturmadığı; yani lipolitik aktiviteye sahip olmadığı ortaya konmuştur. *Candida* sp. 15P, *C. albicans* 8MR11, 13P1, 13P2, 18P1 ve 30P, *C. tropicalis* 1Ç3 ve 29P izolatlarının ise 4 – 20 mm aralığında değişen oranlarda zon oluşturduğu; yani lipolitik enzim aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir. En düşük lipolitik enzim aktivitesine 29P izolatının, en yüksek lipolitik enzim aktivitesine ise 13P2 izolatının sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca, fosfolipazların, yüksek olasılıkla *Candida albicans*'ın patojenitesini arttırdığı bildirilmiştir. Çalışmamızda 18 *Candida* izolatının fosfolipaz aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur (Çizelge 3.9).

Mayaların tanımlanmaları ise MALDI – TOF Kütle Spektrofotometre Tekniği'yle Biomerieux firması tarafından yapılmış olup, test sonucunda 18 maya izolatından 11 tanesinin *C. albicans*, 3 izolatın *C. glabrata*, 3 izolatın *C. tropicalis* ve 1 izolatın da *Candida* cinsine ait olduğu ortaya konmuştur (Çizelge 3.9).

Lactobacillus türleri vajinal epitelyumda yoğun kolonizasyon yaparak, vajinal mikrofloranın kontrolünü sağlamaktadır (Strus ve ark., 2001). Vajinadaki laktik asit bakterileri, laktik asit ve bakteriyosin gibi antimikrobik üreterek, vajinayı patojenlere karşı korumaktadır (Redondo-Lopez ve ark., 1990; Schellenberg ve ark., 2010). Vajinadaki LAB'lerinin laktik asit üretimiyle vajinal homeostazis korunmaktadır. Laktik asit gibi organik asitlerin üretimiyle vajinal

pH'nın 4.5'in altında tutulması sağlanmaktadır. Vajinal pH'nın asidik olmasıyla, patojenlerin gelişimini önlemiş olmaktadır (Cheeti ve ark., 2006). Örneğin, *Gardnerella vaginalis* ürogenital bir patojen olduğundan (Boris ve Barbes, 1998), düşük pH, *Gardnerella vaginalis*'in gelişimi için istenen bir durum değildir. *G. vaginalis*, en iyi pH 6 – 6,5'te gelişmektedir. pH 4'te belirgin bir gelişme olmamakla birlikte pH 4,5'te *G. vaginalis*'in gelişimi başlamaktadır (Aroutcheva ve ark., 2001). Ayrıca, sağlıklı vajinanın düşük asiditesinin (pH 4), klamidya, trikomoniyazis, üriner sistem enfeksiyonları ve genital mikoplazma enfeksiyonunun azalan riskiyle ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Boskey ve ark., 1999).

Çalışmamızda vajinadan izole edilen LAB izolatlarının % asitlik miktarlarına bakıldığında, % asitlik miktarlarının 0,91 – 2,50 arasında değişkenlik gösterdiği sonucuna varılmıştır (Çizelge 3.13). Aslım ve Kılıç'ın yaptığı bir çalışmada da (2006), test ettikleri laktobasillerin % asitlik oranlarının 0,27 – 1,33 arasında değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir (Aslım ve Kılıç, 2006). Çalışmamızda, en düşük % asitlik miktarının *L. paracesei* spp. *paracesei* 10M7 izolatına ait olduğu (%0,91), en yüksek % asitlik miktarının ise *L. crispatus* 8MR20 izolatına ait olduğu (%2,50) rapor edilmiştir. Yine Aslım ve Kılıç'ın yaptığı çalışmada (2006), en yüksek % asitlik miktarının *L. gasseri* R4, R5 (%1,33, %1,18) ve *L. acidophilus* R1, R6 (%1,17, %1,12)'ya ait olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca Gil ve arkadaşları sağlıklı Brezilyalı kadınların vajinasından izole ettikleri LAB'lerinin laktik asit üretim miktarlarını araştırmıştır. Çalışmalarının sonucunda en yüksek laktik asit miktarının sırasıyla, *L. salivarius*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus* ve *L. jensenii*'ye ait olduğu bildirilmiştir. LAB'lerinin probiyotik özellikleri suşa özgüdür, suşa göre değişkenlik göstermektedir (Monteagudo-Mera ve ark., 2012).

Hidrojen peroksit, ya direkt olarak ya da peroksidaz enziminin arttırılmasıyla, vajinal mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmektedir (Eschenbach ve ark., 1989; Hillier ve ark., 1992). Hidrojen peroksit üreten laktobasillerin, reaktif oksijen türleriyle spesifik etkileşime girerek, vajinal kanserin kontrolünde de görev alabildiği rapor edilmiştir (Aroutcheva ve ark., 2001). Ayrıca, Lactobacilli tarafından üretilen hidrojen peroksitin, *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides bivia*, ve

E. coli üzerine öldürücü etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur (Klebanoff ve ark., 1991; Hillier ve ark., 1993). Hawes ve arkadaşları (1996), hidrojen peroksit üreten laktobasillerin vajinayla kolonizasyonunun, azalan bakteriyal vajinozisle ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Hidrojen peroksit aktivitesinin pH ile bağlantılı olduğu da bildirilmiştir. Hidrojen peroksit asidik ortamda stabil kalmaktadır ve hidrojen iyon konsantrasyonu azaldığında parçalanmaktadır. Bu yüzden vajina pH'sı arttığında, bakteriyosin etkinliğini kaybetmekte, hidrojen peroksit parçalanmakta ve laktobasiller *G. vaginalis* gibi diğer bakterilere karşı savaşmadığı bildirilmiştir (Aroutcheva ve ark., 2001).

Çalışmamızda tanımlanan LAB izolatlarının hidrojen peroksit üretim miktarlarının $0,308\pm 0,079$ - $0,934\pm 0,132$ $\mu\text{g/mL}$ arasında olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.13). Fontaine ve Taylor-Robinson (1990), sağlıklı kadınların vajinasından izole ettikleri *Lactobacillus* türlerinin, 155 - 310 $\mu\text{g/mL}$ hidrojen peroksit ürettiğini rapor etmişlerdir. Bir diğer çalışmada, vajinal LAB'lerdeki hidrojen peroksit üretim miktarlarının, 1,01 – 15,50 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişkenlik gösterdiği ortaya konmuştur (Aslım ve Kılıç, 2006). Bu sonuçlardan yola çıkarak, LAB'lerinin hidrojen peroksit üretim miktarlarının değişkenlik gösterebildiği gözlenmiştir.

Çalışmamızda, en düşük hidrojen peroksit üretim miktarına *L. fermentum* 5MR8 suşunun, en yüksek hidrojen peroksit üretim miktarına ise *E. faecalis* 11M10 suşunun sahip olduğu rapor edilmiştir. Gil ve arkadaşları (2010), hidrojen peroksit üreten vajina izolatlarından en yüksek miktarda *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, ve *L. vaginalis* türlerinin hidrojen peroksit ürettiğini ortaya koymuştur. Yapılan bir diğer çalışmada en yüksek hidrojen peroksit üretiminin *L. vaginalis* H5 (Aslım ve Kılıç, 2006) ve *L. fermentum* SK5 (Kaewnopparat ve ark., 2013)'e ait olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak hidrojen peroksit aktivitesinin de suşa özgü olduğu saptanmıştır.

Ayrıca, çalışmamızda tanımlanan LAB izolatlarının proteolitik aktivite miktarlarının ise, $1,047\pm 0,000$ - $14,438\pm 0,003$ mg/mL arasında değişkenlik gösterdiği sonucuna varılmıştır. *L. fermentum* 11MR20 izolatı en düşük, *L. jensenii*

10MR6 izolatının ise en yüksek proteolitik aktivite miktarına sahip olduğu ortaya konmuştur (Çizelge 3.13).

Laktobasillerin antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesinde E test, agar dilüsyon, disk difüzyon ve mikrobrot dilüsyon yöntemi gibi çeşitli metodlar kullanılmıştır (Danielsen ve Wind, 2003). Bizim çalışmamızda, 63 vajinal LAB izolatının antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesinde disk difüzyon tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla, penisilin, ampisilin, okzasilin, metisilin, vankomisin, sefalotin, klindamisin, tetrasiklin, eritromisin, gentamisin, trimetoprim + sulfometoksazol ve metronidazol olmak üzere toplam 12 antibiyotiğin etkinliği test edilmiştir (Çizelge 3.14).

Çalışmamızda, tanımlanan LAB izolatlarının 19 tanesinin penisiline ve 21 tanesinin ampisiline direnç geliştirdiği gözlenmiştir. Voravuthikunchai ve arkadaşları (2006), vajinadan izole edilen L 12A, L 12B, L 19B, ve L 20 laktik asit bakteri izolatlarının, penisilin ve ampisiline direnç gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Laktobasillerin penisilinlere duyarlı, buna karşın okzasilin ve sefalotine daha dirençli olduğu gözlenmiştir. (Danielsen ve Wind, 2003). Ayrıca yapılan bir çalışmada ampisiline daha düşük direnç gözlenmiştir (Goldstein ve ark., 2000). Bizim çalışmamızda da LAB'lerinin penisilin ve ampisine daha duyarlı oldukları gözlenmiştir.

Okzasilin antibiyotiğinde bizim çalışmamızda daha yüksek direnç gözlenmiştir. Test edilen LAB izolatlarından 51 tanesinin okzasiline dirençli olduğu ortaya konmuştur. Çalışmamızda bakteri hücre duvarına etki eden antibiyotiklerden en düşük duyarlılığa sahip antibiyotiğin okzasilin (51 izolat dirençli), en yüksek duyarlılığa sahip antibiyotiğin ise penisilin (19 izolat dirençli) olduğu gözlenmiştir.

Lactobacilli'nin genellikle vankomisine karşı duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Hanghshenas ve ark., 2014). Çalışmamızda, 12 antibiyotik arasında en fazla duyarlılığa sahip antibiyotiğin vankomisin olduğu gözlenmiştir; test edilen LAB izolatlarından 16 tanesi vankomisine dirençli bulunmuştur. Felten ve arkadaşları

(1999), *Lactobacillus acidophilus*'un vankomisine karşı duyarlı olduğunu rapor etmiştir.

