

**EGE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA
PROJE RAPORU**

**EGE UNIVERSITY SCIENTIFIC
RESEARCH PROJECT REPORT**

Proje No:2000-ZRF-003
**FONKSİYONEL BESİNLERİN YAPIMINDA KULLANILAN
PROBİYOTİK MİKROORGANİZMALARIN FARKLI
ANTİBİYOTİK TÜREVLERİNE KARŞI OLAN
DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ
ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Proje Yürütücüleri:
Yrd. Doç.Dr. Gökhan KAVAS
Prof. Dr.Özer KINIK
Prof.Dr.Sevda KILIÇ
Doç. Dr. Harun UYSAL
Prof.Dr.Necati AKBULUT

**A STUDY ON THE DETERMINATION OF SUSCEPTIBILITY OF PROBIOTIC
MICROORGANISMS USING FOR PRODUCTION OF FUNCTIONAL FOODS, AGAINST
DIFFERENT ANTIBIOTIC DERIVATES**

Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Bölümü

Fac,of Agric.,Dept.of Dairy Technology

**Bornova-İzmir
2003**

ÖNSÖZ

Günümüzde antibiyotikler, hijyenik kalitesi kötü olan farklı gıdaların tüketilmesi ile metabolizmaya bulaşan değişik özellikteki patojen mikroorganizmalar sebebiyle ortaya çıkan birçok hastalığın tedavisinde etkili olarak kullanılan antimikrobien ajanlardır. Bu antimikrobien ajanlar uzun yıllardan beri patojen mikroorganizmaların yok edilemesinde ya da sayılarının azatılmasında etkili olarak kullanılmakla birlikte, özellikle son 20 yılda yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin etkilerinin bazı patojenlere karşı azaldığı tespit edilmiştir. Özellikle gıda toksikasyonlarında dünya genelinde en yaygın mikroorganizmalar olarak bilinen *Escherichiae coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella-Shigella* ve *Yersinia enterocolitica*'nın inaktivasyonunda uzun yıllardan beri kullanılan penisillinin ya da ampisilinin etkilerinin azaldığı, ya da daha başka bir anlatımla bu patojenlerin söz konusu antibiyotiklere direnç kazandıkları tespit edilmiştir. Bu durum insan sağlığı için çok büyük bir tehlike niteliği taşımakta ve antibiyotikler ile patojenler arasındaki bu savaşın antibiyotikler lehine çevrilmesi amacı ile yeni bazı antibiyotik türevlerinin üretiminin gerçekleştirildiği görülmektedir.

Bilim dünyası bu arayışlarında son derece haklı olmakla birlikte konu üzerinde yapılan çalışmalarda; bu savaşın sürdürülmesi sırasında metabolizmada ciddi problemlerin geliştiği ve bu problemler sonucunda, özellikle yaşlı ve genç insanlarda gaz, diyare, kabızlık, kolon kanserleri gibi rahatsızlıkların sıklıkla görüldüğü ifade edilmektedir. Antibiyotiklerin günümüzde yaygın bir sıklıkla kullanılması sonucunda ortaya çıkan bu rahatsızlıkların, en çok gastrointestinal sistemde görülmesi ise konunun bir başka boyutunu ortaya çıkarmıştır. Söz konusu bu boyut, metabolizmada doğumdan ölüme kadar varlığını sürdüren, ancak ilerleyen yaş ile bağlantılı olarak sayısal değerleri ve türleri değişen probiyotik bakteri florasıdır. Üzerinde yapılan incelemelerin son yıllarda önem kazandığı probiyotik bakteri florası; stresten başlayıp tüketilen gıdalara kadar uzanan çok geniş ve farklı bir yelpazede yer alan faktörlerden kolaylıkla etkilenebilmektedir. Bu etkileşim sonucunda ise; gastrointestinal florayı oluşturan türlerin buldukları bölgelerdeki cins ve sayılarının değiştiği belirlenmiştir. İnsan sağlığını çok yakından ilgilendiren bu sonuçlardan sonra konu ile ilgili olarak yapılan çalışmaların gerek sayılarının, gerekse niteliklerinin değiştiği görülmektedir.

Çok geniş alanda yürütülen bu çalışmaların ışığı altında; probiyotik bakterilerin tür ve sayılarını etkileyen diğer bir faktörün; değişik sebepler ile sıklıkla ve bilinçsiz olarak kullanılan antibiyotikler olduğu tespit edilmiştir. Aslında uzun yıllardan beri antibiyoterapi sonrası kişilerde görülen bir çok rahatsızlığın nedeninin; antibiyotiklerin probiyotik bakteriler üzerine inhibe edici etkisi sonucunda geliştiği ve bu yararlı bakteri florasının antibiyotik kullanımı ile gastrointestinal sistemden ya tamamen yok olduğu ya da sayılarında önemli azalmalar olduğu belirlenmiştir.

Zamanla konunun aydınlatılması ile probiyotik bakterilere olan ilginin arttığı ve gerçekleşen araştırmaların daha da genişlediği görülmekte ve araştırmacıların söz konusu bu yararlı florayı tekrar kazanabilmek için ne gibi uygulamaların yapılması gerektiği konusunda çalışmışlar başlattıkları bilinmektedir. Bu çalışmalarda, metabolizma için hayati önemi olan bu floranın antibiyotik kullanımı sonrası tekrar kazanılabilmesi için, ilk olarak bakterilerin bulunduğu ortamlardan izolasyonu gerçekleştirilmiş, daha sonra da bu bakterilerin identifikasyonları yapılmıştır. İncelemeler sonunda özellikleri tespit edilen bu bakterilerin, tekrar metabolizmaya kazandırılabilmesi için de farklı gıdalardan yararlanılmış ve bu gıdalar arasında en yaygın kullanım alanının fermente bir süt ürünü olan yoğurt ile gerçekleşebildiği belirlenmiştir. Bilimsel anlamda Fonksiyonel Gıdalar ismi ile tanımlanan bu ürünlere; metabolizmadaki biyolojik yararlılıklarının yüksek olması nedeni ile teröpatik gıdalar da denilmiştir. Özellikle restoran tipi beslenmenin yaygın olduğu çağımızda, yoğun iş temposunda çalışan insanların bu tür gıdalara olan ilgisinin de büyük olduğu görülmektedir.

Günümüzde antibiyotik kullanımına bağlı olarak probiyotik bakterilerde meydana gelen olumsuz değişikliklerin düzenlenmesi bir anlamda hedefine ulaşmış gibi görünse de, önemli bir başka eksiğin bulunduğu da görülmektedir. Bu önemli eksiklik; antibiyoterapi uygulaması sırasında bu bakterilerin kazanılmasıdır. Uzun süreli antibiyoterapi uygulanan hastalarda bu süre sonrasında probiyotik ilaveli gıdaların kullanılması son derece önemli katkılar sağlamıştır. Ancak kanımızca bu bakterilerin antibiyoterapi sırasında nasıl etkilendiklerinin bilinmesinin de bir o kadar önemlidir.

Durum böyle olduğunda ise bilinmesi ya da tespit edilmesi gereken önemli bir konu, yani probiyotik bakterilerin antibiyoresistans özelliklerinin tespiti bir zorunluluk olmaktadır. Ancak bu durumla ilgili olarak farklı görüşler ileri sürülmektedir. Gerçekleştirdiğimiz projemizin sonuçları yardımıyla ise, hangi görüşte olacağımız kesinleşecektir. Ayrıca metabolizmada antibiyoterapi sırasında probiyotik ilaveli gıdalardan, özellikle yoğurdun bu anlamdaki kullanım olanakları ile uzun süreli antibiyotik kullanan hastalarda görülen rahatsızlıkların ne ölçüde engellenebileceği belirlenecektir. Bunun yanında bu proje ile, farklı

nedenlerden ötürü süte bulaşmış olan antibiyotiklerin varlığında da üretimi mümkün olmayan fermente süt ürünlerinden yoğurdun üretim olanakları hakkında da bir fikir oluşması sağlanacaktır.

Bu proje Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca sağlanan destekle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla projenin yürütülmesi için maddi ve manevi destek sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu başta olmak üzere, Süt Teknolojisi Bölüm Başkanlığına, projeye katkıda bulunan tüm kişi ve kurumlara teşekkür ederiz.

Yrd. Doç.Dr. Gökhan KAVAS
Prof. Dr.Özer KINIK
Prof.Dr.Sevda KILIÇ
Doç. Dr. Harun UYSAL
Prof.Dr.Necati AKBULUT

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	IV
ABSTRAKT	VI
ABSTRACT	VI
1-GİRİŞ	1
2-LİTERATÜR ÖZETLERİ	7
3-MATERYAL VE METOD	27
3.1.Materyal	27
3.1.1.Analizlerde Kullanılan Bakterilerin Temini	27
3.1.2.Analizlerde Kullanılan Antimikrobien Ajanların Temini	27
3.2.Metod	27
3.2.1.Probiyotik bakterilerin zenginleştirilmesi	27
3.2.2.Zenginleştirilen probiyotik bakterilerin antibioesistans özelliklerinin belirlenmesi	28
3.2.3.Probiyotik bakterilerin minimum inhibitör testi ile antibioesistans özelliklerinin belirlenmesi	28
3.2.4. MİK testine göre belirlenen farklı antibiyotik kombinasyonlarında probiyotik bakterilerin antibioesistans özelliklerinin belirlenmesi	29
3.2.5. Antibiotiklere dirençli probiyotik bakteriler ile yapılan yoğurtların özelliklerinin tespiti	29
4.BULGULAR ve TARTIŞMA	30
4.1. <i>Enterococcus faecium</i> ' un Antibioesistans Özelliği	30
4.2. <i>Bifidobacterium bifidum</i> ' un Antibioesistans Özelliği	34
4.3. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ile <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ' un Antibioesistans Özelliği	37
4.4. <i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i> ' un Antibioesistans Özelliği	40

Sayfa No

4.5.MİK testine göre belirlenen farklı antibiyotik kombinasyonlarında probiyotik bakterilerin antibioresistans özelliklerinin belirlenmesi.....	42
4.6. Minimum İnhibitör Konsantrasyon Testine Göre Tekli ya da Çoklu Resistans Özellik Gösteren Bakteriler ile Yoğurt Üretimi.....	45
5. SONUÇ.....	47
ÖZET.....	51
SUMMARY.....	52
KAYNAKÇA.....	53
EK.....	61

ABSTRAKT

Bu araştırmada; *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* ile *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* ismi ile tanınan 5 adet probiyotik bakterinin, vankomisin, gentamisin, penisilin G, tetrasiklin ve ampisilin adı verilen 5 adet antibiyotik türevine olan antibioresistans özellikleri tek tek ya da kombinasyonlu uygulamalar ile, 0.5µg/ml, 1 µg/ml ve 2 µg/ml' lik konsantrasyon düzeylerinde belirlenmiştir. Araştırmada tespit edilen antibioresistans özellikler Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) testi ile belirlenmiş ve bu test ile belirlenen en düşük inaktivasyon dozları çalışmanın esasını oluşturmuştur.

Anahtar Kelime: *Probiyotik bakteri; Antibioresistans özellik*

ABSTRACT

In this study, it is assessed the effects of 5 antibiotic and their derivatives as call vancomycin, gentamycin, penicillin G, tetracylin and ampicillin at the level of 0.5, 1, 2 µg/ml alone and in combination on the antibioresistance characteristics of five probiotic bacteria as known *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*. The broad spectrum of antibioresistance specialities determined With Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) Test and the minimal dose proved by the this test has been taken in to the consideration.

Keywords: *Probiotic bacteria; Antibioresistance characteristics*

1.GİRİŞ

Günümüzde insan nüfusunun artışına paralel olarak beslenme ihtiyaçları çok geniş bir yelpazede yer alan gıdalar ile sağlanmaktadır. Gıdaların ve buna bağlı olarak bu gıdalardan elde edilen farklı ürünlerin yapımında da, gıdanın niteliklerini koruyabilmek, istenen tat ve aromada ürün elde edebilmek, bu gıdaların insan sağlığı olumlu etkilemesini sağlayabilmek için araştırmacılar, gelişen yeni teknolojileri uygulamaya sokmuşlardır. İnsan beslenmesinde ve sağlığının korunmasında gelişen yeni teknolojilere bağlı olarak, metabolizma için son derece yararlı yeni ürünler elde edilmiştir. Bununla birlikte, dünyanın bazı bölgelerinde yürütülen bu araştırma ve geliştirme çalışmalarının çok geri kaldığı ve bu bölgelerde ilkel üretim koşulları ile birlikte, insan sağlığı kriteri dikkate alınmadan yapılan üretimlerin varlığını sürdürdüğü görülmektedir.

İnsan sağlığını korumayı hedefleyen tüm kuruluş ve üreticiler, uygar toplumlarda insan beslenmesine gereken önemin verilmesinin zorunlu olduğunda birleşmişlerdir. Söz konusu kuruluşlar, bu konuya dikkat edilmeden gerçekleşen üretimlerin ya da bu üretimlerden elde edilen gıdaların tüketilmesi ile, insanlarda ishalden kansere kadar çok çeşitli ve çoğu zaman da öldürücü birçok hastalığın sağlığı tehdit edebileceğinde birleşmişlerdir. Gıdalar aracılığı ile insanlarda hastalık yapan oluşumlarda özellikle patojen mikroorganizmaların çok büyük bir payı olduğu görülmekte ve mikroorganizmalardan kaynaklanan gıda zehirlenmelerine literatürlerde, “**gıda enfeksiyonları**” ve “**gıda toksikasyonları**” adı verilmektedir.

Sağlıklı beslenmeyi kriter alan toplumsal kuruluşlardan olan Dünya Sağlık Örgütü; günümüzde gıdalara bağlı toksik enfeksiyonların sayısının açıklanan değerlerden en az 300 ile 350 kez daha fazla olduğunu ifade etmektedir. Toksik enfeksiyon; patojen mikroorganizmalar ile kontamine olmuş gıdaların yenmesinin ardından, kişilerin hasta olmalarına verilen bir tanımlama olmakta ve bu sebeple ileri gelen rahatsızlıklarda ortaya çıkan ağrılara da, "**enfeksiöz ağrılar**" denmektedir. Mikroorganizmalar, parazitler ve viruslar bu konuda önemli roller üstlenmektedirler. İşte bu sebeple bu canlılara, “**patojen ajanlar**” ya da “**mikroplar**” ismi verilmektedir (KAVAS ve KINIK 2000).

Günümüzde 100 kişiden biri gıdalara bağlı enfeksiyonlara maruz kalmakta ve özellikle teknolojik açıdan gelişmiş ülkelerde, Hepatit A, Brucelloz, Shigelloz, Salmonelloz ve *Escherichiae coli*' ye bağlı enfeksiyonların sıklıkla rastlanılan olgular

olduğu bildirmektedir. Campylobakteriozis, Yersiniozis, Listeriozis, Satphylococcus ve Fekal Streptokoklar ile ilgili salgınlarında önemli düzeyde olduğu görülmektedir. Ayrıca Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan istatistiklerde, yılda 1milyar ile 5 milyar arasındaki gencin (15 yaşından küçük) toksik enfeksiyonlardan kaynaklanan diyareye maruz kaldıkları ve bu enfeksiyonlardan 3 milyonunun ağır olarak seyrettiği ifade edilmektedir.

Sağlığımızın güvencesi olan hijyenik üretim proseslerinin uygulandığı üretimlerde ise, bu gıdaların mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyon ya da toksikasyonlardan arındırılabilirdiği görülmektedir. 20. yüzyılın en önemli buluşlarından biri olan Penisilin; keşfedildiği yıldan günümüze kadar, söz konusu hastalık yapıcı bu mikroorganizmalar ile savaşında, tek ve vazgeçilmez antimikrobien ajan olduğu bilinmektedir. Ancak adı geöen bu bakterilerin zaman içersinde morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin değiştiği de tespit edilmiştir. Bu nedenle antibakteriyeller ile patojen arasındaki savaşta araştırmacılar yeni antimikrobien ajanlar üretmek ya da bu savaşı başka boyutlara çekmeyi düşünmüşlerdir. Gıda üretim proseslerinde bu patojen bakterilere uygulanan teknolojik savaşında farklı uygulamalar hedeflenmiş ve denenmiştir. Araştırmacılar gıdaların üretiminde pastörizasyon, sterilizasyon, timalizasyon gibi ısısız parametrelerin hijyenik anlamdaki etkinliğini ortaya koymuşlar ve bunların etkinliklerini tespit etmişlerdir. Ancak, söz konusu parametreler hijyenik anlamda uyulması zorunlu kurallar olmakla birlikte, günümüzde gıda üretiminde hijyenik kuralların uygulanmaması ve ayrıca sıklıkla antibiyotik kullanılması nedeniyle toksik enfeksiyonların şiddetinin arttığı görülmektedir. Bu artışta özellikle, *Listeria monocytogenes* (*L.monocytogenes*), *Escherichiae coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, (*S.typhimurium*) ve *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) gibi patojen ajanların, farklı antibiyotiklere olan dirençliliklerinin zaman içersinde arttığı belirlenmiştir. Konu bu boyutu ile ele alındığında insan sağlığı açısından son derece önemlidir. Nitekim A.B.D.' de, her yıl 7 adet patojenin etkisiyle (*Campylobacter jejuni* (*C.jejuni*), *Clostridium perfiringens* (*Cl.perfiringens*), *E.coli* 0157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*(*S.aureus*) ve *Toxoplasma gondii*), 3.3 ile 12.3 milyon insanda toksik enfeksiyon ortaya çıkmakta ve bu enfeksiyonlardan 3900' ü ölümlerle sonuçlanmaktadır.

Toksik enfeksiyonlara neden olan patojen mikroorganizmaların farklı ekolojik koşullara göre değişen türleri, değişik gıdalarda üreyebilmekte ve insanlar üzerinde

önemli hastalıklara ve hatta ölümlere neden olabilmektedir. Bu anlamda yapılan incelemede;

AVRUPA kıtasında gıdalardan kaynaklanan toksik enfeksiyonlar çok sık görülmektedir. Örneğin özellikle Fransa' da 1992 yılında 732, 1994 yılında da 594 adet gıdalara bağlı toksik enfeksiyon varlığı tespit edilmiştir. Elde edilen raporlarda; bu enfeksiyonların % 83 ila % 87' sinin, *Salmonella* türü patojenler ile ilgili olduğu belirtilmiştir. Almanya' da ise; 1995 yılında 1 milyar *Salmonella* enfeksiyonu, İspanya' da ise, 1994 yılında 14 ayrı bölgede 7 aylık bir çalışma sonunda 48 *Salmonella* enfeksiyonu rapor edilmiştir. Avrupa' nın diğer bir bölgesi olan İskoçya' da da; *E.coli* 0157:H7 türünün toksik enfeksiyonların nedeni olduğu ve bu patojenle ilgili geçtiğimiz yıllarda, 396 olgunun varlığı teşhis edilmiştir. Gıdalara bağlı toksik enfeksiyonların nedeni olan patojen bakteri türlerinin AFRİKA kıtasında rapor edilmemesi nedeniyle, söz konusu enfeksiyonların sayısal değerinin az olduğu görülmektedir. Ancak bununla birlikte, Tanzanya' da 1991 yılında *Clostridium botulinuma'* a bağlı enfeksiyonların 18' inin ölümle sonuçlandığı, aynı yıl içerisinde Mısır' da, *E.coli* 0157:H7 suşuna bağlı ve çiğ sütün tüketimi ile ilgili büyük bir salgının varlığı saptanmıştır. Afrika kıtasında, *E.coli* 0157:H7 suşu ile ilgili olarak meydana gelen toksik enfeksiyonların % 6' sının pastörize edilmeden tüketilen sütlerden ileri geldiği de belirtilmektedir. ASYA kıtasında ise; özellikle de Japonya' da gıdalara bağlı enfeksiyonlar, diğer Asya ülkelerine göre daha az rastlanılmakla birlikte, geçtiğimiz yıl Japonya' da, *E.coli* 0157:H7 suşu ile ilgili olarak 10.000'e yakın salgın hastalığın meydana geldiği bildirilmiştir. 1971 ile 1990 yılları arasında ise Japonya ile Kore' de, patojen mikroorganizmalar ile ilgili çok sayıda klinik olgunun varlığı tespit edilmiştir. OKYANUS ülkelerinden özellikle Avustralya' da, 1991-1995 yılları arasında, çok sayıda enfeksiyonun meydana geldiği görülmektedir. Bu salgınlarda özellikle *Campylobacter* ve *Salmonella* türlerinin etkili olduğu, *Shigella* ile *Yersinia* türlerinin ise bu salgınlardaki rollerinin daha az olduğu görülmektedir. Okyanus ülkelerinden bir diğeri olan Yeni Zelanda' da, 1996 yılında Botulizm, Listerioz ile ilgili çok sayıda klinik olgunun varlığı tespit edilmiştir. KUZEY A.B.D.' de ve KANADA' da toksik enfeksiyonların kaynaklarının belirlenmesi ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda da, yaklaşık 9000 ile 40.000 arasında *Salmonella* ' ya bağlı enfeksiyonların varlığı gözlenmiş ve bu salgınlarda özellikle *Salmonella enteritidis'* in rol oynadığı belirlenmiştir. Ayrıca söz konusu gıdalara bağlı bu toksik enfeksiyonda etkin olan gıdanın ise, çiğ süt olduğu

bildirilmiştir. Bununla birlikte aynı bölgede 1994 yılında, 593 *Salmonella enteritidis* salgınının varlığından bahsedilmektedir. GÜNEY A.B.D ve KARAİBLER' de, toksik enfeksiyonların en belirgin sebebi olan diyareye bağlı ölümler tespit edilmiş ve bu ölümlerin daha çok genç insanlarda görüldüğü ifade edilmiştir. Latin Amerika' da ise, Hepatit enfeksiyonları, *E.coli*, Bruselloz ve Shigelloz enfeksiyonlarının etkin olduğu görülmüştür. Latin Amerika' da, 1991 ile 1994 yılları arasında bir milyon dolayında gıdalara bağlı olarak meydana gelen klinik toksik enfeksiyon salgınları tespit edilmiştir (ACAR ve NEU, 1985).

