

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

86792

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

**VAJİNAL KAYNAKLI LAKTOBASİLLERDE BAKTERİYOFAJ
VE BAKTERİYOSİNLERİN ARAŞTIRILMASI**

T 86792

DOKTORA TEZİ

Şengül ALPAY

OCAK - 1999

TRABZON

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

**VAJİNAL KAYNAKLI LAKTOBASİLLERDE BAKTERİYOFAJ
VE BAKTERİYOSİNLERİN ARAŞTIRILMASI**

Şengül ALPAY

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 25.11.1998

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 07 .01.1999

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ali Osman KILIÇ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Neriman AYDIN

Jüri Üyesi : Y. Doç. Dr. Faruk AYDIN

Enstitü Müdürü : Doç. Dr. Murat ERTÜRK

Ali O. Kiliç
Neriman Aydın
Faruk Aydın
Murat Ertürk

OCAK 1999
TRABZON

ÖNSÖZ

Çalışmamın her aşamasında benden gerek teorik, gerekse uygulamalı konularda bilgisini, danışmanlığını esirgemeyerek göstermiş olduğu anlayış ve destekten dolayı değerli hocam Doç. Dr. Ali Osman Kılıç'a teşekkürü borç bilirim.

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora öğrenimimde değerli bilgi ve katkılarını esirgemeyen değerli bölüm başkanımız Doç. Dr. Murat Ertürk'e ve değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Faruk Aydın'a içtenlikle teşekkür ederim.

Doktora yeterlilik sınavıma katılan Prof. Dr. Güher Göral'a ve Tez Savunma sınavıma katılan Doç Dr. Neriman Aydın'a, bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde teknik yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Gamze Çan, Dr. Lin Tao ve Dr. Sylvia I. Pavlova'ya teşekkür ederim.

Ayrıca, tez hazırlığım süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Ar. Gör. İlknur Tosun, Osman Birol Özgümüş, Kurtuluş Buruk, Neşe Kaklıkkaya, Kıvanç Çubukçu, Serpil Yetişkul, Meral Cihanyurdu, Demet Karaçengel Canyılmaz, Şebnem Nur Yılmaz'a ve Sağlık Bilimleri Enstitü Sekreteri Yüksel Yamak'a teşekkür ederim.

Ayrıca, gerek özel ve gerekse eğitim hayatımda her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen sevgili aileme ve arkadaşım Türkan Mert'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Ayrıca, tez çalışmamı Doç. Dr. Ali Osman Kılıç yönetimindeki 97.114.001.15 kodlu proje ile kısmen destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Rektörlüğü, Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Şengül ALPAY

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Normal Vajinal Flora	4
2.2. Vajinal Enfeksiyonlar	5
2.3. Laktobasiller	6
2.3.1. Laktobasillerin Morfolojileri ve Üreme Özellikleri	6
2.3.2. Laktobasillerin Bulundukları Yerler	6
2.3.3. Laktobasillerin Sınıflandırılması	7
2.3.4. Laktobasillerin Vajinal Sağlık Yönünden Önemi	9
2.4. Bakteriyofajlar	11
2.4.1. Bakteriyofajların Morfolojileri ve Sınıflandırılmaları	11
2.4.2. Bakteriyofaj ile Bakteri İlişkisi	15
2.4.2.1. Litik Siklüs	16
2.4.2.2. Lizojenik Siklüs	20
2.4.4. Bakteriyofajlarda Litik veya Lizojenik Karar	22
2.4.5. Bakteriyofajlarda indüklenme Mekanizmaları	23
2.4.6. Bakteriyofaj Direnç Mekanizmaları	23
2.4.7. Laktobasil Bakteriyofajları	25
2.5. Bakteriyosinler	26
3. MATERYAL VE METOD	32
3.1. MATERYAL	32
3.1.1. Çalışma Grubu	32
3.1.2. Kimyasallar, Besiyerleri, Enzim ve Ayıraçlar	32
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Bakteri Tür ve Suşları	33

3.2. METOD	33
3.2.1. Örneklerin Alınması	33
3.2.2. Örneklerin Mikrobiyolojik Değerlendirilmesi	34
3.2.3. Laktobasillerin İzolasyonu ve Saf Kültürlerinin Elde Edilmesi	34
3.2.4. Laktobasillerin İdentifikasyonu	35
3.2.4.1. Katalaz Enzimi Varlığı	35
3.2.4.2. Düşük ve Yüksek Sıcaklıkta Üreme	35
3.2.4.3. Karbohidrat Fermantasyonu	36
3.2.4.4. Eskulin Hidrolizi	36
3.2.4.5. H ₂ O ₂ Üretimi	36
3.2.5. Laktobasillerde Bakteriyofaj ve Bakteriyosinlerin Araştırılması	37
3.2.5.1. Bakteriyofaj ve Bakteriyosin İndüklenmesi	37
3.2.5.2. Bakteriyofaj ve Bakteriyosinlere Duyarlı Konakların Saptanması	38
3.2.6. Bakteriyofaj ve Bakteriyosinlerin Ayırımı	38
3.2.6.1. Lizat Dilusyon Yöntemi	38
3.2.6.2. Sıcaklık Duyarlılık Testi	39
3.2.6.3. Duyarlı Konak Enfeksiyonu	39
3.2.7. Bakteriyofajların Karakterizasyonu	40
3.2.7.1. Bakteriyofaj Stoklarının Hazırlanması	40
3.2.7.2. Bakteriyofaj Titrasyonu	41
3.2.7.3. Bakteriyofajların Elektron Mikroskopik İncelenmesi	41
3.2.8. Bakteriyofajların Litik Enfeksiyon Siklusu	41
3.2.9. Spontan Bakteriyofaj İndüksiyon	42
3.2.10. Bakteriyofaj DNA İzolasyonu	42
3.2.10.1. Bakteriyofaj DNA'larının Restriksiyon Enzim Analizleri	43
3.2.11. DNA-DNA hibridizasyon	44
3.2.11.1. Southern Hibridizasyon	44
3.2.11.2. Dot Blot Hibridizasyonu	46
3.2.12. Laktobasillerde Kromozomal DNA İzolasyonu	47
3.2.13. AP-PCR	48

3.2.14. Laktobasilleri Total Hücre Proteinlerinin Analizi	48
3.2.15. Bakteriyosin Varlığının Belirlenmesi	49
3.2.15.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi	49
3.2.15.2. Bakteriyosin Lizatlarının Katalaz Enzimine Duyarlılığı	50
3.2.16. Bakteriyosinlerin Karakterizasyonu	51
3.2.16.1. Bakteriyosinlerin Minimal İnhibisyon Konsantrasyonlarının Saptanması	51
3.2.16.2. Bakteriyosinlerin Isıya Duyarlılıklarının Saptanması	52
3.2.16.3. Bakteriyosinlerin pH'ya Duyarlılıklarının Saptanması	52
3.2.16.4. Bakteriyosinlerin Proteazlara Duyarlılıklarının Saptanması	52
3.2.16.5. Besiyerleri Kompozisyonunun Spontan Bakteriyosin Üretimine Etkisinin Saptanması	53
3.2.16.6. Sodyum Klorür'ün Bakteriyosin Üretimine Etkisinin Araştırılması	53
3.2.17. Bakteriyosinlerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Saptanması	54
4. BULGULAR	55
4.1. Çalışma Grubu	55
4.2. Laktobasil İzolasyonu ve İdentifikasyonu	55
4.2.1. İzole Edilen Laktobasil Suşlarının Hastaların Klinik Tanılarına Göre Dağılımı	55
4.3. Bakteriyofajların İzolasyonu	60
4.3.1. Profaj Bulunduran Vajinal Laktobasillerin Dağılımı	60
4.3.2. Bakteriyofaj ve Bakteriyosinlere Duyarlı İndikatörlerin Saptanması	62
4.3.3. Bakteriyofajların Kısmi Karakterizasyonları	74
4.3.3.1. Bakteriyofajların Morfolojik özelliklerinin Saptanması	74
4.3.3.2. Bakteriyofajların Genetik Karakterizasyonları	77
4.3.4. Bakteriyosinlerin Kısmi Karakterizasyonu	88
4.3.5. Bakteriyosinlerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Saptanması	94

5. TARTIŞMA	96
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	111
7. ÖZET	114
8. SUMMARY	115
9. KAYNAKLAR	116



KISALTMALAR

AIDS	: Sonradan kazanılmış immün yetmezlik sendromu
ATCC	: Amerikan tip kültür koleksiyonu
BSA	: Bovin serum albümini
BHI	: Beyin kalp infüzyon agar
BV	: Bakteriyel vajinozis
CG	: 10 mM CaCl ₂ +100 mM glisin
dak	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
HIV	: Human immun deficiency virus
kb	: Kilobaz çifti
MRS broth	: Lactobacilli MRS Broth besiyeri
MRS-C	: MRS broth 10 mM CaCl ₂
MRS-CG	: 10 mM CaCl ₂ +100 mM glisin içeren MRS Broth besiyeri
MRS-H	: Laboratuvarda Hazırlanmış MRS besiyeri
MRS-T	: Ticari olarak elde edilmiş MRS besiyeri
nm	: Nanometre
NVF	: Normal vajinal flora
PEG	: Polietilen glikol
RNA	: Ribonükleik asit
SDA	: Saboura dekstroza agar
SM	: Suspension medium
STE	: Sükröz-Tris HCl-EDTA
SDS	: Sodyum dodesil sulfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sulfat poliakrilamid jel elektroforez
TE	: Tris-EDTA
TL	: Trabzon laktobasil suşları
TMB	: Tetramethyl benzidine
UV	: Ultraviyole ışık
UVT	: Ultraviyole transilluminatör
VK	: Vajinal kandidiyazis
Φ	: Bakteriyofaj
Φtl	: Trabzon laktobasil bakteriyofajı

TABLOLARIN LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
1. Bakteriyofajların Sınıflandırması	12
2. Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri	27
3. Yaş Gruplarına Göre Hastaların Dağılımı	55
4. Klinik Tanılarına Göre Hastalardan İzole Edilen Laktobasil Suşlarının Dağılımı	56
5. Çalışmaya Alınan Hastaların Klinik Tanıları ve İzole Edilen Laktobasil Türlerinin Dağılımı	56
6. Klinik Tanılarına Göre Hastalardan İzole Edilen Laktobasil Suşları ve Bu Suşlarda Tespit Edilen Bakteriyofajların Dağılımı	61
7. Bakteriyofaj İzole Edilen Laktobasil Suşlarının Türlerine Göre Dağılımı	61
8. Bakteriyofaj, Bakteriyosin ve Antibakteriyel Aktiviteye Sahip Laktobasillerin Duyarlı Konaklarının Dağılımı	63
9. Bakteriyofajlara Karşı Duyarlı Konaklar	70
10. Kendi Konaklarını Enfekte Eden (Otoenfeksiyon Yapan), Bakteriyofajlar	73
11. Aynı Bireyden İzole Edilen Laktobasil Bakteriyofajlarının Vaginal Florada Birlikte Bulunan Diğer Laktobasilleri Enfeksiyonu	73
12. Bakteriyofajların Morfolojik Özellikleri	74
13. Dot Blot Hibridizasyon Yöntemi İle Bakteriyofaj Grupları Arasındaki Benzerlik	78
14. Bakteriyofaj DNA'larının Restriksiyon Enzim Analizi	81
15. Laktobasil TL034c, TL074c ve TL076'nın Biyokimyasal Özellikleri	87
16. Bakteriyosinlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	91
17. Antimikrobiyal Maddelerin İndüklenme Özellikleri	92
18. Bakteriyosin Üretimine NaCl'ün Etkisi	93
19. Bakteriyosin Üreten Laktobasil Suşlarının Antibakteriyel Aktiviteleri	94
20. Laktobasil Suşlarına H ₂ O ₂ Etkisi	95

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
1. Vajinada Laktobasillerin Oluşturdukları Biyofilm Tabakası	9
2. Bakteriyofaj Familyaları ve Şematik Görünümleri	13
3. Bazı Bakteriyofajların Elektron Mikroskopundaki Görüntüleri	14
4. Bakteriyofajların Litik ve Lizojenik Hayat Siklusu	21
5. Yumuşak Agarda Damla Yöntemi İle Gözlenen Antibakteriyel Aktivite	62
6. Vajinal Kaynaklı Laktobasillerden İzole Edilen Morfotip A Bakteriyofajları (Φtl033a, Φtl056c, Φtl087, Φtl138)	75
7. Vajinal Kaynaklı Laktobasillerden İzole Edilen Morfotip B1 (Φtl122b, Φtl125 ve Φtl139c) ve B2 (Φtl072) Bakteriyofajları	76
8. Φtl034c Probu ile Dot Blot Hibridizasyon	77
9. Bakteriyofaj DNA'larının Restriksiyon Enzim Analizi	80
10. Bakteriyofaj Φtl122b'nin (Grup B1) Plak Morfolojisi	82
11. Bakteriyofaj Φtl122b Yaşam Siklusu	83
12. Restriksiyon Enzim Analizleri Benzer Olan B1 Grubu Üç Bakteriyofajın Morfolojisi	84
13. Farklı Üç Kadından İzole Edilen Laktobasillere Ait B1 Grubu Bakteriyofajlardan Φtl034c, Φtl074c ve Φtl076'nın Genomlarının Restriksiyon Analizi	85
14. B1 grubu Bakteriyofajlardan Φtl034c, Φtl074c ve Φtl076 Genomlarının Southern Hibridizasyon Analizi	86
15. TL034c, TL074c ve TL076'nın Total Hücre Proteinlerinin SDS-PAGE Analizi.	87
16. TL034c, TL074c ve TL076'nın AP-PCR Analizi	88
17. Laktobasil Suşları Üzerine Bakterisilerin Etkisi	89
18. H ₂ O ₂ Etkisinin Katalaz Enzimi İle İnhibisyonu	90
19. NaCl'nin Bakteriyosin Üretimi Üzerin Etkisi	93

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doğurganlık yaşındaki kadınların vajinal floralarında dominant olarak bulunan laktobasiller vajinal sağlığın korunmasında önemli rol oynarlar. Laktobasiller, ürettikleri laktik asit, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve antimikrobiyal maddeler sayesinde patojen mikroorganizmaların vajinada kolonize olmalarına engel olurlar. Laktobasiller, glikojen metabolizması sonucu üretilen glikozu fermente ederek vajinal pH'yı 4.5-5.0'e düşürürler. Asidik pH, oksidasyon redüksiyon potansiyelini düşürerek *Escherichia coli* (*E. coli*), *Gardnerella vaginalis* (*Gardnerella vaginalis*), *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) gibi patojen mikroorganizmaların üremesini asit etkisi ile inhibe ederler (1, 2) Ayrıca, laktobasillerin ürettikleri antimikrobiyal maddeler ile bakteri (3, 4), virus (5) ve mayaları (6) in vitro şartlarda inhibe ettikleri gösterilmiştir.

Laktobasiller, laktokoklar ve diğer laktik asit bakterileri ile gıda endüstrisinde oldukça yaygın olarak kullanılan bakteri gruplarından biridir. Laktik asit bakterileri veya laktikler olarak adlandırılan bu bakteriler bir çok yiyecek ve içeceklerin imalatında, örneğin peynir yapımında, süt, sosis, sucuk gibi et ürünlerinin fermentasyonunda, turşu, salamura gibi yiyeceklerin ekşitilmesinde yaygın olarak kullanılmaları nedeni ile pek çok araştırmacı tarafından morfolojik, biyokimyasal ve genetik düzeyde detaylı olarak incelenmişlerdir. Ayrıca fermentasyon için ticari olarak hazırlanan bu laktik asit bakterilerinin başlatma kültürlerinin (starter culture) saflıklarının korunarak diğer bakteriler tarafından kontamine olmalarının önlenmesi amacı ile, kullanılan kültür bakterilerinin bakteriyosin ve bakteriyofaj içerikleri ve bu ajanlara karşı duyarlılık/dirençlilik özellikleri de araştırılmıştır.

Gıda endüstrisinde önemli rolleri olan, laktobasillerin bir kısmının insanların ağız boşluğu, intestinal sistem ve vajinal floralarında kolonize oldukları bilinmektedir. İnsan vücudunun normal florasında yer alan laktobasiller ile ilgili

alışmalar oldukça sınırlı sayıda olup, bu flora elemanlarının insan sağlığı ile ilişkileri tam olarak bilinmemekle beraber normal vajinal florada dominant olarak bulunan laktobasillerin başta bakteriyel vajinozis (BV) olmak üzere, diğer mikrobiyal vajinal enfeksiyonlar esnasında önemli derecede azalması veya tamamen ortadan kalkması, bunların vajinal sağlığın korunmasında önemli rolünün olduğunu göstermektedir. Ancak, vajinal laktobasillerin BV ve diğer vajinal enfeksiyonlarla ilişkilerini ortaya koyan, laktobasil popülasyonunun bu enfeksiyonlar esnasında ortadan kalkmasının nedenlerini tam olarak açıklayan çalışmalar mevcut değildir.

Laktobasillerin vajinal florada biyofilm oluşturarak başta BV olmak üzere vajinal kandidiyazis (VK) ve cinsel yolla bulaşan gonore ve AIDS gibi enfeksiyonların önlenmesindeki rolleri ile ilgili çalışmalar son yıllarda önem kazanmıştır. Epidemiyolojik çalışmalarda, sağlıklı bir vajinal flora sahip kadınlarda AIDS başta olmak üzere bakteriyel veya maya orjinli vajinitlerin daha az sıklıkta görüldüğü belirtilmektedir (7). Vajinal laktobasil popülasyonunun azaldığı menopozdaki kadınların HIV ve diğer vajinal enfeksiyonlara karşı daha duyarlı oldukları, laktobasillerin oluşturduğu H₂O₂, laktik asit, asetik asit, bakteriyosin gibi diğer metabolitlerle bu patojenlerin inhibe edildiği ileri sürülmektedir (8, 9, 10).

BV'nin oluşumundaki nedenlerin ne oldukları tam olarak bilinmemektedir. Vajinal enfeksiyonlarda, patojen bakterilerin; floradaki laktobasillerin herhangi bir nedenle azalması sonucu mu arttığı, yoksa patojenlerin bir şekilde dominant duruma geçmeleri nedeni ile mi laktobasil popülasyonunun azaldığı bilinmemektedir. BV patojenlerinin genellikle laktobasillerin oluşturdukları laktik asit ve H₂O₂'e karşı duyarlı oldukları düşünöldüğünde, BV oluşumunda öncelikle laktobasil popülasyonunun azaldığı ve bundan sonra flora patojen bakterilerin hakim oldukları tahmin edilmektedir. Böyle bir ekolojik dengenin değişmesinde vajinal laktobasilleri baskılayan faktörlerin neler olabileceği sorusu akla gelmektedir.

Bu faktörlerden birinin flora da yer alan laktobasilleri enfekte eden litik bakteriyofajlar (faj) veya kromozoma entegre olmuş profajların olabileceği düşünölerek bu çalışma planlanmıştır. Bakteriyofajlar litik veya lizojenik hayat siklusları ile duyarlı konaklarını enfekte etmeleri sonucu, konak bakteri popülasyonunun azalmasında veya ortadan kalkmasında önemli rol oynarlar. Vajinal ekosistemde laktobasil bakteriyofajlarının bu tip bir işlevi olduğu, patojen

mikroorganizmaların vajinada kolonize olmalarına zemin hazırladıkları tahmin edilmektedir.

Vajinal orjinli laktobasillerin bakteriyofaj içeriklerini saptamak için planlanan bu çalışmada, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği ve Trabzon Doğum Hastanesi'ne çeşitli şikayetlerle baş vuran kadınlardan vajinal sürüntü örnekleri alınmıştır. Örnekler klinik ve mikrobiyolojik açıdan değerlendirilmiştir. Vajinal enfeksiyonlu ve sağlıklı kadınların sürüntülerinden laktobasil suşları izole edillerek Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de (11) belirtilen kriterlere göre tür tayinleri yapılmıştır. İzole edilen laktobasillerin H_2O_2 ve bakteriyosin üretmeleri, bakteriyofaj içeriklerinin belirlenmesi, bu bakteriyofajların enfekte ettikleri duyarlı konakların saptanması ve bu özelliklerin vajinal enfeksiyonlardaki rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Normal Vajinal Flora

Vajinal mukoza, çok katlı yassı epitel hücreleri ile kaplı olup kılcal damarlar, bartolin bezleri, serviks, tubal ve endometriyal kaviteden salınan transuda adı verilen bir sekresyon ile nemli tutulur. Transuda epitel hücreleri, organik yağ asitleri, elektrolitler, proteinler, karbohidratlar ve mikroorganizmalardan oluşur (12, 13).

Transudanın mililitresinde yaklaşık olarak 10^8 - 10^9 mikroorganizma bulunur. Normal vajinal mikroflora fakültatif anaerobik ve obligat anaerobik bakterilerden oluşmuştur. Bu mikroorganizmalardan obligat anaerobik bakteriler fakültatif anaerobik bakterilere oranla beş kat daha fazladır. Fakültatif anaerobik bakterilerin başlıcaları *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) ve *G. vaginalis* türleridir. Obligat anaerobik bakterilerden *Peptococcus* ve *Peptostreptococcus* türleri ile anaerobik laktobasiller, *Eubacterium* ve *Bacteroides* türleri vajinal florada en sık yer alan bakterilerdir. Ayrıca, *Mycoplasma hominis* (*M. hominis*) ve *Ureoplasma urealiticum* (*U. urealiticum*) gibi fırsatçı patojenler ile *Candida albicans* (*C. albicans*) ve *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) gibi bazı maya türlerine vajinal florada rastlanılmaktadır (14).