Protein sentezini etkileyen antibiyotik gruplarına bakıldığında ise; çalışmamızda, tetrasiklin, eritromisin ve gentamisin duyarlılıklarının birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Test edilen LAB izolatlarından 17 tanesi gentamisine, 21 tanesi tetrasikline ve 22 tanesi eritromisin antibiyotiğine karşı dirençli olduğu ortaya konmuştur. Voravuthikunchai ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2006), 6 LAB izolatının geniş spektrumlu bir antibiyotik olan tetrasikline karşı duyarlı oldukları ortaya konmuştur. Ancak izole edilen LAB'lerinin çoğunun, eritromisin, gentamisin ve kanamisine direnç gösterdikleri rapor edilmiştir. Bir diğer çalışmada ise; test edilen tüm LAB suşlarının tetrasikline direnç göstermiş olduğu ortaya konmuştur (Cebeci ve Gürakan, 2003). Çalışmamızda bakteri protein sentezini etkileyen antibiyotiklerden en düşük duyarlılığa sahip antibiyotiğin klindamisin (48 izolat dirençli), en yüksek duyarlılığa sahip antibiyotiğin ise gentamisin (17 izolat dirençli) olduğu gözlenmiştir.

Laktobasillerin timetoprim – duyarlı dihidrofolat redüktaz nedeniyle trimetoprime duyarlılığı azalmıştır (Danielsen ve Wind, 2003). Bizim çalışmamızda da bu literatürü destekleyici bir sonuç ortaya çıkmıştır ki; test edilen LAB izolatlarından 51 tanesinin trimetoprim + sulfometoksazole karşı dirençli olduğu gözlenmiştir.

Metronidazol ve klindamisin, bakteriyal vajinoziste en yaygın kullanılan antibiyotiklerdir (Ocana ve ark., 2006). Çalışmamızda, bu sonuçlar ile bağlantılı olarak çoğu LAB izolatı klindamisin ve metronidazole dirençlilik gösterdiği gözlenmiştir. Test edilen LAB izolatlarından 48 tanesinin klindamisine, 55 tanesinin ise metronidazole direnç geliştirdiği ortaya konmuştur. Ocana ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *L. acidophilus* CRL1251 ve *L. salivarius* CRL1328 bakterileri dışında, aday probiyotik *Lactobacillus* suşlarının, yüksek metronidazol ve klindamisin konsantrasyonlarında gelişebildiği ortaya konmuştur. *Lactobacilli*'nin metronidazole dirençliliğinin, hidrojenaz aktivitesi yokluğu nedeniyle olabileceği rapor edilmiştir (Church ve ark., 1996).

Spesifik bir antibiyotiğe direnç geliştiren suşların, antibiyotik tedavi sürecinde, antibiyotikle birlikte verilebileceği bildirilmiştir (Cebeci ve Gürakan, 2003). Örneğin, bakteriyal vajinozis tedavisinde, antibiyotikle birlikte o antibiyotiğe duyarlı olmayan LAB suşlarının, floranın korunması açısından verilebileceği bildirilmiştir (Ocana ve ark., 2006). Yine, ürogenital bölge enfeksiyonları ve seyahate bağlı diyarenin tedavisinde, antibiyotikle birlikte probiyotik *Lactobacilli* eş zamanlı verildiğinde, tedavide daha iyi sonuç elde edildiği rapor edilmiştir. Böylece, tedaviyle birlikte daha kısa sürede intestinal flora yeniden oluşabilmektedir (Cebeci ve Gürakan, 2003). Nitekim, Carlstedt – Duke ve arkadaşları (1987), sıçanlara klindamisine duyarlı olmayan laktobasil ile birlikte eş zamanlı olarak antibiyotik tedavisi uyguladığında, laktik asit bakterisinin sıçan bağırsağındaki florayı restore ettiğini gözlemlemiştir. Bu anlamda, LAB'lerinin ticari probiyotik suş olarak kullanılmadan önce mutlaka antibiyotik dirençliliklerine bakılması gerektiği bildirilmiştir (Voravuthikunchai ve ark., 2006).

%90'ının *Candida albicans*'ın sebep olduğu vulvovajinal kandidiyazisin büyük çoğunluğu oral ya da topikal antifungal ajanlarla tedavi edilmektedir; *C. albicans* olmayan *Candida* türlerinin neden olduğu vulvovajinal kandidiyazis vakaları da giderek artmaktadır. Literatürde LAB'lerinin *Candida* üzerindeki antifungal etkisiyle ilgili birtakım çalışmalar yer almaktadır (Gil ve ark., 2010). Çalışma sonucumuzda, *L. crispatus* 2MR5, *L. crispatus* 7MR8, *L. crispatus* 7MR13.3 izolatlarının, *Candida* izolatlarına karşı herhangi bir antifungal aktiviteye sahip olmadığı gözlenmiştir. Ancak *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. paracesei* spp. *paracesei*, *L. pentosus* ve *L. plantarum* türlerine ait olan diğer LAB'lerinin, *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* türlerine karşı değişen miktarlarda antifungal etki gösterdiği ortaya konmuştur (Çizelge 3.15).

Osset ve arkadaşları (2001b), çeşitli LAB izolatlarının bakteriyosinlerinin, agar difüzyon tekniğiyle *C. albicans* ve *C. glabrata*'ya karşı antifungal aktivitelerini incelediklerinde, hiçbir zon oluşumunun gözlenmediğini rapor etmişlerdir. Ancak Ström ve arkadaşları (2002), siklik dipeptidler, piroglutamik asit ve lakton gibi çeşitli antifungal bileşiklerin, *Candida* türlerine karşı önemli bir etkiye sahip olduklarını ortaya koymuştur. Yapılan bir diğer çalışmada

Lactobacillus'un sadece bazı suşlarının *Candida* üzerine inhibitör etki gösterdiği ortaya konmuştur (Eschenbach ve ark., 1989). Atanossova ve arkadaşları (2003) ise *L. paracasei*'nin *Candida* türlerine karşı antifungal aktiviteye sahip olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca, *L. acidophilus*'un ise oral yolla alındığında, *Candida* vajinitine karşı koruyucu etki gösterdiği rapor edilmiştir (Drutz, 1992).

Laktobasillerin, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus agalactiae* gibi ürogenital patojenlerin enfeksiyonlarına karşı primer mikrobiyolojik bariyer olduğu uzun zamandan beri düşünülmektedir. Kadınların ürogenital sistemindeki *Lactobacilli*, istenmeyen mikrobiyal kolonizasyonu engellemektedir (Ekmekçi ve ark., 2009).

Çalışmamızda, LAB'lerinin saf filtratlarının Agar Difüzyon Tekniği'yle patojen bakteri izolatlarına karşı antibakteriyal etkileri araştırılmıştır. *E. faecalis* 11M10, *E. faecalis* 3M2 ve *E. faecalis* 9M3 izolatlarının dışındaki tüm izolatların (*E. faecalis* 9M8, *E. faecalis* 8M10, *Lactobacillus jensenii* 2MR1, *Lactobacillus jensenii* 5MR1, *L. jensenii* 10MR5, *Lactobacillus crispatus* 2MR5, *Lactobacillus crispatus* 1MR3, *Lactobacillus crispatus* 7MR5, *E. faecalis* 5MR6, *L. jensenii* 10MR6, *L. jensenii* 10MR14, patojen bakterilere (*S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. pasteurii*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. hominis*, *S. caprae*, *S. lugdunensis*, *S. caprae*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus vallismortis*, *Enterococcus faecalis* ve *Kocuria kristinae*) karşı antibakteriyal etki gösterdiği rapor edilmiştir. Özellikle, *L. jensenii* 2MR1, *L. jensenii* 5MR1, *L. crispatus* 2MR5, *L. crispatus* 1MR3 ve *L. jensenii* 10MR14 izolatlarının çoğu patojene karşı antibakteriyal etki gösterdiği gözlenmiştir. Yine, çoğu LAB izolatının *E. coli* ATCC 25922 ve *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşlarına karşı da antibakteriyal aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, tüm LAB'lerinin, en fazla *S. agalactiae* 7K8.1 izolatına karşı antibakteriyal aktivite gösterdiği gözlenmiştir (Çizelge 3.16). Fraga ve arkadaşları (2008), vajinadan izole edilen LAB'lerinin Gram pozitif ve Gram negatif olan *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda ayrıca pH'sı 5,5'e ayarlanmış LAB filtratlarının ve de katalaz ve proteinaz K ilaveli LAB filtratlarının, yine vajinadan izole edilmiş patojenlere antibakteriyal etkisi araştırılmıştır. pH'nın antibakteriyal aktivitesi üzerine etkisine baktığımızda, çalışma sonucunda test edilen bazı bakteriler üzerine antibakteriyal aktiviteye sahip *L. jensenii* 2MR1, *L. jensenii* 5MR1, *L. crispatus* 2MR5, *L. jensenii* 10MR6 ve *L. crispatus* 1MR3 izolatlarının nötralize pH'da aktivitelerini kaybettikleri gözlenmiştir. Buradan izolatların saf filtratlarında yer alan antimikrobiyal maddelerin pH 5,5'de aktivitelerini kaybettiği ortaya konmuştur (Çizelge 3.16). Antibakteriyal etkiye sahip izolatların hücresiz filtratlarındaki antimikrobiyal maddelerin katalaz ve proteinaz K enziminden etkilenmediği, inaktif forma geçmediği gözlenmiştir. Antimikrobiyal maddelerin, proteolitik enzimler ile muamelesi sonucunda aktivite kaybı göstermeleri etken maddenin protein yapısında olduğunu göstermektedir (Dinçer, 2007). Ayrıca, filtratlara katalaz enzimi eklendiğinde antimikrobiyal aktivitenin kaybolması, antimikrobiyal maddelerin hidrojen peroksit kaynaklı olmasına bağlanmıştır (Eschenbach ve ark., 1989). Buradan, çalışmamızda var olan antibakteriyal aktivitenin enzimlerden etkilenmeyip, pH'dan etkilenmesi sebebiyle, antibakteriyal etkinin asit oluşumundan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Agregasyon promote edici protein faktörü (aggregation promoting protein factor = APF), insan vajinal laktobasillerinin, sahip olduğu antagonistik mekanizmalarından biridir (Kmet ve Lucchini, 1997). LAB'lerinin otoagregasyon ve koagregasyon özelliklerinin, kromozomal genlerinde kodlandığı ve bu özelliklerin suşa özgü olduğu bildirilmiştir (Ocana ve ark., 2002).

