

**AĞIZ MİKROFLORASINDAKİ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
PROBİYOTİK ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bahar UYAR

DOKTORA TEZİ

**Genel Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ
İkinci Danışman: Prof. Dr. Belma DURUPINAR**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Temmuz 2018**

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 091030 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Bahar UYAR'ın "Ağız Mikroflorasındaki Laktikasit Bakterilerinin Probiyotik Özelliğinin Araştırılması" başlıklı tezi .../.../20.. tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğ"nin ilgili maddeleri uyarınca, genel Biyoloji Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı</u>	<u>Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr.	Merih KIVANÇ	
Üye .. :	Prof. Dr.	Kıymet GÜVEN	
Üye .. :	Prof. Dr.	Zühal KIRZIOĞLU	
Üye :	Prof. Dr.	Berna YAZICI	
Üye :	Doç. Dr.	Buket KUNDUHOĞLU	

Prof. Dr. Ersin YÜCEL

Enstitü Müdürü

ÖZET
AĞIZ MİKROFLORASINDAKİ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN
PROBİYOTİK ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Bahar UYAR

Biyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2018

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

İkinci Danışman: Prof. Dr. Belma DURUPINAR

Diş çürümeleri ve diş eti hastalıkları tüm dünyada insanlarda en sık rastlanan ağız sağlığı hastalıklarıdır. Laktobasillerin ağız mikroflorasındaki patojen bakterilerle tutunma yüzeyi için rekabete girmeleri ve ürettikleri maddelerle onları inhibe etmeleri dolayısıyla ağız probiyotiği olarak kullanılabilme olasılıkları, ağız ve diş sağlığı açısından umut verici bir alternatif oluşturmaktadır.

Ağız ve diş sağlığı üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle bu çalışmada tükürükten elde edilen laktobasillerin probiyotik özelliği değerlendirilmiş ve ağız ve diş sağlığının korunmasına katkı sağlayacak probiyotik laktobasillerin seçimi hedeflenmiştir. Bu amaçla 15-18 yaş arası bireylerden alınan tükürük örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin ağız probiyotiği olarak kullanılabilirliği incelenmiştir. Probiyotik özellikleri belirlemek için yapılan testler sonucu seçilen izolatların, gerçek diş yüzeyinde mutants streptokoklara karşı rekabeti incelenmiştir. İzolatların tamamı *Streptococcus mutans*’a karşı inhibisyon göstermiştir. Ayrıca 13L1B, 14L1, 14L1B, 28LBX izolatlarının varlığı diş yüzeyine *S. mutans*’ın tutunma miktarını azaltmıştır. Bu izolatların *S. mutans* kaynaklı hastalıkları önlemede ağız probiyotiği olarak kullanılabilmeleri açısından sonuçlar umut vericidir. Konuyla ilgili detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Probiyotik, diş çürüğü, *Lactobacillus*, *Streptococcus mutans*

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PROBIOTIC PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA IN ORAL MICROFLORA

Bahar UYAR

Biology Program

Anadolu University, Graduate School of Sciences, July 2018

Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Co-Supervisor: Prof. Dr. Belma DURUPINAR

Tooth decay and gum disease are the most common oral health diseases in humans all over the world. Lactobacillus oral microflora is a promising alternative to mouth and dental hygiene possibilities for recruitment for pathogenic bacteria adhesion surfaces and inhibition of the substances they produce and thus their use as oral probiotics.

Due to the positive effects on oral and dental health, the probiotic properties of lactobacilli obtained from saliva were evaluated in this study and the selection of probiotic lactobacilli to contribute to the protection of oral and dental health was aimed. For this purpose, the availability of lactic acid bacteria isolated from saliva samples from 15-18 year olds as oral probiotics has been investigated. Tests to determine probiotic properties have examined the competition of the selected isolates against *Streptococcus mutans* at the real tooth surface. All of the isolates showed inhibition against *S.mutans*. In addition, In addition, the presence of isolates 13L1B, 14L1, 14L1B, and 28LBX reduced the amount of *S. mutans* attaching to the tooth surface. The results are promising in that these isolates can be used as oral probiotics in the prevention of *S. mutans*-borne diseases. Detailed work on the subject is needed.

Keywords: Probiotic, tooth decay, *Lactobacillus*, *Streptococcus mutans*

TEŞEKKÜR

2011 yılında laboratuvar çalışmalarımın tamamına yakınına yaptığım, zaman zaman ara vererek uzun bir süreçte tamamladığım bu tez çalışmam için;

Çalışmalarımı takip edip, bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren danışmanım Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımı Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü laboratuvarlarında yapabilmemi sağlayan, akademik bilgisiyle ve pozitif yaklaşımıyla destek olan ikinci danışmanım Prof. Dr. Belma DURUPINAR'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımcı ve destek olan, Amasya Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Tuba YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen kendisinden çok şey öğrendiğim OMÜ Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü Doktor Öğretim Üyesi Kemal BİLGİN'e teşekkür ederim.

Tezim boyunca çeşitli konularda yardımcı olan ve güler yüzlerini esirgemeyen Doç. Dr. Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI'ya, Dr. Akif Koray GÜNEY'e ve OMÜ Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü çalışanlarına teşekkür ederim.

Bakterilerin izolasyon ve tanımlanmasında emeği geçen Ondokuzmayıs Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Belgin SIRIKEN'e teşekkür ederim.

Tezimin son aşamasına yetişen eşime, yardımlarından ve sabrından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca beni yetiştiren, her zaman, her koşulda maddi ve manevi yönden beni destekleyen, bana güç ve moral veren anneme ve babama sonsuz teşekkür ederim

Bahar UYAR

03/08/2018

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Bahar UYAR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ ...	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	3
2.1. Oral Mikrobiota.....	3
2.1.1. Oral mikrobiotanın önemi.....	5
2.1.2. Oral mikrobiotayı kontrol eden faktörler.....	6
2.1.3. Tükürük mikrobiotası.....	7
2.1.4. Mukozal mikrobiota.....	7
2.1.5. Diş plağı.....	8
2.1.6. Çürük mikrobiyolojisi.....	9
2.2. Probiyotikler	9
2.2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar.....	10
2.2.2. Probiyotik bakterilerin etki mekanizmaları.....	12
2.2.3. Probiyotik tedavi ve yer değiştirme tedavisi arasındaki farklar	15
2.2.4. Laktik asit bakterileri ve laktobasiller	15
2.2.5. Laktobasillerin probiyotik olarak kullanımı	17
2.2.6. Probiyotik laktobasillerin etki mekanizmaları	18
2.2.6.1. Hücre duvarı ve hücre zarının bütünlüğünün devamı	19
2.2.6.2. DNA ve proteinlerin korunması ve tamiri	20
2.2.7. Laktobasillerin ağız ve diş sağlığına etkileri	21

2.2.7.1. Probiyotikler ve halitozis	29
2.2.8. Probiyotiklerin yan etkileri	30
2.2.9. Prebiyotikler	31
3. MATERYAL VE METOT	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Örneklerin alınması	33
3.1.2. Besi ortamları	33
3.1.2.1. MRS Agar	33
3.1.2.2. MRS agar % 6,0 tuz ilaveli	33
3.1.2.3. MRS agar %7,5 tuz ilaveli	33
3.1.2.4. MRS agar %10 tuz ilaveli.....	33
3.1.2.5. MRS broth	34
3.1.2.6. M 17 agar	34
3.1.2.7. Muller hinton agar	34
3.1.2.8. Brain heart infusion yumuşak agar.....	35
3.1.2.9. Nutrient broth agar	35
3.1.2.10. Nutrient broth yumuşak agar	35
3.1.2.11. Üç sekerli demir agar	36
3.1.2.12. MR-VP broth	36
3.1.2.13. Mitis salivarius agar	37
3.1.2.14. Kanlı agar.....	37
3.1.3. Kullanılan boyalar.....	37
3.1.3.1. Kristal violet	37
3.1.4. Kullanılan çözeltiler.....	38
3.1.4.1. Fizyolojik tuzlu su	38
3.1.4.2. %20'lik gliserol çözeltisi	38
3.1.4.3. Metil kırmızısı çözeltisi.....	38
3.1.4.4. Laktik asit miktar tayini için standart çözelti..	38
3.1.4.5. Laktik asit miktar tayini için A çözeltisi.....	38
3.1.4.6. Laktik asit miktar tayini için B çözeltisi	39
3.1.4.7. Laktik asit miktar tayini için C çözeltisi.....	39
3.1.4.8. Laktik asit miktar tayini için renk ayırıcı.....	39
3.1.4.9. Hidrojen peroksit tespiti için standart çözelti...	39

3.1.4.10. 1N H ₂ SO ₄ çözeltisi	39
3.1.4.11. Amonyum molibdat çözeltisi	39
3.1.4.12. Potasyum iyodür çözeltisi	40
3.1.4.13 Yapay tükürük	40
3.1.4.14. Fosfatla tamponlanmış salin (PBS)	40
3.1.5. Kullanılan antibiyotikler	40
3.1.6. Kullanılan test mikroorganizmaları	41
3.2. Metot... ..	42
3.2.1. Örneklerin izolasyon için hazırlanması	42
3.2.2. İzolasyon	42
3.2.3. İzolatların tanımlanması	42
3.2.3.1. Gram boyama	42
3.2.3.2. Katalaz testi	43
3.2.3.3. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim	43
3.2.3.4. pH; 3,9 da gelişim	43
3.2.3.5. pH; 9,6 da gelişim	44
3.2.3.6. Farklı sıcaklıklarda gelişim	44
3.2.3.7 Hidrojen sülfür oluşumu	44
3.2.3.8. Metil kırmızısı testi	45
3.2.3.9. Arjininden NH ₃ oluşumu	45
3.2.3.10. İzolatların API CHL50 ile tanımlanması	45
3.2.3.11. İzolatların dizi analizi ile tanımlanması	47
3.2.4. Metabolik ürünlerin belirlenmesi	47
3.2.4.1. Laktik asit üretiminin tayini	47
3.2.4.2. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) üretiminin tayini ...	48
3.2.5. İzolatların aside toleransının belirlenmesi	50
3.2.6. İzolatların hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi.....	50
3.2.7. Antibiyotik duyarlılık testi	50
3.2.8. Antimikrobiyal aktivite tayini	51
3.2.8.2. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi.....	51
3.2.8.3. Süpernatantın antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi	52

3.2.9. Laktobasil izolatlarının <i>S. mutans</i> ' a karşı tutunma yüzeyleri için oluşturduğu rekabetin dış yüzeyinde incelenmesi	52
3.2.10. Laktobasil varlığında dış yüzeyine tutunan <i>S. mutans</i> sayısının, laktobasillerin oluşturduğu laktik asit miktarı, hidrojen peroksit miktarı ve pH ile korelasyonunun araştırılması	54
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	55
4.1. Örnek Alınan Bireylere Ait Bilgiler	55
4. 2. İzolasyon Sonuçları.....	57
4.2.1. İzolatlara yapılan tanı testleri sonuçları	57
4.3. İzolatların API CHL50 ile Tanımlanması Sonuçları	60
4.4. İzolatların Dizi Analizi Sonuçları.....	62
4.5. Aside Toleransın Belirlenmesi Deneyinin Sonuçları	63
4.6. İzolatların pH ve Metabolik Ürün Tayini Sonuçları.....	63
4.7. Hemolitik Aktivite Belirlenmesi Sonuçları.....	65
4.8. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları.....	65
4.9. Antimikrobiyal Aktivite Tespiti Sonuçları	67
4.10. Laktobasillerin <i>S. mutants</i> 'a Karşı Tutunma Yüzeyleri İçin Oluşturduğu Rekabetin Dış Yüzeyinde İncelenmesi Deneyi Sonuçları	69
4.11. Laktobasil Varlığında Dış Yüzeyine Tutunan <i>S. mutans</i> Sayısının, Laktobasillerin Oluşturduğu Laktik asit Miktarı, Hidrojen Peroksit Miktarı ve pH ile Korelasyonunun Tesbiti Sonuçları	72
5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	73
KAYNAKÇA	88
ÖZGEÇMİŞ	

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Bazı Ağız Mikroorganizmalarının Ağız İçindeki Dağılımı.....	5
Çizelge 2.2. Probiyotik Olarak kullanılan Bazı Mikroorganizmalar	11
Çizelge 2.3. Probiyotiklerin Genel Etki Mekanizmaları	13
Çizelge 2.4. Probiyotiklerin Kullanıldığı Hastalık Ve Durumlar	14
Çizelge 2.5. Probiyotik Tedavi ve Yerdeğiştirme Tedavisi Arasındaki Farklar	15
Çizelge 2.6. <i>Lactobasillus</i> 'ların Fermentasyon Tipine Göre Gruplandırılması..	16
Çizelge 2.7. Çürüğü Olan Bireylerde Ve Çürüğü Olmayan Bireylerde Tanımlanan Laktobasil Türleri	21
Çizelge 3.1. Antimikrobiyal Aktivite Tayininde Kullanılan Test Mikroorganizmaları	41
Çizelge 3.2. API CHL50 Kullanılan Karbon Kaynakları	46
Çizelge 4.1. Örnek Alınan Bireylere Uygulanan Anket Formu	55
Çizelge 4.2. Bireylerin Beslenme Alışkanlıkları ve Ağız Sağlığını Korumaya Yönelik Tercihleri	56
Çizelge 4.3. İzolatların bazı fizyolojik özellikleri	58
Çizelge 4.4. Farklı Sıcaklıklarda Gelişim, Metil red testi ve Arjininden Amonyak Oluşumu Test Bulguları	59
Çizelge 4.5. İzolatların API CHL50 İle Tanımlanması Testlerinin Sonuçları	61
Çizelge 4.6. Dizi Analizi Sonuçları	62
Çizelge 4.7. İzolatların pH Değeri, Laktik Asit Miktarı, Hidrojen Peroksit Miktarı	64
Çizelge 4.8. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları	66
Çizelge 4.9. İzolatların antimikrobiyal aktivite tespiti sonuçları	68
Çizelge 4.10. Laktobasillerin <i>S. mutants</i> 'a Karşı Tutunma Yüzeyleri İçin Oluşturduğu Rekabetin Dış Yüzeyinde İncelenmesi (I.yöntem)	70
Çizelge 4.11. Laktobasillerin <i>S. mutants</i> 'a Karşı Tutunma Yüzeyleri İçin Oluşturduğu Rekabetin Dış Yüzeyinde İncelenmesi (II.yöntem)	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1. Laktik asit miktarı regresyon doğrusu	48
Şekil 3.2. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarı regresyon doğrusu	49
Şekil 4.1. İzolatların aside tolerans deneyi sonuçları	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

BaCl₂ : Baryum klorür

CO₂ : Karbondioksit

CaCl₂ : Kalsiyum klorür

HCl : Hidroklorik asit

H₂O₂ : Hidrojen peroksit

H₂S : Hidrojen sülfür

KCl : Potasyum klorür

KI : Potasyum iyodür

NaCl : Sodyum klorür

Na₂CO₃ : Sodyum bikarbonat

NaOH : Sodyum hidroksit

Na₄P₂O₇ : Sodyum di fosfat

(NH₄)₆Mo₇O₂₄ :Amonyum molibdat

pH : Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimidir.

ZnSO₄ : Çinko sülfat

β : Beta

γ : Gama

°C : Derece santrigrat

KISALTMALAR

ATP	: Adenozin trifosfat
ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	: Agar brain hard infüsiyon agar
BPARs	: Siyah pigmentli anaerobik çubuklar
d/d	: devir/dakika
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EPS	: Ekzopolisakkarit
FDP	: Fruktöz difosfat
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
DOS	: Diş eti oluk sıvısı
GIT	: Mide barsak kanalı
GRAS	: Genel olarak güvenilir
GrpE	: Nükleotit değiştirme faktörü
IBH	: İrritable barsak hastalığı
kob/CFU	: Koloni oluşturan birim
LAB	: Laktik asit bakterileri
LAM	: Laktik asit miktarı
LGG	: Gorbach ve Goldin tarafından izole edilen <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
LABIP	: Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu
M	: molarite/ molar
mg	: miligram

ml	: mililitre
mm ²	: milimetrekare
<i>msrA</i>	: metionin sulfoksid redüktaz enzimi kodlayan gen
MRS agar	: man ragosa sharp agar
MR-VP Broth	: Methyl-Red Voges-Proskauer Broth
µl	: mikrolitre
N	: Normalite/normal
nm	: nanometre
OD	: Optik yoğunluk
PBS	: Fosfatla tamponlanmış tuz
PG	: Peptidoglikan
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik asit
rpm	: Rölatif santrifüj kuvveti
<i>RT-PCR</i>	: Reverse transcription polimeraz zincir reaksiyonu
SAM	: S-Adenozil metiyonin
sIgA	: Sekretör immunoglobulin A
TCA	: Trikloro asetik asit
TSI	: Üç şekerli demir
<i>UHT</i>	: Ultra Yüksek Isı
vb	: ve benzeri
VSC	: Uçucu kükürt bileşikleri

1.GİRİŞ

Diş çürükleri ve diş eti hastalıkları tüm dünyada insanlarda en sık rastlanan ağız sağlığı hastalıklarıdır. Flor ve diğer koruyucu faktörler bu hastalıklarda azalmayı sağlasa da enfeksiyonu kontrol etme yeteneği sınırlı kalmaktadır. Patojenlerle savaşmada sıklıkla tercih edilen antibiyotik kullanımı ise, patojenlerin antibiyotik direnci geliştirmesine neden olarak antibiyotiklerin başka rahatsızlıklarda kullanımını etkisiz hale getirmektedir. Ayrıca antibiyotikler patojen mikroorganizmalarla birlikte yararlı mikroorganizmaları da yok ettiğinden vücuttaki mikrobiyal dengeyi bozarak yeni hastalıkların gelişimine zemin hazırlamaktadır. Bu sebeplerden dolayı yeni bir yaklaşım olan bakteriyal ekolojinin değiştirilmesine yönelik çalışmalar üzerindeki ilgi artmaya başlamıştır. Bu bağlamda probiyotik kültürlerin kullanılabilirliği ucuz, doğal ve kolay elde edilebilir ajanlar olarak bu yönüme olan talebi artırmıştır.

Probiyotikler, uygun miktarlarda alındığında, konakçı sağlığına faydalı etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanabilmektedir. Probiyotik olarak en yaygın şekilde kullanılan bakteriler laktobasiller ve bifidobakterilerdir. Laktik asit bakterilerinden olan laktobasiller, fermente gıdalarda, fermente olmayan gıdalarda ve insan mikrobiotasında sıklıkla yer alan bakterilerdir. Bu bakterilerin genellikle güvenli olarak tanımlanmaları ve sağlık açısından yararlı etkileri bulunan probiyotik role sahip olmaları, tüketim için tercih edilmelerini sağlamaktadır. Laktobasiller, karbonhidrat fermentasyonu sonucunda organik asitler üretebilmekte ve bu asitler ekolojik pH'ı düşürmekte, böylece aynı ortamda bulunun mikroorganizmalar ile olan etkileşim değişmektedir.

Diş çürüğü; kalsifiye dokuların yıkımı ve lokalize çözünmesiyle sonuçlanan dişlerin mikrobiyolojik enfeksiyöz hastalığıdır. Diş çürükleri; bireysel faktörlerin (genetik yapı, beslenme alışkanlıkları, ağız bakımı, yaş, ırk vb.), ağız mikrobiotasının ve çevresel faktörlerin (pH, oksijen düzeyi gibi) karmaşık etkileşimlerinin bir sonucudur. Ağız ekolojisi bozulursa potansiyel patojenler rekabet üstünlüğü kazanarak hastalık oluşturabilmektedir. Laktobasillerin ağız mikrobiotasındaki patojen bakterilerle tutunma yüzeyi için rekabete girmeleri ve ürettikleri maddelerle onları inhibe etmeleri dolayısıyla ağız probiyotiği olarak kullanılabilme olasılıkları, ağız ve diş sağlığı açısından umut verici bir alternatif oluşturmaktadır.

Diş hastalıklarının tedavisinde probiyotik kültürlerin kullanılabilirliği ile ilgili çalışmalar son on yılda giderek artmıştır. Günümüzde Amerika, Kanada gibi bazı

lkelerde üretilen oral probiyotikleri içeren sakız, pastil, diş macunu, gargara, tablet, kapsül gibi ürünler marketlerde insanların kullanımına sunulmuştur. Ülkemizde de ithal edilen bu ürünleri piyasada bulmak mümkündür. Ancak, konuyla ilgili olarak Türkiye’de üretilen bakanlık onaylı herhangi bir ürün henüz bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, tükürükten izole edilen laktobasillerin probiyotik özelliği değerlendirilerek ağız ve diş sağlığının korunmasına katkı sağlayacak probiyotik laktobasillerin seçimi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Oral Mikrobiota

Vücudun dışı açılan kapısı olan ağız, çok çeşitli mikro çevreler içermesi sebebiyle çok çeşitli mikroorganizmalar içerir. Ağızın yapısına bakıldığında dil, damak, yanak, dudaklar gibi yumuşak ve değişebilen dokular içermesinin yanında dişler gibi sert ve değişmeyen dokuları da içerir. Ayrıca yüzeyleri yıkayan tükürük ve diş eti oluk sıvısı (DOS)'nın varlığı özellikleriyle ağız eşsiz bir yapıdır. Ağızdaki biyolojik yapıların burada yaşayan mikroorganizmalara sunduğu koşullara ağız ekolojisi denir (Aas ve ark., 2005).

Ağız boşluğunda yaklaşık olarak 700 bakteri türü tanımlanmıştır. Bunların 400 kadarı subgingival (diş etinin altında kalan diş eti olukları ya da periodontal cepler) örneklerden tanımlanmıştır. Geri kalan 300'ü dil, ağız mukoza membranları, çürük lezyonları ve endodontik enfeksiyonlar gibi diğer ağız bölgelerinden tanımlanmışlardır. Henüz kültür edilmemiş mikroorganizmaların bazılarının metanojenik arkaeanın olduğu saptanmıştır. Herhangi bir kişinin, bu 700 türün yaklaşık 100-200'üne sahip olduğu düşünülmektedir (Paster ve ark., 2001; Aas ve ark., 2005; Socransky ve Haffajee, 2005). Çok temiz olmayan bir ağızda bir dişteki bakteri sayısı 100 milyon - 1 milyar arasındadır (Moore ve Moore, 2000) .

Ağızdaki endojen mikrobiota kommensal bakterilerden, az sayıdaki mayalardan ve çevre kendilerine uygun olarak değiştiğinde endojen mikrobiyotaya dahil olabilen ek mikrobiota olarak tanımlanan türlerden oluşur. Çizelge 2.1'de bazı mikroorganizmalarının ağız içindeki dağılımı Socransky ve Haffajee (2005)'e göre verilmiştir.

Bakterilerin ağız boşluğunda hayatta kalabilmesi için ağızdaki yüzeylere tutunması gerekmektedir (Jenkinson ve Lamont, 1997; Berkowitz, 2003; Pradeep ve ark., 2014). Dokulara tutunamayan bakteriler ne kadar patojen olursa olsunlar enfeksiyon yapamazlar. Pek çok bakterinin ağızdaki yumuşak ve sert yüzeylere tutunabilmesi yüzey reseptörleriyle, kapsülle veya pilileri vasıtasıyla olur. Bakterilerin çoğu tükürükle beraber hızla yutulur. Diğer bazıları ağız yüzeylerine sadece geçici olarak kolonizasyon gösterirler (Könönen, 2000).

Ağız mikrobiotasının ilk oluşumu, yeni doğanın annenin doğum kanalından çıkışı sırasında vajinal mikrobiyotadaki bakterileri almasıyla başlar. Sezeryan doğumlarda ise

deri mikrobiotası ve cerrahi bulaşla ağız mikrobiotası şekillenir. İlk dişin çıkmasından itibaren ağız içinde oksijenin giremediği bölgeler oluşmaya başlar. Diş eti cebi gibi oksijenin temas edemediği bu kısımlar anaerop bakterilerin yerleşmesi için ortam sağlar. Tükürükteki mikroorganizmaların çoğu anaerobiktir. Oral mikrobiotanın çoğu anne, baba veya kardeşlerden tükürük yoluyla dikey bulaşma yoluyla elde edilir (Berkowitz ve ark., 1981; Könönen, 2000). Ağızdaki mikroorganizmaların sayısı ve çeşitliliği yaşamın ilk birkaç ayında artar. Altı aylıkken dişlerin çıkmaya başlaması, ağız boşluğunda bir dizi yeni tutunma yüzeyi oluşturur. Yaşamın ilk yılında ağızda *Streptococci* ve *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Veillonella* ve *Lactobacillus* cinslerinin üyeleri sıklıkla bulunmaktadır (Kolenbrander ve ark., 2010). Ağızda rastlanan tek mantar, doğal mikrobiotanın üyesi olup olmadığı tartışmalı olan *Candida*'dır. Yaşla birlikte çürük oluşumuna neden olan *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus*'un da sayısı artmaktadır (Söderling ve ark., 2001).

Kommensal türler, çevredeki değişikliklere ve kişinin ağız hijyenine bağlı olarak zararlı ya da yararlı olabilir (Ruby ve Goldner, 2007).

Ağızda bulunan mikroorganizmaların çoğu, biyofilm olarak adlandırılan bir yüzeye yapışık mikroorganizma topluluklarına aittir (Avila ve ark., 2009). Biyofilmler, mikroorganizma tarafından oluşturulan, bir yüzeye yapışmayı sağlayan, mikroorganizmaların içine gömülü olarak yaşadığı jelsi ekstraselüler polimerik matriks olarak tanımlanmaktadır (Leone ve ark., 2006) Biyofilmler tek bir mikroorganizma türünden oluşabileceği gibi birden fazla mikroorganizma türünden de oluşturulabilirler. Yüzeye tutunmayı başaran bakteriler çoğalarak biyofilm tabakasını oluştururlar. Bu bakteriler organize olarak tabaka şeklinde biyofilm oluştururlarsa diş plağı oluşur (Bknz. 2.1.5). Ağızda çevresel değişimler olduğunda bile biyofilm nispeten sabit kalır. Ağız ve diş hastalıklarının büyük çoğunluğu ağız biyofilmlerindeki dengenin bozulmasından kaynaklanır (Kolenbrander ve Palmer, 2004; Foster ve Pan, 2004). Endojen mikrobiotanın faydalı faaliyetlerinden biri de patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlardan korunmayı sağlamaktır. Bu özellik “kolonizasyon direnci” olarak adlandırılır. Eksojen mikroorganizmalar için istenmeyen çevresel şartların oluşturulması, inhibitör maddelerin üretilmesi, tutunma bölgeleri ve besinler için rekabete girme gibi faktörler kolonizasyon direnciyle ilgili mekanizmalardır (Liljemark ve Bloomquist, 1996).

Çizelge 2.1. Bazı ağız mikroorganizmalarının ağız içindeki dağılımı (Socransky ve Haffajee, 2005)
(semboller: ± : nadiren; + : az ; ++ : orta, +++:çok)

Mikroorganizma	Tükürük	Dil	Supragingi val plak	Sbgingival plak
Gram pozitif				
<i>Streptococcus salivarius</i>	+++	+++	± veya +	±
<i>Streptococcus sanguis</i>	++	++	+++	+
<i>Streptococcus mitis</i>	++	++	++	++
<i>Streptococcus mutans</i>	+	+	++ veya +++	± veya +
<i>Lactobacillus sp</i>	+	+	+	± veya +
<i>Actinomyces sp</i>	+	+	++ veya +++	++
<i>Peptostreptococcus sp</i>	± veya +	± veya +	+	+
<i>Treponema sp</i>	±	± veya +	±	± veya +
Gram negatif				
<i>Capnocytophaga sp</i>	+	+	± veya +	± veya +
<i>Neisseria sp</i>	++	++	+	+
<i>Veillonella sp</i>	++	++	+ veya ++	+veya ++
<i>Fusobacterium sp</i>	+	+	+	+veya ++
<i>Provetella melaninogenica</i>	±	± veya ++	± veya +	± veya +
<i>Porpyromonas gingivalis</i>	± veya +	± veya +	± veya +	± veya +
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	± veya +	± veya +	± veya +	± veya +

2.1.1. Oral mikrobiotanın önemi

Ağız mikroorganizmaları bireyin genel sağlığıyla yakından ilişkilidir. Son yıllarda periodontal hastalıklarla ilgili patojenlerin; kardiyovasküler hastalık, inme, prematüre ya da düşük kilo ağırlıklı bebekler, üst solunum yolu infeksiyonları, diyabet ve şişmanlık, romatoid artrit, renal hastalıklar gibi sistemik durumlarla ilişkili olduğunu gösterilmiştir (Marsh ve Martin, 1999).

Ağız mikroorganizmaları ağız hijyen işlemleri, diş tedavi işlemleri, yaralanmalar ya da ağız yumuşak doku enfeksiyonları ile genel dolaşıma girebildikleri gibi gerek ağızda gerek sürekli yutularak ulaştıkları bağırsaklarda lokal immun sistem tarafından yönlendirilerek ve taşınarak da genel sisteme girebilmektedir. Ağız bakterileri kan ya da diğer doku sıvılarına girdiğinde ağız boşluğundaki dinamiklerden farklı bir çevre ile karşılaşmaktadır. Ağız bakterilerinde gen ifadesi; sıcaklık, pH, iyon konsantrasyonu,

çözünen madde konsantrasyonu, oksijen düzeyi ve metabolik substratlar gibi birçok çevresel stresle yeniden düzenlenebilmektedir (Camp ve ark., 2006). Bu düzenlemelerle sistemik dolaşımdaki bir ağız streptokokunun trombositopenitesi, enfektif endokarditte kalp kapaklarında enfeksiyon ve lezyon oluşumunu kolaylaştırmaktadır (Mayo ve ark., 1995). Ağız streptokoklarından *Streptococcus gordonii*'nin *msrA* (metionin sulfoksit redüktaz enzimi kodlayan gen) ifadesi pH 6,2'den 7,3'e yükseldiğinde artar. Metionin sulfoksit redüktaz, bakteriyi oksidatif zarardan koruyarak üremesini artırmaktadır. Enfektif endokarditte *msrA* ifadesindeki artış, çevresel pH'nın asitten alkaliye kaymasıyla uyumludur (Vriesema, 2000; Camp ve ark., 2006).

2.1.2. Oral mikrobiotayı kontrol eden faktörler

Ağız boşluğundaki mikrobiyal ekoloji, fizikokimyasal (sıcaklık, pH, yüzey vb.) faktörlerden, konukçu ile ilgili faktörlerden (genetik yapı, beslenme alışkanlığı, sigara kullanımı, kullanılan ilaçlar, ağız bakımı, vb.) ve bakterilerin birbirleriyle ilişkilerinden etkilenmektedir (Marcotte ve Lavoie, 1998; Socransky ve Haffajee, 2005). Ağızın sürekli olarak tükürükle yıkanması ağız ekolojisini etkilemektedir. Tükürük pH'sı 6,75 - 7,25 arasındadır ve mikroorganizmaların çoğu gelişebilmek için bu pH değerlerini tercih etmektedir. (Marsh, 2003). Diğer taraftan tükürük, mikroorganizmaların besin kaynağı olan artık maddelerin uzaklaşmasına neden olmakta ve mikroorganizmaları bir taraftan diğer tarafa taşıyarak büyük çoğunluğunu oral yüzeylerden uzaklaştırmaktadır. Tükürük; sekretör immunoglobulin A (sIgA), musinler, lizozim, peroksidazlar, laktoferrin gibi bazı savunma faktörleri de içermektedir. Bununla beraber tükürük genellikle dişeti oluşuna ulaşmayı başaramaz. Diş eti oluşu, serumdan türevlenen dişeti oluşu sıvısı (DOS) tarafından kontrol edilir. DOS içeriğinde immunoglobulinler (IgG, IgM, IgA), lökositler, antimikrobiyal maddeler mevcuttur. Dişeti oluşundan ağıza sürekli akan sıvı olan DOS, bakteri gelişimi için uygun besin maddelerini de ihtiva etmektedir ancak herhangi bir yere tutunamayan bakterilerin uzaklaştırılmasına neden olur (Koll ve ark., 2008).

Ağız mikrobiotasının homeostazisini etkileyen faktörlerden biri de sinerjistik ve antagonistik bakteriyal etkileşimlerdir. Sinerjistik etkileşimler arasında koagregasyonun oral yüzeydeki bakterilerin tutunmasını etkilemesi ve fakültatif aerobların oksijen kullanarak (oksijen miktarını azaltarak) anaerob bakterilerin kolonizasyonuna olanak sağlaması ve farklı bakteri türlerinin birbirlerine besin temin etmesi sayılabilir.

Antagonistik etkileşim olarak; reseptörlere tutunma için rekabet etme ve inhibitör madde üretimi sayılabilir. Laktobasillerin ve aktinomisetlerin çeşitli organik asitleri üretmesiyle periodontal patojenlerin inhibisyonu rapor edilmiştir (Sookkhee ve ark., 2001; Doran ve ark., 2004).

Ağız hijyeni, beslenme alışkanlıkları, antimikrobiyal faktörler gibi dış kaynaklı faktörler de mikrobiyal ekoloji açısından önemli etkiye sahiptir. Fırçalama gibi mekanik yollarla plağın ortadan kaldırılmasının diş çürüklerinin ve periodontal hastalıkların önlenmesinde etkili olduğu rapor edilmiştir. Şekerli besinlerin sık tüketilmesinin de diş plağı oluşumunu etkileyerek diş çürüğü riskini artırdığı gösterilmiştir. Farklı enfeksiyonların tedavilerinde kullanılan antibiyotikler ise ağız boşluğuna tükürük ve DOS vasıtasıyla girebilir, bu durum da oral mikrobiotanın dengesinin bozulmasına sebep olur (Marsh ve Martin, 1999).

2.1.3. Tükürük mikrobiotası

Tükürüğün mililitresinde 10^8 koloni oluşturan birim (kob)'den fazla mikroorganizma bulursa da bu sayı kendisine ait olmayıp kaynağını dişlerden, ağız mukozasından ve özellikle dil sırtından almaktadır. *Veillonella parvula*, *Prevotella*, *Melaninogenica* ve *Actinomyces* türleri, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga* ve *Neisseria* tükürükte sıklıkla bulunan mikroorganizmalardandır (Mager, 2003; Socransky ve Haffajee, 2005). Ağız mukozasında bulunan mikroorganizmalar ve dil sırtındaki mikroorganizmalar bölüm 2.1.4' te verilmiştir.

2.1.4. Mukozal mikrobiota

Dudakların iç mukozası, yanaklar, damak, dil, ağızın tabanı ve diş etlerinde baskın olarak birkaç mikroroganizma türü bulunur. Ağırlıklı olarak dudakların iç kısmında, stafilokoklar, mikrokoklar, gram pozitif basiller (örn, *Corynebacterium* ve *Propionobacterium*), streptokoklar ve çok sayıda anaerobik gram negatif türleri bulunur. Streptokoklar dudak, yanak ve damakta *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* ve *Streptococcus constellatus* türleriyle baskınlık göstermektedir (Marsh, 1999; Mager, 2003). Bunların yanı sıra bu bölgeden *Actinomyces*, *Neiseria*, *Haemophylus*, *Capnocytophaga*, *Veillonella*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Prevotella* ve *Candida* grubu da izole edilmiştir. Yanak

ve damak epitelindeki mikroorganizma konsantrasyonu her epitel hücresinde 5-25 bakteri olarak tahmin edilmektedir.

Ağız içinde bakteri yoğunluğu en fazla olan bölge dil sırtıdır. Papillar bölgedeki her epitel hücrede yaklaşık olarak 100 bakteri bulunduğu tahmin edilmektedir. Diğer mukozal yüzeylerde *Streptococcus salivarius* üstünlüğüyle streptokoklar baskındır. Bununla birlikte sağlıklı yetişkin bireylerde dilin lateral ve dorsal yüzeylerinde yüksek oranlarda *V. parvula*, *P. melninogenica*, *Eikenella corrodens*, *Neisseria mucosa*, *Actinomyces odontolyticus*, *Fusobacterium periodonticum*, *Fusobacterium nucleatum* ssp, ve *P. gingivalis* tanımlanmıştır. Dilden izole edilen diğer mikroorganizmalar *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Haemophilus*, *Capnocytophaga*, *Gemella*, *Ruthia*, *Selenomonas*, *Campylobacter*, *Bacteroides* ve *Treponema* türleridir (Taner ve ark., 2002; Mager ve ark., 2003; Kazor ve ark., 2003).

2.1.5. Diş plağı

Diş plağı, diş üzerinde polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler, fosfolipitler ve suyun oluşturduğu matrikste gömülü olan, diş yüzeyinde bulunan mikrobiyal komünite kompleksi için kullanılan genel bir terimdir. Diş plağı tercihen iki diş arasındaki bölgede, kapalı yüzeylerin yarık ve çukurlarında ve subgingival bölge gibi mekanik sürtünmeden korunan yüzeylerde gelişir. Diş plağı, belli oranda bakterinin düzenli kolonizasyonunu gerektiren bir oluşumdur. Diş temizliğini takiben ince bir film tabakası oluşur. Diş yüzeylerini örten bu ince tabaka plak oluşturacak mikroorganizmalar tarafından tanınan reseptörlerin kaynağıdır. Bu reseptörler musinler, aglutininler, proline zengin proteinler, staterin gibi fosfattan zengin proteinler ve alfa amilaz gibi enzimleri içerir. Streptokoklar özellikle *S. mitis* grubu ve *Actinomyces* türleri bu reseptörlere bağlanarak koloni oluşumunu başlatırlar (Kolenbrander ve ark., 2002).