İnsan sağlığına önem veren birçok ülkede son derece önemli olan bu olguların büyük bir kısmına klinik raporlarda rastlanılmakta, ancak dünya genelinde yapılan araştırmalarda söz konusu bu raporların ya hiç tutulmadığı ya da bu raporlarda eksiklikler olduğu görülmektedir. Oysa söz konusu raporların tam anlamı ile tutulduğunda, gıdalara bağlı toksik enfeksiyonların öneminin çok önemli boyutlarda karşımıza çıkacağı görülecektir. Nitekim halk sağlığını son derece önemli boyutlarda tehdit edebilen bu olgu, çok zengin ekolojik şartlara ve son derece zengin bir mutfığa sahip olan ülkemizde üzerinde hassasiyetle durulması gereken konuların başında gelmelidir.

Patojen bakterilere bağlı olarak ortaya çıkan toksik enfeksiyonlar, artan çevre kirliliği, hijyenik olmayan şartlarda yapılan üretimler, sağlıksız koşullarda ürünün pazarlanması gibi sayılmayacak kadar çok faktör ile gün geçtikçe artan bir önem göstermektedir. Gıdalar ile bulaşan patojen mikroorganizmaların insanlar üzerinde meydana getirdiği rahatsızlıkların ortaya çıktığı günlerden itibaren bu hastalıklara karşı değişik antimikrobien ajanlar tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde söz konusu bu tedavi yöntemi halen geçerli olmakla birlikte, bu patojenlerin farklı antimikrobien ajanlara (antibiyotiklere) olan dirençliliklerinin (özellikle insan hastalıklarının nedeni olan patojenlerin değişebilen dayanıklılık genleri ya da bir bakterinin dayanıklı suşlarının artışı ile) değişkenlik göstererek yeni bir boyut kazandığı belirlenmiştir. Bu söz konusu değişime paralel olarak; insan sağlığı ile direkt ilişkide olan gıda üretimi, işlenmesi, ambalajlanması ve pazarlanması gibi konuların da teknolojik işlevselliğinin değişmesi gerekmekte, sağlıksız koşullarda üretim yapan işletmelerden ya da firmalardan piyasaya tüketim amaçlı sunulan gıdalar, insan sağlığını bakteriyolojik anlamda büyük tehlike ile karşı karşıya bırakmaktadır (WEGENER ve ark. 1997).

Bakterilerin zaman içerisinde artan antibiyotik dirençlerinin esas olarak; bakterilerin *mutasyon derecelerinin artışı ve farklı türler ya da suşlar arasındaki hücre transferleri* ile gelişme gösterdiği ortaya konmuştur. Nitekim araştırmacılar, patojen bakterilerin özellikle insan sağlığı üzerindeki tehditlerini ve bakterilerin değişik antimikrobiyal ajanlara olan dirençlerine bağlı olarak ortaya çıkan tehlikelerini engellemek amacıyla, uzun zamandan beri bu patojen bakterilerin mutasyon değişim derecelerinin azaltılması ile ilgili çalışmalar yürütülmektedirler (ANONYMOUS 1996, SMITH 1992, WEGENER ve ark., 1997).

Literatürlerde antimikrobiyal ajanlara dayanıklı bakterilerin meydana getirdiği sağlık problemleri, özellikle pediatri ve akut enfeksiyon görülen rahatsızlıklarda çok önemli bir yer tutmaktadır. Nitekim konu ile ilgili çok sayıda araştırmacı, nezle gibi bazı rahatsızlıklarda değişik türdeki antibiyotiklerin kullanılması ile, bakterilere ait olan dirençlilik profillerinin modifikasyona uğratıldığı konusunda birleşmektedirler. Bunlara ilave olarak araştırmacılar, antimikrobiyal ajanlara dirençliliği arttıran olgular arasında; bakterilerde meydana gelen modifikasyonlar, beslenmede çok çeşitli gıdaların bulunması ve ülkeler arasındaki göçlerin önemli bir paya sahip olduğunda birleşmektedirler. Nitekim geçtiğimiz yıllarda, patojen bakterilerin hızlı olarak gelişen antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi nedeniyle çok sayıda bakteri ve bu bakterilere ait salgınlar ile, bu salgınların rakamsal değerlerinin tespiti yapılabilmektedir (ISEMAN 1993, SMITH 1992).

Patojen bakterilerin antibiyotiklere olan dirençliliklerinin artışı neticesinde, yeni arayışlara gidilmiş ve bu alanda en etkili çarelerden birisi son yıllarda üzerinde oldukça fazla durulan “**Probiyotik bakteriler**” olmuştur.

Teknoloji ve tıp alanındaki (özellikle gastro-enterolojide) uygulamalarda kullanılan probiyotik bakteriler, esas olarak laktik asit bakterileri olarak bilinen *Laktobasiller, Streptokoklar ve Bifidobakterler'* den oluşmaktadır. Söz konusu bu üç genus gastrointestinal floranın en önemli popülasyonları olmakta ve bunların organizma için yararlı görevleri olduğu bilinmektedir. Probiyotiklerde kullanılan laktik asit bakterilerine ait türler; *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Enterococcus faecium ve Bifidobacterium bifidum* gibi bağırsaklara ait izolelerdir. Ancak son zamanlarda yapılan araştırmalarda adı geçen mikroorganizmalara, yoğurt üretiminde kullanılan *Lactobacillus bulgaricus ve Streptococcus salivarius ssp. thermophilus'* un da dahil edildiği görülmektedir (TEN BRINK ve ark. 1987).

Sağlıklı insan florasında normal şartlarda yer alan ve sağlığın korunmasında reddedilemez yararlı olan probiyotik mikroorganizmaların, çeşitli rahatsızlıklar sırasında kullanılan antibiyotik türevlerinin etkinliği ile ya popülasyonunun sayısal değeri azalmakta ya da tamamen ortamdan yok olmaktadır. Bunun neticesinde ise, doğal flora bozulmakta ve vücutta antibiyotiklerden kaynaklanan alerji, diyare, kabızlık, gaz gibi rahatsızlıklar ortaya çıkmaktadır. Bunun yanında söz konusu probiyotik bakteriler; günlük yaşamın getirdiği bazı olumsuzluklar (sinirsel yorgunluk ve stres gibi), farklı patojenlerin enfeksiyonları ve ilerleyen yaşla bağlantılı olarak değişim göstermektedirler. Yapılan çalışmalarda bu bakterilerin psikiyatrik hastalıklar ile olan ilişkileri ortaya konmuştur (FULLER 1998).

Günümüzde, Uluslararası Sindirim Sorunları Araştırma Merkezi A.B.D.' de, değişik sebeplerden ötürü her yıl 60-70 milyon civarındaki Amerikalının sindirim rahatsızlığı yaşadığını rapor etmiş ve bu araştırma merkezi, söz konusu rahatsızlıkların önlenmesinde ilaç tedavisinin yetersiz kaldığını ve bu yüzden probiyotik bakteriler kullanılarak üretilen fermente süt ürünlerinin tüketilmesi gerektiğini bildirmiştir (FULLER 1998, SWARTZ 1994).

Vücudun doğal intestinal florasında bulunan ve organizma için yararlı olan bakterilerin çok farklı etkenlerden kolaylıkla etkilenecek sayılarının azalması, tamamen yok olması karşısında bilim dünyası bu yararlı florayı korumak ya da tekrar geri kazanmak için arayışa girmiş ve "probiyotik mikroorganizmalar" değişik ürünler ile tüketime sunularak bu ürünler **“Fonksiyonel Ürünler”** isimini vermişlerdir.

Bu projede; metabolizmanın sağlıklı olabilmesi için gastrointestinal florada sayıları ve türleri yaşa göre farklılık gösteren çok sayıda probiyotik mikroorganizma türünün farklı antibiyotik türevlerine karşı olan etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu sayede bir hastalık nedeni ile uzun süreli antibiyotik kullanan kişilerin, bir yandan doğal flora dengesinin bozulmasının önlenmesi, bir yandan da antibiyotiklerden kaynaklanan çok sayıdaki rahatsızlığın oluşumunun durdurulabilmesi gerçekleştirilebilecektir. Bu hedefe probiyotik bakteriler kullanılarak üretilen yoğurtlar ile ulaşılması da çalışmanın süt teknolojisi açısından önemini oluşturmuştur.

2.LİTERATÜR ÖZETİ

Sağlıklı bir insan vücudunda probiyotik mikroorganizmalar belli oranlarda bulunmaktadır. Probiyotik mikroorganizma florası, vücudun mukoz membranlarında ve sindirim bölgelerinde kolonize olan ve genel olarak "**acidophilus**" olarak bilinen bakterilerdir. Vücuttaki gastrointestinal mikroorganizma florasında 400 ila 500 arasında farklı türde, gerek patojen gerekse probiyotik mikroorganizma bulunmaktadır. Vücudun sağlıklı olabilmesi için probiyotik mikroorganizma florasının üzerinde yapılan çalışmalarda, mikrofloral koloniler içersindeki probiyotiklerin etkinliğini ve günlük dengesinin getirdiklerini bilmenin gerekli olduğu ifade edilmektedir. Bu nedenle; insan sağlığının dengesini bozan faktörlerin ne olduğunu açıklamak ile işe başlamak yararlı olmaktadır. Bu faktörler;

- çevrede olan ani değişimler
- su ve besinlerin kaliteleri
- günlük enerji tüketimi
- hayvansal ürünlerin aşırı (esas olarak et) miktarları, kafeinin, alkolün ve farklı ilaçların kullanımı.
- Diğer çevresel faktörlerdir.
- Sıklıkla ve yüksek dozda antibiyotik kullanımı

Günümüzde; probiyotik mikrofloraya ait olan çok özel fonksiyonlar nedeniyle bu bakterilerin, insan sağlığında çok önemli rolleri oldukları ispat edilmiş ve bu bakterilerin vücut için gerekli olan diğer faktörlerin (vitaminler, enzimler v.b.gibi) sundukları avantajları yerine getirebildikleri belirlenmiştir (BERNET ve ark. 1994).

Yüzyıllar boyunca insanlar, sağlıklı olmak için hastalıklar ile savaşmışlar ve probiyotiklerce zengin ürünleri tüketmişlerdir. Bu tüketim sonucunda, vücudun sağlıklı ve güçlü olduğu gözlenmiştir. Bu mikroorganizmaların, mukoz membranlarda ve sindirim bölgelerinde nöbetçiler gibi görevleri bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılan incelemelerde, vücutta probiyotik mikroorganizmaların ürettiği esas maddeler, Çizelge 1' deki gibi sınıflandırılmıştır.

Çizelge 1. Probiyotik Mikroflora Tarafından Üretilen Esas Maddeler (DONOHUE ve ark. 1998).

Vitaminler : K vitamini, folik asit, biotin, B1, B2, B6, B12, Niasin ve priydokin.

Enzimler : Laktaz gibi sindirim enzimleri (esas olarak süt ürünlerin sindiriminde), serbest bölgelerin düzenlenmesine yardımcı olan karbonhidrat enzimleri, sindirim ve protein enzimleri, yağ enzimleri.

Uçucu yağ asitleri : Besinlere ait yağ asitlerinin kısa zincirleri yardımıyla üretilen bu yağ asitleri sayesinde, optimum düzeyde sindirim için gerekli olan pH dengesinin sağlanması.

Probiyotiklerin önemi; sindirime yardım etmeleri, sindirilip sindirilmemeleri, bunların kullanım amacına tam olarak hizmet edip etmemesi ile ilgili konuları kapsamaktadır. Çizelge2' de, probiyotik mikroorganizmaların sindirilmemesinden sonraki metabolizmadaki yaşamsal oranları görülmekte ve probiyotikler ile ilgili olarak yapılan farmokolojik çalışmaların 3 esasa dayandığı bildirilmektedir. Bu esaslar;

- a) geçiş mikroorganizmalarının aktif içeriklerinin tanımlanması
- b) farmokinetik etkinin tanımlanması (yapışıklık kapasitesi, kolonizasyon)
- c) sağlıkla ilgili yararlı etkilerin açıklanmasına çalışılmasıdır (MARTEAU ve ark. 1993, MARTEAU ve VESA 1998)

Buna göre yapılan araştırmalarda; sindirimde asıl rolü üstlenen ve bağırsağın farklı kısımlarında bulunan aktif mikroorganizma türlerinin kapasitelerinin ve çeşitlerinin büyük değişiklikler gösterdiği belirlenmiştir (CANGANELLA ve ark. 1997).

Sindirim kanalının değişik kısımlarında bulunan probiyotik bakterilerin aktiflik konsantrasyonlarının gıdaların bağırsaktaki absorpsiyon değerleri ile ve absorbe edilen kısmın dışında arta kalan posa oranlarına bağlı olduğu belirlenmiştir (MARTEAU ve ark. 1993, MARTEAU ve VESA 1998).

Probiyotik bakterilerden *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* ve *Bifidobacterium* türü mikroorganizmaların hücresel yapıları, midede, ince bağırsakta ve çoğu kez de yüksek oranda kalın bağırsakta bozulmaktadır. Probiyotiklerin sindirimi epitelyum' da meydana gelmekte ve bu olguya çevresel faktörler etki edebilmektedir (BERNET ve ark. 1994).

Söz konusu bu özellik; lokal bağışıklık sistemi ile ince bağırsağın iç yüzeyinin çok sıkı bir ilişki içerisinde olduğunun bir kanıtı olarak gösterilmektedir. Bu ilişki nedeniyle probiyotiklerin sindiriminde, değişik avantajların ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Sindirime uğramış probiyotiklerin florada, çevresel koşullara dayanıklılık göstererek kolonize özelliğini kaybetmeden uzun süre canlı kalabildikleri henüz belirlenmemiştir. Nitekim konu ile ilgili olarak yapılan birçok çalışmada bunu destekler yöndedir. Buna rağmen yakın bir zamanda yapılan iki çalışmada; *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus'* a ait 2 suşun, rektal ve jejunal mukozada uzun süreli koloni oluşturabildikleri belirlenmiştir (JOHANSON ve ark. 1993, ALANDER ve ark. 1997).

Çizelge2. Probiyotik Bakterilerin Sindirimden Sonraki Popülasyon Yüzdeleri (BENGMARK 1998).

Probiyotikler	% Yaşam
<i>Bifidobacterium subsp.</i>	30
<i>L.plantarum NCIB 8826</i>	25
<i>L.acidophilus</i>	2-5
<i>L.rhamnosus GG</i>	1-5
<i>L.Salivarius UCC 118</i>	0.2
<i>Lactococcus lactis TC 165.5</i>	0.1-2
<i>S.boulardii</i>	0.36
<i>L.reuteri</i>	0.01

Probiyotik mikroorganizmalar açısından bir çok konu açıklığa kavuşmakla birlikte, bu mikroorganizmalar ile ilgili bazı hususlar henüz aydınlatılabilmemiş değildir. Örneğin; probiyotik mikroorganizmaların vücut içerisinde bir organdan bir başka organa geçişleri ile ilgili olarak herhangi bir çalışma olmamakla birlikte, bu konunun üzerinde araştırmaların devam ettiği görülmektedir. Ayrıca, gıdalar ile vücuda alınan probiyotik bakteriler ile ilgili hiçbir enfeksiyon olgusunun literatürlerde yer almadığı, yalnızca *Sacchoromyces boulardii'* ye ait enfeksiyonunun raporlarda yer aldığı görülmektedir. Bunun yanında probiyotik bakterilerin antibiyotiklere direnç özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili az sayıda çalışmanın bulunduğu tespit edilmiştir (DONOHUE ve ark. 1998).

Probiyotikler, vücut üzerinde fizyolojik özelliklerin geliştirilmesine olanak tanıyan mikroorganizmalardır (FULLER 1998, SCIFFRIN ve ark. 1995).

Bu mikroorganizmalar ister değişik gıdalar ile, ister fermente süt ürünleri ile, isterse lipolize formda ilaçlar ile organizmaya ulaşsın, bu materyallerin içerisinde genellikle probiyotik bakteri popülasyonlarının olduğu görülmektedir (BOULLOCHE ve ark. 1994).

Gastroenteroloji' de probiyotiklerin sağlık üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar oldukça geniş bir alana yayılmaktadır. Bunlar; değişik kaynaklı diyare olguları, immunomodülasyon ve ürogenital enfeksiyonlar, kolik kanserler, bağırsakta bulunan gizli ve genetiksel kaynaklı iltihaplar gibi konuları kapsamaktadır. Günümüzde bu amaçla kullanılan probiyotik bakteri türleri ve metabolizma üzerindeki yararları, Çizelge 3' de verilmiştir. Probiyotik bakterilerin intestinal floradaki etki mekanizmalarının intestinal floranın özellikleri ile de çok yakından ilişkili olduğu ifade edilmekte ve salisilik asit, monomer glikoz ve N-asetilglukozamin gibi maddelerin bulunmaları ile probiyotik bakterilerin randımanlarının artış gösterdiği ifade edilmektedir (FULLER 1998).

Probiyotik bakterilerin bağırsaklara ait ekolojik dengenin korunmasında (*Lactobacillus acidophilus* kalın özellikle de ince bağırsakta, *Bifidobacterium subsp.* ise esas olarak kalın bağırsakta) etkili olduğu, gerek klinik, gerekse bilimsel çalışmalarda kesin olarak ortaya konmuştur.

Bağırsaklara özgü değişik kaynaklı bulaşmalara karşı, söz konusu probiyotiklerin koruyucu etkileri özellikle deney hayvanları üzerinde incelenmiş ve pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlarda; probiyotik mikroorganizmalara bağlı olan mekanizmaların, bağışıklık sistemi ve antioksidan etkilerin uyarılması, antimikrobial maddeler, hidrojen peroksit ve asit üretimi gibi konuları içerdiği belirlenmiştir (BENGMARK 1998, MARTEAU ve ark. 1993, ELMER ve ark. 1996).

Bununla birlikte insanlar probiyotikler üzerinde gerçekleşen denemelerde, *Clostridium difficile*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Enterokoklar*, *Clostridium botulinum*, *Shigella*, *Staphylococcus* gibi patojenlerin üremelerinin durdurulmasında ya da bu tip patojenlerin floradan tamamen yok edilmesinde probiyotik bakterilerin önemi vurgulanmıştır. Nitekim insanlar üzerinde gerçekleştirilen birçok çalışmada, özellikle *Lactobacillus rhamnosus GG* suşunun terapatik etkisi ispatlanmıştır. Araştırmalarda bakteriye ait bu etkinin, gastrointestinal bölgede meydana gelen diyarenin önlenmesi ile gerçekleştiği de ifade edilmektedir. Çizelge 4' te probiyotik

mikroorganizmaların, insan sağlığında hangi rahatsızlıklarının tedavisinde etkili oldukları gösterilmiştir (MARTEAU ve ark. 1993).

Çizelge 3. Probiyotik Bakteriler ve Metabolizmadaki Yararları (CANGANELLA ve ark. 1997).

<u>Probiyotik Mikroorganizma</u>	<u>Yararları</u>
- <i>Lactobacillus acidophilus</i>	-Süt şekerini parçalayan laktaz enziminin üretimini sağlamakta ve ince bağırsakta ilk inhibitör görevini üstlenmektedir.
- <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (<i>Lactobacillus delbrueckii</i>) sınırlayıcı	- Laktik asit üretimi ile intestinal florada bulunan patojenlerin gelişimini bir etki.
- <i>Bifidobacteria</i> (<i>B.bifidum</i> ile <i>B.longum</i>)	- Laktik asit ve asetik asit üretimi ile intestinal florada bulunan patojenlerin gelişimini sınırlayıcı bir etki. Ayrıca, B1, B6, B12, K vitamini ve folik asit üretimi
<u>Diğer Probiyotik Bakteriler</u>	
<i>Bacillus laterosporus</i> , <i>B.sphaericus</i> , <i>B.subtilis</i> , <i>Bifidobacteria infantis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L.casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> , <i>L.caucasicus</i> , <i>L.kefir</i> , <i>L.plantarum</i> , <i>L.salivarius</i> , <i>L.yoghi</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>S.faecium</i> ve <i>S.thermophilus</i> .	

Çizelge 4. Probiyotik Bakteri Türlerinin Hangi Rahatsızlıkların Tedavisinde Etkilidir (CANGANELLA ve ark. 1997).

Tedaviye cevap verdiği bölüm	Probiyotik Türler
Diare ve Virus' lara karşı	<i>L.rhamnosus GG suşu</i> <i>L.casei Shirota suşu</i>
Gastroenteritis	<i>L.rhamnosus GG suşu</i> <i>E.faecium SF 68</i> <i>S.boulardii</i> <i>L.reuten</i>

Konu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* ile *Bifidobacterium* türlerinin, süt bebeklerinde virüslere bağlı rahatsızlıkların önlenmesinde ve diyare riskinin önemli bir biçimde azalmasında etkili oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4).

Yaşlı popülasyonlarda çok önemli sorunlardan bir diğeri de Constipation, yani dışkı atımı azlığıdır. Söz konusu bu rahatsızlık özellikle yaşlı ilerlemiş kişilerde önemli sıkıntılar yaratabilmekte ve bu rahatsızlık çok sayıdaki bireyde gıda kaynaklı bir patojen olan *Clostridium difficile*' den ileri gelebilmektedir. *Clostridium difficile*' den ileri gelen bu rahatsızlığa "pseudomembranous colitis" rahatsızlığı ismi verilmektedir. Probiyotik bakterilerin söz konusu olgu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ile ilgili olarak yapılan çalışmalardan birinde; *Bifidobacterium longum* ve *Lactobacillus acidophilus* türü probiyotik bakterileri içeren sütler, 10 gün süre ile bu rahatsızlığı bulunan kişilerde denenmiştir. 10 günlük süre sonunda bu diyeti kullanan 18 kişinin tuvalete çıkma ihtiyacının 5 kezden 6' ya çıktığı tespit edilmiş, denemede *Bifidobacterium bifidus* ile beslenenlerde ise bu oranın daha yüksek olduğu ifade edilmiştir (SEKI ve ark. 1978).