Otoagregasyon ve koagregasyon aktivitesi, büyük derecede önem taşımaktadır (Jankovic ve ark., 2003). Juárez -Tomás ve arkadaşlarına (2005) göre, otoagregasyon aktivitesi daha asidik ortamlarda artmaktadır; öyle ki probiyotik laktobasiller, bu ortamlarda daha iyi gelişmekte, biyofilm oluşturmakta ve böylece patojen mikroorganizmaların aşırı gelişiminin inhibe edilmesine yardımcı olmaktadır. Çalışmamızda, 76 LAB izolatının 59 tanesinin otoagregasyon aktivitesi gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca, kuvvetli otoagregasyon yeteneğine sahip LAB'lerinden 1 tanesinin *L. paracesei* spp. *paracesei*, 2 tanesinin *L. fermentum*, 3

tanisinin *L. acidophilus* ve 8 tanesinin de *L. crispatus* türlerine ait olduğu ortaya konmuştur (Çizelge 3.17). Dimitonova ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2007), vajinadan izole edilen laktik asit bakteri suşlarının çoğunun otoaglutinasyon aktivitesine sahip olduğu ortaya konmuştur. Bu özellik, laktobasillerin vajinal epitele adezyonla biyofilm oluşumunu sağlayarak, patojenlerin epitele tutunmasının engellenmesiyle ilişkilendirilmiştir.

LAB 'lerinde otoagregasyon aktivitesi, mikrobiyal etkileşimin ortaya konmasına yardımcı olan temel bir aktivite testidir. Yapılan bir çalışmada 20 sağlıklı kadından izole edilen 60 *Lactobacillus* suşunun, 12 tanesinde otoagregasyon aktivitesi saptanmıştır (Kmet ve Lucchini, 1997). Bir diğer çalışmada, *L. fermentum* SK5'in otoagregasyon gösterdiği rapor edilmiştir (Kaewnopparat ve ark., 2013).

Pekçok yazar, *Lactobacillus* türlerinin, patojen bakterilerle koagregasyon yeteneğine de sahip olduğunu rapor etmiştir (Reniero ve ark., 1991; Charteris ve ark., 1997). Vajinal kullanım amaçlı probiyotik suşlarının seçiminde, LAB'sinin koagregasyon yeteneğinin olması önemli bir parametredir (Ekmekçi ve ark., 2009). Vajinal laktobasillerin *E. coli* ile koagregasyon gösterdiği bulunmuştur (Reid ve ark., 1988). Bu yüzden çalışmamızda *E. coli* kullanılmıştır. Sonuçlarımıza göre 76 LAB'sinin 31 tanesinin *E. coli* 25922 suşuyla koagregasyon aktivitesi göstermediği gözlenmiştir. *E. coli* 25922 suşuyla koagregasyon aktivitesi gösteren 45 LAB'sinden, 1 tanesinin *L. plantarum*, 3 tanesinin *L. pentosus*, yine 3 tanesinin *L. fermentum*, 4 tanesinin *L. acidophilus*, 10 tanesinin *L. crispatus* ve 14 tanesinin de *L. paracesei* spp. *paracesei*'ye ait olduğu ortaya konmuştur (Çizelge 3.17). Ekmekçi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2009), 19 vajinal Lactobacilli suşlarının hepsinin, *E. coli* ATCC 11229 ile koagregasyon yapabildiği ortaya konmuştur. Koagregasyonun suşa özgü ve inkübasyon koşulları ve zamana bağlı olduğu ortaya bildirilmiştir.

Probiyotiklerde aranan en önemli özelliklerden biri de; mikroorganizmanın, düşük pH ve yüksek safra tuzlarına dayanıklı olup, hayatta kalabilmesidir (Brink ve ark., 2006). Probiyotiklerin, gastrointestinal asit ve safra tuzuna dirençli,

antibiyotiklere duyarlı ve yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olması istenmektedir. Probiyotiklerin yüksek safra tuzu (%0,3) ve düşük pH (pH 2 – 3) gibi bazı koşulları minimum 90 dakika tolere edebilmesi gerekmektedir (Haghshenas ve ark., 2014). Çalışmamızda, test edilen 12 LAB izolatının hepsinin pH 2’de 3. saatin sonunda canlılığını koruyamadığı; ancak pH 3’te *L. jensenii* 2MR1, *E. faecalis* 8M10, *E. faecalis* 9M8, *L. jensenii* 10MR14 ve *E. faecalis* 11M10 izolatları dışındaki LAB’lerinin (*L. crispatus* 1MR3, *L. crispatus* 2MR5, *E. faecalis* 3M2, *L. jensenii* 5MR1, *E. faecalis* 5MR6, *L. crispatus* 7MR5, *E. faecalis* 9M3, *L. jensenii* 10MR5, *L. jensenii* 10MR6), 3. saatin sonunda pH 3’te canlılıklarını koruyabildiği gözlenmiştir (Çizelge 3.18). Succi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2005), *L. fermentum* SK5 suşunun, pH 2’de 2 saatten daha fazla hayatta kalamadığını, pH 3 ve pH 4’te canlılığını koruyabildiği ortaya konmuştur. Monteagudo – Mera ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2012), *Lactobacillus lactis* ATCC 11454 suşunun pH 2, 2,5 ve 3’te 3. saatin sonunda hala canlılığını koruyabildiği, *Lactobacillus paracasei* ATCC 27092, *Lactobacillus casei* ATCC 393 ve *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 suşlarının pH 2 ve 2,5’te 3. saatin sonunda canlılıklarını koruyamadığı; ancak pH 3’te 3. saatin sonunda canlılıklarını devam ettirebildikleri ortaya konmuştur (Monteagudo – Mera ve ark., 2012). Bu sonuçlardan da düşük pH’larda gelişimin suşa göre değişkenlik gösterebildiği gözlenmiştir.

Safra tuzlarının, hücre membranının organizasyonunu bozduğundan, bakteriyal hücreler üzerine toksik etkili olduğu bildirilmiştir (Succi ve ark., 2005). Çalışmamızda, test edilen 12 LAB izolatının hepsinin de, %0,1 ve %0,3 safra tuzu ortamında 3. saatin sonunda canlılıklarını koruyabildikleri gözlenmiştir (Çizelge 3.19). Kaewnopparat ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da (2013), *L. lactis* ATCC 11454, *L. paracasei* ATCC 27092, *L. casei* ATCC 393 ve *L. rhamnosus* ATCC 53103 suşlarının % 0.4 safra tuzu ortamında 3. saatin sonunda suşların, hala canlılıklarını koruyabildiği ortaya koymuştur. *L. fermentum* SK5 suşunun da, % 0,1 ve % 0,2 safra tuzu içeren ortamda canlı kalabildiği rapor edilmiştir. Safra tuzuna toleransını, laktik asit bakterilerinin ince bağırsakta hayatta kalması için gereken önemli bir özellik olduğu ortaya konmuştur (Succi ve ark., 2005). Ayrıca bu 12

izolattan 7 izolatin (*L. crispatus* 1MR3, *E. faecalis* 9M3, *L. jensenii* 2MR1, *L. jensenii* 5MR1, *L. jensenii* 10MR14, *L. jensenii* 10MR6 ve *E. faecalis* 8M10 izolatları) hidrofobisite yeteneğinin olduğu, 5 izolatin ise (*L. crispatus* 2MR5, *Enterococcus faecalis* 9M8, *E. faecalis* 5MR6, *E. faecalis* 3M2 ve *E. faecalis* 11M10) ise hidrofobisite yeteneğinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

LAB'leri tarafından üretilen EPS'nin izolasyonu, karakterizasyonu, biyosentezi ve fonksiyonel özellikleri hakkında birçok çalışma yayımlanmıştır. (Shene ve ark., 2008; Pan ve Mei, 2010). Bu polisakkaritler özellikle, fermente günlük ürünlere tekstürite kazandırıcı ve jelleştirici ajan olarak kullanılmaktadır. (Ricciardi ve ark., 1997). Ayrıca son zamanlarda LAB ekzopolisakkaritlerinin antikanser aktiviteleri hakkında da literatürde çalışmalar yer almaktadır. Ancak, EPS'nin ekstraksiyonu ve saflaştırma işlemleri sırasında, polisakkarit yapısının değişebildiği ve böylece hücre proliferasyonunu stimüle edici özelliklerini kaybedebildiği bildirilmiştir. Son dönemde yapılan çalışmalar, bakteriyal EPS tarafından indüklenen hücre proliferasyon stimülasyonunun, yapı bağımlı olduğunu desteklemektedir (Amrouche ve ark., 2006).

LAB'leri antitümör aktiviteye sahiptir; ancak hücre gelişiminin inhibisyonu üzerindeki mekanizması henüz tam aydınlatılamamıştır (Russo ve ark., 2007). Antikanser aktivite testlerinde LAB'lerinin farklı komponentleri denenmiştir. (Sekine ve ark., 1995; Motevaseli ve ark., 2013). Bu amaçla, canlı hücre ve hücre duvarı, ekzopolisakkaritler gibi hücrenel komponentleri kullanılarak, antikanser aktivite *in vivo* ve *in vitro* olarak araştırılmıştır (Kim ve ark., 2002; Lopez ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda da vajinadan izole edilen LAB'lerinin EPS'leri kullanılmıştır.