Plakta bulunan mikroorganizmaların çoğu anaerobik mikroorganizmalardır. Bu anaerob bakterilerin arasında *Veillonella*, *Actinomyces*, peptostreptokoklar, bakteroidesler ve fusobakterler sayılabilir. Diğer mikroorganizmalar ise streptokoklar, difteroidler ve laktobasillerdir.

Diş plağı yaşlandıkça ağızda bulunan kalsiyum tuzları plak yüzeyinde çökerek diş taşlarını oluşturur.

2.1.6. Çürük mikrobiyolojisi

Diş çürüğü; kalsifiye dokuların yıkımı ve lokalize çözünmesiyle sonuçlanan dişlerin mikrobiyolojik enfeksiyöz hastalığıdır. Genel mekanizma asitlerin mineyi çözündürmesi şeklindedir. Diş çürüğüne neden olan bakterilere kariyojenik bakteri denir. Kariyojenik bakteriler aynı zamanda dişin enfeksiyonu sonucu hastalığın ilerlemesine de sebep olurlar. Çürük lezyonları, asidik ortam oluşturabilme yeteneği olan çok sayıda bakterinin diş yapısını demineralize etmesiyle oluşur. Çürük ve dişeti hastalıkları gibi iki önemli ağız hastalığından öncelikli olarak sorumlu olan iki bakteri grubu *S. mutans* serotipleri (Serotip a: *S. cricetus*, Serotip b: *S. rattus*, Serotip c: *S. ferus*, ve Serotip d, g, ve h: *S. sobrinus*) ve belli *Lactobacillus* türleridir. Bütün *S. mutans* serotipleri çürüğün önemli potansiyel sebebi olarak gösterilir. *S. mutans* ve *Lactobacillus* büyük miktarda asit üretebilirler (asidojenik), asidik çevreyi tolere edebilirler (asidürik), sükroz tarafından güçlü bir şekilde uyarılırlar ve insanda çürükle ilişkili olan başlıca organizmalar gibi görülürler (Roberson ve ark., 2010).

S. mutans, insanlarda pandemik bir enfeksiyon olarak mevcuttur; yani ırk, etnik köken veya coğrafik durum göz önüne alınmaksızın herkeste bulunur. Normalde, *S. mutans* ağız mikrobiotasının önemsiz, küçük bir bileşeni olarak ağızda bulunur. Çok sayıda aktif çürük lezyonu olan hastalarda ise, plak mikrobiotasının baskın bir üyesi haline gelmiştir. *S. mutans* sıklıkla çürüğün başlamasıyla ilişkilendirilir. *Lactobacillus* lar ise önceden oluşmuş bir çürüğün ilerlemesiyle ilişkilendirilir (Roberson ve ark., 2010).

2.2. Probiyotikler

Probiyotikler, Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, uygun miktarlarda alındığında, konakçı sağlığına faydalı etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanabilmektedir. (Gültekin, 2004). Probiyotik terimi, “pro” ve “biota” kelimelerinden türetilmiş olup “yaşamsal, canlı için” anlamını taşımaktadır. Antibiyotik teriminin anlamca karşıtı olup, patojen bakterilerin kontrolü için patojen olmayanların kullanılması anlamına gelmektedir. Probiyotiklere “biyoteropatik ajanlar” da denilmektedir (Reid ve ark., 2003; Hill ve Guarner, 2004; Parvez ve ark., 2006).

Probiyotik kavramını ilk defa öne süren 1908’de Nobel ödülü almış olan Elie Metchnikoff, insan vücudunda bulunan zararsız canlı bakterilerin konakçı için yararlı etkilerinin olabileceğine dikkat çekmiştir (Dugas, 1999). Metchnikoff, barsak

bakterilerinin protein hidrolizi sonucu oluşturduğu amonyak, aminler ve indol gibi maddelerin konakta otointoksikasyona neden olduğunu ve enerjisini protein hidrolizi yerine karbonhidrat fermantasyonundan sağlayan laktik asit bakterilerinin kullanımının faydalı sonuçlar verdiğini bildirmiştir. Ancak, bilimsel olarak bu organizmaların tanımlanması yirminci yüzyılın başlarında mümkün olmuştur. Probiyotik kavramı ilk defa 1965 yılında Lilly ve Stillwell tarafından “Bir mikroorganizma tarafından salgılanıp başka bir mikroorganizmanın büyümesini destekleyen bileşiklerin” tanımlanmasında kullanılmıştır. 1971 yılında Sperti, bu terimi mikrobiyal üremeyi destekleyen doku özütleri için kullanmıştır. Fuller tarafından 1989 yılında "konakçı hayvanın bağırsak dengesini düzelteren canlı mikroorganizma içeren yem" olarak tanımlanan probiyotik terimi, 1992 yılında Havenaar ve Huis in't Veld tarafından "insan ve hayvanda yararlı mikrobiotanın yararını artıran tek veya karışık canlı mikroorganizma kültürü" olarak genişletilmiştir. Son olarak 1998 yılında Guarner ve Schaafsman tarafından "sağlıklı yaşamayı temin etmenin ötesinde belirgin bir sağlık kazancı sağlayan belirli sayıdaki canlı mikroorganizma" olarak tanımlanmıştır (Klaenhammer, 2000).

Probiyotiklerin insan sağlığına yararlı etkileri arasında; patojen mikroorganizmaları ve toksinleri nötralize etmek, barsak geçirgenliğini azaltmak ve barsak duvarını zararlı maddelerden korumak, oksidatif hasarları baskılamak, proteazlar, lipazlar, amilazlar, disakkaridazlar gibi enzimlerin sentezini artırmak, bazı vitaminleri (K2, B1, B2, B3, B6, B12, folik asit, biyotin ve pantotenik asit) sentezlemek, nörotransmitterlerin (asetilkolin, serotonin, dopamin, dopamin vb) sentezini yapmak sayılabilir (Berg, 1996).

Bir mikroorganizmanın probiyotik olabilmesi için sağlığa yararlı olduğu ve güvenli olduğu bilimsel olarak tespit edilmelidir. Günümüze kadar çok sayıda mikroorganizma probiyotik olarak tanımlanmıştır. Bunlardan en sık kullanılanlar ise bifidobakteriler ve laktobasillerdir.

2.2.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Probiyotikler esas olarak laktik asit bakterileridir. Yoğurt yapımında kullanılan mikroorganizmalar (*Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*) dışında tüm laktik asit bakterileri bağırsak mikrobiotası elemanlarıdır (Parvez ve ark., 2006). Bir probiyotik ürün, bu mikroorganizmalardan birini ya da birkaçını içerebilmektedir.

İçerdiği mikroorganizma sayısı arttıkça probiyotiğin kullanım alanı da genişlemektedir. Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar (Salminen, 1998)

<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus cellebiosus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Bifidobacterium</i> türleri	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium thermophilum</i>
<i>Bacillus</i> türleri	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus lentus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus coagulans</i>
<i>Pediococcus</i> türleri	<i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i> türleri	<i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Streptococcus intermedius</i> , <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>Bacteriodes</i> türleri	<i>Bacteriodes capillus</i> , <i>Bacteriodes suis</i> <i>Bacteriodes ruminicola</i> , <i>Bacteriodes amylophilus</i>
<i>Propionibacterium</i> türleri	<i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Leuconostoc</i> türleri	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Küfler	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Mayalar	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida torulopsis</i>

Probiyotik bir mikroorganizmanın tanımı için zorunlu kriterler LABIP (Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu) tarafından belirlenmiştir (Guarner ve Schaafsma, 1998; Gibson ve Fuller, 2000; Ewaschuk ve Dieleman, 2006).

Buna göre probiyotik potansiyeli taşıyan mikroorganizmalar:

- İnsan orjinli olmalıdır,

- Patojen özellik içermemelidir,
- Gastrik asit ve safra tuzuna direnç göstermelidir,
- Bağırsak epitel dokularına tutunmalıdır,
- Gastrointestinal sistemde kısa süreler için de olsa sürekliliğini devam ettirebilmelidir,
- Antimikrobiyel bileşikler üretebilmelidir,
- İmmün cevabı stimüle edebilmelidir,
- Metabolik etki kabiliyeti olmalıdır (kolesterol asimilasyonu, laktaz aktivitesi, vitamin üretimi),
- Patojen mikroorganizmalara antibakteriyel direnç özelliğini aktarmamalıdır,
- Teknolojik süreçlere direnç göstermelidir.

Probiyotik olarak sıklıkla kullanılan bifidobakteriler ve laktobasiller insan mikrobiotasının birer üyesi olarak düşünülmektedir. Ağız boşluğunda yer alan ilk anaerob bakterinin bifidobakteriler grubu olduğu gösterilmiştir (Rotimi ve Duerden, 1981).

Probiyotik özelliklere sahip bakterilerin tanımlanması ve kullanıma sunulmasıyla ilgili çalışmalar artarak devam etmektedir.

2.2.2. Probiyotik bakterilerin etki mekanizmaları

Probiyotiklerin etki mekanizması; mikrobiyal ekoloji üzerindeki etkileri, bağışıklık üzerine etkileri ve barsak epiteli üzerine etkileri kapsamaktadır. Probiyotikler kişiye özgü etkiler göstermektedir. Ayrıca gösterilen etkiler bakteri türünün suşuna özgüdür. Probiyotiklerin aside ve safraya dirençleri, mide-barsak kanalına kolonize olmaları ve klinik etkileri de farklılıklar göstermektedir. Ayrıca *in vivo* ve *in vitro* etkileri de her zaman aynı olmamaktadır. Probiyotiklerin genel etki mekanizmaları Çizelge 2.3' de verilmiştir.

Omurgalı hayvanların barsak içeriğinde yüzlerce tür bakteri ortaklaşa veya yarış içerisinde yaşamaktadır. Sindirim sistemi mikrobiotası bireyin sağlığında çok önemli bir role sahiptir. Çeşitli faktörlerle barsak mikrobiotası bozulmaktadır. Barsaktaki mikroorganizmalar temel besin öğelerini kullanırken oluşturdukları yan ürünlerle barsaktaki dinamikleri etkilemektedir. Ayrıca fermentasyon sonucunda oluşan bir takım zararlı ürünler bazı akut ve kronik barsak rahatsızlıklarına zemin hazırlamaktadır. Bazen

de barsağa ulaşan patojen bakteriler barsak mikrobiotasındaki dengeyi bozmaktadır. Sürekli bozulmaya yatkın olan dengenin tekrar kurulması için probiyotiklerden yararlanılmaktadır (Gibson ve Fuller, 2000).

Çizelge 2.3. Probiyotiklerin genel etki mekanizmaları

Mekanizma	Etki	Sonuç
Tutunma bölgeleri için rekabet eder.	Tutunmayı inhibe eder. Patojenlerin gelişimini inhibe eder.	Patojenlere karşı antagonizma oluşarak doku yıkımını ve inflamasyonu azaltır.
Besin/ büyüme faktörleri için rekabet eder, antimikrobiyal bileşikler üretir.	Patojenlerin gelişimini inhibe eder.	
İmmün sistemi güçlendirir.	Patojenlerin gelişimini inhibe eder. Lokal ve sistemik immün cevapta etkilidir.	

Doğumda steril olan gastrointestinal kanalın mikroorganizmalarca kolonizasyonu doğumdan hemen sonra (anneden vajinal ve intestinal yolla) başlamaktadır. Diyet ve çevre ise kolonizasyon için gerekli olan diğer faktörleri oluşturmaktadır (Ewaschuk ve Dieleman, 2006). Gastrointestinal kanalın mikrobiotası ile konak arasında karşılıklı etkileşimler bulunmaktadır. Barsak bariyerini güçlendirmede ve epitelyum değişiminde bakterilerin rolü önemli olmaktadır. Ayrıca konakçı için patojenlerin baskılanması, vitamin sentezi, emilemeyen gıdalardan enerji sağlanması, mukozal bağışıklık sisteminin desteklemesi gibi yararlı etkileri bulunmaktadır (Madsen ve ark., 2001). Probiyotiklerin kimyasal karsinojenlere karşı hassasiyeti azalttığı da rapor edilmiştir. Probiyotiklerin bu alandaki yararlı etkileri arasında; karsinojenleri detoksifiye etmek, karsinojenik bileşikleri oluşturan bakterilerin sayısını ve metabolik aktivitesini azaltmak, tümör hücrelerinin gelişmesini inhibe edecek bileşikler üretmek ve kanser hücrelerinin çoğalmasına karşı immün sistemi uyarmak gibi faktörler sayılabilir (Parvez ve ark., 2006; Rafter ve ark., 2007).

Probiyotikler bugün için birçok hastalıkta veya patolojik durumda kullanılmaktadır ve her geçen gün kullanım alanlarına bir yenisi eklenmektedir. Probiyotiklerin kullanıldığı hastalık ve durumlar Çizelge 2.4’de (Reid ve ark.,1988; Schiffrin ve ark., 1995; Dugas ve ark., 1999; Isolauri, 2001; Szajewska ve ark., 2001; Gill ve ark., 2003; Young ve ark., 2003; Sanders, 2003; Isolauri, 2003; Isolauri, 2004; Mego, 2005; Aihara ve ark., 2005; Henker ve ark., 2001; Kang ve ark., 2006; Commane

ve ark., 2005; El-Nezami ve Polychronaki, 2006; Falagas ve ark., 2006; Logan ve Katzman, 2005; Benton ve ark., 2007; Rao ve ark., 2009; Messaoudi ve ark., 2011; Ishimwe ve ark., 2015;’a göre düzenlenmiştir) verilmiştir.

Çizelge 2.4. *Probiyotiklerin kullanıldığı hastalık ve durumlar*

Hastalık/durum	Probiyotığın Gösterdiği Etki
Beslenme	Daha iyi sindirebilme, bazı vitamin ve minerallerin emilimini artırma
Kabızlık	Bağırsak motilitesini düzenleme
Enfeksiyonlar; Rotavirüs ishali, Seyahat ilişkili ishal, Antibiyotikle ilişkili ishal, <i>C. difficile</i> ilişkili ishal, <i>H. pylori</i> , Hastane enfeksiyonları	Önleme ve tedavi etme
Diş çürüklerini önleme	Patojenlere karşı antagonistik etki Tutunma yüzeyleri için rekabet
Laktoz intoleransının önlenmesi	Laktoz Hidrolizi
Serum kolesterol düzeyinin düşürülmesi	Kolesterolü metabolize etmek
Karaciğerin ve böbreğin katabolik yükünü azaltma	
Kanser oluşumunun azaltılması Kolorektal kanser gelişiminin önlenmesi	Antikarsinojenik aktivite göstermek
İnflamatuvar barsak hastalıklarının tedavisi ve atakların önlenmesi	İmmün reaksiyon Patojenlere karşı antagonistik etki
Alerjik hastalıkların engellenmesi	Tedaviyi destekleyici
İmmün sistemi güçlendirme	Bağıışıklık sisteminin uyarılması Antimikrobiyal aktivite
Üriner kanal sağlığı	Üropatojenlerle koagregasyon Kadınlarda ürogenital enfeksiyonları önlemek
Kardiyovasküler sistem	Yüksek kan basıncını düşürmek
Spastik kolon	Florayı düzenleyip gaz oluşumunu azaltmak.
Ağız ve diş sağlığı, Ağız kokusu (halitosis)	Antimikrobiyal madde üreterek, tutunma yüzeyi için rekabet ederek, kükürtlü bileşiklerin oluşumunu engelleyerek
Depresyon, duygu durum bozuklukları	Bazı nörotransmitterler üreterek ve barsak mukozasını patojenlerden koruyarak
Kolesterol giderimi	Safra tuzlarını hidroliz ederek

Probiyotik etki suşa özgüdür yani bir türe ait probiyotik etki o türün bütün bireylerinde bulunmamaktadır.

2.2.3. Probiyotik tedavi ve yer değiştirme tedavisi arasındaki farklar

Probiyotik tedavi ve yer değiştirme tedavisi (diğer adıyla bakteriyoterapi), bazen birbirinin yerine kullanılmaktadır. Her ne kadar her ikisinde de tedavi için canlı bakteriler kullanılsa da aralarında küçük farklılıklar bulunmaktadır. Yer değiştirme terapisinde etkili strain enfeksiyon bölgesine doğrudan uygulanmaktadır. Periyodontal yer değiştirme tedavisi anlayışı, periyodontal cepleri temizledikten sonra bu bölgeyi patojenlerin yeniden kolonize etmesini önlemek için subgingival olarak faydalı ağız bakterilerini buraya yerleştirmekten oluşmaktadır (Agarwal ve ark, 2011). Çizelge 2.5'te iki yöntem arasındaki farklar gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. *Probiyotik tedavi ve yerdeğiştirme tedavisi arasındaki farklar*

Probiyotik tedavi	Yerdeğiştirme tedavisi
Yiyeceklerin içerisinde verilerek uygulanır	Etkili suş yutulmaz ve uygulanır
Endojen mikroflorada nadiren etkili ve uzun süreli değişim	Endojen mikroflorada etkili ve uzun süreli değişim
Bölgede sürekli kolonize olmadan faydalı etki gösterir	Etkili suşla bölgenin sürekli kolonizasyonu temeldir.
Bağıışıklık sistemini etkileyerek faydalı etki gösterir	Çok az immünolojik etkiye sahiptir.

2.2.4. Laktik asit bakterileri ve laktobasiller

Laktik asit bakterileri, gram pozitif, spor oluşturmayan, katalaz negatif basil ve koklardan oluşan, Firmicutes filumuna ait çeşitli bakteri cinslerinden oluşmaktadır. Grubun önemli cinsleri arasında *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella* yer almaktadır. Laktik asit bakterileri aerotolerant anaerob organizmalardır. Fermantasyon sonucu ana ürün olarak organik asit üreten bu bakteriler sitokrom içermezler ve elektron taşıma sistemi bulundurmazlar. Enerji ihtiyaçlarını substrat düzeyinde fosforilasyon ile karşılarlar.

Laktobasiller taksonomik olarak, *Firmicutes* filumu, *Bacilli* sınıfı, *Lactobacillales* ordosu, *Lactobacillaceae* familyasına aittir. Gelişmek için zengin besi ortamına ihtiyaç duyan besinsel olarak titiz bakterilerdir. Besin fermentasyonundaki önemli rollerinin yanında canlının türüne, yaşına, bağırsakta yerleştiği yere bağlı olarak değişen oranlarda insan ve hayvanların mide barsak kanalında (GIT) bulunmaktadır.

Laktobasillerin en önemli özellikleri laktozun fermentasyonu sonucunda laktik asit üretmeleridir. *Lactobacillus* cinsinin fermentasyon tipine göre gruplandırılması zorunlu homofermentatif (grup I), fakültatif homofermentatif (grup II), zorunlu heterofermentatif (grup III) şeklindedirler (Marsh, 1999; Salminen ve ark, 2004). Bakterilerin özellikleri Çizelge 2.6' da verilmiştir.

DNA baz kompozisyonu (molar G+C yüzdesi) laktobasillerde minimum %35 (*L. salivarius*) ve maksimum %53 (*L. fermentum*) arasında değişmektedir. Bir gruplandırmaya göre laktobasiller molar G+C yüzdesi açısından, molar G+C yüzdesi %32,4-38,3 arasında değişen türler (*L. jugurti*, *L. helveticus*, *L. salivarius*, *L. bulgaricus*), molar G+C yüzdesi %42,7-48 arasında değişen türler (*L. buchneri*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. viridescens*, *L. plantarum*) ve molar G+C yüzdesi %49-51,9 arasında değişen türler (*L. lactis*, *L. leichmanii*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus*) şeklinde üç gruba ayrılmaktadır (Salminen ve ark., 2004) .

Çizelge 2.6. *Lactobacillus* cinsinin fermentasyon tipine göre gruplandırılması

(a: fermente olduğunda b: pentozla uyarıldığında) (Marsh, 1999; Salminen ve ark., 2004)

Özellik	Grup I zorunlu homofermentatif	Grup II fakültatif homofermentatif	Grup III zorunlu heterofermentatif
Pentoz fermentasyonu	-	+	-
glukozdan CO ₂ oluşturma	-	-	+
glukonattan CO ₂ oluşturma	-	+ ^a	+ ^a
FDP aldolaz varlığı	+	+	-
Fosfoketolaz varlığı	- <i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. salivarius</i>	+ ^b <i>L. sakei</i> <i>L. casei</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. plantarum</i>	+ <i>L. reuteri</i> <i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. fermentum</i>

Birinci grupta yer alan türlerin hepsi homofermantatiftir. 2. ve 3. grupta ise hem homofermantatif hem de heterofermantatif türler yer almaktadır. G+C yüzdesi açısından aynı gruba giren türler DNA hibridizasyonu ve immünolojik yöntemlerle birbirinden ayrılarak tanımlanabilmektedir.

2.2.5. Laktobasillerin probiyotik olarak kullanımı

Belirli şartlar altında uygulandığında laktobasillerin sağlığa faydalı olduğu gösterilmiştir. Barsak enfeksiyonların ve antibiyotik kullanımı sonrasında mikrobiotanın bozulmasıyla meydana gelen sıkıntıların önlenmesinde ve tedavisinde, akut enfeksiyöz ishali ve antibiyotik ilişkili ishali önlemede laktobasillerin etkinliği gösterilmiştir (Sazawal ve ark., 2006). Belirli bazı laktobasiller *Clostridium difficile* ilişkili ishali ve nüks etmesini azaltabilmektedir (Pillai ve Nelson, 2008) ve yeni doğanlarda nekrotizan enterokoliti önleyebilmektedir (Deshpande ve ark., 2007). İnflamatuvar barsak hastalığı (IBH)'nın önlenmesi ve tedavisinde (Hedin ve ark., 2007), kolorektal kanserin önlenmesinde (Camileri, 2006), irritabl barsak sendromu tedavisinde (Rafter ve ark., 2007) bazı umut verici sonuçlar da elde edilmiştir. GIT haricinde vücudun diğer bölümlerinde de kadınlarda bakteriyel vaginosis ve ürogenital hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde, (Falagas ve ark., 2007) atopik hastalıkların ve gıdalara aşırı duyarlılığın önlenmesinde (Boyle ve Tank., 2006) ve diş çürüklerinin önlenmesinde (Meurman ve Stamatova, 2007) bazı *Lactobacillus* suşları ile probiyotik uygulamalar fayda sağlamıştır. Probiyotik laktobasiller yüksek güvenlik profiline sahiptirler ve mükemmel şekilde tolere edilirler. Ancak, nadir durumlarda, immün rahatsızlığı olan hastalarda probiyotik laktobasillerin enfeksiyonlara yol açtığı raporlar da yayınlanmıştır (Besselink ve ark., 2008; Liong, 2008).

Probiyotiklerin sağlığa olumlu yöndeki bu etkilerin niteliği uygulanan suşa, uygulama şekline, uygulanan bireye ve uygulama şartlarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Konuyla ilgili pozitif verilerle sonuçlanan çok sayıda bilimsel çalışma mevcuttur. Diğer taraftan laktobasillerin faydalı etkilerini rapor eden çalışmalarda kontrol grubu, yan etkiler, doğrulanmış verilerin eksik olduğu da bilinmelidir (Marco ve ark., 2006).

Laktobasillerin ağız mikrobiotasındaki patojen bakterilerle tutunma yüzeyi için rekabete girmeleri ve ürettikleri maddelerle onları inhibe etmeleri dolayısıyla ağız

probiyotiği olarak kullanılabilme olasılıkları, ağız ve diş sağlığı açısından umut verici bir alternatif oluşturmaktadır.

2.2.6. Probiyotik laktobasillerin etki mekanizmaları

Probiyotik laktobasiller patojenlerin inhibisyonunu ve mikrobiyal etkileşimlerde dengeyi sağlamaktadır, epitel bariyer fonksiyonu geliştirmektedir ve bağışıklık tepkilerini düzenlemektedir. Laktobasiller besin bozulmalarını önlemede yüzlerce yıldır kullanıldığından dolayı patojen inhibe etmedeki yetkinlikleri iyi bilinmektedir. Zamanla laktobasillerin bağışıklık uyarıcı ve bağışıklık düzenleyici özellikleri incelenmiştir. Mide-barsak kanalına içecek, yiyecek, ya da hapla uygulanan probiyotikler patojenler ve toksinlere karşı barsak duvarı epitelinin bariyer fonksiyonunu güçlendirdiğinden giderek önem kazanmaktadır (Fedorak ve Madsen, 2004; Marco ve ark., 2006; Boirivant ve Strober, 2007).

Probiyotik laktobasiller mide-barsak kanalından geçerken çeşitli sert çevre koşullarıyla karşılaşmaktadır. İlk olarak konukçunun asidik mide koşullarında hayatta kalmaları gerekmektedir. Sağlıklı bir insan, her gün yaklaşık 2,5 litre mide özsuyu salgılamaktadır. Açlıkta mide özsuyunun pH'sı 1,5 iken, besin alımıyla beraber pH 3-5 aralığında olmaktadır. Düşük pH proton motive gücü bozmakta, asit duyarlı enzimlerin aktivitesini azaltmakta, DNA ve proteinlere zarar vermektedir (van de Guchte ve ark., 2002).

Probiyotikler için bir diğer sert çevre koşulu safra ortamıdır. Çünkü safra asitlerinin biyolojik membranı parçalayıcı özellikleri bulunmaktadır. Karaciğerden ince barsağa her gün yaklaşık 1 lt safra salgılanmaktadır. Safra asitleri kolesterolden sentezlenir veya glisin ya da taurin ile konjugedir. Safra tuzları laktobasillerin ürettiği laktik asit gibi organik asitlere benzer davranış göstererek toksik etki oluşturmaktadır (Begley ve ark., 2005). Bu asitler, hücre zarından difüzyonla geçtikten sonra sitoplazmada proton forma geçerler, çözünmez hale gelerek hücre zarından geçememektedir.

GIT'de laktobasiller asit ve safra ile başa çıkmanın yanı sıra oksidatif ve osmotik strese de maruz kalmaktadır. Ayrıca, diğer mikroplar ve bağışıklık sistemi hücreleri de probiyotik mikroplar için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Tüm bu stres faktörlerine karşı probiyotik laktobasillerde çapraz adaptasyon olgusu (bir stres durumuna adaptasyonun başka bir stres faktörüne karşı da koruması) görülmesi ilginç olarak

değerlendirilmiştir. Bu durum stresle başa çıkmada laktobasillerde bazı ortak mekanizmaları işaret etmektedir (van de Guchte ve ark., 2002; De Angelis ve Gobbetti, 2004; Begley ve ark., 2005).

Probiyotik laktobasillerin optimum fonksiyon göstermesini sağlayan faktörler; probiyotik faktörler ve adaptasyon faktörleri olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Probiyotik faktörler mikrobiyal dengeyi korumak, epitel hücreleri korumak ve bağışıklığın düzenlenmesi olmak üzere üç temel mekanizmadan oluşmaktadır. Adaptasyon faktörleri ise stres direnci, konukçunun çevresine uyum sağlayan aktif metabolizma ve bağırsak mukozasına ve mukusa tutunma özelliklerini kapsamaktadır. Adaptasyon faktörlerinin probiyotik faktörlere yardımcı olduğu ifade edilmektedir (Lebeer ve ark., 2008).

Yapılan çalışmalara bakılıp laktobasillerin işlevlerin karmaşıklığı göz önüne alındığında, konakçıda farklı suşların farklı tepkilere yol açtığı anlaşılmaktadır. Bu nedenle, sonuçlar belirli bir *Lactobacillus* suşu ile genellenememektedir.

2.2.6.1. Hücre duvarı ve hücre zarının bütünlüğünün devamı

Laktobasillerin hücre duvarı ve hücre zarını oluşturan makromoleküller çeşitli stres şartlarında hücre bütünlüğünün devamına yardım etmektedir. Örneğin düşük pH *L. casei*' nin oral bir straininin hücre zarının yağ asidi bileşeninde bir değişime yol açmaktadır (Fozo, 2004). Benzer şekilde safra tuzlarının *L. reuteri* CRL1098 nin lipid hücre zarında değişimleri başlattığı gösterilmiştir (Taranto, 2003).

Laktobasillerin asit cevabı ile ilgili çeşitli senaryolar tanımlanmıştır. Asidik şartlar altında *L. reuteri* ATCC 55730' de penisilin bağlı proteinler grubuna ait olan, bir esteraz geni olduğu varsayılan Ir1516' nın uyarıldığı gösterilmiştir (Wall ve ark., 2007). Bu gen tahrip edildiğinde asit şokuna hassasiyette ciddi artışlar gözlenmiştir. Safra maruz kalındığında da aynı genin uyarıldığı gözlenmiştir. Safra varlığında canlı kalabilmek için bu genin varlığının önemi mutant analizle doğrulanmıştır (Whitehead ve ark., 2008). Buna ek olarak Pfeiler ve arkadaşları (2007), tarafından mikroarray analizi kullanarak *L. acidophilus* NCFM de safraya maruz kalındıktan sonra hücre zarı, PG ve yüzey proteini biyosentezi ile ilgili çok sayıda genin ifade edildiği gösterilmiştir.

Düşük pH'da ve safra varlığında hücre bütünlüğü için D-alanil teikoik asitin de gerekli olduğu ifade edilmiştir (Neuhaus ve Baddiley, 2003).

2.2.6.2. DNA ve proteinlerin korunması ve tamiri

DNA ve proteinler gibi makromoleküllerin korunmasında bir dizi protein rol oynar. Hücre içinde asitliğin artması, DNA'dan pürin ve pirimidinlerin kaybolmasına yol açabilir. Cappa ve arkadaşları (2005), Northern analizi ve reverse transkripsiyon (RT)-PCR kullanarak *L. helveticus* CNBL 1156 de düşük pH'da nükleotit kesip çıkarma tamiri ile ilgili bir enzim olan nükleaz ATP-bağlama kaset (ABC) kompleksinin A altbirimini kodlayan *uvrA*'nın ifade edilme düzeyinin arttığını gözlemişlerdir. Safra asitlerinin de DNA hasarını uyardığı ve DNA tamir enzimlerini aktive ettiği gözlenmiştir (Begley ve ark., 2005). *L. reuteri*'de safraya maruz kaldıktan sonra *dps* (Açlık sırasında DNA koruma) geninin ifadesinin arttığını mikroarray analizleriyle gözlenmiştir (Whitehead ve ark., 2008). *dps* *E. Coli*'de oksidatif stres, radyasyon, metal toksitesi, sıcaklık stresi ve pH stresi gibi stres adaptasyon çeşitleriyle ilgili bulunmuştur (Martinez ve Kolter, 1997). Bununla birlikte *L. Reuteri*'de *dps* 'nin tahrip edilmesinin safrada canlı kalabilme yeteneğini önemli derecede etkilememesinin sebebi olarak DNA koruma ve tamir enzimlerinin artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Whitehead ve ark., 2008).

Genel stres şartlarına cevap oluşturmada şaperon grubu proteinler oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Şaperonlar; proteinlerin katlanması, renatürasyon, hasar görmüş proteinlerin uzaklaştırılması ve denatüre olmuş proteinlerin korunması gibi konularda görev alarak genel stres durumlarına cevap oluşturmada yardımcı olmaktadır. Konuyla ilgili olarak yapılan çalışmalardan birinde pH 4'de 1 saat inkübasyona bırakılan *L. reuteri* ATCC 23272'deki şaperonlardan GrpE ve DnaK gen ifadelerinin arttığı rapor edilmiştir (Lee ve ark., 2008). Bir diğer çalışmaya göre *L. acidophilus* NCFM'de safraya maruz kaldıktan sonra *groES*, *groEL*, *dnaK*, *htrA*, ve *grpE* gen ifadelerinin arttığı mikroarray yöntemi ile gösterilmiştir (Pfeiler ve ark., 2007). Mide-barsak sistemi şartlarında laktobasillerin hızlı cevap oluşturmada Clp proteinleri özellikle önemli olmaktadır. Asit stresinde *L. reuteri* ATCC 55730'de, ifadesi uyarılan genlerden birisi olarak *clpL* bulunmuştur (Wall ve ark., 2007). Bron ve arkadaşları (2006), *L. plantarum*'da safra uygulamasıyla glutatyon reduktaz ve *metC-cysK* operonu ifadesinin arttığını bildirmişlerdir. Glutatyon, oksidatif stresin önemli belirtecidir ve bakterilerin *in vivo* canlılığında önemli rol oynayabilmektedir. Glutatyon ve sistein metabolizması, S-Adenozil Metiyonin (SAM) metabolizmasıyla ve metil döngüsüyle yakından ilişkili bulunmuştur (Winzer ve ark., 2003). SAM döngüsü rRNA nükleotit modifikasyonu,

poliamin sentezi ve metilasyon süreçleriyle ilgili olarak merkezi metabolik rol oynamaktadır. Tüm bu süreçlerin stres altındaki makromoleküllerin dayanıklılığını artırmayla ilgili olabileceği düşünülmektedir (Loenen, 2006).

2.2.7. Laktobasillerin ağız ve diş sağlığına etkileri

Ağız sağlığına etkilerine bakıldığında laktobasiller, tarihsel olarak diş çürükleriyle ilişkili ilk mikroorganizmalardır (Owen, 1949). Çocukluğun ilk yıllarından itibaren, tükürükte yüksek miktarda, dil sırtında, mukozal yüzeylerde, sert damakta, diş plağında ve daha az miktarda olmak üzere dişlerin yüzeyinde görülmektedir.

Çürüğü olan bireylerdeki tükürükte tanımlanan laktobasil türleri ve çürüğü olmayan bireylerdeki tükürükte tanımlanan laktobasil türleri Çizelge 2.7’de verilmiştir.

Çizelge 2.7. Çürüğü olan bireylerde ve çürüğü olmayan bireylerde tanımlanan laktobasil türleri

Çürüğü Olan Bireylerde Tanımlanan Türler	Çürüğü Olmayan Bireylerde Tanımlanan Türler
<i>L. rhamnosus.</i>	<i>L. rhamnosus.</i>
<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>
<i>L. alactosus</i>	<i>L. alactosus</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>L. cellobiosus</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. salivarius</i>	<i>L. salivarius</i>
<i>L.buchneri</i>	<i>L.buchneri</i>
<i>L. pentosus</i>	<i>L. pentosus</i>
<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. vaginalis</i>	<i>L. vaginalis</i>
<i>L. xylosus L. delbrueckii</i>	<i>L. xylosus</i>
<i>L. leichmanii</i>	<i>L. oris</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>L. delbrueckii</i>
	<i>L. leichmanii</i>
	<i>L. gasseri</i>
	<i>L. crispatus</i>

Çizelge 2.7, çeşitli araştırmacıların çalışmasına göre (Munoz-Jeldrez ve ark., 1980; Nancy ve ark., 1992; Botha ve ark., 1993; Smith ve ark., 2001; Koll-Klais ve ark., 2005; Tennpaisan ve Dahlen, 2006) düzenlenmiştir.

Çürüğü olan çocuklarda laktobasil sayısı 100 kat fazla bulunmuştur (Beighton ve ark., 2004). Yetişkinlerde de kök çürüğü olan bireylerde diş plağında laktobasil miktarının arttığı gözlenmiştir (Ellen ve ark., 1985; Bowden ve ark., 1990; Van Houte ve ark., 1990; Fure, 2003).

Laktobasillerin sindirim kanalında ve vajinada doğal olarak kolonize olup bireyi patojenlere karşı korudukları düşünülmektedir. Buna karşın ağız boşluğunda çürük lezyonlarında bulunduklarından dolayı diş çürüklerinin sebebi olarak bilinmektedirler. Laktobasiller çürüklerin başlatılmasından çok çürümüş olan dişlerde yerleşmiş olarak bulunmuştur. Son zamanlarda çürüklerin ve periyodontal hastalıkların önlenmesinde laktobasillerin faydalı rolleri olduğuyla ilgili araştırmalar yayınlanmıştır. Probiyotikler ağızda bilimsel olarak ilk kez 1954 yılında çalışılmıştır (Kragen; 1954). Araştırmacı gingivitis, periodontitis gibi çeşitli periyodontal rahatsızlığı olan bireylerde laktik asit bakterilerinin faydalı etkileri olabileceğini rapor etmiştir. Laktobasillerin ağız mikroflorasındaki patojen bakterilerle tutunma yüzeyi için rekabete girmeleri ve ürettikleri maddelerle onları inhibe etmeleri dolayısıyla ağız probiyotiği olarak kullanılabilme olasılıkları, ağız ve diş sağlığı açısından umut verici bir alternatif oluşturmaktadır. “Periyodontal yer değiştirme” olarak ifade edilen tedavinin yaklaşımı, periyodontal cepleri temizledikten sonra bu bölgeyi patojenlerin yeniden kolonize etmesini önlemek için subgingival olarak faydalı ağız bakterilerini buraya yerleştirmek mantığına dayanır. Yerdeğiştirme tedavisi, patojenik mikroorganizmaları yok etmek için zararsız bakterileri kullanarak enfeksiyonlarla mücadele etmenin alternatif bir yoludur. Gastrointestinal düzensizliklerin tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılan probiyotikler, diş hekimliğinde de başarılı sonuçlar göstermiştir. Yakın geçmişte yapılan çeşitli çalışmalarda probiyotik kullanımının karyojenik biyofilmi azalttığı gösterilmiştir. Probiyotik stratejilerin uygulanması, gelecekte tedavi edilen popülasyonlarda yeni çürük oluşumunu da sonlandırabilir (Ranganathan ve Vaidya, 2011). Laleman ve arkadaşları (2014), diş çürüğünün önlenmesinde probiyotiklerin pozitif etkiye sahip olduklarını ifade etmişlerdir.