Probiyotik bakterilerin organizmada mineral madde absorpsiyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ile ilgili olarak da çok sayıda inceleme yapıldığı görülmektedir. Söz konusu çalışmalarda; probiyotiklerin kullanımı ile özellikle Bifidobakterlere bağlı etki neticesinde, mineral madde absorpsiyonunda önemli düzeyde artışların olduğu tespit edilmiştir. Bu amaçla araştırmacılar kobaylara 31 gün süre ile % 0.01 Ca içeren gıdaların, Bifidobakter ve Laktuloz katkısı ile birlikte verilmesi neticesinde; osteoporoz olgusunda olumlu yönde etkiler gözlendiğini ifade etmişlerdir (IGARASHI ve ark. 1994).

Probiyotiklerin organizmadaki bağışıklık sistemini güçlendirici yöndeki etkilerinin konu alındığı değişik çalışmalarda araştırmacılar özellikle, *Bifidobacterium longum*' un immun sistem üzerine olan etkilerini incelemişler ve toplam IgA düzeyindeki değişiklikleri alimantar doku sıvılarında 1 ile 16 gün sonra tespit etmişlerdir. Söz konusu araştırma sonuçlarında, toplam IgA seviyesinin özellikle *Bifidobacterium longum* ile ilk haftalarda dereceli olarak artış gösterdiği ve 4. ve 6. haftalar arasında başlangıç seviyelerine ulaştığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte *Bifidobacterium longum* türü probiyotik mikroorganizmanın bulunduğu bireylerde, bu bakteri kaynaklı ve antijen bazlı protein fraksiyonlarının seviyelerinde de önemli düzeyde artışlar gözlendiği belirtilmiştir. Sonuç olarak; söz konusu antijen bazlı

protein artışının özellikle, *Escherichiae coli* türü patojenlerin toksisitesine karşı son derece etkili olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada 10^{10} CFU/g düzeyinde *E.coli* kontaminasyonuna uğramış farelerin *Bifidobacterium longum* aşılama sırasında % 64' ünün öldüğü, ancak *Bifidobacterium longum* aşılama sonrası farelerin 4 hafta süresince hayatta kaldıkları bildirilmiştir. Bununla birlikte *Bifidobacterium longum* ile aşılama sonrası farelerde antitoksinin önemli düzeyde artış gösterdiği de raporlarda yer almıştır (YAMAZAKI ve ark. 1982, YAMAZAKI ve ark. 1991).

Probiyotik bakteri olarak tanınan Bifidobakterler ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, Bifidobakterlerin intestinal floradaki sayısal artışı neticesinde; biyogen aminler, amonyak ve fenol gibi tehlikeli bileşiklerin üretiminden sorumlu olan, Enterobakterler, Clostridiumlar, Bakteroidler, Fusobakteriler, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella*, *Salmonella* ve *Campylobacter jejuni* gibi patojen mikroorganizmaların popülasyonlarında azalmaya neden oldukları tespit edilmiştir. Bifidobakterlerin, söz konusu patojenler üzerine olan bu etkisi, intestinal floradaki pH' nın, laktat ve asetik asit üretimi ile azalması ve bu azalmanın patojenler üzerinde negatif etki yapması ile açıklanmaktadır (MITSUOKA, 1990)

Probiyotik bakterilerden Bifidobakterler ile ilgili olarak yapılan araştırmalarda, bu bakterilerin kanser olgularında anti kanserojenik bir etki gösterdiği de ispatlanmıştır. Konu ile ilgili olarak yapılan bir araştırmada; sıçanlara bifidobakterlerin yedirilmesi ile kanserojenik tümör riskinin azaldığı belirlenmiştir. Bu çalışmada, bifidobakterlerin kanser genlerinin aktivasyonundan sorumlu olan bakterilerin enzimatik aktivitelerinin düzenlenmesinde ve kanser genlerinin bileşimleri ve toksikasyonlarının önlenmesinde yararlı oldukları tespit edilmiştir. Gıdalara bağlı olarak ortaya çıkan kanser, kolesterol ve tansiyon, genel olarak interik ve toksik özellikte olan, *Clostridium perfringens* ile *E.coli* gibi patojen bakteriler nedeniyle oluşmaktadır. Bu bakteriler intestinal floradaki pH' nın çok altında bir değerde şeker katabolizmasından başlayarak, laktik asit ve asetik asit üretmektedirler. İşte bunun sonucunda, aminlerin ve amonyakın absorpsiyonu azalmakta ve böylece de kanser, tansiyon, kolesterol' ün oluşumunda etkili olan nitrozamin değerleri artmaktadır. *Bifidobacterium infantis* kullanılarak kanser risklerinin önlenmesi ile ilgili olarak yapılan bir araştırmada, söz konusu bakterinin organizmadaki immuno-reaksiyon sistemini aktive ederek kanser oluşumuna engel teşkil ettiği tespit edilmiştir (SCHWAN ve ark. 1984).

Bazı çalışmalarda da probiyotik bakteriler ile patojen bakteriler arasındaki antogonistik etki incelenmiş ve özellikle *Helicobacter pylori* ile Lactobaciller arasında çok önemli antogonistik etkiler tespit edilmiştir (MIDOLO ve ark. 1995).

Söz konusu bu antogonistik etkiler değişik araştırmaların konusu olmuş ve araştırmacılar, *Lactobacillus johnsonii* 'nin LA1 suşunun yaşamsal aktivitelerini devam ettirirken, *Helicobacter pylori*' nin aktivitesini engellediğini ve böylece de bu patojenden kaynaklanan peptit ülser olgularının görülme sıklığının azaldığını bildirmişlerdir. Ancak yinede günümüze kadar yapılan araştırmalarda, probiyotikler ile *Helicobacter pylorii*' nin sebep olduğu olumsuzlukların köklü bir biçimde tedavisinin yapılamadığı da görülmektedir (MICHETTI ve ark. 1995).

Metabolizma için son derece yararlı etkileri çok sayıda araştırma ile ortaya konmuş olan probiyotik mikroorganizmalar, yukarıda da ifade edildiği gibi son derece geniş bir yelpazede yer alan etkenlerden etkilenebilmekte ve bu durum yaşam sağlığımızı çok yakından ilgilendirmektedir. Bu etkenlerden en önemlisi; antibiyotik kullanımına bağlı olarak probiyotik bakterilerin sayılarının azalması ya da tamamen yok olmasıdır. Probiyotik bakterilerin sayılarının azalması ya da ortamdan yok olması neticesinde ise, özellikle genç ve yaşlı popülasyonlarda çok ciddi rahatsızlıklar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle uzmanların büyük bir bölümü, antibiyoterapi sonrası ortaya çıkan sindirim bozukluklarının önlenmesinde probiyotik suşların etkinliğinin belirlenmesi ile ilgili olarak çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Ancak antibiyotik kullanımı sırasında probiyotik bakterilerin etkinliğinin belirlenmesi ile ilgili olarak sınırlı sayıda çalışmanın bulunduğu görülmektedir. Bu noktada; probiyotik bakterilerin antibioresistans etkinliklerinin, yani farklı antibiyotiklere karşı bakterilerin dirençliliklerinin belirlenmesi, projemizin asıl çıkış kaynağı olmuştur. Buna göre;

Günümüzde ister patojen isterse probiyotik bakteriler olsun, tüm bakteriler eğer antibiyotiklerin yüksek konsantrasyonlarını tolere edebiliyorsa, ilacın kötü etkilerinden kendini korumak için direnç geliştirmiş anlamına gelmektedir. Bu etkiler bakterilerin farklı yapılarını ilgilendiriyor olsa da, en fazla kullanılan ilaçlar, ya ribosomlardaki protein sentezi, ya hücre duvarı sentezi ya da DNA replikasyonu ile ilişkili olmaktadır. Dolayısıyla bakterilerde direnç mekanizmalarının bulunması, bakterilerin davranışının belirleyicisi olmaktadır. Ayrıca bakterilerde genetik olarak dirençli genler, horizontal transmisyon riskini arttırabilen plazmidlerde ya da kromozomlarda bulunabilmekte ve bunlar mutasyonlarla ya da delasyon, insersion

gibi kromozomal yeniden-düzenlenme olayları sırasında görülebilmektedir. Ayrıca probiyotik bakterilerde antibioresistans olgusunun olabilmesi, bakteri-bakteri arasında gerçekleşen ve bir bakteriden diğer bakteriye gen aktarımına olanak veren transformasyon yoluyla ya da eksojen özellikteki bir DNA' nın integrasyonu gibi mekanizmalarla da gerçekleşebilir. Bunlara ilave olarak, bakteri-bakteri arasında DNA aktarımına olanak tanıyan çok farklı gen aktarım mekanizmalarının da bulunduğu bir gerçektir. Konuya netlik getirmesi açısından bir başka hususa da açıklık getirilmesi gerekmektedir. Bu son derece önemli konu da; metabolizmadaki antibiyotik etkinliğinin pH yani asitlik ile olan yakın ilişkisidir. Günümüzde konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, pH şiddetinin antibiyotik aktivitesini etkilediği ortaya konmuştur. Buna bağlı olarak probiyotik bakterilerin metabolizmada yaşadığı ya da kolonize olduğu yerler itibarıyla farklı bölgelerde farklı kolonizasyon değerleri bulunmakta ve her bir probiyotik bakteri türünün yaşadığı alanında farklı pH değeri bulunmaktadır. Nitekim konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda; *Lactobacillus acidophilus*'un kalın bağırsakta özellikle de ince bağırsakta, *Bifidobacterium subsp.* ise esas olarak kalın bağırsakta, *Bifidobacterium bifidum* ve *Lactobacillus bulgaricus*'un ise midede kolonize oldukları belirlenmiştir. Buna göre; pH değerinin şiddetinin fazla olduğu bölgelerde antibiotiklerin etkilerinin azaldığı düşünüldüğünde ileryen yaşla birlikte bu bölgelerde bulunan probiyotik türlerin antibioresistans özellik göstermesi hiç de uzak görülmemektedir. Ayrıca mukozal konsantrasyonun da, gastrointestinal bölgenin farklı bölgelerinde (mide, ince bağırsak gibi) farklı değerler gösterdiğinin bilinmesi ve bu olgunun da probiyotik bakterilerin antibioresistans özelliklerine etki edebileceğini düşündürmektedir.

Antibioterapi uygulamasından sonra probiyotik bakterilerinin etkinliğinin araştırıldığı çalışma sayısının fazla olduğu görülmektedir. Söz konusu çalışmalarda probiyotik bakterilerin antibioterapi sonrasında kullanılması ile çok önemli yararlılıklar ispat edilmiştir (Çizelge 5).

Konumuz ile ilgili araştırmaların sayısının az olması nedeni ile bu bölümde antibioterapi uygulamasından sonra probiyotik bakterilerin kullanılması ile sağlanan yararların klinik koşullardaki sonuçları üzerinde durulacaktır. Bu sonuçların ışığı altında da projemizin önemini kendiliğinden ortaya çıkacağı düşünülmektedir.

Günümüzde antibiyotik kullanımından sonra kontrollü koşullarda probiyotik bakteriler kullanılarak üretilen ürünlerin tüketilmesi ile elde edilen yararlar oldukça fazladır. Bu yararların ağırlıklı bir kısmını; antibioterapi sonrası kişilerde ortaya çıkan

diyare, kabızlık ve gaz gibi rahatsızlıklar oluşturmaktadır. Bu amaçla birçok araştırmacı bu rahatsızlıkların giderilmesinde, *Saccharomyces boulardii*, *Enterococcus faecium SF68* ve *Lactobacillus rhamnosus GG* suşu gibi probiyotik bakterilerin, özellikle diyare risklerini yarı yarıya azalttığı ya da tamamen ortadan kaldırdığı belirlemiştir (Çizelge 5). Başka bir çalışmada ise, hastanın diarezinin önlenmesinde kullanılacak olan probiyotik bakterilerin yüzdesel etkileri saptanmış ve konu ile ilgili değerler Çizelge 6' da verilmiştir.

Çizelge 5. Antibiyoterapiye Bağlı Sindirim Bozukluklarında Probiyotik Suşların Etkileri (WEGENER 1997).

Antibiyotikler	Probiyotikler	Etkileri
Ampiciline	Lactines→	%8.3-%23
Antituberculeux	<i>E.faecium SF 68</i>	%5-%18
Çeşitleri	<i>E.faecium SF 68</i>	%8.7-%27.2
Neomycine	<i>L.acidophilus</i>	%20-%42
Eritromycine	<i>B.longum</i>	+
Eritromycine	<i>L.rhamnosus GG suşu</i>	+
Clindamycine	<i>B.longum+Lactobacillus</i>	+
Çeşitleri	<i>S.boulardii</i>	+
Çeşitleri	<i>S.boulardii</i>	%4.5-%17.5
Çeşitleri	<i>S.boulardii</i>	%9.5-%21.8
Betalactamine	<i>S.boulardii</i>	%7.2-%14.6

Çizelge 6. Antibiyotiklerden Kaynaklanan Diarenin Önlenmesinde Kullanılacak Olan Probiyotik Bakterilerin Yüzdesel Etkileri (BOULLOCHE ve ark. 1994).

Probiyotikler	Etkinliği
<i>L.fermentumKLD</i>	Yok
<i>Lactobaciller</i>	%43-%71
<i>S.boulardii + L.rhamnosusGG</i>	-%11
<i>L.rhamnosusGG</i>	%3.9

Günümüzde probiyotiklerin özellikle antibiyoterapiden sonra gerçekleştirdikleri terapatik etkilerinin özellikle fermente süt ürünleri ile (özellikle yoğurt ile) uygulanmasının insan sağlığı üzerine yararları olduğu bilinmektedir. Bu amaçla söz konusu fermente süt ürünleri ile alınan probiyotiklerin, özellikle laktozun birincil ve

ikincil intoleransında büyük avantajlar sağladığı tespit edilmiştir. Ayrıca değişik süre ve dozlarda farklı hastalıkların tedavilerinde uygulanan antibiyotiklerden ileri gelen diyarenin azaltılmasında, ya da tamamen önlenmesinde probiyotik ilaveli fermente süt ürünlerinin kullanıldığı görülmektedir. Nitekim antibiyotik kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan diyarenin önlenmesinde, *Clostridium difficile* ile meydana gelen kolik diyarenin tekraralama olasılığının düşürülmesinde, fermente süt ürünlerinden yoğurda aşılana *Saccharomyces boulardii*' nin günde 1 gr yenmesi, *Enterococcus faecium* SF68, ya da *Lactobacillus rhamnosus* GG suş' unun fermente süt ürünleri ile alınması neticesinde, hastalarda pozitif yönde gelişmeler olduğu tespit edilmiştir (SALMINEN ve ark. 1996, BENGMARK 1998).

İntestinal florada özellikle ilerleyen yaşla birlikte ve antibiyoterapiden sonra sayısal değerlerinde artış olan *Clostridium difficile* isimli patojen ile yapılan bir diğer çalışmada, bu bakteriden kaynaklanan rahatsızlıkların bir daha ortaya çıkmaması için, *S.boulardii*' nin fermente süt ürünleri ile birlikte tüketilmesinin olumlu sonuçlar verdiği ve söz konusu patojenden kaynaklanan rahatsızlıkların tekrarlanma olasılığının yarı yarıya azaldığı rapor edilmiştir (McFARLAND ve ark. 1994).

Antibiyoterapiden sonra endogen floranın bileşimine probiyotiklerin etkileri konusundaki verilerin oldukça az olduğu görülmektedir (MARTEAU ve ark. 1993). Probiyotikler tarafından intra kolik pH' da kısa zincirli yağ asitlerinin üretim değerlerindeki etkileri, günümüze kadar yapılan araştırmalar ile tespit edilememiştir (BARTRAM ve ark. 1994). Buna karşılık yine de konu ile ilgili bazı çalışmalar söz konusudur. Bu çalışmalarda, probiyotik bakterilerden olan *Enterococcus faecium* SF68' in, fermente süt ürünlerine aşılması ve bu şekilde tüketilmesi ile ilgilidir. Araştırma sonucunda; bu ürünün tüketilmesi neticesinde öde bağlı asit üretiminin azaldığı tespit edilmiştir.

Hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmaların birçoğunda; farklı probiyotiklerin ağız yolu ile alınması sonucunda, sümüksü seviyede bağışıklığın düzenlenebildiği bildirilmekte ve (MARTEAU ve CELLIER 1998, SALMINEN ve ark. 1996) konu ile ilgili 4 benzer çalışmada; fermente süt ürünlerinden probiyotiklerce zenginleştirilen yoğurdun hayvanlara yedirilmesi ile, kandaki lenfosit hücrelerinin sayısal olarak arttığı ifade edilmektedir (MARTEAU ve CELLIER 1998).

Yoğurt etkisi altında ağız yolu ile yapılan beslemenin (çoğu zaman aşı da denmektedir) düzenli olarak uygulanması ile organizmaya patojen bakteri bulaşımının azaldığı kesin olarak ispatlanmıştır (MARTEAU ve CELLIER 1998).

Konu ile ilgili olarak yapılan denemelerde, *Lactobacillus rhamnosus GG* suşunun, küçük çocuklarda uzun süren diyarelerin azalmasında etkili olduğu ve bu probiyotik bakterinin çocuklara yoğurt ile verilmesinin en uygun yol olduğu ifade edilmektedir (ISOLAURI ve ark. 1991). Aynı araştırmacılar, immunoglobulin salgılarından yoksun hücrelerin vücuttaki artışı ile, probiyotik mikroorganizmaların oranı arasında yakın bir ilişkinin olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar hastalığın nekahat devresi sırasında probiyotikler ile beslenen çocukların %90' nından, yalnızca %46' sında virüslara karşı spesifik bir IgA antikorunun geliştiğini de rapor etmişlerdir. Konu ile ilgili olarak çalışan diğer araştırmacılar da, ağız yolu ile yapılan bu beslenme sonucunda, vücudun virüslara karşı bir etki oluşturduğunu bildirmektedirler. *Lactobacillus rhamnosus GG* suşu ile yapılan tüm çalışmalarda bu etkinin, bakterinin kendi karakteristik özelliklerinden meydana geldiği de rapor edilmiştir (ISOLAURI ve ark. 1995). Fermente süt ürünlerinden yoğurda probiyotik bakterilerden, *Bifidobacterium breve*'nin YIT 4064 suşunun ilave edilerek sığan yavrularına yedirilmesi sonucunda, hayvanların organizmalarında virüslara karşı bir etkinin olduğu bildirilmektedir (YASUI ve ark. 1995).

LINK-AINSTER ve ark. (1994)), fermente süt ürünlerine aşılınmış *Lactobacillus johnsonii LA1* suşunun insanlarda ağız yolu ile alınması neticesinde, insan patojenlerinden *Salmonella Ty2* suşunun aktivitesinin azalması yönünde önemli bir etkisi olduğu belirtilmiştir. Probiyotik bakterilerin söz konusu fermente süt ürünleri ile tüketimine dayanarak yapılan bir başka çalışmada ise; vücuttaki kan dolaşımında granulositler' in fagositöz olgusunun gerilediği ya da durduğu da ifade edilmekte (SCHIFFRIN ve ark. 1995) ve konu ilgili olarak aynı yıllarda yapılan iki farklı çalışmada da, probiyotiklerin IgA antikorlarının vücuttaki sayısal artışında çok büyük rolleri oldukları belirtilmektedir (MARTEAU ve ark. 1997, WELS ve ark. 1996).

BOUFRON ve ark. (1996), probiyotik ilaveli fermente süt ürünleri ile ilgili çalışma sonuçlarında, haftada 3 kezden fazla yoğurt kullanımının büyük oranda ağız yolu riskini azalttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu etkinin; probiyotik mikroorganizma türleri ilave edilmiş ve geniş tüketim alanı bulmuş gıdalar ile gerçekleşen uygulamalar nedeni ile çok büyük önem arzettiğini bildirmişlerdir. Bu amaçla yapılan 2 denemede; *Lactobacillus casei bioactis* suşu yoğurt ile birlikte kullanılmış ve bunun neticesinde; idrar torbası yüzeyindeki tümör oluşumlarının

tekrarlanma oranının önemli ölçülerde azaldığı belirtilmiştir (HOSONO ve ark. 1997, ASO ve ark. 1992, ASO ve ark. 1995).

Konu ile ilgili olarak araştırmacıların üzerinde çözüm bulamadıkları en önemli husus; bu tip rahatsızlıkların önlenmesinde kullanılan ilaçların bile, hastalığın tedavisinde probiyotiklerce elde edilen tedavi başarısına ulaşamamış oluşudur (KRUIS ve ark. 1997).

Günümüzde tıp alanında birçok hastalığın tedavi edilmesinde ya da tekrarının önlenmesinde probiyotiklerin kullanılması olgusunun ve bunların en yaygın olarak fermente süt ürünleri ile diyetlerde uygulanmasının bu alanda yeni tedavi oluşumlarına kaynak teşkil ettiği görülmektedir. Nitekim PLEIN ve HOTZ (1993) tarafından Crohn hastalığının seyri döneminde ortaya çıkan diyarenin azaltılmasında, *Sacharomyces boulardii* ilave edilmiş yoğurt kullanımının etkili olduğu rapor edilmiştir.

Metabolizmada yer alan probiyotik bakteriler, gastrointestinal sistemin farklı bölgelerine lokalize olmuş farklı türlerden oluşmakta ve her farklı türün etki mekanizması ile etki ettiği bölgelerdeki aktivasyonları farklılık göstermektedir. Bu alanda üzerinde en fazla çalışılan probiyotik bakteri türlerinin Bifidobacterium' lar olduğu görülmektedir.