Çalışmamızda, vajinadan izole edilen 2 LAB'sinin HeLa ve HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, 2,5-5-7,5-10-15 ve 20 mg/mL EPS olmak üzere 6 farklı konsantrasyonun etkisi çalışılmıştır. Çalışma sonucunda doza bağlı olarak, en fazla 20 mg/mL'lik EPS konsantrasyonunda HeLa hücreleri üzerine belirgin bir etki gözlenmiştir. *E. faecalis* 3M2 izolatinın %61 oranında, *E. faecalis* 8M10 izolatinın ise, % 31 oranında HeLa

hücreleri üzerinde inhibisyon etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır. Liu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2011b), *L. casei* 01 ekzopolisakkaritin, kolon kanser hücre hattı olan HT – 29 ve intestine 407 hücreleri üzerinde değişen konsantrasyonlarda hücre canlılığını etkilediği ortaya konmuştur. Bakteri EPS'si intestine 407 hücrelerine 5 – 50 µg/mL konsantrasyonlarında uygulandığında hücre canlılığı %92,5- 101,6 (p >0,05) oranında gözlenmiştir. Ancak 100 µg/mL konsantrasyonunda hücre canlılığında belirgin bir azalma ortaya konmuştur. HT – 29 hücrelerinde de doza bağlı olarak en yüksek konsantrasyonda (100 µg/mL) etki gözlenmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise, *Enterococcus faecium* D-36 suşundan izole edilen EPS'nin Caco-2 hücreleri üzerinde 20 mg/mL'lik konsantrasyonda hücre canlılığında %20 oranında inhibisyona neden olduğu rapor edilmiştir (Altuğ, 2013). Çalışma sonucunda, EPS konsantrasyonuna bağlı olarak inhibisyon etkisinin de farklı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Lactobacillus acidophilus EPS'lerinin, kolon kanseri hücreleri üzerine antikanser aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur (Kim ve ark., 2010). Bazı yazarlar, bifidobakteriyal EPS'nin farklı epitelyal intestinal hücre hatları üzerine *in vitro* antikarsinojenik aktiviteye sahip olduğunu desteklemiştir. (You ve ark., 2004; Lopez ve ark., 2012). Yapılan bir çalışmada 18 bifidobakteri izolatının 12'sinin EPS'sinin HT29 hücrelerinin proliferasyonunu belirgin bir şekilde azalttığı ortaya konmuştur (Lopez ve ark., 2012). Bir diğer çalışmada ise; insan feçesinden izole edilen *L. acidophilus* 606 EPS'sinin, HT – 29 hücre proliferasyonunu doza ve zamana bağlı olarak inhibe ettiği bildirilmiştir. Çalışmanın başlangıç deneylerinde EPS konsantrasyonunda 100 mg/mL'ye kadar çıkmıştır; yüksek konsantrasyonlarda çözünme problemi nedeniyle doz konsantrasyonu olarak 10 mg/mL EPS kullanılmıştır (Kim ve ark., 2010). Bizim çalışmamızda da en yüksek doz konsantrasyonu olarak 20 mg/mL EPS kullanılmıştır.

LAB'lerinin antikanser etkileriyle ilgili çalışmaların çoğunluğu, kolorektal kanser ile ilgilidir (Thirabunyanon ve Hongwittayakorn, 2013; Nami ve ark., 2014). Ancak literatürde az da olsa rahim ağzı kanseriyle ilgili çalışmalar da yer almaktadır. Rahim ağzı kanseri, insan papilloma virüsü (HPV) ilişkili bir kanserdir. HPV enfeksiyonu sonrası, *Lactobacilli* tarafından baskın olan serviks mikroflorası,

serviks kanserinin gelişimini engellemek için savaşmaktadır. Literatürde, vajinadaki *Lactobacilli*'nin rahim ağzı kanserini önlemeye yönelik antitümör aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Motevaseli ve ark., 2013). Bu konuda yapılan çalışmalarda, HeLa serviks kanser hücre hattının, uygun bir model olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir (Rahmati ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda da, vajinadan izole edilen LAB EPS'lerinin, rahim ağzı kanseri üzerine sitotoksik etkilerinin araştırılması amacıyla HeLa hücre hattı kullanılmıştır.

Lee ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2015), kimçiden izole edilen *Lactococcus lactis* KC24 suşunun canlı hücrelerinin, HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri araştırıldığında, hücrelerde $21,16 \pm 0,92$ oranında sitotoksikite yarattığı ortaya konmuştur. *L. acidophilus* 36YL suşundan izole edilen metabolitlerin, HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkiye sahip olduğu yine yapılan bir çalışmayla rapor edilmiştir (Nami ve ark., 2014).

Haghshenas ve arkadaşları günlük ürünlerden izole edilen *L. plantarum* 15HN ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 44Lac suşlarının canlı hücrelerinin, HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksikitesini araştırdığında; *L. plantarum* 15HN'nin 50 µg/mL'lik konsantrasyonunda HeLa hücreleri üzerinde %20 oranında inhibisyona neden olduğunu, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 44Lac'ın 40 µg/mL'lik konsantrasyonunda HeLa hücreleri üzerinde çok az sitotoksikiteye neden olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışma sonucunda yine doza ve zamana bağlı etkiler gözlenmiştir. Yine Motevaseli ve arkadaşlarının (2013) yaptığı bir çalışmada da, *L. gasseri* ATCC 33323 homojenatının, *L. crispatus* SJ-3CUS suşunun homojenatına göre HeLa hücreleri üzerine daha toksik olduğu ortaya konmuştur. Bizim çalışmamızda da 2 farklı izolattan (*E. faecalis* 3M2 ve *E. faecalis* 8M10) ekzopolisakkaritlerinin, HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin farklı gözlenmiştir. *E. faecalis* 3M2 bakterisinin, *E. faecalis* 8M10 bakterisine göre HeLa hücrelerinde daha sitotoksik olduğu rapor edilmiştir (O'Toole ve Claesson, 2010). LAB'lerinin probiyotik etkilerinde olduğu gibi antikanser aktivitelerinde de suşa özgü özelliklerin olduğu saptanmıştır.

Ayrıca yapılan bir çalışmada LAB ekzopolisakkaritinin bizim çalışmamızdaki en yüksek doz gibi 20 mg/mL konsantrasyonda, HeLa hücreleri üzerine %86,86 ± 4,875 oranında sitotoksik olduğu ortaya konmuştur (Nguyen ve Nguyen, 2014). Bizim çalışmamızda ise 20 mg/mL'lik EPS konsantrasyonunun, *E. faecalis* 3M2 bakterisi HeLa hücrelerini %61 oranında, *E. faecalis* 8M10 bakterisi ise %31 oranında inhibisyona uğrattığı rapor edilmiştir.

Pediococcus pentosaceus dekstranının, 1mg/mL konsantrasyonda HeLa hücreleri (1×10^4) hücre / kuyu üzerinde antikanser etki göstermediği bildirilmiştir (Patel ve ark., 2010). Bizim çalışmamızda da en düşük doz olan 2,5 mg/mL'lik EPS konsantrasyonunda düşük bir inhibisyon etkisi gözlenmiştir. *E. faecalis* 3M2 bakterisi HeLa hücrelerini bu konsantrasyonda %7,5 oranında, *E. faecalis* 8M10 bakterisi ise HeLa hücrelerini %8 oranında inhibe ettiği rapor edilmiştir.

Pekçok kanser terapötiklerinin sağlıklı hücre ve dokulara da toksik etki yarattığı bildirilmiştir. Vajinal Lactobacilli canlı hücrelerinin, sağlıklı ve kanserli rahim ağzı hücrelerine uygulandığında, sağlıklı hücreler üzerine sitotoksik etki göstermediği; ancak Lactobacilli süpernatantları uygulandığında sağlıklı hücreler üzerine sitotoksik etki yarattığı yapılan bir çalışmayla ortaya konmuştur (Motevaseli ve ark., 2013). Haghshenas ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada da (2014), günlük ürünlerden izole edilen *L. plantarum* 15HN ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 44Lac suşlarının canlı hücrelerinin, sağlıklı hücre hattı olan HUVEC hücreleri üzerine de sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise; LAB'lerimiz HUVEC hücrelerine sitotoksik etki göstermiştir. En yüksek EPS dozu olan 20 mg/mL konsantrasyonda *E. faecalis* 3M2 bakterisi, HUVEC hücrelerini %88 oranında, *E. faecalis* 8M10 bakterisi ise HUVEC hücrelerini %85 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir.

Yine yapılan bir diğer çalışmada, *L. acidophilus* 606'nın ısıyla öldürülmüş hücrelerinin, normal hücrelere *L. casei* ATCC 393'ün ısıyla öldürülmüş hücrelerinden daha az sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Choi ve ark., 2006). Probiyotik özellik suşa göre değişkenlik göstermektedir (Dicks ve Botes, 2010).

SONUÇ

Vajinal Lactobacilli'nin rahim ağız kanseri hücreleri üzerindeki etkileri henüz tam olarak aydınlatılmamıştır (Motevaseli ve ark., 2013). LAB'lerinin antikanser aktiviteleriyle ilgili daha fazla çalışma yapılmasına gerek vardır (Kim ve ark., 2002). Gelecek araştırmalar, bu mikroorganizmaların gastrointestinal sisteme dayanlı kapsüllerde ve ovül/kapsül yapısındaki intravajinal farmasötik prepatlarda üretilmek üzere klinik alanda kullanımlarına yönelmiştir (Gil ve ark., 2010). Bu anlamda da, sağlıklı kadınlardan izole edilen yüksek asit üretimine sahip yeni suşların, probiyotik olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir (Aslım ve Kılıç, 2006).

Çalışmamızda *E. faecalis* 3M2 bakterisinin, *E. faecalis* 8M10 bakterisinin ekzopolisakkaritine göre HeLa hücreleri üzerine daha yüksek oranda toksisite gösterdiği gözlenmiştir. Buradan antikanser aktivitenin de, suşa göre değişkenlik gösterebileceği saptanmıştır. İzolatlarımızın, sağlıklı hücre hattı olan HUVEC hücrelerini de etkilemesi sebebiyle, etkili izolatımızın çeşitli farmasötik ve biyoteknolojik yöntemlerle geliştirilerek, hedefe yönlendirme yapılabilmesi mümkün olabilmektedir. Aynı zamanda, vajinadan izole edilen diğer LAB'lerinin de antikanser aktivitelerinin olup olmadığını ortaya koymak adına, çalışmalara devam edilecektir.

KAYNAKLAR

- Akçalı, A. (2010), “Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi,” *Türk Onkoloji Dergisi*, **25:3**, 119-123.
- Akçelik, M., Ayhan, K., Çakır, D., Doğan, H. B., Gürgün, V., Halkman, A., Kaleli, D., Kuleaşan, H., Özkaya, D. F., Tunail, N. ve Tükel, Ç. (2000), *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Birimi, Ankara, 2. Baskı, 229-275, 514-515.
- Altuğ, B. (2013), *Laktik asit bakterilerinden elde edilen ekzopolisakkaritlerin (eps) memeli kültür hücrelerinde biyolojik aktivitesinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Amrouche, T., Boutin, Y., Prioult, G. ve Fliss, I. (2006), “Effects of bifidobacterial cytoplasm, cell wall and exopolysaccharide on mouse lymphocyte proliferation and cytokine production,” *Int. Dairy J.*, **16**, 70–80.
- Anonim (2001), FAO/WHO. Regulatory and Clinical Aspects of Dairy Probiotics. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report.
- Antonio M. A., Hawes S .E. ve Hillier S. L. (1999), “The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species,” *J. Infect. Dis.*, **180**, 1950–1956.
- Antonio, M. A., Rabe, L. K. ve Hillier, S. L. (2005), “Colonization of the rectum by *Lactobacillus* species and decreased risk of bacterial vaginosis,” *J. Infect. Dis.*, **192**, 394–398.
- Arena, A., Maugeri, T. L., Pavone, B., Iannello, D., Gugliandolo, C. ve Bisignano, G. (2006), “Anti viral and immuno regulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*,” *Int. Immunopharmacology*, **6 (1)**, 8-13.