Vajinal epitel hücreleri prodüktif ve gebelik dönemleri boyunca kadın cinsiyet hormonları olan östrojen ve progesterona maruz kalmaktadır. Progesteron, uterusu gebeliğe hazırlayan ve meme bezlerinin gelişmesini sağlayan hormondur. Östrojen ise vajinada, epitel hücrelerini uyararak bu hücrelerde glikojen depolanmasına, hücrelerin olgunlaşmasına, dolayısı ile yüzeyel tabakanın kalınlaşması ve dökülmesine neden olur. Dökülen vajinal yüzey epitel hücreleri, üzerinde bağlı olan mikroorganizmaları da beraberlerinde taşır. Vajinal lümene dökülen epitel hücrelerinden açığa çıkan glikojen laktobasiller tarafından fermente edilir (12, 15, 16).

Gebelik sırasında anneden plasental geçişle östrojen alan yeni doğan kız çocuklarında vajinal epitel tabakası 6-8 katlıdır ve vajinada bol miktarda laktobasil bulunur. Fakat bir kaç hafta içinde epitel tabakasının kalınlığında ve laktobasil populasyonunda azalma görülür. Bu Şekilde 8 yaşına kadar devam eder. Vajinal epitel tabakası 8-14 yaşıları arasında yavaşıca kalınlaşımaya başılar ve prodüktif dönemde tam olgunluğa erişıir (15). Prodüktif dönemde normal vajinal mikrofloraya laktobasiller hakim olur ve vajinal pH 4.5-5.0 arasında bulunur. Menapoz döneminde epitel hücre tabakası erozyon sonucu inceler, laktobasil populasyonunda azalma gözlenir ve vajinal pH 6-8 değerlerine ulaşıır (17).

Normal vajinal mikroflora, hormonlara bağlı olarak menstrual siklus, hamilelik, ortamın pH'sı, yaşı, seksüel aktivite, doğum kontrol yöntemleri, kullanılan ilaçlar ve antibiyotikler, diabetes mellitus ve cerrahi girişımlere bağlı olarak değişıklık gösterir (18, 19). Bunlar vajinal enfeksiyonların oluşıması için predispozan faktörlerdir.

2.2. Vajinal Enfeksiyonlar

Vajinada en sık görülen enfeksiyonlar BV, VK ve trikomoniyazis'dır. Streptokok, stafilokok, *E. coli* ve diğer bakteriyel ve Herpes gibi viral ajanlarla oluşıan enfeksiyonlar daha nadirdir. Ayrıca, alerjik-kontakt dermatit, deskuamatif, eroziv idiyopatik vajinit ve Behçet sendromu gibi vasküler kollajen hastalıklar da vajinada görülebilmektedir (12, 19).

BV, *G. vaginalis* başıta olmak üzere *Bacteroides* spp., *Mobilincus* spp., *Peptostreptococcus* spp. gibi obligat ve *Streptococcus* spp., *M. hominis* ve *U. urealyticum* gibi fakültatif anaerobik mikroorganizmalar tarafından oluşıturulan vajina enfeksiyonudur (14). BV, nedeni tam olarak bilinmeyen vajinal floranın bozulması, laktobasil populasyonunun azalması ve patojen mikroorganizmaların artması ile karakterize bir enfeksiyon hastalığıdır. BV'de klasik klinik tanı, vajinal pH artışı, beyaz homojen kıvamlı akıntı ve sürüntü rneklerinin KOH ile muamele edildiğinde amin veya balık kokusu açığa çıkması ile konulmaktadır (15).

VK, oğunlukla *C. albicans*, nadir olarak da *C. krusei*, *C. tropicalis* gibi diğer maya türlerinin etken olduğu bir enfeksiyondur. *C. albicans*'ın vajinal epitel hücrelerine daha yüksek oranda yapışıarak enfeksiyon oluşıturduğu bildirilmektedir (20). VK'in kliniği, akıcı veya koyu pürülan özellikte akıntı,

kaşıntı, yerel iritasyon ve kızarıklık, vajina, vulva veya her ikisinde de pamukcuk benzeri plakların oluşumu ile karakterize edilmektedir (15).

Trikomoniyazis, *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*)'in oluşturduğu vajinanın parazitik bir enfeksiyonudur. Doğadan veya cinsel yolla bulaşan *T. vaginalis* şiddetli ve akut inflamatuvar bir enfeksiyon tablosu oluşturur. Vajinal florada asemptomatik olarak bulunabilen *T. vaginalis* (21) normal flora bakterilerini fagosite ederek vajinal enfeksiyonların oluşmasına zemin hazırlar (22).

2.3. Laktobasiller

2.3.1. Laktobasillerin Morfolojileri ve Üreme Özellikleri

Laktobasiller değişik büyüklükte, silindirik, kokobasil, bazen kısa çubuklar şeklinde, çoğu zaman zincir oluşturan, hareketsiz ve spor oluşturmayan, gram pozitif bakterilerdir. Genellikle küçük, 2-5 mm çapında R tipi, bazı türler düzgün S tipi koloni oluşturlar. Koloniler düzgün kenarlı, konveks, düz, parlak ve pigmentsizdir. Üremeleri için pepton, et ve maya ekstresi, domates suyu, manganez, asetat, oleik asit esterleri ve Tween 80 gibi kompleks besinler, amino asit, vitamin ve peptidlere ihtiyaç gösterirler. Optimum olarak 30-40°C ürerler, ancak 2°C ile 53°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında da üreme yeteneğine sahiptirler. En iyi pH 5.5-6.2 olan besiyerlerinde çoğalırlar. Laktobasillerin bir çok türü aerotolerandır. Mikroaerobik ve anaerobik türleri içeren laktobasillerin mikroaerobik olanları %5 CO₂ varlığında daha iyi ürerler. İzolasyonları için en uygun besiyerleri *Lactobacillus* MRS ve Rogosa agar besiyerleridir (11, 23).

2.3.2. Laktobasillerin Bulundukları Yerler

Laktobasiller çevrede, tahıllarda, süt, et, balık ve fermente ürünler ile insan ve hayvanların ağız, intestinal kanal, vajina ve diğer vücut bölgelerinde yaygın olarak bulunurlar (23). Laktobasil türlerinden *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. brevis* ve *L. salivarius* çoğunlukla insan ağız florasında, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, ve *L. salivarius* ince barsakta, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum* ve *L. cellobiosus*, *L. crispatus*, *L. jensenii* ve *L. gasseri* daha çok

vajinaya yerleşirler (11).

Laktik asit bakterileri veya laktikler olarak adlandırılan bu bakteriler bir çok yiyecek türlerinin imalatında, örneğin peynir yapımı, süt, sos, sucuk gibi et ürünlerinin fermentasyonunda, turşu, salamura veya yiyeceklerin ekşitilmesinde önemli rol oynarlar (24). Metchnikoff 1900'lu yıllarda, fermente süt ürünlerinde tespit ettiği laktik asit üreten, gram pozitif bir bakteri türünü *Bulgarian bacillus* olarak isimlendirilmiş ve 1921 yılında bu isim *Lactobacillus bulgaricus* (*L. bulgaricus*) olarak değiştirilmiştir. Uzun yıllardan beri yoğurt ve süt ürünlerinin fermentasyonunda, *L. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) kullanılmaktadır (25). *L. bulgaricus* barsak florasına kolonize olmayan bir laktobasil türüdür (26). Bununla birlikte, *L. acidophilus*'un barsakta daha iyi kolonize olduğunun belirlenmesi ile 1935 yılından sonra, fermente süt ürünlerine *L. acidophilus* katılmaya başlanmış ve asidofilik süt ürünleri piyasaya sürülmüştür. Bunlardan özellikle yoğurt veya bioyoğurt ile alınan laktobasillerin barsak florasına yerleşmeleri sonucu patojen bakterilere karşı doğal bir koruyuculuk sağlanması amaçlanmıştır (25). Laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan organik asit, H_2O_2 ve antimikrobiyal maddelerin kompleks etkileri ile patojen bakterilerin mukozal yüzeylerde kolonize olmalarının önlenmesi sağlanmaktadır (27).

2.3.3. Laktobasillerin Sınıflandırılması

Laktobasiller ilk kez 1894 yılında Döderlein tarafından vajinadan izole edilmiştir. Gram pozitif basil morfolojisinde, spor oluşturmeyen ve katalaz negatif olan bu bakteriler Döderlein basilleri olarak isimlendirilmiştir. Glukoz ve glukonattan gaz oluşturmaları, karbohidratları fermente etmeleri, üreme sıcaklıkları ve laktik asit oluşturma özelliklerine göre cins düzeyinde bu bakterilerin ilk identifikasyonları 1901 yılında Beijerinck tarafından yapılmıştır. Döderlein basilleri, *L. acidophilus* olarak tür düzeyinde ilk kez 1928 yılında Thomas tarafından tanımlanmıştır (27).

Daha sonraki yıllarda bir çok farklı laktobasil türleri belirlenmiştir. Laktobasiller, Orla-Jensen tarafından laktik asit üreten bakteriler sınıfında incelenerek *Streptobacterium*, *Thermobacterium* ve *Betabacterium* olmak üzere başlıca üç grupta toplanmıştır. Bu gruplandırmada, karbohidratları sadece laktik

asitlere fermente eden homofermentatif ve karblohidratları laktik, asit asetik, etanol ve CO₂'e metabolize eden heterofermentatif bakterilere yer verilmiştir. Hem homofermentatif hem de heterofermentatif laktobasillerde piruvat ara ürün olarak oluşmaktadır. Böylece metabolik olarak laktobasiller, anaerobik mikroorganizmalardan aerobik mikroorganizmalara geçiş bölgesinde yer alırlar (11).

Kandler ve Weiss (11) laktobasilleri klasik karakteristik özelliklerini göz önüne almaksızın, karbohidrat fermantasyonlarına göre 1986'da üç subgruba ayırmışlardır.

Bu subgruplardan birincisine obligat homofermentatif laktobasiller dahil edilmiştir. Bunlar, heksozu daima Embden-Meyerhof yoluyla laktik asit'e fermente ederler, fakat pentozu veya glukonatu fermente etmezler. Bu subgrup, vajinal florada sık bulunan *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. crispatus* türlerini ve diğer *L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. animalis*, *L. helveticus*, *L. ruminis*, *L. salivarius*, *L. sharpeae*, *L. vitulinus*, *L. yamanashiensis* türlerini içermektedir.

İkinci subgrupta fakültatif heterofermentatif laktobasiller yer almaktadır. Bunlar heksozu Embden-Meyerhof yolu ile daima laktik aside veya glukoz sınırlandırılması durumunda laktik asit, asetik asit, etanol ve formik asite fermente ederler. Pentozu fosfoketolaz aracılığı ile laktik ve asetik asitlere fermente ederler. Bunlar *L. agilis*, *L. casei*, *L. alimentarius*, *L. bavaricus*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, *L. homohiochii*, *L. maltaromicus*, *L. murinus*, *L. plantarum* ve *L. sake* türleridir.

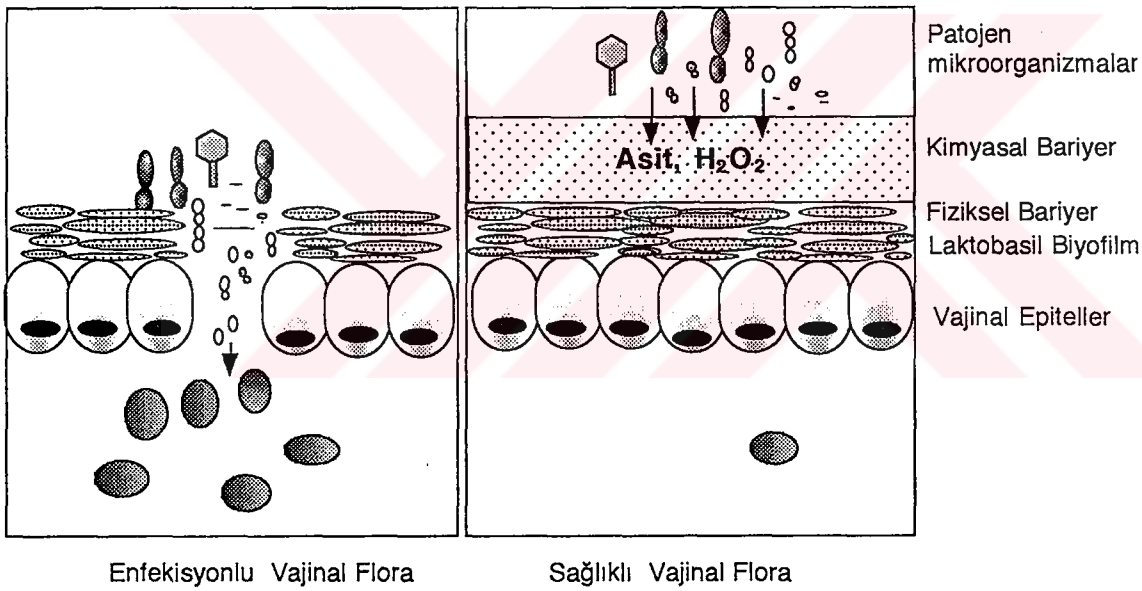
Üçüncü subgrupta ise heksozu laktik asit, asetik asit veya etanole ve CO₂'e, pentozu Embden-Meyerhof yolu veya fosfoketolaz aracılığı ile laktik ve asetik asitlere fermente eden obligat heterofermentatif laktobasiller yer almaktadır. Bunların başlıcaları *L. bifermentans*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. collinoides*, *L. confusus*, *L. divergens*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. fructosus*, *L. halotolerans*, *L. hilgardii*, *L. kandleri*, *L. kefir*, *L. minor*, *L. reuteri*, *L. sanfrancisco*, *L. vaccinofermentum*, *L. viridescens* türleridir.

Laktobasillerin oksidatif fosforilizasyon için sitokrom sistemleri yoktur. Bununla birlikte son elektron alıcısı olarak NADH₂ ve O₂'nin oksidasyonunu sağlayabilen oksidaz ve peroksidaz içeren flavin molekülüne sahiptirler. Ayrıca laktobasiller süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerine sahip olmamalarına

rağmen süperoksitleri manganey yardımıyla parçalarlar.

2.3.4. Laktobasillerin Vajinal Sağlık Yönünden Önemi

Normal vajinal florada dominant olarak bulunan laktobasiller, patojen bakterilere karşı fiziksel ve kimyasal bir bariyer oluşturarak vajinal sağlığın korunmasında önemli rol oynarlar. Laktobasiller, vajinal epitel kaplayan; su ve metabolitlerden oluşan organik bir polimer matriks içine gömülü mikroorganizma topluluğundan meydana gelen bir biyofilm tabakası oluştururlar (28). Patojen mikroorganizmalara karşı vajinal epitel yüzeyinde laktobasillerin oluşturduğu biyofilm tabakası Şekil 1 de gösterilmiştir .



Şekil 1. Vajinada Laktobasillerin Oluşturdukları Biyofilm Tabakası.

Bakterilerin epitel hücrelerine adhezyonu, mukozal membranlardaki kolonizasyonda önemli bir faktördür. Normal vajinal florada bulunan laktobasillerin, B gurubu streptokok, *N. gonorrhoeae* ve *G. vaginalis* gibi patojen mikroorganizmaların vajinal epitel hücrelerine adhezyonunu interfere

etme yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir (29). *L. acidophilus*'un insan intestinal hücre kültürüne bağlandığı ve *E. coli* gibi enterik bakterilerin bu hücrelere bağlanmalarını önlediği gösterilmiştir (30).

Laktobasiller, fermentatif metabolizmaları sonucu oluşturdukları asetik asit, laktik asit ve formik asit ile vajinal pH'yı buna bağlı olarak oksidasyon redüksiyon potansiyelini düşürerek birçok patojen mikroorganizmanın üremesine engel olurlar. Antibiyotik kullanımı, doğum kontrol yöntemleri veya hormonlara bağlı olarak laktobasillerin baskılanması durumunda, vajinada inflamasyon, kaşıntı, iritasyon veya vajinit oluşmaktadır (25).

Laktobasillerin bir çoğu H_2O_2 üretmektedir. H_2O_2 , katalaz negatif bakteriler için toksik bir bileşiktir. Katalaz, H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 'ye parçalayan solunum enzimlerinden biridir. Çoğu aerobik ve fakültatif anaerobik mikroorganizmalar bu enzimi üretme yeteneğindedirler. Laktobasillerin oluşturduğu H_2O_2 , özellikle katalaz negatif patojen mikroorganizmaların üremelerine engel olmaktadır (31).

Laktobasiller vajinal floraya patojen mikroorganizmaların yerleşmesine engel olabilen inhibitör bakteriyel ürünler salarlar. Bu inhibitör bakteriyel ürünler; metabolik ürünler, litik ajanlar, enzimler ve bakteriyosinler olmak üzere geniş bir guruptur (32). Laktobasillerin ürettiği antibakteriyel maddeler, benzer laktobasil türleri yanında, gram negatif patojen bakterilere de etkilidirler (11). *L. acidophilus* suşları, asidosin A (33) ve laktasin (34) gibi antibakteriyel maddeler üretmeleri ve gastrointestinal ya da vajinal floraya kolonize olabilme özelliklerinden dolayı, vajinal enfeksiyonların tedavisinde (6, 35) tablet veya vajinal ovul olarak kullanılmaktadır (36).

Ayrıca, laktobasillerin oluşturdukları antimikrobiyal ürünler ve inhibitör proteinler, immün sistemi uyarak aktif bir immünizasyon sağlarlar (37). Laktobasillerin organizma için güvenli olmaları, intrinsik adjuvant özelliği göstermeleri, normal gastro intestinal florada bulunmaları ve probiyotik özelliğe sahip olmaları, oral veya parental aşı çalışmalarında kullanılmalarını sağlamaktadır (38, 39). Probiyotik, latince "canlı için" anlamına gelen bir terimdir. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Bacillus* ve *Candida* türleri başlıca probiyotik mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar tarafından salgılanan ekstreli organik asitler, H_2O_2 , asidosin, asidofilin, laktosin, ve nisin gibi maddeler probiyotik ürünleri oluşturmaktadır (2).

Laktobasiller, fermentasyonu başlatma ve fermente etmenin yanı sıra, asidofilik süt ve yoğurt gibi besinlerin sağlık değerini de artırmaktadırlar. Laktobasiller, gıda ile yayılan enterik patojenleri, laktik asit ve antimikrobial maddeler üretmeleri nedeni ile ishal, BV ve VK gibi enfeksiyonların tedavisinde ve bu enfeksiyonlardan korunmada *L. acidophilus* katkılı yoğurt ve sütler kullanılmaktadır (40).

2.4 Bakteriyofajlar

2.4.1. Bakteriyofajların Morfolojileri ve Sınıflandırılmaları

Bakteriyofajlar, yalnızca konak bakteri hücresinde üreyebilen, konak bakteri hücresi içinde veya ortamda serbest olarak bulunabilen, ışık mikroskobu ile görülemeyip ancak elektron mikroskobu (EM) ile görülebilen bakteri viruslarıdır (41). Bakteriyofajlar temel olarak nükleik asit ve onu çevreleyen protein bir kılıfıdan ibarettirler. Nükleik asit, çift zincirli DNA, tek zincirli DNA, çift zincirli RNA veya tek zincirli RNA şeklinde bulunabilmektedir. Bakteriyofaj nükleik asitlerini çevreleyen protein kılıfa kapsid adı verilmektedir. Kapsid, tekrarlayan polipeptitlerden ve kapsomer adı verilen protein alt birimlerinden oluşmuştur. Kapsomerlerin sayısı, şekli, büyüklüğü ve diziliş düzenleri bakteriyofajın tipine bağlı olarak değişiklik gösterir (42).

İlk olarak 1915 yılında Twort, *Micrococcus* spp. kolonileri ile yaptığı çalışma da, bazı kolonilerin yenmiş veya kesilmiş gibi görüldüğünü ve buna neden olan etkenin bakterilerin geçemediği filtreden geçebilen bir mikroorganizmanın olduğunu bildirmiştir. Bakteri yiyen anlamına gelen bakteriyofaj terimi, ilk olarak Fransa'da, 1917'de D'Herelle tarafından kullanılmış ve 1930'lu yıllarda Burnette ve Schlesinger tarafından bu bulgular doğrulanarak, etkenin bakteri virusu olduğu belirlenmiştir (43). Sonraki yıllarda, endüstride kullanılan fermente ürünlerin sık sık bozularak büyük maddi zararlara yol açması ve buna neden olan etkenin litik bir bakteriyofaj kontaminasyonu olduğunun belirlenmesi bu konudaki araştırmaları hızlandırmıştır.

Bakteriyofaj biyolojisi üzerine klasik çalışmalar 1940-1950 yılları arasında Delbrück, Luria, Hershey ve diğer araştırmacı gruplar tarafından yapılmış ve *E. coli*'de belirlenen benzer bakteriyofajlar, T1-T7 şeklinde numaralandırılmıştır.

Bakteriyofajların fiziksel ve kimyasal araştırmaları 1960'lı yıllarda başlamıştır. Bu araştırmalarda, T bakteriyofajlarından büyük ölçüde yararlanılmış ve çok yakın benzerlik gösteren T2, T4 ve T6 bakteriyofajları T-even bakteriyofajları olarak isimlendirilmiştir. Ayrıca, lizojenik özelliğe sahip lambda bakteriyofajının bulunması ile çalışmalar daha da hız kazanmıştır (44).