Fermente süt ürünleri ile birlikte kullanılan Bifidobakterlerin metabolizmanın farklı bölgelerindeki etkinlikleri şu şekilde sıralanmaktadır:

Bifidobacterium bifidum ve *Lactobacillus bulgaricus'* un mide de gelişme gösterdiği belirlenmiş ve bu anlamda mide de gelişebilecek patojen bakterilere (özellikle *Helicobacter pylorii*) karşı bir koruyucu gibi davrandıkları tespit edilmiştir. Nitekim araştırmacıların özellikle peptit ülser olgularında antibiyotiklerin yetersiz kaldığı ya da probiyotik bakterilerin etkilerinin bu tip olgularda antibiyoterapiden daha etken olduğu görüşünde birleşmeleri, midedeki pH düzeyinde antibiotiklerin etkinliğinin azlığı ya da daha başka bir anlatımla bu pH değerinde probiyotik bakterilerin antibiyotiklere direnç göstermeleri ve dolayısıyla da aktivitelerini sürdürebilmeleri ile gerçekleşmektedir. Bu olgu ise yukarıda açıklamaya çalıştığımız projemizin çıkış noktası niteliğini taşımaktadır.

Fermente süt ürünlerinin ve bu ürünlerin yapısında bulunan laktik asit bakterilerinin de ince bağırsakta iyileştirici yönde etkileri tespit edilmiştir. Gastrointestinal sistemin önemli bir kısmını oluşturan ince bağırsak üzerinde bu bakterilere ait en önemli etki, laktozun yetersiz sindirimini düzenlenmesindedir. Fermente süt

ürünlerinin ve bu ürünler ile alınan laktik asit bakterilerinin, immünite sistemin birçok parametresi üzerinde, bilinen intestinal enfeksiyonlarının gerek sürelerinde, gerekse etkilerinde azalmalar meydana getirdiği açıklanmıştır. Konu ile ilgili olarak yapılan araştırmalarda, laktik asit bakterilerinin söz konusu yararlarının bakterilerin aktivitelerinin değişiminin neticesinde olduğu görülmektedir.

Kalın bağırsak intestinal bölgenin en uzun ve belkide en önemli kısımlarından birini teşkil etmekte ve bu bölgede meydana gelecek düzensizliklerin, değişik ve çok önemli hastalıklara neden olduğu bilinmektedir. Gerçektende insan sağlığını çok önemli boyutlarda tehdit eden hastalıkların başında kalın bağırsak kanserlerinin geldiği görülmektedir. Fermente süt ürünleri ile probiyotik bakterilerin birlikte kullanılması ile kalın bağırsak kanserlerinin önlenmesi ve özellikle son 20 yıl içerisinde konu ile ilgili çok sayıda araştırma yapıldığı bildirilmektedir (TAKIGUCHI ve ark. 1996).

Bu amaçla yapılan çalışmalarda, çok sayıda mekanizma özetlenmiştir. Söz konusu mekanizmaların açıklanması amacıyla yapılan çalışmaların esasını; intestinal mikrofloranın değişimi ile, zararlı bakterilerin inhibisyonu, bağışıklık sisteminin aktive edilmesi ve kansere neden olan genlerin baskılanması gibi konular oluşturmuştur. Bu anlamda, laboratuvarlarda ve çevresel koşullarda insan ve hayvan denekleri üzerinde yapılan çalışmalarda birbirini tutmayan sonuçlar elde edilmiştir. BOUHNİK ve ark. (1996), antibiyoterapi uygulamasından sonra Bifidobacter ilaveli süt ürünleri ile yaptıkları bir çalışmada, kalın bağırsakta önemli kanserojen etkenlerin başında gelen β -glukoronidaz aktivitesinin düşürülmesinde, Bifidobacter'lerin çok etkin oldukları tespit edilmiştir. Bununla birlikte hastalara yoğurt yedirilmesinin klinik tedavilerdeki anlamının, "ağız yolu ile yapılan aşı" olduğu ve bu aşının, özellikle yaşlı insanlarda olumlu sonuçlar verdiği de ifade edilmektedir. Antibiyoterapi uygulamasından sonra *Clostridium difficile*'in sayısal değerinin artışı ile kaynaklanan kabızlık, gaz şikayetleri ve kanser oluşum risklerinin arttığı bildirilmiştir. Bu durumdaki yani bağırsaklarında gazdan şikayetçi olan 8 kadın hastanın ele alındığı bir çalışmada; araştırmacılar farklı tedavi yöntemletrini denemişler ve 2 farklı grup ile çalışmışlardır. İlk grup hasta, yağsız süte aşılanmış bifidobakterler ile beslenmiş, ikinci grup hasta ise, sadece yağsız süt ile beslenmiştir. 15 günlük diyet süresi sonunda, hastaların diareleri incelenmiştir. Araştırma sonuçlarında, bifidobakter + yağsız süt ile beslenen hastalardaki gaz şikayetlerinin ortadan kalktığı, diğer grupta

olan hastalarda ise bu şikayetlerin devam ettiği belirlenmiştir. Araştırmacılar 8 hastanın diyarelerinde diyet uygulanmadan önce, *Clostridium* sporlarının yüksek oranda bulunduğunu, ancak bu sporların Bifidobakter suşları ilave edilmiş yağsız süt ile beslenen hastalarda sporların sayılarının önemli düzeyde azaldığını tespit etmişlerdir. İkinci gruptaki hastalarda ise Clostridium sporlarının sayısal değerlerinin aynı kaldığı saptanmış ve antibiyoterapi sonrası görülebilen kanser risklerindeki artışın riskinin değişmediği tespit edilmiştir (SCHWAN ve ark. 1984).

Günümüzde bifidobakter ilaveli yoğurdun terapideki uygulamaları ile ilgili birçok klinik rapor bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesinde araştırmacılar diyetlerinde Bifidobakter ilave edilmiş yoğurt bulunan hastaların, ince ve kalın bağırsaklarında bu bakterilerinin yaşabilirliği üzerinde denemeler yapmışlardır. Araştırmada, düzenli olarak yoğurt tüketilmesi sonucunda, intestinal floradaki yararlı bakteri popülasyonunun sayısal olarak arttığı ve buna bağlı olarak patojen mikroorganizmaların sayılarının azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca söz konusu bakterilerin intestinal floradaki canlılığının ancak yoğurt tüketiminin sürekliliği ile gerçekleştiği tespit edilmiştir (PEDROSA ve ark. 1995)

Tüm araştırmalarda, intestinal florada anaerob bakterilerin sayısal değerlerinin değişimi ile çok farklı rahatsızlıkların ortaya çıktığı belirlenmiştir. İşte bu rahatsızlıkların önlenmesi ile ilgili bir başka çalışmada; Bifidobakterlerce (özellikle *Bifidobacterium longum*) zenginleştirilmiş yoğurtlar hastalara yedirilmiştir. Araştırma sonunda, bifidobakter ilaveli yoğurt tüketiminin sürekliliğine bağlı olarak (en az 15 gün) anaerobik patojen bakterilerin azaldığı ve intestinal florada gözlenen diyare ile kabızlık gibi rahatsızlıkların iyileştiği, ya da süresinin kısaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca bir çok çalışmada kanser oluşum risklerinin önlenebileceği de rapor edilmiştir (BARTRAM ve ark. 1994)

TEN BRINK ve ark. (1987)'nin bildirdiğine göre, Isolauri ve ark.'ları, immunoglobulin salgılarından yoksun hücrelerin vücuttaki artışı ile Bifidobakterlerin oranı arasında yakın bir ilişkinin olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar hastalığın nekahat devresi sırasında, bifidobakter ilaveli yoğurt ile beslenen çocukların %90'ından yalnızca %46'ında virüslere karşı spesifik bir IgA antikorunun geliştiğini de rapor etmişlerdir. Konu ile ilgili olarak çalışan diğer araştırmacılar da, ağızdan yoğurt ile yapılan bu beslenme sonucunda, vücudun virüslere karşı bir etki oluşturduğunu bildirmektedirler.

Son yıllarda özellikle Japonya' da bebeklerde ve çocuklarda gözlenen diyarelerin önlenmesinde, bifidobakter ilaveli yoğurtların kullanıldığı ve bu alanda başarıya ulaşıldığı bildirilmektedir. Bunların dışında probiyotik mikroorganizmalar olarak bilinen bifidobakterler ile bazı laktobasil türlerinin yoğurda ilave edilip tüketilmesi sonucunda metabolizmada meydana gelen olumlu etkilerinden iki tanesi deneysel olarak ispatlanmış ve "laktoz intoleransı" ile "pseudomembranous colitis" rahatsızlığı engellenebilmiştir (BOWDEN ve ark. 1981).

Probiyotik mikroorganizmalar kullanılarak üretilen fermente süt ürünleri ile gerçekleşen terapilerin özellikle antibiyoterapiden sonraki yararları araştırmacılar tarafından kabul edilmektedir. Ancak günümüzde, probiyotik bakterilerin antibiyotik kullanımı sırasında bu ajanlar ile olan ilişkilerinin ne düzeyde olduğu bir o kadar önemlidir. Özellikle bilim dünyası patojen bakterilerin antibiyotiklere karşı olan dirençliliklerinin son yıllarda hızlı bir artış göstermesine bağlı olarak, probiyotik bakterilerde de bu özelliğin ne durumda olduğunu merak etmektedirler. Ancak söz konusu bu özellik ile ilgili yalnızca bazı türler ile ilgili az sayıda araştırma yapıldığı görülmektedir. Söz konusu çalışmaların ise en fazla *Enterococcus faecium* türleri ile ilgili olduğu dikkat çekicidir.

Araştırmacıların bir bölümü konu ile ilgili olarak; probiyotik bakterilerin normal bağırsak florasında doğal olarak bulunduğunu ve bu doğal floradaki bakterilerin herhangi bir antibiyotik kullanımından sonra sayısal olarak azaldığını ifade etmekte ve bu yüzden söz konusu bakterilerin antibioesistans özelliklerinin belli olduğu görüşünde birleşmektedirler. Ancak bir diğer grup araştırmacı da; patojen bakterilerde görülen antibioesistans özelliğinin değişiminin aynısının probiyotik bakteriler ile de ilişkilendirilebileceği konusunda birleşmekte ve araştırmacılar, probiyotik bakterilerin insanın yaşamı boyunca kullanmak zorunda olduğu antibiyotiklere karşı direnç ya da duyarlılık kazanabileceğini ifade etmektedirler. Nitekim penisilin grubu antibiyotiklerden, özellikle penisilin G, gram(+) ve gram(-) bakterilerden kaynaklanan rahatsızlıkların tedavisinde sıklıkla kullanılmakla birlikte, araştırmacılar zamanla söz konusu bakterilerin antimikrobien ajanlara olan dirençliliklerinin gün geçtikçe arttığını ve bu dirençliliğin özellikle, penisilin ve sefalosporin grubu antimikrobien ajanlara karşı olduğunu ifade etmektedirler (BARZA 1985, GUSTAFFERO ve STECKELBORG 1991, TOHME 1997).

Çok farklı morfolojik özelliklere ve aktivitelere sahip olan probiyotik bakterilerin metabolizma ile olan ilişkilerinin, yani mukoz membranlara absorbe olup

olmadıklarının, ya da bir organdan diğer bir organa taşınıp taşınmadıklarının bilinmesi bu bakterilerin antibioresistans özelliklerinin tespitinde son derece önemlidir. Çünkü her mikroorganizma yaşam aktivitesinin gerçekleştiği organının belli bölgelerinde lokalize olmakta ve yaşamını devam ettirebilmek için kendi biyolojik yapısında gerekli kodlamaları gerçekleştirmektedir. İnsan hayatının ortalama 70 yıl olarak ifade edildiği bir dönem süresince farklı patojenlere karşı savaşmada kullanılan antibiyotiklere de bu anlamda duyarlılıklarının artması ya da azalması söz konusu olabilmektedir.

Günümüzde dışkı orjinli olduğu ispat edilmiş bir tek Enterokok türü probiyotik olarak gerek insan, gerekse hayvan beslenmesinde kullanılmaktadır. Bu tür *Enterococcus faecium* 'dur. Günümüzde *E.faecium* ' un probiyotik olarak kullanılan farklı suşları izole edilmiştir.

a) *Enterococcus faecium SF68*: Söz konusu enterokok türünün insanlarda kullanımı ile, intestinal bölgeye uyumlu olması, generasyon süresinin kısalığı, düşük pH değerinde stabilite göstermesi ve bakteriyosin üretme yeteneği gibi faktörler nedeni ile intestinal düzensizliklerin tedavisinde yararlanılmaktadır. Bununla birlikte, *Escherichia coli*, Salmonella türleri ve Enterobacter türleri üzerinde inhibitör bir etki yarattığı da yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Antibiyotik kullanımına paralel olarak görülen ishale karşı, ayrıca kandaki amonyak oranının düşürülmesi ile sarılığa bağlı beyin iltihabına yakalanmış hastaların ruhsal durum ve psikiyatrik dengelerinin sağlanması açısından da laktuloz (bir laktoz türevidir) kadar etkili olduğu ortaya konmuştur.

Söz konusu probiyotik bakteri türünün hayvan beslemesinde kullanımı ile; hayvan yetiştiriciliğinde enterit hastalığının engellenmesinde destek olarak yararlanılmaktadır. Günümüzde hayvanlarda önemli bir hastalık olan enterit hastalığı antibiyotiklerle önlenemekte, ancak patojen ve fırsatçı mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı kazandıkları direnç, bu hastalığın tedavisinde alternatif bir yöntem olarak probiyotiklerin kullanımını gündeme getirmektedir. Nitekim konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalardan birinde; *Escherichia coli* ' nin diyare etmeni olan 3 ayrı suşuyla enfekte olmuş 3 ayrı inek yavrusu, *E. faecium SF68* suşu bulunan preparatlarla beslenmiş ve yapılan incelemede, hastalık yapıcı özelliği daha az olan *E.coli* ile enfekte olmuş yavrunun hastalığı daha hafif atlattığı, ayrıca canlı ağırlığındaki artışın daha hızlı gerçekleştiği tespit edilmiştir (FRANZ ve ark. 1999).

b) *Enterococcus faecium PR88*

Özellikle peynir endüstrisinde Cheddar peynirinin üretiminde kullanılan *E. faecium PR 88* insan gastrointesinal sisteminde olumlu etkiler yaratmaktadır (GARDINER ve ark. 1999).

c) *Enterococcus faecium K77D*

Bu tür de, özellikle Danimarka' da, kefir, yoğurt, peynir gibi fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanıldığı bildirilmektedir (FRANZ ve ark. 1999).

d) *Enterococcus faecium J96*

Söz konusu suş sağlıklı tavuklardan izole edilmiş bir probiyotiktir. Yapılan araştırmalarda, tavuk sürülerinde ölümcül sonuçlara neden olan Pullorum hastalığının etmeni ve bir patojen olan *Salmonella pullorum* üzerinde inhibitör etkisi olduğu saptanmıştır. Bu anlamda probiyotik olarak özellikle zootekni ve veterinerlikte büyük öneme sahiptir (AUDISIO ve ark. 1997).

Enterococcus faecium türü probiyotik bakteriler kısa bir zaman önce insan sağlığının iyileştirilmesinde tercih edilen probiyotik bakterilerden olmuş ve söz konusu bakterinin, penisilin ya da ampicillin, glikopeptid ve aminoglikozid türü antibiyotiklere duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ancak zaman içerisinde bakterinin yapısında meydana gelen antibioresistans değişimlerin incelendiği çok sayıda araştırmada da görüldüğü gibi, bakterinin antibioresistans özelliklerinde değişimler olduğu tespit edilmiştir. Bu konu ile ilgili olarak çok sayıda araştırmanın gerçekleştirildiği görülmektedir.

İnsanlarda ve hayvanlarda uzun zaman önce enterik bir etki gösteren bu bakterinin büyük bir oranının inaktive edilmesinde aminoglikozid türevi antibiyotiklerin etkili olduğu tespit edilmiş, ancak yakın bir zamanda çok az sayıda da olsa bazı türlerin dirençli oldukları belirlenmiştir. Söz konusu bakterinin antibiyotiklere olan direncinin belirlenmesi üzerinde çalışan araştırmacılar, aminoglikozidlere dirençli olan türlerden söz konusu direnç genlerini tespit ederek bu genleri izole etmişler ve duyarlı olan bakterilere aktararak bu bakterilerin de söz konusu antimikrobien ajanlara direnç geliştirmelerini sağlamışlardır. *Enterococcus faecium* türlerinin başka antibiyotikler ile olan dirençliliklerinin tespiti üzerinde yapılan çalışmaların bir diğeri de; streptomisin üzerinde olmuş ve bakterinin bu antibiotik türevine karşı önemli düzeyde dirençli oldukları belirlenmiştir. Bu dirençte 30S ribozomunda bulunan ve mutasyona uğramış olan bir protein türü, aminoglikozidaz enzimi yardımıyla duyarlı olan bakterilere transfer edilmiş ve gentamisin türü antibiyotiklere karşı bu

bakterilerin etkilerini denemişlerdir. Araştırmada, söz konusu bakterilerin gentamisine olan dirençliliklerinin az olduğu belirlenmiştir. Vankomisin *Enterococcus faecium* türleri üzerine olan etkilerinin incelendiği araştırmalarda, söz konusu bakterinin bu antibiyotiğe direnç gösterdiği tespit edilmiştir (BRETT ve ark. 2002).

Günümüzde bir probiyotik bakteri olarak tanımlanan *Enterococcus faecium*' un özellikle aminoglukozidlere ve glikopeptidlere dirençliliğinin arttığı tespit edilmiş ve araştırmacılar tarafından farklı antibiotik türevlerine karşı bu etkinin nasıl olduğu incelemeye alınmıştır. Ayrıca geçmiş dönemlerde bir patojen olarak sınıflandırılan bu bakteriden kaynaklanan rahatsızlıkların önlenmesinde söz konusu antibiyotiklerin kullanılmaması gerektiğini ifade etmişlerdir.

Enterococcus faecium' un antibioresistans özelliğinin belirlendiği bir başka çalışmada; 16 µg/ml ampicillin + 2 µg/ml levofloxacin kombinasyonuna karşı söz konusu bakterinin antibioresistans özelliği incelenmiştir. Bu çalışmada, *Enterococcus faecium*' un ampicilline karşı dirençli, ancak levofloxacinine karşı duyarlı türlerinden yararlanılmıştır. Araştırma sonuçlarında kullanılan antibiotik kombinasyonunun *Enterococcus faecium*' un inaktivasyonuna etkisi tek başına levofloxacinin kullanımından daha fazla etkili olduğu tespit edilmiş ve çalışmada bakterinin sayısal değerinde $>2\text{-log}_{10}$ düzeyinde bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Ancak ampicillin kullanımına göre bu kombinasyonun bakteri üzerindeki inaktivasyon düzeyinin ise önemli olmadığı belirlenmiştir. Çalışmada söz konusu antibiotikler arasında sinerjistik bir etkinin varlığı saptanmış ve araştırmada adı geçen probiyotik bakterilerin seçilmiş antibiotiklere büyük oranda dirençli oldukları da ifade edilmiştir (SMITH ve ark. 1997).

Konu ile ilgili olarak yapılan başka bir çalışmada; peynir , et, domuz eti ve kümes hayvanlarından izole edilen 76 tip *Enterococcus faecium*' un insan ve hayvan hastalıklarında kullanılan, avoparein basitrasin, virginiamisin, glikopeptid, vankomisin, ampicillin, tetrasiklin ile narasin gibi antibiotiklere olan duyarlılıkları incelenmiştir. Çalışmada *Enterococcus faecium* türlerinin glikopeptid, vankomisin ve avopareine dirençli oldukları, virginiamisine ise, çoklu dayanıklılık göstermedikleri tespit edilmiştir. Araştırmada tüm suşların ampicilline dirençli oldukları belirlenirken, tetrasiklinlere olan duyarlılığın da şüpheli olduğu belirlenmiştir (BUTAYE ve ark. 2000).

Enterococcus faecium' un antimikrobiyal özelliğinin tespiti ile ilgili olarak izole edilmiş 60 adet türün Cefotaxime % 64 oranında duyarlı olduğu, % 36' sının ise dirençli olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu araştırmada seçilen antibiyotiğın, özellikle hastahanelerde sıklıkla kullanılan bir antibiyotik olması nedeni ile önemli olduğu vurgulanmıştır. (WAGENLEHMER ve ark. 2002).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırma materyalini; *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* olarak bilinen probiyotik kültürler ile antimikrobiyen ajanlar olan antibiyotikler oluşturmuştur.

3.1.1. Analizlerde Kullanılan Bakterilerin Temini

Probiyotik bakteri türleri, liyofilize formda olan ve -70°C ' de depolanmış Mikrobank™ dan, Pro-Lab Diagnostics, Austin, TX, USA' dan temin edilmiştir.

3.1.2. Analizlerde Kullanılan Antimikrobiyen Ajanların Temini

Antimikrobiyen ajanlar olan, Vankomisin , Gentamisin, Penisilin G, Tetrasiklin ve Ampisilin Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA' dan etken maddesi toz halinde temin edilmiştir.

Çalışmada; Vankomisin 3950 µg/ml, gentamisin 3420 µg/ml, penisilin G 4211 µg/ml ve Tetrasiklinin 4256 µg/ml olacak şekilde steril su ile hazırlanmış stok solüsyonları hazırlanmıştır. Ampisilin ise, 0.1 M Minimum İnhibitör Konsantrasyonuna (MIK) göre ayarlanmıştır.

Daha önce seçilmiş olan, ancak analizler sırasında kullanılmayan probiyotik bakterilerin bir kısmı ön zenginleştirme ve asıl zenginleştirme aşamalarında istenen sayısal düzeye ulaşamadıkları için ya da bakterilerin bilinmeyen bir sebeple inaktif olmalarından dolayı denenemede kullanılamamışlardır. Bazı bakterilerde görülen inaktivasyon olayının, gelişme ortamı olan süttten ya da sıvı besi ortamlarından kaynaklanan kontaminasyonlar nedeni ile olduğu düşünülmektedir.