- Aslım, B. (1994), *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* Bakterilerinin Metabolik ve Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Bazı Fiziksel ve Kimyasal Mutajenlerin Etkisi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Aslım, B. ve Kılıç, E. (2006), “Some probiotic properties of vaginal lactobacilli isolated from healthy woman,” *Jpn. J. Infect. Dis.*, **59**, 249-253.
- Atanossova, M., Choiset, Y., Dalgalarondo, M., Chobert, J. -M., Dousset, X., Ivanova, I., ve Haertle, T. (2003), “Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous antibacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3,” *Int. J. Food Microbiol.*, **87**, 63–73.
- Atassi, F., Brassart, D., Grob, P., Graf, F. ve Servin, A. L. (2006), “*Lactobacillus* strains isolated from the vaginal microbiota of healthy women inhibit *Prevotella bivia* and *Gardnerella vaginalis* in coculture and cell culture,” *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **48**, 424–432.
- Badel, S., Bernardi, T. ve Michaud, P. (2011), “New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides,” *Biotechnol. Adv.*, **29:1**, 54–66.
- Banerjee, M. ve Sarkar, P. K. (2003), “Microbiological quality of some retail spices in India,” *Food Res. Int.*, **36**, 469–474.
- Beral, V. (2015), “Reprint of “Cancer of the cervix: A sexually transmitted infection?,” *Cancer Epidem.*, **39:6**, 1148-1151.
- Bergonzelli, G. E., Blum, S., Brussow, H. ve Corthesy-Theulaz, I. (2005), “Probiotics as a treatment strategy for gastrointestinal diseases?,” *Digestion*, **72**, 57-68.
- Bhaskaracharya, R. K. ve Shah, N. P. (2000), “Texture characteristics and microstructure of skim milk Mozzarella cheese made using exopolysaccharide and non-exopolysaccharide producing starter cultures,” *Aust. J. Dairy Technol.*, **55**, 132–138.

- Bhunia, A. K., Johnson, M. C., Ray, B. (1988), "Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*," *J. Appl. Bacteriol.*, **65**, 261-268.
- Boris, S ve Barbe's, C. (2000), "Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens," *Microbes Infect.*, **2**, 543-546.
- Boris, S., Suarez, J. E., Vázquez, F. ve Barbés, C. (1998), "Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens," *Infect. Immun.*, **66**, 1985–1989.
- Borstt, A. ve Fluit, A. C. (2003), "High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections," *J. Med. Microbiol.*, **52**, 971–974.
- Boskey, E. R., Cone, R. A., Whaley, K. J. ve Moench, T. R. (2001), "Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source," *Hum. Reprod.*, **16**, 1809–1813.
- Boskey, E. R., Telsch, K. M., Whaley, K. J., Moench, T. R. ve Cone, R. A. (1999), "Acid Production by Vaginal Flora In Vitro Is Consistent with the Rate and Extent of Vaginal Acidification," *Infect. Immun.*, **67**, 5170–5175.
- Böke, H., Aslım, B. ve Alp, G. (2010), "The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPS) produced by yogurt starter bacteria," *Arch. Biol. Sci.*, **62(2)**, 323-328.
- Brink, M., Todorov, S. D., Martin, J. H., Senekal, M. ve Dicks, L. M. T. (2006), "The effect of probiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the intestinal mucus," *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 813-820.
- Carlstedt-Duke, B., Alm, L., Hoverstad, T., Midvedt, A. C., Norin, K. E., Steinbakk, M. ve Midvedt, T. (1987), "Influence of clindamycin, administered together with or without lactobacilli, upon intestinal ecology in rats," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **45:5**, 251–259.

- Cebeci, A. ve Gürakan, C. (2003), "Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains," *Food Microbiol.*, **20**, 511–518.
- Charteris W. P., Kelly P. M., Morelli L., Collins J. K. (1997), "The role and therapeutic potential of *Lactobacillus* species in female urogenital tract infection," *Microecol. Ther.*, **26**, 59–96.
- Cheeti, S., Warriar, B. K. ve Lee, C. H. (2006), "The role of monocarboxylate transporters in uptake of lactic acid in HeLa cells," *Int. J. Pharm.*, **325**, 48–54.
- Chen, H., Zheng, Z., Chen, P., Wu, X. G. ve Zhao, G. (2012), "Inhibitory Effect of Extracellular Polysaccharide EPS-II from *Pseudoalteromonas* on *Candida* adhesion to Cornea *in vitro*," *Biomed. Environ. Sci.*, **25:2**, 210-215.
- Choe, E.S., Warriar, B., Chun, J.S., Park, J.C. ve Lee, C.H. (2004), "EDTA-induced activation of Ca-regulated proteins in the vaginal mucosa," *J. Biomed. Mater. Res.*, **68A**, 159–167.
- Choi, H. J., Lee, H. S., Her, S., Oh, D. H., Yoon, S. S. (1999), "Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc sp.* J2 isolated from the Korean fermented Vegetable Kimchi," *J. Appl. Microbiol.*, **86**, 175–181.
- Choi, S. S., Kim, Y., Han, K. S., You, S., Oh, S. ve Kim, S. H. (2006), "Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress *in vitro*," *Lett. Appl. Microbiol.*, **42**, 452–458.
- Church, D.L., Bryant, R.D., Sim, V. Ve Laishley, E.J. (1996), "Metronidazole susceptibility and the presence of hydrogenase in pathogenic bacteria," *Anaerobe*, **2**, 147–153.
- Claire, L., Glenn, V., Gibson, R. ve Robert, A. (2006), "Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*," *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 846–853.

- Çelik, S. (2011), *Çeşitli bor bileşiklerinin glioma ve nöroblastoma kanserli hücre hatlarında apoptotik etkilerin in vitro yöntemlerle araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Damia, G. ve Brogini, M. (2004), "Improving the selectivity of cancer treatments by interfering with cell response pathways," *Eur. J. Cancer*, **40**, 2550–2559.
- Danielsen, M. ve Wind, A. (2003), "Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents," *Int. J. Food Microbiol.*, **82**, 1– 11.
- Demir, E. (2014), *Fermente süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinde bakteriyosin üretiminin karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- De Stefanotommonaro, G., Simeon, V., Poli, A., Nicolaus, B. ve Carnuccio, R. (2007), "A polysaccharide from tomato (*Lycopersicon esculentum*) peels affects NF-κB activation in LPS-stimulated J774 macrophages," *J. Nat. Prod.*, **70:10**, 1636- 1639.
- De Vuyst, L. ve Degeest, B. (1999), "Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria," *FEMS Microbiol. Rev.*, **23**, 153–177.
- Degeest, B., Vaningelgem, F. ve De Vuyst, L. (2001), "Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria," *Int. Dairy J.*, **11**, 747–757.
- Demirci, M. ve Gündüz, H. (1994), "Süt Teknolojisi El Kitabı, Hasad Yayıncılık, Ankara, 184.
- Dicks, L. M. T. ve Botes, M. (2010), "Probiotic lactic acid bacteria in the gastrointestinal tract: health benefits, safety and mode of action," *Benef. Microbes*, **1:1**, 11-29.
- Dimitonova, S. P., Danova, S. T., Serkedjieva, J. P. ve Bakalov, B. V. (2007), "Antimicrobial activity and protective properties of vaginal lactobacilli from healthy Bulgarian women," *Anaerobe*, **13**, 178–184.

- Dinçer, E. (2007), *Et ve et ürünlerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve bunların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Doi, K. Phuong, O. T. A., Kawatou, F., Nagayoshi, Y., Fujino, Y. Ve Ohshima, T. (2013), "Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented rice bran product," *Adv. Microbiol.*, **3**, 265-272.
- Doleyres, Y., Schaub, L. ve Lacroix, C. (2005), "Comparison of the functionality of exopolysaccharides produced in situ or added as bioingredients on yogurt properties," *J. Dairy Sci.*, **88**, 4146–4156.
- Drutz, D. J. (1992), "Lactobacillus prophylaxis for *Candida vaginitis*," *Ann. Intern. Med.*, **116**, 419–420.
- Duboc, P., ve Mollet, B. (2001), "Applications of exopolysaccharides in the dairy industry," *Int. Dairy J.*, **11**, 759–768.
- Dubois M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. ve Smith, F. (1956), "Colorimetric method for determination of sugars and related substances," *Anal. Chem.*, **28**, 350–356.
- Ekmekçi, H., Aslım, B. ve Öztürk, S. (2009), "Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*," *Microbiol. Immunol.*, **53**, 59–65.
- Er, S., Koparal, A. T. ve Kıvanç, M. (2015), "Cytotoxic effects of various lactic acid bacteria on Caco-2 cells," *Turk. J. Biol.*, **39:1**, 23-30.
- Eschenbach, D. A., Davick, P. R., Williams, B. L., Klebanoff, S. J., Young-Smith, K., Critchlow, C. M. ve Holmes, K. K. (1989), "Prevalence of hydrogen peroxide-producing Lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis," *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 251–256.
- Felten, A., Barreau, C., Bizet, C., Lagrange, P. H. ve Philippon, A. (1999), "*Lactobacillus* species identification, H₂O₂ production, and antibiotic

- resistance and correlation with human clinical status,” *J. Clin. Microbiol.*, **37:3**, 729–733.
- Fettweis, J. M., Serrano, M. G., Girerd, P. H., Jefferson, K. K. ve Buck, G. A. (2012), “A New Era of the Vaginal Microbiome: Advances Using Next-Generation Sequencing,” *Chem. Biodivers.*, **9**, 965 – 976.
- Fichera, G.A. ve Giese, G. (1994), “Non-immunologically mediated cytotoxicity of *Lactobacillus casei* and its derivative peptidoglycan against tumor cell lines,” *Cancer Lett.*, **85**, 93–103.
- Fontaine, E. A, ve Taylor-Robinson, D. (1990), “Comparison of quantitative and qualitative methods of detecting hydrogen peroxide produced by human vaginal strains of lactobacilli,” *J. Appl. Bacteriol.*, **69**, 326-331.
- Fotakis, G. ve Timbrell, J. A. (2006), “In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride,” *Toxicol. Lett.*, **160**, 171–177.
- Fraga, M., Perelmutter, K., Delucchi, L., Cidade, E. ve Zunino P. (2008), “Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains,” *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, **93**, 71–78.
- Freshney, R. I., (2005), *Culture of Animal Cells*, Wiley, USA, 359-372.
- Fuller, R. (1989), “Probiotics in man and animal”, *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 365–378.
- Gil, N. F., Martinez, R. C. R., Gomes, B. C., Nomizo, A. ve de Martini, E. C. P. (2010), “Vaginal lactobacilli as potential probiotics against *Candida* spp.,” *Braz. J. Microbiol.*, **41**, 6-14.
- Gill, H. S. ve F. Guarner. (2004), "Probiotics and human health: a clinical perspective," *Postgrad. Med. J.*, **80**, 516-526.