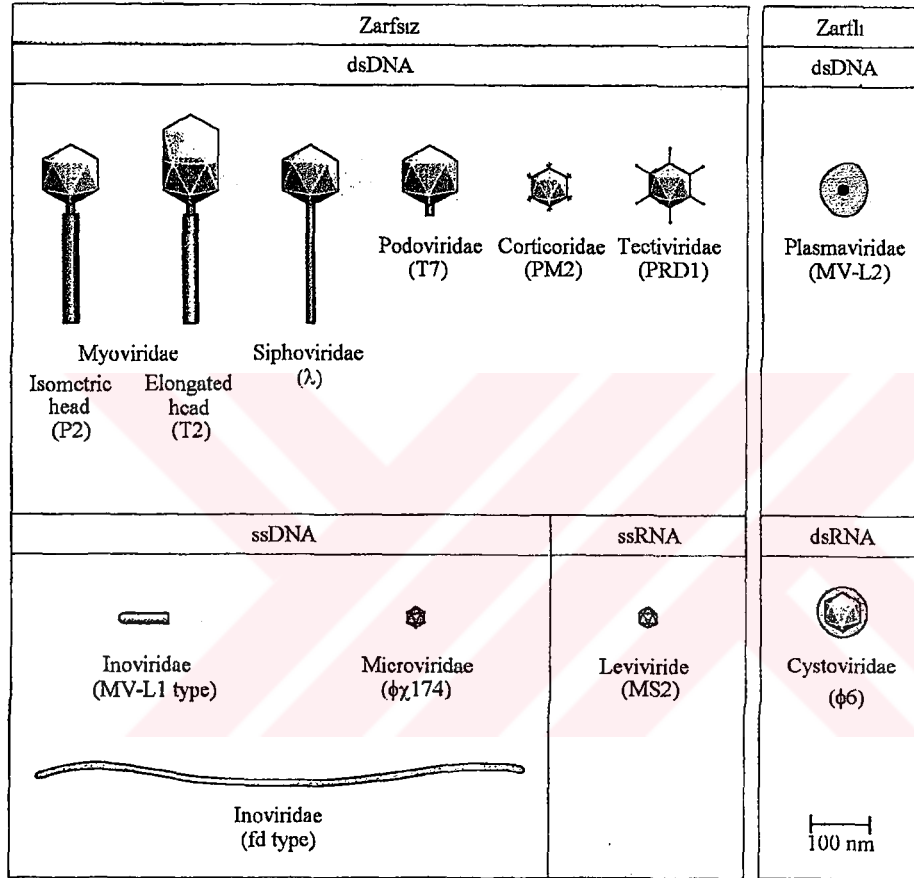
Bradley (45) tarafından bakteriyofajlar, baş morfolojileri, kuyruk içermeleri ve taşıdıkları nükleik asit tiplerine göre A'dan F'ye kadar 6 farklı sınıf içinde toplanmış (Tablo 1) ve morfotip A ile B'nin diğer morfotiplere nazaran daha sık bulunduğu belirtilmiştir. Bu sınıflandırmada, T-even bakteriyofajları; grup A, T1 ile T5 bakteriyofajları; grup B, T3 ile T7 bakteriyofajları; grup C, kuyruksuz bakteriyofajlar baş büyüklüğüne göre grup D ile grup E ve ipliksi bakteriyofajlar grup F içinde incelenmiştir.

Kuyruklu bakteriyofajlar, kuyruk morfolojisi ve içerdikleri yapılar açısından farklılık göstermektedir. Grup A içinde yer alan *E. coli* T4 bakteriyofajında kuyruk, yaka adı verilen bir yapı ile baş kısma bağlıdır. Boru şeklinde kuyruk öz kısmı ve onu çevreleyen kasılabilir bir örtü bulunmaktadır. Kuyruk, kuyruk tablası denilen bir yapı ile sonlanmakta ve bu yapı üzerinde bakteriyofajın konak hücre yüzeyindeki özgül reseptörlere yapışmasını sağlayan fibril ve dikenler yer almaktadır. Grup B ve C bakteriyofajlarında ise yaka ve kuyruk örtüsü bulunmaz (46, 47).

Tablo 1. Bakteriyofajların Sınıflandırılması

Grup	Bakteriyofaj Morfolojisi	Nükleik Asit Tipi
A	Kasılabilir kuyruklu	dsDNA
B	Uzun kasılamayan kuyruklu	dsDNA
C	Kısa kasılamayan kuyruklu	dsDNA
D	Kuyruksuz, büyük kapsomerli	ssDNA
E	Kuyruksuz, küçük kapsomerli	ssRNA
F	Başsız, ipliksil filamantöz	ssDNA

Son yıllardan “International Committee on Taxonomy of Viruses” (ICTV) tarafından yapılan çalışmalarla bakteriyofajlar, öncelikle nükleik asitlerinin çift veya tek zincirli DNA yada RNA olması ve zarf içerikleri yönünden gruplandırılmıştır. Bu gruplandırmada bakteriyofaj büyüklükleri, şekilleri, kuyruk yapıları ve EM’deki görüntüleri ele alınarak bir dizi familyalar belirlenmiştir (Şekil 2 ve 3).

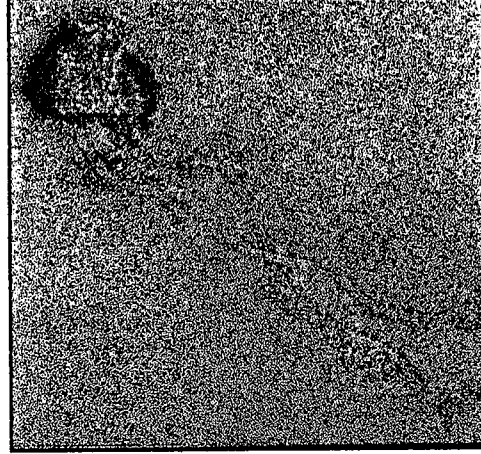


Şekil 2. Bakteriyofaj Familyaları ve Şematik Görünümleri

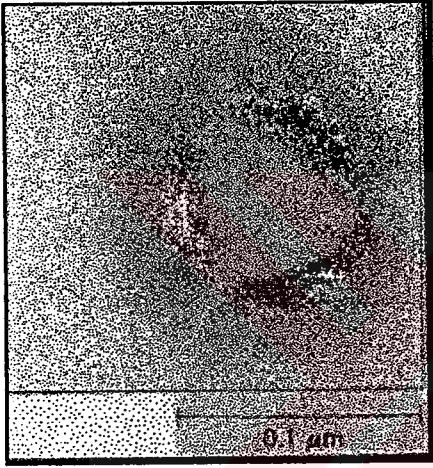
Kuyruklu bakteriyofajlara ait 3300'ün üzerinde örnek; nükleik asit tipi, DNA homolojisi, baz kompozisyonu ve sekansı, genom anatomisi, restriksiyon endonükleaz enzim paternleri, virionun kuyruk morfolojisi, kapsid içeriği, fizyolojisi, konak genişliği, profaj durumu, plak tipi ve büyüklüğü, burst size ve latent periodu gibi bir dizi kriterler ele alınarak incelenmiş ve üç büyük familyaya ayrılmıştır. Bunlar kasılabilir kuyruklu, ikozahedral kapsidli, kuyruk tablası ve fiberleri bulunan, yaklaşık 120×10^6 dalton ağırlığında DNA'ya sahip T-even



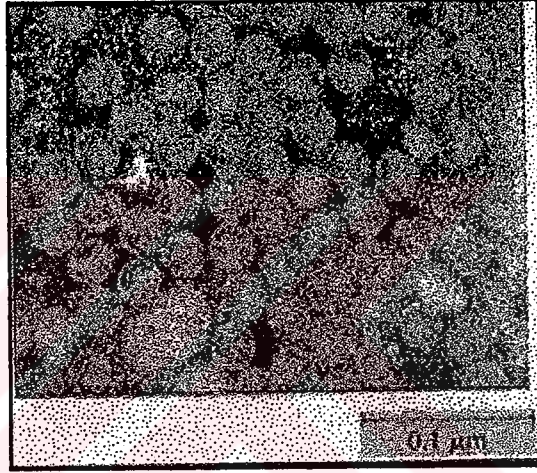
Myoviridae (Grup A)



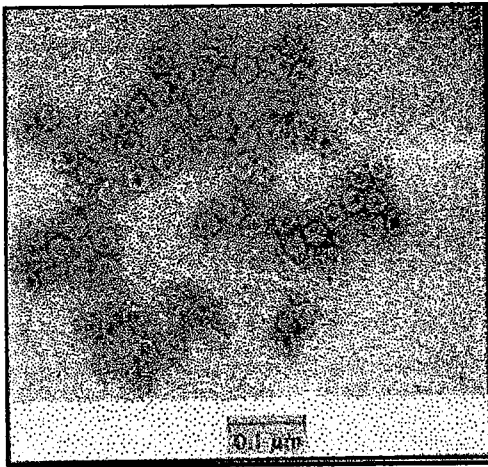
Siphoviridae (Grup B)



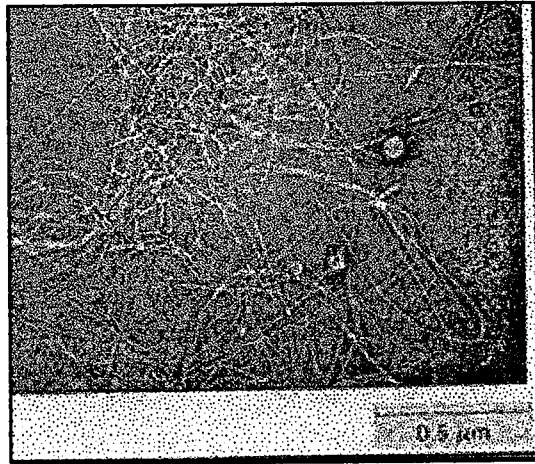
Podoviridae (Grup C)



Leviviridae (Grup D)



Corticoviridae (Grup E)



Inoviridae (Grup F)

Şekil 3 Bazı Bakteriyofajların Elektron Mikroskopundaki Görüntüleri

bakteriyofajları; Myoviridae, ikozahedral kapsidli, kılıfsız uzun kasılamayan kuyruklu, 32×10^6 dalton ağırlığında lineer DNA içeren yapışkan uçlu (12 bazlık tek zincirli kısım) lambda tipinde bakteriyofajlar, Siphoviridae ve çok kısa kasılamayan kuyruklu, 45×10^6 dalton ağırlığında DNA'lı T3 ve T7 gibi bakteriyofajlar ise Podoviridae familyası olarak belirlenmiştir.

Bradley'in D grubu içinde yer alan kuyruksuz, ikozahedral büyük kapsomerli lipid ihtiva eden 10×10^6 dalton ağırlığında sirküler çift zincirli DNA içeren Φ PM2 benzeri bakteriyofajlar Corticoviridae, 10×10^6 dalton ağırlığında lineer DNA'lı Φ PRD1 benzeri bakteriyofajlar Tectiviridae ve E grubundaki Φ X174 gibi küçük kapsomerli tek zincirli sirküler pozitif polariteli DNA bakteriyofajları; Microviridae, Φ MV-L2 gibi ikozahedral olmayan zarflı DNA bakteriyofajları; Plasmaviridae içinde incelenmişlerdir.

Bradley'in F grubunda yer alan filamentöz tek zincirli DNA bakteriyofajları Inoviridae familyasında yer almıştır. İkozahedral tek zincirli ve zarfsız Φ MS2 gibi RNA bakteriyofajları Leviviridae, Φ 6 gibi çift zincirli, zarflı bakteriyofajlar ise Cystoviridae olarak belirlenmiştir (44, 48, 49).

2.4.2. Bakteriyofaj ile Bakteri İlişkisi

Belirli bakteriyofaj tipleri, belirli bakteri tiplerini enfekte eder. Ancak bazı bakteriyofajlar birbirine akraba olan bakterilerle de ilişki kurabilir veya belirli bir bakteri türü birden fazla bakteriyofaj için konak olabilir (50). Bakteriyofajlar konak bakterilerde litik ve lizojenik olmak iki farklı yaşam şekli gösterir.

Litik yaşamda, bakteriyofaj DNA'sı konak hücre içinde kendini replike ederek yeni progen viruslar oluşturur ve hücreyi parçalar. Konak hücre parçalanması olayına lizis, hücrenin parçalanmasına neden olan bakteriyofaja litik bakteriyofaj ya da virulan bakteriyofaj ve bakteriyofajın bu yaşam şekline ise litik siklus adı verilir (51, 52, 53).

Lizojenik yaşamda, bakteriyofaj DNA'sı konak bakteri DNA'sına entegre olur. Progen virion oluşmaz. Bakteri bölünüp çoğalması ile bakteriyofaj nükleik asidi de buna paralel olarak çoğalır. Bakteriyofajın konak hücreye entegre olması olayına lizojeni, bakteri hücrelerine lizojenik bakteri, bakteriyofaja ılımlı ya da tempere bakteriyofaj, bu yaşam şekline ise lizojenik siklus adı verilir (51, 52).

Bakteriyofajlarda litik ve lizojenik yaşam siklusu farklı evrelerden oluşmaktadır (Şekil 3).

2.4.2.1. Litik Siklus

Litik bakteriyofajlarda yaşam siklusu adsorbsiyon, enfeksiyon ve erken proteinlerin sentezi, çoğalma, morfogenez ve bakteriyofajın salınması aşamalarından oluşmaktadır (43, 45, 52, 54, 55).

a. Adsorbsiyon: Bakteriyofajların üremesinde en önemli ilk kademe, bakteriyofajların konak bakteriye tutunması ve sonra adsorbe olmasıdır. Bu evrede bakteriyofaj partikülleri, konak hücredeki bakteriyofaja spesifik reseptörlere tutunarak hücre duvarına adsorbe olur. Tüm bakteriyofajlar adsorbsiyon için özel yapılara sahiptirler ve bakteriyofajın konak bakterilere olan özgüllüğünü bu kademe belirler. Bir çok bakteride bakteriyofajın tutunması için gerekli reseptörler hücre duvarında yer alır. Kuyruklu bakteriyofajlarda yapışma bölgesi olarak kompleks kuyruk fiberleri veya dikenleri, ikozahedral kuyruksuz bakteriyofajlarda bir çok yapışma proteinleri, filamentöz bakteriyofajlarda bakteriyofajın uç kısımları ve RNA bakteriyofajlarında ise basit bir protein molekülü bulunmaktadır. Konak bakteri hücreleri üzerindeki bakteriyofaj reseptörleri, sıklıkla kompleks yapıda polisakkarit, lipid veya F pili'leri olup güçlü antijenik özelliklere sahiptirler.

Kapsüllü bakterilerde bakteriyofajın hücre duvarındaki reseptörlere ulaşması için bakteriyofaj kuyruğunda bulunan bir enzim aracılık etmektedir. Bakteriyofajlar, bu enzim aracılığı ile polisakkarit kapsül üzerinde bir tünel oluştururlar ve bakteriyofaj reseptörüne ulaşarak bağlanmayı gerçekleştirirler. Bakteride meydana gelen mutasyonlar, bakteriyofaj adsorbsiyonu için özgül reseptörlerin kaybolmasına ve bu bakterilerin bakteriyofaj enfeksiyonuna karşı dirençli hale gelmesine neden olurlar. Ayrıca, bir bakteriyofajın konak bakteriyi enfekte edebilmesi için hücre duvarının yeniden sentez edilmesi gerekir. Eski bakteri kültürlerinin hücre duvarlarında meydana gelebilecek değişikliklerle bakteriyofaja karşı direnç gelişmektedir.

Bakteriyofaj adsorbsiyonu, başlangıçta dönüşümlüdür fakat kısa bir süre içinde uygun iyonik bağlar ve ısı aracılığıyla dönüşümsüz hale geçmektedir. Kuyruklu bakteriyofajlarda adsorbe olacak bakteriyofaj, öncelikle konak hücre

yüzeyine dik şekilde karakteristik bir pozisyon alır, kuyruk öz kısmı, bakteri hücre duvarının içerisine 12 nm kadar gömülür. Adsorbsiyon işlemi bakteriyofajın bakteri ile temasından yaklaşık beş dakika sonrasına kadar tamamlanmış olur. Bakteriyofaj adsorbsiyonu için ortamda bazı metal iyonlarının varlığına ihtiyaç vardır. Bunlar, T4 bakteriyofajı için kalsiyum (Ca) ve lambda bakteriyofajı için magnezyum (Mg) iyonlarıdır. Yüksek ve düşük pH değerlerinin adsorbsiyona inhibitör etkileri bulunmaktadır.

b. Enjeksiyon ve erken proteinlerin sentezi: Adsorbsiyonu takiben bakteriyofaj DNA'sı tıpkı bir enjektör ile enjeksiyon yapar gibi fiziksel olarak konak bakteri sitoplazması içine enjekte edilir. Bakteriyofaj kılıfı hücre dışında kalır ve içinde nükleik asit bulunmayan bakteriyofaj kılıfına hayalet faj adı verilir. Bu işlem sırasında yalnızca bakteriyofaj nükleik asidi hücre içine girmekte, bakteriyofajın baş ve kuyruğuna ait protein yapılar dışarıda kalmaktadır. Bakteriyofaj DNA enjeksiyonu, bazı bakteriyofajlarda ilk olarak DNA'nın kısa bir kolunun girmesi sonra geri kalan kısmının girmesi şeklinde meydana gelmektedir. Bazı bakteriyofajlarda ise direkt olarak bakteriyofaj DNA'sının tümü bir bütün olarak sitoplazmaya girmektedir. Hücre içine enjekte edilen bakteriyofaj nükleik asidi, bakteriyofaj DNA'sında bulunan modifikasyon ve modifikasyonla ilişkili proteinler aracılığı ile konak membran nükleazlarından korunmaktadır. Bakteriyofaj DNA'sı hücre içine lineer olarak girmekte ve sitoplazmada sirküler hale gelmektedir. Lambda bakteriyofaj DNA'sı, hücre içine enjekte edildiğinde yapışkan (*cos* = kohesiv) uçlarla sirküler yapı oluşturmaktadır.

Bakteriyofaj nükleik asidi, konak hücre plazma membranından geçerken kalıp olarak kullanılmaya başlanmakta ve erken mRNA molekülleri oluşturulmaktadır. Bakteriyofaj DNA'sında, bakteriyofaj mRNA sentezi daima bakteriyel RNA polimeraz aracılığı ile başlamakta ve ilk bakteriyofaj mRNA'sı yapıldıktan sonra bakteriyofaja spesifik çok erken ve erken proteinler sentez edilmektedir. İlımlı bakteriyofajlarda litik ya da lizojenik yaşam şekline bu devrede karar verilmektedir. Bu karar ile konak hücrenin replikasyon veya transkripsiyon özelliği ya da her iki özelliği bloke edilmekte, bakteriyofaj immünitesi gelişmekte ve konak hücre aynı bakteriyofaj ile tekrardan enfekte olamamaktadır. Konak bakteri DNA ve RNA sentezinin bloklanması, bir çok bakteriyofajda farklı şekillerde meydana gelmektedir.

Bakteriyofaj nükleik asidinin konak bakteri içerisine girmesi, konak bakterinin DNA ve RNA sentezini bloklaması ve ilk hücre içi bakteriyofajın oluşması için geçen süreye eklips periyodu adı verilir. Bir çok bakteriyofajda eklips periyodu yaklaşık 12 dak gibi bir süreye tekabül etmektedir.

c. Multiplikasyonu: Multiplikasyon evresinde bakteriyofaj DNA replikasyonu başlar ve bir çok yeni profaj oluşturulur. Bakteriyofaj DNA replikasyonu, bakteriyofaj DNA'sı üzerinde bulunan ve replikasyon orijini adı verilen spesifik bir bölgeden başlar. Replikasyon orijini birçok bakteriyofajda tektir, fakat uzun kromozomlu T-even bakteriyofajlarında çok sayıda bulunmaktadır. Bakteriyofajların çoğunda replikasyon, rolling-circle replikasyonu (yuvarlanan çembersel replikasyon) şeklinde meydana gelmektedir (52). Lambda bakteriyofajı gibi çift zincirli DNA'ya sahip bakteriyofajlarda, rolling circle replikasyon ile lineer çift zincirli uzun ve bir çok *cos* bölgeleri içeren DNA sentez edilir. Φ X174 gibi tek zincirli sirküler DNA'ya sahip bakteriyofajlarda replikasyon önce komplementer DNA'nın sentezi ile başlar. Daha sonra protein A adı verilen bir protein yardımı ile replikasyon orjininde bir çentik oluşturulur ve rolling circle replikasyon ile tek zincirli sirküler bakteriyofaj DNA'ları replike edilir (44, 49, 56).

Replikasyonunun sonuna doğru ortamda nükleazlar artmakta, DNA'da kırılmalar ve tek zincir üzerinde çentikler oluşmaktadır. Bunlar, lineer, çift zincirli DNA üzerinde tekrarlayan bazlar içeren ve faj üretiminde ara ürün olan konkatamerlerin oluşumu için başlangıçtır. Bu evrede konak ve bakteriyofaj kromozomu üzerinde bir çok mutasyonlar da oluşabilmektedir (52).

d. Morfogenezis (Bakteriyofaj partiküllerinin oluşumu): Konak bakteri hücresi içerisinde yeterli bakteriyofaj DNA'sı oluşturulduktan sonra geç mRNA sentezlenerek bakteriyofajın kılıfını ve kuyruğunu oluşturacak olan yapısal ve katalitik proteinler sentez edilir. Yapısal proteinlerin bir alt sınıfı olan olgunlaşma proteinleri yardımı ile bakteriyofaj DNA'sı, bakteriyofaj kılıfı içine girmekte ve progen virion oluşturulmaktadır.