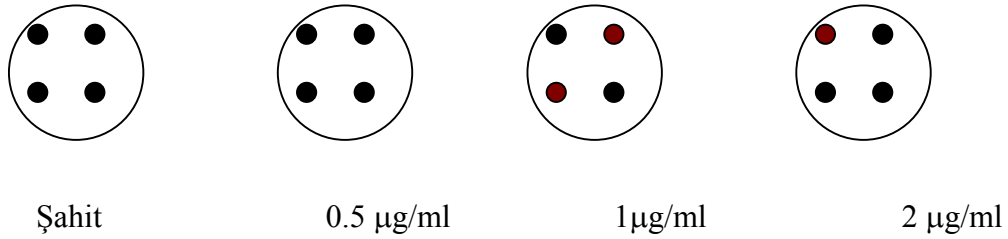
3.2. Metod

3.2.1. Probiyotik bakterilerin zenginleştirilmesi

Araştırmada ; probiyotik bakterilerden *Enterococcus faecium* Triptoz Soya Broth' da (TSB) 35°C ' de, *Lactobacillus acidophilus* ile *Lactobacillus bulgaricus* MRS buyyonda 42°C ' de, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* M17 buyyonda, *Bifidobacterium bifidus* da Bifidobacterium buyyonda 37°C ' de en az 1×10^7 CFU/ml düzeyine çoğaltılmış ve bu kültür sıvısı Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIK) yönteminde kullanılmıştır.

3.2.2.Zenginleştirilen probiyotik bakterilerin antibioresistans özelliklerinin belirlenmesi

Her bir probiyotik bakterinin antibioresistans özelliğinin belirlenebilmesi için Bölüm 3.2.3.' de açıklanan uygun agar ortamı içersine her antibiyotik için üç farklı dozda (0.5 µg/ml , 1 µg/ml ve 2 µg/ml) antimikrobiyal solüsyondan ilave edilmiş ve petri-plak (100x15 mm) yöntemine göre ekim yapılmıştır. Agar yüzeyine 10⁴ CFU olacak şekilde (yaklaşık 1-2 µl) kültür aşılantısıdır. Gelişmenin kontrolü için de gene aynı ortamlara bu defa antibiyotik ilave edilmeden söz konusu bakterilerin aşılandığı şahit inokülasyonlar yapılmıştır (Şekil 1). Daha sonra *Enterococcus faecium*' un 35 °C, *Lactobacillus acidophilus* ile *Lactobacillus bulgaricus*' un 42 °C' de, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* ile *Bifidobacterium bifidum*' un da 37°C' deki gelişmeleri incelenmiştir (SMITH ve ark. 1997).



Şekil 1. Petri Kabı Sayım Yöntemi Kullanılarak Agar Ortamında Probiyotik Bakteri Türlerinin Antibioresistans Özelliklerinin Belirlenmesi İle İlgili Şematize.

- Gelişimi şüpheli örnek
- Gelişme varlığı

3.2.3.Probiyotik bakterilerin minimum inhibitör testi ile antibioresistans özelliklerinin belirlenmesi.

Denemede probiyotik bakterilerin antibioresistans özelliklerinin belirlenmesinde; *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* için MRS agar (Shin, H.S., Lee, J., Pestka, J.J., Ustunol, Z.: J. Food Protection **63** (3) 327-331 (2000), *Enterococcus faecium* için Caso Agar (Kandler, O., Schleifer, K. H., Dandl, R., 1968. J. Bacteriol, p:1935-1939). [ATCC <- Micro-media System Inc. <- Kaiser-Permanente, strain Portland. Urine. Quality control strain according to DIN 58959-7 (6924), antibiotics assay (see Applications List), quality control strain for media.

Minimum inhibitory concentration of antibiotics (2263). (Medium 245, 37°C)], *Bifidobacterium longum* için Bifidobacterium Medium ortamı (Lauer, E., Kandler, O., 1983. System. Appl. Microbiol.4,p: 42-64. [G. Reuter, E194b (Variant a). Intestine of adult (335). Type strain. Taxonomy/description (490, 1300, 1379). Murein: A21.3 (466). (Medium 58, 37°C, anaerobic)], *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* için de M17 Agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England), (Shin, H.S., Lee, J., Pestka, J.J., Ustunol, Z.: J. Food Protection **63** (3) 327-331 (2000) kullanılmıştır. Söz konusu besi ortamları EK' de sunulmuştur.

3.2.4. MİK testine göre belirlenen farklı antibiyotik kombinasyonlarında probiyotik bakterilerin antibioresistans özelliklerinin belirlenmesi

Araştırmada bu amaçla Minimum İnhibitör Konsantrasyon testine göre antibiyotiklere tekli ya da çoklu direnç gösteren probiyotik bakteri türleri belirlenmiş ve yukarıda belirtilen agar gelişme ortamlarındaki aktiviteleri incelenmiştir. Bu bölümde; her antibiyotiğin etki eden minimum dozu kriter alınmış ve agar ortamında test mikroorganizması 10^4 CFU düzeyinde olacak şekilde aşılandıktan sonra incelenmiştir.

3.2.5. Antibiyotiklere dirençli probiyotik bakteriler ile yapılan yoğurtların Özelliklerinin tespiti.

Söz konusu antibiyotiklere dirençliliği saptanan probiyotik kültürlerle yoğurt yapım olanakları araştırılmıştır. Üretilen yoğurtlarda asitlik değeri pH (Hanna 210 pH-metre- Oysun,G.(Süt ve Ürünlerinde Analiz Yöntemleri (Ed. G. Oysun), Izmir, 306 (1996)' ye göre yapılmıştır.

Yoğurt üretimi için temin edilen süt 80-85 °C' de 15-20 dakika ısıtılmış ve içersinde % 3 oranında probiyotik bakteri kültür kombinasyonu inoküle edilerek, 42-43 °C' lerde 2,5-3 saat arasında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen yoğurtlar 24 saat depolanmış ve bunlarda yukarıdaki analizler yapılmıştır.

4.BULGULAR ve TARTIŞMA

Araştırmada, probiyotik bakterilerin antibiogramlarını tam olarak ortaya koyabilmek için, kullanılan antibiyotik ajanların etki mekanizmalarının bilinmesi bir zorunluluktur. Buna göre denememizde kullanılan antibiyotiklerin bakteriler üzerindeki etki mekanizmaları ile ait oldukları familyalar Çizelge 7’ de verilmiştir.

Çizelge 7. Araştırmada Seçilen Antibiyotiklerin Probiyotik Bakterilere İn vitro Koşullardaki Etki Mekanizmaları (Antibiogram testi) ve Antibiyotiklerin Ait Oldukları Familya (DEVER ve DERMODY 1991).

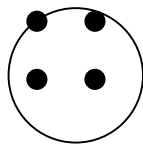
Antibiyotiğin İsmi	Etki Mekanizmaları	Ait Oldukları Familya
Vankomisin	Peptidoglikan sentezini inhibe eder	Glikopeptid
Gentamisin	Protein sentezini inhibe eder	Aminosid ya da Amioglikozid
Penisillin G	Peptidoglikan sentezini inhibe eder	Bêta-laktamin
Tetrasiklin	Protein sentezini inhibe eder	Tetrasiklinler
Ampisilin	Peptidoglikan sentezini inhibe eder	Bêta-laktamin

Denememizde kullanılan probiyotik bakterilerin söz konusu antibiyotiklere olan dirençlilikleri ya da duyarlılıkları, Çizelge 7’den de görüldüğü gibi bakterilerin belirtilen bölgeleri ile ilgili olmaktadır. Günümüzde etki mekanizmaları tespit edilmiş olan antibiyotik türlerinin özellikle etki ettiği patojen bakteri grupları da belirlenmiştir. Buna göre; vankomisin, özellikle *Staphlococcus*’ ler ile *Enterococcus*’lara, geniş spektrumlu olan gentamisin aneorob bakterilerden başka *Streptococcus*lar ile *Listeria* türlerine, penisillin G Gram (+) ile Gram (-) koklar ile basillere, tetrasiklin çok geniş spektrumlu oluşu ile hemen hemen tüm bakterilere, ampisilin ise, geniş spekturumlu olmasının yanında özellikle *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde etkili olmaktadır.

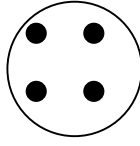
4.1. *Enterococcus faecium*’ un Antibioresistans Özelliği

Araştırmada, minimum inhibitör testi kullanılarak elde edilen bakterilere ait deneme sonuçlarında; *Enterococcus faecium*’ un uygulanan üç farklı antibiyotik dozundaki dirençliliği her bir antibiyotik baz alınarak aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

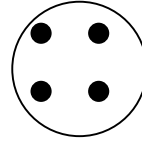
A-) Vankomisin



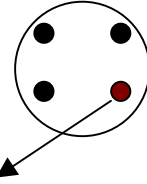
Şahit Örnek



Vankomisin
0.5 µg/ml



Vankomisin
1 µg/ml



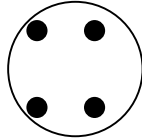
(Gelişimi şüpheli örnek)

Vankomisin
2 µg/ml

Yapılan incelemede; *Enterococcus faecium* türü probiyotik bakterilerin 0.5 µg/ml ile 1 µg/ml düzeyinde uygulanan Vankomisine % 100 oranında dirençli oldukları, ancak 2 µg/ml düzeyinde yapılan uygulamada % 75 düzeyinde dirençli oldukları tespit edilmiştir. 2 µg/ml düzeyinde uygulanan vankomisine söz konusu türlerin % 25 oranında şüpheli dirençli oldukları da belirlenmiştir¹.

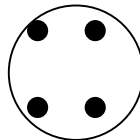
Konu ile ilgili olarak söz konusu probiyotik bakteri türünün yapılan tüm çalışmalarda (BRETT ve GILMORE 2002, SMITH 1997) vankomisine dirençli olduğu belirlenmiş ve bu sonuçların çalışmamızla uyum içerisinde olduğu görülmüştür.

B-) Gentamisin

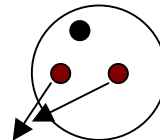


Gelişimi şüpheli örnekler

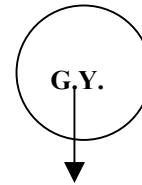
Şahit Örnek



Gentamisin
0.5 µg/ml



Gentamisin
1 µg/ml



Gentamisin
2 µg/ml

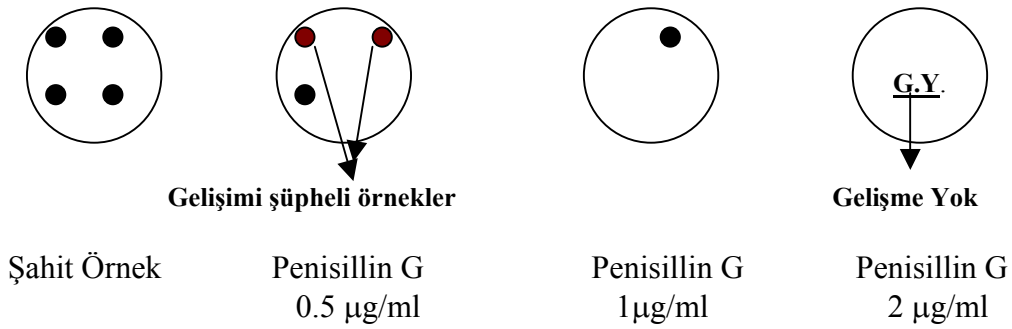
Gelişim Yok

Araştırmada incelenen *Enterococcus faecium* türlerinin Gentamisine olan dirençliliklerinin 0.5 µg/ml düzeyinde % 100, 1 µg/ml düzeyinde % 25 ve 2 µg/ml düzeyinde ise % 0 olduğu belirlenmiştir. Ancak araştırmamızda 1 µg/ml düzeyinde elde edilen sayımda % 50 düzeyinde de şüpheli gelişim gösteren (mikroskop altında yapılan inceleme sonucunda koloni şekli itibariile) kolonilere rastlanılmış yani şüpheli dirençlilik tespit edilmiştir.

¹ Denememizde elde edilen şüpheli dirençlilik gösteren türler dikkate alınmamıştır.

Araştırmamızda elde edilen sonuçların diğer çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür (BRETT ve GILMORE 2002). Konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda bakterinin gentamisine olan dirençliliğinin son derece az olduğu tespit edilmiştir. Denememizde de *Enterococcus faecium*' un yalnızca 0.5 µg/ml' lik gentamisin konsantrasyonuna % 100, 1 µg/ml' lik konsantrasyonda bu direncin % 25' e gerilediği ve 2 µg/ml' lik antibiyotik konsantrasyonunda da dirençliliğin ortadan kalktığı tespit edilmiştir.

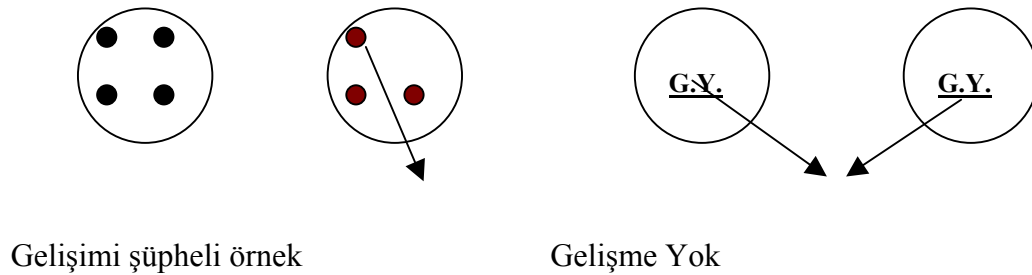
C-) Penisillin G



Penisillin G türü antibiyotiğe karşı söz konusu bakterinin in vitro koşullardaki dirençliliğinin, 0.5 µg/ml ile 1 µg/ml düzeyinde düşük olduğu (%25) tespit edilmiş, ancak 2 µg/ml düzeyindeki Penisillin varlığında ise bakterinin gelişimine (dirençlilik %0) rastlanmamıştır.

Farklı araştırmalarda konu ile ilgili elde edilen değerlerin çalışmamızda bulduğumuz sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir. Nitekim penisillinin düşük konsantrasyonlarında dahi söz konusu bakterinin inhibe olduğu tespit edilmiş olmakla birlikte, çalışmamızda seçilmiş olan en düşük konsantrasyon olan 0.5 µg/ml düzeyindeki dirençlilik % 25 olarak belirlenmiştir (BRETT ve GILMORE 2002, SMITH ve ark. 1997).

D-) Tetrasiklin

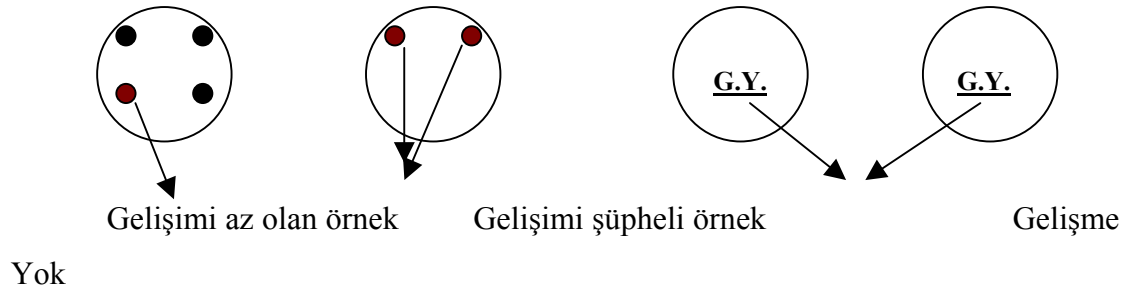


Şahit Örnek	Tetrasiklin 0.5 µg/ml	Tetrasiklin 1 µg/ml	Tetrasiklin 2 µg/ml
-------------	--------------------------	------------------------	------------------------

Enterococcus faecium' un dirençliliğinin incelendiği diğer bir antibiyotik türü Tetrasiklin olmuş ve araştırmada, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml ve 2 µg/ml düzeylerindeki tetrasiklin varlığında söz konusu probiyotik bakterinin gelişiminin olmadığı ve bu konsantrasyonlarda bakterinin inhibe olduğu belirlenmiştir. Ancak çalışmamızda 0.5 µg/ml düzeyinde uygulanan tetrasikline karşı tespit edilen dirençliliğin şüpheli olduğu da (% 75) saptanmıştır.

Araştırmamızda elde edilen değerlerin konu ile ilgili olarak yapılan araştırmalar ile uyumlu olduğu görülmektedir (BUTAYE ve ark. 2000).

E-) Ampisilin



Şahit Örnek	Ampisilin 0.5 µg/ml	Ampisilin 1 µg/ml	Ampisilin 2 µg/ml
-------------	------------------------	----------------------	----------------------

Bakterilerin peptidoglikan sentezinin inhibisyonu ile antibakteriyel özellik gösteren Ampisilin bu özelliği değişik konsantrasyonlarda denenmiştir. Çalışmamızda *Enterococcus faecium*' un, 0.5 µg/ml , 1 µg/ml (%100) ve 2 µg/ml (%100) düzeyinde uygulanan ampisiline dirençsiz olduğu tespit edilmiştir. Ancak araştırmada 0.5 µg/ml düzeyinde saptanan dirençliliğin şüpheli (%50) olduğu da belirlenmiştir.

Konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, *Enterococcus faecium*' un ampisiline duyarlılığı ile ilgili çelişkili raporlar bulunmaktadır. Nitekim bazı çalışmalarda söz konusu bakterinin ampisiline son derece hassas olduğu ve düşük dozlarda bile inaktive olduğu tespit edilirken (BRETT ve GILMORE 2002), diğer bazı çalışmalarda da 16 µg/ml konsantrasyonunda uygulanan ampisilin düzeyinde bile bakterinin dirençli olduğu bildirilmiştir. Ancak çalışmada araştırmacılar söz konusu direncin ampisilin + levofloxacin kombinasyonu ile sağlandığını ifade etmişler ve

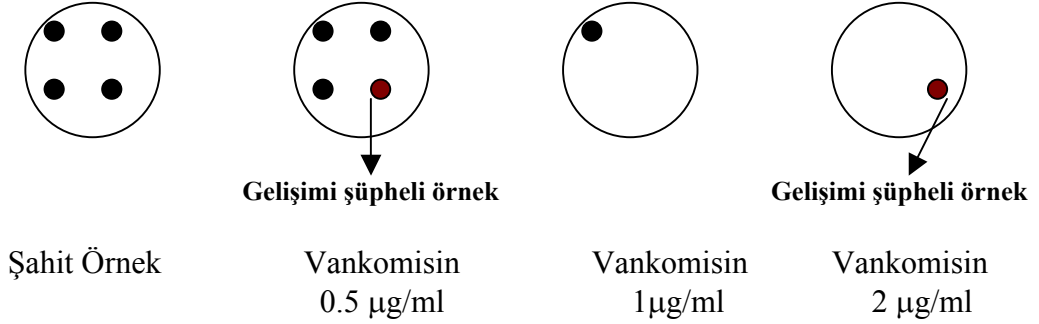
antibiyotikler arasında sinerjisi bir etkinin olduğu görüşünde birleşmişlerdir (SMITH ve ark. 1997).

Araştırmanın bu bölümünde incelenen *Enterococcus faecium*' un denenen antibiyotiklerin farklı konsantrasyonlarına olan duyarlılıklarında farklılıklar tespit edilmiştir. Buna göre; söz konusu bakteri Vankomisin'in 0.5 µg/ml ile 1 µg/ml' lik konsantrasyonlarına % 100 oranında dirençli bulunurken, 2 µg/ml konsantrasyonundaki uygulamaya % 75 oranında dirençli ve % 25 oranında da şüpheli dirençli bulunmuştur. Bunun yanında gentamisin'in 0.5 µg/ml' lik konsantrasyonuna % 100 dirençli olurken, 1 µg/ml ve 2 µg/ml' lik konsantrasyonlarda % 25 düzeyinde dirençli, 1 µg/ml' lik konsantrasyonda da % 50 oranında şüpheli dirençli olarak tespit edilmiştir. Penisilin G' ye karşı olan duyarlılığının belirlendiği çalışmamızda; söz konusu probiyotik bakterinin 0.5 µg/ml' lik penisilin G konsantrasyonuna % 25 oranında dirençli bulunurken, % 50 oranında şüpheli dirençli bulunmuş, 1 µg/ml' lik penisilin G konsantrasyonuna ise % 25 dirençli, ancak % 75 oranında da şüpheli dirençli olduğu belirlenmiştir. 2 µg/ml' lik konsantrasyonda ise bakteri % 100 oranında duyarlı olarak tespit edilmiştir. Diğer bir grup antibiyotik olan tetrasiklinlere karşı olan duyarlılığın incelendiği çalışmamızda; 0.5 µg/ml' lik tetrasiklin konsantrasyonunda bakterinin % 75 oranında şüpheli dirençli olduğu, 1 µg/ml ile 2 µg/ml' lik antibiyotik düzeylerinde ise % 100 duyarlı olduğu saptanmıştır. Çalışmada söz konusu bakterilere olan etkisi incelenmiş olan diğer bir antibiyotik Ampisilin olmuş ve ampisilin'in 0.5 µg/ml konsantrasyon düzeyinde bakterilerin % 50 oranında şüpheli dirençli olduğu, 1 µg/ml ve 2 µg/ml' lik konsantrasyonlara ise % 100 oranında duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

4.2. *Bifidobacterium bifidum*' un Antibioresistans Özelliği

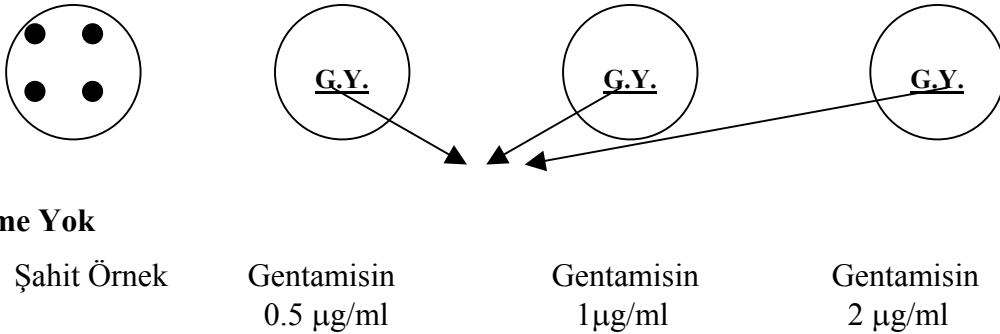
Denememizde antibioresistans özelliği tespit edilen diğer bir bakteri de, *Bifidobacterium bifidum* olmuş ve söz konusu bakterinin bu özelliği antibiyotikler baz alınarak aşağıda verilmiştir.