- Giorgi, A., Torriani, S., Dellaglio, F., Bo, G., Stola, E. ve Bernuzzi, L. (1987), "Identification of vaginal lactobacilli from asymptomatic women," *Microbiologica*, **10**, 377–384.
- Goldstein, E. J. C., Citron, D. M., Merriam, C. V., Warren, Y. ve Tyrrell, K. L., (2000), "Comparative in vitro activities of ertapenem (MK-0826) against 1,001 anaerobes isolated from human intraabdominal infections," *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 2389– 2394.
- Guitarte, C., Alagkiozidis, I., Mize, B., Stevens, E., Salame, G. ve Lee, Y. C. (2014), "Glassy cell carcinoma of the cervix: A systematic review and meta-analysis," *Gynecol. Oncol.*, **133**, 186–191.
- Guo, Y., Pan, D., Li, H., Sun, Y., Zeng, X. ve Yan, B. (2013), "Antioxidant and immunomodulatory activity of selenium exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*," *Food Chem.*, **138**, 84–89.
- Güney, G. (2011), *Askorbik asit yüklü katı lipid nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Halkman, A.K. (2005), *Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*, Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti., Ankara, 73–89, 250.
- Hanghshenas, B., Abdullah, N., Nami, Y., Radiah, D., Rosli, R. ve Khosroushahi, A. Y. (2014), "Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines," *Anaerobe*, **30**, 51-59.
- Hassan, A.N. (2008), "Possibilities and Challenges of Exopolysaccharide-Producing Lactic Cultures in Dairy Foods," *J. Dairy Sci.*, **91**, 1282–1298.
- Hawes, S. E., Hillier, S. L., Benedetti, J., Stevens, C. E., Koutsky, L. A., Wolner-Hanssen, P. ve Holmes, K. K. (1996), "Hydrogen peroxide-producing

- lactobacilli and acquisition of vaginal infections,” *J. Infect. Dis.*, **174**, 1058-1063.
- Heinamann, C. ve Reid, G. (2005), “Vaginal microbial diversity among postmenopausal women with and without hormone replacement therapy,” *Can. J. Microbiol.*, **51:9**, 77-781.
- Heumann, D., Barras, C., Severin, A., Glauser, M. P. ve Tomasz, A. (1994), “Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes,” *Infect. Immun.*, **62**, 2715–2721.
- Hillier, S. L., Krohn, M. A., Klebanoff, S. J. ve Eschenbach, D. A. (1992), “The relationship of hydrogen peroxide-producing lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women,” *Obstet. Gynecol.*, **79**, 369-373.
- Hillier, S. L., Krohn, M. A., Rabe, L. K., Klebanoff, S. J. ve Eschenbach, D. A. (1993), “The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli and bacterial vaginosis in pregnant women,” *Clin. Infect. Dis.*, **16:4**, 273-281.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T. ve Williams, S.T. (2000), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Lippincott Williams & Wilkins, Fildelfiya, 527-567.
- Hongpattarakere, T., Cherntongi N., Wichienhot, S., Kolida, S. ve Rastall R. A. (2012), “In vitro prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria,” *Carbo. Poly.*, **87**, 846– 852.
- Iliev, I., Ivanova, I. ve Ignatova, C. (2006), “Glucansucrases from lactic acid bacteria (LAB),” *Biotechnol. Equipment*, **3**, 15–20.
- Iordache, F., Iordache, C., Chifiriu, M. C., Bleotu, C., Pavel, M. Smarandache, D., Sasarman, E., Laza, V., Bucu, M., Dracea, O., Larion, C., Cota, A. ve Lixandru, M. (2008), “Antimicrobial and immunomodulatory activity of some probiotic fractions with potential clinical application,” *Arch. Zootec.*, **11:3**, 41-51.

- Jankovic, I., Ventura, M., Meylan, V., Rouvet, M., Elli, M. ve Zink, R. (2003), "Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2," *J. Bacteriol.*, **185**, 3288–3296.
- Jespers, V., Menten, J., Smet, H., Poradosu, S., Abdellati, S., Verhelst, R., Hardy, L., Buvé, A. ve Crucitti, T. (2012), "Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests," *BMC Microbiol.*, **12**:1-10.
- Jimenez, N., Krouwer, V. J. D. ve Post, J. A. (2013), "A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro," *Cytotechnol.*, **65**, 1–14.
- Jolly, L., Vincent, S. J. F., Duboc, P. ve Neeser, J. R. (2002), "Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria," *Ant. van Leeuw.*, **82**: 367–374.
- Jones, H. W. (1997), "Record of the first physician to see Henrietta Lacks at the Johns Hopkins Hospital: History of the beginning of the HeLa cell line," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **176**, 227-8.
- Juárez Tomás, M. S., Wiese, B. ve Nader-Macías, M.E. (2005), "Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294," *J. Appl. Microbiol.*, **99**, 1383-1391.
- Kaewnopparat, S., Dangmanee, N., Kaewnopparat, N., Srichana, T., Chulasiri M ve Settharaksa, S. (2013), "In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman," *Anaerobe*, **22**, 6-13.
- Kaewsrichan, J., Peeyananjarassri, K. ve Kongprasertkit, J. (2006), "Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **48**: 75–83.
- Kato, I., Endo, K. ve Yokokura, T. (1994), "Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice," *Int. J. Immunopharmacol.*, **16**, 29–36.

- Kim, J. Y., Woo, H. J., Kim, Y. S. ve Lee, H. J. (2002), "Screening for antiproliferative effects of cellular components from lactic acid bacteria against human cancer cell lines," *Biotechnol. Lett.*, **24**, 1431–1436.
- Kim, Y., Oh, S., Yun, H. S. ve Kim, S. H. (2010), "Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells," *Lett. Appl. Microbiol.*, **51**, 123–130.
- Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Daito, T., Kaneko, T. ve Itoh, T. (1998), "Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*," *Int. J. Food Microbiol.*, **40**, 169–175.
- Kitazawa, H., Toba, T., Itoh, T., Kumano, N., Adachi, S. ve Yamaguchi, T. (1991), "Antitumoral activity of slime-forming encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated from Scandinavian røpy sour milk, "viili"," *Anim. Sci. Technol.*, **62**, 277–283.
- Klebanoff, S. J., Hillier, S. L., Eschenbach, D. A. ve Waltersdorff, A.M. (1991), "Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂-generating lactobacilli," *J. Infect. Dis.*, **164**, 94-100.
- Kmet, V. ve Lucchetti, F. (1999), "Aggregation of saw lactobacilli with diarrheogenic *Escherichia coli*," *J. Vet. Med.*, **46**, 683.
- Kmet, V. ve Lucchini, F. (1997), "Aggregation-promoting factor in human vaginal *Lactobacillus* strains," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **19**, 111–114.
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H. ve Uchiyama, H. (2008), "Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress," *J. Biosci. Bioeng.*, **106:4**, 381-386.
- Kumar, A.S., Mody, K. ve Jha, B. (2007), "Bacterial exopolysaccharides – a perception," *J. Basic Microbiol.*, **47:2**, 103–117.

- Kyriogou, M. ve Shafi, M. I. (2013), "Invasive cancer of the cervix," *Gynaecol. Reprod. Med.*, **23:11**, 343-351.
- Larsen, B., Monif, G. R. G. (2001), "Understanding the bacterial flora of the female genital tract," *Clin. Infect. Dis.*, **32**, 69–77.
- Lebeer, S., de Keersmaecker, S. C. J., Verhoeven, T. L. A., Fadda, A. A., Marchal, K. ve Vanderleyden, J. (2007), "Functional analysis of luxS in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation," *J. Bacteriol.*, **189**, 860–871.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. ve De Keersmaecker, S. C. (2008), "Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72**, 728-64.
- Lee, J. -W., Shin, J. -G., Kim, E. H., Kang, H. E., Yim, I. B., Kim, J. Y., Joo, H.-G. ve Woo, H. J. (2004), "Immunomodulatory and anti-tumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*," *J. Vet. Sci.*, **5**, 41–48.
- Lee, N. K., Han, K. J., Son, S. H., Eom, S. J., Lee, S. K. ve Paik, H. D. (2015), "Multifunctional effect of probiotic *Lactococcus lactis* KC24 isolated from kimchi," *Food Sci. Technol.*, **64**, 1036-1041.
- Lepargneur, J. P. ve Rousseau, V. (2002), "Protective role of the Doderleïn flora," *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, **31:5**, 485-94.
- Li, S., Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D., Niu, C., Yang, Z. ve Wang, Q. (2012), "Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods," *Food Chem.*, **135**, 1914–1919.
- Lin, W. H., Hwang, C. F., Chen, L. W. ve Tsen, H. Y. (2006), "Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products," *Food Microbiol.*, **23**, 74–81.