Lambda bakteriyofajında, yapısal proteinlerin sentezi ve kapsidin oluşturulmasından sonra sentez edilen bakteriyofaj DNA'sı, terminaz (Ter) adı verilen bir enzim ile *cos* bölgelerinden kesilmekte ve kapsid içine doldurulmaktadır. Daha sonra kuyruk kısmı kapsid ile birleşerek profaj partikülleri meydana gelmektedir (56).

Bakteriyofajın adsorbsiyonu, enjeksiyonu, bakteriyofaj DNA replikasyonu, morfogenezi ve ilk hücre dışı bakteriyofaj partikülünün gözlenmesi için geçen süreye latent peryod adı verilmekte ve değişik bakteriyofaj tiplerinde bu peryod 13-45 dak gibi bir süreye tekabül etmektedir (56).

f. Yeni sentez edilen bakteriyofajların salınımı: Enfeksiyon siklusunun geç evresinde, konak bakteri hücresinde yeterince profaj sentez edilmiş olur ve bir kısım enzimler ile hücre duvarı parçalanarak progen bakteriyofajlar ortama salınır. Bakteriyofajların bakteri hücrelerinde üreme süreleri farklı olmalarına rağmen T4 bakteriyofaj'ında 40-50 dak içinde replikasyon tamamlanmaktadır. T-even bakteriyofajlarında hücre lizisi, enfeksiyonun geç evresinde kodlanan iki proteinin fonksiyonu ile meydana gelmektedir. Bunlardan biri *t* geni tarafından kodlanan lipaz olup yeni oluşan bakteriyofajların hücre membranına yapışmasını, diğeri ise *e* geni tarafından kodlanan lizozim olup hücre duvarının parçalanmasını sağlamaktadır (45). Lambda bakteriyofajında bu görevi endolizin adı verilen bir enzim yapmaktadır (46).

Bakteri hücresinin parçalanması ile progen fajlar ortama salınmaktadır. Hücre dışı ilk bakteriyofaj partikülünün görüldüğü bu olaya patlama (burst) ve bir hücreden salınan bakteriyofaj partikül sayısına patlama sayısı (burst size) adı verilmektedir. İn vitro ortamda, hücre dışı bakteriyofaj sayısının arttığı peryoda yükselme peryodu, bakteriyofajın salındığı süspansiyona lizat denilmektedir. Burst, filamentöz bakteriyofajlarda gözlenmez ve bu bakteriyofajlar hücreyi parçalamaksızın hücre duvarı porlarından dışarı çıkarlar (56). Burst sayısı her bakteriyofajda farklıdır.

İN vitro olarak yükselme peryodu sıvı besiyerinde, bulanık bakteri kültürlerinin berraklaşması, katı besiyerinde ise; üst agardaki konak bakteri kültürlerinin enfeksiyon bölgesinde plak adı verilen liz olmuş alanların oluşması ile belirlenmektedir (53, 57). Bakteriyofajların yaşam evrelerinin üremesinin saptanmasında önemli klasik metodlardan biri üreme eğrisinin saptanmasıdır. Bakteriyofaj üremesinin izlenmesi ve progeni virus sentezi için bir basamaklı üreme (One step growth curve) deneyi yapılır ve konak bakterinin enfeksiyonu için belirli sayılarda bakteriyofaj (10-300) kullanılır. Pratik olarak kültürde bulunan her hücrenin aynı anda enfekte olabilmesi için enfeksiyon sıklığının (multiplicity of infection: moi) yani hücre başına düşen enfektif bakteriyofaj partikül sayısının ayarlanması gerekmektedir. Enfeksiyon sıklığı (moi) enfektif

bakteriyofaj sayısının hücre sayısına bölünmesi ile belirlenebilmektedir. Lizat içindeki enfektif bakteriyofaj sayısı (pfu/ml), plak oluşturma yönteminde sayılarak tespit edilebilmektedir.

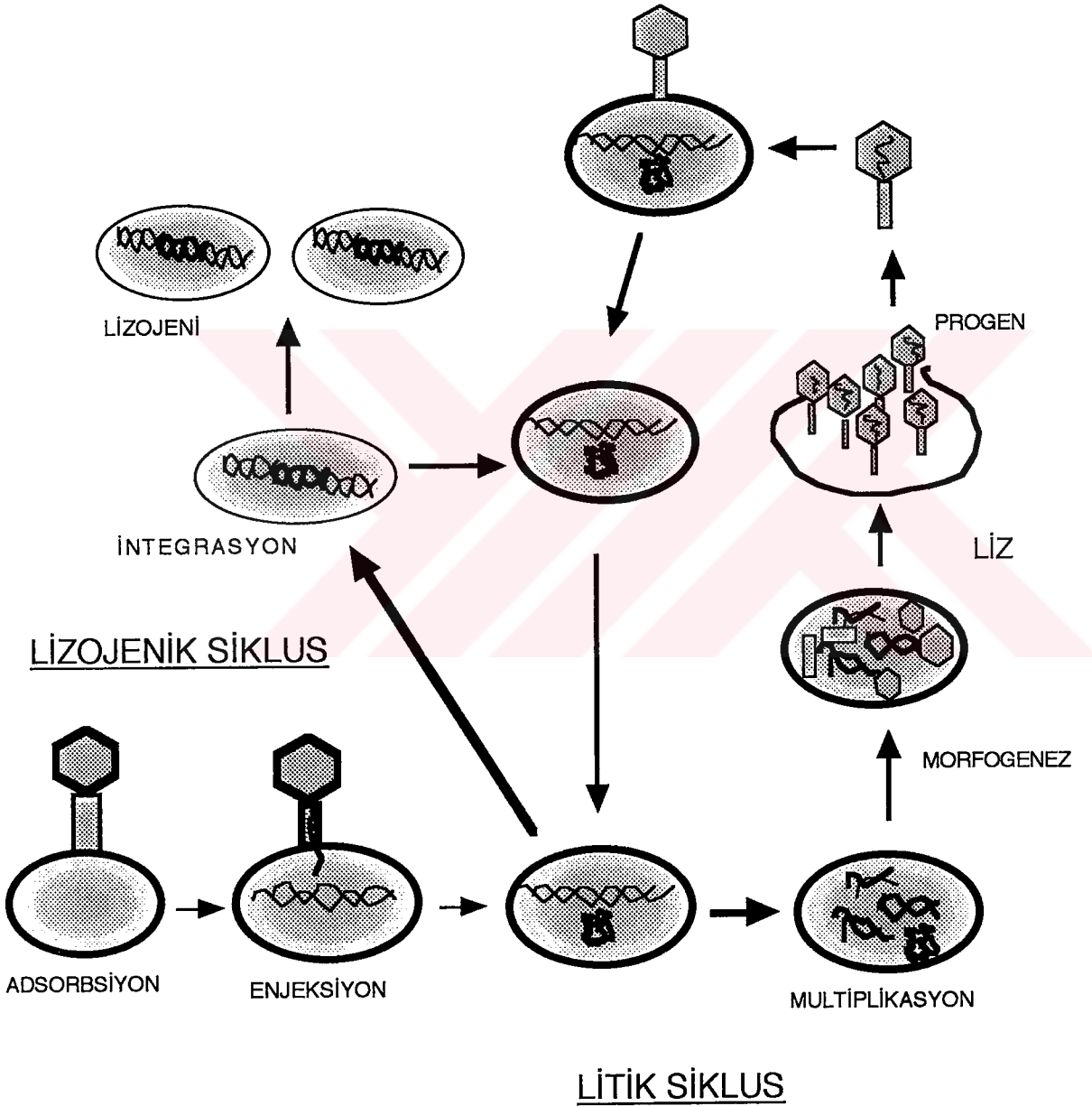
2.4.2.2. Lizojenik Siklus

Lizojenik bakteriyofajlar, nükleik asitlerini bakteri hücrelerine enjekte ederek konak hücreyi enfekte etmelerine rağmen nükleik asitlerinin replikasyonu başlamamaktadır. Bakteriyofaj DNA'sı bakteri kromozomuna entegre olmakta ve yavru bakterilere genetik olarak aktarılmaktadır. Lizojenik yaşam, bazı bakteriyofajlarda alternatif yaşam siklusu olarak bulunmaktadır (Şekil 3). Lizojeni, bazı bakterilerde patojenite ile yakın ilişkilidir. *Corynebacterium diphtheria* (*C. diphtheria*) ve kızıl streptokok'unda toksin yapımı profaj kontrolü altındadır. Lizojenik siklusu kullanan ve en iyi tanımlanan bakteriyofaj *E. coli* lambda bakteriyofajıdır. Lambda bakteriyofajı her iki siklusu da kullanabilmektedir. Lizojenik siklusda, bakteriyofajın konak hücreye adsorbsiyonu ve bakteriyofaj DNA'sının hücre içine enjeksiyonu aşamaları litik bakteriyofajlarda olduğu gibidir (44, 49). Bakteriyofaj nükleik asidi hücre içine enjekte edilirken, bakteriyel RNA polimeraz aracılığı ile bakteriyofaja spesifik mRNA'nın kısa bir kolu (erken mRNA) sentez edilir. Bakteriyofaj DNA'sının tamamı, hücre içine enjekte edildiğinde sirküler hale geçer. Erken mRNA ile bakteriyofaj DNA'sı tarafından kodlanan represör proteini sentez edilir.

Represör, 236 amino asitten oluşan, monomer yapıda, birbirlerine 40 amino asit ile bağlı amino ve karboksil domainlerini içeren bir proteindir. Monomer yapıdaki represör proteinleri, dimer oluşturma eğilimindedir ve amino uçları ile DNA'ya bağlanırlar. Represör proteini, gen ekspresyonunda hem pozitif hem de negatif düzenleyici olarak görev yaparak litik ya da lizojenik yaşam şekline karar vermektedir. Eğer ortamda yeterince represör proteini varsa diğer tüm bakteriyofaj genlerinin transkripsiyonu bloklanır ve profaj oluşturulamaz (44, 46, 49).

Lizojenik siklusun son aşamasını, sirküler yapıdaki bakteriyofaj DNA'sının konak kromozomal DNA içine integrasyonudur. Bu olaya bakteriyofaj *int* geninin kodladığı integrasyon (İnt) proteini aracılık etmektedir. Bakteriyofaj kromozomu üzerindeki *attP* (attachment phage) gen bölgesi ile konak

kromozomu üzerindeki *attB* (attachment bacteria) gen bölgesi rekombinasyon yaparak bakteriyofajın bakteri kromozomuna entegrasyonu sağlar. Lambda bakteriyofajının *E.coli* kromozomu üzerindeki *attB* bölgesi, galaktoz (*gal*) ve biotin (*Bio*) genleri arasında yer almaktadır. Bakteriyofaj DNA'sının konak kromozomundan çıkmasını ise yine bakteriyofaj tarafından kodlanan eksizyon (*Xis*) proteini sağlamaktadır (44, 46).



Şekil 4. Bakteriyofajların Litik ve Lizojenik Hayat Siklusu.

Laktik asit bakterilerinde entegrasyon ve eksizyon olayları tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, *L. gasseri* adh bakteriyofajında *attP* bölgesinin, 365 baz çiftlik büyüklükte olduğu ve 11 bazlık tekrarlayan uçlar içerdiği bildirilmektedir (58). Entegrasyondan sonra, bakteri DNA'sı bakteriyofaj DNA'sı ile birlikte bölünüp çoğalmaya devam etmektedir. Bakteriyofaj nükleik asidi, herhangi bir etken ile indüklenerek litik sıklusa geçmeye karar verene kadar, konak kromozomunda lizojenik şekilde taşınır ve konak kromozomu ile birlikte bölünerek çoğalır (56).

2.4.4. Bakteriyofajlarda Litik veya Lizojenik Karar

Bakteriyofajlarda litik veya lizojenik yaşama siklusuna karar, erken mRNA oluştuktan sonra verilmektedir. Litik ve lizojenik karar mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, bakteriyofaj kromozomu üzerinde bulunan promotor ve operatör denen bölgelerin kontrolü altında olduğu varsayılmaktadır. Lambda bakteriyofajı genomunda, *ci* ve *cro* gen bölgeleri ve bu bölgelerin transkripsiyonunu başlatan promotor kısımları bulunmaktadır. *ci* gen bölgesinin promotoru; represör bağlama promotoru (PRM), *cro* gen bölgesinin promotoru; sağ promotor (PR)'dur. Promotor, RNA polimerazın DNA'ya bağlandığı ve transkripsiyonun başladığı bölgedir. Operatör, mRNA ve diğer bilgilerin kodlandığı esas genleri içeren bölgedir ve OR1, OR2 ile OR3 kısımlarından oluşmuştur.

Litik veya lizojenik yaşam kararında önemli rol oynayan represör proteini her üç operatöre bağlanabilme özelliğindedir. Represör, OR1 ve OR2'ye bağlandığında RNA polimeraz OR3'e bağlanıp transkripsiyonu sola doğru yönlendirir ve lizojenik evreyi başlatır. Represör proteini OR3 bağlandığında RNA polimeraz, OR1 ve OR2'ye bağlanarak transkripsiyonu sağa doğru yönlendirir ve litik evreyi başlatır.

Bakteriyofaj DNA'sı konak içine enjekte edildiğinde konağın RNA polimerazı, bakteriyofaj kromozomunda bulunan sağ (PR) veya sol (PL) promotora bağlanır ve transkripsiyonu başlatır. Böylece çok erken faz proteinleri sentez edilir. RNA polimeraz konak hücre tarafından üretilen ve DNA'dan RNA sentez eden bir enzimdir. Erken proteinler, bakteriyofaj kromozomunda bulunan *N* ve *cro* gen bölgelerini çalıştırarak *N* ve Cro proteinlerini sentez ederler.

Bakteriyofaj *N* gen bölgesi ile enfeksiyonun ilk evresinde erken proteinler sentez edilir. Erken proteinler, represörü aktive ederek bakteriyofajı lizojenik, inaktive ederek litik evreye çevirirler. Bu karar çevre şartları ve tam olarak bilinmeyen bazı etkenler tarafından da belirlenmektedir. Erken faz proteinleri rekombinasyon ve DNA replikasyon genlerini çalıştırır. Geç oluşan proteinler ise litik evrede baş, kuyruk ve liz genlerini, lizojenik evrede, *cI* ve *int* genlerini çalıştırır(46).

2.4.5. Bakteriyofajlarda İndüklenme Mekanizmaları

Lizojenik döngüde replike olan bakteriyofajlar *in vivo* veya *in vitro* ortamlarda çeşitli etkenlerle indüklenerek litik evreye geçebilmektedirler. En çok bilinen indükleyici ajanlar UV ve kimyasal ajanlardır. *In vivo* ortamda ilaçlar veya hücre içinde gelişen bir dizi bilinmeyen olaylarla indüklendiği varsayılmaktadır. *In vitro* olarak en iyi indükleyici kimyasal ajanlardan biri mitomisin C dir. İndüklenme mitomisin C konsantrasyonuna göre değişmektedir. Laktobasil suşlarının indüklenmesi için gerekli minimum mitomisin C konsantrasyonu 0.2 mg/ml dir. İndüklenmede ısı ve kültürün yaşı önemli etkenlerdir. Isının etkisi her suş için farklılık göstermekle birlikte, kültürün yaşının erken logaritmik fazda olması gerekmektedir (57).

UV ve mitomisin C gibi ajanlar, tam olarak bilinmeyen bir mekanizma ile normalde DNA molekülleri arasında rekombinasyonu sağlayan bir bakteriyel protein olan RecA'nın davranışını önemli ölçüde değiştirerek, yüksek spesifikliğe sahip bir proteaz haline dönüştürür. Bu proteaz, represör moleküllerini karboksil ve amino bölgeleri arasından keser. Böylece lizojen içinde dimer oluşturabilecek monomer sayısı azalır ve operatörün OR1 ile OR2 bölgesine bağlanacak dimer yeteri kadar bulunamaz. Dolayısı ile RNA polimeraz, OR1 ile OR2 bölgesine bağlanarak litik siklusun başlamasına neden olur (46).

2.4.6. Bakteriyofaj Direnç Mekanizmaları

Bakteriler, bakteriyofaj enfeksiyonuna karşı çeşitli mekanizmalar aracılığı ile karşı koymaya çalışırlar. Bu mekanizmalar; adsorbsiyonun inhibisyonu, restriksiyon modifikasyon sistemi ve abortif enfeksiyonlar olmak üzere başlıca üç grup altında toplanmaktadır. Bakterilerin bakteriyofajlara dirençli olması; bakteri

hücre yüzeyinde bakteriyofaja spesifik reseptörlerin modifikasyona uğraması veya bakteriyofajın adsorbsiyonunda bir bozukluğun olması şeklinde olabilmektedir. Adsorbsiyon inhibisyonu; bakteriyofaj partiküllerinin, hücre yüzeyine enfeksiyonu gerçekleştirebilecek düzeyde yapışamaması ile oluşan inhibisyonudur. Adsorbsiyon inhibisyonu, spontan nokta mutasyonları veya adsorbsiyon inhibisyonunu kodlayan bir plazmid aracılığı ile meydana gelmektedir. Araştırmalar, hücre yüzeyinde bulunan, galaktoz ve mannoz gibi şekerlerin ihtiva ettikleri bir polimer aracılığı ile hücre yüzeyindeki reseptörlerin maskelendiğini ve bakteriyofaja direncin geliştiğini göstermiştir. Ayrıca bakterilerin, taşıdıkları bazı plazmidleri aracılığı ile birden fazla bakteriyofaja direnç kazanabildikleri ve plazmid içeren suşlarda bulunan hücre yüzey antijenlerinin bazılarının, adsorbsiyon bloklanmasında önemli rol oynadıkları belirlenmiştir. Adsorbsiyonun bloklanmasında ısıya duyarlılığın aracı bir mekanizma olduğu da tespit edilmiştir (51, 59).

Restriksiyon/modifikasyon enzimleri, dışarıdan bakteriye giren yabancı DNA'ları tanıyarak onları parçalayan, çift iplikli DNA'da spesifik bölgelerden kesim yaparak DNA'dan genin veya segmentin çıkarılmasında etkin ve spesifik fonksiyon gören, ayrıca sentez edilen DNA'nın sitozin veya pirimidin bazlarına metil grupları takarak modifiye eden enzimlerdir. Konağın iyi gelişmiş restriksiyon endonükleazlara sahip olması bakteriyofaja karşı bakteriyi koruyan önemli bir faktördür.

Abortif enfeksiyon, bakteriyofajın adsorbe olmasına, DNA'nın girmesine ve viral gen ekspresyonunun ilk aşamalarının normal devam etmesine rağmen enfeksiyon siklusunun durması ve progen oluşmaması olayıdır. Abortif enfeksiyonlar, bakterilerin bakteriyofajlara direnç oluşturmada çok etkilidir. Replikasyonunun ve progen salınımının yavaş ilerlediği bakteriyofajlarda abortif mekanizma oldukça etkilidir.

Konağın, aynı bakteriyofajı lizojenik olarak taşıması ve immünite geliştirmesi veya başka bir lizojenik bakteriyofaj içererek interferans geliştirmesi gibi faktörler, bakteriyofaja karşı bakteriyi dirençli kılmaktadır. Normal koşullarda lizojenik bakterilerde profaj stabildir. Lizojenik siklusun spontan olarak sonlanması yaklaşık 10^{-5} civarında meydana gelmekte ve kültür süpernatantı düşük titrede bakteriyofaj içermektedir. Fakat bakteriler spontan salınan bu bakteriyofaja karşı

immündurlar. Bu immünite, bakteriyofaj DNA'sının konak içinde replike olmamasından kaynaklanmaktadır.

2.4.7. Laktobasil Bakteriyofajları

Laktobasillerde bakteriyofajların varlığı ilk olarak 1934 yılında New York şehrinin atık sularından izole edilen *L. acidophilus* ve *L. bulgaricus* türlerinde gösterilmiştir. Daha sonraları laktobasil bakteriyofajları değişik kaynaklardan; süt ürünlerinden (42), salam, sucuk, sosis gibi et ürünlerinden (60), insan ince barsağından (61) ve vajinal floradan izole edilmişlerdir (62).

Bakteriyofajlar, özellikle gıda endüstrisinde kullanılan laktobasil başlatma kültürlerini inhibe ederek gecikmiş asit üretimine neden olmaktadır. Bu nedenle, gıda orjinli laktobasiller ve bunların bakteriyofajları konusunda oldukça yoğun çalışmalar yapılarak bir çok yeni bakteriyofaj izole edilmiştir. İzole edilen bakteriyofajlar, morfoloji ile konak genişliklerine göre sınıflandırılmışlardır (42, 61, 63).

Bradley'in sınıflandırmasına göre laktobasil suşlarından izole edilen bakteriyofajların büyük bir kısmı B gurubu, az bir kısmı ise A ve C gurupları içinde yer almaktadır (64, 65). Ackermann (66), virulan özellikte laktokok bakteriyofajlarının büyük çoğunluğunu ve *Siphoviridae* familyasına ait tempere bakteriyofajları, EM'de morfolojik olarak incelemiş ve grup B bakteriyofajlarını B1 ve B2 morfotiplerine ayırmıştır. B1 morfotipi; 60 nm'den küçük ikozahedral başlı, 200 nm'den kısa non-kontraktıl kuyruklu bakteriyofajlar, B2 morfotipi ise; 60x40 nm çapında uzamış başlı, B1 bakteriyofajından daha kısa kuyruklu (~ 100 nm) ve daha nadir görülen bakteriyofajlar şeklinde tarif etmiştir.

Başka bir çalışmada, B1 grubu bakteriyofajları kuyruk yapısındaki aksesuar (boyundaki halkaların, kuyruk kılıfının yapısı, fiberlerin ve topuzların sayısı, uzunlukları, basitten komplekse giden tabla şekilleri) değişikliklere göre subgruplara ayrıldığı bildirilmektedir (67). Değişik laktobasil türlerinde belirlenen, litik özellikteki tüm bakteriyofajlar, izometrik başlı ve kuyrukta önemli bir değişikliği bulunmayan, çapraz çizgili kuyruklu, fibröz halkalı, kuyruk fiberleri olan bakteriyofajlardır (51).