Comelli ve arkadaşları (2002), 23 süt ürünündeki mikroorganizmaları potansiyel probiyotik özellikleri için araştırmışlardır. Test edilen strainlerden ikisi (S.

thermophilus ve *L. lactis*) tükürük kaplı hidroksiapatite (dişin sert dokularının prensibal kimyasal bileşeni) tutunabilmiştir ve diş plağını taklit eden biyofilme girebilmiştir. Araştırmacılar, süt ürünleri kaynaklı *L. rhamnosus*'un yedi ay kullanılması sonucu *S. mutans* sayısında azalma gözlemişlerdir. Ishikawa ve arkadaşları (2003), *L. salivarius*'un 24 saat içinde siyah pigmentli anaerobik çubukları (BPARs), *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*'i öldürdüğü gözlemişlerdir. Bu araştırmacılar, 4 hafta süreyle *L. salivarius* içeren tabletler kullanan bireylerde tükürükte anaerobik basillerin azaldığını rapor etmişlerdir.

Çürük oluşumunun engellenmesini sağlayan yaklaşımlardan birisi olan pasif lokal bağışıklama ile ilgili yapılan Wei ve arkadaşları (2002)'nin yaptığı bir çalışmada, hamile ineklerin aşısıyla bağışıklanması sağlanarak *S. mutans* ve *S. sobrinus* gibi insanlarda diş çürümelerine yol açan bakterilere karşı etkili IgG antikorı üretmesi sağlanmış ve bu antikor saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bu bağışıklık ürününün (İÜ) streptokokların tükürük kaplı hidroksiapatite tutunmasının inhibisyonu ve glikosiltransferaz enziminin inhibisyonu gibi çürümeleri engelleyici özelliklere sahip olduğu tesbit edilmiştir. Aynı çalışmanın devamında İÜ katkılı UHT süt ve *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) içeren sütün önemli seviyede ($p<0.05$) antistreptokok aktivitesine (özellikle *S. mutans*'a karşı) sahip olduğu ve LGG içeren süte İÜ ilave edilmesinin çürümelerin engellenmesi açısından önemli bir yaklaşım olabileceği ifade edilmiştir.

Bazı durumlarda laktobasiller çürük oluşturan bakterileri inhibe ederek faydalı rol oynarlar. Michalek ve arkadaşları (1981), ratlarda yaptığı çalışmada, diş plağında *L. casei* bulunuyorsa *S. mutans*'ın azaldığını bildirmişlerdir. Ahumada ve arkadaşları (2001), dilden izole edilen laktobasillerin %36'sının *S. mutans* gelişimini inhibe ettiğini göstermiştir. Homofermentatif grup laktobasillerin, heterofermantetiflere göre daha güçlü antimikrobiyal madde ürettiklerini de rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, çürük diştten elde edilen laktobasillerin streptokoklara karşı inhibitör madde üretiminin çürüksüz diştten elde edilenlere göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Plasebo kontrollü çift körlü bir çalışmada *S. salivarius* K12 verilen bireylerde *S. mutans* seviyesinin düştüğü görülmüştür ve plak oluşumunu azalttığı da gözlenmiştir (Burton ve ark., 2013).

Sookkhee ve arkadaşları (2000), sağlıklı ağızdan izole ettikleri laktobasillerin antimikrobiyal aktivitesini analiz etmişlerdir ve beş tükürük laktobasil izolatının (*L.*

paracasei'nin 3 izolatu, *L. rhamnosus*'un 2 izolatu) mutans streptokoklara (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*), *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis* ve *Candida*'ya karşı antimikrobiyal etkili olduğunu göstermişlerdir.

Koll-Klais ve arkadaşları (2005), test edilen laktobasillerin %69'unun *S. mutans*'i, %88'inin *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*'i, %82'sinin *P. gingivalis*'i ve %65'inin *P. intermedia*'yı inhibe ettiğini göstererek bu çalışmayı doğrulamıştır. En yüksek antimikrobiyal etkiyi *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* ve *L. salivarius* türleri sergilemiştir. Sağlam bireylerden izole edilen strainler, *S. mutans*'a karşı kronik periyodontitli hastalardan elde edilenlerden daha düşük antimikrobiyal etki sergilemişlerdir. Buna karşılık Testa ve arkadaşları (2003), oral laktobasillerle (*L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* ve *L. salivarius*) anaerob *P. intermedia* ve *F. nucleatum* arasında antagonistik etkileşim bulamamışlardır.

Simark-Mattsson ve arkadaşları (2007), *in vitro* çalışmada sağlıklı genç bireylerde oral laktobasillerin mutans streptokokları inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu bulgu son zamanlarda ağız probiyotikleri ile ilgili yapılan bazı çalışmalarla paralellik göstermektedir. Nāse ve arkadaşları (2001), çocuklarda uzun süreli *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) içeren süt tüketiminin çürük riskini azalttığını ortaya koymuşlardır. Ahola ve arkadaşları (2002), LGG ve *Lactobacillus rhamnosus* LC 705 içeren peynirin kısa süreli tüketimi ile çürük riskinin ve *S. mutans* sayısını azalttığı göstermişlerdir (Ahola ve ark., 2002; Meurman, 2005). *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* içeren probiyotiklerin de çürük oluşturan *S. mutans* miktarını azalttığını gösteren çalışmalar vardır (Haukioja, 2010; Anilkumar ve Monisha, 2012; Bizzini ve ark., 2012). Çoğulu ve arkadaşlarının (2010), yaptıkları çalışmada 20-27 yaş aralığındaki bireylere günlük 200 ml farklı probiyotik türler içeren kefir verilmiştir. Bu bireylerde *Lactobacillus* türlerinde ve *S. mutans* miktarlarında önemli azalmalar gözlenmiştir. Benzer çalışmalarda probiyotik içerikli ürün kullanımının *S. mutans* sayısını azalttığı gösterilmiştir (Cağlar ve ark., 2005a; Cildir ve ark., 2009; Jindal ve ark., 2011; Singh ve ark., 2011; Juneja ve Kakade, 2012; Campüs ve ark., 2014; Tehrani ve ark., 2016;)

Bosh ve arkadaşları (2012), çalıştıkları laktik asit bakteri izolatlarının, ağız sağlığını geliştirmede potansiyel probiyotik olarak kullanılabilecek özellikleri olduğunu göstermişlerdir.

Çeşitli probiyotiklerin oral bakteri veya çürüğe neden olan biyofilm üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Lee ve Kim; 2014) *Lactobacillus* türleri, oral

streptokokların büyümesini güçlü bir şekilde önlemişlerdir. Ayrıca, *Lactobacillus* türleri, karyojenik biyofilm modelinin oluşumunu önemli ölçüde engellemiştir. Adı geçen çalışmada araştırmacılar, *L. rhamnosus*'un *S. mutans*'ın glukon üretimini azaltarak ağızda biyofilm oluşumunu engelleyebildiğini ifade etmişlerdir.

Güngör ve arkadaşları (2013), sağlıklı çocukların ağızlarından elde edilen laktik asit bakterileriyle fermente et ürünlerinden elde edilen laktik asit bakterilerinin kullanıldığı bir çalışmada tüm laktik asit bakterilerinin *S. mutans* sayısını azalttığını bildirmişlerdir. Chung ve arkadaşları (2004), laktobasillerin mutans streptokokların tutunması üzerine etkileriyle ilgili yaptıkları çalışmada, *L. fermentum* süpernatanı ile *S. mutans* gelişiminin engellenemediğini ancak *S. mutans*'ın tutunma özelliğinin engellenebildiğini bildirmişlerdir. Lin ve arkadaşları (2015), çalışmalarında kullandıkları beş laktobasil izolatının (*Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei* LC01, *Lactobacillus plantarum* ST-III, *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 ve *Lactobacillus rhamnosus* HN001) mutans streptokokların biyofilm oluşturmalarını ve gelişimini önlediğini rapor etmişlerdir. Lee ve Kim (2014)'in yaptıkları çalışmada *L. rhamnosus*'un hem antimikrobiyal aktivite göstererek hem de *S. mutans*'ın biyofilm oluşturmalarını engellediğini göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada *L. rhamnosus*'un biyofilm oluşumuna katılmadığından iyi bir çürük önleyici bir aday olabileceğini de ifade etmişlerdir.

Probiyotik içeren süt, yoğurt ve peynirin düzenli tüketiminin tükürükteki çürük oluşturan bakteri sayısında azalmaya neden olduğu ve diş plağında azalmaya yardımcı olduğu gösterilmiştir (Nikawa ve ark., 2004). Busscher ve arkadaşları (1999), yoğurt içerisine eklenen *L. acidophilus* ve *L. casei*'nin mineye tutunabildiğinden ağızda kolonize olabildiğini göstermişlerdir. Ancak normal yoğurttaki *L. bulgaricus* tutunmayı başaramamıştır. *L. acidophilus* ve *L. casei* içeren yoğurtların 1 hafta süreyle tüketiminin tükürükteki ve plaktaki diğer laktobasilleri uzaklaştırdığını rapor etmişlerdir. Nozari ve arkadaşları (2015)'nin yaptığı çalışmada, *Bifidobacterium lactis* içeren probiyotik yoğurt tüketen çocuklarda tükürükte *S. mutans* sayısının azalmadığı halde normal yoğurt yiyen çocuklarda tükürükte *S. mutans* sayısının azaldığı gösterilmiştir. Petti ve arkadaşları (2008), ise *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* içeren yoğurdun *S. mutans* üzerinde bakteri öldürücü etkisi bulunduğunu savunmuşlardır.

Çağlar ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2008a), kısa süreli bifidobakteri içeren dondurma tüketen genç erişkinlerle streptokokların ve laktobasillerin tükürük düzeylerini

etkileyip etkilemediğini incelemişlerdir. Probiyotik dondurmanın tüketilmesinden sonra tükürükte streptokokların istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığını kaydetmişlerdir. Bu çalışmada laktobasillerin sayısı değişmemiştir. Çağlar ve arkadaşları (2008b) yeni bir tıbbi cihazla verilen probiyotik *L. reuteri*'nin genç kadınlarda tükürük mutans streptokok sayısını ve laktobasil sayısını azalttığını göstermişlerdir.

Teanpaisan ve arkadaşları (2011), biyofilm modelinde altı probiyotik türün (*L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. salivarius* ve *Lactobacillus* SD1–SD6) *S. mutans* ATCC 25175'a karşı gücü inhibitör etki gösterdiğini gözlemişlerdir. Bu etkinin asidik şartlarda daha da arttığını bildirmişlerdir.

Peynirin ağız ortamının pH'sını yükselterek diş yapısında çürümeyi önlediği ve remineralizasyonu desteklediği rapor edilmiştir (Gedelia ve ark., 1991; Jensen ve ark., 1990) Sakız veya pastillere katılan probiyotiklerin günlük kullanımlarının da tükürük içerisindeki *S. mutans* sayısını azalttığı gösterilmiştir (Çağlar ve ark., 2006, 2007).

Hırvatistan'da üretilen ilk probiyotik diş macununun etkinliğini araştırmak amacıyla, rastgele seçilmiş 50 kişilik bir Hırvat deney grubu üzerinde 4 haftalık bir süre boyunca yapılan bir çalışmada katılımcılar 4 hafta boyunca aynı üreticinin test diş macunu ve diş fırçasını kullanarak dişlerini fırçalamışlardır. Probiyotik diş macununun kullanımından 4 hafta sonra elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak, katılımcılarda çalışmaya başlamadan öncekine kıyasla çürük oluşturan bakteri sayılarında anlamlı bir azalma olduğunu göstermiştir (Majstorovi ve ark., 2013).

Ghasempour ve arkadaşları (2014), *Lactobacillus casei* subsp. *Pseudoplantarum* ve *Saccharomyces cerevisiae* türlerini içeren kefir ile sodyum florid içeren çalkalama suyunun *S. mutans* seviyelerini azaltmada eşit oranda etkili olduğunu göstermişlerdir.

Ashwin ve arkadaşları (2015), *B. lactis* Bb-12 ve *L. acidophilus* La-5 içeren probiyotik dondurmaların tüketilmesinden önce ve sonra 6-12 yaş grubundaki çocuklarda tükürük *S. mutans* seviyelerine göre çürük riskini değerlendirmişlerdir. Çalışmada dondurma tüketiminden yedi gün sonra *S. mutans* sayısında anlamlı bir azalma sağlanmıştır. Normal dondurma tüketen grupta ise önemli bir azalma olmamıştır. Ancak her iki grupta da çalışma süresinden altı ay sonra, *S. mutans*'ın tükürük seviyelerinin başlangıçtaki seviyelere benzer olduğu belirlenmiştir. Nagarajappa ve arkadaşları (2015), *Bifidobacterium* içeren dondurma tüketen bireylerde *S. mutans*'ın tükürük seviyelerinin azaldığını göstermişlerdir.

Rodríguez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2016), Şili’de 2 ve 3 yaşlarındaki çocuklar iki gruba ayrılarak, deney grubundaki çocuklara 150 ml *L. rhamnosus* eklenmiş süt verilmiş, kontrol grubuna standart süt verilmiştir. 10 ay boyunca devam eden çalışmada probiyotik süt verilen grupta kontrol grubuna kıyasla çürük lezyonlarının azaldığı gözlenmiştir.

Krzyściak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2017), *L. salivarius* ihtiva eden bir probiyotik madde, *S. mutans* ve *C. albicans*’ın bir çift-tür biyofilm üretme kabiliyeti üzerindeki etkisi, *in vitro* modelde araştırılmıştır. Biyofilm oluşturan *S. mutans* ve *C. albicans* kolonilerinin sayısı tespit edilmiştir. *L. salivarius*, *C. albicans* ve *S. mutans*’ın çürük oluşturan biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir. Probiyotik etkisi altında; biyofilm kütlesi ve biyofilm içerisindeki *S. mutans* sayısı azalmıştır. *C. albicans* sayıları da azalmıştır. Daha da ötesi; probiyotik uygulamasından sonra mantarlar patojenik potansiyelli hif veya germ tüpleri metdana getirememilerdir.

Lin ve arkadaşları (2017), probiyotik laktobasillerin çürüklerden izole edilen *S. mutans* ve biyofilmler üzerine etkisini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada dört laktobasil suşunun *S. mutans*’ın gelişimini engellediğini ve *in vitro* bakteri biyofilmlerinin bileşimi üzerinde etkili olduğunu gözlemişlerdir. Probiyotik kullanımının çürük önlemede, umut verici bir yöntem olabileceğini bildirmişlerdir.

Rungsri ve arkadaşları (2017), günde bir sefer *L. rhamnosus* SD11 veya *L. bulgaricus* içeren fermente süt tüketen iki gruba ayırdıkları 43 genç yetişkin üzerinde 4 hafta boyunca yaptıkları çalışmada; probiyotik grupta kontrol grubuna kıyasla mutans streptokoklarda ve toplam bakterilerde istatistiksel olarak anlamlı azalmanın gözlemlendiğini ve laktobasil sayısının, fermente sütler aldıktan sonra her iki grupta anlamlı düzeyde arttığını ortaya koymuşlardır. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların daha önce bildirilenlerden daha uzun süre ağız boşluğunda kolonize olduğu da kaydedilmiştir.

Sinkiewicz ve arkadaşları (2010), ağıza *L. reuteri* uygulamasından sonra tükürükteki *L. reuteri* varlığını araştırdıkları çalışmalarında tükürükteki total *Lactobacillus* sayısında önemli oranda artış saptamışlardır.

Probiyotik kullanımının periyodontal rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmasıyla ilgili olarak Hillman ve arkadaşları (2009), *S. uberis* ve *S. oralis* türlerinin periyodontal patojenleri baskıladığını rapor etmişlerdir. Vivekananda ve arkadaşları (2010), *L. reuteri* alımından sonra dişeti kanamasında ve gingivitiste azalma gözlemlendiğini

bildirmişlerdir. Gruner ve arkadaşları (2016) ise yaptıkları çalışmalar sonucunda probiyotik tedavinin periodontal hastalıkların iyileştirilmesinde kullanılabileceğini ancak probiyotiklerin çürük tedavisinde kullanılması için eldeki verilerin yetersiz olduğunu rapor etmişlerdir.

Probiyotik kullanımının ağız kokusunu azalttığına dair çalışmalar da vardır. Konuyla ilgili 2.2.7.1’ de “Probiyotikler ve halitosis” başlığı altında bilgi verilmiştir.

Oral kandidazise karşı da probiyotiklerin tedavi edici olarak kullanılabileceğine dair çalışmalar mevcuttur (Elahi ve ark.,2005; Hattaka ve ark., 2007; Ahola ve ark., 2002). Oral laktobasillerin enteropatojenik bakterilerin gelişimini inhibe ettiği de gösterilmiştir (Smith ve ark., 2001).

Yukarıda belirtilen tüm bu çalışmaların yanında karşıt görüşler de mevcuttur. Montalto ve arkadaşları (2004), 45 gün süreyle probiyotik tüketiminin tükürükteki laktobasilleri azalttığını ancak streptokokları önemli oranda etkilemediğini rapor etmiştir. Bu araştırmacılar probiyotik tüketen bireylerin çürüklerini düzenli olarak kontrol ettirmelerini tavsiye etmişlerdir. Çeşitli çalışmalarda süt, tablet, pastil gibi çeşitli formlarda probiyotik alımının çürük oluşturan bakterilerin miktarını etkilemediği gösterilmiştir (Montalto ve ark., 2004; Lexner ve ark., 2010; Chuang ve ark., 2011; Çıldır ve ark., 2012; Marttinen ve ark., 2012).

Schwendicke ve arkadaşları (2014a), probiyotik türlerin kendiliğinden kariojenik olabilecekleri düşüncesiyle yaptıkları çalışmada probiyotik *L. rhamnosus* GG'yi *S. mutants* ile karşılaştırmışlardır ve diş dokularında oluşan mineral kaybını analiz etmişlerdir. *L. rhamnosus* GG, özellikle dentin boşluklarında ve yüksek derecede kariojenik koşullarda mineral kaybına neden olmuştur. *L. rhamnosus* GG'nin *S. mutants* üzerinde inhibitör etkilere sahip olmadığı daha ziyade *in vitro* çürüğe katkıda bulunduğu gözlenmiştir.

Schwendicke ve arkadaşları (2014b), bir başka çalışmada canlı *Bifidobacterium animalis* BB12'nin *in vitro* *S. mutans*'ın çürük oluşturma etkisini azaltmadığını, ısı ile inaktive edilmiş BB12 nin ise dentin boşluklarındaki *S. mutans*'ın çürük oluşturma etkisini azalttığını göstermişlerdir. İnaktif probiyotiklerin çürük oluşumunun kontrolü için uygun olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Matsumoto ve arkadaşları (2005), yaptıkları çalışmada molar dişlerin yüzeylerinin *S. mutans* MT8148R ve *L. salivarius* LS1952R ile enfekte edilmesinin, MT8148R yerleşmesini desteklediğini bildirmişlerdir.

Yli-Knuuttila ve arkadaşları (2006) ise 14 gün süreyle probiyotik içecek tüketen 56 bireyde *L. rhamnosus* GG'nin ağız boşluğuna kolonize olamadığını bildirmişlerdir.

Fernández ve arkadaşları (2015), probiyotik bakterilerin, *S. mutans*'ın çürük oluşturma özelliği üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. *L. rhamnosus* aktivitesinin deneysel bir çürük modelinde *S. mutans*'ın çürük oluşturma etkinliğini azaltmadığını ileri sürmüşlerdir.

Bazı araştırmacılar tükürükteki laktobasil sayısının artmasıyla ağız kuruluğu arasında korelasyon gözlemişlerdir (Loesche ve ark., 1995; Almstahl ve ark., 2004). Bu duruma radyoterapi hastalarında daha çok rastlanmıştır (Bardow ve ark., 2001; Al-Nawas ve ark., 2006). Antilla ve arkadaşları (1999), sinir bozukluğu olan bireylerde ve ağız laktobasil sayısında artış görülmesi sebebiyle depresif bireylerde diş çürüklerinin görülme riskinin arttığını belirtmişlerdir. Bu durum iki olasılıkla açıklanmıştır. İlki, depresif bireyler çok şeker ürünü tükettiklerinden böyle bir sonucun ortaya çıktığıdır. İkincisi ise, bağışıklık sisteminin düşmesi bu olgulara yol açmıştır.

Yeni izole edilen probiyotik suşların ağız ve diş hastalıkları tedavisinde veya önlenmesinde kullanılabilecek bir ürün olarak dünya pazarına sunulabilmeleri için uzun vadeli çalışmalara ihtiyaç vardır. Ağız sağlığı için kullanılacak olan probiyotiklerin etkinliğinin ve güvenliğinin bilimsel olarak kanıtlanmış olması, kullanım şekli ve dozu, özellikle hangi hasta ve yaş grubu için kullanılacağına iyi araştırılması gerekmektedir (Pradeep ve ark., 2014).

Günümüzde Amerika, Kanada gibi bazı ülkelerde üretilen oral probiyotikleri içeren pastil, diş macunu, sakız, tablet, kapsül ve gargara gibi ürünler marketlerde kullanıma sunulmuştur (Zahradnik ve ark., 2009; Jose ve ark., 2013; Thomas ve Chicago, 2014; Tagg, 2014). Rus bilim adamlarının geliştirdiği bir probiyotik karışımının da gingivitis ve periodontitis tedavisinde etkili olduğu öne sürülmüştür (Grudianov, 2002; Pozharitskaia, 1994).

Ülkemizde ağız ve diş hastalıklarına yönelik olarak Türkiye'de üretilen Bakanlık onaylı herhangi bir ürün henüz bulunmamaktadır. Ancak ithal ürünleri piyasada bulmak mümkündür.

2.2.7.1. Probiyotikler ve halitozis

Kötü ağız kokusu (halitozis), ağız boşluğundaki kommensal (karşılıklı fayda sağlayan) ilişki gösteren mikrofloranın dengesinin patojen mikroorganizmalar lehine

bozulmasıyla oluşmaktadır (Scully ve ark., 2008). Ağız kokusunun sebebi pek çok hastalık olabilmektedir ancak asıl neden ağız boşluğundaki mikrobiyal dengenin patojenler lehine bozulmasıdır. Gıdalarla alınan ya da tükürükte bulunan proteinlerin anaerobik patojenlerin etkisiyle parçalanarak kükürtlü bileşenlerin oluşumu ağız kokusuna yol açabilmektedir. Kang ve arkadaşları *in vitro* ve *in vivo* olarak *Weissella cibaria*'nın *F. nucleatum*'un oluşturduğu uçucu kükürt bileşiklerinin (VSC) üretimini inhibe ettiğini göstermişlerdir. VSC'nin azalmasındaki mekanizma, *F. nucleatum*'un faaliyetlerini inhibe eden durum *W. cibaria* tarafından üretilen hidrojen peroksittir. Ağız probiyotiği için aday olan mikroorganizmalardan *S. salivarius*'un, VSC üzerinde inhibe edici etkisi gösterilmiştir.

Burton ve arkadaşları (2005), *S. salivarius* suşu olan K12'nin halitoziste etkili olan gram pozitif bakteri türlerini inhibe eden bileşikler ve bakteriyosin ürettiğini bildirmişlerdir. Probiyotiklerin düzenli kullanımı halitozisi önlemeye yardımcı olabilmektedir (Kang ve ark., 2006). Probiyotik kullanımının halitosiste etkili olduğu bildirilmiş ancak bakteri karışımı yazarlar tarafından açıklanmamıştır (Henker ve ark., 2001; Kang ve ark., 2006). Keller ve arkadaşları (2012), probiyotik laktobasilleri kullanarak (*L. reuteri* DSM 17938 ve *L. reuteri* ATCC PTA 5289) yaptıkları çalışmada probiyotik sakızların ağız kokusu üzerinde faydalı bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Jamali ve arkadaşları (2016), yaptıkları çalışmada klorheksidin ile ağız hijyenini sağladıktan sonra probiyotik uygulamanın, daha uzun sürelerle ağız kokusu şiddetini azaltabileceğini ortaya koymuşlardır. Iwamoto ve arkadaşları (2010), probiyotik laktobasil *L. salivarius* WB21 uygulaması ile esas olarak fizyolojik halitozu azalttığını göstermişlerdir. Yoo ve arkadaşları (2017), ağız kokusunu gidermek için probiyotik kullanılmasını desteklemektedirler.

2.2.8. Probiyotiklerin yan etkileri

Çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara göre, pek çok ağız hastalığının tedavisinde ve önlenmesinde probiyotiklerin faydalı etkisinin olduğu doğrulanmıştır. Şimdiye kadar yapılan klinik araştırmalarda genel ağız sağlığına ciddi yan etkileri olmadığı rapor edilmiştir.

Lactobacillus ve *Bifidobacterium* organizmalarının neden olduğu enfeksiyon vakaları çok nadirdir ve enfektif endokardit ve bakteriyeminin, vakaların %0,05-%0,4'ünü oluşturduğu zannedilmektedir. Vaka sunumu olarak iki immünosüpresif

hastada fungemi ve probiyotik kullanan ülseratif kolitli iki hastada *Saccharomyces boulardi*'ye bağlı ishal alevlenmesi bildirilmiştir (Riquelme ve ark., 2003). Probiyotik bakterilerin, antimikrobiyal, mukozal ve sistemik immüneyi aktivite edici, epitel fonksiyonlarını iyileştirici etkilerinin gösterilmesi, klinik tıpta probiyotiklerin kullanımı ile ilgili yeni bir dönemi başlatmıştır. Bugün probiyotiklerin, çocukların enfeksiyöz ishallerinde, tekrarlayan *C. difficile* enfeksiyonlarında ve postoperatif enfeksiyonlarında terapötik kullanımlarını destekleyen birinci düzey veriler bulunmaktadır. Diğer gastrointestinal enfeksiyonlarda, postoperatif bakteriyel translokasyonu engellemekte ve IBH'da probiyotik kullanımını destekleyen ikinci düzey veriler elde edilmiştir. Saavedra ve arkadaşları (2004), *B. lactis* ve *S. thermophilus* içeren bir formülü bebeklerde uzun süreli olarak denemişlerdir ve herhangi bir yan etki gözlemlenmemişlerdir. Ancak son yıllarda, tüm probiyotik bakterilerin benzer etkileri olmadığı ortaya çıkmıştır.

Probiyotik olarak kullanılacak strainlerin toksin üretimi, hemolitik ve metabolik aktivite, insanlarda yan etkiler, antibiyotik duyarlılığı gibi bazı parametrelerden geçmesi gerekmektedir (Senok, 2005). Probiyotiklerin kullanımında, uygulanmadan önce daima bir yarar/zarar analizine tabi tutulmalıdır. Sağlıklı insanlar herhangi bir riskle karşılaşmazlar. Gıdalarda ve takviye olarak probiyotiklerin güvenli bir şekilde kullanılmasının uzun bir geçmişi vardır ve risk faktörü yoksa probiyotik kullanımı genel olarak güvenilir (GRAS) kabul edilmektedir (Floch ve ark., 2013).

2.2.9. Prebiyotikler

Prebiyotik, barsaktaki bazı mikroorganizmaların artışını ve faaliyetlerini seçici olarak destekleyen, insan ya da hayvan sağlığını olumlu yönde etkileyen, sindirilemeyen kısa zincirli karbonhidratlar olarak tanımlanabilmektedir. Prebiyotikler bağırsaktaki yararlı mikrobiota (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* gibi) tarafından seçici olarak kullanılırken toksin üreten *Clostridium*'lar, proteolitik *Bacteriodes*'ler ve toksijenik *E. coli* gibi potansiyel patojen mikroorganizmaların çoğalmasını da engellemektedir (Gibson ve Roberfroid, 1995). Prebiyotik özellik taşıyan bir besin bileşeni; sindirime dirençli olup, bağırsak mikrobiotası tarafından hidroliz edilebilmektedir. Prebiyotik bir bileşen, seçici olarak bir veya birkaç bakterinin çoğalmasını uyarabilmektedir. Ve konakçının sağlığı üzerinde olumlu etkiler meydana getirmektedir. Prebiyotik besin bileşenleri arasında inülin, laktosükroz, laktuloz,

fruktooligosakkaritler, galaktooligosakkaritler, glikooligosakkaritler vb sayılabilir. Hindiba (*Cichorium intybus*) ve enginar prebiyotikten zengindir. Hindibada %15-20 inülin ve %5- 10 oligofruktoz bulunmaktadır. Besinlerin çoğunda bulunan inülin hindiba kaynaklıdır ya da sükrozdan sentez edilmektedir. Oligofruktoz inülinin kısmen hidrolize edilmiş şeklidir. Diğer prebiyotik kaynaklar arasında buğday, arpa, çavdar, soğan, sarmısak, muz, kuşkonmaz ve pırasa sayılabilir (Gibson ve Roberfroid, 1995; Gibson, 2000; Langlands 2004; Manning, 2004).

Prebiyotiklerin kolon mikrobiotası, bağışıklık fonksiyonları, mineral kullanımı, lipid metabolizması üzerinde yararlı ve kolon kanseri gelişimini önleyici etkileri bulunmaktadır (Manning, 2004; Brannon, 2003).

Probiyotik ve prebiyotikler birlikte kullanıldığında ikisinin sinerjik etkisinden yola çıkılarak “sinbiyotik” olarak adlandırılırlar. Bu şekilde uygulama ile probiyotiklerin sindirim kanalında hayatta kalabilmeleri desteklenir, böylece bakterilerin yaşam süreleri uzamaktadır ve probiyotikler kolonda daha iyi kolonize olmaktadır (Bruzzese ve ark., 2006; Ewaschuk ve Dieleman 2006; Fedorak ve Madsen 2004a, 2004b).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Örneklerin alınması

Çalışmada izolasyon materyali olarak kullanılan tükürük örnekleri, ağızda dolgu ve çürük olmayan, tesadüfi yöntemle seçilen 15-18 yaş aralığında, 12'si kız, 18'i erkek 30 lise öğrencisinden steril falkon tüplere tükürtülerek alınmıştır ve aynı gün analize alınmıştır.

3.1. 2. Besi ortamları

3.1.2.1. MRS agar (*Lactobacillus* Agar acc. To DEMAN, ROGOSA and SHARPE)

Diamonyum hidrojen sitrat 2g, Dipotasyum hidrojen fosfat 2g, Glikoz 20g, Magnezyum sülfat 0,2g, Mangan sülfat 0,04g, Et ekstraktı 8g, Pepton 10g, Sodyum asetat 5g, Maya ekstraktı 4 g, Tween® 80 ml, Agar 14 g, Distile su 1000 ml.

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 5,7±0,2'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.2.2. MRS agar % 6,0 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilen MRS agar besiyeri içerisine 60gr/1000 ml olacak şekilde sodyum klorür eklenerek, içerik distile suda çözüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.2.3. MRS agar %7,5 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilen MRS agar besiyeri içerisine 75gr/1000 ml. olacak şekilde sodyum klorür eklenerek, içerik distile suda çözüldükten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.2.4. MRS agar %10 tuz ilaveli

Daha önce içeriği verilen MRS agar besiyeri içerisine 100gr/1000 ml olacak şekilde sodyum klorür eklenerek, içerik distile suda çözüldükten sonra 12 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.2.5. MRS broth

Dipotasyum hidrojen fosfat... 2 g
Glikoz20 g
Magnezyum sülfat heptahidrat ...0,2 g
Mangan sülfat tetrahidrat... 0,05 g
Et ekstraktı8 g
Pepton ...10 g
Sodyum asetat trihidrat.... 5 g
Triamonyum sitrat.... 2 g
Yeast ekstraktı5 g
Distile su ...1000 ml

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

3.1.2.6. M 17 agar

Soya Pepton ...5,0 g
Et Pepton2,5 g
Kazein Peptone ..2,5 g
Maya extract.. .2,5 g
Et Extract ...5,0 g
Laktoz monohidratt ... 5,0 g
Askorbik asit ...0,5 g
Sodyum β-glycerophosphate19,0 g
Magnezyum sülfat ...0,25 g
Agar-agar ...12,75 g
Distile su ...1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 7,1±0,2'ye ayarlanmış ve 121°C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.2.7. Mueller hinton agar

Sığır eti-kalp ekstraktı....4 g
Kazein hidrolizat..... 17,5 g

Nisasta1,5 g

Agar17 g

Distile su1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $6,8\pm0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.2.8. *Beyin kalp infusion (BHI) yumusak agar (53286, Sigma)*

Sığır kalbi.... 5 g

Dana beyni12,5 g

Di sodyum hidrojen fosfat2,5 g

Glikoz (D+)2 g

Pepton10 g

Sodyum klorür.... 5 g

Agar7 g

Distile su1000 ml.

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $7,4\pm0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121°C 'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.2.9. *Nutrient broth agar (N 9405, Sigma)*

Et ekstraktı3 g

Pepton5 g

Agar..... 14 g

Distile su1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $6,8\pm0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121°C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.2.10. *Nutrient broth yumuşak agar (N 9405, Sigma)*

Et ekstraktı..... 3 g

Pepton5 g

Agar.... 7 g

Distile su1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $6,8\pm0,2$ 'ye ayarlanmış ve 121°C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1. 2.11. Üç sekerli demir agar (1.03915, Merck)

Pepton (kazein den) ...15 g
Pepton (et den) ...5 g
Et ekstraktı ...3 g
Maya ekstraktı ...3 g
Sodyum klorür... 5 g
Laktoz10 g
Sukroz10 g
D (+) Glikoz1 g
Demir 3 amonyum sitrat0,5 g
Sodyum tiyosülfat.... 0,5 g
Fenol kırmızısı0,024 g
Agar12 g
Distile su 1000 ml

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH $7,4\pm0,2$ 'ye ayarlanmıştır. İçeriğin tam olarak homojen hale getirilmesi için besiyeri kaynatılmış ve test tüplerine 15 ml koyularak 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan tüpler eğimli bir zemin üzerine yatırılarak dondurulmuş ve yatık agar şeklinde kullanılmıştır.

3.1.2.12. MR-VP broth (Merck 1.05712) methyl-red voges-proskauer broth

Pepton (etten).....7 g
D-Glikoz..... 5 g
Dipotasyum fosfat5 g
Distile su1 lt

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra pH $6,9\pm0,2$ 'ye ayarlanmış, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.1.2.13. *Mitis salivarius* agar

Kasein...15 g

Hayvansal doku ekstraktı 5 g

Sükroz. 50 g

Dekstroz1 g

Dipotasyum fosfat 4 g

Tiripan Blue...0,075 g

Kristal Violet 0,0008 g

Agar....15 g

1% Potasyum Tellurite, ...1 ml

Distile su ...1 lt

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

3.1.2.14. *Kanlı agar*

Papaik hazmedilmiş soya unu... 5 gr

Pankreatik kazein...15 gr

Agar...15 gr

Distile su ...1000 ml

NaCl...5 gr

Steril edilen ve 50°C'ye soğutulan bu bileşime; Defibrine koyun kanı (70 ml) eklenerek. Distile suda, kazein, soya unu, tuz ve agar karıştırılır. Isıtılarak kaynaması ve erimesi sağlanır. 121°C'de 15 dk tutulup sterilize edilerek, pH=7,3'e ayarlanır. 50°C'ye soğutulup ve %5-7 defibrine koyun kanı eklenmiştir. Petri plaklarına dağıtılıp kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan boyalar

3.1.3.1. *Kristal violet*

Kristal violet ..2,0 g

Etil Alkol (% 95) ..20 ml

Amonyum Oksalat ..0,2 g

Distile Su.. 20 ml

Kristal violet, 10 ml etil alkol içersinde çözüldükten sonra üzerine ayrı bir erlende 20 ml distile su içersinde çözünmüş olan amonyum oksalat eklenmiştir. Karışım filtreden geçirilerek kullanılmıştır (Speck ve ark., 1976).

3.1.4. Kullanılan çözeltiler

3.1.4.1. Fizyolojik tuzlu su

Sodyum klorür 8,5 g

Distile su 1000 ml

Fizyolojik tuzlu su çözeltisi sodyum klorür distile su içersinde çözülerek kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

3.1. 4.2. %20'lik gliserol çözeltisi

Gliserol 20 ml

Distile su 80 ml

Gliserol ve distile su karıştırılıp 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra kullanılmıştır (Akçelik ve ark., 2000).

3.1. 4.3. Metil kırmızısı çözeltisi

Metil kırmızısı..1g

600ml alkol

400 ml distile su

Metil kırmızısı alkol ve su içersinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.1.4.4. Laktik asit miktar tayini için standart çözelti

Saf laktik asit solüsyonundan sırası ile 1, 3, 8, 10, 12, 16 mg/ml olacak şekilde ayrı ayrı 5 ml'lik MRS broth ortamı içeren tüplere ilave yapılarak hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

3.1.4.5. Laktik asit miktar tayini için A çözeltisi

Baryum klorür 98,75 g, Distile su 1000 ml

Çözelti baryum klorür ($BaCl_2 \cdot 2 H_2O$) distile su içersinde çözündürüldükten sonra kullanılmıştır (Mumcu, 1997).

3.1.4.6. Laktik asit miktar tayini için B çözeltisi

Sodyum hidroksit 26,4 g, Distile su 1000 ml

Sodyum hidroksit (NaOH) distile su içerisinde çözülerek 0,66 N NaOH hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

3.1.4.7. Laktik asit miktar tayini için C çözeltisi

Çinko sülfat 225 g, Distile su 1000 ml

Çözelti Çinko sülfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) distile su içerisinde çözülerek kullanılmıştır (Mumcu, 1997).