A-) Vankomisin



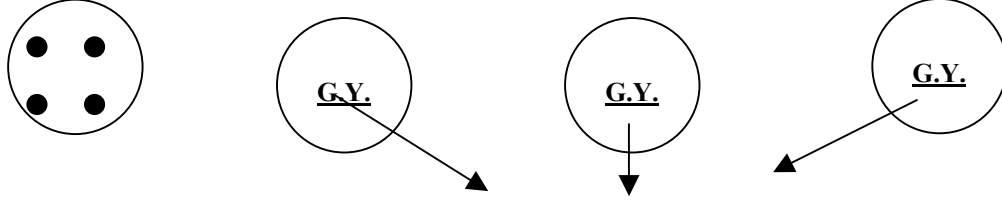
Denememizde antibioresistans özelliği belirlenmek üzere kullanılan diğer bir probiyotik bakteri olan *Bifidobacterium bifidum*' un, 0.5 µg/ml düzeyindeki Vankomisine % 75 oranında dirençli olduğu tespit edilmiş, 1 µg/ml düzeyindeki vankomisin ortamında ise bu dirençlilik % 25' lere gerilemiştir. 2 µg/ml düzeyinde vankomisin bulunan ortamda ise bu dirençliliğin ortadan kalktığı belirlenmiş, şüpheli olan sayımın deneysel hatalardan kaynaklandığı kanısına varılmıştır.

B-) Gentamisin



Söz konusu probiyotik bakterinin Gentamisine olan dirençliliğinin belirlendiği çalışmada; *Bifidobacterium bifidum* türlerinin tümünün söz konusu antibiotiğe dirençsiz olduğu tespit edilmiştir. Yapılan literatür çalışmalarında adı geçen antibiyotiğin, geniş spektrumlu oluşu ve özellikle de anaerob bakterilerin genelinde etkili oluşu bu bulgularımızı desteklemiştir.

C-) Penisillin G

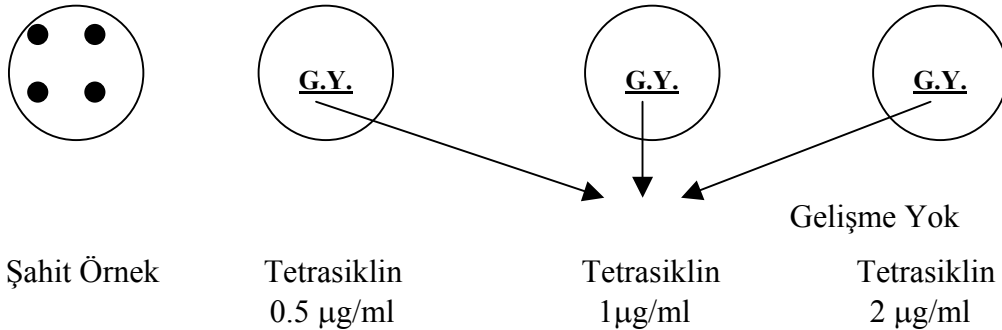


Gelişme Yok

Şahit Örnek	Penisillin G 0.5 µg/ml	Penisillin G 1µg/ml	Penisillin G 2 µg/ml
-------------	---------------------------	------------------------	-------------------------

Penislin G konu ile ilgili olarak yapılan tüm deneysel çalışmalarda özellikle Gram (+) ve Gram (-) bakteriler üzerinde son derece etkili antimikrobiyal bir ajan olarak tanımlanmaktadır. Ancak özellikle son yıllarda patojen bakteriler ile ilgili olarak yapılan araştırmalarda, çok sayıda patojen bakterinin bu antibiyotiğe karşı duyarlılıklarının değiştiği ve dirençliliklerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu anlamda incelemeye aldığımız bu antibiyotiğin *Bifidobacterium bifidum* türlerine karşı etkilerinin son derece güçlü olduğu belirlenmiş ve 0.5µg/ml , 1 µg/ml ile 2 µg/ml düzeyinde bile söz konusu bakterileri inaktive ettiği tespit edilmiştir.

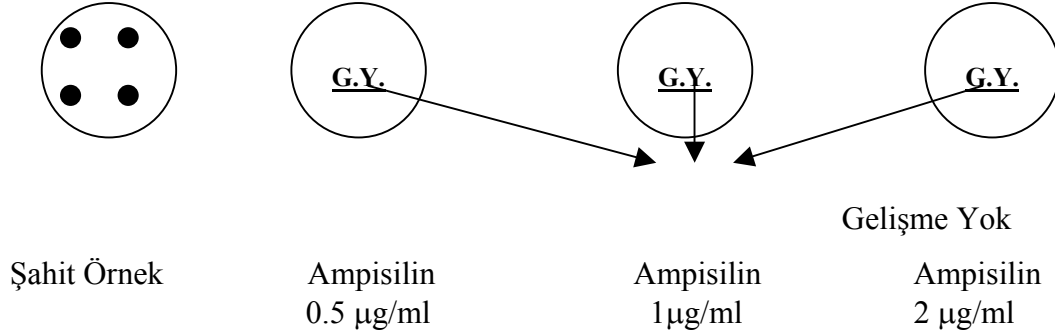
D-) Tetrasiklin



Araştırmamızda incelemeye aldığımız diğer bir antimikrobiyal ajan Tetrasiklinler olmuştur. Söz konusu antimikrobiyen ajanlar özellikle bakterilerin protein sentezini durdurarak onları inaktive etmekte ve bu anlamda geniş bir

spektrumunda etki etmektedir. Nitekim denememizde üç değişik dozda *Bifidobacterium bifidum* üzerine olan etkisi incelenen antibiyotiğin her üç dozda da söz konusu bakteriyi inaktive ettiği belirlenmiştir.

E-) Ampisilin



Denememizde incelenen *Bifidobacterium bifidum* türlerinin tümü kullanılan ampisilin konsantrasyonlarında inaktive olmuş ve söz konusu bakterilerin bu antibiyotiğe dirençsiz oldukları sonucuna varılmıştır.

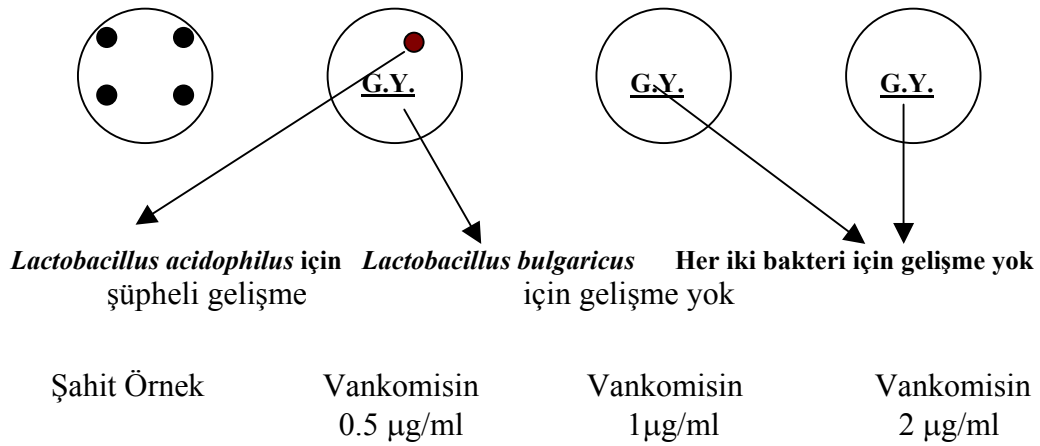
Araştırmanın bu bölümünde *Bifidobacterium bifidum* türlerinin yalnızca 0.5 µg/ml konsantrasyonundaki Vankomisine % 75 oranında dirençli olduğu, % 25 oranında da şüpheli dirençli olduğu belirlenirken, 1 µg/ml' lik vankomisin konsantrasyonunda % 25' i dirençli % 75' i de duyarlı bulunmuştur. Araştırmada kullanılan diğer bir konsantrasyon 2 µg/ml düzeyinde olmuştur. Yapılan incelemede söz konusu bakterinin bu konsantrasyonda uygulanan antibiyotiğe % 25 oranında şüpheli dirençli olduğu tespit edilmiştir. Ancak *Bifidobacterium bifidum* türünün denemede kullanılan diğer antibiyotik türlerine karşı olan duyarlılığının % 100 olduğu da saptanmıştır.

4.3. *Lactobacillus acidophilus* ile *Lactobacillus bulgaricus*' un Antibioresistans Özelliği.

Denememizde antibioresistans özelliği belirlenen diğer bakteriler, *Lactobacillus acidophilus* ile *Lactobacillus bulgaricus* olmuştur. Araştırmada incelenen her iki probiyotik bakteri de mikroaerofilik ortamları seven, buna karşın anaerob ortamlarda da gelişme gösteren ve antimikrobiyallere karşı son derece

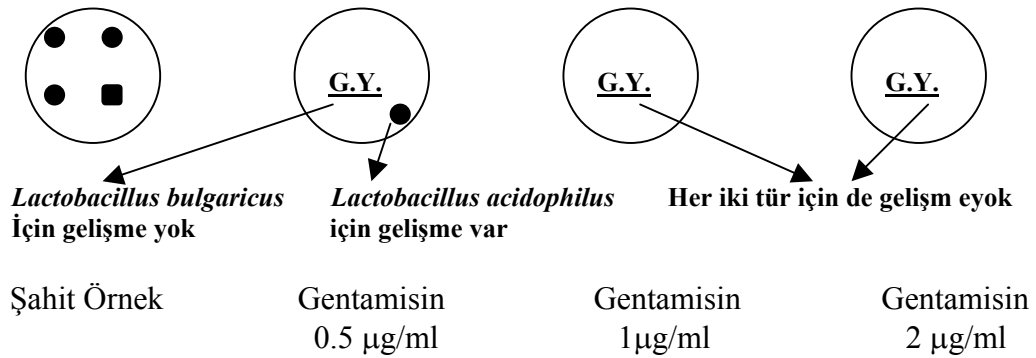
duyarlı olan türlerdir. Bu bakterilerin denememizde kullanılan antibiyotiklere olan duyarlılıkları ise şu şekilde bulunmuştur:

A-) Vankomisin



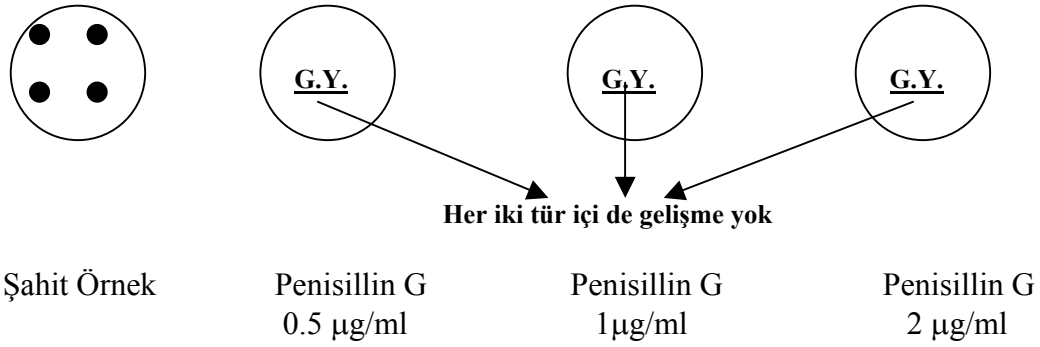
Araştırmada söz konusu probiyotik bakterilerin antibioresistans özelliklerinin bir arada incelenmesinin nedeni, bakterilerin aynı familyada yer alması ve genel özelliklerinin birbirine yakın olması ile ilgilidir. Vankomisine olan duyarlılıkların incelendiği bu bölümde; *Lactobacillus bulgaricus*' un vankomisinin her üç dozuna da duyarlı olduğu, *Lactobacillus acidophilus*' un ise, vankomisinin 0.5 µg/ml'lik konsantrasyonuna % 25 oranında, ancak şüpheli bir direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

B-) Gentamisin



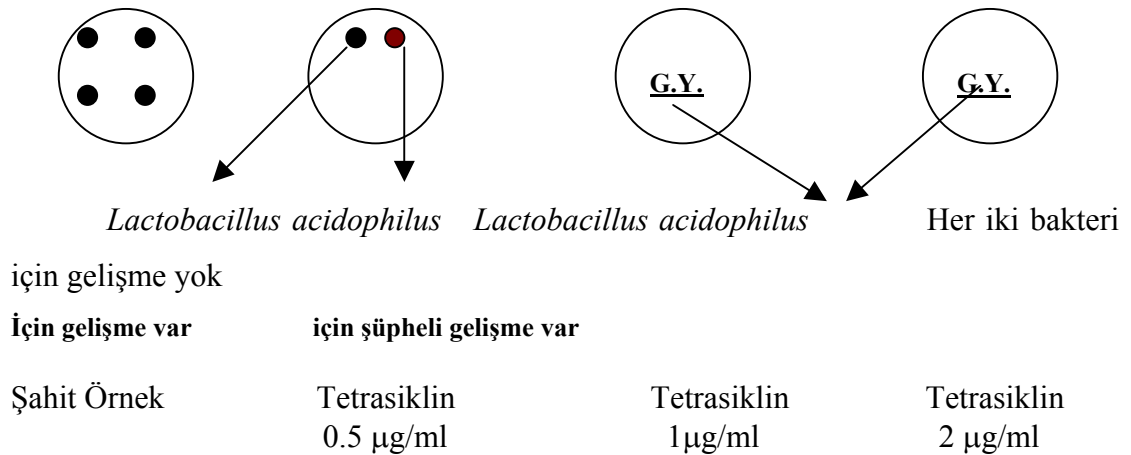
Çalışmamızda her iki probiyotik bakteri türünün aminoglikozid türü bir antimikrobiyal ajan olan gentamisine olan duyarlılıkları tespit edilmiştir. Buna göre; *Lactobacillus acidophilus*'un çok düşük konsantrasyonlardaki (0.5 µg/ml) gentamisine % 25 düzeyinde dirençli çıktığı, ancak *Lactobacillus bulgaricus*' un ise, her üç doza da duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

C-) Penisilin G



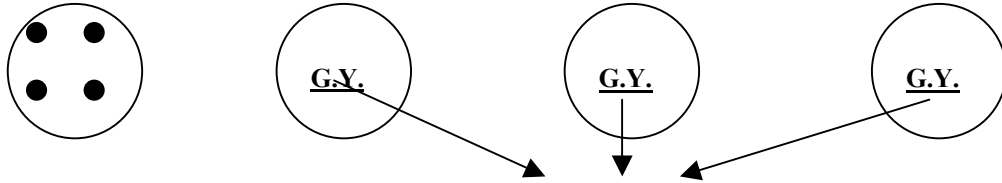
Denememizde in vitro koşullarda incelenen her iki bakterinin, Bêta laktamin sınıfı bir antibiyotik olan Penisilin G' ye, % 100 düzeyinde duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Böylece antibiyotikler arasında ilk keşfi yapılan bu antibiyotığın probiyotik bakterilerden olan bu iki türe olan etkilerinin hala son derece güçlü olduğu belirlenmiştir.

D-) Tetrasiklinler



Son derece geniş spektrumlu antibiyotiklerden olan ve tetrasiklinler sınıfında yer alan tetrasiklin türü antibiyotiğe karşı *Lactobacillus acidophilus*' un 0.5 µg/ml konsantrasyonunda % 25 düzeyinde dirençli olduğu, % 25 düzeyinde de şüpheli bir olasılıkla dirençli olduğu görülmüştür. *Lactobacillus bulgaricus*' un ise, kullanılan üç konsantrasyona da duyarlı olduğu belirlenmiştir. Tetrasiklinler uzun zamandan beri insan sağlığında özellikle streptococcus ya da staphylococcus'ların inaktivasyonunda kullanılmakta olan antimikrobiyal ajanlardır. *Lactobacillus acidophilus* türü bakteriler de gastrointestinal florada bulunmaktadır. Bu bilgilere ışığında, zaman içerisinde kullanılan bu antibiyotiğe karşı bakterinin çok düşük düzeyde de olsa bir direnç geliştirmesi mümkün olabilir. Ancak yoğurt starter kültürü olarak bilinen *Lactobacillus bulgaricus*' un bu antibiyotiğe duyarlı olması, yoğurt teknolojisinde hala bir sorun olarak durmaktadır.

E-) Ampisilin



Her iki

bakteri içi gelişme yok

Şahit Örnek	Ampisilin 0.5 µg/ml	Ampisilin 1 µg/ml	Ampisilin 2 µg/ml
-------------	------------------------	----------------------	----------------------

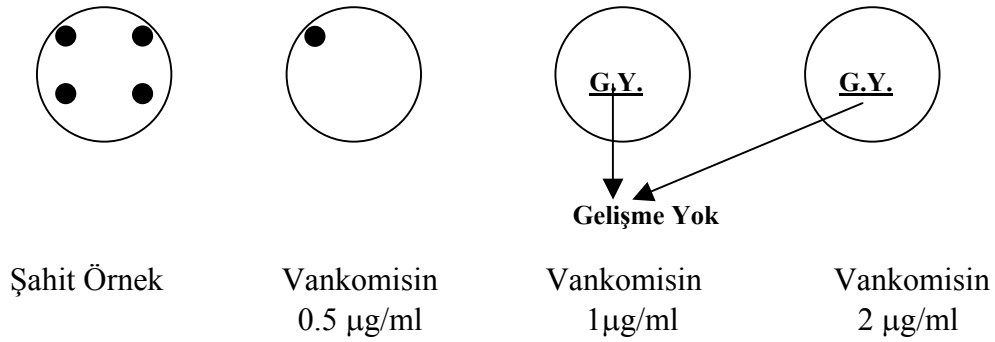
Çalışmamızda ampisiline duyarlılığı denenen her iki bakterinin antibiyotiğin tüm konsantrasyonlarına duyarlı oldukları belirlenmiştir. Bu durum; ampisilin geniş spektrumlu etki mekanizmasına bağlanabilir.

Çalışmanın bu bölümünde *Lactobacillus bulgaricus*' un seçilen antimikrobiyen ajanlara olan duyarlılıkları % 100 olarak tespit edilirken, *Lactobacillus acidophilus*' un Gentamisin ve Tetrasiklin türü antibiyotiklere olan duyarlılıkları % 75 (dirençlilikleri % 25) düzeyinde tespit edilmiştir. Bunun yanında denememizde kullanılan antibiyotiklerden olan Vankomisin ile Tetrasiklinlere karşı *Lactobacillus acidophilus*' un % 25 düzeyinde şüpheli dirençli olduğu da

belirlenmiştir. Ancak çalışmamızda elde edilen bu yüzdesel diğer oran dikkate alınmamıştır.

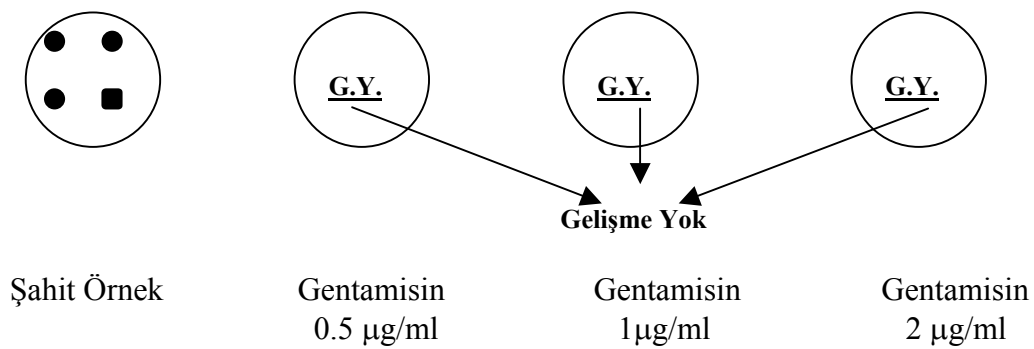
4.4. *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*' un Antibioresistans Özelliği.