Bakteriyofajın konak hücre üzerine adhezyonu kuyruk aracılığı ile olmaktadır. *L. casei*'nin başlıca bakteriyofaj adhezyon molekülünü ramnoz,

bakteriyofaj J1 için bu reseptör hücre duvarındaki L-ramnoz, *L. casei* S-1 için stoplazmik membrandaki D-glukozamin olduğunu belirlenmiştir (68). Lambda bakteriyofajı için konak hücre reseptörü bir mannoz transport proteinidir (46).

Laktik asit bakterilerine ait bakteriyofajlarda nükleik asit, çift zincirli lineer DNA'dır. DNA'nın uç kısımlarında tekrarlayan baz dizileri bulunmakta ve bu tekrarlayan baz dizileri, bakteriyofaj DNA'sı hücre içine enjekte edildiğinde sirküler yapı oluşturmalarını sağlamaktadır. Bu nedenle, laktik asit bakteriyofajları lambda benzeri bakteriyofajlar olarak bilinmektedir.

Laktobasil bakteriyofajlarının genom büyüklüğü yalnızca bir kaç bakteriyofajda çalışılmış ve 34 ile 75 kb arasında değişen büyüklüklerde olduğu belirlenmiştir (69, 70).

2.5. Bakteriyosinler

Bakteriyosin terimi orjinal olarak spesifik reseptörlere adsorbsiyonu ve intraspesifik aktiviteli, letal biyosentezi karakterize eden kolisin tipi proteinleri tanımlamak için önerilmiştir. Özellikle gram pozitif bakterilerin ürettiği kolisin ile yakın ilişkili maddeler bakteriyosin olarak tanımlanmıştır (32).

Laktobasil ve laktokok gibi laktik asit bakterilerinde antimikrobiyal etki çok uzun yıllardan beri bilinmekte ve fermentasyon işlemlerinde kullanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinde protein yapısındaki antimikrobiyal maddelerin araştırılması ilk olarak 1920-1930 yılları arasında yapılmış ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*'de nisin tanımlanmıştır. Daha sonraki yıllarda, laktik asit bakterilerinde yapılan çalışmalarda, kimyasal olarak farklı yapıda bir çok bakteriyosin saptanmıştır.

Bakteriyosinler, spesifik bakteriyosidal partiküllerin bir grubudur ve yakın akraba bakterilere karşı bakterisidal aktiviteye sahip, N ve C terminal bölgelerinden oluşan, protein yapısında moleküllerdir. Bakteriyosinler, duyarlı konakların üremesini çeşitli mekanizmalar ile inhibe etmektedirler. Bu inhibisyon mekanizmaları;

a) Bakteriyosinlerin membran veziküllerine etki ederek metabolik ürünlerin dışarı salınmasını önlemek.

b) Membran porları üzerinde kompleksler oluşturmak ve bu kompleksler ile hücre duvarı ve stoplazmik membranın geçirgenliğini etkileyerek membran transportu ve permeabilitesini bozmak.

c) Hücrenin enerji üretimi veya makromolekül sentezini engellemek, şeklinde bildirilmektedir.

Bradley (32), bakteriyosinleri molekül ağırlıklarına göre iki gruba ayırmıştır (Tablo 2). Düşük molekül ağırlığına sahip bakteriyosinler, genellikle tripsine yüksek duyarlı, ısıya karşı dayanıklı oldukları, büyük molekül ağırlıklı bakteriyosinlerin ise tripsine dirençli, ısıya duyarlı oldukları belirlenmiştir. Büyük molekül ağırlıklı bakteriyosinlerin bir kısmının defektif profaj oldukları bildirilmektedir. Düşük molekül ağırlıklı bakteriyosinlerin (<30 kDa), büyük molekül ağırlığındaki bakteriyosinlere (>30 kDa) göre daha geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır.

Tablo 2. Bakteriyosinlerin Genel Özellikleri

Düşük Moleküler Ağırlıklı (≤30 kD) Bakteriyosinler	Yüksek Moleküler Ağırlıklı (>30 kD) Bakteriyosinler
Sediment oluşturmaz	Sediment oluşturur
Tripsine duyarlı	Tripsine dirençli
Termostabil	Termolabil
EM'de görülmez	EM'de bakteriyofaj benzeri yapı ve komponentler

Bradley (32), tarafından konak bakterinin gelişmesini engelleyen inhibitör etkenin bakteriyosin olduğunun belirlenmesi için kolisinler esas alınarak bir dizi klasik kriterler saptanmıştır. Bu kriterler;

- a- Homolog türler arasında dar bir inhibitör aktiviteye sahip,
- b- Esansiyel olarak bulunurlar, biyolojik olarak aktif proteinler,
- c- Bakterisidal aktiviteye sahip,
- d- Spesifik hücre reseptörlerine yapışırlar,
- d- Konak hücrenin bakteriyosin immünitesi ve bakteriyosin üretimi plazmide bağlıdır,
- e- Letal biyosentez aracılığıyla üretilirler.

Bakteriyosinlerin kesin belirlenmesi için bu kriterler üniversal bir belirleyici olmamakla birlikte bunların en az b ve c şıklarına uyum göstermeleri, inhibitör etkenin bakteriyosin olarak kabul edilmesini sağlamaktadır.

Klaenhammer (71), laktik asit bakterileri tarafından üretilen bakteriyosinleri, protein yapısındaki inhibitörleri, moleküler büyüklükleri ve etkili oldukları konakların türlerine göre karakterize ederek başlıca dört farklı sınıf içinde toplamıştır. Bunlar;

Lantibiyotikler: Ribozomal olarak sentezlenmekte olup molekülün aktif formunda lantionin, beta metillantonin, dehidroalanin ve dehidrobutirin içeren küçük (<5 kDa) membran-aktif peptitlerdir. Laktosin S, *L. sake* tarafından oluşturulan bir lantibiyotiktir.

Lantibiyotik içermeyen, ısıya stabil, düşük molekül ağırlığında membran-aktif peptidler: Amfifilik helikal yapıdan hidrofobik yapıya kadar değişebilen, beta sheet yapılı, 10 kDa'dan küçük molekül ağırlığında ve 110-120°C'de kaynamaya dayanıklı bakteriyosinlerdir. Kurvasin A, sakasin A, sakasin P, laktasin B ve laktosin F bu grup içinde yer alan laktobasil bakteriyosinlerinden birkaçıdır. Bu grup bakteriyosinler, yüksek konsantrasyonlarda glisin benzeri küçük amino asitleri içerirler ve güçlü katyonik özelliğe sahiptirler. Bunların büyük bir kısmı, biyokimyasal olarak karakterize edilmiş ve üç subgrup altında toplanmışlardır. Bunlar; listeria-aktif peptidler, bakteriyosin aktivitesini tamamlayan iki peptid molekülü ihtiva eden kompleks bakteriyosinler ve aktivite için sistein rezidüsüne ihtiyaç gösteren tiol-aktif peptidlerdir.

Büyük molekül ağırlığında, ısıya duyarlı bakteriyosinler: Moleküler ağırlığı 30 kDa'dan büyük olup proteinleri içermektedir. Laktasin A ve B, asidofilusin A, kazeisin 80, helvetisin V-1829 bu grup içinde yer alan bakteriyosinlerdir.

Kompleks bakteriyosinler: Proteine ilave olarak lipid ve karbohidrat bulunduran bakteriyosinlerdir. Plantarisin S bu grup içinde yer almaktadır.

Klaenhammer'ın (71) yapmış olduğu bu sınıflandırma 1996'da Nes ve ark (72) tarafından da desteklenmiş ve bakteriyosinler üç sınıf içinde toplanmışlardır. Bu çalışmacılar, lantibiyotik içermeyen bakteriyosinleri üç subgruba ayırmışlar ve farklı olarak bu grup içinde salgısal bakteriyosinleri incelemişlerdir. Ayrıca,

bakteriyosinlerin bir kısmında antibakteriyel aktivite ile ilişkili lipid ve karbohidrat gibi bazı makromoleküller içermekte olduklarını belirtmişlerdir.

Bakteriyosinlerin bir kısmı kromozomal, bir kısmı plazmid aracılığı ile kodlanmaktadır. Bakteriyosinler, temelde iki farklı tipe ayrılırlar. Biri; küçük molekül ağırlıklı, daima termostabil, santrifüj ile çöktürülemeyen ve EM'de gözlenemeyen, diğeri ise çok büyük moleküler yapıda, kolay sediment oluşturan, EM'de bakteriyofaj kuyruk komponenti veya bakteriyofaj benzeri şeklinde görülen yapılardır. Bu iki tipin ortak özellikleri protein yapısında olmaları ve oluşma şekilleridir. Bunların genetik determinantları tempere bakteriyofaj ile ilişkili olarak ekstra kromozomal elementlere benzer şekilde hücrede meydana gelirler. Bakteriyel kromozomlar ile aynı fazda replike olurlar ve böylece bakteriyosinogenik suşları oluştururlar (50).

Gram pozitif bakterilere ait bakteriyosinler, kimyasal yapı olarak bir kısmı basit proteinlerden oluşurken bir kısmı da stafilokok, klostridyum ve laktobasil bakteriyosinlerinde olduğu gibi proteinlere ek olarak lipid ve karbohidrat komponentleri ihtiva eden kompleks moleküllerdir (32).

Laktobasiller, aktiviteleri birbirlerine benzeyen bir çok farklı bakteriyosin üretmektedir. *L. sake* tarafında üretilen sakasin ve değişik laktobasil türleri tarafından üretilen laktosin, küçük molekül ağırlığında bakteriyosinlerdir. *L. helveticus* tarafından üretilen helvetisinler en iyi karakterize edilen büyük molekül ağırlığındaki bakteriyosinler olup kromozomal olarak kodlanmaktadır (32, 50).

Bakteriyosinler, bakterilerin bir bakteriyofaj tarafından enfekte edilmesi veya metabolik inhibitörler ile indüklenmesi sonucu yüksek miktarlarda salınırlar. En iyi bakteriyosin indükleyici ajan, UV ve mitomisin C'dir. Bununla birlikte, spontan olarak da bakteriyosin, bakteri kültür süpernatantlarında bulunabilmektedir (32).

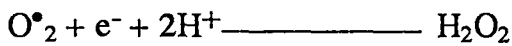
Bakteriler, kendi bakteriyosinlerine karşı immüdürlürlar. Bakteriyosin üreten suşlar, kendi ürettikleri bakteriyosinlerden korunmak için bir koruyucu sistem geliştirmişlerdir. Bu sistem immünite olarak tanımlanmaktadır. İmmüniteyi sağlayan, 50-150 amino asitten oluşmuş düşük molekül ağırlığında ve bakteriyosinlerin üretimleri sırasında eş zamanlı üretilen bir proteindir. İmmünite proteinlerinin %50-90'ı sitoplazmada serbest olarak bulunmaktadır (72). Bakteriyosinogenik mikroorganizmalar ürettikleri proteazlar aracılığı ile bazı

bakteriyosinlere karşı korunurlar ve bakteriyosinleri inaktive ederler. *Enterococcus faecalis* subsp *zymogenes* ürettiği kendi bakteriyosinine karşı spesifik bir teikoik asit ile korunarak immünizasyon sağlamaktadır. Ayrıca yüksek molekül ağırlığında olan bakteriyosinlerin çoğu mükemmel antijen özelliğine sahiptirler (32).

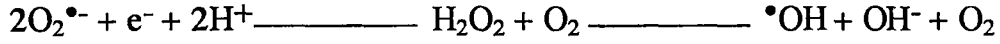
Son yapılan çalışmalarda, bakteriyosin üreten mikroorganizmaların birden fazla sayıda farklı bakteriyosin üretebildikleri ve bunların çoklu bakteriyosinogenik suşlar oldukları belirlenmiştir. Bu çoklu bakteriyosinogenik suşların izolasyonunda da giderek artış gözlenmektedir. *Corynebacterium piscicola* UV17B en az iki farklı bakteriyosin üretmekte ve bunlardan biri plazmid, diğeri kromozomal olarak kodlanmaktadır. Laktobasillerden, *L. plantarum* C11 suşu çoklu bakteriyosinogenik suş olarak belirlenmiştir. *L. plantarum* C11 suşu, 2 adet iki peptidli ve bir adet bir peptidli olmak üzere üç farklı bakteriyosin üretmekte ve bunların tümü kromozomal olarak kodlanmaktadır. (72).

Laktobasiller bakteriyosin ve asit üretimleri dışında konak suşlar üzerinde inhibitör etki gösterebilen H_2O_2 üretirler. Laktobasillerde glukoz, homo ve hetero fermentasyon ile piruvata, piruvat'ın da oksidasyonu ile asetat, CO_2 ve H_2O_2 son ürün olarak oluşmaktadır. Ayrıca, laktat son ürün olmakla birlikte, flavin ihtiva eden laktat dehidrogenaz veya laktat oksidaz enzimi aracılığı ile NAD'ye bağımsız olarak aerobik koşullar altında CO_2 ve asetata kadar metabolize olabilmekte ve H_2O_2 oluşmaktadır (73).

Biyolojik sistemlerde en önemli radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksit meydana gelir. Hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır (74).



Biyolojik sistemlerde H_2O_2 asıl oluşumu süper oksit'in dismutasyonu ile olur. İki süper oksit molekülü iki proton alarak H_2O_2 ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir. Hidrojen peroksit serbest bir radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve hidroksil radikali oluşturur.



Bu reaksiyona "Haber-Weis" reaksiyonu denir. Bu reaksiyon katalizli ve katalizörsüz meydana gelebilir. Demir katalizörlüğünde ferro demir kullanılarak Fenton reaksiyonu ile H_2O_2 den $\bullet\text{OH}$ ve OH^- üretilir. Hidroksil radikali, yarılanma ömrü çok kısa, olduğu yerde büyük hasara sebep olan, son derece reaktif bir oksidandır. Serbest radikaller hücrenin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler.

Katalaz, demir ihtiva eden H_2O_2 'yi oksijen ve suya parçalayarak toksik etkisini gideren bir enzimdir (75). Laktobasillerin oluşturduğu H_2O_2 , katalaz üretemeyen *E. coli* (76, 77), *G. vaginalis*, *Bacteroides* spp., *M. hominis*, *U. urealyticum* *Peptostreptococcus* spp., gibi anaeroplara, viridans streptokoklar (78), *C. trachomatis* (22) ve *N. gonorrhoeae*'nin (26) üremelerini inhibe edebilmektedir.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. MATERİYAL

3.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma Ocak 1996 ile Haziran 1998 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Çalışmaya Farabi Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği ve Trabzon Doğum Hastanesi'ne başvuran 75 kadın hasta alındı. Vajinal sürüntü örneklerini almak için hazırlanan formlara, kişisel bilgiler, geçmişte geçirdiği genel ve vajinal enfeksiyonlar kaydedildi. Son üç ay içerisinde herhangi bir nedenle antibiyotik kullanan hastalar çalışma kapsamına alınmadı.

3.1.2. Kimyasallar, Besiyerleri, Enzim ve Ayıraçlar

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve ayıraçlar; NIH Thioglycollate Broth, Pancreatic Digest of Casein, Bacto Peptone, Lactobacilli MRS Broth, Rogosa SL Broth, Purple Broth Base, Columbia Broth, Heart Infusion Broth, Brucella Broth ve esculine Difco (ABD) 'dan; cellobiose, galactose, maltose, mannitol, mannose, melibiose, raffinose, ribose, sorbitol, sucrose, trehalose, soluble starch, glucose, glycogen, beef extract, glycine, mineral oil, ethidium bromide, tetramethyl benzidine (TMB), vitamin K1, hemin, mitomycin C, lysozyme, ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA), N, N, N', N'-tetra metil etilen diamin (TEMED), ammonium persulfate, acrylamide, N,N'-methylene bis-acrylamide, Trizma hydrochloride, Trisma base, dextrane sulfate, polyvinylpyrrolidone, ficoll, gelatin, glycerol, sodium dodecyl sulfate (SDS), beta-mercapto ethanol, bovin serum albumin (BSA), chloroform, phenol, proteinase K, RNase H, DNase I, sodium acetate, catalase, trypsin ve pronase E Sigma (ABD)'dan; sodium chloride, sodium bicarbonate, sodium citrate, di-sodium phosphate, monopotassium

phosphate, hydrogen peroxide, magnesium sulfate, magnesium chloride, disodiumhydrogen phospate, hydrochloric acid, potasium hydroxide ve natrium hydroxide Merck (Almanya) firmasından; Triton X-100, polyethylene glycol 8000, bromocresol purple ve bromophenol blue Fisher (ABD)'dan; acetone Carlo Erba (İtalya)'dan; restrisiyon endonükleaz enzimleri Promega, New England Biolabs ve Life Technologies (ABD)'den; horseradish peroxidase United Biomedical Inc. (ABD); Sabouraud Dextrose Agar ve BBL hydrogen-carbon dioxide generating kit Becton Dickinson (ABD), non-radyoaktif hibridizasyon kiti GibcoBRL (ABD), Nytran naylon transfer membranı Schleicher Schuell (ABD) firmalarından temin edildi.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Bakteri Tür ve Suşları

L. gasseri ATCC 9857, *L. fermentum* ATCC 14931, *L. fermentum* ATCC 23271, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 15808, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 4749, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ATCC 9649, *L. jensenii* ATCC 25258, *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139, *L. vaginalis* ATCC 49540 ve *L. acidophilus* ATCC 4356 suşları University of Missouri Kansas City'den temin edildi ve laktobasil tür tayininlerinde kontrol olarak kullanıldı. *G. vaginalis* ATCC 14018, *E. coli* ATCC 25922, *P. vulgaris* ATCC 13315, *P. aeruginos* ATCC 10145, *E. cloacae* ATCC 13047, *S. milleri* IS51, *S. aureus* ATCC 25923 ve *C. albicans* ATCC 60193 suşları Refik Saydam Hıfzısıhha'dan temin edildi ve bakteriyosinlere karşı duyarlılıkları test edildi.

3.2. METOD

3.2.1. Örneklerin Alınması

Çalışma gurubunu oluşturan hastaların her birinden ikişer vajinal sürüntü örneği, jinekolojik muayene esnasında eküviyon çubuklar kullanılarak uzman bir hekim tarafından alındı. Örneklerden biri, steril tiyoglikolat besiyerine daldırıldı, diğeri kuru olarak steril test tüplerine konuldu ve içinde buz kalıpları bulunan kutularda transport edildi. Tiyoglukolat besiyeri üretici firmanın tavsiyesine göre

distile suda hazırlandı ve eküviyon çubukları bulunan test tüplerine 3 ml dağıtılarak otoklavda steril edildi.

3.2.2. Örneklerin Mikrobiyolojik Değerlendirilmesi

Kuru eküviyon çubuğu ile alınan vajinal sürüntü örneği, temiz bir lam üzerine sürülerek metanol ile tespit edildi ve gram boyama yapıldı. Aynı örnekten serum fizyolojik içinde nativ preparat hazırlanarak *T. vaginalis* varlığı yönünden araştırıldı. BV tanısı, vajinal akıntı bulunması, amin testi pozitifliği, yükselmiş vajinal pH, yüksek BV skoru ve clue hücre görülmesi ile kondu. Amin testi için, kuru eküviyon ile alınmış vajinal sürüntü örneğine %10'luk potasyum hidroksit (KOH) damlatılarak tipik balık kokusu oluşması amin testi pozitif olarak değerlendirildi. Gram boyama ile BV skorunun tespiti için Spiegel ve ark (79)'nın tanımladığı, Nugent ve ark (80)'nin modifiye ettiği yöntem kullanıldı. Gram boyanmış vajinal sürüntü örneklerinde bol miktarda ve üreme fazında maya hücreleri gözlenen örnekler MV olarak tanımlandı.

3.2.3. Laktobasillerin İzolasyonu ve Saf Kültürlerinin Elde Edilmesi

Tiyoglikolat besiyeri içine eküviyon ile alınan vajinal sürüntü örnekleri vortekslenerek materyalin besiyerine homojen karışması sağlandı. Her hasta örneğinden iki adet 800 μ l'lik sıvı 1.5 ml kapasiteli steril endorf tüplerine alındı. Üzerlerine 200 μ l steril gliserol ilave edilerek vortekslendi ve daha sonraki çalışmalarda kullanmak amacı ile -80°C derin dondurucuda saklandı. Direkt sürüntü örnekleri gram yöntemi ile boyanarak mikroskopta incelendi. Mikroskop sahasında yoğun gram pozitif basiller bulunan örnekler tiyoglikolat sıvı besiyeri içinde dilüe edildikten sonra Rogosa SL agara ekim yapıldı. Mikroskop sahasında az bakteri görülen örneklerden direkt olarak 10-20 μ l aynı besiyerine seyreltme yöntemi ile ekildi. Rogosa SL agar, laktobasillerin primer izolasyonunda kullanılan selektif bir besiyeridir. Rogosa SL agar besiyerini hazırlamak için; üretici firmanın tavsiyesine göre; Rogosa SL Broth'un pH'sı glasiyel asetik asit ile 5.4'e ayarlandı ve %1.5 agar ilave edildikten sonra 2-3 dak kaynatılarak steril petri plaklarına 0.5 cm kalınlıkta döküldü.