3.1.4.8. Laktik asit miktar tayini için renk ayırıcı

Demir klorür 5 g, Hidroklorik asit 12,5 ml, Distile su 87,5 ml

Demir klorür 1 N, 12,5 ml hidroklorik asit (HCl) içerisinde çözdürülmüş ve karışım distile su ile 100 ml' ye tamamlanmıştır. Laktik asit miktar tayini için kullanılan renk ayırıcı, kullanılacağı zaman taze olarak hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

3.1.4.9. Hidrojen peroksit tespiti için standart çözelti

0,1 ml saf (% 35) hidrojen peroksit alınıp distile su ilavesi ile 30 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 1 ml başka bir erlene alınmış ve tekrar distile su ile 30 ml'ye tamamlanmıştır (Mumcu, 1997).

3.1.4.10. 1 N H_2SO_4 çözeltisi

Sülfürik asit 1,67 ml, Distile su 100 ml

Saf sülfürik asitten distile su ilavesi ile 1 N olacak şekilde çözelti hazırlanmıştır (Mumcu, 1997)

2.1.4.11. Amonyum molibdat çözeltisi

Amonyum molibdat 0,12 g, Distile su 100 ml

Çözelti amonyum molibdat ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$) distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

2.1.4.12. Potasyum iyodür çözeltisi

Potasyum iyodür 16,6 g, Distile su 100 ml

Çözelti potasyum iyodür (KI) distile su içersinde çözülerek hazırlanmıştır (Mumcu, 1997).

3.1.4.13. Yapay tükürük

%0,1 et ekstraktı

%0,2 maya ekstraktı

%0,5 proteoz pepton

%0,25 hog gastrik doku

6,0 mmol/l NaCl

1,8 mmol/l CaCl₂

2,7 mmol/l KCl

121°C'de 20 dakika otoklavlandıktan sonra bu karışımın 100 ml'sine 0,45 µm steril filtreden geçirilerek sterilize edilmiş olan %40'luk üre çözeltisinden 125 µl eklenmiştir (Guan ve ark., 2001).

3.1.4.14. Fosfatla tamponlanmış salin (PBS)

NaCl.....8 g

KCl.....0,2 g

Na₂HPO₄.....1,44 g

KH₂PO₄.....2,4 g

Bileşenler 800 ml destile suda çözülmüş ve pH'sı 7,4±0,2 olacak şekilde ayarlanmıştır. Karışımın hacmi 1000 ml'ye tamamlanarak 121°C'de 20 dakika sterilizasyon yapılmıştır (Sambrook ve ark., 1989).

3.1.5. Kullanılan antibiyotikler

Sefotaksim , Siprofloksasin, Kloromfenikol, Gentamisin, Tetrasiklin,Vankomisin, Eritromisin, Klindamisin.

3.1.6. Kullanılan test mikroorganizmaları

Tükürük örneklerinden izole edilip saflaştırılan laktobasillerin Çizelge 3.1’de verilen bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterip göstermediği belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Antimikrobiyal aktivite tayininde kullanılan test mikroorganizmaları

Mikroorganizma	Kültürün Temin Edildiği Yer	Optimum Gelişme Sıcaklığı
<i>Bacillus cereus</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	30 °C
<i>Bacillus subtilis</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	30 °C
<i>Escherichia coli</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	37 °C
<i>Enterococcus faecalis</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	37 °C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	30 °C
<i>Listeria monocytogenes</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	30 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	30 °C
<i>Salmonella typhimurium</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	30 °C
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	37 °C
<i>Proteus vulgaris</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	37 °C
<i>Streptococcus mutants</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	30 °C
<i>Streptococcus mutants</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	30 °C
<i>Streptococcus mutants</i>	Anadolu Üniv. Fen Fakültesi	30 °C
<i>Candida tropicalis</i>	Ondokuzmayıs Üniv. Tıp Fakültesi	37 °C
<i>Candida albicans</i>	Ondokuzmayıs Üniv. Tıp Fakültesi	37 °C
<i>Candida albicans</i>	Ondokuzmayıs Üniv. Tıp Fakültesi	37 °C

Çalışmalar sırasında kullanılan test mikroorganizmaları uzun vadede %15’lik gliserol içerisinde -80 °C’de, kısa süreli olarak ise +4 °C de nutrient broth içerisinde saklanmıştır. Kullanılan bütün test mikroorganizmaları, analizlerden önce stoktan çıkarılarak canlandırılmış, saflık kontrolü yapılmış ve daha sonra testlerde kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Örneklerin izolasyon için hazırlanması

İzolasyon için kullanılacak tükürük örnekleri, 15-18 yaş arası lise öğrencilerinden steril falkon tüplere tükürtülerek alınmıştır. Aynı gün içerisinde analize alınmıştır. Bu öğrencilere anket uygulanarak yaş ve cinsiyetleri belirlenmiş; laktik asit bakterilerinin bulunma sıklığı açısından beslenme alışkanlıkları, ekonomik durumları, ağız sağlığını korumaya yönelik tercihleri incelenmiştir. Örnek alınan bireylere uygulanan anket formu çizelge 4.1’de sunulmuştur. Öğrencilerin beslenme alışkanlıkları ve ağız sağlığını korumaya yönelik tercihleri uygulanan ankete göre belirlenerek Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

3.2.2. İzolasyon

Alınan örnekler, laktobasilleri izole etmek için MRS agara, streptokokları izole etmek için M17 agara, öze ile ekilmiştir. Ekim yapılan petriler 37°C’de %5 CO₂ içeren karbondioksit etüvünde, 2-3 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda koloni morfolojisi, gram reaksiyonları ve katalaz aktiviteleri incelenmiştir. Spor oluşturmayan, katalaz negatif, gram pozitif çubuk ve kok şekilli bakteriler ayrılarak çalışmalarda kullanılmak üzere stoklanmıştır. %20 gliserollü besiyeri bulunan ependorf tüplere alınarak -80°C’de saklamaya alınmıştır.

3.2.3. İzolatların tanımlanması

3.2.3.1. Gram boyama

Temelde bakterilerin hücre çeperi geçirgenliği farkı kullanılarak; bakterilerin gram pozitif ve gram negatif şeklinde iki gruba ayrılmasını sağlayan Gram boyama yöntemi, dört farklı kimyasalın kullanımı ile gerçekleştirilmiştir. Boyama işlemi için daha önce saflaştırma işlemleri tamamlanmış olan izolatlar MRS agar petrilerinde çizgi ekim yapılarak tekrar aktifleştirilmiş ve çalışma için 24–48 saatlik taze kültürler kullanılmıştır. Gram reaksiyonunun gözlemlenebilmesi için; temiz bir lam üzerine bir damla distile su damlatılmış, katı besiyerinde geliştirilmiş olan kültürden öze yardımı ile alınan az miktardaki kültür bu su içerisinde emülsüfiye edilerek tüm lam yüzeyine yayılmıştır. Lam havada kurutulduktan sonra, üç kez bek alevinden geçirilmek suretiyle fiksasyon yapılmıştır. Fiksasyonu gerçekleştirilen preparat ilk olarak kristal viole ile

boyanmış ve 1–1,5 dakika bekletilmiştir. Preparat yüzeyindeki fazla boya distile su yardımıyla giderildikten sonra lügol çözeltisi tüm lam yüzeyine yayılmış ve 1 dakika bekletilmiştir. Fazla boyanın yıkanmasından sonra preparat 10–15 saniyeliğine %95’lik etil alkol ile muamele edilmiş ve ardından distile su ile tekrar yıkanmıştır. Son olarak preparat 30 saniye süreyle, safranin ile boyanmıştır. Ardından fazla boya distile suyla yıkanarak preparat kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan preparat ışık mikroskopunda (Olympus, CHK, 3E 0357) immersiyon yağı kullanılarak 100’lük objektifte incelenmiş ve mevcut renge göre değerlendirme yapılmıştır. Boyama sonucunda mor renkli görülen bakteriler gram pozitif, pembe renkli olanlar ise gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989).

3.2.3.2. Katalaz testi

Bakterilerde katalaz enziminin varlığını ya da yokluğunu gösteren bu test, katalaz enziminin ortamdaki hidrojen peroksidi su ve oksijene ayırması temeline dayanmaktadır. Test katı veya sıvı ortamda uygulanabilmekte ve birkaç dakika içerisinde sonuç vermektedir. izolatların katalaz enzimine sahip olup olmadıklarını belirlemek için; kültürler agar petrilerinde geliştirilmiş ve 24–48 saatlik taze kültürler üzerine birkaç damla %3’lük hidrojen peroksit (H_2O_2) ilave edilerek gaz çıkışı olup olmadığı gözlemlenmiştir. *Staphylococcus aureus* test sırasında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçta gaz çıkışının görüldüğü örnekler katalaz pozitif, diğerleri ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Akçelik ve ark., 2000).

3.2.3.3. Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişim

Elde edilen izolatların tuza karşı olan toleranslarının belirlenmesi için; sırası ile %6, %7,5 ve %10 oranında tuz içeren MRS agar ortamı hazırlanmış ve 24–48 saatlik aktif kültürlerden bu üç ortama inokülasyon yapılarak izolatlar 2–7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İzolatların farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişimi derecelendirilerek sonuçlar değerlendirilmiştir (Holt ve ark., 2000).

3.2.3.4. pH; 3,9’da gelişim

İzolatların yüksek asitliğe sahip ortamda gelişip gelişmediğini belirlemek için; 1M HCl ve 1M NaOH ile pH; 3,9’a ayarlanmış MRS broth besi ortamı daha önce

tanımlandığı şekilde hazırlanmıştır. Mevcut izolatların 24–48 saatlik aktif kültürlerinden pH sı 3,9'a ayarlanmış MRS broth ortamına inoküle edilmiş ve izolatlar 2–5 gün süreyle optimum gelişme koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. inkübasyon süreci sonunda bulanıklık görülen tüpler pozitif, bulanıklık görülmeyen tüpler ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Holt ve ark., 2000).

3.2.3.5. pH; 9,6'da gelişim

İzolatların pH 9,6'da gelişip gelişmediğini belirlemek için; 1M HCl ve 1M NaOH ile pH 9,6'ya ayarlanmış MRS broth besi ortamı hazırlanmıştır. Mevcut izolatların 24–48 saatlik aktif kültürlerinden hazırlanan besi ortamına inokülasyon yapılarak izolatlar 2–5 gün süreyle optimum gelişme koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Belirtilen süre sonunda bulanıklık görülen tüpler pozitif, bulanıklık görülmeyen tüpler ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Holt ve ark.,2000).

3.2.3.6. Farklı sıcaklıklarda gelişim

Elde edilen izolatların farklı sıcaklıklara toleransının belirlenmesi için 24–48 saatlik aktif kültürlerden MRS agar petrilere inokülasyon yapılarak, 2–7 gün süreyle 4°C, 15°C ve 45°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Belirtilen sürenin sonunda kültür gelişimi kontrol edilerek farklı sıcaklıklarda gelişim değerlendirilmiştir (Holt ve ark., 2000) .

3.2.3.7. Hidrojen sülfür oluşumu

Bakterilerin sistin, sistein gibi kükürt içeren aminoasitlerden ya da sülfatlardan hidrojen sülfür (H₂S) oluşturup oluşturmadıklarının belirlendiği bu testte, tüplere yatık agar şeklinde hazırlanmış olan üç şekerli demir agar (TSI) ortamı kullanılmıştır. Test için, 24–48 saat süresince MRS agar ortamında geliştirilmiş taze kültürlerden öze ve transfer iğnesi yardımıyla TSI ortamına ekim yapılmıştır. Ekimler transfer iğnesi aracılığı ile dibe daldırma, tüpün orta noktasından geçecek bir çizgi şeklinde dibe kadar iğnenin sokulması ve öze yardımıyla yüzeye ekim şeklinde gerçekleştirilmiştir. Kültürler 48–96 saat optimum üreme koşullarında inkübasyona tabi tutulmuştur. Pozitif kontrol olarak *Salmonella typhimurium* kültürü kullanılmıştır. Hidrojen sülfür pozitif kültürlerde; bakteriler tarafından üretilen H₂S besi ortamında bulunan demir ile

birleşerek siyah renk oluşturacağı için, dipte siyah renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Bunun yanı sıra besi ortamının da renk değişimi şeker (sakkaroz ve laktoz) kullanımını, besi ortamının dip kısmının zeminden yukarı doğru kalkmış olması da glikozdan gaz oluşumunu işaret etmektedir (Halkman, 2005).

3.2.3.8. Metil kırmızısı testi

Bu test, glikozun fermentatif metabolize olması sonucu besi yerinde organik asitlerin meydana geldiğini ve pH'nın düştüğünü ortaya koymak için yapılır. Metil kırmızısı çözeltisi pH 6,0'da sarı renk ve pH 4,4'den aşağıda kırmızı renk gösterir. Üremiş kültürlerden Clark ve Lubs besi yerine (MR/VP buyyonu) ekimler yapılarak tüpler 37°C de 2-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Üzerine 4-5 damla metil kırmızısı çözeltisi ayıraç damlatılarak ve iyice karıştırılmıştır. Üstte kırmızı renkli bir halkanın meydana geldiği tüpler pozitif olarak, üst tarafta sarı bir halka ise negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.9. Arjininden NH_3 oluşumu

İzolatların Arjininden amonyak oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek için 24–48 saat süresince MRS broth ortamında geliştirilmiş taze kültürlerden kapaklı tüplerde hazırlanan arjinin dihidrolaz broth besiyerine inokülasyon yapılmıştır. Tüplerin ağızları sıkıca kapatıldıktan sonra, kültürler optimum gelişme şartlarında 7–9 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Arjinin dihidrolaz broth ortamı içerisinde bulunan indikatör ortamda alkali madde bulunduğu zaman sarıdan kırmızımsıya doğru bir renk değişimi göstermektedir. Bu nedenle inkübasyon süreci sonunda kırmızı-pembe renkte olan tüpler pozitif, değişmeden sarı renkte kalan tüpler negatif olarak değerlendirilmiştir (Tamer ve ark., 1989; Papamanoli ve ark., 2003).

3.2.3.10. İzolatların API CHL50 ile tanımlanması

API CHL50 (bioMerieux) karbonhidrat fermentasyon testleri baz alınarak laktik asit bakterilerinin tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılan bir sistemdir. Test hazır olarak bulunan kitler aracılığıyla üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmekte ve organizmalar kullandıkları karbonhidrat kaynaklarına göre sınıflandırılmaktadır. Kullanılan karbon kaynakları Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Tanımlaması yapılacak olan izolatlar tek koloni düşecek şekilde MRS agar ortamına ekilerek 24–48 saat inkübe edilmiştir. Tek kolonilerden alınarak yeniden MRS agar ortamına ekim yapılarak 24–48 saat inkübe edilmiştir. Gelişen kültürler steril öze yardımıyla 2 ml’lik API süspansiyon ortamına aktarılmıştır. 2 ml’lik API süspansiyon ortamında maksimum yoğunluk elde edildikten sonra ortam sıvısından 5 ml’lik API süspansiyon ortamına aktarım yapılmış ve bu ortamda Mc. Farland 2 yoğunluğunu sağlayan sıvı miktarı tespit edilmiştir. Daha sonra 2 ml’lik API süspansiyon ortamından Mc. Farland 2 yoğunluğunu sağlayan sıvı miktarının 2 katı alınarak 10 ml API CHL50 ortamına aktarılarak vortex yardımıyla homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Elde edilen süspansiyon, toplamda 49 çeşit olmak üzere her bir kuyucuğu farklı karbon kaynağı içeren kitlere aktarılmıştır. Kuyucukların süspanse sıvı ile doldurulması işleminden sonra, yüzeyleri mineral yağ ile kaplanmış ve kapakları kapatılan kitler 30°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürecinde 24 ve 48. saatler sonunda kuyucuklarda meydana gelen renk değişimleri baz alınarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Tanımlanmaya çalışılan izolat kuyucuklarda bulunan karbon kaynağını kullandığı zaman mevcut indikatör nedeni ile renk değişimi meydana gelmektedir. Başlangıçta koyu mavi renkte olan kuyucuklardan sarıya dönenler pozitif, değişmeden kalanlar negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif ve negatif olarak değerlendirilen sonuçlar üretici firma tarafından optimize edilmiş olan veri tabanına girilerek tür tanımlamaları gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. API CHL50 Kullanılan karbon kaynakları

0	Galaktoz	Laktoz	Gentiobiose	D-Arabitol
Gliserol	Glukoz	Melibioz	D-Turanoz	L-Arabitol
Eritritol	Fruktoz	Sukroz	D- Lyxose	Glukonat
D-Arabinoz	Mannoz	Trehaloz	D-Tagatoz	2-keto-glukonat
L-Arabinoz	Sorboz	Inulin	Eskulin	5-keto-glukonat
Riboz	Rhamnoz	Melezitose	a-metil-D-mannosid	Mannitol
D-Ksiloz	Dulsitol	Rafinoz	a-metil-D-glukozid	Sorbitol
L-Ksiloz	Salisin	Nişasta	N-asetil-glukozamin	D-Fukoz
Adonitol	Sellobioz	Glikojen	Amigidalin	L-Fukoz
Inositol	Maltoz	Ksilitol	Arbutin	b-metil-D-ksilosid

3.2.3.11. İzolatların dizi analizi ile tanımlanması

İzolatların 16S rRNA gen bölgesine göre dizi analizi 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' ve 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' evrensel primerleri kullanılarak BM Laboratuvar Sistemleri'ne yaptırılmıştır. Elde edilen dizi bilgileri BioEdit 7.0.5.3 dizi hizalama ve editleme programında düzenlenmiş ve birleştirilmiştir. Ardından National Center for Biotechnology (NCBI) web sitesinde bulunan GenBank veritabanındaki diğer 16S rRNA dizileriyle Blast programı kullanılarak karşılaştırılmış olup izolatların tür düzeyinde tanımlaması yüzde benzerlik oranıyla belirlenmiştir.

3.2.4. Metabolik ürünlerin belirlenmesi

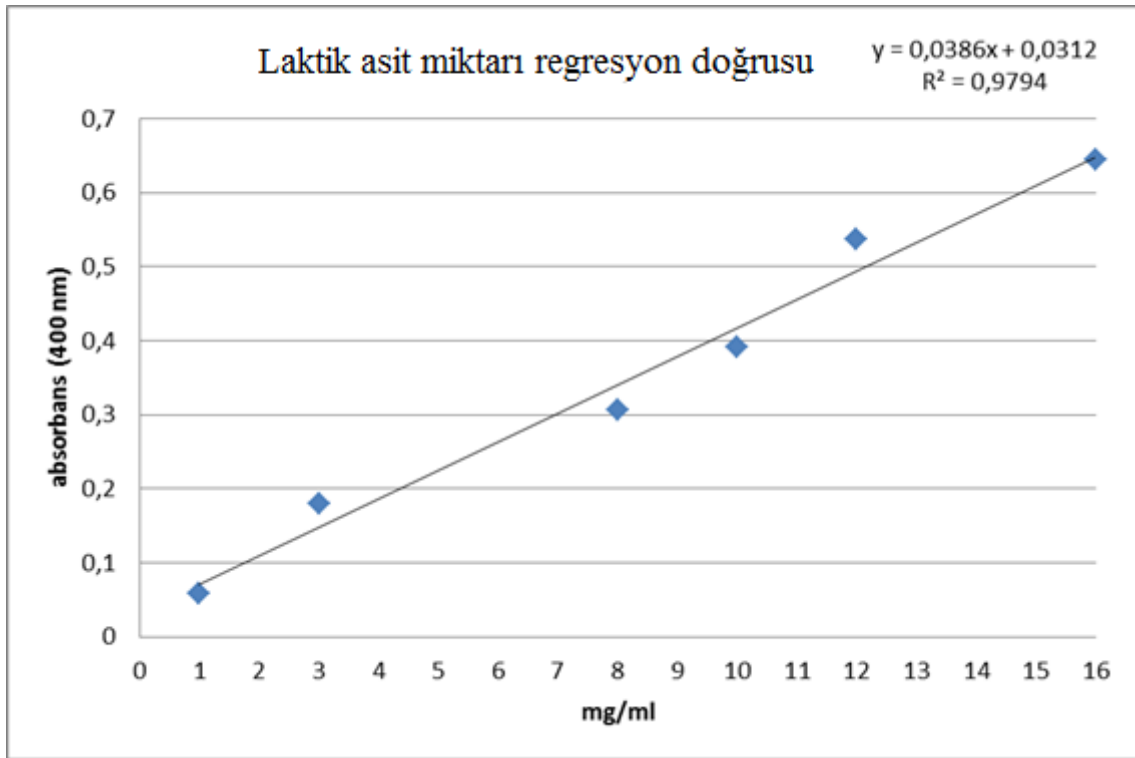
Tükürükten izole edilerek, laktobasil olduğu doğrulanan izolatların metabolik ürünlerinden laktik asit ve hidrojen peroksit üretimi tayinleri yapılmıştır. Çalışma esnasında her örnek için 4 okuma yapılmış ve bulunan absorbans değerleri (optik yoğunluk) regresyon doğrusuna göre değerlendirilerek hesaplanmıştır.

3.2.4.1. Laktik asit üretiminin tayini

İzolatlar 5 ml MRS broth besiyerinde geliştirilmiş ve bu aktif kültürden yeniden olan 5 ml MRS besi ortamına %1 oranında inokülasyon yapılmıştır. Kültürler optimum gelişme koşullarında 48 saat inkübasyona bırakılmış ve laktik asit miktar tayininde bu kültürler kullanılmıştır. Çalışma çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir. İnkübasyondan sonra kültürlerin üzerine sırası ile 2 ml A çözeltisi (Bknz 3.1.5), 2 ml B çözeltisi, (Bknz 3.1.6), son olarak da 2 ml C çözeltisi (Bknz 3.1.7) eklenmiştir. Her çözelti eklendikten sonra örnekler vorteks yardımı ile tüpler iyice karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler Whatman 42 nolu filtre kâğıdından süzülerek, süzüntüden 1,5 ml alınıp ayrı bir erlene aktarılmış ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti iyice karıştırıldıktan sonra bu çözeltiden 10 ml alınarak ayrı bir tüp içerisine alınmıştır ve alınan çözelti üzerine 1 ml renk ayırıcı eklenmiştir. Ayıraç ilavesinden sonra örnekler tekrar vorteks yardımıyla karıştırılmış ve 5 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sürecin sonunda berrak sarı renk alan örnekler spektrofotometre (Shimadzu, UV-2101PC) yardımıyla 400 nm dalga boyunda okunmuştur. Elde edilen

optik yoğunluk (OD) değerleri, daha önceden hazırlanan, regresyon doğrusuna göre, mg/ml cinsinde laktik asit miktarına (LAM) çevrilmiştir (Mumcu, 1997).

Laktik asit miktarının hesaplanabilmesi için regresyon doğrusu çıkarılmıştır. Mumcu (1997)'nin yöntemi kullanılmıştır; saf laktik asit solüsyonundan 5 ml'lik MRS broth ortamı içeren tüplere sırası ile 1, 3, 8, 10, 12, 16 mg/ml olacak şekilde ayrı ayrı laktik asit ilavesi yapılarak laktik asit miktarı gittikçe artan bir solüsyon serisi elde edilmiştir. Elde edilen serideki her tüp birer izolat gibi düşünülüp, izolatlar için uygulanan işlemler bire bir standart çözeltilere de uygulanmış ve yine 400 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen OD değerleri ve bu değerleri sağlayan laktik asit konsantrasyonları grafik üzerine yerleştirilerek regresyon doğrusu çıkarılmıştır. Şekil 3.1'de çıkarılan regresyon doğrusu verilmiştir.



Şekil 3.1. Laktik asit miktarı regresyon doğrusu

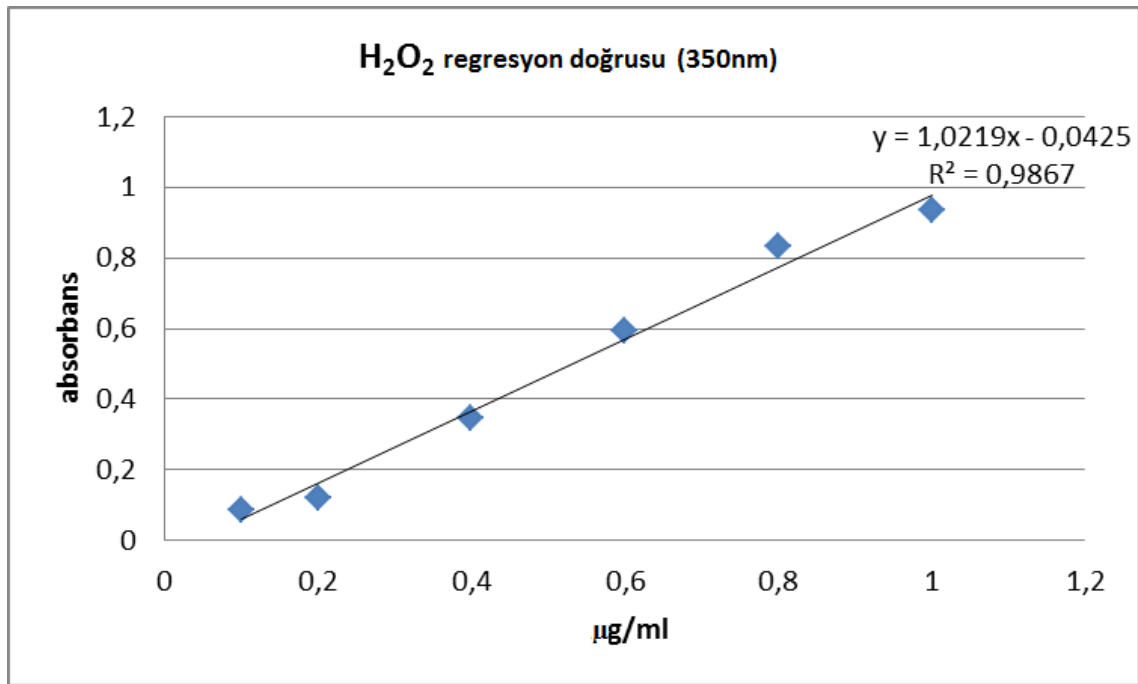
3.2.4.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2) üretiminin tayini

Hidrojen peroksit üretimi tayin edilecek olan izolatlar 5 ml MRS broth besiyerinde geliştirilmiş ve bu aktif kültürden tüplere hazırlanmış olan 5 ml MRS

broth ortamına %2 oranında inokülasyon yapılmıştır. Kùltürler 48 saat boyunca optimum gelişme koşullarında inkübasyona tabi tutulmuş ve hidrojen peroksit miktar tayininde bu kùltürler üzerinde yapılmıştır. Bu amaçla Mumcu (1997)'nin yöntemi kullanılmıştır. Çalışma çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kùltürlerin üzerlerine 5 ml distile su eklenerek kùltürler 5000 rpm de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte oluşan berrak sıvı alınarak Whatman 42 nolu filtre kâğıdından süz÷lm÷ştür.

Süz÷ntünün 4 ml'si ayrı bir tüpe alınarak üzerine sırası ile 0,5 ml sülfürik asit, 0,5 ml amonyum molibdat ve 0,5 ml potasyum iyodür çözeltisi ilave edilmiş, her kimyasal ilavesinden sonra örnekler vorteksle karıştırılmıştır. Elde edilen sıvının 350 nm dalga boyunda spektrofotometre de (Shimadzu, UV-2101PC) optik yoğunlukları belirlenmiştir. Elde edilen optik yoğunluk (OD) değerleri; daha önceden hazırlanan, regresyon doğrusuna göre µg/ml cinsinde hesaplanmıştır (Mumcu, 1997).

İzolatların ürettiği hidrojen peroksit miktarının hesaplanabilmesi Mumcu (1997)'nin yöntemi kullanılarak regresyon doğrusu çıkarılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. H₂O₂ miktarı regresyon doğrusu

Regresyon doğrusu çıkarmak için; 0,1 ml saf (% 35) hidrojen peroksit alınıp distile su ilavesi ile 30 ml' ye tamamlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiden 1 ml başka bir

erlene alınmış ve tekrar distile su ile 30 ml'ye tamamlanarak standart çözelti hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözelti bir izolat gibi düşünülüp, izolatlar için uygulanan işlemler bire bir standart çözeltiye de uygulanmış bu sayede hidrojen peroksit regresyon doğrusu çıkarılmıştır. Regresyon doğrusundan hareketle 1 mg/ml hidrojen peroksit karşılık gelen hidrojen peroksit değeri hesaplanmış ve izolatların okunan değerleri oluşturulan regresyon doğrusu ile kıyaslanarak mg/ml cinsine çevrilmiştir. Çizelge 3.4'te izolatların ürettiği hidrojen peroksit miktarını hesaplamak için çıkarılan regresyon doğrusu verilmiştir.

3.2.5. İzolatların aside toleransının belirlenmesi

Laktobasil izolatlarının düşük pH değerlerine toleransları araştırılmıştır. Bu amaçla, pH 2,5'e ayarlanmış 10 ml'lik MRS broth besiyerleri kullanılmıştır. Besiyerlerine her bir laktobasilden 10^9 kob/ml inoküle edilmiştir. Kontrol için inokülasyon yapılmayan besiyeri kullanılmıştır. İnkübasyonun 4. ve 24. saatlerindeki değişimler 620 nm (OD 620)'de ölçülmüştür. Canlılık testi için inokülasyonun 4. ve 24. saatinde pH 2,5 olan besiyerlerinden örnek alınarak MRS agarda kontrolleri yapılmıştır (Jacobbsen ve ark.,1999).

3.2.6. İzolatların hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi

Hemolitik aktivitenin belirlenmesi amacıyla, 37 °C'de 18 saat geliştirilen kültürlerden kanlı agar ortamına çizgi ekim yöntemiyle ekim yapılmıştır. Kontrol bakterisi olarak *E. coli* kullanılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra, kolonilerin etrafında, parlak-yeşil zon oluşturan koloniler α -hemolitik, berrak zon oluşturanlar β -hemolitik, zon oluşturmayanlar ise γ -hemolitik olarak değerlendirilmiştir (Maragkoudakis ve ark., 2006).

3.2.7. Antibiyotik duyarlılık testi

İzolatların çeşitli antibiyotiklere karşı olan direnç ve duyarlılık durumlarını belirlemek için Kirby-Bauer Disk-Difüzyon Metodu kullanılmıştır. Çalışma sırasında kullanılan antibiyotiklerin seçiminde daha önce bu konuda yapılmış olan mevcut çalışmalar temel alınmıştır. Çalışma çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Antibiyotik dirençlilik değerlendirmesi yapılacak olan izolatların MRS agar petrilinde geliştirilmiş olan 24–48 saatlik aktif kültürlerinden alınarak 1 ml fizyolojik tuzlu su içersinde dilüsyonları hazırlanmıştır. 1 ml fizyolojik tuzlu su ile Mc Farland No: 0,5 (10^8 kob/ml) bulanıklığına ayarlanmıştır. Hazırlanmış olan dilüsyonların her birinden 0,5 ml alınarak daha önceden hazırlanmış ve petrilere aktarılmış olan Müller Hinton agar ortamına, steril koşullar altında yayma plaka yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petrilere, steril koşullarda, kapakları açık biçimde 5–10 dakika süreyle bekletilerek yüzeylerinin kuruması sağlanmıştır. Ardından ticari olarak satılan ve belirlenmiş olan antibiyotik diskleri petrilere steril koşullarda, aralarında en az 1,5 cm boşluk olacak şekilde yerleştirilmiştir. Disklerin yerleştirilmesi işleminden sonra petiler 10–15 dakika süreyle bekletilmiş ve sonrasında test organizmasının optimum gelişme koşullarında 24–48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda petrilere oluşan inhibisyon zon çapları ölçülmüş ve değerlendirme yapılmıştır (Anonim, 1997; Rollins ve Joseph, 2000; Halami ve ark., 2000).

3.2.8. Antimikrobiyal aktivite tayini

Tükürük örneklerinden izole edilen laktobasillerin, Çizelge 3.1.'de belirtilen mikroorganizmalara karşı, antimikrobiyal aktivitesi kuyucuk yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2.8.1. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

Tükürük örneklerinden izole edilip saflaştırılan laktobasiller, MRS broth içeren tüplere ekilerek 48 saat süreyle optimum koşullarda geliştirilerek aktif hale getirilmiştir. Daha sonra aktif kültürlerden %1 oranında alınarak tekrar MRS broth içeren tüplere inokülasyon yapılmıştır. Aktarımı yapılan kültürler 48 saat süreyle optimum gelişme koşullarında inkübasyona tabi tutulmuş ve bu kültürler çalışma için kullanılmıştır. Müller Hinton agar besiyeri ve 7 ml'lik tüplerde yumuşak BHI agar (% 0,7 agar içeren BHI Agar) besiyerleri hazırlanmıştır. Petrilereki Müller Hinton agara 3mm çapında delikler açılmıştır. Açılan deliklere hazırlanan LAB kültürlerinden 80-90 µl eklenmiştir. Hazırlanan yumuşak BHI Agar besi ortamları 45 °C' ye kadar soğutulduktan sonra besi ortamına; test bakterisinin Nutrient broth ortamında hazırlanmış ve Mc Farland No: 0,5 (10^8 kob/ml) göre yoğunluğu ayarlanmış sıvı kültüründen 10 µl inoküle edilmiştir. Besi ortamı iyice karıştırıldıktan sonra, Müller Hinton Agar besiyerinin üzerine dökülmüştür.

Petriler içerdikleri test mikroorganizmasının optimum gelişme sıcaklığında 24 saat süreyle inkübasyona tabi tutulduktan sonra, sonuçlar; laktik asit bakterileri etrafında oluşan zonların çapları ölçülerek değerlendirilmiştir (Schillinger ve Lücke,1989). Çalışma her izolat için çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.2. Süpernatantın antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

Tükürük örneklerinden izole edilip saflaştırılan laktobasiller, MRS broth içeren tüplere ekilerek 48 saat süreyle optimum koşullarda (30°C’de aerobik, 30°C’de anaerobik ya da 42°C’de aerobik koşullarda) geliştirilerek aktif hale getirilmiştir. Daha sonra aktif kültürlerden %1 oranında alınarak tekrar MRS broth içeren tüplere 1 ml inokülasyon yapılmıştır. Aktarımı yapılan kültürler 48 saat süreyle optimum gelişme koşullarında inkübasyona tabi tutulmuş ve bu kültürler çalışma için kullanılmıştır. MRS broth içerisindeki LAB kültürü 5000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatantları alınmıştır. Alınan süpernatantların pH’sı 10 N NaOH ile pH 6,5’e ayarlanmıştır ve 0,22 µm steril selüloz membran filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir. Müller Hinton agar besiyeri ve 7ml lik tüplerde yumuşak BHI agar (% 0,7 agar içeren BHI Agar) besiyerleri hazırlanmıştır. Petrilerdeki Müller Hinton agara 3mm lik delikler açılmıştır. Açılan deliklere hazırlanan LAB süpernatantlarından 80-90 µl eklenmiştir. Hazırlanan yumuşak BHI Agar besi ortamları 45°C’ye kadar soğutulduktan sonra besi ortamına; test bakterisinin Nutrient broth ortamında hazırlanmış ve Mc Farland No: 0,5 (10^8 kob/ml) göre yoğunluğu ayarlanmış sıvı kültüründen 10 µl inoküle edilmiştir. Besi ortamı iyice karıştırıldıktan sonra, Müller Hinton Agar besiyerinin üzerine dökülmüştür. Petriler içerdikleri test mikroorganizmasının optimum gelişme sıcaklığında (Çizelge 3.2.) 24 saat süreyle inkübasyona tabi tutulduktan sonra, sonuçlar; laktik asit bakterileri etrafında oluşan zonların çapları ölçülerek değerlendirilmiştir (Schillinger ve Lücke, 1989). Çalışma her izolat için çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Aynı işlemler süpernatantın pH değeri 6,5’e ayarlanmadan da yapılmıştır.

3.2.9. Laktobasil izolatlarının *S. mutans*’a karşı tutunma yüzeyleri için oluşturduğu rekabetin diş yüzeyinde incelenmesi

Tutunma deneyleri için Ondokuzmayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalı tarafından sağlanan sağlıklı diş örnekleri kullanılmıştır.

Yumuşak doku artıklarından temizlenmiş dişler deney başlayıncaya kadar serum fizyolojik içerisinde bekletilmiştir. Bu amaçla iki farklı yöntemden yararlanılmış ve işlemler iki defa tekrarlanmıştır.

Birinci yöntemde Erten'in kullandığı yöntem uygulanmıştır (Erten, 2005). Deneyden önce kullanılacak olan yapay tükürük, fizyolojik tuzlu su (FTS) ve fosfatla tamponlanmış salin (PBS) hazırlanmıştır. Diğer mikrobiyolojik malzemeler hazır olarak kullanılmıştır.

Diş örnekleri FTS (Fizyolojik tuzlu su) içinde 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiş ve deney günü steril yapay tükürük içerisinde 37 °C'de 30 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda steril pens ile alınan diş örneklerinin steril kurutma kağıdında suyu giderilmiş ve aseptik şartlarda 3 diş bir falkonda olacak şekilde başlangıç sayısı bilinen laktobasil süspansiyonunun içerisine bırakılmıştır. Diş örnekleri 4 saatlik inkübasyon sonunda steril pens ile alınarak başlangıç sayısı bilinen streptokok süspansiyonunun içerisine bırakılmıştır. Burada da 4 saatlik inkübasyon tamamlandıktan sonra diş örneklerinin suyu steril kurutma kağıdında giderilmiş ve 10 ml'lik steril PBS içerisine aktarılmıştır. Diş yüzeyine tutunan hücrelerin PBS içine dağılması için 1 dakika süreyle vorteksle hızla karıştırılmıştır. Buradan içerisinde PBS bulunan ependorf tüpler kullanılarak 10⁶'ya kadar seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Laktobasiller için MRS agar besiyerine ve streptokoklar için MS agar besiyerine damla kültür yöntemiyle ekim yapılmıştır (Karahan ve ark., 2002). 37 °C'de 48 saat inkübasyondan sonra sayım yapılarak sayım sonuçları değerlendirilmiştir.