- Liu, C. F., Tseng, K. C., Chiang, S. S., Lee, B. H., Hsu, W. H. ve Pan, T. M. (2011a), “Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides,” *Sci. Food Agric.*, **91**: 2284–2291.
- Liu, C. T., Chu, F. J., Chou, C. C. ve Yu, R. C. (2011b), “Antiproliferative and anticytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01,” *Mutat. Res.*, **721**, 157–162.
- Liu, C., Lu, J., Lu, L., Liu, Y., Wang, F. ve Xiao, M. (2010) “Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1,” *Biores. Technol.*, **101:14**, 5528–5533.
- Liu, S. Q. ve Pilone, G. J. (1998)., “A REVIEW : Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance,” *J. Appl. Microbiol.*, **84**, 315–327.
- Looijesteijn, P. J., Trapet, L., De Vries, E., Abee, T. ve Hugenholtz, J. (2001), “Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*,” *Int. J. Food Microbiol.*, **64**, 71–80.
- Lopez, P., Monteserin, D. C., Gueimonde, M., de los Reyes – Gavilian, C. G., Margolles, A., Suarez, A. ve Ruas – Madiedo, P. (2012), “Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* strains elicit different in vitro responses upon interaction with human cells,” *Food Res. Int.*, **46**, 99–107.
- Luo, G., Samaranayake, L. P. ve Yau, J. Y. Y. (2001), “*Candida* Species Exhibit Differential In Vitro Hemolytic Activities,” *J. Clin. Microbiol.*, **39:8**, 2971-2974.
- Macfarlane, G. T. ve Cummings, J. H. (2002), “Probiotics, infection and immunity,” *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **15**, 501–506.
- Maggi, L., Mastromarino, P., Macchia, S., Brigidi, P., Pirovano, F. ve Matteuzzi, D.(2000), “Technological and biological evaluation of tablets containing

- different strains of lactobacilli for vaginal administration,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **50**, 389-95.
- Mårdh, P. A. (1991), “The vaginal ecosystem,” *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **165**, 1163–1168.
- Marshall, V.M., ve Rawson, H.L. (1999), “Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, **34:2**, 137–143.
- Martí'n, R., Sa'nche, B., Sua'rez, J.E. ve Urdaci, M. C. (2012), “Characterization of the adherence properties of human Lactobacilli strains to be used as vaginal probiotics,” *FEMS Microbiol. Lett.* **328**, 166–173.
- Massi, M., Vitali, B., Federici, F., Matteuzzi, D. ve Brigidi, P. (2004), “Identification method based on PCR combined with automated ribotyping for tracking probiotic Lactobacillus strains colonizing the human gut and vagina,” *J. Appl. Microbiol.*, **96**, 777–786.
- Mastromarino, P., Brigidi, P., Macchia, S., Maggi, L., Pirovano, F., Trinchieri, V., Conte, U. ve Matteuzzi, D. (2002), “Characterization and selection of vaginal Lactobacillus strains for the preparation of vaginal tablets,” *J. Appl. Microbiol.*, **93**, 884–893.
- Matu, M. N., Orinda, G. O., Njagi, E. N. M., Cohen, C. R. ve Bukusi, E. A. (2010), “In vitro inhibitory activity of human vaginal lactobacilli against pathogenic bacteria associated with bacterial vaginosis in Kenyan women,” *Anaerobe*, **16**, 210-215.
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D. ve Kjelleberg, S. (2011), “Should we stay or should we go: mechanism and ecological consequences for biofilm dispersal,” *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 39–50.
- McGroarty J.A. (1993), “Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract,” *FEMS Immunol. Med. Mic.*, **6**, 251–64.

- McMillan, A., Dell, M., Zellar, M. P., Cribby, S., Martz, S. ve Hong, E. (2011), "Disruption of urogenital biofilms by lactobacilli," *Colloid Surface B*, **86**: 58-64.
- Melis, G.B., Ibba, M.T., Steri, B., Kotsonis, P., Matta, V. ve Paoletti, A.M. (2000), "Role of pH as a regulator of vaginal physiological environment," *Minerva Ginecol.*, **52**, 111–121.
- Miglierini, P., Malhaire, J. P., Goasduff, G., Miranda, O. ve Pradier, O. (2014), "Cervix cancer brachytherapy: High dose rate," *Cancer Radio.*, **18**, 452–457.
- Miller, W. L. ve Reid, G. (2012), "Human studies on probiotics and endogenous lactic acid bacteria in the urogenital tract," *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects* (Ed: Lahtinen, S., Ouwehand, A. C. Salminen, S. ve Wright, A.), Taylor & Francis Group, USA, 543-559.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M., Remaud Simeon, M. (2001), "Homopolysaccharides from lactic acid bacteria," *Int. Dairy J.*, **11**, 675–85.
- Monteagudo-Mera, A., Rodriguez-Aparicio, L., Martinez-Blanco, J., Rua, H., Navasa, N., Garcia-Armesto, M. R. ve Ferrero, M. A. (2012), "In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin," *J. Funct. Foods*, **4**, 531-541.
- Mosmann, T. (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *J. Immunol. Methods*, **16:65(1-2)**, 55-63.
- Motevaseli, E., Shirzad, M., Akrami, S.vM., Mousavi, A.vS., Mirsalehian, A. ve Modarressi, M. H. (2013), "Normal and tumour cervical cells respond differently to vaginal lactobacilli, independent of pH and lactate," *J. Med. Microbiol.*, **62**, 1065–1072.

- Mozzi, F., Gerbino, E., Font De Valdez, G. ve Torino, M. I. (2009), "Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in an in vitro gastric system," *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 56–64.
- Mumcu, Z.N. (1997), *Kefirden İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Plazmit DNA'larının İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Nami, Y., Abdullah, N., Haghshenas, B., Radiah, D., Rosli, R. ve Khosroushahi, A.Y. (2014), "Probiotic potential and biotherapeutic effects of newly isolated vaginal *Lactobacillus acidophilus* 36YL strain on cancer cells," *Anaerobe*, **28**: 29-36.
- Nguyen, D. T. ve Nguyen, T. H. (2014), "Detection on Antioxidant and Cytotoxicity Activities of Exopolysaccharides Isolated in Plant-Originated *Lactococcus lactis*," *Biomed. Pharmacol. J.*, **7:1**, 33-38.
- Nikolic, M., López, P., Strahinic, I., Suárez, A., Kojic, M., Fernández-García, M., Topisirovic, L., Golic, N. ve Ruas-Madiedo, P. (2012), "Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics," *Int. J. Food Microbiol.*, **158**,155–162.
- Nwodo, U. U., Green, E. ve Okoh, A. I. (2012), "Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects," *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 14002-14015.
- O'Toole, P. W. ve Claesson, M. J. (2010), "Gut microbiota: changes through the lifespan from infancy to elderly," *Int. Dairy J.*, **20**, 281-291.
- Ocaña V. S., Pesce de Ruiz Holgado, A. A., Nader-Macías, M. E. (1999), "Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain," *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 5631-5635.
- Ocana, V. S. ve Nader – Macias, M. E. (2002), "Vaginal lactobacilli: self- and co aggregating ability," *Br. J. Biomed. Sci.*, **59**, 183-190.

- Ocana, V., Silva, C. ve Nader-Mac'ias, M. E. (2006), "Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic Vaginal Lactobacilli," *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, **2006**, 1–6.
- Okkers, D. J. (1999), "Characterization of pentocin TV35b bacteriocin like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*," *J. Appl. Microbiol.*, **87**, 726-734.
- Oktar, N. (2009), *K562 hücre dizisinde fosfin bileşiklerinin sitotoksik etkisinin mtt (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) ile araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Ooi, V. E., ve Liu, F. (2000), "Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide–protein complexes," *Curr. Med. Chem.*, **7:7**, 715–729.
- Orlando, A., Messa, C., Linsalata, M., Cavallini, A. ve Russo, F. (2009), "Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on proliferation and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric and DLD-1 colonic cancer cell lines," *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **31**, 108–116.
- Osset, J., Bartolomé, R. M. Ve García, E. (2001a), "Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells," *J. Infect. Dis.*, **183**, 485–491.
- Osset, J., García, E., Bartolomé, R. M. ve Andreu, A. (2001b), "Role of *Lactobacillus* as protector against vaginal candidiasis," *Med. Clin.*, **22**, 285-288.
- Önder, N. İ. (2013), *Bazı sentetik bileşiklerin anti-kanser özelliklerinin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Özekinci, T., Akpolat, N., Mete, M. ve Atmaca, S. (2007), "*Candida* Türlerinin *In Vitro* Hemolitik Aktivitesi," *Turk. J. Infect.*, **21:4**, 201-203.

- Pan, D. ve Mei, X. (2010), "Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12," *Carbohydr. Polym.*, **80**, 908–914.
- Paolillo, R., Carratelli, C.R., Sorrentino, S., Mazzola, N. Ve Rizzo, A. (2009), "Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells," *Int. Immunopharmacol.*, **9**, 1265-1271.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. ve Kotzekidou, P. (2003), "Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Grek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties," *Meat Sci.*, **65**, 859-867.
- Pascual, L. M., Daniele, M. B., Ruiz, F., Giardano, W., Pajaro, C. ve Barberis, L. (2008), " *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina," *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **54**, 141-148.
- Patel, S., Kasoju, N., Bora, U. ve Goyal, A. (2010), "Structural analysis and biomedical applications of dextran produced by a new isolate *Pediococcus pentosaceus* screened from biodiversity hot spot Assam," *Biores. Technol.*, **101**, 6852–6855.
- Patel, S., Majumder, A. ve Goyal, A. (2012), "Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria," *Indian J. Microbiol.*, **52:1**, 3-12.
- Pektaş, S. (2014), *Süt ve süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit üretim yeteneklerinin araştırılması*, Yüksek lisans tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Pelinescu, D., Chifiriuc, M. C., Ditu, L. M., Sarbu, I., Bleotu, C., Vassu, T., Stoica, I., Lazar, V., Corcionivoschi, N. Ve Sasarman, E. (2011), "Selection and characterization of the probiotic potential of some lactic acid bacteria isolated from infant feces," *Roman. Biotechnol. Lett.*, **16:3**, 6178-6189.
- Penna, A. L. B., Rao-Gurram, S. ve Barbosa-Ca'novas, G. V., (2007), "Effect of milk treatment on acidification, physicochemical characteristics, and probiotic cell counts in low fat yoğurt," *Milchwissenschaft*, **62**, 48–52.

- Pereira, D. I. A. ve Gibson, G. R. (2002a), "Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **37:4**, 259–281.
- Pereira, D. I. A. ve Gibson, G. (2002b), "Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut," *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 4689–4693.
- Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M. J., Cerning, J. ve Desmazeaud, M. (2000), "Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium," *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 3427– 3431.
- Quayle, A. J. (2002), "The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells," *J. Reprod. Immunol.*, **57**, 61–79.
- Rafter, J. (2003), "Probiotics and colon cancer," *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, **17:5**, 849-859.
- Rahmati, M., Bannazadeh, H., Fazli, D., Tahmasebzadeh, F., Farrokhi, A. ve Rasmi, Y. (2011), "The apoptotic and cytotoxic effects of Polygonum avicular extract on HeLa-S cervical cancer cell line," *Afr. J. Biochem. Res.*, **5**, 373-378.
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C.O., Brotman, R. M., Davis, C. C., Ault, K., Peralta, L., Forney, L. J., "Vaginal microbiome of reproductive-age women," (Ed: Gordon, J. I.), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, No: 108, 4680, 2011.
- Redondo - Lopez, V., Cook, R. L. ve Sobel, J. D. (1990), "Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora," *Rev. Infect. Dis.*, **12**, 856-872.
- Reid, G. (2002), "Probiotics for urogenital health," *Nutr. Clin. Care*, **5**, 3–8.