Rogosa agar besiyerine ekimleri yapılan vajinal sürüntü örnekleri, 37°C’de mumlu kavanoz içinde 24-48 saat inkübe edildi. Kültürlerde oluşan koloniler koloni mikroskopu ile incelenerek farklı koloni morfolojileri tespit edildi. Morfolojik olarak farklı olan birkaç koloni alınarak, gram boyanma özellikleri ve katalaz üretilmeleri yönünden test edildi. Gram pozitif basil morfolojisinde ve katalaz negatif bakteri kolonileri Lactobacilli MRS sıvı besiyerinde çoğaltıldı. Sıvı besiyerinde yeterli sayıda üreyen bakteriler aynı besiyerinin agar petri plaklarına seyreltme yöntemi ile ekilerek saflıkları kontrol edildi. MRS besiyeri, laktobasiller için spesifik bir besiyeridir. MRS sıvı besiyerinin pH’sı glasiyel asetik asit ile primer izolasyon için 6.2’ye, bakteriyosin, profaj indüksiyonu ve bakteriyofaj enfeksiyonu için 5.5’e ayarlandı ve otoklavda steril edildi. MRS agar besiyeri, pH’sı ayarlanmış sıvı besiyerine %1.5 agar ilavesi ile hazırlandı.

Laktobasillerin stok kültürleri, MRS sıvı besiyerinde üretildikten sonra %10 steril gliserol içinde -80°C’de, çalışma kültürleri %50 gliserol içinde -20°C’de saklandı.

3.2.4. Laktobasillerin İdentifikasyonu

Saf olarak izole edilen laktobasillerin tür tayinleri temel olarak Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology’de belirtilen kriterlere göre yapıldı (81). Bunlardan özellikle 15 ve 45°C sıcaklıkta üreyebilme, katalaz üretimi, karbohidratları fermente ve eskulini hidroliz etme özellikleri test edildi.

3.2.4.1. Katalaz Enzimi Varlığı

MRS agar da üretilmiş laktobasil kolonilerden bir öze dolusu alındı ve lam üzerinde bir damla %3’lük H₂O₂ ile karıştırıldı. Köpürme şeklinde gaz kabarcıklarının oluşması pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.4.2. Düşük ve Yüksek Sıcaklıkta Üreme

İzole edilen laktobasil suşları MRS sıvı besiyerine ekilerek 15°C ve 45°C üreme özellikleri yönünden değerlendirildi. En fazla bir hafta inkübasyon sonucunda üreme olmayan kültürler negatif olarak değerlendirildi.

3.2.4.3. Karbohidrat Fermantasyonu

Laktobasil suşlarının sellobiyoz, galaktoz, laktoz, maltoz, mannitol, mannoz, melibioz, rafinöz, riboz, sükröz, trehaloz, nişasta, glukoz ve glikojeni fermente etme test edildi.

Stok karbohidrat solusyonları steril distile su ile %10 konsantrasyonda hazırlandı ve 0.45 µm'lik filtreden süzülerek steril edildi. Karbohidratların dilüsyonları fermentasyon besiyerinde %10'luk karbohidrat solusyonlarının her biri için %1'lik hazırlandı. Solusyonlar steril ependorf tüpelerine 500 µl şeklinde dağıtıldı. Bir gecelik laktobasil kültürlerinden 1.5 ml üç kez karbohidrat içermeyen fermentasyon besiyeri ile asiditenin giderilmesi için yıkandı ve pellet 500 µl fermentasyon besiyeri içinde süspanse edildi. Bakteri süspansiyonundan 10 µl alınıp %1 karbohidratlı fermentasyon besiyerlerine ekildi ve 37°C'de 3-4 gün inkübe edildi. Bromocresol purple içeren fermentasyon besiyerinin renginin mordan sarıya dönüşmesi ile test pozitif olarak değerlendirildi.

Fermentasyon besiyeri (%1 Bacto peptone, %0.1 beef extract, %0.5 sodium chloride ve %0.015 bromocresol purple) distile suda çözülür ve pH 6.8'e ayarlandıktan sonra otoklavda steril edilerek hazırlandı (82).

3.2.4.4. Eskulin Hidrolizi

Eskulin UV ışığı altında floresan veren bir glikozittir. Bir gecelik laktobasil kültürü, 3 ml eskulinli besiyerine 1/15 oranında inoküle edildikten sonra 24-48 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. UV altında floresan vermeyen örnekler, eskulin hidroliz testi pozitif olarak değerlendirildi.

Eskulinli sıvı besiyeri; %1 heart infusion broth distile su ile 80°C'ye kadar ısıtılarak çözülürken sonra süzgeç kağıdından süzülür, içine %1 bacto peptone, %0.5 sodium chloride, %0.1 esculine ilave edilerek hazırlandı. Otoklavda steril edildikten sonra kullanıldı (83).

3.2.4.5. H₂O₂ Üretimi

Laktobasillerin bir gecelik kültürlerinden, TMB besiyerine yoğun çizgi ekimleri yapıp üç gün 37°C'de anaerobik ortamda inkübe edildi.

İnkübasyondan çıkarıldıktan ve atmosferik havada 15 dak bekletildikten sonra H_2O_2 üreten kolonilerin mavi renk oluşturması ile test pozitif olarak değerlendirildi (14, 84).

TMB besiyeri; %2.6 Brucella broth, %1.5 agar ve %1 nişasta distile suda çözüldükten sonra otoklavda steril edildi. Besiyeri $80^{\circ}C$ 'ye soğutulduktan sonra %0.001 horseradish peroxidase, %0.025 TMB (stok solusyon; 0.25 g TMB, 0.35 ml %25 lik HCl ve 50 ml distile suda çözüldü ve filtre sterilizasyonu yapıldıktan sonra renkli şişede saklandı), %0.5 hemin ve %0.1 vitamin K1 ilave edilerek steril petri plaklarına döküldü.

3.2.5. Laktobasillerde Bakteriyofaj ve Bakteriyosinlerin Araştırılması

Laktobasillerin bakteriyofaj veya bakteriyosin içerikleri, bu suşların indüklenmesi ve bakteriyofaj/bakteriyosin idetifikasyon testleri ile belirlendi.

3.2.5.1. Bakteriyofaj ve Bakteriyosinlerin İndüklenmesi

Laktobasil suşlarının bakteriyofaj bulundurmaları ve bakteriyosin üretmeleri mitomisin C ile indüklenerek test edildi (41, 42). Laktobasillerin 24 saatlik kültüründen subkültür yapılarak bir gecelik taze kültür elde edildi. Sabah taze kültürden, 10 mM $CaCl_2$ içeren MRS sıvı (MRS-C) besiyeri içine 1/100 oranında subkültür yapıldı. Yaklaşık 2 saat ($OD_{600} \text{ nm} = 0.2$) inkübasyondan sonra, son konsantrasyon $0.2 \mu\text{g/ml}$ olacak şekilde mitomisin C ilave edildi ve yaklaşık 5-8 saat inkübasyona tabi tutuldu. Mitomisin C ile indüklenmiş kültürler inkübasyon süresince gözlemlenerek bulanık kültürlerin profaj indüksiyonu ve laktobasillerin liz olması sonucu berraklaşması veya toz gibi çökmesi ile belirlendi. Liz gözlenen veya gözlenmeyen tüm kültürlerden 1 ml ependorf tüplerine alınarak 13000 rpm'de 10 dak santrifüj edildi. Süpernatant, başka bir ependorf tüpe aktarılacak bir damla kloroform ilave edildi. Bu şekilde elde edilen süpernatant (lizat) kullanılacağı süreye kadar $4^{\circ}C$ 'de saklandı (42, 85). Lizatlar, bakteriyofaj ve bakteriyosinlerin belirlenmesi için damla (drop assay) yöntemi ile test edildi.

3.2.5.2. Bakteriyofaj ve Bakteriyosinlere Duyarlı Konakların Saptanması

Laktobasillerde bakteriyofaj taşıyan veya bakteriyosin üreten suşların ve bu suşlara duyarlı olan konakların (indikatör suş) belirlenmesi için, Kılıç ve ark (41)'nın uyguladıkları damla yöntemi (drop assay) uygulandı.

İndikatör olarak kullanılan laktobasillerin bir gecelik kültürlerinden, 10 mM CaCl₂ ve 100 mM glisin bulunan MRS sıvı (MRS-CG) besiyerine 1/10 oranında subkültür yapıldı. Subkültürler, erken midlog gelişme fazında iken (yaklaşık 4-6 saat) 200 µl alınarak ayrı bir steril tüpe aktarıldı. Yumuşak MRS-GC agar besiyeri hazırlanarak su banyosunda 47°C'ye soğutuldu. Hazırlanan bu besiyeri su banyosunda bekletilen kapaklı tüplere 3'er ml dağıtıldıktan sonra 200 µl'lik indikatör laktobasil subkültürü ile karıştırıldı ve MRS agar petri plağı yüzeyine ikinci bir tabaka olarak döküldü. Yumuşak agar donduktan sonra petri plaklarının alt kapağına agar yüzeyine damlatılacak olan lizatların belirlenebilmesi için karelere bölünmüş ve numaralanmış şeffaf kağıtlar yapıştırıldı. Yumuşak agar yüzeyinin kuruması için petri plağının üst kapağı yarım açık olacak şekilde 37°C'de 30 dak bekletildi. Her bir karenin ortasına önceden hazırlanmış lizatlardan 3 µl damlatıldı. Damla yapılan petri plakları, lizatın agara iyice nüfuz etmesi için 15-20 dak hareket ettirilmeden oda sıcaklığında bekletildi. Petri plakları, dikkatlice mumlu kavanoza yerleştirildi ve 24-48 saat 37°C'de inkübe edildi. Lizat damlatılan alanlarda indikatör bakterinin üremediği bir inhibisyon zonunun oluşması bakteriyofaj/bakteriyosin veya antibakteriyel aktivite varlığı olarak belirlendi (85). Tek plak oluşturan lizatlar bakteriyofaj pozitif olarak değerlendirildi. Damlatma yapılan bölgede bulanık, berrak, diffüz, halka veya yüzük şeklinde inhibisyon zonları oluşturan lizatlar kaydedilerek, bakteriyofaj veya bakteriyosin içeriği yönünden araştırmak amacı ile diğer testlere tabi tutuldu.

3.2.6. Bakteriyofaj ve Bakteriyosinlerin Ayırımı

3.2.6.1. Lizat Dilüsyon Yöntemi

Damla yöntemi ile indikatör hücre üzerinde inhibisyon oluşturan lizatlarda,

yoğun bakteriyofaj bulunmasından dolayı tek plak gözlenemeyen, veya antibakteriyel etkenden dolayı oluşan inhibisyon zonlarının birbirinden ayrılması için, lizatların seri dilüsyonları ile damla yöntemi tekrarlandı. Dilüe edilmiş lizatlarda inhibitör etkenin tek plak oluşturması ile bakteriyofajlar antibakteriyel aktivite/bakteriyosinlerden ayrıldı. Damla yönteminde, inhibisyon zonu belirlenen lizatların MRS sıvı besiyerinde 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} şeklinde seri dilüsyonları yapıldıktan sonra indikatör kültür üzerine damlatıldı. Dilüsyonlarda inhibisyon zonu oluşturan veya 0.5-2 mm çapında tet tek açılma şeklinde plak (single plaque) oluşturan lizatlar potansiyel bakteriyofaj olarak değerlendirildi. Bakteriyofaj plağı oluşturmayan, açık veya bulanık zonlar oluşturan ve artan dilüsyonlarda zon gözlenmeyen lizatlar antibakteriyel aktivite olarak değerlendirildi (56).

3.2.6.2. Sıcaklık Duyarlılık Testi

Laktobasil lizatında bulunan inhibitör etkenin sıcaklığa direnci damla yöntemi ile test edildi (41). İnhibisyon oluşturan lizatlardan 100 μ l 6 steril endorf tüpe dağıtıldı. Lizatlardan beşi 60°C, 70°C, 80°C, 90°C ve 100°C'de 10 dak tutulduktan sonra duyarlı konaklar üzerine damlatıldı. Kontrol olarak sıcaklığa maruz bırakılmamış lizat kullanıldı. Sıcaklığa dirençli lizatlarda bakteriyosin, duyarlı olanlarda ise bakteriyofaj veya sıcaklığa duyarlı bakteriyosinler bulunduğu düşünülerek diğer ayrıntı testler yapıldı.

3.2.6.3. Duyarlı Konak Enfeksiyonu

Damla yönteminde duyarlı konağı inhibe ettiği tespit edilen lizatlarda antibakteriyel aktivite nedeninin bakteriyofaj olduğunun belirlenmesinde duyarlı konak enfeksiyon yöntemi uygulandı.

Duyarlı konağın bir gecelik kültüründen 100 μ l alındı ve 10 ml MRS-CG besiyerine 1/100 oranında subkültür yapıldı. Midlog fazındaki kültürden 1 ml'si kapaklı steril tüpe aktarıldı ve bu kültüre bakteriyofaj içerdiği düşünülen lizatın değişik dilüsyonlarından 100 μ l karıştırıldı. Bakteriyofajın konak hücreye adsorpsiyonu için 37°C'de 45 dak inkübe edildi. Enfekte hücreler, önceden

hazırlanmış ve 47°C’de bekletilen 3 ml yumuşak MRS-CG agar besiyeri ile düşük hızda vortekslenerek karıştırıldı. Karışım 37°C’de bekletilerek yüzeyi kurutulup ısıtılan MRS agar petri plaklarına döküldükten sonra inkübe edildi. İnkübasyondan sonra indikatör hücrenin üremesi ile kaplanan agar yüzeyinde küçük liz alanların gözlenmesi (bakteriyofaj plağı) ile antibakteriyel etkinin bakteriyofaja ait olduğu tespit edildi (42).

3.2.7. Bakteriyofajların Karakterizasyonu

3.2.7.1. Bakteriyofaj Stoklarının Hazırlanması

Enfeksiyon yöntemi ile tek plak oluşturan bakteriyofajların bulundukları konaklar mitomisin C ile indüklenerek geniş hacimde lizatlar hazırlandı (86, 87). Bakteriyofaj belirlenen laktobasil suşlarının bir gecelik kültüründen 1 ml alınarak 37°C’de ısıtılmış 100 ml MRS-CG sıvı besiyerinde (pH 5.5) subkültürleri yapıldı. Subkültürler, erken midlog üreme fazına ulaştığında, mitomisin C ilave edilerek 8-10 saat inkübe edildi. Kültürlerin inkübasyonu süresince hücrelerin bakteriyofaj indüksiyonu sonucu liz olmaları izlendi.

Bol miktarda bakteriyofaj üretmek amacı ile, indüklenme yöntemine ilave olarak bazı bakteriyofajlar için enfeksiyon yöntemi kullanıldı. Bu amaçla, duyarlı konağın 100 ml MRS-CG besiyerindeki erken midlog fazdaki kültürü 1 bakteriyofaj/10 duyarlı bakteri hücresi [(moi=multiplicity of infection)=0.1] olacak şekilde bakteriyofaj ile enfekte edildi ve 8-10 saat inkübasyona tabi tutuldu.

Hem mitomisin C indüksiyonu hem de enfeksiyon yöntemi ile elde edilen bakteriyofaj lizatlarına 2 damla kloroform ilave edilerek indüklenmeleri durduruldu ve kültürler 50 ml kapasiteli santrifüj tüplerine aktararak 4°C’de, 10000 rpm hızda 10 dak santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir şişeye aktarıldı ve 10 mM MgSO₄ ve 0.1 µg/ml DNase I ve RNase ilave edilerek bakteri DNA ve RNA’sının parçalanması için 37°C’de 30 dak inkübasyona bırakıldı. Süpernatantdaki protein ve hücre DNA’sını çöktürmek amacı ile son konsantrasyonu 1 M olacak şekilde NaCl ilave edildi ve yavaşça alt üst edilerek karıştırıldı. Buz üzerinde 1 saat bekletildikten sonra tekrar 10000 rpm’de 10 dak santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir şişeye aktarıldı ve bakteriyofaj

partiküllerinin çökmesi için son konsantrasyon %10 olacak şekilde polietilen glikol (PEG 800) ilave edildi. Yavaşca alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra buz üzerinde en az 1 saat bekletildi. Bakteriyofaj partikülleri 15000 rpm'de 10 dak santrifüj edilerek çöktürüldü. Pellet korunarak süpernatant döküldü ve santrifüj tüpleri ters tutularak sıvının iyice süzülmesi sağlandı. Santrifüj ile çöktürülen bakteriyofaj partiküllerinin 1 ml süspansiyon tamponu (SM) [, %0.58 NaCl, %0.02 MgSO₄.7H₂O, 50 mM Trizma HCl (pH 7.5), %0.01 jelatin] içinde bir gece 4 °C'de bekletilerek çözülmesi sağlandıktan sonra steril ependorf tüplerine aktarıldı ve buzdolabında saklandı.

Bakteriyofaj stoğu, titrasyonu yapıldıktan sonra drop assay, EM inceleme ve DNA izolasyonunda kullanıldı.

3.2.7.2. Bakteriyofaj Titrasyonu

Bakteriyofaj titrasyonu stok lizat içindeki bakteriyofaj sayısının belirlenmesi için yapıldı. Bakteriyofaj lizatların seri dilüsyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) SM ile yapıldı (88). SM içindeki bakteriyofaj dilüsyonlarından 100 μ l alınarak 4-6 saatlik duyarlı laktobasil kültürleri enfekte edildi. Yumuşak agar içinde oluşan bakteriyofaj plakları sayılarak mililitredeki bakteriyofaj partikül sayısı [plaque forming unit/ml (pfu/ml) = Agar besiyerindeki plak sayısı / ekilen miktar x dilüsyon miktarı] belirlendi (42, 56). Bakteriyofaj sayısı (titresi) 10^8 den fazla olan lizatlar EM'de incelendi ve DNA izolasyonunda kullanıldı.

3.2.7.3. Bakteriyofajların Elektron Mikroskopik İncelenmesi

PEG ile izole edilen bakteriyofajlar 0.1 M amonyum asetat içinde süspanse edildi ve karbon kaplı formvar film (grid) levhaya yerleştirilip kurutuldu. Levha %2 uranil asetat ile (pH 4.2) negatif boyandı ve EM'de 100000-150000 büyütmede bakteriyofajlar gözlenerek fotoğrafları çekildi (89).

3.2.8. Bakteriyofajların Litik Enfeksiyon Siklusu

Bir bakteriyofajın duyarlı bir konak içinde geçirdiği bir jenerasyonluk yaşam siklusu ve bu siklus sonucu meydana gelen bakteriyofaj sayısı (single-step

growth curve and burst size) bakteriyofaj enfeksiyonu yöntemi ile $moi = 0.1$ olacak şekilde gerçekleştirildi (42, 56). Enfeksiyonun başlangıcını takip eden 30 dak adsorpsiyon süresinin sonu sıfırıncı dakika kabul edilerek her 15 dak'da bir olmak üzere toplam 180 dak kültürlerden 100 μ l örnek alındı, dilüsyonları yapıldıktan sonra, iki ayrı agar besiyerine ekildi. Her petri plağındaki bakteriyofaj plakları sayılarak pfu/ml'leri belirlendi. Sonuçlar bir grafik üzerine, x eksenini zaman, y eksenini bakteriyofaj sayısı olacak şekilde yerleştirilerek bakteriyofajların latent ve çoğalma periyotlarını gösteren bir aşamalı gelişme eğrileri belirlendi. İndikatör bakteri kültürünün mililitresindeki bakteri sayısı (colony forming unite=cfu/ml) ve bu bakterilerin bakteriyofaj tarafından enfekte edilmesi sonucu oluşan bakteriyofaj plakları (pfu/ml) sayılarak, bir indikatör bakteriden oluşan bakteriyofaj sayısı hesaplandı. Bunun için; bir enfeksiyon siklusu sonucu oluşan bakteriyofaj sayısı (burst size) indikatör sayısına bölündü.

3.2.9. Spontan Bakteriyofaj İndüksiyonu

Spontan indüksiyon deneyi, kültür içinde bakteriyofajın herhangi bir ajanla indüklenmeden, kendiliğinden salınan bakteriyofaj sayısının belirlenmesi amacı ile yapıldı. Profaj bulunduran lizojenik laktobasillerin bir gecelik kültürlerinden, MRS sıvı besiyerinde 1/100 oranında subkültürleri yapıldı. Kültürlerden; 2, 3, 4, 5, 6 ve 8. saatlerde 1 ml alınarak 10000 rpm de 10 dak santrifüj edildi ve lizatlar hazırlandı. Ayrıca, kültür içindeki laktobasillerin sayısının belirlenmesi için lizat hazırlanırken konak hücrenin cfu/ml'leri agar-ekim yöntemi ile belirlendi. Bakteriyofajın spontan indüklenmesi ve indüklenen bakteriyofaj sayısının belirlenmesi için; lizatın seri dilüsyonları yapılarak damla yöntemi ve enfeksiyon deneyi yapıldı. Spontan indüklenmenin olup olmadığı ve spontan pfu/ml ile cfu/ml sayıları karşılaştırılarak spontan indüklenme oranı belirlendi.