A-) Vankomisin



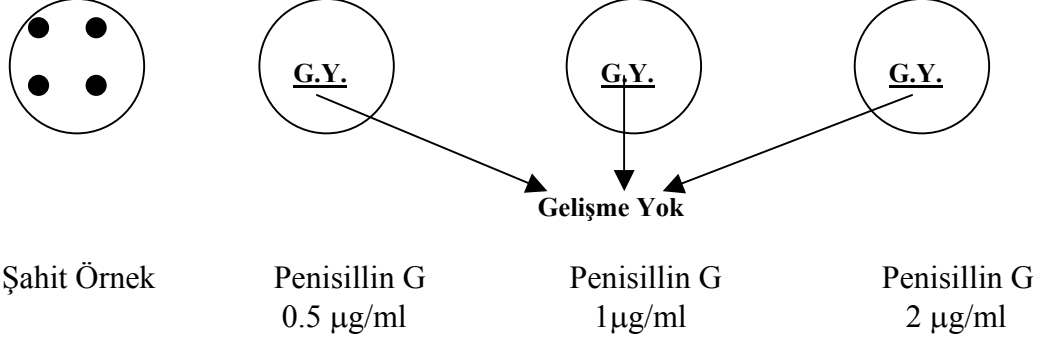
Süt teknolojisinde yoğurt üretiminde önemli bir starter kültür olan *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*' un vankomisinin farklı konsantrasyonlarına karşı gösterdiği dirençliliğin farklı olduğu görülmüştür. Çalışmada söz konusu bakterinin, vankomisinin 0.5 µg/ml' lik konsantrasyonuna % 25 düzeyinde dirençli olduğu, 1µg/ml ve 2 µg/ml' lik konsantrasyonlara ise % 100 oranında duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

B-) Gentamisin



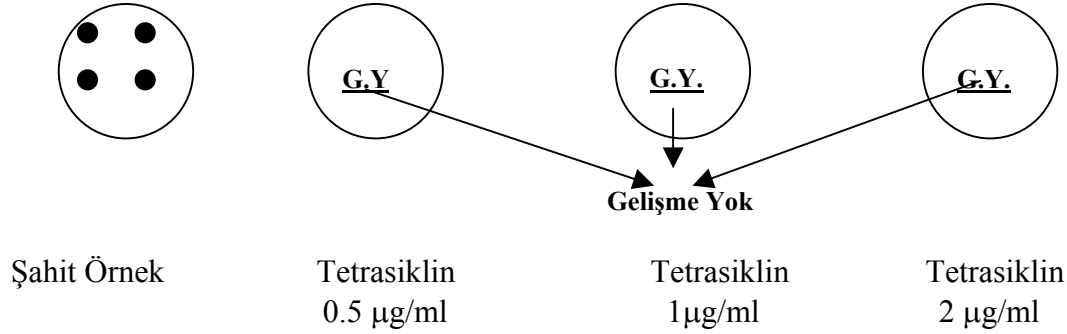
Gentamisine karşı *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* türü bakterilerin antibiyotiğin uygulanan tüm konsantrasyonda duyarlı olduğu ve bu duyarlılığın % 100 düzeyinde olduğu tespit edilmiştir

C-) Penisilin G



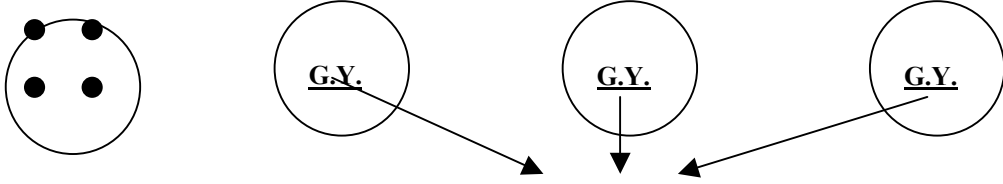
Penisilin G' nin farklı konsantrasyonlarına karşı elde edilen değerlerin de aynen gentamisinde elde edilen sonuçlarla paralel olduğu görülmüş ve bakterinin penisilinin tüm konsantrasyonlarına % 100 oranında duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

D-) Tetrasiklinler



Geniş bir alanda insan sağlığında etkili bir antimikrobiyen ajan olarak kullanılan tetrasiklinlere karşı söz konusu bakterinin duyarlılığı tüm konsantrasyonlarda % 100 olarak bulunmuştur.

E-) Ampisilin



Yok

Gelişme

Şahit Örnek

Ampisilin
0.5 µg/ml

Ampisilin
1 µg/ml

Ampisilin
2 µg/ml

Tetrasiklin grubu gibi geniş bir alanda kullanılan ampisiline karşı bakterinin dirençliliğinin olmadığı ve tüm konsantrasyonlarda elde edilen duyarlılık değerinin % 100 olduğu saptanmıştır.

Araştırmamıza, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*' un farklı antibiyotiklere olan dirençlilikleri incelendiğinde; söz konusu bakterinin yalnızca vankomisinine çok düşük bir (0.5 µg/ml) konsantrasyonuna dirençli olduğu belirlenmiş, ancak diğer antibiyotikler ve dozlara olan duyarlılığın % 100 olduğu görülmüştür.

4.5. MİK testine göre belirlenen farklı antibiyotik kombinasyonlarında probiyotik bakterilerin antibioresistans özelliklerinin belirlenmesi

Araştırmanın bu bölümünde; tekli ya da çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiş olan bakterilerin, direnç gösterdikleri antibiyotik konsantrasyonlarının minimum değerleri kriter alınmış (MİK) ve bu antibiyotiklerin minimum inhibe edici konsantrasyonları birbirileri ile kombine edilerek bakteriler üzerindeki etkilerinin nasıl olduğu tespit edilmiştir. Buna göre;

a-) Araştırmamızda *Enterococcus faecium* türlerinin vankomisinine uygulanan konsantrasyonlarına dirençli oldukları tespit edildiği için denemede kullanılmamıştır.

Çalışmamızda gentamisinine etki ettiği minimum doz (1 µg/ml) ile penisilin G'nin etki ettiği minimum dozlar (0.5 µg/ml) kombine edilerek agar ortamına ilave edilmiş ve bakterinin gelişimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Araştırmamızda *Enterococcus faecium*' un söz konusu antibiyotik kombinasyonuna olan direncinin

yok olduğu ve söz konusu antibiyotik konsantrasyonunun inhibe edici etkisinin, tek tek kullanıma göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Denemede kullanılan diğer bir doz; 1 µg/ml gentamisin + 0.5 µg/ml tetrasiklin olmuş ve bunların kombineli etkileri *Enterococcus faecium* üzerinde denenmiştir. Sonuçta inhibe edici etkinin gentamisin + penisilin G'deki etkiyle aynı ancak daha şiddetli olduğu belirlenmiştir. Nitekim antibiyotiklerin tek tek uygulandığı denemenin ilk bölümünde 0.5 µg/ml' lik konsantrasyonlarda canlı bakteri izole edilirken, kombinasyonun uygulandığı bu bölümde hiçbir canlı koloniye rastlanılmamıştır.

Gentamisin (1 µg/ml) + ampisilin (0.5 µg/ml), penisilin G (0.5 µg/ml) + tetrasiklin (0.5 µg/ml), penisilin G (0.5 µg/ml) + ampisilin (0.5 µg/ml) ile tetrasiklin (0.5 µg/ml) + ampisilin (0.5 µg/ml) kombinasyonlarının tümünün *Enterococcus faecium* üzerine inhibe edici etkileri olduğu belirlenmiştir.

b-) Araştırmamızda MİK değerleri tespit edilmiş olan antibiyotiklerin kombinasyonları agar gelişme ortamına ilave edilerek çoklu etki tespit edilmiştir. Buna göre, *Bifidobacterium bifidum*' un tüm kombinasyonlardan etkilendiği belirlenmiş olmakla birlikte yalnızca gentamisin (0.5 µg/ml) + ampisilin (0.5 µg/ml) kombinasyonuna olan direncin biraz daha yüksek olduğu saptanmış, ancak bu elde edilen değerin çok önemli olmadığı da görülmüştür.

c-) İncelenen tüm antibiyotik kombinasyonlarında tek tek antibiyotik kullanımına göre daha fazla etkilenen bu probiyotik bakterinin en az penisilin (0.5 µg/ml) + vankomisin (0.5 µg/ml) kombinasyonundan etkilendiği yani daha dirençli olduğu, ancak bu etkinin antibiyotiklerin tek tek kullanımı ile elde edilen sonuçlar ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

d-) Araştırmada söz konusu probiyotik bakterinin tüm antibiyotik kombinasyonlarından etkilendiği ve bu etkinin tek tek antibiyotik kullanılması ile elde edilen değerler düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Daha başka bir anlatımla antibiyotik kombinasyonları ile gerçekleşen inhibisyonun, tek tek antibiyotik kullanımı ile elde edilmiş olan inhibisyonla aynı düzeyde olduğu görülmüştür.

e-) Doğal yaşam aralığında son derece hassas bir diğer türde *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*' dur. Söz konusu probiyotik bakteri, tek tek uygulanan antibiyotik dozlarının en düşük düzeyinden bile etkilendiği tespit edilmiş ve bu

etkinin antibiyotik kombinasyonlarında daha şiddetli olduğu görülmüştür. Nitekim denememizde kullanılan antibiyotiklerin 0.5 µg/ml' lik konsantrasyonlarına bile dirençli bulunmayan bu tür, farklı antibiyotik kombinasyonlarının uygulandığı 0.5 µg/ml' lik düzeyde hiçbir şekilde gelişme gösterememiştir.

Farklı antibiyotik kombinasyonlarının probiyotik bakteriler üzerine olan etkilerinin incelendiği bu bölümde, probiyotik bakterilerin en düşük dozda uygulanan antibiyotik kombinasyon konsantrasyonların dirençsiz oldukları belirlenmiştir. Çalışmada tek tek antibiyotiklere bazı dozlarda direnç gösteren suşların, kombineli uygulamalarda bu dirençlilikleri ortadan kalkmıştır. Ancak iki türden *Bifidobacterium bifidum*' un gentamisin (0.5 µg/ml) + ampisilin (0.5 µg/ml) ve *Lactobacillus acidophilus*' un da, penisilin (0.5 µg/ml) + vankomisin (0.5 µg/ml) kombinasyonuna olan direncinin biraz daha yüksek olduğu saptanmış ve bakterilerin çoklu direnç gösterdikleri belirlenmiştir. Belirtilen antibiyotik kombinasyonlarına diğer kombinasyonlardan daha dirençli çıkan söz konusu probiyotik bakterinin bu özellikleri, doğal olarak yaşamlarını sürdürdükleri ortam ile ilişkilendirilebilir. Ancak söz konusu bu direncin tarafımızdan çok önemli bir kriter olmadığı da görülmektedir. Ayrıca çalışmada yoğurt teknolojisinde starter kültür olarak kullanılan *Lactobacillus bulgaricus* ile *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*' un gerek tek tek, gerekse kombineli olarak uygulanan antibiyotiklerin en düşük konsantrasyonundan bile etkilendiği görülmüştür.

Sonuç olarak araştırmamızın bu bölümünde probiyotik bakterilerin kombine antibiyotik kullanımının en düşük dozu ile inaktive edildikleri tespit edilmiş ve bu olgudan özellikle yoğurt bakterileri etkilenmiştir.

4.6. Minimum İnhibitör Konsantrasyon Testine Göre Tekli ya da Çoklu Resistans Özelliği Gösteren Bakteriler ile Yoğurt Üretimi.

Denemizde kullanılan antibiyotiklere dirençliliği en fazla probiyotik türün, *Enterococcus faecium* olduğu tespit edilmiş olmakla birlikte bu bakterinin özellikle tetrasiklin ile ampisilin her konsantrasyonuna karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca teknolojik olarak söz konusu türden yoğurt yapım olanağının bulunmaması nedeni ile denemede kullanılmamıştır. Konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda bu

tür kullanılarak elde edilen yoğurtların kalitelerinin çok düşük olduğu, istenen pıhtının gevşek ve aroma ile tadında buna paralel olarak gelişemediği belirlenmiştir.

Antibiyotiklerin uygulanan en düşük dozuna bile dirençsiz olduğu tespit edilen *Lactobacillus bulgaricus* ile *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* da çalışmanın bu bölümünde incelemeye alınmamıştır.

Çalışmamızda gerek tek tek, gerekse kombineli olarak uygulanan antibiyotik kombinasyonlarına tekli ya da çoklu direnç gösteren probiyotik bakteri kültürleri; *Lactobacillus acidophilus* ile *Bifidobacterium bifidum* olarak belirlenmiş ve bu bakterilerin birlikte kullanılması ile elde edilen yoğurtların özelliklerinin belirlenmesine çalışılmıştır.

Buna göre, söz konusu bakterilerden *Lactobacillus acidophilus* MRS buyyonda, *Bifidobacterium bifidum* ise Bifidobacterium Medium ortamında zenginleştirilmiş ve en az 10^7 CFU/ml düzeyine ulaşıncaya kadar zenginleştirmeye devam edilmiştir. Zenginleştirme sonunda, % 13 kurumaddeye ayarlanmış süt içersine 1:1 oranında ve % 3 düzeyinde bakteri popülasyonu aşılacak ve 2.5-3 saat inkübasyona bırakılmıştır. 2.5-3 saat sonra inkübasyondan alınan yoğurtların yapılarının gevşek olduğu ve istenen kokuya sahip olmadığı tespit edilmiştir. Bunun üzerine inkübasyona ½ saat kadar daha devam edilmiş ve 24 saat +4 °C' de buzdolabı koşullarında bekletilmiştir. 24 saat sonunda buzdolabından çıkartılan yoğurtların istenen tat-aroma ve yapıda olmadığına karar verilmiş ve denemeye devam edilememiştir.

Denemede antibiyotik kombinasyonlarına dirençli olduğu tespit edilen probiyotik bakteriler ile yoğurt üretilenmemiştir. Yapılan literatür çalışmalarında söz konusu bakteri kombinasyonuna en az bir yoğurt kültürünün (Özellikle de *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*' un) ilave edilmesi ile başarıya ulaşıldığı belirlenmiş olmakla birlikte, bu şekildeki bir uygulamanın araştırmamızın özüne ters düşmesi açısından tercih edilmemesine karar verilmiştir. Çünkü çalışmamızda *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*' un gerek tekli, gerekse kombineli antibiyotik uygulamalarına dirençsiz olması bu karara varmamızda esas etken olmuştur.

5. SONUÇ

Araştırmada elde edilen bulgularımızın diğer konu ile ilgili olarak çalışan araştırmacıların sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir. Bu uyum içerisinde özellikle antibiyotiklerin etki ettiği bakteri grupları dikkate alındığında, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların doğru olduğu görülmektedir. Nitekim çok sayıda araştırmacı *Enterococcus faecium*' un özellikle vankomisine dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz değerler (tüm konsantrasyonlarda) bunu doğrulamaktadır. Bunun yanında özellikle anaerob bakteriler üzerine etki ettiği bildirilen gentamisin araştırmamızda incelediğimiz ve genelde mikroaerofilik ama bazen de anaerob gelişme gösteren *Lactobacillus acidophilus* ile *Lactobacillus bulgaricus* üzerine olan inhibe edici etkisi doğrulanmıştır. Nitekim çalışmamızda *Lactobacillus acidophilus*' un gentamisin ve tetrasiklin türü antibiyotiklere olan duyarlılıkları % 75 (dirençlilikleri % 25) düzeyinde tespit edilmiş, *Lactobacillus bulgaricus*' un duyarlılığı da uygulanan antibiyotiklerin tüm konsantrasyonlarında % 100 olarak belirlenmiştir. Ayrıca çalışmamızda insan sağlığının iyileştirilmesinde tıp alanında yaygın olarak kullanılan ve geniş spektrumlu antibiyotikler sınıfına dahil edilen tetrasiklin ile ampisilin tüm konsantrasyonlarda bakterilere karşı etken oluşu da literatürleri destekler niteliktedir. Bununla birlikte çalışmamızda tespit edilen *Lactobacillus acidophilus*' un bu geniş spektrumlu antibiyotiklere olan zayıf dirençliliğinin (% 25) zaman içerisinde bulunduğu gastrointestinal sistemdeki bir mutasyonla ilişkilendirilebilmesi olasıdır. Denememizde bakterilerde peptidoglikogan sentezini durdurarak inhibe etme yeteneği gösteren vankomisine ise; probiyotik bakterilerin dirençliliklerinin diğer antibiyotik türlerine göre daha fazla olduğu ortaya konmuştur. Ancak çalışmamızda bu direncin özellikle *Enterococcus faecium*' da ağırlık kazandığı görülmektedir. Elde edilen bulguların ışığı altında araştırmadan çıkan sonuçlar şu şekilde özetlenebilir;

a-) Araştırmada incelenen *Enterococcus faecium*; vankomisinin 0.5 µg/ml ile 1 µg/ml' lik konsantrasyonlarına % 100 oranında dirençli, 2 µg/ml konsantrasyonundaki uygulamaya % 75 oranında dirençli ve % 25 oranında da şüpheli dirençli bulunmuştur. Bunun yanında gentamisin 0.5 µg/ml' lik konsantrasyonuna % 100 dirençli olurken, 1 µg/ml' lik konsantrasyonda % 25 düzeyinde dirençli , % 50 oranında da şüpheli dirençli olarak tespit edilmiştir. Araştırmada söz konusu

bakterinin 2 µg/ml' lik gentamisin konsantrasyonunda % 100 oranında inaktive olduğu belirlenmiştir. Penisilin G konsantrasyonuna karşı olan duyarlılığının da belirlendiği çalışmamızda; bu probiyotik bakterinin 0.5 µg/ml' lik penisilin G konsantrasyonuna % 25 oranında dirençli, % 50 oranında şüpheli dirençli olduğu, 1 µg/ml' lik penisilin G konsantrasyonuna ise % 25 dirençli, ancak % 75 oranında da şüpheli dirençli olduğu belirlenmiştir. 2 µg/ml' lik konsantrasyonda ise bakteri % 100 oranında duyarlı olarak tespit edilmiş ve bu konsantrasyonda tamamen inaktive olmuştur. Diğer bir grup antibiyotik olan tetrasiklinlere karşı ise; 0.5 µg/ml' lik tetrasiklin konsantrasyonunda bakterinin % 75 oranında şüpheli dirençli olduğu, 1 µg/ml ile 2 µg/ml' lik antibiyotik düzeylerinde ise % 100 duyarlı olduğu saptanmıştır. Çalışmada söz konusu bakterilere olan etkisi incelenmiş olan diğer bir antibiyotik ampisilindir. Ampisilinin 0.5 µg/ml konsantrasyon düzeyinde bakterinin % 50 oranında şüpheli dirençli olduğu, 1 µg/ml ve 2 µg/ml' lik konsantrasyonlara ise % 100 duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu bakterinin araştırmada denenen antinbiyotiklere çoklu direnç gösterdiği de belirlenmiştir.

b-) Araştırmada *Bifidobacterium bifidum* türlerinin yalnızca 0.5 µg/ml konsantrasyonundaki vankomisine % 75 oranında dirençli, % 25 oranında da şüpheli dirençli olduğu belirlenirken, 1 µg/ml' lik vankomisin konsantrasyonunda % 25' i dirençli bulunmuştur. Denemede kullanılan 2 µg/ml' lik konsantrasyonda ise bakterinin uygulanan antibiyotiğe % 25 oranında şüpheli dirençli olduğu tespit edilmiştir. Ancak *Bifidobacterium bifidum* türünün denemede kullanılan diğer antibiyotik türlerine karşı olan duyarlılığının % 100 olduğu da saptanmıştır. Söz konusu bakterinin farklı antibiyotiklere çoklu direnç gösterdikleri tespit edilmiştir.

c-) Çalışmada *Lactobacillus bulgaricus*' un seçilen antimikrobiyen ajanların tümüne olan duyarlılığı her konsantrasyonda % 100 olarak tespit edilmiştir.

d-) *Lactobacillus acidophilus*' un gentamisin ve tetrasiklin türü antibiyotiklere olan duyarlılıkları % 75 (dirençlilikleri % 25) düzeyinde tespit edilmiştir. Bunun yanında denememizde kullanılan antibiyotiklerden olan vankomisin ile tetrasiklinlere karşı *Lactobacillus acidophilus*' un % 25 düzeyinde şüpheli dirençli olduğu da belirlenmiştir. Adı geçen bakterinin yukarıdaki bilgilerin ışığı altında düşük düzeyde de olsa çoklu direnç gösterdiği saptanmıştır.

e-) *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*' un farklı antibiyotiklere olan dirençlilikleri incelendiği araştırmamızda; söz konusu bakterinin yalnızca

vankomisinin çok düşük (0.5 µg/ml) konsantrasyonuna dirençli olduğu belirlenmiş, ancak diğer antibiyotikler ve dozlara olan duyarlılığın % 100 olduğu görülmüştür. Çalışmamızda elde edilen sonuçların ışığı altında bakterinin tekli direnç gösterdiği belirlenmiştir.

f-) Araştırmada farklı antibiyotik kombinasyonlarının probiyotik bakteriler üzerine olan etkileri de incelenmiştir. Bu amaçla; probiyotik bakterilerin en düşük dozda uygulanan antibiyotik kombinasyonu konsantrasyonlarına dirençsiz oldukları belirlenmiştir. Çalışmamızda yalnızca iki türün (*Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*) sırasıyla gentamisin (0.5 µg/ml) + ampicilin (0.5 µg/ml) ve penisilin (0.5 µg/ml) + vankomisin (0.5 µg/ml) kombinasyonuna olan dirençlerinin biraz daha yüksek olduğu saptanmış, ancak bu direncin düşük dozlarda olduğu görülerek, sonuçlar için önemli olmadığı kanısına varılmıştır.

g-) Denememizde tekli ya da çoklu antibioresistans özelliği belirlenmiş olan bakteriler seçilerek bu bakterilerden yoğurt yapım olanakları incelenmiştir. Ancak çalışmada antibiyotik kombinasyonlarına dirençli olduğu tespit edilen probiyotik bakterilerden yoğurt üretilmemiştir. Bunun en önemli nedeni ise; denememizde yoğurt bakterilerinin seçilen antibiyotiklere tekli ya da çoklu kombinasyonlarında (en az konsantrasyonlarda) dahi son derece duyarlı olmasına bağlanmıştır.

Araştırmamızda; tekli ya da kombinasyonlu antibiyotik uygulamalarına en fazla direnç gösteren probiyotik bakteriler sırasıyla; *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* ile *Bifidobacterium bifidum* olarak tespit edilmiş, diğer türlerin ise dirençliliklerinin ya çok az ya da hiç bulunmadığı belirlenmiştir. Söz konusu türler kullanılarak yapılması planlanan yoğurt üretimi ise gerçekleştirilememiştir. Ancak araştırmamızda yoğurt bakterilerinden özellikle *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* ile *Lactobacillus bulgaricus*' un tüm antibiyotiklere son derece duyarlı oluşu bunun nedeni olarak görülmektedir. Ancak araştırmamızda farklı antibiyotiklere dirençlilikleri belirlenen türler ile antibiyotiklere dirençliliği tespit edilmiş yoğurt bakterilerinin birlikte kullanılması neticesinde yoğurt üretiminin gerçekleşmesi mümkün olabileceği ve söz konusu bu olgunun literatürlerle de doğrulandığı görülmektedir.

Farklı nedenler ile süte geçen antibiyotiklerin varlığında yoğurt üretiminin yapılamayacağı bilinmektedir. İşte bu sebeple son yıllarda özellikle genetik alanında bir bakterinin dirençli geni diğer duyarlı bakterilere (konjugasyon ya da

transformasyon yolu ile) aktarılmakta ve bu sorunun yok edilmesine çalışılmaktadır.