- Reid, G. ve Burton, J. (2002), "Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria," *Microbes Infect.*, **4**, 319–324.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. T. ve McCormick, J. K. (2003a), "Potential uses of probiotics in clinical practice," *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 658–672.
- Reid, G. ve Bruce, A.-W. (2003b), "Urogenital infections in women: can probiotics help?," *Postgrad. Med.J.*, **79**, 428-432.
- Reid, G., McGoarty, J. A., Angotti, R. ve Cook, R. L. (1988), "*Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens," *Can. J. Microbiol.*, **34**, 344.
- Reniero R., Cocconcelli P.S., Bottazzi V., Morelli L. (1991) High frequency conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation promoting factor. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 763–8.
- Ricciardi, A., Parente, E. ve Clementi, F. (1997), "A simple method for the screening of lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides in liquid media," *Biotechnol. Techn.*, **11:5**, 271-275.
- Rönnqvist, P. D., Forsgren-Brusk, U. B. ve Grahn-Håkansson, E. E. (2006), "Lactobacilli in the female genital tract in relation to the other genital microbes and vaginal pH," *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, **85**, 26 –735.
- Ruas-Madiedo, P., Abraham, A., Mozzi, F. ve de los Reyes-Gavilán, C.G. (2008), "Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria", *Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications*, (Ed: Mayo, B., López, P. ve Pérez-Martín, G.), Research Signpost, Hindistan, 137-166.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C.G. ve Salminen, S. (2006), "Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus," *J. Food Prot.*, **69**, 2011–2015.

- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. ve Zoon, P. (2002), "An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria," *Int. Dairy J.*, **12**, 163–171.
- Ruas-Madiedo, P., Medrano, M., Salazar, N., de los Reyes-Gavila, C. G., Pe' rez, P.F. ve Abraham, A. G. (2010), "Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate in vitro the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells," *J. Appl. Microbiol.*, **109**, 2079–2086.
- Russo, F., Orlando, A., Linsalata, M., Cavallini, A. ve Messa, C. (2007), "Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on the cell growth and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric cancer cells," *Nutr. Cancer*, **59**, 106–114.
- Ryan, M. P., Rea, M. C., Hill, C., Ross, R. P. (1996), "An Application in Cheddar Cheese Manufactura for a Strain Of *Lactococcus lactis* Producing a Novel Broad-Spectrum Bacteriocin, Lacticin 3147," *Appl. Environ. Microbiol.*, **62:2**, 612–619.
- Salminen, S., Ouwehand A. C. ve Isolauri, E. (1998), "Clinical applications of probiotic bacteria," *Int. Dairy Journal*, **8**, 563-572.
- Schellenberg, J., Smoragiewicz, W. ve Karska-Wysocki, B. (2006), "A rapid method combining immunofluorescence and flow cytometry for improved understanding of competitive interactions between lactic acid bacteria (LAB) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in mixed culture," *J. Microbiol. Meth.*, **65:1** 1–9.
- Sekine, K., Ohta, J., Onishi, M., Tatsuki, T., Shimokawa, Y., Toida, T., Kawashima, T. ve Hashimoto, Y. (1995), "Analysis of antitumor properties of effector cells stimulated with a cell wall preparation (WPG) of *Bifidobacterium infantis*," *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 148–153.

- Servin, A. L. (2004), "Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens," *FEMS Microbiol. Rev.*, **28**, 405–440.
- Shah, N.P. (2007), "Functional cultures and health benefits," *Int. Dairy J.*, **17**, 1262–1277.
- Shene, C., Canquil, N., Bravo, S. ve Rubilar, M. (2008), "Production of the exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus*: Effect of growth conditions on fermentation kinetics and intrinsic viscosity," *Int. J. Food Microbiol.*, **124**, 279–284.
- Shiraishi, T., Pankratova, S. ve Nielsen, P.E. (2005), "Calcium ions effectively enhance the effect of antisense peptide nucleic acids conjugated to cationic tat and oligoarginine peptides," *Chem. Biol.*, **12**, 923–929.
- Silvester, M. E. ve Dicks, L. M. T. (2003), "Identification of lactic acid bacteria isolated from human vaginal secretions," *Ant. van Leeuw.*, **83**: 117–123.
- Slifkin, M. (2000), "Tween 80 Opacity Test Responses of Various *Candida* Species," *J. Clin. Microbiol.*, **38:12**, 4626-4628.
- Sobel, J. D. ve Chaim, W. (1996), "Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis," *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2497-2479.
- Song, Y., Kato, N., Matsumiya, Y., Liu, C., Kato, H. ve Watanabe, K. (1999), "Identification of hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants," *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3062-3094.
- Srinivasan, S. ve Fredricks, D. N. (2008), "The Human Vaginal Bacterial Biota and Bacterial Vaginosis," *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, **2008**, 1-22.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. ve Svabic-Vlahovic, M. (2000), "A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation," *J. Microbiol. Methods*, **40**, 175–179.

- Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A., ve Schnürer, J. (2002), “*Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid,” *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 4322-4327.
- Strus, M., Marewicz, E., Kukla, G., Ruranska-Smutnicka, D., Przondo-Mordarska, A. ve Heczko, P.B. (2001), “Surface properties of *Lactobacillus* strains of human origin,” *Microb. Ecol. Health Dis.*, **13**, 240–245.
- Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S., Coppola, R. (2005), “Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese,” *FEMS Microbiol.*, **244**, 129-137.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S. ve Wannamaker, L. W. (1976), “Bacteriocins of gram positive bacteria,” *Bacteriol. Rev.*, **40**: 722-756.
- Tamer, A. Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, D., Bursalıoğlu, M. ve Oğultekin, R. (1989), 3. ve 4. Sınıf Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, Anadolu Üniversitesi Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, Eskişehir, No: 74, 23-25, 240.
- Tannock, G. W. (1999), “Identification of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*,” *Current Issues Molec. Biol.*, **1:1**, 53-64.
- Thirabunyanon, M. ve Hongwittayakorn, P. (2013), “Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **169**: 511-525.
- Tieking, M., Korakli, M., Ehrmann, M. A., Gänzle, M. G. ve Vogel, R. F. (2003), “In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria,” *Appl. Environ. Microbiol.*, **69:2**, 945-952.

- Todorov, S.D., Danova, S.T., Van Reenen, C.A., Meincken, M., Dinkova, G., Ivanova, I.V. ve Dicks, L.M.T. (2006), "Characterization of bacteriocin HV219, produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219 isolated from human vaginal secretions," *J. Basic Microbiol.*, **46**, 226–238.
- Todorov, S.D., Botes, M., Danova, S. T. ve Dicks, L. M. T. (2007), "Probiotic properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions," *J. Appl. Microbiol.*, **103**, 629-639.
- Tomas, M. –S. –J., Brue, E. ve Nader – Macias, M. –E. (2003), "Comparison of the growth and hydrogen peroxide production by vaginal probiotic lactobacilli under different culture conditions," *Am. J. Obset. Gynecol.*, **188**, 35-44.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. ve Jemal, A. (2012), "Global cancer statistics," *CA Cancer J. Clin.*, **65:2**, 87–108.
- Van Marle, M. ve Zoon, P. (1995), "Permeability and rheological properties of microbially and chemically acidified skim-milk gels," *Netherlands Milk Dairy J.*, **49**, 47–65.
- Vielfort, K., Sjclinder, H., Roos, S., Jonsson, H. ve Aro, H. (2008), "Adherence of clinically isolated lactobacilli to human cervical cells in competition with *Neisseria gonorrhoeae*," *Microbes Infect.*, **10**, 1325-1334.
- Vinderola, C.G. ve Reinheimer, J. A. (2003), "Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological resistance," *Food Res. Int.*, **36**, 895-904.
- Voravuthikunchai, S. P., Bilaso, S. ve Supamala, O. (2006), "Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli," *Anaerobe*, **12**, 221–226.
- Vu, V., Chen, M., Crawford, R. J. ve Ivanova, E. P. (2009), "Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation," *Molecules*, **14**, 2535-2554.

- Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C. ve Song, S. (2008), "Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir," *Int. J. Biol. Macromol.*, **43:3**, 283–288.
- Werning, M. L., Notararigo, S., Nácher, M., de Palencia, P. F., Aznar, R. ve López, P. (2012), "Biosynthesis, Purification and Biotechnological Use of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria," *Food additive* (Ed: El-Samragy, Y.), InTech open, Hırvatistan, 83-114.
- Wescombe, P. A., Heng, N. C. K., Burton, J. P., Chilcott, C. N. ve Tagg, J. R. (2009), "Streptococcal bacteriocins and the case for *Streptococcus salivarius* as model oral probiotics," *Future Microbiol.*, **4:8**, 19-35.
- Wu, M. H., Pan, T. M., Wu, Y. J., Chang, S. J., Chang, M. S. ve Hu, C. Y. (2010), "Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A.1 macrophages) and antimicrobial properties," *Int. J. Food Microbiol.*, **144**, 104–110.
- www.thermoscientific.com/onebio
- Ye, S., Liu, F., Wang, J., Wang, H. ve Zhang, M. (2012), "Antioxidant activities of an exopolysaccharide isolated and purified from marine *Pseudomonas* PF-6," *Carbohydr. Polym.*, **87**, 764– 770.
- Yiğit, T. (2009), "Süt ve süt ürünlerinden probiyotik bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması," Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- You, H. J., Oh, D. K., ve Ji, G. E. (2004), "Anticancerogenic effect of a novel chiroinositol containing polysaccharide from *Bifidobacterium bifidum* BGN4," *FEMS Microbiol. Lett.*, **240**, 131–136.
- Za'rate, G. ve Nader-Macias, M. E. (2006), "Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells," *Lett. Appl. Microbiol.*, **43**, 174-180.

Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., Yang, Z. ve Li, S. (2013), "Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88," *Int. J. Biol. Macromol.*, **54**, 270– 275.

Zhennai, Y. (2000), *Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structure and properties*, Doktora Tezi, Helsinki Üniversitesi, Gıda Teknolojisi Bölümü, Helsinki.

Zhu, W. M., Liu, W., Wu, D. Q. (2000), "Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasserii* KT7," *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 877-886.