Bu deneye paralel olarak başlangıç laktobasil ve streptokok yoğunluklarının belirlenmesi amacıyla bakteri kültürünün bulunduğu falkonlar 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek PBS ile iki kez yıkanmıştır. Pellet 10 ml PBS ile sulandırılarak 10¹⁰'a kadar dilüsyonlar hazırlanmıştır. Laktobasiller için MRS agara streptokoklar için MS agara damla kültür yöntemiyle ekimler yapılarak başlangıç bakteri yoğunlukları belirlenmiştir.

İkinci yöntemde ise aktif haldeki laktobasil kültüründen 10 ml'lik MRS sıvı besiyerine streptokoklardan ise BHI sıvı besiyerine %2 oranında inoküle edilmiş ve 37 °C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler 5000 d/dk'da 5 dakika santrifüj edilerek pellet iki kez steril PBS ile yıkanmıştır. Her yıkamadan sonra santrifüj işlemleri tekrarlanmıştır. Pellet tekrar 5 ml PBS içinde süspanse edilerek diş yüzeyinde laktobasillerin streptokoklara karşı etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan

denemelerde kullanılmıştır. Dişlerin kuron kısımlarında 25 mm² lik bir alan işaretlenmiş ve bu alanın dışındaki kısımlar otoklav bandı ile kaplanmıştır. Dişlerin her biri ayrı petri kutularında steril edilmiştir. Belirlenen alanlara başlangıç hücre konsantrasyonu bilinen laktobasil süspansiyonundan 20 µl aktararak 37 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İşaretlenmiş bölge tamamen kuruduktan sonra steril FTS ile yıkama yapılmış ve aynı alana başlangıç hücre konsantrasyonu belli olan streptokok süspansiyonundan 20 µl aktarılmıştır. 37 °C’de 30 dakika inkübasyondan sonra dişler steril FTS ile yıkanmıştır. Daha sonra dişler steril FTS içine alınarak hızlıca karıştırılmış ve seri dilüsyonlar yapılarak laktobasiller için MRS agar besiyerine, streptokoklar için ise MS agar besiyerine damla kültür yöntemiyle ekim yapılmıştır. 37 °C’de 48 saat inkübasyon süresinden sonra sayım yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.10. Laktobasil varlığında diş yüzeyine tutunan *S. mutans* sayısının, laktobasillerin oluşturduğu laktikasit miktarı, hidrojen peroksit miktarı ve pH ile korelasyonunun araştırılması

Laktobasil izolatlarının ürettikleri laktik asit miktarları, hidrojen peroksit miktarları ve pH (Bknz. Çizelge 4.9) ile laktobasil varlığında diş yüzeyine tutunan *S. mutans* sayısı (Bknz. Çizelge 4.12) arasında korelasyonun olup olmadığı SPSS analiziyle belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Örnek Alınan Bireylere Ait Bilgiler

Çalışmada kullanılan tükürük örnekleri ağızda dolgu olmayan tesadüfi yöntemle seçilen, 30 (12'si kız, 18'i erkek) lise öğrencisinden alınmıştır. Örnek alınan bireylere uygulanan anket formu Çizelge 4.1.'de sunulmuştur. Öğrencilerin beslenme alışkanlıkları ve ağız sağlığını korumaya yönelik tercihleri uygulanan ankete göre belirlenerek Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Örnek alınan bireylere uygulanan anket formu

Adı Soyadı :				
Cinsiyeti				
Yaşı:				
1. Son altı ay içinde herhangi bir tedavi gördü mü?				
2. Son üç ay içinde kullandığı ilaçlar (özellikle antibiyotikler)				
3. Diş fırçalama alışkanlığı var mı?				
4. Diş fırçalama sıklığı nedir?				
5. Diğer dental hijyen araçlarından herhangi birini kullanıyor mu? a. Diş ipi b. Arayüz fırçası c. Köprüaltı ipi d. Ağız çalkalama solüsyonları e. Diğer				
6. Xylitol içeren ürünleri kullanıyor mu?				
7. Kötü alışkanlıkları var mı? a. Alkol b. Sigara c. Diğer				
8. Tüketilen besinler				
Et ve ürünleri	Az Tüketiyor	Orta derece tüketiyor	Çok Tüketiyor	Tüketmiyor
Hamur işi ve Tatlılar				
Meyve ve sebze				
İçme sütü				
Peynir				
Yoğurt				
Dondurma ve diğer süt ürünleri				
9.En son (ne zaman) tüketilen süt ürünü ve miktarı:				
10. Ailenin gelir durumu a.normal b. yüksek c. düşük				
Adres ve Tel. no:				

Çizelge 4.2. Bireylerin beslenme alışkanlıkları ve ağız sağlığını korumaya yönelik tercihleri

N o	E	H	MS	S	P	Y	D	En son tüketilen süt lülü gıdalar	Diş fırçalama sıklığı
1	Ç	Ç	Ç	A	N	N	N	Önceki akşam sütü tatlı	Ara sıra
2	A	A	A	N	N	Ç	N	Önceki gün yoğurt	Günde 2 kez
3	N	A	N	-	Ç	N	Ç	Önceki gün yoğurt	Ara sıra
4	Ç	N	Ç	N	N	N	Ç	Önceki gün yoğurt	Ara sıra
5	Ç	Ç	N	A	Ç	N	Ç	Önceki gün sütlaç	Günde 2 kez
6	N	N	N	A	Ç	N	N	Önceki akşam bir bardak süt	Sabah-akşam
7	Ç	Ç	Ç	A	A	N	Ç	Önceki gün sütlaç	Sabah-akşam
8	A	A	N	N	N	Ç	N	Önceki akşam bir bardak süt	Günde 3 kez
9	N	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	N	Önceki akşam yoğurt	Günde 2 kez
10	N	Ç	A	Ç	N	N	Ç	Her sabah süt	Nadir
11	A	N	Ç	N	N	N	Ç	Önceki akşam ayran	Nadir
12	Ç	N	Ç	N	N	N	N	Önceki gün ayran	Günde 2 kez
13	N	Ç	Ç	Ç	N	Ç	Ç	Önceki gün ayran	Günde 1 kez
14	Ç	N	N	-	Ç	Ç	Ç	Hatırlamıyor	Günde2-3kez
15	N	A	Ç	A	Ç	Ç	Ç	Sabahbir parça peynir	Günde 2 kez
16	N	N	N	N	Ç	Ç	Ç	hatırlamıyor	Günde 2 kez
17	N	A	N	N	N	A	N	hatırlamıyor	Günde 2 kez
18	N	N	N	N	N	A	N	2 saat önce dondurma	Günde 2 kez
19	N	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	A	Sabah 2 bardak süt	Günde 2 kez
20	N	N	N	N	Ç	Ç	Ç	Önceki gün kakao süt	Günde3 kez
21	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	2 bardak süt	3 günde bir
22	-	Ç	N	N	Ç	Ç	Ç	hatırlamıyor	Günde 2 kez
23	N	A	N	A	Ç	N	N	hatırlamıyor	Günde 1 kez
24	N	N	Ç	N	Ç	N	Ç	hatırlamıyor	Günde 3 kez
25	N	-	N	N	N	N	N	Sabah 1 parça peynir	Günde 3 kez
26	N	N	Ç	A	N	Ç	Ç	Dondurma	Günde 1 kez
27	N	Ç	Ç	A	A	N	N	1 kase yoğurt	Günde 1 kez
28	N	Ç	N	Ç	N	Ç	N	hatırlamıyor	Günde 2 kez
29	N	N	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	hatırlamıyor	Günde 2 kez
30	N	A	Ç	Ç	N	N	Ç	hatırlamıyor	Günde 2 kez

(E: Et ve et ürünleri, HT: hamur işi ve tatlılar MS: meyve ve sebze S: süt, P: peynir Y:yoğurt D: dondurma. N: normal, A: az, Ç: çok, -: tüketmiyor).

Anket uygulanan bireylerin %43,3'ü önceki gün, %16,7'si de örneğin alındığı gün süt ve süt ürünü tüketmişlerdir.Yapılan anketten elde edilen bilgilere göre örnek alınan bireylerin et yeme alışkanlıkları oranı; %23,3'ü çok tüketiyor, %10'u az tüketiyor,

%63,3'u normal miktarda, %3,3'ü tüketmiyor şeklindedir. Hamur işi ve tatlı yeme alışkanlıkları oranı; %36,7'si çok tüketiyor, %23,3'ü az tüketiyor, %36,7'si normal miktarda, %3,3'ü tüketmiyor şeklindedir. Meyve sebze yeme alışkanlıkları oranı; %50'si çok tüketiyor, %6,7'si az tüketiyor, %43,3'ü normal miktarda tüketiyor şeklindedir.

Süt içme alışkanlıkları oranı; %26,7'si çok tüketiyor, %26,7'si az tüketiyor, %40'ı normal miktarda tüketiyor şeklinde, peynir yeme alışkanlıkları oranı; %46,7'si çok tüketiyor, %6,7'si az tüketiyor, %46,7'si normal miktarda tüketiyor şeklindedir. Yoğurt yeme alışkanlıkları oranı; %46,7'si çok tüketiyor, %6,7'si az tüketiyor, %46,7'si normal miktarda tüketiyor şeklinde, dondurma yeme alışkanlıkları oranı; %56,7'si çok tüketiyor, %3,3'ü az tüketiyor, %40'ı normal miktarda tüketiyor şeklindedir.

Örnek alınan bireylerin diş fırçalama alışkanlıkları şu şekildedir; %80'ı günde 1-3 kez dişlerini fırçalarken %20'si ara sıra dişlerini fırçalamaktadır.

4.2. İzolasyon Sonuçları

İzolatların seçiminde MRS agarda laktobasillere özgü krem renkli, mat ve düzgün kenarlı kolonilere öncelik verilmiştir. İzolasyon sonucunda 35 adedi MRS agardan 48'i diğer besiyerlerinden olmak üzere toplam 83 izolat elde edilmiştir. Çalışmalara MRS agar üzerinden elde edilen izolatlarla devam edilmiştir. Laktobasil olup olmadıklarını belirlemek için diğer testler uygulanmıştır.

Saflık kontrolü yapılan izolatların mikroskopik görünümü, gram reaksiyonu ve katalaz aktiviteleri incelenmiştir. Çeşitli boyutlarda çubuk şekilli, spor oluşturmayan, gram pozitif ve katalaz negatif izolatlar laktobasil olarak değerlendirilmiştir.

4.2.1. İzolatlara yapılan tanı testleri sonuçları

Laktobasil izolatların PH 3,9'da gelişim, pH 9,6'da gelişim, TSI testi, %6, %7,5, %10 tuzda gelişim sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Test sonuçlarına bakıldığında; İzolatların tamamının pH 3,9'da ve pH 9,6'da geliştiği gözlenmiştir.

Laktobasil izolatlarının tamamının H₂S oluşturduğu gözlenmiştir.

İzolatların %6 tuz oranında geliştiği ancak 20LB, 28LB'nin gelişmediği, 19L1A ve 4L2'nin ise az geliştiği belirlenmiştir. 21L2, 28LA, 16LA, 14L1, 8L1C, 9L2B, 7L1, 5L1A, 5L1B, 4L1A, 4L1B'nin %7,5 tuz oranında gelişebildiği, 6L1'in az geliştiği, diğerlerinin ise gelişemediği belirlenmiştir. %10 tuz oranında ise sadece 16LA'nın

gelişebildiği, 6L1, 7L1, 21L2, 28LA'nın az geliştiği diğerlerinin ise gelişemediği belirlenmiştir. Çizelge 4.4'de farklı sıcaklıklarda gelişim, metil red testi ve arjininden amonyak oluşumu test bulguları verilmiştir.

Çizelge 4.3. İzolatların bazı fizyolojik özellikleri

İzoalt adı	pH 3,9'da gelişim	pH 9,6'da gelişim	TSI testi	%6 tuzda gelişim	%7,5tuzda gelişim	%10tuzda gelişim
4L1A	+	+	+	+	+	-
4L1B	+	+	+	+	+	-
4L2	+	+	+	*	-	-
5L1A	+	+	+	+	+	-
5L1B	+	+	+	+	+	-
6L1	+	+	+	+	*	*
7L1	+	+	+	+	+	*
8L1A	+	+	+	+	-	-
8L1B	+	+	+	+	-	-
8L1C	+	+	+	+	+	-
9L2B	+	+	+	+	+	-
13L1A	+	+	+	+	-	-
13L1B	+	+	+	+	-	-
14L1	+	+	+	+	+	-
16LA	+	+	+	+	+	+
19L1A	+	+	+	*	-	-
19L2A	+	+	+	+	-	-
19L2AX	+	+	+	+	-	-
19L2B	+	+	+	+	-	-
20LB	+	+	+	-	-	-
20L2A	+	+	+	+	-	-
21L2	+	+	+	+	+	*
28LA	+	+	+	+	+	*
28LB	+	+	+	-	-	-
28LBX	+	+	+	+	-	-

(+:gelişen, - gelişmeyen, *, az gelişen/belirlenemeyen)

Çizelge 4.4. Farklı sıcaklıklarda gelişim, metil red testi ve arjininden amonyak oluşumu test bulguları

Izolat adı	4°C	15°C	45°C	Metil red testi	Arjininden amonyak oluşumu
4L2	+	+	+	+	-
4L1B	+	+	+	+	-
4L1A	+	+	+	+	-
5L1A	+	+	+	+	-
5L1B	+	+	+	+	-
7L1	+	+	+	+	-
8L1B	+	+	+	+	-
8L1C	+	+	+	+	-
8LA	+	+	+	+	-
8L1	+	+	+	+	-
9L2B	+	+	+	+	-
13L1A	+	+	+	+	+
13L1B	+	+	+	+	+
14L1B	+	+	+	+	-
14L1	+	+	+	+	-
16LA	+	+	-	+	-
18LA	+	+	+	+	+
19L2B	+	+	+	+	-
19L2AX	+	+	+	+	-
19L2A	+	+	-	+	-
19L1A	+	+	+	+	-
20L2A	+	+	+	+	-
20LB	+	+	+	+	-
21L2	+	+	+	+	-
28LBX	+	+	+	+	-
28LB2	+	+	+	+	-
3L1	+	+	+	+	-
11L1	+	+	+	+	-
6L1	+	+	+	+	-
9L1	+	+	+	+	-
15L1	+	+	+	+	-
17L1	+	+	+	+	-
28LA	-	+	+	+	-

(+:gelişen, - gelişmeyen)

İzolatların tamamının 4°C’de ve 15°C’de gelişebildiği, 19L2A ve 16LA haricindekilerin de 45°C’de gelişebildiği gözlenmiştir. İzolatların tamamının glikozu fermentatif olarak hidrolize edebilmişlerdir. Fermantasyon sonucu asit oluşturdıkları da metil kırmızısı testinden belirlenmiştir. Laktobasil izolatlarından 13L1A, 13L1B, 18LA dışındakilerin arjininden amonyak oluşturma yeteneğine sahip olmadıkları belirlenmiştir.

4.3. İzolatların API CHL50 İle Tanımlanması Sonuçları

API CHL50 ile tanımlama est sonuçları Çizelge 4.5’de verilmiştir.

API CHL50 test sonuçları üretici firma tarafından optimize edilmiş olan veri tabanına girilerek tür tayinleri gerçekleştirilmiştir. İzolatlardan 18 tanesinin (4L2, 4L1B, 4L1A, 5L1A, 5L1B, 7L1, 8LA, 8L1, 6L1, 9L1, 14L1B, 16LA, 18LA, 19L2AX, 19L2A, 19L1A, 20L2A, 28LBX) %99,9 olasılıkla *Lactobacillus plantarum* olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 8L1B’nin %99,5, 28LA’nın %93,4, 15L1 ve 17L1’in %99,9 13L1A’nın %73,1 olasılıkla *Lactobacillus plantarum* olduğu tespit edilmiştir. Böylece API CHL50 Sistemi ile izolatların %80’e yakınının *Lactobacillus plantarum* olduğu, geri kalanlardan 8L1C’nin %59,5 *Lactobacillus pentosus* veya %40,4 *Lactobacillus plantarum*, 13L1B’nin 13L1B’nin *Lactobacillus pentosus*, 11LB’nin %83,4 *Lactobacillus paracasei ssp paracasei*, 28LB2’nin *Lactobacillus rhamnosus* olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. İzolatların API CHL 50 ile tanımlanması testlerinin sonuçları

Mikroorganizma	API CHL50 Sistemi Test Sonucu
4L2	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
4L1B	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
4L1A	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
5L1A	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
5L1B	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
7L1	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
8L1B	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,5
8L1C	<i>Lactobacillus pentosus</i> %59,5 <i>L. plantarum</i> %40,4
8LA	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
8L1	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
13L1A	<i>Lactobacillus plantarum</i> % 73,1 veya <i>L. pentosus</i> %26,8
13L1B	<i>Lactobacillus pentosus</i>
14L1B	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
16LA	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
18LA	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
19L2B	<i>Lactobacillus plantarum</i> veya <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
19L2AX	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
19L2A	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
19L1A	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
20L2A	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
20LB	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
21L2	<i>Lactobacillus plantarum</i> veya <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
28LBX	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
28LB2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
3L1	<i>Lactobacillus pentosus</i> %84,2 <i>Lactobacillus plantarum</i> %15,5
11L1	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> %83,4
6L1	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
9L1	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,9
15L1	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,0
17L1	<i>Lactobacillus plantarum</i> %99,0
28LA	<i>Lactobacillus plantarum</i> %93,4 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> %6,5

4.4. İzolatların Dizi Analizi Sonuçları

İzolatların 16S rRNA gen bölgesine göre dizi analizi 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' ve 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' evrensel primerleri kullanılarak BM Laboratuvar Sistemleri'ne yaptırılmıştır. Elde edilen dizi bilgileri BioEdit 7.0.5.3 dizi hizalama ve editleme programında düzenlenmiş ve birleştirilmiştir. Ardından National Center for Biotechnology (NCBI) web sitesinde bulunan GenBank veritabanındaki diğer 16S rRNA dizileriyle Blast programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. İzolatların tür düzeyinde tanınması yüzde benzerlik oranıyla belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Dizi analizi sonuçları

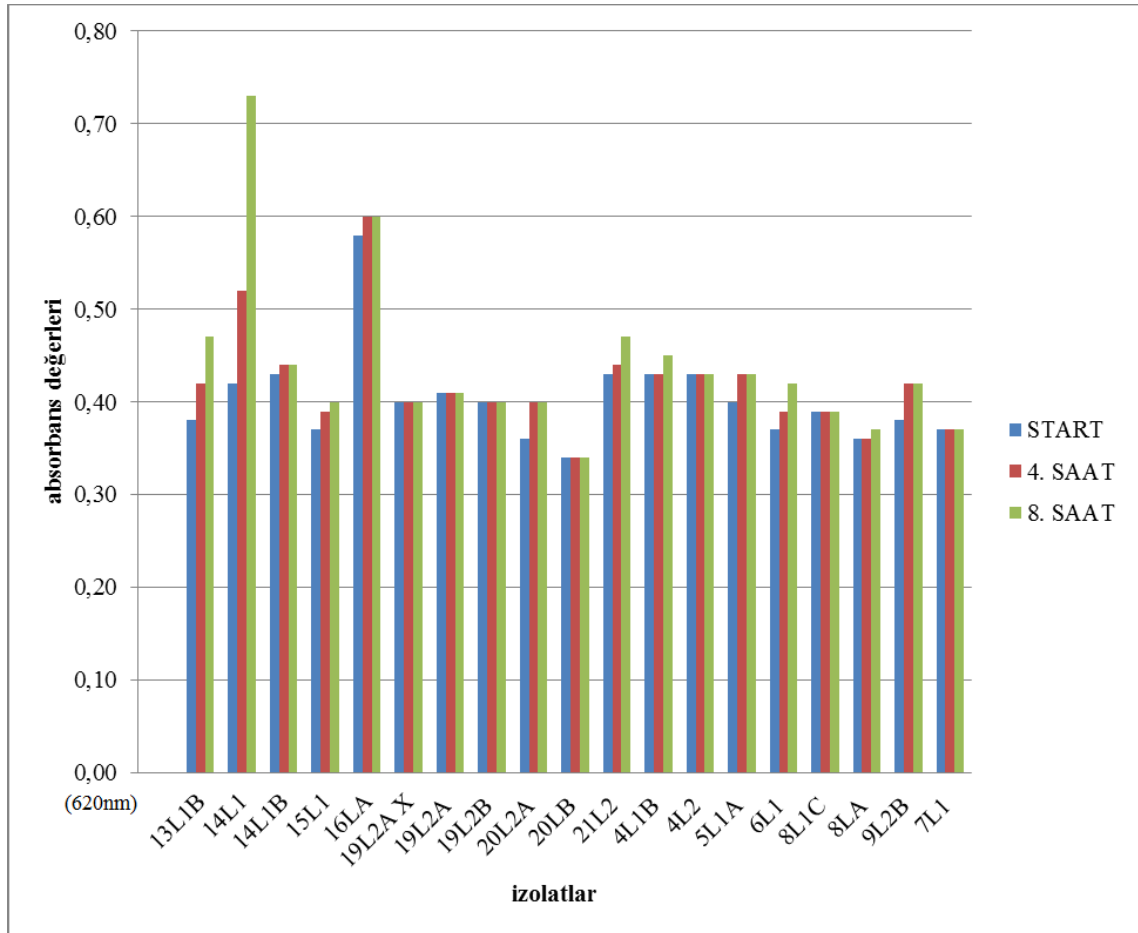
İzolat Numarası	16s rRNA sonucu	% benzerlik	Accession
13L1B	<i>L. plantarum</i>	96	KM485577.1
14L1	<i>L. plantarum</i>	97	KM495871.1
14L1B	<i>L. plantarum</i>	98	EU626013.1
15L1	<i>L. plantarum</i>	97	JN039358.1
16LA	<i>L. plantarum</i>	98	KC815025.1
19L2AX	<i>L. plantarum</i>	98	EU419597.1
19L2A	<i>L. plantarum</i>	96	EU626013.1
19L2B	<i>L. plantarum</i>	98	KM495856.1
20L2A	<i>L. plantarum</i>	97	EU419598.1
20LB	<i>L. plantarum</i>	98	EU419598.1
21L2	<i>L. plantarum</i>	97	KM485570.1
4L1B	<i>L. plantarum</i>	95	KC422320.1
4L2	<i>L. plantarum</i>	97	EU419598.1
5L1A	<i>L. plantarum</i>	97	KM495865.1
6L1	<i>L. plantarum</i>	97	KJ801851.1
8L1C	<i>L. plantarum</i>	97	KM495865.1
8LA	<i>L. plantarum</i>	96	EU419598.1
9L2B	<i>L. plantarum</i>	97	KM485570.1
7L1	<i>L. plantarum</i>	96	HQ259243.1

Dizi analizine gönderilen 19 tür, *Lactobacillus plantarum* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.6).

4.5. Aside Toleransın Belirlenmesi Deneyinin Sonuçları

Laktobasil suşlarının düşük pH değerlerine toleransları araştırılmıştır. Bu amaçla, pH 2,5'e ayarlanan gelişme ortamında izolatların 4. saat ve 24. saatteki canlılıklarına bakılmış, tamamının canlılığının devam ettiği gözlenmiştir. Probiyotik mikroorganizmaların midedeki asitte canlı kalarak barsaklara geçebilmesi önemlidir. Midede kalma süresi ortalama 4 saattir.

İzolatların başlangıçta, 4.saatte ve 8.saatte 620 nm'de ölçülen optik yoğunlukları da Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Buna göre; izolatlardan 13L1B, 14L1B, 20L2A, 21L2, 6L1 ve 9L2B'nin optik yoğunluklarının 4.saatte ve 8.saatte başlangıç değerinden az da olsa arttığı gözlenmiştir. Bu da izolatların bu ortamda ürediğini göstermektedir.



Şekil 4.1. İzolatların aside tolerans deneyi sonuçları

4.6. İzolatların pH ve Metabolik Ürün Tayini Sonuçları

İzolatların pH ve metabolik ürün tayini sonuçları Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. İzolatların pH değeri, laktik asit miktarı , hidrojen peroksit miktarı

İzolat no	pH	Laktik Asit Miktarı (mg/ml)	Hidrojen Peroksit Miktarı (µg/ml)
4L2	3,69	7,948 ±0,004	0,0700±0,004
4L1A	3,82	7,845 ±0,013	0,0690±0,002
5L1A	3,71	7,974 ±0,011	0,0709±0,003
5L1B	3,99	12,093 ±0,026	0,0690±0,001
7L1	3,83	4,632 ±0,018	0,0680±0,001
8L1B	4,01	15,228 ±0,014	0,1189±0,001
8L1C	3,79	12,637±0,013	0,1443±0,001
8LA	3,65	11,238±0,052	0,0690±0,001
8L1	3,84	11,756±0,011	0,0739±0,001
9L2B	3,92	8,751±0,008	0,0533±0,001
13L1A	3,88	9,684±0,010	0,0856±0,058
13L1B	3,64	14,606±0,009	0,1620±0,004
14L1B	3,98	11,964±0,012	0,1120±0,006
14L1	3,80	11,782±0,006	0,1160±0,004
16LA	4,10	7,611±0,006	0,0739±0,002
18LA	3,80	6,653±0,002	0,0700±0,001
19L2B	3,60	6,109±0,008	0,0788±0,004
19L2AX	3,62	15,021±0,016	0,0690±0,004
19L2A	3,63	15,228±0,004	0,0729±0,006
19L1A	3,65	15,098±0,010	0,0680±0,003
20L2A	3,69	14,762±0,009	0,1796±0,008
28LA	3,92	15,513±0,001	0,1257±0,092
21L2	3,64	12,767±0,032	0,1003±0,003
28LBX	4,04	14,736±0,011	0,0768±0,008
28LB2	4,03	15,047±0,006	0,0778±0,006
3L1	3,61	9,399±0,017	0,0974±0,008
11L1	4,10	15,306±0,012	0,1160±0,006
6L1	3,91	11,990±0,008	0,1179±0,002
9L1	3,90	10,409±0,006	0,0426±0,005
15L1	3,70	9,995±0,005	0,0729±0,001

İzolatların ürettiği laktik asit miktarı Şekil 3.1'deki, hidrojen peroksit miktarı ise Şekil 3.2'deki regresyon doğrularına göre hesaplanmıştır. Deney sonuçlarına göre; izolatların pH değeri en düşük 3,60 ile 19L2B'dir. En yüksek pH değeri 4,10 olarak 11L1 izolatına aittir. İzolatların ürettikleri laktik asit miktarları 4,632-15,306 mg/ml aralığında bulunmuştur. Endüşük değer 7L1'e aittir. Enyüksek değer 28LA ya aittir. İzolatların ürettikleri H₂O₂ miktarları ise 0,0426-0,1796 µg/ml aralığında belirlenmiştir; endüşük değer 9L1'e aittir, en yüksek değer de 20L2A'ya aittir.

4.7. Hemolitik Aktivite Belirlenmesi Sonuçları

Kanlı agarda *E. coli* kolonilerinin çevresinde parlak-yeşil zon (α -hemolitik), *Staphylococcus aureus* kolonilerinin çevresinde berrak zon (β -hemolitik) gözlenirken Laktobasil kolonilerinin etrafında zon oluşumu gözlenmemiştir (γ -hemolitik). Probiyotik olarak kullanım potansiyeli olan mikroorganizmaların, hemolize neden olmayan γ -hemolitik suşlar olması gerekmektedir (Maragkoudakis ve ark., 2006, Mourad ve Nour-Eddine 2006). Çalışmamızda denenen tüm laktobasil izolatları γ -hemolitikdir.

4.8. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları

Yapılan çalışmada disk difüzyon yönteminin bulgularına göre; izolatların tamamının vankomisin (VA)'e dirençli olduğu gözlenmiştir. İzolatların 14 tanesinin (4L1B, 4L2, 5L1A, 5L1B, 8L1A, 8L1B, 8L1C, 9L2B 13L1A, 14L1, 19L2A, 19L2AX, 19L2B, 21L2) Klindamisin (CC)'e dirençli olduğu gözlenmiştir. İzolatların 12 tanesinin (4L1B, 4L2, 5L1B, 8L1A, 8L1C, 9L2B 13L1A, 14L1, 16LA, 19L1A, 20L2A, 21L2) Siproflksasin (CİP) dirençli olduğu gözlenmiştir. İzolatlardan 1 tanesinin (19L2A), sefotaksim (CTX)'e dirençli olduğu belirlenmiştir. İzolatlardan 19L1A tetrasiklin (TE)'e dirençli olarak, 7L1'in ise gentamisin (GE)'e dirençli olduğu gözlenmiştir.

Probiyotik izolatlar için en önemli özellik transfer edilebilir antibiyotik direnç geni taşıyor olmasıdır (Duncan, 2003). Antibiyotik direnç geninin plasmid ya da transpozonlar gibi taşınabilir genetik elementlerde mi yoksa asıl kromozom üstünde mi olduğu saptanmalıdır (Saarela ve ark., 2000). Çeşitli çalışmalarda, laktobasillerin

vankomisine karşı dirençli oldukları saptanmıştır. (Charteris ve ark, 1998; Temmerman ve ark., 2002, Zhou ve ark., 2005, Kastner ve ark., 2006; Maragkoudakis ve ark., 2006). Vankomisin, çoklu ilaç direnci taşıyan patojenlerin neden olduğu klinik enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir. Laktik asit bakterilerinde vankomisin direncinin yatay gen transferi yolu ile aktarılmayan, kromozom kodlu bir özellik olduğu tespit edilmiştir (Zhou ve ark., 2005; Klare ve ark., 2007).

Çizelge 4.8’de antibiyotik duyarlılık testi sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.8. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları

İzolat no	CİP	VA	CC	CTX	TE	E	C	GM
4L1B	R	R	R	15	11	16	14	11
4L2	R	R	R	16	10	15	13	12
5L1A	8	R	R	15	9	15	12	11
5L1B	R	R	R	14	10	16	11	10
6L1	7	R	12	4	10	13	10	9
7L1	3	R	3	10	8	15	10	R
8L1A	R	R	R	6	5	13	7	6
8L1B	5	R	R	15	9	14	11	10
8L1C	R	R	R	9	6	15	9	9
9L2B	R	R	R	11	5	14	11	9
13L1A	R	R	R	7	7	15	11	7
13L1B	8	R	8	5	7	9	6	5
14L1	R	R	R	15	8	15	10	8
16LA	R	R	4	12	7	14	12	9
19L1A	R	R	10	10	R	13	11	11
19L2A	4	R	R	R	7	8	7	7
19L2AX	5	R	R	5	5	13	9	8
19L2B	3	R	R	13	9	13	11	11
20LB	8	R	15	6	8	15	11	4
20L2A	R	R	3	5	9	14	12	4
21L2	R	R	R	4	4	13	8	4
28LA	10	R	10	4	15	17	15	10
28LB	7	R	7	3	13	15	10	7
28LBX	3	R	3	7	5	15	3	7

(Sonuçlar mm cinsinde verilmistir. R: dirençli, Siproflxasin :CİP,Vankomisin :VA, Klindamisin :CC, Sefotaksim: CTX, Tetrasiklin :TE, Eritromisin :E, Kloramfenikol :C, Gentamisin:GM)

4.9. Antimikrobiyal Aktivite Tespiti Sonuçları

15-18 yaş arası bireylerin tükürüklerinden elde edilen 30 adet laktobasil izolatının tamamı agar difüzyon yöntemi ile Çizelge 3.2’de verilen test bakterilerine karşı denenmiştir. 30 laktobasil izolatın hemen tamamının test bakterilerinden *Candida*’lar hariç diğerlerine karşı etkili olduğu agar difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.

Antimikrobiyal madde tespiti için uygulanan yöntemde laktobasil izolatlarının saf filtratlarının düşük olan pH’sı test sırasında pH 6,5’e ayarlanmıştır. Bu şekilde yapılan denemeler sonucunda laktobasil filtratlarından hiçbirisi test mikroorganizmalarına karşı zon oluşturmamıştır. Ancak pH 6,5’e ayarlanmadan aynı deney yapıldığında kuyucuklara konulan izolatların etrafında zon oluşumu gözlenmiştir. Buna dayanarak, antagonistik etkinin aside bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Ağız mikrobiotasında bulunan laktobasillerin asit üretimleri nedeniyle diş çürümesine yol açtıkları düşünülse de, bazı durumlarda laktobasiller çürük oluşturan bakterileri inhibe ederek ve diş yüzeyine tutunma özelliği açısından onlarla rekabete girerek faydalı rol oynarlar (Michalek ve ark., 1981). Çürük oluşturan patojenlere karşı inhibisyon gösterme özelliği ağız probiyotiği olarak kullanılacak bakteriler için aranan bir durumdur.

Proteus vulgaris, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* ve *Staphylococcus aureus*’a karşı izolatların tamamı antagonistik etki göstermiştir. *Bacillus subtilis*’e karşı 7L1, 13L2A, 19L3 haricindeki izolatlar, *Listeria monocytogenes*’e karşı 4L1A, 5L1B, 16LA, 19L3 haricindeki izolatlar, *Klebsiella pneumoniae*’ye karşı 4L1A ve 5L1A dışındaki tüm izolatlar, *Enterococcus faecalis*’e karşı 13L2A, 14L1, 19L2A, 28LB dışındaki izolatlar, *Yersinia enterocolitica*’ya karşı 4L1B, 5L1B, 13L2A, 14L1B, 19L3 dışındaki izolatlar antagonistik etki göstermiştir.

İzolatlardan hiç biri *Candida albicans* ATCC, *Candida tropicalis* ve *Candida albicans* 625’e karşı inhibisyon gösterememiştir

Laktobasil izolatları, gastrointestinal sistem patojenleri olan test mikroorganizmalarının hemen hepsine karşı antagonistik etki göstermişlerdir. Ağız probiyotiği olarak kullanılacak olan mikroorganizmalar gastrointestinal sisteme de gireceğinden oradaki patojen mikroorganizmaların inhibisyonu da istenen bir özellik olacaktır.

Çizelge 4.9. İzolatların (pH ayarlamadan) antimikrobiyal aktivite tespiti sonuçları (zon çapı mm)

izolat Numaraları	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans 2-2</i>	<i>Streptococcus mutans 3-2</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans 625</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<u>4L1A</u>	13	9	-	7	-	7	10	8	11	11	8	-	-	-
<u>4L1B</u>	7	12	10	10	12	10	16	-	8	12	15	-	-	-
<u>4L2</u>	12	10	7	11	12	10	10	13	10	8	10	-	-	-
<u>5L1A</u>	14	9	6	8	-	12	8	8	10	12	14	-	-	-
<u>5L1B</u>	7	13	-	10	12	8	15	-	8	14	10	-	-	-
<u>7L1</u>	12	-	10	13	10	12	9	10	12	15	10	-	-	-
<u>8LA</u>	8	13	13	11	12	9	16	11	10	14	12	-	-	-
<u>8L1A</u>	10	8	9	13	8	12	10	8	12	15	12	-	-	-
<u>8L1B</u>	14	12	10	11	8	11	11	14	14	14	14	-	-	-
<u>8L1C</u>	9	6	9	5	5	7	8	12	13	8	15	-	-	-
<u>9L2B</u>	13	15	12	11	12	10	15	10	10	14	10	-	-	-
<u>13L1B</u>	8	11	10	11	14	10	15	14	16	12	10	-	-	-
<u>13L2A</u>	13	-	13	11	11	9	-	-	7	10	10	-	-	-
<u>13L1A</u>	9	15	9	10	7	10	11	10	8	12	14	-	-	-
<u>14L1</u>	13	10	14	14	10	10	9	8	10	14	8	-	-	-
<u>14L1B</u>	13	13	10	10	13	11	-	-	12	9	10	-	-	-
<u>16LA</u>	10	11	-	9	10	10	14	8	10	12	10	-	-	-
<u>18LA</u>	13	9	7	8	8	8	7	7	7	11	8	-	-	-
<u>19L3</u>	13	9	-	10	11	13	10	-	16	13	10	-	-	-
<u>19L1A</u>	11	-	8	13	8	13	10	8	16	10	14	-	-	-
<u>19L2A</u>	13	10	14	15	13	10	-	8	14	13	9	-	-	-
<u>19L2B</u>	12	-	8	13	10	13	9	9	16	12	12	-	-	-
<u>20L2A</u>	14	13	10	10	13	9	10	13	10	10	10	-	-	-
<u>20LB</u>	12	15	12	11	12	10	15	6	9	10	8	-	-	-
<u>21L2</u>	10	15	13	12	10	11	14	9	10	12	13	-	-	-
<u>28LA</u>	12	13	12	9	13	10	10	13	10	11	12	-	-	-
<u>28L2B</u>	10	7	6	9	-	10	8	7	8	8	10	-	-	-
<u>28L3</u>	13	10	8	12	8	14	11	14	14	13	12	-	-	-
<u>28LBX</u>	14	7	6	7	-	7	-	-	7	6	13	-	-	-

İzolatların tamamı *Streptococcus mutans* 2-2 ve *Streptococcus mutans* 3-2'a karşı inhibisyon göstermiştir. En çok inhibisyon gösteren izolatlar *Streptococcus mutans* 2-2 için; 5L1B, 7L1, 8L1A, 8LA, 8L1B, 9L2B, 14L1 iken, *Streptococcus mutans* 3-2 için; 4L1B, 5L1A, 8L1C, 8L1B, 13L1A ve 19L1A olmuştur.