Gerçekten de özellikle son on yılda antibiyotiklere dirençli yoğurt bakteri kültürleri bu teknikler yardımı ile üretilmiş ve teknolojiye kullanılmaya başlanmıştır. Ancak yapılan çalışmalarda söz konusu bu dirençliliğin, ülkeden ülkeye, kullanılan süte, işlem proseslerine, hastalığın türü ile kullanılan antibiyotik türevlerine göre değişebildiği görülmekte, probiyotik bakterilerin gelişme ortamı olan sütün özellikleri ve mevsimsel farklılıkların da bu anlamda önemli olduğu bildirilmektedir. Ayrıca bakterilerin morfolojik özelliklerinde meydana gelen değişimler, antibiyotik-antibiyotik, antibiyotik-ortam (özellikle pH değişimi) ya da antibiyotik-bakteri etkileşimlerinin de bakterilere ait antibioresistans özelliği etkilediği bilinmektedir. Antibioresistans özelliğın belirlenmesinde özellikle antibiyotik-antibiyotik etkileşiminden doğan sinerjistik etkinin son derece önemli olduğu ve bu etkinin kimi zaman bakteriler üzerindeki inhibe etkiyi arttırdığı, kimi zamanda azalttığı görülmektedir. Çalışmamızda kullanılan antibiyotiklerin birbirine olan sinerjistik etkisi antibiyotik kombinasyonlarının hazırlanması ile ortaya konmuştur.

Bu çalışma ile elde edilen bulgularımız ışığında; süt ortamında yukarıda belirtilen antibiyotiklerin bulunması neticesinde, dirençliliği tespit edilen bakteriler kullanılarak bir üretime gidilebileceği, ancak bu üretimde antibiyotiklere dirençliliği belirlenmiş olan yoğurt bakterilerinin de bulunmasının bir zorunluluk olduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışmayı takip edecek diğer çalışmalara da bir görüş niteliği kazandırması bu çalışmanın pratik önemini ortaya koymaktadır.

ÖZET

Bu araştırmada; *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* ile *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* ismi ile tanınan beş adet probiyotik bakterinin, vankomisin, gentamisin, penisilin G, tetrasiklin ve ampisilin adı verilen beş adet antibiyotik türevine olan antibioresistans özellikleri tek tek ya da kombinasyonlu uygulamalar ile, 0.5µg/ml, 1 µg/ml ve 2 µg/ml' lik konsantrasyon düzeylerinde belirlenmiştir. Araştırmada tespit edilen antibioresistans özellikler Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) testi ile belirlenmiş ve bu test ile belirlenen en düşük inaktivasyon dozları çalışmanın esasını oluşturmuştur.

Araştırmada, tek tek antibiyotik uygulamalarına en fazla dirençliliği belirlenmiş probiyotik bakteri kültürlerinin sırasıyla, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum* ile *Lactobacillus acidophilus*, antibioresistans özelliği en az olan türlerin ise, *Lactobacillus bulgaricus* ile *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* olduğu tespit edilmiştir.

Tekli antibioresistans özelliği iyi olan probiyotik suşlarda, çoklu antibioresistans özelliklerde belirlenmiş ve bunun sonucunda özellikle iki türün (*Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*) sırasıyla gentamisin (0.5 µg/ml) + ampisilin (0.5 µg/ml) ve penisilin (0.5 µg/ml) + vankomisin (0.5 µg/ml) kombinasyonuna olan dirençlerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ancak çalışmamızda elde ettiğimiz bu antibioresistans özelliğin önemli olmadığı da vurgulanmıştır.

Tekli ya da çoklu antibioresistans özelliği tespit edilmiş olan probiyotik bakterilerden *Bifidobacterium bifidum* ve *Lactobacillus acidophilus* ile yoğurt üretim olanaklarının araştırıldığı çalışmada, üretilen yoğurtların tat-aroma, koku, dış görünüşlerinin istenen normlarda olmadığına karar verilmiştir. Ayrıca bu yoğurt üretiminde başarılı olabilmek için, en az bir yoğurt bakterisine ihtiyaç olduğu da belirlenmiştir.

SUMMARY

In this study, it is assessed the effects of 5 antibiotic and their derivates as call vancomycinm, gentamicin, penicillin G, tetracylin and ampicillin at the level of 0.5, 1, 2 µg/ml alone and in combination on the antibioresistance charactesisties of five probiotic bacteria as known *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*. The broad spectrum of antibioresistance specialities determined With Minumum Inhibitory Concentrations Test (MIC) and the minimal dose proved by the this test has been taken in to the consideration.

According to the results, probiotic bacteria cultures, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* respectively were resistance against the antibiotic treatments alone .Susceptibility on antibiotic treatments was observed the strains of *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*. The probiotic strains that acquaried maximal antibiotic resistance characteristic alone were examined againts antibiotics in combination. The highest resistance to gentamicin + ampicillin 0.5 µg/ml and penicillin + vankomycin 0.5 µg/ml combination was observed in two strains especially *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*. However the antibioresistance characteistic of strains examined in this study was not found significant.

Bifidobacterium bidfidum and *Lactobacillus acidophilus* determined the antibioresistance characteristics againts antibiotic alone or in combination were examined to the possibility of yoghurt production. It has been shown that the flavour, taste, odour and exterior apperance of yoghurts were not acceptable. Moreover Minimally one strains of yoghurt bacteria was notably acquired for the acceptable yoghurt production.

KAYNAKÇA

1-ACAR, JF., NEU, HC. 1985. Gram-negative aerobic bacterial infections: A focus on directed therapy with special reference to aztreonam. Rev. Infect. Dis., 7(suppl 4): 537.

2-ALANDER M., KORPELA R., SAXELIN, M., VILPPONEN-SALMELA T., MATTILA-SANDHOLM T. and VON WRIGHT A.1997. Recovery of Lactobacillus rhamnosus GG from human colonic biopsies. Lett. Appl. Microbiol .24: 361-364.

3-ANONYMOUS,1996.<http://www.infobiogen.fr/SDV/godelle.html>

Comminiqué/godelle:bacteries et antibiotiques. AltaVista.com.

4-ASO, Y. and AKAZAN, H. 1992. Prophylactic effect of Laciobacillus casei preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. Urol Int. 49:125-129.

5-ASO Y., AKAZA H., KOTAKE T., TSUKAMOTO T., IMAI, K., NAITO, S. and THE BLP STUDY GROUP. 1995. Preventive effect of a Lactobacillus casei preparation on the recurrence of superticial bladder cancer in a double blind trial. Eur. Urol.27: 104-109

6-AUDISIO, MC., OLIVER, G & APELLA, MC., 1997. Protective Effect of Enterococcus faecium J96, a Potential Probiotic Stain, on Chicks Infected with Salmonella Pullorum

7-BARTRAM, H.P., SCHEPPACH, WOLFGANG, GERLACH, STEPHANIE, RUCKDESCHEL, GOTTHARD and all. 1994. Does yogurt enriched with Bifidobacterium longum affect colonic microbiology and fecal metabolites in healthy, 59, No:2, s:428-432.

8-BARZA, M. 1985. First of a new class of beta-lactam antibiotics. Ann.Intern.Med., 103: 552.

9-BENGMARK, S.1998. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. Gut.

Schiafsma G. State of the art concerning probiotic strains in milk products. 4IDk Nutr News: 145 23-4.

10-BERNET, MF, BRASSART, D, NEESER, IR. and SERVİN, A.1994. Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. Gut. 35:483-489.

11-BOUHNİK, Y., FLOURIE, B., ANDIREUX, C., BISETTI, N., BRIET, F. and RAMBAUD, J-C., 1996. Effects of *Bifidobacterium sp* fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. Eur. J. Clin. Nutr., 50: 269-273.

12-BOULLOCHE, J, MOUTERDE, O. and MALLET, E. 1994. Traitement des diarrhées aiguës chez le nourrisson et le jeune enfant - Etude contrôlée de l'activité antidiarrhéique de *L.acidoophilus* (souche LB) contre un placebo et un médicament de référence (lopéramide). Ann Pediatr. 41:1-7.

13-BOUTRON, MC., FAIVRE, J., MARTEAU, P., COUÏLLAULT, C., SENESSE, P. and QUIPOURT, V.1996. Calcium, phosphorus, vitamin D, dairy products and colorectal carcinogenesis: a French case-control study Br. J. Cancer. 74:145-151.

14-BOWDEN, T.A., MANSBERGER, A.R. and LYKINS, L.E., 1981. Pseudomembranous colitis; mechanism for restoring floral homeostasis. Am.Surg.:47:83-178.

15-BRETT,D.S., GILMORE, M.S., 2002. Antibiotics resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. Microbes and Infection 4, 215-224.

16-BUTAYE, P., Van Damme, K., Devriese, L.A., Van Damme, L., Baele, M., Lauwers, S., Haesebrouck, F., 2000. In Vitro susceptibility of enterococcus faecium isolated from food to growth-promoting and therapeutic antibiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 54; 181-187.

17-CANGANELLA, F, PAGANINI, S, OVIDI, M. VETTRAIÑO, AM. BEVILACQUA, L., MASSA, S., ET ALL.1997. Aerobiology investigation on probiotic pharmaceutical products used for human health. *Microbiol. Res.*; 152:171-9.

18-DEVER, LA., DERMODY, TS. 1991. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Arch Intern. Med.*, 151: 95-886.

19-DONOHUE DC, SALMINEN S and MARTEAU, P. 1998. Safety of probiotic bacteria. In: *Lactic acid bacteria-Microbiol and functional aspects*. Salminen S., von Wright A., eds, Marcel Dekker, New York, (2nd ed), 369-384.

20-ELMER GW., SURAWICZ CM. and MCFARLAND LV. 1996. Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *JAMA*. 275: 870-876.

21-FULLER R. 1998. Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.*66: 365-378

22-FRANZ, MAP., HOLZAPFEL, HW., STILES, EM. 1999. Enterococci at the Crossroads of food safety ?. *Int. Journal of Food Microbiology*, 47. p: 1-24.

23-GARDINER, GRP., VALLACE, JM., SCANLAN, PF., JAGERS, PJM., COLLINS, JK., 1999. Influence of a Probiotic adjunct Culture of *Enterococcus faecium* on the Quality of Cheddar Cheese. *J. Agric. Food Chem.*, 4907-4916.

24-GUSTAFERRO, C., STECKELBERG, J. 1991. Cephalosporin antimicrobial agents and related compounds. *May Proc.*, 66 (10), 1064-1073.

25-HOSONO A., KITAZAWA H. and YAMAGUSHI T. 1997. Antimutagenic and antitumor activities of lactic acid bacteria. In: Probiotics 2- Applications and practical aspects. Fuller Ed. Chapman & Hall, Londres, pp:89-131.

26-IGARSHI, M., LIYAMA, Y., KATO, R., TOMITA, M., ASAMI, N. and EZAWA, I. 1994. Effect of Bifidobacterium longum and lactulose on the strength of bone in ovariectomized osteoporosis model rats. Bifidus 7. 139-147.

27-ISEMAN, MD. 1993. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. N. Engl. Med., 329:91-784.

28-ISOLAURI E., JUNTUNEN M., RAUTANEN T., SILLANAUKEE P. and KOIVULA T. 1991. A human Lactobacillus strain (Lactobacillus GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. Pediatrics, 88:90-97.

29-ISOLAURI E., JOENSU J., SUOMALAINEN H., LUOMALA M. and VESIKARI T. 1995. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by Lactobacillus casei GG. Vaccine; 13: 310-312.

30-JOHANNSON ML, MOLIN O., JEPPSSON B., NOBAEK S., AHRNE S. and BENGMARK S. 1993. Administration of different Lactobacillus strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. Appl. Environ. Microbiol. 59:15-20.

31-KAVAS, G., KINIK, Ö., 2000. Probiyotik Etkili Fermente Süt Ürünlerinin İnsan Sağlığındaki Rolü. DÜNYA yayıncılık, GIDA Dergisi, NİSAN sayısı, Sayı: 2000-04, Yıl: 6, Sayfa: 44-50. İSTANBUL.

32-KRUIS W., SCHUTZ E., FRIC P., FIXA B., JUDMAIER G. and STOLTE M. 1997. Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. Aliment Pharmacol. Ther. 11: 853-858.

- 33-LAUER, E., KANDLER, O., 1983. *System. Appl. Microbiol.* 4,p: 42-64.
- 34-LINK-AINSTER H., ROCHAT F., SAUDAN KY., MIGNOT O.and AESCHLIMANN JM. 1994. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* 10;55-64.
- 35-MARTEAU, P., POCHART, P., BOUHNİK, Y. and RAMBAUD, JC.1993. Fate and effects of some transiting microorganisms in the human gastrointestinal tract. *World Rev. Nutr. Diet.* 74:1-21.
- 36-MARTEAU P., VAERMAN JP., DEHENIN JP., BORD S., BRASSART D.and POCHART P., ET ALL.1997. Effect of intrajejunal perfusion and chronic ingestion of *Lactobacillus acidophilus* strain La1 on serum concentrations and jejunal secretions of immunoglobulins and serum proteins in healthy humans. *Gastroenterol Clin. Biol.* 21:293-298.
- 37-MARTEAU P.and CELLIER C.1998. Immunological effects of biotherapeutic agents. In : *Biotherapeutic agent and infectious diseases*. Elmer G, Surawicz C, McFarland I., eds. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey in press.
- 38-MARTEAU, P and VESA T.1998. Pharmacokinetics of probiotics and biotherapeutic agents in humans. *Bioscience Microflora.* 17:1-6.
- 39-McFARLAND LV., SURAWICZ CM., GREENBERG WN., FEKETY R., ELMER GW., MOYER KA. ET ALL.1994. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile*. *JAMA.* 271 1913-1918.
- 40-MICHETTI, P., DORTA, G., BRASSARD, D., VOUILLARNOZ, D., SCHWITZER, W., FALLEY, C. ET ALL. 1995. *L.acidophilus* supernatant as an adjuvant in the therapy of *H.pylori* in humans. *Gastroenterology.* 108:A166.

41-MIDOLO PD., LAMBERT JR., HULL R., LUO F. and GRAYSON ML. 1995. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *Appl. Bacteriol.* 79: 475-479.

42-MITSUOKA, T. 1990. Bifidobacteria and Their role in human health. *Journal of Industrial Microbiology*, 6, 263-268.

43-OYSUN, G. 1996. In *Süt ve Ürünlerinde Analiz Yöntemleri* (Ed. G. Oysun), 306, İzmir.

44-PEDROSA, MARCOS C., GOLNER, BARBARA B., GOLDIN, BARRY R., BARAKAT, SUSAN and all., 1995. Survival of yogurt-containing organisms and *Lactobacillus gasseri* (ADH) and their affect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypochloorthydric eldderly subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61, No:2, s: 353-359.

45-PLEIN K. and HOTZ J. 1993. Therapeutic effects of *Sacctiaromyces boulardii* on mild residual symptoms instable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea-a pilot study. *Z. Gastroenterol.* 31: 129-34.

46-SALMINEN, S. ISOLAURIE. and SALMINEN, F. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: succesful Strains and future challenges. *Antonie van Leevenhoek.* 70: 347-358.

47-SCIFFRIN EJ., ROCHAT F., LINK-AMSTER H., AESEHUMAIM JM. and DONNET-HUGHES A. 1995. Immune-modulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 78: 491-497.

48-SCIFFRIN EJ., ROCHAT F., LINK-AMSTER H., AESEHUMAIM JM. and DONNET-HUGHES A. 1995. Immune-modulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 78: 491-497.

49-SCHWAN, A., SJOLIN, S., TROTTESTAM, U. and ARONSON, B., 1984. Clostridium difficile enterocolitis cured by rectal infusion of normal faeces. Scand J. Infect Dis., 16: 211-215.

50-SEKI, M., IGARASHI, M., FUKUDA, Y., SHIMAMURA, S., KAWASHIMA, T. and OGASA, T. 1978. The effect of Bifidobacterium cultured milk on the "regularity" among on aged group. J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci. 34349-34387.

51-SHIN, H.S., LEE, J., PESTKA, J.J., USTUNOL, Z.2000. *Enterococcus faecium* için Caso Agar (Kandler, O., Schleifer, K. H., Dandl, R., 1968. J. Bacteriol, p:1935-1939).Journal Food Protection **63** (3) 327-331.

52.SMITH, AL. 1992. Antibiotic resistance pediattric pathogens. Infect. Dis. Clin. North.Am., 6: 95-177.

53-SMITH, C.E., FOLENO, B.E., BARRETT, J.F., FROSCO, M.B., 1997. Assessment of the synergistic interaction of Lavofloxacin and Ampicillin againts Enterococcus faecium by the Checkerboard Agar Dilution and Time-kill Methods. Diag. Microbiol Infect. Dis. 27; 85-92.

54-SWARTZ, MN. 1994. Hospital-acquired infections: diseases with increasingly limited therapies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7-2420.

55-TAKIGUCHI, R., MIYAMOTO, O.H.E.M., TOYODA, S., NAKAJIMA, I. and BENNO, Y., 1996. Effects of fermented-milk administration on fecal microflora and putrefactive metabolites of healthy adults and healthy elderly persons. Bifidus-Flores, Fructus et Semina, 9: 135-140.

56-TEN BRINK, B., MINKUS, M., BOL, J. and HUIS IN T'VELD J.H.J. 1987. Production of antibacterial compounds by lactobacilli. FEMS Microbial Rev., 46:64.

57-TOHME,A. 1997. Actualités sur les antibiotiques. Vol.5, No:12, <http://www.bignet.com.lb/medworld/actual-1.htm>.AltaVista.com.

58-YAMAZAKI, S. KAMIMURA, H., MOMOSE, H., KAWASHIMA, T. and UEDA, K. 1982. Protective effect of Bifidobacterium-monoassociation against lethal activity of Escherichia coli. Bifidobacteria Microflora, 1: 55-59.

59-YAMAZAKI, S., TSUYUKI, S., AKASHIBA, H., KAMIMURA, H., KIMURA, M., KAWASHIMA, T. and UEDA, K. 1991. Immune response of Bifidobacterium-monoassociated mice. Bifidobacteria Microflora. 10: 19-31.

60-YASUI H., KIYOSHIMA J. and USHIJIMA H. 1995. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea of mouse pups born to and nursed by dams fed Bifidobacterium breve YIT 4064. J. Hyg. Dis. 172:403-409.

61-WAGENLEHER, F.M.E., MACKENZIE, F.M., FORBES, K.J., GOULD, I.M., 2002. Molecular epidemiology and antibiotics resistance of Enterobacter spp. from three distinct populations in Grampian, UK. International Journal Antimicrobial Agents. 20; 419-425.

62-WEGENER, HC., BAGER, F., ARESTRUP, FM. 1997. Surveillance de la résistance antimicrobienne chez l'homme dans les denrées alimentaires et le bétail au Danemark. Vol: 2, No:3. <http://www.ceses.org/eurosurv/v2n3/en9-121.htm>. Alta Vista.com.

63-WELLS JM., ROBINSON K., CHAMBERLAIN LM., SCHOTFIELD KM. and LE PAGE RWF. 1996. Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles. Antonie van Leeuwenhoek. 70 317-330.

1-*Bifidobacterium longum* zenginleştirilmesi ve antibioresistans özelliğinin belirlenmesi için,
Bifidobacterium Medium kullanılmıştır.

BİFİDOBACTERİUM MEDIUM

Kazein peptone	10.0	g/litre
Et ekstraktı	5.0	g/litre
Maya ekstraktı	5.0	g/litre
Glukoz	10.0	g/litre
K ₂ HPO ₄	3.0	g/litre
Tween 80	1.0	ml/litre
Destile su	1000.0	ml
Agar	15	g/litre

-Sterilizasyon öncesi pH 6.8.

-Sterilizasyon sonrası, % 1' lik sistein-HCL ve sodyum askorbat solüsyonu final konsantrasyonu 0.05%'lik olacak şekilde ilave edilmiştir.

-Zenginleştirme buyyonu besi ortamından agarın çıkartılması ile hazırlanmıştır.

2- *Enterococcus faecium* zenginleştirilmesi ve antibioresistans özelliğinin belirlenmesi için, Caso Agar ve Caso Buyyon kullanılmıştır.

CASO AGAR		
Kazein pepton	15.0	g
Soya Peptonu	5.0	g
NaCl	5.0	g
Agar	15.0	g
Destile su	1000.0	ml

- 121 °C' de 15 dakikalık strelizasyondan sonra pH to 7.3' e ayarlanmıştır

-Zenginleştirme sıvısı; besi ortamından agar çıkartılarak hazırlanmıştır.

3- *Lactobacillus bulgaricus* ve *Lactobacillus acidophilus* zenginleştirilmesi ve antibioresistans özelliğinin belirlenmesi için, MRS buyyon ve MRS Agar kullanılmıştır.

MRS AGAR

Kazein pepton	10.00	g/litre
Et ekstraktı	10.00	g/litre
Maya ekstraktı	5.00	g/litre
Glukoz	20.00	g/litre
Tween 80	1.00	g/litre
K₂HPO₄	2.00	g/litre
Na-asetat	5.00	g/litre
(NH₄)₂ sitrat	2.00	g/litre
MgSO₄ x 7 H₂O	0.20	g/litre
MnSO₄ x H₂O	0.05	g/litre
Destile su	1000.00	ml
Agar	10	g/litre

- 121 °C' de 15 dakika sterilizasyondan sonra pH 6.2 ± 0.2' ye ayarlanmıştır.

-Zenginleştirme sıvısı olan MRS buyyon; aynı ortamdan agar çıkartılarak hazırlanmıştır.

4- *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* zenginleştirilmesi ve antibioresistans özelliğinin belirlenmesi için, M17 Agar ve M17 Buyyon kullanılmıştır.

M17 AGAR

Tripton	5.0 g/litre
Soya pepton	5.0 g/litre
Et Ekstraktı	5.0 g/litre
Maya Ekstraktı	2.5 g/litre
Askorbik asit	0.5 g/litre
Magnezyum sülfat	0.25 g/litre
Di-sodyum-gliserofosfat	19.0 g/litre
Destile su	1000.00 ml
Agar	11.0 g/litre

- 121 °C' de 15 dakika sterilizasyondan sonra pH 6.9±0.2 ' ye ayarlanmıştır.

-Zenginleştirme sıvısı olan M17 Buyyon ise; M17 agarda yer alan agarın çıkartılması ile hazırlanmıştır.