3.2.10. Bakteriyofaj DNA İzolasyonu

PEG ile yoğunlaştırılarak elde edilen bakteriyofaj lizatlarından bir kısmı bakteriyofaj DNA izolasyonunda kullanıldı (86, 87). Bu amaçla bakteriyofaj

lizatından 500 μ l ayrı bir ependorf tüpüne aktarıldı ve birebir oranında fenol ilave edildi. Ependorf tüpü 5 dak yavaşça karıştırılarak bakteriyofaj kılıfının parçalanması sağlandı. Daha sonra 10000 rpm de 5 dak santrifüj edildi ve oluşan üst faz temiz bir ependorf tüpüne aktarıldı. Bu faz içindeki fenolu uzaklaştırmak için bire bir oranında kloroform-izoamilalkol (24:1) ilave edildi ve yavaşça alt üst edildikten sonra 5 dak oda ısısında bırakıldı, 10000 rpm de 5 dak santrifüj edildi ve üst faz ayrı bir ependorf tüpüne aktarıldı. Bu işlem iki kez tekrar edildi. Süpernatant üzerine iki hacim %95 etanol ilave edilerek en az 1 saat -20°C'de bekletilerek bakteriyofaj DNA'sının presipite olması sağlandı ve 10 dak santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü. Ependorf tüpüne bir hacim %70'lik etanol ilave edildi ve 2 dak santrifüj edildikten sonra döküldü, DNA 65°C'de 10 dak kurutuldu ve TE tamponunda [10 mM Trizma-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA (pH8.0) saf suda hazırlanarak otoklavda steril edildi] çözüldü. Bakteriyofaj DNA'sının TE içinde çözünmesi amacı ile bir gece 4°C'de bekletildikten sonra, DNA'nın saflığı ve konsantrasyonun tespit edilmesi amacı ile 5 μ l DNA solüsyonu %0.8 agaroz jelde, 60 voltta 1 saat yürütüldü ve jel etidiyum bromür (0.1 μ g/ml) ile boyandıktan sonra UVT'de incelendi. Kalan örnekler kullanılacağı süreye kadar -20°C'de saklandı.

3.2.10.1. Bakteriyofaj DNA'larının Restriksiyon Enzim Analizleri

İzole edilen bakteriyofajların genom büyüklüklerini belirlemek amacı ile restriksiyon enzim analizleri yapıldı. Bakteriyofaj DNA'ları, *EcoRI*, *PstI* ve *SalI* restriksiyon enzimlerinin bir ünitesi ile bakteriyofaj DNA'nın 1 μ g toplam 10 μ l hacim içinde kesildi. Bu amaçla enzim, enzime spesifik tampon ve bakteriyofaj DNA karışımı (1 μ l Enzim, 1 μ l enzime spesifik 10x tampon ve 8 μ l bakteriyofaj DNA) buz üzerinde hazırlandı ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Kesilen DNA solüsyonuna 2 μ l yükleme tamponu [%20 ficoll 400, 0.1 M Na₂EDTA (pH 8.0), %0.25 bromophenol blue, %0.25 xylene cyanole] ilave edilerek 10000 rpm de 5 sn santrifüj edildi ve 10 dak 65°C'de bekletilerek enzim inaktive edildi, tekrar 5 sn santrifüj edilerek örneğin tüpün dipinde toplanması sağlandı ve %0.8'lik agaroz jelle yüklenerek elektroforeze tabi tutuldu.

Restriksiyon enzimleri ile kesilen bakteriyofaj DNA fragmanlarının

büyükliklerini hesaplamak için; çekilen jel fotoğrafları büyütüldü. Fotoğrafta, her bir bakteriyofaja ait DNA fragmanlarının ve moleküler ağırlık standart'ı bir cetvel yardımı ile ölçülerek semi-logaritmik grafik kağıdının x eksenine, DNA fragman büyüklükleri kilobaz çifti (kb) olarak y eksenine yerleştirilerek standart bir grafik elde edildi. Bu grafik yardımı ile bakteriyofaj genomunun restriksiyon enzimler ile kesilerek elde edilen fragmanlarının büyüklükleri hesaplandı. Bir bakteriyofajın genom büyüklüğü restriksiyon fragmanlarının büyüklüklerinin aritmetik toplamı ile kb olarak hesaplandı.

3.2.11. DNA-DNA Hibridizasyonu

3.2.11.1. Southern Hibridizasyon

Southern hibridizasyon, 1975 yılında Southern tarafından geliştirilen, teşhis materyalinde bulunan mikroorganizmaların, izole ve pürifiye edilmiş DNA'larındaki spesifik sekansları, işaretli proplar (RNA veya DNA) yardımıyla ortaya konmasına dayalı bir tekniktir (90, 91). Restriksiyon enzim analizi ile kesilen bakteriyofaj DNA'ları yine biyotin ile işaretlenmiş (BioNick™ Labeling System, GIBCO BRL, USA) fakat kesilmemiş bakteriyofaj propları ile hibridizasyona tabi tutuldu ve izole edilen bakteriyofajların genom düzeyinde birbirlerine olan benzerlikleri belirlendi.

a. Membrana Bağlı Denatüre DNA'nın Hazırlanması: Restriksiyon enzimleri ile kesilen bakteriyofaj DNA'ları, %0.8'lik agaroz jelde elektroforez edildikten ve boyanıp su ile yıkandıktan sonra 200 ml 0.25 N HCl içinde 15 dak yavaşça çalkalayarak DNA'nın depürinizasyonu sağlandı. Jel iki defa distile su ile yıkandı. DNA'nın denatürasyonu için, jelin üzerini kaplayacak kadar 0.5 N NaOH ilave edildi ve 30 dak yavaşça çalkalamaya bırakıldı. Jelin boyutlarında kesilen naylon hibridizasyon membranı kesilerek 2x SSC [20x SSC: 3 M NaCl, 0.3 M sodyum sitrat, 1 M HCl (pH 7.0)] içinde ıslatıldı. Naylon membran boyutlarında filtre kağıtları kesildi ve 10x SSC ile ıslatıldı. Jelin membrana transferini sağlamak için hazırlanan bir süngerin üzerine sırası ile, filtre kağıdı, jel, naylon membran, filtre kağıtları ve ağırlık yerleştirilerek 10x SSC varlığında bir gece DNA'nın naylon membrana transferi (blot) gerçekleştirildi. Gerekliğinde ıslanan filtre kağıtları kuru olanlar ile değiştirildi, azalan 10x SSC

süngerin yarı yüksekliğini geçmeyecek kadar yerine kondu. Blot işlemi sonunda, membran alınarak, 2x SSC içinde 5 dak yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurutma kağıtları arasında en az 30 dak kurutuldu.

b. Prehibridizasyon ve Hibridizasyon: Agaroz jelden DNA aktarılmış ve kurutulmuş naylon membran 3 dak UV ışığına maruz bırakılarak DNA'nın membrana iyice bağlanması (cross-link) sağlandı. Membran temiz naylon poşet içine yerleştirildikten sonra membran boyutlarından 1 cm büyük olacak şekilde kenarlardan kapatıldı. Poşet ucundan kesilerek içine, bir ısıtıcı yardımı ile 10 dak kaynatılıp buz içinde hızlıca soğutulmuş 10 ml prehibridizasyon solüsyonu ilave edildi, hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı ve prehibridizasyon solüsyonunun homojen dağılımı sağlandı. Poşet, 42°C su banyosunda 6 saat 80 rpm şiddetinde çalkalamaya bırakılarak membranın transfer edilen DNA dışında kalan kısımların (background), prehibridizasyon solüsyonunda bulunan nonspesifik DNA ile kaplanması sağlandı.

Prehibridizasyon solüsyonu; %50 formamide, %5 SSC, 5x Denhardt's solüsyonu, 25 mM sodyum fosfat (pH 6.5), 0.5 mg/ml ısıtılarak denatüre edilmiş herring sperm DNA, %5 dekstran sülfat, %0.5 SDS solüsyonları steril deiyonize su ile 100 ml ye tamamlanarak hazırlandı ve 7 ml hacimlerde tüplere bölüştürülerek -20°C'de kullanılacağı süreye kadar saklandı. Denhardt's Solüsyonu (50x); %1 Ficoll, %1 polyvinylpyrrolidone, %1 BSA ve steril deiyonize su ile hazırlandı.

Prehibridizasyon işlemi tamamlandıktan sonra hibridizasyon solüsyonuna 20 µl biyotin ile işaretli bakteriyofaj DNA probu ilave edilerek 10 dak kaynatıldı ve hemen buz içinde alınarak 2-3 dak karıştırılarak denatüre olmuş DNA zincirlerinin tekrar renatüre olmaları engellendi. Prehibridizasyon solüsyonu, poşetin ucundan biraz kesilerek boşaltıldı ve içine hibridizasyon solüsyonu ilave edilerek 42°C'de bir gece su banyosunda inkübasyona bırakıldı.

Hibridizasyon solüsyonu; %45 formamide, %5 SSC, 1x Denhardt's solüsyonu, 20 mM sodyum fosfat (pH 6.5), 0.2 mg/ml taze denatüre edilmiş herring sperm DNA, %5 dextran sülfat ve %0.5 SDS 'in steril deiyonize su ile 100 ml ye tamamlanması ile hazırlandı ve 7 ml hacimlerde steril tüplere dağıtılarak -20°C'de kullanılacağı süreye kadar saklandı.

c. Yıkama İşlemi: Hibridizasyondan sonra membran poşetten çıkartılarak yıkama işlemine tabi tutuldu. Bunun için; 100 ml solüsyon A (2x SSC, %0.1 SDS)

ile oda ısısında 3 dak iki defa yıkandı. Aynı işlem solüsyon B (0.2x SSC, %0.1 SDS) ile iki kez tekrar edildi. Daha sonra membran 65°C'de solüsyon C (0.6x SSC, %0.1 SDS) ile 15 dak 65°C'de inkübe edildi ve membran 100 ml 2x SSC ile 2-3 dak stabilize edildi.

d. Tespit ve Görüntüleme işlemleri: Prob ile hibridize olmuş DNA'nın membrana tespiti için membran sırasıile tampon 1 [0.1 M TrisHCl (pH 7.5), 0.15 M NaCl] içinde 1-2 dak bekletildikten sonra döküldü, tampon 2 (tampon 1 içinde %3 BSA hazırlandı ve -20°C'de kullanılacağı süreye kadar saklandı) ilave edilerek 10 dak çalkalayıcıda çalkalanarak tampon 2 içinde bulunan BSA ile membranın kaplanması sağlandı. Tampon 2 döküldükten sonra 7 ml 1/1000 oranında dilüe edilmiş ve üretici firmadan sağlanan konjugat ile membran 10 dak yıkandı. Membran, tampon 1 içinde 2 kez 15 dak ve daha sonra tampon 3 [0.1 M Tris HCl (pH 9.5), 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂] içinde 10 dak çalkalayıcıda çok yavaş çalkalanarak yıkandı. Renkli şişede taze olarak hazırlanan boya solüsyonu (7.5 ml tampon 3 içine 33 µl BCIP ve 25 µl NBT) membrana ilave edildi ve renk oluşana kadar (1/2-4 saat) karanlıkta bekletildi. Son olarak membranın boyanma işlemini, tampon 4 [20 mM Tris HCl (pH 7.5), 0.5 mM EDTA] ilave edilerek durduruldu, membran kurutularak görüntülendi.

3.2.11.2 Dot Blot Hibridizasyonu

Mitomisin C ile indüklenmeyen laktobasil bakteriyofajların belirlenmesi ve farklı morfolojiye sahip bakteriyofaj grupları arasındaki benzerliklerin tespit edilmesi için; Southern hibridizasyonda kullanılan bakteriyofaj DNA problemleri kullanılarak dot blot hibridizasyonu yapıldı (91).

Laktobasillere ait kromozomal DNA'lar ve saflaştırılmış bakteriyofaj DNA'ları membran üzerine 3 µl (yaklaşık 0.1 µg) damlatıldı. Membran oda sıcaklığında kurutulduktan sonra denatürasyon solüsyonu (0.5 M NaOH, 1 M NaCl) ile ıslatılmış filtre kağıtları üzerine yerleştirildi ve 5 dak bekletilerek membran üzerinde nükleik asitlerin denatürasyonu sağlandı. Membran, 0.5 M Tris HCl (pH 7.5) içinde ıslatılmış filtre kağıdı üzerine aktarıldı ve 30 sn bekletilerek tamponlandı. Daha sonra nötralizasyon solüsyonu [1 M Tris HCl (pH 7.5), 1.5 M NaCl] ile ıslatılmış olan filtre kağıtları üzerine aktararak 5 dak bekletildi ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Membran tamamen kurutulduktan sonra UVT'de 3 dak

bekletilerek DNA'nın membran üzerine fiksasyonu sağlandı. Bu aşamadan sonra Southern hibridizasyonda takip edilen yöntem ile prehibridizasyon, hibridizasyon ve görüntüleme işlemleri gerçekleştirildi. Membran boyandıktan sonra koyu bir rengin oluşması, kullanılan prob DNA ile test edilen DNA arasındaki homolojinin varlığını gösterdi.

3.2.12. Laktobasillerden Kromozomal DNA İzolasyonu

Laktobasillerden kromozomal DNA izolasyonunda, Lewington ve ark (92) ve Klaenhammer (93)'ün tarif ettikleri protokoller modifiye edilerek kullanıldı.

Bir gecelik laktobasil kültürlerinden 10 ml steril tüplere alındı, 5000 rpm de 10 dak santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Pelet, 500 μ l taze MRS ile çözüldükten sonra üzerine 9.5 ml MRS ve %3 glisin ilave edildi ve 2 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Hücreler 5000 rpm de 10 dak santrifüj edilerek çöktürüldü ve 1 ml soğuk STE ile [%25 sükröz, 50 mM Tris HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA (pH 8.0)] iki kez yıkandıktan sonra aynı çözeltinin 1 ml'si içinde çözülerek buz üzerinde 10 dak bekletildi, 5 mg/ml lizozim ilave edilerek 37°C'de 30 dak inkübe edildi. Lizozim ile muamele edilen hücreler 12500 rpm de 45 sn çöktürüldü ve süpernatant döküldü. Pelet vorteks ile karıştırıldı, üzerine 500 μ l liz solusyonu [5 mM Tris HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA (pH 8.0), 50 mM glukoz, %3 SDS) ilave edildi ve yavaşca alt üst edilerek karıştırıldı. Aynı karışıma 50 μ l 1 N NaOH, 5 μ l proteinaz K (5 mg/ml) ve 10 μ l RNase (10 mg/ml) ilave edildikten sonra 65°C'de bir gece inkübe edildi. Karışım 10 dak oda sıcaklığında soğuması için bekletildikten sonra, üzerine 50 μ l 2 M Tris HCl (pH 7.0) ve 70 μ l 5 M NaCl ilave edildi. Hücre lizatu 500 μ l %3 NaCl ile satüre edilmiş fenol ve 300 μ l kloroform ilave edilerek 5 dak çok yavaşca karıştırılarak proteinler ekstrakt edildikten sonra 10000 rpm de 10 dak çöktürüldü. Üst kısım steril bir ependorf tüpe alındı ve 600 μ l kloroform-izoamilalkol ile 5 dak ekstrakte edilerek 10000 rpm'de 5 dak santrifüj edildi. Üst faz steril bir ependorf tüpe alındı ve DNA iki hacim %95 etanol ile presipite edildi, %70'lik etanol ile yıkandı ve pelet 65°C'de kurutulduktan sonra 200 μ l TE içinde çözüldü.

3.2.13. AP-PCR

L. gasseri Φadh bakteriyofajının lizin genine spesifik primerler (Lys F: 5'-CTA ATA CGA CGG CAA TTC TAG-3'; Lys R: 5'- CCC CGT CCA TTG ATG GGA AAT-3') kullanılarak gerçekleştirildi (94). Buz üzerinde hazırlanan PCR reaksiyonu toplam 50 µl hacimde ve her bir primerden 10 picomol, 1x reaksiyon tamponu, her bir deoksiniükleotit tri fosfat (dNTP: dATP, dGTP, dTTP, dCTP)'dan 0.2 mM, 1.5 µM MgCl₂ ve 1 U Taq DNA polimeraz ve kalıp DNA ile gerçekleştirildi. Amplifikasyon 30 siklus olarak başlangıçtaki 94°C'de 3 dak denatürasyondan sonra, 94°C'de 30 sn, 32°C'de 1 dak ve 72°C'de 2 dak olarak yapıldı. Tamamlanamayan zincirlerin tamamlanması için amplifikasyon sonrası 72°C'de 10 dak inkübe edildi. AP-PCR ürünlerinden 20 µl alınarak %2 agaroz jelde, 60 voltta 1 saat yürütüldü ve UVT altında polaroid kamera ile görüntülendi.

3.2.14. Laktobasillerin Total Hücre Proteinlerinin Analizi

Laktobasillerin total hücre protein profillerinin belirlenmesi amacı ile sodyum dodesil sulfat poliakril amid jel elektroforezi (SDS-PAGE) esas olarak Laemmli'nin (95) tanımladığı şekilde yapıldı.

Laktobasillerin MRS sıvı besiyeri içindeki bir gecelik taze kültürlerinden 6 ml 7000 rpm'de çöktürüldü. Pelet üç kez 1 ml TE (pH 7.0) tamponu içinde yıkandı. Pelet 500 µl STET tamponu [%8 sukroz, %5 triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris HCl (pH 7.0)] içinde çözüldü ve 10 mg/ml lizozim ilave edildikçe 37°C'de 40 dak inkübe edildi. Viskozite ile bakterilerin liz olduğu gözlemlendikten sonra 10000 rpm'de 30 sn hücreler çöktürüldü. Pelet üzerine hacmi kadar 2x sample tamponu [% 4 SDS, % 20 glycerol, % 10 2-mercaptoethanol, 125 mM Tris (pH 6.8) ve % 0.5 bromphenol blue] ilave edildi ve karıştırıldı. Örneğin üzeri, birkaç damla mineral oil ile kaplandı ve 5 dak kaynatıldı, 10000 rpm de 3 dak santrifüj edildikten sonra üst kısımdan 30 µl miktarlara bölünüp SDS-PAGE uygulanmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

Total hücre proteinlerinin analizi için % 10'luk ayırma jeli (15.9 ml deiyonize su, 13.3 ml acryl:Bisacryl (29:1), 10 ml Tris-HCl (pH 8.8), 0.4 ml % 10 luk SDS, 0.4 ml % 10 luk ammonium persulfate (APS) ve 0.016 ml TEMED ile hazırlandı.)

hazırlandı ve 1.5 mm spacer kullanılarak hazırlanan cam plakalar arasına dökülerek üst kısma 2-3 mm kadar butanol ilave edildi. Yıgma jelinin (9.825 ml deiyonize su, 1.875 ml Tris HCl (pH 6.8), 3 ml acrylamide- bisacrylamide, 0.15 ml % 10'luk SDS, 0.075 ml % 10'luk APS, 0.015 ml TEMED ile hazırlandı.) üst kısmındaki butanol dökülerek deiyonize su ile bir kaç defa yıkandı ve kurutma kağıtları ile kurulandı. Polimerizasyon için 30 dak oda ısısında bekletildi ve üzerine % 5'lik yıgma jeli ilave edildi. Taraklardan 1.5 mm kalınlığındaki ve 20 kuyucuklu olanı jelin üst kısmına yerleştirildi. Jel polimerize olduktan sonra tarak çıkarılarak kuyucuklar elektroforez tamponu ile yıkandı ve 1x elektroforez tamponu (10x Elektroforez tamponu; 0.25 M Trisma base, 1.192 M glycine, % 1 SDS olacak şekilde hazırlandı ve pH 8.3'e) ile örnekleri yüklemek için hazır hale getirildi.

Hazırlanmış total hücre protein örnekleri -20°C'den alınarak 3 dak kaynatıldı ve 10000 rpm de 2 dak santrifüj edildikten sonra üst kısımdan 20 µl kuyucuklara yüklendi. Proteinler, yıgma jelini geçene kadar 90 V, daha sonra ise 180 V doğru akım altında elektroforeze tabi tutuldu. İşaret boyası jelin alt kısmına geldiğinde akım durdurularak jel çıkarıldı ve coomassie brilliant blue R-250 boyası (% 45 deiyonize su, % 45 methanol, % 10 glacial asetik asit ve % 0.25 coomassie brilliant blue R- 250) ile bir gece yavaşça çalkalanarak boyandı. Bu işlemten sonra boya giderme solüsyonuna (suda % 7.5 glacial acetic acid ve %20 methanol) alındı ve fotoğrafı çekildi.

3.2.15. Bakteriyosin Varlığının Belirlenmesi

Damla yöntemi ile diğer laktobasilleri inhibe eden fakat bakteriyofaj belirlenemeyen laktobasil suşları bakteriyosin üretimi açısından agar kuyucuk yöntemi ile test edildi. Bakteriyosinlerin, H₂O₂'den ayırmak için katalaz enzimine duyarlılık, asit etkisinden ayırımı için nötral pH'da inhibisyon aktiviteleri test edildi.

3.2.15.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi

Bakteriyofaj belirlenemeyen laktobasil suşları bakteriyosin yönünden araştırılmak üzere agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile incelendi (96, 97).

Bakteriyosin varlığını tespit etmek için mitomisin C ile indüklenerek hazırlanan lizatlar kullanıldı.

Laktobasillerin oluşturduğu antimikrobiyal maddelerden etkilenen laktobasil suşlarının (indikatör suşlar) 4-6 saatlik kültürleri hazırlandı ve bu suşlardan 500 μ l alınarak 47°C'de bekletilen Rogosa SL agar besiyerinin 20 ml'si ile karıştırıldıktan sonra steril petri plağına döküldü. Rogosa SL agar donduktan sonra 4 mm çapında steril cam tüp ile en az 3 cm aralık olacak şekilde kuyucuklar açıldı ve bu kuyucuklara bakteriyosin şüpheli laktobasil suşuna ait lizatlardan 100 μ l damlatıldı. Damlatılan lizatın agar içine diffüz olması için 4°C'de 4 saat bekletildikten sonra 37°C'de ve CO₂'li ortamda inkübe edildi. İndikatör suşların kuyucuk etrafında ürememesi veya bir inhibisyon zonunun oluşması, etkenin bakteriyosin, H₂O₂ veya asit olduğu şeklinde değerlendirildi.