En az inhibisyon gösteren izolatlar *Streptococcus mutans* 2-2 için; 4L2, 8L1C, 28LB2 iken, *Streptococcus mutans* 3-2 için; 4L1A, 14L1, 18LA, 20LB olmuştur. Diş çürüklerine sebebiyet veren mikroorganizmalar olan *S. mutans*'a karşı izolatların antagonistik etki göstermesi ağız probiyotiği olarak kullanılacak mikroorganizma için istenen bir özelliktir.

4.10. Laktobasil İzolatlarının *S. mutans*'a Karşı Tutunma Yüzeyleri İçin Oluşturduğu Rekabetin Diş Yüzeyinde İncelenmesi Deneyi Sonuçları

Laktobasillerin *S. mutans*'a karşı tutunma yüzeyleri için oluşturduğu rekabetin belirlenebilmesi için 3.2.6'da anlatılan iki ayrı yöntem izlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.10'da ve Çizelge 4.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.10 incelendiğinde, başlangıçta yoğunluğu 10^9 - 10^{10} kob/ml olan laktobasillus izolatlarının diş yüzeyine yüksek yoğunlukta bağlandığı (10^8 - 10^{10}) görülmüştür. Aynı şekilde *S. mutans* tek başına olduğunda diş yüzeyine adezyonu 10^8 - 10^{10} oranında iken laktobasillerle birlikte uygulandığında *S. mutans* adezyonu önemli ölçüde düşmüştür. 8L1C, 13L1B, 16LA, izolatlarında ml'deki tutunan bakteri sayısı 10^5 kob kadar düşerken 8LA, 8L1, 14L1, 18LA, 21L2, 28LBX, 28LB2 izolatlarında ise diş yüzeyine tutunan *S. mutans* sayısı 10^6 kob/ml olarak belirlenmiştir.

II. yöntemde gerçek diş yüzeyinde mm^2 başına tutunan bakteri sayısı hesaplanmıştır. Uygulanan bu yöntemde tek başına streptokok tutunması başlangıç sayısı olan $8,0 \times 10^5$ kob/ mm^2 'den, $2,8 \times 10^5$ - $4,0 \times 10^5$ kob/ mm^2 aralığında olmuştur. Sonuçları değerlendirmek için Çizelge 4.11 incelendiğinde, II. yöntemde de uygulanan izolatların, tutunan *S. mutans* sayılarını azalttığı belirlenmiştir.

Her iki yönetime birlikte bakıldığında kullanılan izolatlar, tutunan *S. mutans* sayılarını azaltmıştır. Özellikle 13L1B, 14L1, 14L1B ve 28LBX izolatları gerçek diş yüzeyine tutunan *S. mutans* miktarını diğer izolatlara göre farkedilir derecede azaltmıştır.

Tüm izolatlar diş yüzeyine yüksek oranda tutunma göstermiştir. LAB izolatlarının varlığı tüm durumlarda *S. mutans*'ın tutunma miktarını azaltmıştır.

Çizelge 4.10. Laktobasillerin *S. mutans*'a karşı tutunma yüzeyleri için oluşturduğu rekabetin dış yüzeyinde incelenmesi (I. yöntem)

İzolat no	Başlangıç laktobasil sayısı kob/ml	Dış yüzeyine tek başına tutunan sayı kob/ml	Streptokoklarla beraber dış yüzeyine tutunan sayı kob/ml	Başlangıç streptokok sayısı kob/ml	Laktobasil uygulamasından sonra dış yüzeyine tutunan sayı kob/ml
4L2	3,0X10 ¹⁰	2,5X10 ⁸	3,0X10 ⁷	2,0X10 ⁹	2,0X10 ⁷
4L1A	4,0X10 ⁹	2,0X10 ⁸	2,5X10 ⁶	3,0X10 ⁹	1,5X10 ⁷
5L1A	2,0X10 ¹⁰	3,5X10 ⁹	4,5X10 ⁶	6,5X10 ⁸	5,0X10 ⁷
5L1B	5,0X10 ¹⁰	3,0X10 ⁹	5,0X10 ⁶	4,5X10 ⁹	2,5X10 ⁷
7L1	3,5X10 ⁹	3,0X10 ⁸	1,5X10 ⁶	2,5X10 ⁹	1,0X10 ⁷
8L1B	6,0X10 ⁹	2,0X10 ⁸	3,0X10 ⁶	2,0X10 ⁹	3,0X10 ⁷
8L1C	3,0X10 ⁹	3,0X10 ⁸	2,5X10 ⁶	2,0X10 ⁹	4,5X10 ⁵
8LA	8,0X10 ⁹	2,0X10 ⁸	3,5X10 ⁶	2,0X10 ⁹	7,0X10 ⁶
8L1	7,5X10 ⁹	1,5X10 ⁸	3,0X10 ⁶	4,5X10 ⁹	6,5X10 ⁶
9L2B	5,0X10 ⁹	3,0X10 ⁸	1,5X10 ⁷	9,0X10 ⁸	4,0X10 ⁷
13L1A	4,0X 10 ⁹	4,0X10 ⁸	4,0X10 ⁶	1,0X10 ⁹	2,0X10 ⁷
13L1B	3,0X10 ¹⁰	5,0X10 ⁹	6,5X10 ⁹	1,5X10 ⁹	5,0X10 ⁵
14L1B	4,0X 10 ¹⁰	6,0X10 ⁹	3,0X10 ⁸	7,5X10 ⁸	3,0X10 ⁶
14L1	6,0X 10 ⁹	4,0X10 ⁸	4,0X10 ⁶	3,0X10 ⁹	3,0X10 ⁶
16LA	3,5X 10 ⁹	5,0X10 ⁸	2,5X10 ⁵	4,0X10 ⁹	6,0X10 ⁵
18LA	5,0X 10 ¹⁰	2,0X10 ⁹	5,0X10 ⁶	1,0X10 ⁹	7,0X10 ⁶
19L2B	2,0X10 ¹⁰	5,0X10 ⁹	3,0X10 ⁸	3,0X10 ⁹	4,0X10 ⁷
19L2X	2,5 X10 ⁹	5,0X10 ⁸	4,0X10 ⁷	3,0X10 ⁹	2,0X10 ⁷
19L2A	4,0X10 ⁹	3,0X10 ⁸	2,5X10 ⁶	1,0X10 ⁹	1,5X10 ⁷
19L1A	4,0X10 ⁹	3,0X10 ⁸	6,0X10 ⁷	1,0X10 ⁹	3,0X10 ⁷
20L2A	6,0X10 ¹⁰	4,0X10 ⁹	4,0X10 ⁷	1,0X10 ⁹	3,0X10 ⁷
21L2	4,0X10 ¹⁰	3,5X10 ⁹	2,5X10 ⁶	1,0X10 ⁹	6,0X10 ⁵
28LBX	4,5X10 ¹⁰	5,0X10 ⁹	6,5X10 ⁵	1,0X10 ⁹	2,5X10 ⁵
28LB2	4,0X10 ¹⁰	3,5X10 ⁹	1,5X10 ⁶	5,5X10 ⁸	1,5X10 ⁵
3L1	3,0X10 ⁹	1,0X10 ⁸	2,5X10 ⁶	3,5X10 ⁹	2,0X10 ⁷
11L1	2,0X10 ⁹	7,0X10 ⁸	3,5X10 ⁶	3,0X10 ⁹	2,0X10 ⁷
6L1	3,0X10 ⁹	4,0X10 ⁸	5,0X10 ⁶	1,0X10 ⁹	2,0X10 ⁶
9L1	5,0X10 ⁹	2,0X10 ⁹	3,0X10 ⁷	1,5X10 ⁹	3,0X10 ⁶
15L1	4,0X10 ⁹	3,0X10 ⁹	2,0X10 ⁶	7,5X10 ⁸	2,0X10 ⁵
28LA	9,0X10 ⁹	7,0X10 ⁸	3,5X10 ⁶	4,0X10 ⁹	4,0X10 ⁷

Çizelge 4.11. Laktobasillerin *S. mutans*' a karşı tutunma yüzeyleri için oluşturduğu rekabetin dış yüzeyinde incelenmesi II . yöntem (25 mm² lik alana doğrudan bakteri uygulaması)

İzolat numarası	Başlangıç laktobasil sayısı kob/mm ²	Dış yüzeyine tek başına tutunan sayı kob/mm ²	Streptokoklarla beraber dış yüzeyine tutunan sayı kob/mm ²	Başlangıç streptokok sayısı kob/mm ²	Laktobasil uygulamasından sonra dış yüzeyine tutunan streptokok sayısı kob/mm ²
4L2	1,6X10 ⁷	3,2X10 ⁵	6,0X10 ⁴	8,0X10 ⁵	1,6X10 ⁵
4L1A	8,0X10 ⁶	1,2X10 ⁵	2,6X10 ⁴	8,0X10 ⁵	8,0X10 ⁴
5L1A	8,0X10 ⁶	6,0X10 ⁴	1,4X10 ⁴	8,0X10 ⁵	6,0X10 ⁴
5L1B	1,2X10 ⁷	1,0X10 ⁵	8,0X10 ³	8,0X10 ⁵	1,0X10 ⁵
7L1	8,0X10 ⁶	2,4X10 ⁶	6,0X10 ³	8,0X10 ⁵	6,0X10 ³
8L1B	8,0X10 ⁶	6,0X10 ⁵	3,4X10 ⁵	8,0X10 ⁵	2,2X10 ⁵
8L1C	1,6X10 ⁶	3,4X10 ⁵	6,0X10 ³	8,0X10 ⁵	1,0X10 ⁴
8LA	8,0X10 ⁶	4,0X10 ⁵	2,6X10 ⁵	8,0X10 ⁵	2,6X10 ⁵
8L1	8,0X10 ⁶	8,0X10 ⁵	2,8X10 ⁵	8,0X10 ⁵	1,4X10 ⁵
9L2B	1,6X10 ⁷	2,0X10 ⁵	2,8X10 ⁴	8,0X10 ⁵	1,6X10 ⁵
13L1A	8,0X10 ⁶	8,0X10 ⁵	6,0X10 ³	8,0X10 ⁵	6,0X10 ³
13L1B	8,0X10 ⁶	3,6X10 ⁵	8,0X10 ³	8,0X10 ⁵	4,0X10 ³
14L1B	2,4X10 ⁷	8,0X10 ⁶	1,4X10 ⁵	8,0X10 ⁵	2,8X10 ³
14L1	2,4X10 ⁶	1,6X10 ⁶	6,0X10 ⁴	8,0X10 ⁵	8,0X10 ²
16LA	8,0X10 ⁶	8,0X10 ⁵	1,4X10 ⁵	8,0X10 ⁵	8,0X10 ⁴
18LA	1,6X10 ⁷	1,0X10 ⁶	6,0X10 ⁴	8,0X10 ⁵	1,8X10 ⁵
19L2B	1,6X10 ⁷	8,0X10 ⁵	8,0X10 ⁴	8,0X10 ⁵	1,6X10 ⁵
19L2AX	8,0X10 ⁶	2,0X10 ⁶	1,4X10 ⁵	8,0X10 ⁵	1,2X10 ⁵
19L2A	1,6X10 ⁷	8,0X10 ⁵	6,0X10 ⁴	8,0X10 ⁵	2,4X10 ⁵
19L1A	8,0X10 ⁶	1,0X10 ⁵	1,0X10 ⁵	8,0X10 ⁵	2,2X10 ⁵
20L2A	1,6X10 ⁷	8,0X10 ⁵	4,0X10 ⁴	8,0X10 ⁵	0,8X10 ⁴
28LA	8,0X10 ⁶	3,0X10 ⁵	4,0X10 ⁴	8,0X10 ⁵	2,8X10 ⁴
21L2	8,0X10 ⁶	1,2X10 ⁵	2,4X10 ⁴	8,0X10 ⁵	1,4X10 ⁴
28LBX	1,6X10 ⁶	8,0X10 ⁴	1,2X10 ⁴	8,0X10 ⁵	8,0X10 ²
28LB2	3,2X10 ⁶	8,0X10 ⁴	1,6X10 ⁴	8,0X10 ⁵	2,0X10 ⁴
3L1	8,0X10 ⁶	1,6X10 ⁶	8,0X10 ⁴	8,0X10 ⁵	2,2X10 ⁴
11L1	3,2X10 ⁶	8,0X10 ⁵	1,6X10 ⁴	8,0X10 ⁵	6,0X10 ⁴
6L1	8,0X10 ⁶	1,2X10 ⁶	1,4X10 ⁵	8,0X10 ⁵	8,0X10 ⁴
9L1	8,0X10 ⁶	2,0X10 ⁵	1,2X10 ⁴	8,0X10 ⁵	8,0X10 ⁴
15L1	8,0X10 ⁶	8,0X10 ⁴	6,0X10 ³	8,0X10 ⁵	0,8X10 ⁴

4.11. Laktobasil Varlığında Dış Yüzeyine Tutunan *S. mutans* Sayısının, Laktobasillerin Oluşturduğu Laktikasit Miktarı, Hidrojen Peroksit Miktarı ve pH ile Korelasyonunun Tesbiti Sonuçları

Yapılan korelasyon analizi sonuçlarına göre; laktobasil varlığında dış yüzeyine tutunan *S. mutans* sayısı ile laktobasillerin oluşturduğu laktikasit miktarları arasında korelasyon katsayısı negatif olarak hesaplanmıştır. Buna göre; laktobasil varlığında dış yüzeyine tutunan *S. mutans* sayısı ile laktobasillerin oluşturduğu laktikasit miktarları arasında zayıf negatif ilişki olduğu görülmüştür. Korelasyon katsayısının anlamlılığı için hesaplanan p değeri 0,959 olarak bulunmuştur. Bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildir. Analizler SPSS (versiyon no 25) ile gerçekleştirilmiştir.

Yapılan korelasyon analizi sonuçlarına göre; laktobasil varlığında dış yüzeyine tutunan *S. mutans* sayısı ile laktobasillerin oluşturduğu hidrojen peroksit miktarları arasında korelasyon katsayısı negatif olarak hesaplanmıştır. Buna göre; laktobasil varlığında dış yüzeyine tutunan *S. mutans* sayısı ile laktobasillerin oluşturduğu hidrojen peroksit miktarları arasında zayıf negatif ilişki olduğu görülmüştür. Korelasyon katsayısının anlamlılığı için hesaplanan p değeri 0,033 olarak bulunmuştur. Bu değer istatistiksel olarak anlamlıdır.

pH ile laktobasil varlığında dış yüzeyine tutunan *S. mutans* sayısı arasında korelasyon katsayısı negatif olarak hesaplanmıştır. Buna göre; laktobasil varlığında dış yüzeyine tutunan *S. mutans* sayısı ile pH arasında zayıf negatif ilişki olduğu görülmüştür. Korelasyon katsayısının anlamlılığı için hesaplanan p değeri 0,093 olarak bulunmuştur. Bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildir.

5. SONUÇ TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Diş çürükleri ve diş eti hastalıkları tüm dünyada insanlarda en sık rastlanan ağız sağlığı hastalıklarıdır. Flor ve diğer koruyucu faktörler bu hastalıklarda azalmayı sağlasa da enfeksiyonu kontrol etme yeteneği sınırlı kalmaktadır. Patojenlerle savaşmada sıklıkla tercih edilen antibiyotik kullanımı ise, patojenlerin antibiyotik direnci geliştirmesine neden olarak antibiyotiklerin başka rahatsızlıklarda kullanımını etkisiz hale getirmektedir. Ayrıca antibiyotikler patojen mikroorganizmalarla birlikte yararlı mikroorganizmaları da yok ettiğinden vücuttaki mikrobiyal dengeyi bozarak yeni hastalıkların gelişimine zemin hazırlamaktadır. Bu sebeplerden dolayı yeni bir yaklaşım olan bakteriyel ekolojinin değiştirilmesi yaklaşımına yönelik çalışmalar üzerindeki ilgi artmaya başlamıştır. Bu bağlamda probiyotik kültürlerin kullanılabilirliği ucuz, doğal ve kolay elde edilebilir ajanlar olarak bu yöneme olan talebi artırmıştır.

Diş çürükleri; kişisel özellikler (genetik yapı, beslenme alışkanlıkları, yaş, ırk vb.) ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimlerinin bir sonucudur. Ağız ekolojisi bozulursa potansiyel patojenler rekabet üstünlüğü kazanarak hastalık oluşturabilmektedir (Elavarasu ve Jayapalan, 2012). Probiyotikler, uygun miktarlarda alındığında, konakçı sağlığına faydalı etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanabilmektedir. Probiyotik olarak en yaygın şekilde kullanılan bakteriler laktobasiller ve bifidobakterilerdir. Laktobasillerin ağız mikroflorasındaki patojen bakterilerle tutunma yüzeyi için rekabete girmeleri ve ürettikleri maddelerle onları inhibe etmeleri dolayısıyla ağız probiyotiği olarak kullanılabilme olasılıkları, ağız ve diş sağlığı açısından umut verici bir alternatif oluşturmaktadır.

Bu çalışmada tükürükten elde edilen laktobasillerin probiyotik özelliği değerlendirilmiştir ve ağız ve diş sağlığının korunmasına katkı sağlayacak probiyotik laktobasillerin seçimi hedeflenmiştir. Bu amaçla 15-18 yaş arası öğrencilerinden alınan tükürük örneklerinden izole edilen laktobasillerin ağız probiyotiği olarak kullanılabilirliği incelenmiştir.

Çalışmamızda tükürük örneklerinin alındığı bireylere, beslenme ve diş fırçalama alışkanlıklarını belirlemek üzere anket uygulanmıştır. Tükürükten izole edilen laktobasil örnekleri klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlandıktan sonra, probiyotik olarak kullanılabilme kriterlerine uygunluk açısından hemolitik aktiviteleri belirlenmiştir. Aside tolerans kabiliyetleri araştırılmıştır. Laktik asit ve hidrojen peroksit üretim miktarları ve antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. Antimikrobiyal madde üretebilme

yeteneklerine değerlendirilmiştir. Bu çalışmalardan sonra probiyotik özelliğe sahip olabileceği düşünülen izolatların, gerçek dış yüzeyinde *S. mutants*'a karşı tutunma yüzeyleri açısından rekabet yetenekleri *in vitro* olarak incelenmiştir. İzolatların ürettikleri laktik asit miktarları, hidrojen peroksit miktarları ve gelişme ortamını getirdikleri pH değeri ile laktobasil izolatlarının varlığında dış yüzeyine tutunan *S. mutans* sayıları arasında korelasyon olup olmadığı araştırılmıştır.

Örnek alınan bireylere uygulanan anketle bireylerin beslenme ve diş fırçalama alışkanlıkları incelenmiştir. Buna göre, laktobasiler süt ürünleri tüketen bireylerden de tüketmeyenlerden de izole edilmiştir. Aynı şekilde diş fırçalama alışkanlığı olan bireylerden de olmayan bireylerden de laktobasiller benzer oranlarda izole edilmiştir. Bu durumu değerlendirirken anket verilerinde kişilerin doğru beyanatta bulunup bulunmadıkları da akılda tutulmalıdır.

İzolatların seçiminde MRS agarda laktobasillere özgü krem renkli, mat ve düzgün kenarlı kolonilere öncelik verilmiştir. İzolasyon sonucunda 35 adedi MRS agardan 48'i diğer besiyerlerinden olmak üzere toplam 83 izolat elde edilmiştir. Çalışmalara MRS agar üzerinden elde edilen çeşitli boyutlarda çubuk şekilli, spor oluşturmayan, gram pozitif ve katalaz negatif 30 izolat laktobasil olarak değerlendirilmiştir (Holt ve ark., 2000). İzolatların daha sonra bazı fizyolojik özellikleri incelenmiştir. İzolatların tamamının pH 3,9'da ve pH 9,6'da geliştiği ve H₂S oluşturduğu gözlenmiştir. Çeşitli ticari ürünlerden izole edilen LAB'lerinin pH 3,2'de zayıf gelişim gösterdiği bildirilmiştir (Lin ve ark., 2006).

Parente ve arkadaşları (2010), çeşitli gıdalardan izole edilen *L. plantarum*'un pH 9,6'da gelişmediğini ancak şaraptan elde edilen *L. plantarum*'un 9,6 da geliştiğini bildirmişlerdir. Sawatari ve Yokota (2007), alkali pH değerlerinde *L. plantarum* suşlarının 8,2-8,7'lik bir dış pH değerine kadar gelişmesinin artabileceğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar *L. plantarum* suşlarının aside toleranslı olduğunu bildirmişlerdir. Benzer bulgular Alegría ve arkadaşları (2004), ve Mathara ve arkadaşları (2008), tarafından da rapor edilmiştir.

İzolatların %6 tuz oranında geliştiği ancak 20LB, 28LB'nin gelişmediği, 19L1A ve 4L2'nin ise az geliştiği belirlenmiştir. 21L2, 28LA, 16LA, 14L1, 8L1C, 9L2B, 7L1, 5L1A, 5L1B, 4L1A, 4L1B'nin %7,5 tuz oranında gelişebildiği, 6L1'in az geliştiği, diğerlerinin ise gelişemediği belirlenmiştir. %10 tuz oranında ise sadece 16LA'nın gelişebildiği, 6L1, 7L1, 21L2, 28LA'nın az geliştiği diğerlerinin ise gelişemediği

görülmüştür. *L. plantarum* suşlarının % 0,5-10 tuz içeren ortamlarda gelişebildiği çeşitli araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (Dinçer, 2007; Milesi ve ark., 2008; Gómez-Ruiz ve ark., 2008). Tuz oranı arttıkça bakteri canlılığı azalmıştır. Yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu da gıda ile ilişkili olduğu için karşılaştırmak zordur.

İzolatların tamamının 4°C’de ve 15°C’de gelişebildiği, 19L2A ve 16LA haricindekilerin de 45°C’de gelişebildiği gözlenmiştir. İzolatların tamamının glikozu fermentatif olarak hidrolize edebildiği gözlenmiştir. Fermantasyon sonucu asit oluşturdıkları da metil kırmızısı testinden belirlenmiştir. Ahirwar1 ve arkadaşları (2017), çocuk tükürüklerinden izole edilen *L. plantarum* izolatlarının çalışmamıza benzer olarak 15°C’de gelişebildiğini bildirmişlerdir. Ancak bizim izolatlarımızdan ikisi hariç diğerleri 45°C’de gelişebilirken, araştırmacılar *L. plantarum* suşlarının 45°C’de gelişemediğini bildirmişlerdir.

Laktobasil izolatlarından 13L1A, 13L1B, 18LA dışındakilerin arjininden amonyak oluşturma yeteneğine sahip olmadıkları belirlenmiştir. Benzer olarak Hindistan’da çocukların tükürüklerinden izole edilen laktobasiller içinde 21 *L. plantarum*’un arjininden amonyak oluşturmadağı bildirilmiştir (Ahirwar1 ve ark., 2017). Homofermantatif şarap laktobasili *L. delbrueckii* ve *L. plantarum*’un çalışmamızdaki gibi arjinini parçalayamadığı ortaya konmuştur (Edwards ve ark., 1993). Ayrıca bazı laktobasillerin süt fermantasyonunda da arjinini parçalayamadığı rapor edilmiştir. Ancak, peynirden izole edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, ve balıktan izole edilen *L. plantarum* arjinini parçalayabilmektedir (Liu ve Pilone, 1998). Buradan hareketle LAB’leri arjininden amonyak oluşturmalarının, mikroorganizmanın bulunduğu kaynağa ve de fermantasyon şekline göre değişebildiği sonucuna varılabilir.

Çalışmada tükürükten izole edilen laktobasil izolatlarının tanımlanmasında API CHL50 ve 16S rRNA dizi analizi kullanılmıştır. İzolatlar içinde baskın tür *L. plantarum* olarak belirlenmiştir.

API sonuçlarına göre *L. pentosus* ve *L. rhamnosus* da elde edilmiştir. API CHL 50 ile *L. plantarum* ya da *L. pentosus* olduğu belirlenen türlerin dizi analizi ile *L. plantarum* olduğu belirlenmiştir. Pek çok LAB türünün besinsel ihtiyaçları ve gelişme ihtiyaçları benzer olduğundan klasik metotlarla (API CHL 50 gibi) tanımlanması zordur. Ayrıca API CHL50 gibi ticari amaçlı sistemler yeni özellik kazanmış türlerin veya alt türlerin tanımlanmasında yetersiz kalmaktadır Bu bağlamda moleküler tanımlama yöntemleri daha güvenilirdir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011). Chalakov ve

arkadaşları (2017), yaptıkları çalışmada API web veri tabanında *L. plantarum* ve *L. pentosus* türlerinin biyokimyasal profillerinin benzer olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar API web veri tabanının yeni izole edilen suşların tanımlanmasında yetersiz kaldığını, moleküler tanımlama yöntemlerinin kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir.

16S rRNA dizi analizi yöntemine göre, izolatların *L. plantarum* olma olasılığı %95 ile %98 aralığında bulunmuştur. Aynı cinse ait olan türlerin dizi benzerliğinin %95-97 arasında olduğu bilinmektedir (Madigan ve Martinko, 2010). 13L1B, 19L2A, 4L1B, 8LA ve 7L1 izolatlarında 16S rRNA dizi analizi benzerlik oranının %97'nin altında olması, bu izolatların yeni tür olma potansiyellerinin değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu durumda gen bölgesinin tamamının daha iyi bir resolüsyonda analizinin yapılması gerekmektedir, veya çok yakın bir türle DNA-DNA hibridizasyonu yapılmalıdır. 16S rRNA gen dizilenmesi ile çözümlenemeyen durumlarda ise özellikle protein kodlayan farklı gen bölgelerin dizilenmesi önerilmektedir. Bunun yanında DNA G+C oranı belirlenmesi, tüm genom analizi yöntemleri de kullanılmaktadır. Genetik yöntemlerden elde sonuçların da fenotipik karakterizasyon ile uyumlu olması gerekmektedir (Tindall ve ark., 2010).

Koll ve arkadaşları (2008), tükürük izolatlarında baskın tür olarak, çalışmamıza benzer şekilde, *L. plantarum* bulmuşlardır. Yapılan diğer çalışmalarda tükürükten Tennpaise ve Dahlen (2006); *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. salivarius* türlerini, Koll-Klais ve arkadaşları (2005); *L. fermentum*, *L. oris*, *L. salivarius*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* türlerini belirlemişlerdir. Smith ve arkadaşları (2001), ise tükürükten *L. plantarum* izole edememişlerdir, ancak *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. brevis* türlerini izole etmişlerdir. Buna karşılık Ahrne ve arkadaşları (1998), sağlıklı insanların rektal ve oral mikrobiyatasında en fazla *L. plantarum* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Oral mikrobiota kompleks ve dinamik bir yapıdadır. Çevresel ve besinsel faktörlerden önemli ölçüde etkilenmektedir.

Ülkemizde Güngör ve arkadaşları (2013), tarafından yapılan bir çalışmada sağlıklı çocukların ağızlarından *Lactococcus lactis* ss. *lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus* sp., *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* ss. *paracasei*, *Weissella confusa* izole edilmiştir. Çalışmamızda ise bu çeşitliliği yakalayamadık. Bunun sebebi izolasyondan sonra zamana bağlı olarak izolatların bir

çoğunu kaybetmemiz olabileceği gibi örneklemede sadece tükürük kullanmamız da olabilir. Bakteri çeşitliliği izole edilen yere ve ülkelere görede değişmektedir. Román-Méndez ve arkadaşları (2009), Meksikalı ve Fransız çocuklarda diş çürüğünden en sık *L. rhamnosus* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Fransız çocuklarda *L. rhamnosus* izole edilirken diğer laktobasillerin izole edilemediğini Meksikalı çocuklarda ise *L. rhamnosus* ile birlikte *L. acidophilus* ve *L. brevis*’in de izole edildiğini bildirmişlerdir. Colloca ve arkadaşları (2000), sağlıklı bireylerin dil, diş ve tükürüğünden *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus* ve *L. acidophilus* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Oral mikrobiyota diş sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Diş çürüklerinin oluşmasından ağız kokusuna kadar bir çok hastalığa neden olabilmektedir (Matsumoto ve ark, 2005). Buna karşılık laktik asit bakterilerinin ağız sağlığına yararlı etkileri de ortaya konmuştur (Ouweland ve ark., 2002).

Hemolitik aktivite belirleme deneyi sonuçlarına göre izolatların tamamının hemolitik aktivite göstermediği, bundan dolayı da probiyotik olarak kullanılmasında sakınca bulunmadığı belirlenmiştir.

Antibiyotik duyarlılık testi bulgularına göre; izolatların tamamı vankomisin (VA) dirençlidir. İzolatların 14 tanesi (4L1B, 4L2, 5L1A, 5L1B, 8L1A, 8L1B, 8L1C, 9L2B 13L1A, 14L1, 19L2A, 19L2AX, 19L2B, 21L2) Klindamisin (CC) dirençlidir. İzolatların 12 tanesi (4L1B, 4L2, 5L1B, 8L1A, 8L1C, 9L2B 13L1A, 14L1, 16LA, 19L1A, 20L2A, 21L2) Siproflxasin (CİP) dirençlidir. 19L2A, sefotaksim (CTX) dirençlidir. 19L1A tetrasiklin (TE) dirençlidir. 7L1 gentamisin (GE) dirençlidir.

Probiyotik strainler için en önemli özellik transfer edilebilir antibiyotik direnç geni taşıyor olmasıdır (Duncan, 2003). Antibiyotik direnç geninin plasmid ya da transpozonlar gibi taşınabilir genetik elementlerde mi yoksa asıl kromozom üstünde mi olduğunun saptanması önerilmektedir (Saarela ve ark., 2000). Çeşitli çalışmalarda, laktobasillerin vankomisine karşı doğal dirençli oldukları saptanmıştır. (Charteris ve ark., 1998a, Temmerman ve ark., 2002; Zhou ve ark., 2005; Kastner ve ark., 2006; Maragkoudakis ve ark., 2006). Laktobasillerin vankomisin direnç genlerinin diğer bakterilere aktarabildiği ortaya konmamıştır (Tynkkynen ve ark., 1998). Yapılan çalışmalarda laktobasillerin; basitrasin, siprofloksasin, kanamisin, gentamisin, streptomisin ve vankomisine karşı yüksek doğal dirençe sahip olduğu, penisilin ve ampisilin gibi hücre duvarı sentezi inhibitörüne karşı ise duyarlı oldukları saptanmıştır

(Danielsen ve Wind, 2003; Shao ve ark., 2015). Çalışmamıza benzer olarak Egervarn (2009), inceledikleri *L. plantarum* suşlarının ampisilin, gentamisin duyarlı, eritromisin, klindamisin ve streptomisine karşı dirençli olduklarını vurgulamışlardır. Tetrasikline karşı elde edilen direncin, plazmide bağlı tet (M) ile ilişkili olduğunu saptamıştır.

Kullanılan izolatların *B. cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *E. feacalis*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *P. vulgaris*, *S. mutants2-2*, *S. mutants2-3*, *C. albicans* ATCC , *Candida tropicalis* ve *C. albicans* 625'e karşı antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. *P. vulgaris*, *B. cereus*, *S. typhimurium* ve *S. aureus*'a karşı izolatların tamamı antagonistik etki göstermiştir. *B. subtilis*'e karşı 7L1, 13L2A, 19L3 haricindeki izolatlar, *L. monocytogenes*'e karşı 4L1A, 5L1B, 16LA, 19L3 haricindeki izolatlar, *K. pneumoniae*'ye karşı 4L1A ve 5L1A dışındaki tüm izolatlar, *E. feacalis*'e karşı 13L2A, 14L1, 19L2A, 28LB dışındaki izolatlar, *Y. enterocolitica*'ya karşı 4L1B, 5L1B, 13L2A, 14L1B, 19L3 dışındaki izolatlar antagonistik etki göstermiştir. İzolatlardan hiç biri *C. albicans* ATCC, *Candida tropicalis* ve *C. albicans* 625' e karşı inhibisyon gösterememiştir.

Laktobasil izolatları, gastrointestinal sistem patojenleri olan test mikroorganizmalarının hemen hepsine karşı antagonistik etki göstermişlerdir. Ağız probiyotiği olarak kullanılacak olan mikroorganizmalar gastrointestinal sisteme de gireceğinden oradaki patojen mikroorganizmaların inhibisyonu da istenen bir durumdur.

İzolatların tamamı *S. mutans* 2-2 ve *S. mutans* 3-2'a karşı inhibisyon göstermiştir. En yüksek inhibisyon gösteren izolatlar *S. mutans* 2-2 için; 5L1B, 7L1, 8L1A, 8LA, 8L1B, 9L2B, 14L1 iken, *S. mutans* 3-2 için; 4L1B, 5L1A, 8L1C, 8L1B, 13L1A ve 19L1A olmuştur. En düşük inhibisyon gösteren izolatlar *S. mutans* 2-2 için; 4L2, 8L1C, 28LB2 iken, *S. mutans* 3-2 için; 4L1A, 14L1, 18LA, 20LB olmuştur. Diş çürüklerine sebebiyet veren mikroorganizmalar olan *S. mutans*'a karşı izolatların antagonistik etki göstermesi ağız probiyotiği olarak kullanılacak mikroorganizmalar için aranan bir özelliktir.

Yine çalışmamıza paralel olarak, Sookkhee ve arkadaşları (2000), sağlıklı ağızdan izole ettikleri laktobasillerin antimikrobiyal aktivitesini analiz etmişlerdir ve beş tükürük laktobasil izolatının (*L. paracasei*'nin 3 izolatı, *L. rhamnosus*'un 2 izolatı) mutans streptokoklara (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*), *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces viscosus*, *P. gingivalis* ve *Candida*'ya karşı antimikrobiyal etkili olduğunu

göstermişlerdir. Benzer olarak yapılan bir çalışmada da Samot ve Badet (2012), 66 oral laktik asit bakterisinin hepsinin *S. mutans*'ı inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Simark-Mattsson ve arkadaşları (2007), tarafından yapılan çalışmada *in-vitro* ortamda laktobasillerin *S. mutans*'ın gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Michalek ve arkadaşları (1981), diş plağında *L. casei* bulunduğu durumlarda *S. mutans*'ın azaldığını bildirmişlerdir. Ahumada ve arkadaşları (2001) dilden izole edilen laktobasillerin % 36'sının *S. mutans* gelişimini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu konuda yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Ishakawa ve ark., 1990; Nase ve ark., 2001; Iniesta ve ark., 2012). Köll ve arkadaşları (2008), *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. salivarius* ve *L. rhamnosus* suşlarının, hem yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu hem de çevresel strese yüksek toleransa sahip olduğunu ifade etmişlerdir. *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* içeren probiyotiklerin çürük oluşturan *S. mutans* miktarını azalttığı bir çok çalışmada ortaya konmuştur (Haukioja, 2010; Anilkumar ve Monisha, 2012; Bizzini ve ark., 2012). Benzer çalışmalarda probiyotik içerikli ürün kullanımının *S. mutans* sayısını azalttığı gösterilmiştir (Näse ve ark., 2001; Ahola ve ark., 2002; Jindal ve ark., 2011; Singh ve ark., 2011; Twetman ve Keller 2012; Juneja ve Kakade, 2012; Campüs ve ark., 2014; Nagarajappa ve ark., 2015). Jindal ve arkadaşları (2011), 150 sağlıklı (7-14 yaş) çocukla 14 gün süreyle yaptıkları çalışmada, *L. rhamnosus*, *Bacillus coagulans* ve *Bifidobacterium* türlerinin dondurularak kurutulmuş toz kombinasyonu uygulayarak tükürükte mutans streptokok sayılarında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemişlerdir. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkisinin laktik asit, hidrojen peroksit, asetik asit, hidrojen sülfür, bakteriyosin ya da bakteriyosin benzeri maddelerden meydana geldiği de bildirilmiştir (Gilliand, 1990; Lewus ve ark., 1991).

Ancak bulgularımızın aksine probiyotik tüketiminin tükürükteki laktobasilleri azalttığını ancak streptokokları önemli oranda etkilemediğini ifade eden görüşler de mevcuttur. Çeşitli çalışmalarda süt, tablet, pastil gibi çeşitli formlarda probiyotik alımının çürük oluşturan bakterilerin miktarını etkilemediği gösterilmiştir (Lexner ve ark., 2010; Chuang ve ark., 2011; Çıldır ve ark., 2012; Marttinen ve ark., 2012). Taipale ve arkadaşları (2013)'nın yaptığı çalışmaya göre bebeklikte uygulanan *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* BB-12, 4 yaşına kadar çürük oluşumunu artırmadığı yada azaltmadığıdır. Gruner ve arkadaşları (2016), yaptıkları çalışmada probiyotik kullanımının *S. mutans* sayılarını azalttığını ancak çürük görülme olasılığını önemli

ölçüde düşürmediğini belirtmişlerdir. Matsumoto ve arkadaşlarının (2005), çalışmasında molar dişlerin yüzeylerinin *S. mutans* MT8148R ve *L. salivarius* LS1952R ile süper enfeksiyonu, MT8148R yerleşmesini desteklemiştir. Yli-Knuuttila ve arkadaşlarının (2006), çalışmasında ise 14 gün süreyle probiyotik içecek tüketen 56 bireyde *L. rhamnosus* GG, ağız boşluğuna kolonize olmadığı görülmüştür. Montanalto ve arkadaşlarının (2004), yaptığı çalışmaya göre; oral yolda kullanılacak probiyotiklerin hem kapsüllerle hem de sıvı halde ağız yoluyla verilmesi, laktobasillerin tükrük sayısını belirgin şekilde arttırmaktadır, *S. mutans* popülasyonlarını ise önemli ölçüde değiştirmemiştir.

Antimikrobiyal etki için kullanılan filtratların düşük olan pH'sı, test sırasında pH 6,5'e ayarlandığında yapılan deneylerin sonucunda laktobasil filtratlarından hiçbir test mikroorganizmalarına karşı zon oluşturmamıştır. Buna dayanarak, antagonistik etkinin düşük pH'ya bağlı olduğu tahmin edilmektedir. Ağız mikrobiotasında bulunan laktobasillerin asit üretimleri nedeniyle diş çürümesine yol açtıkları düşünülse de, bazı durumlarda laktobasiller çürük oluşturan bakterileri inhibe ederek ve diş yüzeyine tutunma özelliği açısından onlarla rekabete girerek faydalı rol oynadığı ileri sürülmüştür (Michalek ve ark., 1981). Laktik asit, asetik asit gibi organik asitlerin *S. mutans*'ı inhibe ettiği düşünülse de çalışmamızda laktik asit miktarı ile tutunan *S. mutans* sayısı arasında istatistiki olarak bir korelasyon bulunamamıştır. Aynı şekilde pH ile tutunan *S. mutans* sayısı arasında da önemli bir korelasyon bulunamamıştır. *L. plantarum* izolatlarının tutunan *S. mutans* sayısında azalmaya farklı mekanizmalar neden olmuş olabilir.

Probiyotik özellik gösteren mikroorganizmalar ürettikleri biyoaktif bileşenlerle (bakteriyosin benzeri maddeler, organik asitler, hidrojen peroksit, nitrik oksit gibi) patojenlerin sinyal mekanizmasını önleyerek onların aktivitelerini engellerler. Çürük oluşturan patojenlere karşı inhibisyon özelliği ağız probiyotiği olarak kullanılacak bakteriler için aranan bir durumdur (Shenderov, 2011).

İzolatların ürettikleri laktik asit miktarları 4,632-15,306 mg/ml aralığında bulunmuştur. En düşük değer 7L1'e aittir. En yüksek değer 28LA'ya aittir. İzolatların ürettikleri H₂O₂ miktarları ise 0,0426 – 1,796 mg/ml aralığında belirlenmiştir; en düşük değer 9L1'e aittir, en yüksek değer de 20L2A'ya aittir. Kıvanç ve arkadaşları (2014), çocukların ağızlarından izole edilen 24 laktik asit bakterisinde laktik asit miktarının *L. plantarum* için 0,35-0,92 mg/ml arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Bu değerler bizim

bulgularımızın çok altındadır. Kıvanç ve arkadaşları (2011), bozadan izole ettikleri *L. plantarum* izolatlarında laktik asit miktarının 0,16-7,79 mg/ml arasında değiştiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar bu izolatlarda H_2O_2 miktarları ise 0,55- 2,18 ($\mu\text{g/ml}$) arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Toksoy ve arkadaşları (1999), et ürünlerinden izole ettikleri 39 *L. plantarum* izolatının 1,80-3,44 $\mu\text{g/ml}$ H_2O_2 ürettiğini tesbit etmişlerdir. Buna karşılık, Song ve arkadaşları (1999), japon kadınlardan izole ettikleri vajinal *L. plantarum*'un H_2O_2 üretemediğini bildirmişlerdir. Üretilen madde miktarındaki farklılıkların suşa özgü özelliklerden kaynaklandığı söylenebilir; aynı türün bile farklı suşlarında farklı biyolojik aktiviteler gözlenebilir.

Lactobacillus suşları laktik asit ve H_2O_2 gibi antimikrobiyal maddeler üretmek suretiyle patojenleri inhibe edebilmektedir (Redondo ve Lopez, 1990; Klebanoff ve ark., 1991; Boris ve Barbes, 2000). Çalışmamızda laktik asit bakterilerinin ürettiği H_2O_2 miktarı ile tutunan *S.mutans* sayısı arasında önemli bir korelasyon bulunmuştur. Bakteriler tarafından üretilen H_2O_2 *S. mutans*'ın tutunmasını etkilemiştir.

Zamana bağlı asit tolerans çalışmalarının bulgularına göre izolatların tamamın 4. saat ve 24. saatteki canlılığının devam ettiği ve bakteri sayısının arttığı gözlenmiştir. Laktik asit bakterilerinin asit toleransının diğer çalışmalarla karşılaştırılması oldukça zordur. Çünkü farklı yöntemler ve suşlar kullanılmaktadır. Ancak çalışmalar *L. plantarum*'un asit toleransının yüksek olduğunu göstermektedir (Alegría ve ark., 2004; Mathara ve ark., 2008). pH 2,5 gibi bir pH'ya tolerans; Mathara ve arkadaşları (2008), tarafından bakterilerin bu düşük pH'ya kısa süreli maruz kalması şeklinde açıklanmıştır. McDonald ve arkadaşları (1990), *L. plantarum*'un pH homeostasisini pH 3,0 değerine kadar koruyabildiğini ve sadece iç pH'nın 4,6-4,8'e ulaştığı zaman büyümesinin durduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca arginin dihidrolaz yolu (Arena ve ark., 1999) ve glutamat dekarboksilasyonu (Siragusa ve ark., 2007) ile bu türlerin seçilmiş ortamlarda asit toleransını artırabileceği bildirilmiştir. Bizim izolatlarımızda argininden amonyak oluşmadığı için asit toleransının buna bağlı olmadığını düşünüyoruz. Ancak asit toleransı glutamat dekarboksilasyonu ile ilişkili olabilir ancak bu konunun araştırılması gerekmektedir (Dhaka ve ark., 2012).

Ağız probiyotiği olarak kullanılacak olan mikroorganizmalar gastrointestinal sisteme de gireceğinden midedeki asit ortamda canlı kalabilmesi istenen bir özellik olacaktır. Laktik asit bakterilerinin probiyotik özelliklerini araştırıldığı bazı çalışmalarda izolatların düşük pH'da canlı kalabildiklerini gösterilmiştir

(Xanthopoulos ve ark., 2001; Prasad ve ark., 1990), Ayrıca Demirok ve arkadaşları (2014), bebeklerden izole ettikleri laktobasillerin özelliklerini araştırdıkları çalışmada inceledikleri laktobasil izolatları arasında *L.casei*'nin düşük pH'ya (pH 3) daha dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda izolatların ürettiği asit miktarı ile ortamın asitliğini pH 3,60-4,10 aralığına getirdikleri gözlenmiştir; izolatların pH değeri en düşük olanı pH 3,60 ile 19L2B' dir, en yüksek pH değeri ise pH 4,10 olarak 11L1 izolatına aittir.

Karyojenik mikroorganizmaların inhibe edilmesindeki ilk aşama, laktik asit bakterilerinin diş yüzeyinde kolonize olmasıdır. Ağız probiyotiği olarak kullanılacak mikroorganizma özelliklerinden biri de ağızdaki patojenlerle tutunma yeteneği açısından rekabet edebilmesidir. Bu özelliği denemek için çalışmamızda izolatların gerçek diş yüzeyinde *S. mutans*'a karşı tutunma yüzeyi açısından rekabeti incelenmiştir.

Yapılan deney sonuçlarına bakıldığında, başlangıçta yoğunluğu 10^9 - 10^{10} laktobasil izolatlarının diş yüzeyine yüksek yoğunlukta bağlandığı (10^8 - 10^{10}) görülmüştür. Aynı şekilde *S.mutans* tek başına olduğunda diş yüzeyine adezyonu 10^8 - 10^{10} oranında iken laktobasillerle birlikte uygulandığında *S. mutans* adezyonu önemli ölçüde düşmüştür. 8L1C, 13L1B, 16LA, izolatlarında ml'deki tutunan bakteri sayısı 10^5 kob kadar düşerken 8LA, 8L1, 14L1,18LA, 21L2, 28LBX, 28LB2 izolatlarında ise diş yüzeyine tutunan *S. mutans* sayısı 10^6 kob/ml olarak belirlenmiştir. Kullanılan izolatlar, tutunan *S. mutans* sayılarını azaltmıştır. Tong ve arkadaşları (2011), *L. lactis* ile ilgili olarak benzer bulgular bildirmişler. Bu çalışmada *L. lactis*'in diş yüzeyinde *S. mutans*'a karşı antagonist etki gösterdiğini ve diş çürüğüne neden olan *S.mutans*'ın sayısının azaltılmasında etkili olduğu ortaya konmuştur.

Oral kavitenin ekosistemi mikroorganizmaların gelişmesine uygun ortamı sağlamaktadır. Bunun yanında mikroorganizmaların adsorbe olabileceği yüzeylerde bu ortamda bulunmaktadır (Fejerskov ve Kidd, 2003). Bakterilerin ağızdaki kolonizasyonu için en önemli adım ağız yüzeylerine yapışmasıdır (Stamatova ve ark., 2009; Stamatova ve Meurman, 2009).

Probiyotik bakteriler patojen bakterilerin bağlanacağı reseptör bölgelere bağlanarak patojenlerin adezyonunu engellemektedir (Haukioja ve ark., 2008; Stamatova ve ark., 2009; Esteban-Fernández ve ark., 2018)

Laktik asit bakterilerinin yumuşak ve sert dokulara yapışmasında spesifik ve spesifik olmayan bakteri mekanizmalarının rol oynadığı belirtilmiştir (Gibbons, 1996).

Diş yüzeyine yapışmada fiziksel etkileşimler kadar kimyasal etkileşimlerde etkili olmaktadır (Carlen ve ark., 1996).

Ayrıca, bakterilerin aynı kolonizasyon bölgesi için rekabeti, bakteriyel adhezyonun artması üzerine etkili olabilmektedir (Filoche ve ark., 2004). *L. plantarum* 13L1B bu bulguyu desteklemektedir. Adezyon bölgesi için rekabet *L. plantarum* 13L1B'nin daha fazla adezyonuna neden olmuştur. Buna karşın diğer bakterilerde böyle bir etkileşim görülmemiştir. *L. plantarum* 13L1B dışındaki diğer bakteriler ile ilgili tutunma sonuçlarımızın Guan ve arkadaşları (2001)'nin da ileri sürdüğü gibi *Streptococcus* yoğunluğu 10^6 'dan daha yüksek olduğunda diğer mikroorganizmaların yüzeye daha az tutunduğunu ileri sürdükleri çalışmalarının sonucuyla uyumlu olduğu görülmüştür. Bulgularımızın aksine Güngör ve arkadaşları (2013), başlangıç yoğunluğu 10^8 kob/ml olan *S.mutans*'ın, laktik asit bakterilerin yüzeye tutunmasını engellemesi beklenirken, laktik asit bakterilerinin her iki deneyde de diş yüzeyine *S.mutans*'tan daha yüksek yoğunlukta bağlandığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda *L.plantarum* 8L1C, 14L1B, 19L2B, 21L2 Güngör ve arkadaşları (2013), ile uyumlu sonuçlar vermiştir. Stamatova ve Meurman (2009), laktobasillerin tükürük proteinlerine bağlanarak epitelyal hücrelere yapıştığını yada adezyon bölgesinde diğer bakterilere bağlanarak oral dokulara yapıştığını ileri sürmüşlerdir.

Yapay tükürük ile kaplı dişlere *L. plantarum* izolatları farklı oranlarda bağlanmıştır. Çalışmamızın aksine Güngör ve arkadaşları (2013), laktik asit bakterileri içinde tükürük ile kaplı diş yüzeyine en düşük yoğunlukta bağlanan suşların *L. plantarum* olduğunu bildirmişlerdir. Ancak diş yüzeyi tükürük ile kaplı olmadığında en yüksek bağlanmanın *L. plantarum* olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda yüksek bağlanma gözlememiz yapay tükürük kullanmamız nedeniyle olabilir. *L. rhamnosus* LGG ve *L.delbrueckii bulgaricus*'nin tükürükle kaplı hidroksiapatite tutunmasının incelendiği bir çalışmada, LGG'nin tükürükle kaplı hidroksiapatit yüzeye, *L. delbrueckii bulgaricus* ve *S.sanguinis*'ten daha güçlü tutunduğu görülmüştür (Stamatova ve ark., 2009). Comelli ve arkadaşları (2002), ağızdan izole edilen laktik asit bakterilerinden *S. thermophilus* NCC1561 ve *Lactococcus lactis* NCC2211'in tükürükle kaplı hidroksiapatite yüksek düzeyde bağlandığını göstermişlerdir. Laktobasillerin mutans streptokokların tutunması üzerine etkileriyle ilgili yapılan bir başka çalışmada, *L. fermentum* süpernatanı ile *S. mutans* gelişimi inhibe edilememiş ancak *S. mutans*'ın tutunma özelliği inhibe edilmiştir (Chung ve ark., 2004). Lin ve arkadaşları (2015),

çalışmalarında kullandıkları beş laktobasil izolatının (*Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei* LC01, *Lactobacillus plantarum* ST-III, *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 ve *Lactobacillus rhamnosus* HN001) mutans streptokokların biyofilm oluşturmalarını ve gelişimini önlediğini rapor etmişlerdir. Plasebo kontrollü çift körlü yapılan bir çalışmada *S. salivarius* K12 verilmesi bireylerde *S. mutans* seviyesini düşürdüğü görülmüştür ve plak oluşumunu azalttığı da gözlenmiştir (Burton ve ark., 2013). Busscher ve arkadaşları (1999), normal yoğurttaki *L. bulgaricus* 'un diş minesine tutunamadığını ancak yoğurda eklenen *L. acidophilus* ve *L. casei*'nin mineye tutunabildiğinden ağızda kolonize olabildiğini göstermişlerdir. *L. acidophilus* ve *L. casei* içeren yoğurtların 1 hafta süreyle tüketiminin tükürükteki ve plaktaki diğer laktobasilleri uzaklaştırdığını rapor etmişlerdir. Teanpaisan ve arkadaşları (2011), biyofilm modelinde altı probiyotik *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei* ve *L. salivarius*. *Lactobacillus* SD1–SD6 türün *S. mutans* ATCC 25175'a karşı güçlü inhibitör etki gösterdiğini gözlemişlerdir. Bu etkinin asidik şartlarda arttığını saptamışlardır.

LAB'ın yüzeylere tutunma ve aynı ekosistemdeki mikroorganizmalarla rekabet etme becerisinin çoğunluğu algılama mekanizmasıyla kontrol edildiği bildirilmiştir. *L. plantarum* WCFS1 ile yapılan bir çalışmada bu türün çevrede yaygın olarak bulunmasının ve adaptasyon kabiliyetinin diğer türlere kıyasla daha iyi olmasının sebebi olarak çoğunluğu algılama mekanizması gösterilmiştir (Sturme ve ark, 2007; O'Flaherty ve Klaenhammer, 2010).

Sağlık açısından pek çok alanda kullanılan probiyotiklerin ağız ve diş sağlığında önleyici ve tedavi edici olarak kullanılmaya başlaması umut vericidir. Zira oral mikrobiyotadaki patojenlerin varlığı sadece ağız içiyle sınırlı değildir; sistemik hastalıklarla ağız patojenleri arasında pozitif korelasyon bulunan çalışmalar mevcuttur. Bunlar arasında kalp damar sağlığı hastalıkları (Korev ve ark., 2011), diyabet (Casarin ve ark., 2013), tümörler (Hooper ve ark., 2009) sayılabilir. Erken çocukluk dönemindeki bireylerle yapılan çalışmalar, ağız sağlığının iyileşmesiyle genel sağlığın da iyileşeceğini (metabolik domino etkisi) düşündürmektedir. Probiyotik kullanımı, çürüklerin ve diğer ağız hastalıklarının önlenmesinde ve bunlarla mücadelede yerleşik yöntemlere değerli bir yardımcı olabilir (Twetman 2016).

Vücudumuzun giriş kapısı olan ağızdaki patojenlerin faaliyetlerini engelleyecek “ağız probiyotiği” olarak tanımlanacak yeni izolatların keşfi ile daha sağlıklı bir yaşam elde etme fikri heyecan vericidir.

Ağızda diş çürüğü ve restorasyon bulunmayan bireylerden izole edilen laktobasillerin streptokokları inhibe ettiği ve *S.mutans* inhibisyonunda etkili olan laktobasiller ise etki sırasına göre *L.paracasei*, *L.plantarum* ve *L.rhamnosus*’un olarak sıralandığı bildirilmiştir (Simark-Mattsson ve ark., 2007). Araştırmacılar oral hijyeni iyi olan bireylerin oral kavitelerinden izole edilen probiyotik mikroorganizmaların diş çürüğünün önlenmesinde ve tedavisinde kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ancak, konuyla ilgili daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu rapor edilmiştir.

Yüksek adezyon kapasitesine sahip doğal izolatlar, oral sağlığın sağlanmasında ve sürdürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Karyojenik mikroorganizmanın büyümesinin engellenmesinin ilk adımı bu mikroorganizmaların diş yüzeyine kolonizasyonunun önüne geçilmesidir. Bunun için son yıllarda probiyotik bakteriler bu amaçla kullanılmaya başlanmıştır. Bu güne kadar probiyotik bakterilerin çeşitli şekillerde kullanımının *S. mutans* üzerine etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmalara bakıldığında bunların genellikle standart kültürlerle yapıldığı görülmektedir. Çalışmamızda ise izolatlar bizim halkımıza ait izolatlardır. Bu şekilde yapılan çalışma sayısı birkaç tanedir (Erten 2005, Güngör ve ark., 2013). Probiyotik özellik suşa özgü olduğu için bu özelliği taşıyan ülkemize uygun laktik asit bakterilerinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

L. plantarum ve *S. mutans* arasındaki antagonizm, *S. mutans* kolonizasyonunu diş yüzeyinde tutunumu üzerine etkili olmuştur. *S. mutans*’ın kolonizasyonunun azalması diş çürüklerinin oluşumunu geciktirmede yararlı olabilir. İzolatlarımız içinde *L. plantarum* 13L1B, 14L1, 14L1B, 28LBX suşları her iki yöntem ile yapılan tutunma testlerinde ümit var suşlar olarak ortaya çıkmıştır. Bu suşlar *S. mutans* tutunmasını önemli ölçüde azaltmıştır. Ancak çalışmalarımız *in vitro* olarak yapıldığı için bu çalışmaların *in vivo* olarak denenmesi gerekmektedir. Ağız ortamında tükürük sürekli bir akış halindedir. İçeriğinde ise çeşitli enzimler ve proteinler bulunmaktadır. Bu arada çok çeşitli gıdalar da tüketilmektedir. Bu şekilde dinamik bir ortamda probiyotik olabileceğini belirlediğimiz bakterilerin test edilmesi ve davranışının belirlenmesi gerekmektedir. Ancak burada bazı laktik asit bakterilerini derin çürüklerin nedeni olduğu unutulmamalıdır. Schwendicke ve arkadaşları (2014), probiyotik türlerin

kendiliğinden çürük oluşturabilecekleri düşüncesiyle yaptıkları çalışmada, probiyotik *L. rhamnosus* GG'yi *S. mutans* ile karşılaştırmışlardır ve diş dokularında oluşan mineral kaybını analiz etmişlerdir. LGG, özellikle dentin boşluklarında ve yüksek derecede çürük oluşumunu destekleyen koşullarda mineral kaybına neden olduğunu gözlemişlerdir. *L. rhamnosus* GG'nin, *S. mutans* üzerinde inhibitör etkilere sahip olmadığı daha ziyade *in vitro* çürüğe katkıda bulunduğu sonucuna varmışlardır. Belki de probiyotik bakterilerin bazı ürünleri *S. mutans*'ın tutunmasını engellemede çürük oluşturma riski olmadan kullanılabilir. Bu hususunda araştırılması yararlı olacaktır.

Ağız probiyotiği olarak kullanılacak bakterinin ağızda uzun süre kalabilecek pastil veya sakız gibi çiğnenebilen ürünlerle verilmesi gerektiği diş hekimlerince tavsiye edilmektedir. Sakız veya pastillere katılan probiyotiklerin günlük kullanımlarının da tükürük içerisindeki *S. mutans* sayısını azalttığı gösterilmiştir (Çağlar ve ark., 2006; 2007). Probiyotik diş macununun kullanımının da çürük oluşturan bakteri sayılarında anlamlı bir azalma sağladığı gösterilmiştir (Majstorovi ve ark., 2013).

Probiyotik suşların ağız ve diş hastalıklarının önlenmesinde veya tedavisinde kullanılabilecek bir ürün olarak dünya pazarına sunulabilmeleri için uzun vadeli çalışmalara ihtiyaç vardır. Zira yayınlanan çalışmaların metodolojileri birbirinden farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar arasında çalışma tasarımı, tedavi ve takip süresi, probiyotik suşlar, probiyotiklerin konsantrasyonları ve kullanılan araçlar (süt ürünleri, dondurma, pastil, toz vs), seçilen nüfus, yaş gibi faktörler sayılabilir. Ağız sağlığı için kullanılacak olan probiyotiklerin etkinliğinin ve güvenliğinin bilimsel olarak kanıtlanmış olması, kullanım şekli ve dozu, özellikle hangi hasta ve yaş grubu için kullanılacağına iyi araştırılması gerekmektedir (Pradeep ve ark,2014). Bunun yanında ağız mikrobiotasındaki bireysel farklılıklar, kullanılacak olan probiyotik veya probiyotiklerin karışımının kişiye göre farklı olmasını gerektirebilir. Bu bağlamda; ağız probiyotiği olarak kullanılacak suş iyi seçilmelidir. Ayrıca bakteriyoterapi sonrası çürük gelişme olasılığı da takip edilmelidir.

Ülkemizde ağız ve diş hastalıklarına yönelik olarak Türkiye’de üretilen Bakanlık onaylı herhangi bir ürün henüz bulunmamaktadır. Ancak yurtdışından ithal edilen ve onay almış ürünleri piyasada bulmak mümkündür.

Bu çalışma göstermiştir ki; 15-18 yaş arası bireylerin tükürüklerinden elde edilen LAB izolatlarının, bir ağız patojeni olan ve çürük oluşturma özelliği bulunan *S. mutans*’a karşı antimikrobiyal etkisi vardır. Ayrıca bu izolatlar (13L1B, 14L1, 14L1B,

28LBX) gerçek diş yüzeyine tutunan *S. mutans* miktarını azaltmıştır. Tüm izolatlar diş yüzeyine yüksek oranda tutunma göstermiştir. LAB izolatlarının varlığı tüm durumlarda *S. mutans*'ın tutunma miktarını azaltmıştır. Bu izolatların *S. mutans* kaynaklı hastalıkları önlemede ağız probiyotiği olarak kullanılabilmeleri açısından sonuçlar umut vericidir. Diş rklerinin önlenmesinde ve kontrol altına alınmasında rk karşıtı ajan adayları olacak probiyotiklerin ağız probiyotiği olarak kullanılabilmeleri için daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA

- Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes, L.N. Olsen, I., Dewhirst, F.E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.*,43(11):5721-32.
- Agarwal, E., Bajaj, P., Guruprasad, C.N., Naik, S., Pradeep, A.R. (2011). Probiotics: A Novel Step Towards Oral Health . *AOSR.*,1(2):108-115.
- Ahola, A.J., Yli-Knuuttila, H., Suomalainen, T., Poussa, T., Ahlström, A., Meurman, J.H., Korpela, R. (2002). Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors . *Arch Oral Biol.*, 47(11): 799-804.
- Ahumada, M., Del, C., Bru, E., Colloca, M.E., Lopez, M.E., Nader- Macias, M.E. (2001). Lactobacilli isolation from dental plaque and saliva of a group of patients with caries and characterization of their surface properties. *Anaerobe*, 7: 71-77.
- Aihara, K., Kajimoto, O., Hirata, H., Takahashi, R., Nakamura, Y. (2005). Effect of powdered fermented milk with *Lactobacillus helveticus* on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *J Am Coll Nutr.*, 24:257– 265.
- Akçelik, M., Ayhan, K., Çakır, D., Doğan, H.B., Gürgün, V., Halkman, A., Kaleli, D., Kuleasan, H., Özkaya, D.F., Tunail, N., Tükel, Ç. (2000), Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Birimi, Ankara, 2. Baskı, 229-275, 514-515.
- Alegria, E.G., López, I., Ruiz, J.I., Saenz, J., Fernández, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., Ruiz-Larrea, F., (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiology Letters* 230, 53–61.
- Al-Nawas, B. and Grotz, K.A. (2006) Prospective study of the long term change of the oral flora after radiation therapy. *Support Care Cancer*, 14(3): 291-296.
- Almstahl, A., Wikstrom, M., Carlen, A., Eliasson, L., Lingstrom, P. (2004). *Lactobacillus* species in supragingival plaque in subjects with hyposalivation. *Int J Dent Hyg.*, 2(3): 143
- Anilkumar , K. And Monisha, A. (2012). Role of friendly bacteria in oral health – a short review, *Oral Health Prev. Dent.*, 10 3–8.
- Anonim (1997), Disk Diffusion Susceptibility Testing (Kirby-Bauer Method), <http://www.addl.purdue.edu/newsletters/1997/spring/dds.shtml>
- Antilla, S.S., Knuuttila, M.L. and Sakki, T.K. (1999). Depressive symptoms favour abundant growth of salivary lactobacilli. *Psychosom Med.*, 61(4): 508-512.
- Ahrne, S., Nobaek, S., Jeppsson, B., Adlerberth, I., Wold, A.E. and Molin, G., (1998). The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *Journal of Applied Microbiology* 85: 88-94.

- Arena, M.E., Saguir, F.M., Manca de Nadra, M.C., (1999). Arginine dihydrolase pathway in *Lactobacillus plantarum* from orange. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 203–209.
- Ashwin, D. Ke, V. Taranath, M. Ramagoni, NK. Nara, A. Sarpangala, M. (2015). Effect of Probiotic Containing Ice-cream on Salivary Mutans Streptococci (SMS) Levels in Children of 6-12 Years of Age: A Randomized Controlled Double Blind Study with Six-months Follow Up. *J Clin Diagn Res.*;9:ZC06-9
- Ahirwar, S., S., Gupta, M., K., Gupta G., and Screening, V., S. (2017). Isolation and Identification of *Lactobacillus* Species from Dental Caries of Children *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 6(1): 497-503
- Avila, M., Ojcius, D.M. and Yilmaz, Ö. (2009). The oral microbiota: Living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.*, 28(8):405-11.
- Bardow, A., Nyvad, B. and Nauntofte, B. (2001). Relationships between medication intake, complaints of dry mouth, salivary flow rate and composition, and the rate of tooth demineralization in situ. *Arch Oral Biol* ., 46(5): 413-23.
- Begley, M., Gahan, C.G.M. and Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29:625–651.
- Brighton, D., Brailsford, S., Samaranayake, L.P., Brown, J.P., Grant-Mills, D., Harris, R., Lo, E.C.M., Naidoo, S., Ramos-Gomez, F., Soo, T.C., Burnside, G., Pine, C.M. (2004). A multi-country comparison of caries-associated microflora in demographically diverse children. *Community Dent. Health*, 21(1 Suppl): 96-101.
- Benton, D. Williams, C. Brown, A. (2007). Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition. *Eur J Clin Nutr*; 61: 355–361.
- Berkowitz, RJ. Turner, J. Green, P. (1981). Maternal salivary levels of *Streptococcus mutans* and primary oral infection of infants. *Arch Oral Biol*;26:147– 149.
- Berkowitz, RJ. (2003). Causes, treatment and prevention of early childhood caries: A microbiologic perspective. *J Can Dent Assoc*;69:304–307.
- Berg, RD. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*; 4:430-435
- Besselink, M.G.H., Van Santvoort, H.C., Buskens, E., Boermeester, M.A. (2008). Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 371:651–659.
- Bizzini, B., Pizzo, G., Scapagnini, G., Nuzzo, D., Vasto, S., (2012). Probiotics and oral health. *Curr. Pharm. Des.*, 18 5522–5531.

- Boirivant, M., and Strober, W. (2007). The mechanism of action of probiotics. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 23:679–692.
- Botha, S.J. (1993). Oral lactobacilli isolated from teenage orthodontic patients. *J Dent Assoc S Afr.*, 48(4): 177-181.
- Bowden, G.H., Ekstrand, J., McNaughton, B., Challacombe, S.J. (1990). Association of selected bacteria with the lesions of root surface caries. *Oral Microbiol Immunol.*, 5(6): 346-351.
- Boyle, R.J. and Tang, M.L.K. (2006). The role of probiotics in the management of allergic disease. *Clin. Exp. Allergy* 36:568–576.
- Boris, S., Suarez, J.E. and Barbes, C. (1997). Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *J Appl Microbiol.*, 83:413–420.
- Boris S., & Barbes C., (2000). Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect* 2: 543–54
- Bosch, M., Nart, J., Audivert, S., Bonachera, M.A., Alemany, A.S., Fuentes, M.C., Cuñé, J. (2012). Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral health. *Arch Oral Biol.* 57(5):539-49.
- Brannon, C. (2003). Prebiotics: feeding friendly bacteria. *Today's Dietitian September*.
- Bron, P.A., Molenaar, D., Vos, W.M., Kleerebezem, M. (2006). DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.*, 100:728–738.
- Bruzzese, E., Volpicelli, M., Squaglia, M., Tartaglione, A., Guarino, A. (2006). Impact of prebiotics on human health, *Dig Liver Dis*;38:283-7.
- Burton, J.P., Chilcott, C.N., Tagg, J.R. (2005). The rationale and potential for the reduction of oral malodour using *Streptococcus salivarius* probiotics. *Oral diseases* 11 Suppl 1:29-31.
- Burton, J., Drummond, B., Chilcott, C., Tagg, J., Thomson, W., Hale, J., Wescombe, P. (2013). Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial, *J. Med. Microbiol.*, 62 875–884.
- Busscher, H.J., Mulder, A.F. and van der Mei, H.C. (1999). In vitro adhesion to enamel and *in vivo* colonization of tooth surfaces by lactobacilli from a bio-yoghurt. *Caries Res.*, 33(5): 403-404.
- Caglar, E., Kargul, B. and Tanboga, I. (2005a). Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. *Oral Dis.*, 11:131– 137.

- Caglar, E., Sandalli, N., Twetman, S., Kavaloglu, S., Ergeneli, S., Selvi, S. (2005b). Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontol Scand*. 63(6):317-20.
- Caglar, E., Cildir, S.K., Ergeneli, S., Sandalli, N., Twetman, S. (2006). Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta Odontol Scand* , 64: 314-318.
- Caglar, E., Kavaloglu, S.C., Kusu, O.O., Sandalli, N., Holgerson, P.L., Twetman, S. (2007). Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clin Oral Investig*, 11: 425-429.
- Caglar, E., Kusu, O.O. Cildir, S.K. Kuvvetli, S.S. Sandalli, N. (2008). A probiotic lozenge administered medical device and its effect on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Int J Paediatr Dent*..18:35-39
- Caglar, E., Kusu, O.O., Kuvvetli, S.S, Kavaloglu, S.C., Cildir, S., Sandalli, N., Twetman, S. (2008). Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontol Scand*. Jun;66(3):154-8.
- Camilleri, M. (2006). Probiotics and irritable bowel syndrome: rationale, putative mechanisms, and evidence of clinical efficacy. *J. Clin. Gastroenterol.*, 40:264–269.
- Camp, S., Lei, Y. and Costalonga, M., Zhang, Y.S., Zaia, A., Vajna, R., Ross, K.F., Herzberg, M.C. (2006). Systemic disease and the oral microbiota, “Lamont RJ, Burne RA, Lantz MS, Leblanc DJ (eds): Oral Microbiology and Immunology” kitabında s.361-75, ASM Press Washington
- Campus, G., Cocco, F., Carta, G., Cagetti, M.G., Simark-Mattson, C., Strohmenger, L. (2014). Lingström P Effect of a daily dose of *Lactobacillus brevis* CD2 lozenges in high caries risk schoolchildren. *Clin Oral Investig.*, 18(2):555-61.
- Cappa, F., Cattivelli, D. and Cocconcelli, P.S. (2005). The *uvrA* gene is involved in oxidative and acid stress responses in *Lactobacillus helveticus* CNBL1156. *Res. Microbiol.*, 156:1039–1047.
- Carlen, A., Olsson, J. and Ramberg, P. (1996). Saliva mediated adherence, aggregation and prevalence in dental plaque of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces* spp, in young and elderly humans. *Arch Oral Biol*, 41, 1133-40.
- Casarin, R.C.V, Barbagallo, A., Meulman, T., Santos, V.R., Sallum, E.A., Nociti, F.H. (2013). Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodont Res.*, 48: 30–36.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *journal of Food Protection*, 61; 1636-1643.

- Chung, J., Ha, E.S., Park, H.R., Kim, S. (2004). Isolation and characterization of *Lactobacillus* species inhibiting the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Oral Microbiol Immunol.*, 19(3): 214-216.
- Chuang, L.C., Huang, C.S., Ou-Yang, L.W., Lin, S.Y. (2011) Probiotic *Lactobacillus paracasei* effect on cariogenic bacterial flora. *Clin Oral Investig.*, 15(4):471-6.
- Chalakov, T.Y, Yanakieva, V., Dobrev, I., Salim, Y., Denkova, Z. (2017). Antimicrobial activity of *Leuconostoc lactis* strain BT17, isolated from a spontaneously fermented cereal beverage (boza). *J Microbiol Biotechnol Food Sci.*, 7(1): 47-9
- Cildir, S.K., Germec, D., Sandalli, N., Ozdemir, F.I., Arun, T., Twetman, S., Caglar, E. (2009). Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. *Eur J orthod.* ;31(4):407-11.
- Cildir, S.K., Sandalli, N., Nazli, S., Alp, F., Caglar, E. (2012). A novel delivery system of probiotic drop and its effect on dental caries risk factors in cleft lip/palate children. *Cleft Palate Craniofac J.*, 49(3):369-72.
- Cogulu, D., Ak, A.T., Caglar, E., Sandalli, N., Karagozlu, C., Ersin, N., Yerlikaya, O. (2010). Potential effects of a multistrain probiotic-kefir on salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. *J. Dent Sci.*, 5:144-9.
- Colloca, M., E., Ahumada, M., C., López, M., E., Nader-Macias, M., E. (2000). Surface properties of *Lactobacilli* isolated from healthy subjects. *Oral Dis.* 6:227-233.
- Comelli, E.M., Guggenheim, B., Stingle, F., Neeser, J.R. (2002). Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *Eur J Oral Sci.*, 110:218-224.
- Commane, D., Hughes, R., Shortt, C., Rowland, I. (2005). The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutat Res.*;591:276–89.
- Danielsen, M., Wind, A., A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 1-11.
- De Angelis, M., and Gobbetti, M. (2004). Environmental stress responses in *Lactobacillus*. a review. *Proteomics.*, 4:106–122.
- Demirok N. T., (2014). Bebeklerden İzole Edilen *Lactobacillus* spp.'nin Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi. Doktora tezi. Namık kemal üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Dhakal, R., Bajpai, V.K, Baek, K.H. (2012). Production of GABA by microorganisms: a review. *Braz J Microbiol.*;43(4):1230–41

- Dinçer, E., (2007). Et ve et ürünlerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve bunların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Doran, A., Kneist, S. and Verran, J. (2004). Ecological control: in vitro inhibition of anaerobic bacteria by oral streptococci. *Microb Ecol Health Dis.*, 16: 23–27
- Dugas, B., Mercenier, A. and Lenoir-Winjkooop, I. Arnaud, C., Dugas, N., Postairec, E. (1999). Immunity and probiotics. *Immunol Today*, 20:387-90
- Duncan, MJ. (2003) Genomics of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.* ;14(3):175-87.
- Edwards, C.G., Powers, J.R., Jensen, J.R., Weller, K.M., Peterson J.C. (1993). *Lactobacillus* spp. from Washington State wines: isolation and characterisation *J. Food Sci.*, 58, 453-458
- Elahi, S, Pang, G., Ashman, R., Clancy, R. (2005). Enhanced clearance of *Candida albicans* from the oral cavities of mice following oral administration of *Lactobacillus acidophilus*. *Clin Exp Immunol.*, 141(1):29-36.
- Elavarasu, S., Jayapalan, P., Murugan, T. (2012). Bugs that debugs: probiotics *J. Pharm. Bioall. Sci.*, (4) 22
- Ellen, R.P., Banting, D.W. and Fillery, E.D. (1985). *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* detection in the assessment of dental root surface caries risk. *Dent Res.*, 64(10): 1245-1249.
- Egervarn, M. (2009). Antibiotic resistance in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum*. Unpublished Ph. D. Dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences, Dept. of Microbiology, Sweden.
- Erten, Ö., (2005). The use of probiotics against dental cavities. Science Institute Thesis. Süleyman Demirel University, Isparta, Turkey.
- Esteban-Fernández, A., Zorraquín-Peña, I., Ferrer, M. D., Mira, A., Bartolomé, B., González de Llano, D., & Moreno-Arribas, M. V. (2018). Inhibition of Oral Pathogens Adhesion to Human Gingival Fibroblasts by Wine Polyphenols Alone and in Combination with an Oral Probiotic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 2071-2082
- El-Nezami, H.S., Polychronaki, N.N. and Ma, J. (2006). Probiotic supplementation reduces biomarker for increased risk of liver cancer in young men from Southern China. *Am J Clin Nutr.*, 83:1199–1203.
- Ewaschuk, J.B. and Dieleman, L.A. (2006). Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.*, 12(37):5941-50.

- Falagas, M.E., Betsi, G.I., Tokas, T., Athanasiou, S. (2006). Probiotics for prevention of recurrent urinary tract infections in women: a review of the evidence from microbiological and clinical studies. *Drugs*, 66:1253–1261.
- Falagas, M.E., Betsi, G.I. and Athanasiou, S. (2007). Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 13: 657–664
- Fedorak, R.N. and Madsen, K.L. (2004a). Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders. *Curr Opin Gastroenterol.*, 20(2):146-55.
- Fedorak, R.N. and Madsen, K.L. (2004b). Probiotics and the management of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 10:286–299.
- Fejerskov, O. and Kidd, E. (2003). Dental caries the disease and its clinical management, Denmark, Blackwell Munksgaard.
- Filoché, S. K., Anderson, S. A. and Sissons, C. H. (2004). Biofilm growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*, 19, 322-6.
- Flichy-Fernández, A.J., Ata-Ali, J., Alegre-Domingo, T., Candel-Martí, E., Ata-Ali, F., Palacio, J.R. and Peñarrocha-Diago, M., (2015). The effect of orally administered probiotic *Lactobacillus reuteri*-containing tablets in peri-implant mucositis: a double-blind randomized controlled trial. *Journal of Periodontal Research* 50: 775-785.
- Floch, M.H. (2013). Probiotic safety and risk factors. *J Clin Gastroenterol* 47:375–376
- Fozo, E.M., Kajfasz, J.K. and Quivey, R. G. (2004). Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 238:291–295.
- Foster, J.S., Pan, P.C. and Kolenbrander, P.E. (2004). Effects of antimicrobial agents on oral biofilms in a saliva-conditioned flowcell. *Biofilms*, 1: 5-12.
- Fure, S.A. (2003). ten-year cross-sectional and follow-up study of salivary flow rates and mutans streptococci and lactobacillus counts in elderly Swedish individuals. *Oral Health Prev Dent.*, 1(3): 185- 194.
- Gedalia, I., Ionat-Bendat, D., Ben-Mosheh, S., Shapira, L. (1991). Tooth enamel softening with a cola type drink and rehardening with hard cheese or stimulated saliva in situ. *J Oral Rehabil.*, 18: 501-506.
- Ghasempour, M., Sefdgar, S.A., Moghadamnia, A.A., Ghadimi, R., Gharekhani, S., Shirkhani, L. (2014) Comparative study of Kefir yogurt drink and sodium fluoride mouth rinse on salivary mutans streptococci. *J Contemp Dent Pract.* ;15:214–17
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota:introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.*, 125: 1401-1412

- Gibbons, R. J. (1996). Role of adhesion in microbial colonization of host tissues: a contribution of oral microbiology. *J Dent Res*, 75, 866-70.
- Gibson, G.R. and Fuller, R. (2000). Aspects of in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J. Nutr.* 130:391-395.
- Gill, H.S. (2003). Probiotics to enhance anti-infective defence in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*, 17:755-73.
- Gilliand, S.E., (1990), "Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria" *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 175-188.
- Gómez-Ruiz, J.A., Cabezas, L., Martínez-Castro, I., González-Viñas, M.A., Poveda, J.M., (2008). Influence of a defined-strain starter and *Lactobacillus plantarum* as adjunct culture on volatile compounds and sensory characteristics of Manchego cheese. *European Food Research and Technology* 227, 18–190.
- Grudianov, A.I., Dmitrieva, N.A. and Fomenko, E.V. (2002). Use of probiotics Bifidumbacterin and Acilact in tablets in therapy of periodontal inflammations. *Stomatologiia (Mosk)*, 81(1):39-43.
- Gruner, D., Paris, S. and Schwendicke, F. (2016). Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 48, 16–25.
- Guan, Y.H., de Graaf, T., Lath, D.L., Humphreys, S.M., Marlow, I., Brook, A.H. (2001). Selection of oral microbial adhesion antagonists using biotinylated *Streptococcus sanguis* and a human mixed oral microflora. *Archives of Oral Biology*, 46, 129-138
- Guarner, F. and Schaafsma, G. J. (1998.) Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* (39), 237-238.
- Gungor, O.E., Kirzioglu, Z., Dincer, E., Kivanc, M., (2013). Who will win the race in childrens' oral cavities? *Streptococcus mutans* or beneficial lactic acid bacteria?. *Beneficial Microbes*, 4: 237-245
- Gültekin, M. (2004). Probiyotikler, *ANKEM Derg* 18(Ek 2), :287-9.
- Haukioja, A. (2010). Probiotics and oral health, *Eur. J. Dent.*, 4, 348–355.
- Halami, P.M., Chandrashekar, A. and Nand, K. (2000). 'Lactobacillus farciminis MD, a new strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay,'. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 197-202.
- Halkman, A.K. (2005). Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, Basak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Sti. Ankara, 73–89, 250.

- Hatakka, K., Ahola, A.J., Yli-Knuuttila, H., Richardson, M., Poussa, T., Meurman, J.H., Korpela, R. (2007). Probiotics reduce the prevalence of oral candida in the elderly--a randomized controlled trial. *J Dent Res.*, 86(2):125-30.
- Haukioja, A., Loimaranta, V. and Tenovu, J. (2008). Probiotic bacteria affect the composition of salivary pellicle and streptococcal adhesion *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol*, 23, 336-43
- Hedin, C., Whelani, K. and Lindsay, J.O. (2007). Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. *Proc. Nutr. Soc.*, 66:307–315.
- Henker, J., Schuster, F. And Nissler, K. (2001). Successful treatment of gut-caused halitosis with a suspension of living non-pathogenic *Escherichia coli* bacteria-a case report. *Eur J Pediatr*, 160:592-594.
- Hill, H.S. (2004). Guarner F. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad Med J.*, 80: 516-526.
- Hillman, J., McDonell, E., Hillman, C., Zahradnik, R., Soni, M., (2009). Safety assessment of ProBiora3, a probiotic mouthwash: subchronic toxicity study in rats. *Int. J. Toxicol.*, 28: 357–367.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T., Williams, S.T. (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, 527-567.
- Hooper, S. J., Wilson, M. J. & Crean, S. J. (2009). Exploring the link between microorganisms and oral cancer: a systematic review of the literature. *Head Neck* 31, 1228–1239
- Iniesta M, Herrera D, Montero E, Zurbriggen M, Matos AR, Marin MJ., (2012). Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol.*, 39:736-44.
- Ishikawa, H., Aiba, Y., Nakanishi, M., Oh-Haashi, Y., Koga, Y. (2003). Suppression of periodontal pathogenic bacteria in the saliva of human by the administration of *Lactobacillus salivarius* II2711. *J Jap Soc Periodontol*, 45: 105-112.
- Ishimwe, N., Daliri, E. B., Lee, B. H., Fang, F. & Du, G. (2015). The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 94–105
- Isolauri, E. (2001). Probiotics in human disease *Am J Clin Nutr*, 73:1142S–6S.
- Isolauri, E. (2003). Probiotics for infectious diarrhoea. *Gut.*, 52:436–7

- Isolaure, E. (2004). The role of probiotics in paediatrics. *Current Paediatrics*, 14:104–9.
- Iwamoto, T., Suzuki, N., Tanabe, K., Takeshita, T., Hirofujii, T. (2010). Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* WB21 on halitosis and oral health: an open-label pilot trial. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 110(2):201-8.
- Jacobsen, C.N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A.E., Møller, P.L., Michaelsen, K.F., Pærregaard, A., Sandstro, B. Tvede, M., Jakobsen, M. (1999). Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by *In vitro* Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains In Humans. *Applied And Envirnl Microbiol.*, p. 4949–4956 Vol. 65, No. 11
- Jamali, Z., Aminabadi, N.A., Samie, M., Sighari, D.A, Shokravi, M., Shirazi, S. (2016). Impact of chlorhexidine pretreatment followed by probiotic *Streptococcus salivarius* strain K12 on halitosis in children: a randomised controlled clinical trial.;*Oral Health Prev Dent*, 14(4):305–313
- Jenkinson HF, Lamont RJ. Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8:175–200.
- Jensen, M.E. and Wefel, J.S. (1990). Effects of processed cheese on human plaque pH and demineralization and remineralization. *Am J Dent.*, 3: 217-223
- Jindal, G., Pandey, R.K., Agarwal, J., Singh, M.A. (2011). comparative evaluation of probiotics on salivary mutans streptococci counts in Indian children. *Eur Arch Paediatr Dent.*, 12(4):211-5.
- Jose, J.E., Padmanabhan, S. and Chitharanjan, A.B. (2013). Systemic consumption of probiotic curd and use of probiotic toothpaste to reduce *Streptococcus mutans* in plaque around orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 144(1): 67-72.
- Juneja, A. and Kakade, A. (2012). Evaluating the effect of probiotic containing milk on salivary mutans streptococci levels. *J Clin Pediatr Dent.*, 37(1):9-14.
- Kang, M.S., Na, H.S. and Oh, L.S. (2005). Coaggregation ability of *Weissella cibaria* isolates with *Fusobacterium nucleatum* and their adhesiveness to epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett.*, 253:323–329.
- Kang, M.S., Kim, B.G., Chung, J., Lee, H.C., Oh, J.S. (2006). Inhibitory effect of *Weissella cibaria* isolates on the production of volatile sulphur compounds. *J Clin Periodontol*, 33:226-232.
- Karahan, A.G., Aridoğan, B.C. and Çakmakçı, M.L. (2002). *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu*, Isparta.

- Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C. Meile, L. (2006). Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Systematic and Applied Microbiol.*, 29; 145-155.
- Kazor, C.E., Mitchell, P.M., Lee, A.M., Stokes, L.N., Loesche, W.J., Dewhirst, F.E., B.J. Paster. (2003). Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(2), 558-563.
- Keller Mette K., Allan B., Thorbjörg J., Twetman S. (2012). Effect of chewing gums containing the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* on oral malodour. *Acta Odontologica Scandinavica*, 70: 246-250
- Kıran, F., Osmanağaoğlu, Ö., (2011). Laktik asit bakterilerinin identifikasyonunda/ tiplendirilmesinde kullanılan moleküler yöntemler. *Erciyes Ün. Fen Bil. Enst. Derg.*, 27(1): 62-74.
- Kıvanç, A., K., Tahtacı, S., Kıvanç, M. (2014). Inhibitory activity of lactic acid bacteria against *Streptococcus mutans* and its biofilm Industrial, medical and environmental applications of microorganisms. Current status and trends *Antonio Méndez-Vilas* (Ed). Wageningen Academic Publishers. *The Netherlands*, 535-540.
- Kivanc, M., Yilmaz, M., Cakir, E. (2011). Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. *Turkish Journal Of Biology*, 35 (3): 313-324
- Klaenhammer, T.R., (2000). Probiotic bacteria: today and tomorrow. *J Nun.*, 130:415-416.
- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Müller-Berling, S., Witte, W. Goossens, H. (2007). Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 59; 900-912.
- Klebanoff SJ, Hillier SL, Eschenbach DA & Waltersdorph AM (1991). Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂-generating lactobacilli. *J Infect Dis*, 164: 94–100
- Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N., Blehert, D.S., Eglund, P.G., Foster, J.S., Palmer, R.J., Jr (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 66: 486–505.
- Kolenbrander, P.E, Palmer, R.J. (2004). Jr Human oral bacterial biofilms. In: Microbial biofilms. Ghannoum M, O'Toole GA, editors. *Washington,DC: ASM press*, 85-117.

- Kolenbrander, P., Palmer, R.Jr., Periasamy, S., Jakubovics, N. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol.*, 8: 471–480.
- Koll-Klais, P., Mandar, R., Leibur, E., Marcotte, H., Hammarstrom, L., Mikelsaar, M. (2005). Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol.*, 20(6): 354-61
- Koll, P., Mandar, R., Marcotte, H, Leibur, E., Mikelsaar, M., Hammarström, L. (2008). Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiology and Immunology*, 23 (2), 139–147.
- Koren, O., Spor, A., Felin, J., Fak, F., Stombaugh, J., Tremaroli, V., Behre, C.J., Knight, R., Fagerberg, B., Ley, R.E., Backhed, F. (2010). Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*;108:4592–8
- Kragen, H. (1954). The treatment of inflammatory affections of the oral mucosa with a lactic acid bacterial culture preparation. *Zahnarztl Welt.*, 9(11): 306-8.
- Könönen, E., (2000). Development of oral bacterial flora in young children. *Ann Med*;32:107–112
- Krzyściak, W., Kościelniak, D., Papież, M., Vyhouskaya, P., Zagórska-Świeży, K., Kołodziej, I., Bystrowska, B., Jurczak, A. (2017). Effect of a *Lactobacillus Salivarius* Probiotic on a Double-Species *Streptococcus Mutans* and *Candida Albicans* Caries Biofilm. *Nutrients*. 9(11): 1242.
- Laleman, I., Dettailleur, V., Slot, D.E., Slomka, V., Quirynen, M., Teughels, W. (2014). Probiotics reduce mutans streptococci counts in humans: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig*, 18(6):1539-52.
- Langlands, S.J., Hopkins, M.J., Coleman, N., Cummings, J.H. (2004). Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. *Gut*, 53: 1610-1616.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S.C. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 72:728–764.
- Lee, K., Lee, H.G., Pi, K., Choi, Y.J. (2008). Effect of low pH on protein expression by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. *Proteomics*, 8:1624-1630.
- Lee, S.H. and Kim, Y.J. (2014). A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries. *Arch Microbiol.*, 196(8):601-9.
- Leone S., Molinaro A., Alfieri F., Cafaro V., Lanzetta R., Donato A., Parrilli M. (2006). “The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides”, *CarbohydrRes*, 341, 2456- 2461,

- Lewus, C.B., Kaiser, A. ve Montville, J.T. (1991), "Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat," *Appl. and Environ. Microbiol.*, 57 (6), 1683-1688.
- Lexner, M.O., Blomqvist, S., Dahlén, G., Twetman, S., (2010). Microbiological profiles in saliva and supragingival plaque from caries-active adolescents before and after a short-term daily intake of milk supplemented with probiotic bacteria - a pilot study. *Oral Health Prev Dent.*, 8(4):383-8.
- Liljemark, W.F. and Bloomquist, C. (1996). Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med.*, 7(2): 180-198.
- Lin, X., Chen, X., Chen, Y., Jiang, W., Chen, H. (2015). The effect of five probiotic lactobacilli strains on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Oral Dis.*, 21(1):e128-34.
- Lin, X., Chen, X., Tu, Y., Wang, S., Chen, H. (2017). Effect of Probiotic Lactobacilli on the Growth of *Streptococcus mutans* and Multispecies Biofilms Isolated from Children with Active Caries *Med Sci Monit.* 23: 4175–4181.
- Liong, M., T. (2008). Safety of probiotics: translocation and infection. *Nutr. Rev.*, 66:192–202.
- Liu, S. Q. and Pilone, G. J. (1998)., "A REVIEW : Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance," *J. Appl. Microbiol.*, **84**, 315–327.
- Loenen, W.A.M. (2006). S-Adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything? *Biochem. Soc. Trans.*, 34:330–333.
- Loesche, W.J., Schork, A., Terpenning, M.S., Chen, Y.M., Stoll, J. (1995). Factors which influence levels of selected organisms in saliva of older individuals. *J Clin Microbiol.*, 33: 2550–2557.
- Logan, A., C., Katzman, M., (2005). Major depressive disorder Probiotics may be an adjuvant therapy. *Med Hypotheses.*; 64:533–538.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., (2010). *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, Palme Yayıncılık, Onbirinci baskıdan çeviri, syf;324-325.
- Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., Doyle, J., Jewell, L., Simone, C.D. (2001). Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterol.*, 121(3):580-91.
- Mager, D., L., Ximenez-Fyvie, L.A., Haffajee, A., D., Socransky, S.S. (2003). Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol.*, 30: 644–654

- Majstorovi, M, Vrani DN, Szirovicza, L. (2013). Recent achievements in preventive dentistry by introducing new probiotic toothpaste. *Coll Antropol.*;37:1307–12.
- Manning, T.S. and Gibson, G.R. (2004). Prebiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*,18: 287-298.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int. Dairy J.*, 16; 189-199.
- Marchant, S., Brailsford, S., R., Twomey, A., C., Roberts, G., J., Beighton, D., T. (2001). The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res.*, 35(6): 397-406.
- Marco, M., L., Pavan, S., and Kleerebezem, M. (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17:204–210.
- Marcotte, H. and Lavoie, M.C., (1998). Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 62: 71–109
- Marsh, P.D. and Martin, M.V. (1999). *Oral Microbiology* Fourth Edn.p.23
- Marsh, P.D. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes ? *Microb*, 149:279-294
- Martinez, A. and R. Kolter. (1997). Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J. Bacteriol.*, 179:5188– 5194.
- Marttinen, A., Haukioja, A., Karjalainen, S., Nylund, L., Satokari, R., Öhman, C., Holgersson, P., Twetman, S., Söderling, E. (2012). Short-term consumption of probiotic lactobacilli has no effect on acid production of supragingival plaque. *Clin Oral Investig.* 16(3):797-803.
- Mathara, J., M., Schillinger, U., Kutima, P., M., Mbugua, S., K., Guigas, C., Franz, C., Holzapfel, W., H., (2008). Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. *Current Microbiology* 56, 315–321.
- Matsumoto, M., Tsuji, M., Sasaki, H., Fujita, K., Nomura, R., Nakano, K., Shintani, S., Ooshima, T. (2005). Cariogenicity of the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* in rats. *Caries Res.*, 39(6): 479-483.
- Mayo, J.A., Zhu, H., Harty, D.W., Knox, K.W. (1995). Modulation of glycosidase and protease activities by chemo-stat growth conditions in an endocarditis strain of *Streptococcus sanguis*. *Oral Microbiol Immunol.*, 10(6):342-8.
- Mathara, J., M., Schillinger, U., Kutima, P., M., Mbugua, S., K., Guigas, C., Franz, C., Holzapfel, W., H., (2008). Functional properties of *Lactobacillus plantarum*

- strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. *Current Microbiology*, 56, 315–321.
- McDonald, L., C., Fleming, H., P., Hassan, H.M. (1990). Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2120–2124.
- Mego, M., Majek, J., Koncekova, R., Ebringer, L., Čierniková, S., Rauko, P., Kováč, M., Trupl, J., Slezák, P. (2005). Intramucosal bacteria in colon cancer and their elimination by probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 with organic selenium. *Folia Microbiol.*, 50:443–7.
- Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejdi, A. (2011). Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br J Nutr.*, 105:755–764.
- Meurman, J.H. (2005). Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci.*, 113: 188-196.
- Meurman, J.H. and Stamatova, I. (2007). Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis.*, 13:443–451.
- Michalek, S.M., Hirasawa, M., Hiroshi, K., Kuniyasu, O., Mcghee, J.R. (1981). Oral ecology and virulence of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in Gnotobiotic Rats. *Infect Immun.*, 33 (3): 690-696.
- Milesi, M.M., McSweeney, P.L.H., Hynes, E.R., (2008). Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of *Lactobacillus plantarum* in two model cheese systems: cheddar cheese-type and soft-cheese type. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 884–892.
- Montalto, M., Vastola, M., Marigo, L., Covino, M., Graziosetto, R., Curigliano, V., Santoro, L., Cuoco, L., Manna, R., Gasbarrini, G. (2004). Probiotic treatment increases salivary counts of lactobacilli: a double - blind, randomized, controlled study. *Digestion*, 69(1): 53-6.
- Moore, W.E. and Moore, L.V. (2000). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol*, 5(1):66-77.
- Mourad, K. and Nour-Eddine, K. (2006). Microbiological study of naturally fermented Algerian green olives: Isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts along with the effects of brine solutions obtained at the end of olive fermentation on *Lactobacillus plantarum*. *Grasas y Aceites*, 57; 292-300.
- Mumcu, Z.N., (1997). Kefirden izole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik, Antimikrobiyal ve Plazmit DNA'larının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Munoz-Jeldrez, J. and Martinez, D. (1980). Lactobacilos de origen oral, determinacion de especies y susceptibilidad a ciertos autobioticos. *Odontol Chilena*, 28: 86-88.
- Nagarajappa R, Daryani H, Sharda AJ, Asawa K, Batra M, Sanadhya S. (2015) Effect of Chocobar Ice Cream Containing Bifidobacterium on Salivary *Streptococcus mutans* and Lactobacilli: A Randomised Controlled Trial. *Oral Health Prev Dent.*;13:213-8.
- Nancy, J. Dorignac, G. (1992). Lactobacilli from the dentin and saliva in children. *J Clin Pediat Dent.*, 16(2): 107-111.
- Neuhaus, F.C. and Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67:686–723.
- Näse, L., Hatakka, K., Savilahti, E., Saxelin, M., Pönkä, A., Poussa, T., Korpela, R., Meurman, J.H. (2001). Effect of longtermconsumptionof a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res.*, 35(6), 412-420.
- Nikawa, H., Makihiro, S., Fukushima, H., Nishimura, H., Ozaki, K., Darmawan, S. (2004). *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *Int J Food Microbiol* 95: 219-223.
- Nozari, A., Motamedifar, M., Seifi, N., Hatamizargaran, Z., Ranjbar, M.A. (2015). The effect of iranian customary used probiotic yogurt on the children's salivary cariogenic microflora. *J Dent* .16(2):81-6.
- O'Flaherty, S., and Klaenhammer, T. R., (2010). The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut/host. *Int. Dairy J.*, 20: 262–268.
- Ouwehand, A., C., Salminen, S., and Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 279-89.
- Owen, O.W. (1949). A study of bacterial counts (lactobacilli) in saliva related to orthodontic appliances. *Amer J Orthodont.*, 35: 672-678.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P. (2003). 'Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Grek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties,' *Meat Science*, 65, 859-867.
- Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., Kim, H.Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for heath. *J Appl Microbiol.*, 100(6):1171-85.
- Paster, B.J., Boches, S.K., Galvin, J.L., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Sahasrabudhe, A., Dewhirst, F.E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.*, 183:3770–3783.

- Parente, E., Ciocia, F., Ricciardi, A., Zotta, T., Felis E., G., Torriani, S. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. *International Journal of Food Microbiology*, 144 (2010) 270–279.
- Petti, S., Tarsitani, G. and Simonetti D'Arca, A. (2008). Antibacterial activity of yoghurt against viridans streptococci in vitro. *Arch Oral Biol.*, 53: 985-990.
- Pillai, A. and Nelson, R. (2008). Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD004611.
- Pfeiler, E.A., Azcarate-Peril, M.A. and Klaenhammer, T.R. (2007). Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.*, 189:4624–4634.
- Pozharitskaia, M.M., Morozova, L.V., Mel'nichuk, G.M., Mel'nichuk, S.S. (1994 Apr-Jun). The use of the new bacterial biopreparation Acilact in the combined treatment of periodontitis *Stomatologiia.*, 73(2):17-20.
- Pradeep, K., Kuttappa, M.A. and Prasana, K.R. (2014). Probiotics and oral health: an update. *SADJ.*, 69(1): 20-4.
- Prasad, J, Gill, HS, Smart, JB and Gopal, PK. (1999). Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal* 8, 993–1002
- Rafter, J., Bennett, M.G. Caderni, Y., Clune, R., Hughes, P.C., Karlsson, A., Klinder, M., O'Riordan, G.C., O'Sullivan, B., Pool-Zobel, G., Rechkemmer, M., Roller, I., Rowland, M., Salvadori, H., Thijs, J., Van Loo, B., Watzl, B., Collins, J.K. (2007). Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am. J. Clin. Nutr.*, 85:488–496.
- Ranganathan R, Vaidya R. (2011). Preventing dental caries the probiotic approach. *The Journal of Ahmadabad Dental College and Hospital.*, 2:60–65.
- Rao AV, Bested AC, Beaulne TM, Katzman MA, Iorio C, Berardi JM, Logan AC., (2009). A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut Pathog*;1:6
- Reid, G., McGroarty, J.A., Angotti, R., Cook, R.L. (1988). *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Can J Microbiol.*, 34:344–351.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M.T., McCormick, J.K. (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev.*, 16: 658-672.
- Redondo-Lopez, V., Cook, R.L and Sobel, J.D., (1990). Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis* 12: 856–872.

- Riquelme, A.J, Calvo, M.A, Guzman, A.M, Depix, M.S., García, P.M.D., Pérez, C.M.D., Arrese, M.M.D., Labarca, J.A.M.D. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* fungemia after *Saccharomyces boulardii* treatment in immunocompromised patients. *J Clin Gastroenterol*, 36:41-3.
- Roberson, T.M, Heymann, O.H. and Swift, E.J., (2010). Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry, Gürkan S, Yalcin Cakir F, 3. Bölüm: Karyoloji: Lezyon, Etiyoloji, Önleme ve Kontrol (Cariology: The Lesion, Etiology, Prevention and Control), Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri. p. 67- 134.
- Rodríguez G., Ruiz B., Faleiros S., Vistoso A., Marró M.L., Sánchez J., Urzúa I., and Cabello R. (2016) Probiotic Compared with Standard Milk for High-caries Children: A Cluster Randomized Trial *Journal of Dental Research*, Vol. 95(4) 402–407
- Rollins, M., Joseph, S.W. (2000). BSCI 424 Pathogenic Microbiology, Antibiotic Disk Susceptibilities (Kirby-Bauer Disk-Diffusion Method).
<http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/LabMaterialsMethods/AntibioticDisk.htm>.
- Román-Méndez, C., Badet, C., Yáñez, A., Dominguez, M.,L., Giono, S., Richard, B., (2009). Identification of oral strains of *Lactobacillus* species isolated from Mexican and French children. *J Dent Oral Hyg.*, 1:9-16
- Rotimi, V.O., Duerden, B.I. (1981). The development of the bacterial flora in normal neonates. *J Med Microbiol.* 14(1):51-62.
- Ruby, J., Goldner, M. (2007). Nature of symbiosis in oral disease, *J Dent Res.*, 86(1):8-11.
- Rungsri, P., Akkarachaneeyakorn, N., Wongsuwanlert, M., Piwat, S., Nantarakchaikul, P., Teanpaisan, R. (2017). Effect of fermented milk containing *Lactobacillus rhamnosus* SD11 on oral microbiota of healthy volunteers: A randomized clinical trial *J Dairy Sci.* Oct;100(10):7780-7787.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol.* Dec 28;84(3):197-215.
- Saavedra, J.M., Abi-Hanna, A., Moore, N., Yolken, R.H. (2004). Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *Am J Clin Nutr.*, 79(2):261-7.
- Salminen, S. Deighton, M.A., Benno, Y. and Gorbach, S.L. (1998). Lactic acid bacteria in health and disease. In: Salminen S., von Wright, A. eds. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc. pp. 211-254.

- Salminen, S. and Wright, A. (2004). *Ouwehand A Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*, Third Edition CRC Press
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Second Edition.
- Samot, J., Badet, C., (2012), Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health, *Anaerobe* 17:69-72.
- Sanders, M.E. (2003). Probiotics:consideration for human health. *Nutr Rev.*, 61:91-9.
- Sawatari, Y., Yokota, A., (2007). Diversity and mechanisms of alkali tolerance in Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3909–3915.
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., Black, R.E. (2006). Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infect. Dis.*, 6:374–382.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K. (1989), ‘Antibacterial Activity of Lactobacillus sake Isolated from Meat,’ *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (8), 1901–1906.
- Schiffrin, E.J., Rochat, F., Link-Amster, H.A. (1995). Immune system stimulation by probiotics. *J Dairy Science*; 78: 1597–1606.
- Schwendicke F., Dörfer C., Kneist S., Meyer-Lueckel H., Paris S. (2014a). Cariogenic effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a dental biofilm model. *Caries Res.*;48(3):186-92.
- Schwendicke, F., Horb, K., Kneist, S., Dörfer, C., Paris, S. (2014b). Effects of heat-inactivated Bifidobacterium BB12 on cariogenicity of *Streptococcus mutans* in vitro. *Arch Oral Biol.* ;59(12):1384–1390
- Scully C, Greenman J. (2008). Halitosis (breath odor) *Periodontol* 2000.; 48: 66-75.
- Senok, A.C., Ismaeel, A.Y. and Botta, G.A. (2005). Probiotics: facts and myths. *Clin Microbiol Infect.*, 11(12):958-66.
- Shao, Y., Zhang, W., Gou, H., Pan, L., Zhang, H., Sun, T. (2015). Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 50, 250-258.
- Shenderov, BA. (2011). Probiotic (symbiotic) bacterial languages. *Anaerobe*; 1:490-5.
- Simark-Mattsson, C., Emilson, C.G., Hakansson, E.G., Jacobsson, C., Roos, K., Holm, S. (2007). *Lactobacillus*-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs caries-active subjects. *Eur J Oral Sci.*, 115(4): 308-14.

- Singh, R.P., Damle, S.G, and Chawla, A. (2011). Salivary mutans streptococci and lactobacilli modulations in young children on consumption of probiotic ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb12 and *Lactobacillus acidophilus* La5. *Acta Odontol Scand.*, 69(6):389-94
- Sinkiewicz, G., Cronholm, S., Ljunggren, L., Dahlén, G., Bratthall, G. (2010). Influence of dietary supplementation with *Lactobacillus reuteri* on the oral flora of healthy subjects. *Swed Dent J.* 34(4):197-206.
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C.G., Coda, R., Gobbetti, M., (2007). Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 7283–7290.
- Smith, S.I, Aweh, A.J, Coker, A.O., Savage, K.O., Abosede, D.A., Oyediji, K.S. (2001). Lactobacilli in human dental caries and saliva. *Microbios*; 105(411): 77-85.
- Socransky, S.S, Haffajee, A.D. (2005). Periodontal Microbial Ecology. *Periodontol 2000*, Vol. 38, 135–187
- Song, Y.-L., Kato, N., Matsumiya, Y., Liu, C.-X., Kato, H., Watanabe, K., (1999). Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. *J. Clin. Microbiol.* 37:3062-3064.
- Sookkhee, S., Chulasiri, M., and Prachyabrued, W. (2001). Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *J Appl Microbiol.*, 90: 172-179
- Söderling, E., Isokangas, P., Pienihäkkinen, K., Tenovuo, J., Alanen, P. (2001). Influence of maternal xylitol consumption on mother-child transmission of mutans streptococci: 6-year follow-up. *Caries Res.*, 35:173–177.
- Speck, M.L. (1976), *Compendium Of Methods For The Microbiological Examination Of Foods*, American Public Health Association, Washington, DC, 89.
- Stamatova, I., Kari, K., Vladimirov, S. & Meurman, J. H. (2009) *In vitro* evaluation of yoghurt starter lactobacilli and *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion to saliva-coated surfaces. *Oral Microbiol Immunol.*, 24, 218-23.
- Stamatova, I. and Meurman, J. H. (2009) Probiotics: health benefits in the mouth. *Am J Dent*, 22, 329-38.
- Sturme, M. H. J., Nakayama, D. Molenaar, Y. Murakami, R. Kunugi, T. Fujii, E. E. Vaughan, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos. (2005). An agr-like two-component regulatory system in *Lactobacillus plantarum* is involved in production of a novel cyclic peptide and regulation of adherence. *J. Bacteriol.* 187:5224-5235.

- Szajewska, H., Kotowska, M., Mrukowich, J.Z. (2001). Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of rotavirus nosocomial infection *J Pediatr*;138:361-5.
- Tagg J. Canada: Probiotic gum with BLIS-K12. [Cited: 2014 Dec 9]. Available from: <http://culturedcare.com/>.
- Taipale, T., Pienihäkkinen, K., Alanen, P., Jokela, J., Söderling, E. (2013). Administration of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB-12 in early childhood: a post-trial effect on caries occurrence at four years of age. *Caries Res.*;47:364-72
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, D., Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R. (1989). 3. ve 4. Sınıf Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu, Anadolu Üniversitesi, Eğitim Sağlık ve Bilimsel Arastırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, No. 74, Eskisehir, 23-25, 240.
- Taner, A.C.R., Milgrom, P.M., Kent, R., Mokeem, S.A., Page, R.C., Riedy, C.A. (2002). Weinstein P, Bruss J: The microbiota of young children from tooth and tongue samples. *J Dent Res*;81:53–57.
- Taranto, M., P., Murga, M., L., F., Lorca, G., and de Valdez, G., F. (2003). Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. *J. Appl. Microbiol.* 95:86–91.
- Teanpaisan, R., Dahlen, G. (2006). Use of polymerase Chain Reaction techniques and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for differentiation of oral *Lactobacillus* species. *Oral Microbiol Immunol*; 21: 79-83.
- Teanpaisan, R., Piwat, S., Dahlén, G. (2011). Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. *Lett Appl Microbiol.* Oct;53(4):452-9.
- Tehrani, M., H., Akhlaghi, N., Talebian, L., Emami, J., Keyhani, S., E., ve Etzad, S. (2016). Effects of probiotic drop containing *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium infantis*, and *Lactobacillus reuteri* on salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* levels. *Contemp Clin Dent.* Oct-Dec; 7(4): 469–474.
- Temmerman, R., Pot, B. and Huys, G. (2002). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int.J. Food Microbiol.*, 81; 1-10.
- Testa, M.M., Valladares, R., Cardenas, IL., (2003). Antagonistic interactions among *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia* with oral lactobacilli. *Res Microbiol* 154:669–675
- Thomas J. Chicago, IL: GUM® PerioBalance® A Breakthrough in Oral Health Care. [Cited: 2014 Dec 14]. Available from: <http://www.periobalance.com/about-gum-periobalance.aspx>.
- Tindall, B., J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W., Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60(1), 249–266.

- Toksoy, A., Beyatlı, Y., Aslım, B. (1999). Sucuk ve Sosislerden İzole Edilen *Lactobacillus plantarum* Suşlarının Bazı Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi. *Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi*, 23:533-540
- Tong, Z., Zhou, L., Li, J., Kuang, R., Lin, Y., Ni, L. (2012). An in vitro investigation of *Lactococcus lactis* antagonizing cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* .,57:376-82.
- Twetman, S. (2012). Are we ready for caries prevention through bacteriotherapy? *Braz Oral Res*;26:64-70
- Twetman, S., Keller, M., K. (2012). Probiotics for caries prevention and control. *Adv Dent Res*.;24:98-102
- Twetman, S. (2016). Caries risk assessment in children: how accurate are we? *Eur Arch Paediat Dent*. 17(1):27–32.
- Tynkkynen, S., Singh, K., V., Varmanen, P. (1998). Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance genes. *The International Journal of Food Microbiology*, 41, 195-204.
- van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich S. D., and Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82:187–216.
- Van Houte, J., Jordan, H., V., Laraway, R., Kent, R., Soparkar, P., M., DePaola, P., F. (1990). Association of the microbial flora of dental plaque and saliva with human root-surface caries. *J Dent Res*; 69(8): 1463- 1468.
- Vivekananda, M., R., Vandana, K.,L., Bhat, K.. G. (2010). Effect of the probiotic *Lactobacilli reuteri* (Prodentis) in the management of periodontal disease: apreliminary randomized clinical trial, *J. Oral Microbiol*. 1–9.
- Vriesema, A., J., Dankert, J., Zaat, S., A. (2000). A shift from oral to blood pH is a stimulus for adaptive gene expression of *Streptococcus gordonii* CH1 and induces protection against oxidative stress and enhanced bacterial growth by expression of *mrsA*, *Infect Immun*;63(3):1061-8.
- Wall, T., M. Bath, R. A. Britton, H. Jonsson, J. Versalovic, and S. Roos. (2007). The early response to acid shock in *Lactobacillus reuteri* involves the ClpL chaperone and a putative cell wall-altering esterase. *Appl. Environ. Microbiol*. 73:3924–3935.
- Wei, H., V. Loimaranta, J. Tenovuo, S. Roka, E.L. Syvaioja, H. Korhonen, V. Joutsjoki, P. Marnila. (2002). Stability and activity of specific antibodies against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in bovine milk fermented with

- Lactobacillus rhamnosus* strain GG or treated at ultra-high temperature. *Oral Microbiology and Immunology*.17 (1): 9-15.
- Whitehead, K., J. Versalovic, S. Roos, and R. A. Britton. (2008). Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:1812–1819.
- Winzer, K., K. R. Hardie, and P. Williams. (2003). LuxS and autoinducer-2: their contribution to quorum sensing and metabolism in bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* 53:291–396.
- Xanthopoulos ,V., Petridis, D., Tzanetakis, N. (2001). Characterization and Classification of *Streptococcus Thermophilus* and *Lactobacillus Delbrueckii* Subsp. *Bulgaricus* Strains Isolated from Traditional Greek Yogurts. *Journal of Food Science* 5:747–752
- Prasad, J, Gill, H.S., Smart, J.B. and Gopal, P.K. (1999). Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal* 8, 993–1002
- Yli-Knuuttila, H., Snall, J., Kari, K., Meurman, J.H. (2006). Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol*; 21(2): 129-131.
- Yoo, J., Shin, I., Jeon, J., Yang, Y., Kim, J., Lee, D. (2017). The Effect of Probiotics on Halitosis: a Systematic Review and Meta-analysis.*Probiotics Antimicrob Proteins*. Nov 22.
- Young, R.J., Huffman, S. (2003). Probiotic use in children. *J Pediatr Health Care*, 17:277-83.
- Zahradnik, R.T, Magnusson, I., Walker, C., McDonell, E., Hillman, C.H., Hillman, J.D., (2009). Preliminary assessment of safety and effectiveness in humans of ProBiora3, a probiotic mouthwash. *J Appl Microbiol.*; 107(2): 682-90.
- Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K. and Gill, H.S. (2005). Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Int. J. Food Microbiol.*, 98; 211-217.