Agarda gözlenen inhibisyon zonunun lizattaki asit veya bakteriyosinden mi ileri geldiğini ayırmak için asit nötralizasyonu yapıldı. Bunun için 75 μ l kültür süspansiyonu 25 μ l %10'luk CaCO₃ solüsyonu ile karıştırıldı ve kuyucuklara kondu. CaCO₃ ilave edilmeyen lizatlar kontrol olarak kullanıldı. CaCO₃ ilave edilen lizatların etrafında inhibisyon zonu oluşması ve CaCO₃ bulunmayan kuyucukların etrafında inhibisyonun oluşmamasının nedeninin lizatta bulunan asitten, her iki kuyucuğun etrafında inhibisyon gözlenmiş ise, bu inhibitör ajanın bakteriyosin veya H₂O₂ varlığı nedeni ile olabileceği düşünülerek diğer ayırıcı testler yapıldı.

3.2.15.2. Bakteriyosin Lizatlarının Katalaz Enzimine Duyarlılığı

İndikatör laktobasil suşlarını inhibe eden antimikrobiyal ajan veya ajanların bakteriyosinden mi yoksa H₂O₂'den mi kaynaklandığının belirlenmesi için agar spot metodu ile katalaz inaktivasyon testi uygulandı (98, 99).

Antibakteriyel aktivite gösteren suşların 18 saatlik kültürleri, 10 mM Tris-HCl (pH 7.0)'de 1/10 dilüe edildi. Dilüe kültürün 2 μ l'si (10⁶cfu/ml) 6 kuyucuklu doku kültür pleytlerinde hazırlanan Rogosa SL agar besiyerinin iki ayrı kuyucuğuna damlatıldı ve kuruyana kadar bekletildikten sonra 24 saat inkübe edildi. İndikatör suşların 8 saatlik kültürleri (1/10) alınarak 47°C'de bekletilen Rogosa SL yumuşak agar ile karıştırıldı ve son konsantrasyon 5 mg/ml olacak şekilde katalaz enzimi

ilave edildi. Karışım 24 saat inkübe edilen test suşlarının bulunduğu kuyucuklardan birinin üzerine üreyen kültürü yayılmayacak şekilde döküldü. Kontrol amacı ile diğer kuyucuk üzerine aynı şartlarda hazırlanmış ve katalaz ilave edilmemiş indikatör kültür döküldükten sonra 18-24 saat inkübe edildi ve oluşan inhibisyon zonları incelendi. Katalaz enzimi bulunan kuyucukların etrafında inhibisyon zonu oluşmamışsa etkinin H_2O_2 , inhibisyon zonu oluşmuşsa etkinin bakteriyosine ait olduğuna karar verildi.

Katalaz enziminin (2800 Ü/mg) stok solüsyonu, 50 mg/ml miktarında steril distile su içinde eritildikten sonra filtreden süzülerek hazırlandı. Kullanılacağı süreye kadar $-20^{\circ}C$ 'de saklandı.

H_2O_2 'in edeğişik konsantrasyonlarının (ticari H_2O_2 'in distile suda %1, %2, %3, %4, %5 ve %6'lık) indikatör laktobasillere olan etkisi, test edildi. Bunun için; her bir H_2O_2 dilüsyonundan daha önce izah edildiği şekilde ve miktarda indikatör laktobasil kültürü üzerine damlatılarak test edildi.

Katalaz enzim aktivitesini test etmek için H_2O_2 'nin yukarıda verilen miktarlarına son konsantrasyon 7 Ü/ml katalaz enzimi ilave edilerek $25^{\circ}C$ 'de 35 dak bekletildikten sonra kültürler üzerine damlatıldı. Sonuçta 7 Ü/ml katalaz enziminin maksimum %3 oranında H_2O_2 'i inhibe edebildiği ve dolayısı ile test için kullanılan katalaz enziminin çalışıyor olduğu belirlendi. Bu kontroller, iki farklı indikatör suş üzerinde test edilerek doğrulandı.

3.2.16. Bakteriyosinlerin Karakterizasyonu

İzole edilen laktobasillerde belirlenen bakteriyosinlerin sıcaklık, pH ve proteazlara duyarlılık gibi özellikleri incelendi. Ayrıca, bakteriyosinler dilüe edilerek minimum inhibitör konsantrasyonları belirlenmeye çalışıldı.

3.2.16.1. Bakteriyosinlerin Minimal İnhibisyon Konsantrasyonlarının Saptanması

Bakteriyosin içeren lizatların MRS sıvı besiyerinde 10^{-5} 'e kadar seri dilüsyonları hazırlandı. Dilüsyonlardan duyarlı indikatör laktobasil kültürleri üzerine damlatılarak minimal antibakteriyel etkinin gözlendiği son dilüsyon

tespit edildi.

3.2.16.2. Bakteriyosinlerin Isıya Duyarlılıklarının Saptanması

Bakteriyosin bulunan lizatların her birinden 5 ayrı ependorf tüpe 100'er μ l aktarıldı. Ependorf tüplerinin herbiri 60, 70, 80, 90 ve 99°C'de 10'ar dak tutulduktan sonra duyarlı konaklar üzerine damlatıldı. Duyarlı konak üzerinde inhibisyon zonu oluşturan lizatlardaki bakteriyosinler dirençli, oluşturmayanlar duyarlı olarak belirlendi (100). Isı testinde 99°C'de 10 dak dirençli olan bakteriyosin içeren lizatlar kaynatma testine tabi tutuldu. Bunun için 4 ependorf tüpe 100'er μ l lizat dağıtıldı ve birinci tüp 10, ikinci tüp 20, üçüncü tüp 30 ve dördüncü tüp 60 dak 100°C'de kaynayan su banyosu içinde bekletildi ve duyarlı konak üzerine damlatıldı. İnhibisyona neden olmayan lizatlar içindeki bakteriyosinlerin, belirlenen kaynama derecelerine ve sürelerine duyarlı, inhibisyon zonu oluşturanların ise dirençli oldukları belirlendi. Kontrol olarak aynı şartlarda elde edilen ve ısıya maruz bırakılmayan lizatlar kullanıldı.

3.2.16.3. Bakteriyosinlerin pH'ya Duyarlılıklarının Saptanması

Lizatlarda belirlenen bakteriyosinlerin karakterizasyonu için değişik pH değerlerindeki aktivitelerine bakıldı. Bu amaçla steril 1 N NaOH, 2 N HCl solüsyonları ve pH kağıtları kullanılarak lizatların pH'ları 3.0, 4.5, 7.0 ve 9.0'a ayarlandıktan sonra oda sıcaklığında 4 saat bekletildi. Değişik pH'lardaki lizatlar indikatör suşlar üzerine damlatılarak test edildi. İndikatör suşları inhibe eden lizatlar ve pH değerleri tespit edilerek kaydedildi.

3.2.16.4. Bakteriyosinlerin Proteazlara Duyarlılıklarının Saptanması

Bakteriyosinlerin proteolitik enzimlere duyarlılıklarını test etmek amacı ile proteinaz K, pronaz E ve tripsin'in stok solüsyonları hazırlandı. Bakteriyosin içeren lizatların pH'ları 7.0'ye ayarlandı. Proteolitik enzimlerin son konsantrasyonları 0.1 mg/ml olacak şekilde lizatlara ilave edildi. İşlemlerin tümü buz üzerinde yapıldı. Kontrol olarak pH'ları nötralize edilmiş ve nötralize edilmemiş enzim içermeyen lizatlar kullanıldı. Tüm lizatlar 37°C'de 1

saat inkübe edildi. Lizatların proteolitik enzimlere duyarlılıkları damlatma yöntemi ile test edildi ve inhibisyon aktivitesinin belirlenmesi o enzime karşı bakteriyosinin dirençli olduğu şeklinde değerlendirildi (101).

Tripsinin 0.5 mg/ml stok solüsyonu 0.1 M sodium fosfat tamponu içinde hazırlandı ve son konsantrasyon 0.1 mg/ml olacak şekilde kullanıldı (102).

Proteinaz K, 0.041 M potasyum fosfat tamponu içinde 2 mg/ml stok konsantrasyonda hazırlandı filtreden süzülerek steril edildi.

Pronaz E; potasyum fosfat tamponu (pH 7.5) içinde, 0.5 mg/ml stok konsantrasyonda hazırlandıktan sonra filtreden süzülerek steril edildi.

Tripsin, proteinaz K, pronaz E ve enzimlerin aktivite kontrolleri bovin serum albümin (BSA) ile test edilerek SDS-PAGE analizi ile kontrol edildi.

Deiyonize steril suda hazırlanarak filtre ile steril edilmiş stok BSA'nın 1, 0.5 ve 0.25 mg/ml dilüsyonları hazırlandı (103). Enzimlerin son konsantrasyonları 0.1 mg/ml olacak şekilde total 50 µl BSA solüsyonları ile buz üzerinde karıştırıldı (101). Enzim içeren ve içermeyen BSA solüsyonları ikiye ayrılarak hazırlandı. Aynı komponentleri taşıyan örneklerden biri -20°C'de bekletilirken, diğeri enzim işlevinin belirlenmesi için 37°C'de 60 dak inkübe edildi. Örneklerin tümü SDS-PAGE de yürütülerek BSA'nın parçalanıp parçalanmadığı gözlemlendi ve enzimlerin aktiviteleri kontrol edildi (95).

3.2.16.5. Besiyerleri Kompozisyonunun Spontan Bakteriyosin Üretimine Etkisinin Saptanması

Bir gecelik laktobasil kültürlerinden, 5 ml Rogosa SL, ayrı ayrı ticari bileşenlerin katılması ile hazırlanmış MRS ve ticari MRS sıvı besiyerlerinde 1/10 oranında subkültürleri yapıldı. Kültürlerden 18, 24 ve 48 saat sonunda 1 ml alınarak 10000 rpm'de 10 dak santrifüj edilerek kültür lizatları hazırlandı. Elde edilen tüm lizatların seri dilüsyonları yapıldı, duyarlı konak üzerine damlatma yöntemi ile test edilerek bakteriyosin üretimi için en uygun besiyerinin hangisi olduğu belirlendi.

3.2.16.6. Sodyum Klorürün Bakteriyosin Üretimine Etkisinin Saptanması

Sodyum klorürün değişik konsantrasyonlarının sıvı veya katı ortamlarda bakteriyosin üretimi üzerine olan etkisi araştırıldı.

Bakteriyosin üreten laktobasillerin bir gecelik kültürlerden %1, %2, %3, %4, %5 ile %10 NaCl bulunan MRS sıvı (pH 6.8) besiyerlerine 1/25 oranında subkültürleri yapıldı ve 24-48 saat inkübasyona tabi tutuldu. Bu süre sonunda kontrol lizatlar ile birlikte kültürlerin süpernatantları duyarlı konakların üzerine damlatılarak test edildi.

Test, agarlı besiyerinde tekrar edildi. Bunun için %1, %2, %3 ve %4 NaCl içeren Rogosa SL hazırlandı ve steril 12 kuyucuklu doku kültür pleytlerine kontrol besiyeri ile birlikte döküldü. Bakteriyosin üreten suşların taze kültürlerinden 2×10^3 cfu/2µl alınarak Rogosa SL agar besiyerleri üzerine damlatıldı ve 24 saat CO₂'li ortamda inkübe edildi. Duyarlı konağın 6-8 saatlik kültürü hazırlanarak 45°C'de bekletilen Rogosa SL soft agar içine 1/10 oranında karıştırıldı ve pleytin kuyucuklarına ikinci tabaka olarak döküldü. Hazırlanan pleytler, 24 saat daha inkübasyona tabi tutuldu. Kontrol olarak NaCl içermeyen Rogosa SL agar besiyerinde oluşan zon çapı ile NaCl içeren ortamlardaki oluşan zon çapları bir cetvel yardımı ile ölçülerek karşılaştırıldı ve NaCl'ün bakteriyosin üretimi üzerine etkisi belirlendi.

3.2.17. Bakteriyosinlerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Saptanması

Bakteriyosinlerin, *G. vaginalis* ATCC 14018, *S. aureus* ATCC 25923, *Streptococcus milleri* (*S. milleri*) IS51, *E. coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* (*P. vulgaris*) ATCC 13315, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 10145, *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) ATCC 13047 ve *C. albicans* ATCC 60193 tip suşlarına karşı antimikrobiyal etkileri agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile test edildi. *G. vaginalis* için Columbia, *C. albicans* için Sabora dekstrozu (SDA) ve diğer suşlar için BHI agar ve sıvı besiyerleri kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubu

Çalışmaya alınan 75 kadının vajinal sürüntü örneğinden bir veya birden fazla laktobasil izole edildi. Laktobasil izole edilen kadınların yaş gruplarına göre dağılımları Tablo 3’de verildi. Hasta grubunu oluşturan kadınların %93’ünün 18 ile 49 yaşları arasında yer aldığı görüldü.

Tablo 3. Yaş Gruplarına Göre Hastaların Dağılımı

Yaş Aralığı	Hasta	
	Sayısı (n)	Yüzdesi (%)
≤17	1	1.3
18-29	25	33.3
30-39	28	37.4
40-49	16	21.4
≥50	5	6.6
	75	100

4.2. Laktobasil İzolasyonu ve İdentifikasyonu

4.2.1. İzole Edilen Laktobasil Suşlarının Hastaların Klinik Tanılarına Göre Dağılımı

Vajinal sürüntü örneklerinden hazırlanan direk gram boyalı preparatların incelenmesi ile 75 hastanın 46'sında normal flora, 14'ünde BV, 9'unda VK ve 6'sında ara form saptandı. Bu kadınlardan toplam 100 laktobasil suşu izole edildi (Tablo 4).

Tablo 4. Klinik Tanılarına Göre Hastalardan İzole Edilen Laktobasil Suşlarının Dağılımı

Klinik Tanı	Hasta		İzole Edilen Laktobasil
	Sayı	%	Sayı
BV	14	18.4	17
Araform	6	7.9	11
MV	9	11.8	12
NVF	46	60.5	60
Toplam	75		100

Hastaların klinik tanıları ve izole edilen laktobasillerin türlere göre dağılımı Tablo 5’da verilmiştir. İzole edilen laktobasillerin tür tanıları, Bergey's Manual Microbiology'de belirtilen kriterlere göre yapıldı(104) ve en yüksek oranda *L. gasseri* suşlarının bulunduğu tespit edildi.

Tablo 5. Çalışmaya Alınan Hastaların Klinik Tanıları ve İzole Edilen Laktobasil Türlerinin Dağılımı

Sayı	Örnek No	Klinik Tanı	Laktobasil Türleri
1	004	NVF	<i>L. jensenii</i> TL013
2	002	VK	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL016
3	006	NVF	<i>L. fermentum</i> TL018
4	009	NVF	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL021
5	013	BV	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL023a
6			<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL023b
7	011	NVF	<i>L. gasseri</i> TL024
8	012	NVF	<i>L. gasseri</i> TL025a
9			<i>L. gasseri</i> TL025b
10	014	NVF	<i>Lactobacillus</i> spp. TL026

Tablo 5'den Devam...

11	015	NVF	<i>Lactobacillus</i> spp. TL027
12	016	BV	<i>L. fermentum</i> TL028
13	017	NVF	<i>L. casei</i> TL029
14	040	NVF	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL032a
15			<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL032b
16	020	NVF	<i>L. gasseri</i> TL033a
17	020	NVF	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL034c
18	022	NVF	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL035
19	025	BV	<i>L. gasseri</i> TL038a
20			<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL038b
21	047	NVF	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL039a
22			<i>L. gasseri</i> TL039b
23	073	NVF	<i>L. gasseri</i> TL041
24	029	VK	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL042a
25			<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL042b
26	031	NVF	<i>L. acidophilus</i> TL044a
27	039	NVF	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL048a
28			<i>Lactobacillus</i> spp. TL048b
29	041	BV	<i>L. gasseri</i> TL049
30	055	NVF	<i>L. gasseri</i> TL054
31	056	VK	<i>L. casei</i> TL055a
32			<i>L. acidophilus</i> TL055b
33	057	NVF	<i>L. gasseri</i> TL056b
34			<i>L. gasseri</i> TL056c
35	062	VK	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL059a
36			<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL059b

Tablo 5'den Devam...

37	066	NVF	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL060a
38			<i>L. acidophilus</i> TL060b
39			<i>L. gasseri</i> TL060c
40			<i>L. gasseri</i> TL060d
41	067	NVF	<i>L. acidophilus</i> TL061a
42			<i>L. acidophilus</i> TL061b
43	075	NVF	<i>L. acidophilus</i> TL065
44	071	BV	<i>L. gasseri</i> TL067
45	078.	NVF	<i>L. gasseri</i> TL072
46	079	BV	<i>L. gasseri</i> TL073a
47	080	Ara Form	<i>Lactobacillus</i> spp. TL074a
48			<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL074b
49			<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL074c
50	081	NVF	<i>Lactobacillus</i> spp. TL075a
51			<i>L. gasseri</i> TL075b
52	082	BV	<i>L. gasseri</i> TL076
53	086	NVF	<i>L. gasseri</i> TL080
54	094	NVF	<i>L. acidophilus</i> TL081
55	092	NVF	<i>L. gasseri</i> TL083
56	096	NVF	<i>Lactobacillus</i> spp. TL084
57	099	BV	<i>L. gasseri</i> TL085b
58	103	NVF	<i>L. gasseri</i> TL087
59	104	VK	<i>Lactobacillus</i> spp. TL088
60	111	NVF	<i>L. gasseri</i> TL093c
61	119	NVF	<i>L. acidophilus</i> TL099a
62	125	NVF	<i>L. gasseri</i> TL101
63	126	BV	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL102a
64	124	NVF	<i>L. coryniformis</i> TL104

Tablo 5'den Devam...

65	134	NVF	<i>L. gasseri</i> TL108
66	137	Ara Form	<i>L. gasseri</i> TL109a
67			<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL109b
68			<i>L. gasseri</i> TL109c
69	153	VK	<i>L. gasseri</i> TL110
70	146	Ara Form	<i>L. acidophilus</i> TL111b
71	157	VK	<i>L. jensenii</i> TL112
72	142	NVF	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL113
73	145	Ara Form	<i>Lactobacillus</i> spp. TL114
74	159	NVF	<i>Lactobacillus</i> spp. TL119a
75			<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL122b
76	147	VK	<i>L. gasseri</i> TL125
77	160	NVF	<i>Lactobacillus</i> spp. TL127
78	165	BV	<i>L. fermentum</i> TL129
79	171	NVF	<i>L. gasseri</i> TL132a
80			<i>L. gasseri</i> TL132b
81	175	NVF	<i>L. acidophilus</i> TL134
82	177	VK	<i>L. gasseri</i> TL135
83	179	NVF	<i>L. gasseri</i> TL136
84	181	NVF	<i>L. gasseri</i> TL137
85	176	BV	<i>L. gasseri</i> TL138
86	182	Ara Form	<i>L. gasseri</i> TL139a
87			<i>L. acidophilus</i> TL139c
88	180	NVF	<i>L. gasseri</i> TL141
89	187	NVF	<i>L. gasseri</i> TL143a
90			<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL143b
91	186	BV	<i>L. agilis</i> TL145a
92			<i>L. gasseri</i> TL145b

Tablo 5'den Devam...

93	188	Ara Form	<i>L. gasseri</i> TL146
94	191	BV	<i>L. gasseri</i> TL147
95	194	NVF	<i>L. gasseri</i> TL149
96	196	NVF	<i>Lactobacillus</i> spp. TL150a
97			<i>L. gasseri</i> TL150b
94	191	BV	<i>L. gasseri</i> TL147
95	194	NVF	<i>L. gasseri</i> TL149
96	196	NVF	<i>Lactobacillus</i> spp. TL150a
97			<i>L. gasseri</i> TL150b
98	197	BV	<i>L. gasseri</i> TL152
99	198	NVF	<i>L. fermentum</i> TL153
100	199	NVF	<i>L. acidophilus</i> TL154

BV tanısı konmuş 14 hastadan üçünün vajinal floralarından birden fazla laktobasil suşu izole edildi. BV semptomlu diğer hastaların vajinal floralarından ise sadece bir tip laktobasil izole edildi. Normal vajinal floraya sahip 46 kadının birinden dört, 11'inden iki ve 32'sinden tek bir laktobasil türü izole edildi. VK'lı 9 olgudan 3'ünde iki tip laktobasil izole edilirken, ara form klinik tablo gösteren 6 kadının 2'sinden üç, birinden iki ve üçünden tek bir laktobasil suşu izole edildi.

4.3. Bakteriyofaj İzolasyonu

4.3.1. Profaj Bulunduran Vajinal Laktobasillerin Dağılımı

Klinik tanılarına göre dağılımlarında en yüksek oranda bakteriyofaj, BV'li hastalardan izole edilen laktobasil suşlarında %88.2 olarak belirlendi (Tablo 6). VK'lı kadınlarda %45, NVF'li ve ara formdaki kadınlarda %50 oranlarında bakteriyofaj tespit edildi. χ^2 testine göre yapılan istatistik değerlendirmede (105), gruplar arasında bakteriyofaj taşıyıcılığı yönünden anlamlı bir farkın

bulunduğu saptandı ($p= 0.033$).

Tablo 6. Klinik Tanılarına Göre Hastalardan İzole Edilen Laktobasil Suşları ve Bu Suşlarda Tespit Edilen Bakteriyofajların Dağılımı.

Klinik Tanı	İzole Edilen Laktobasil Sayı	İzole Edilen Bakteriyofaj Sayı	%
BV	17	15	88.2*
Araform	11	5	45.4
MV	12	6	50
NVF	60	30	50
Toplam	100	56	

(* $p=0.033$)

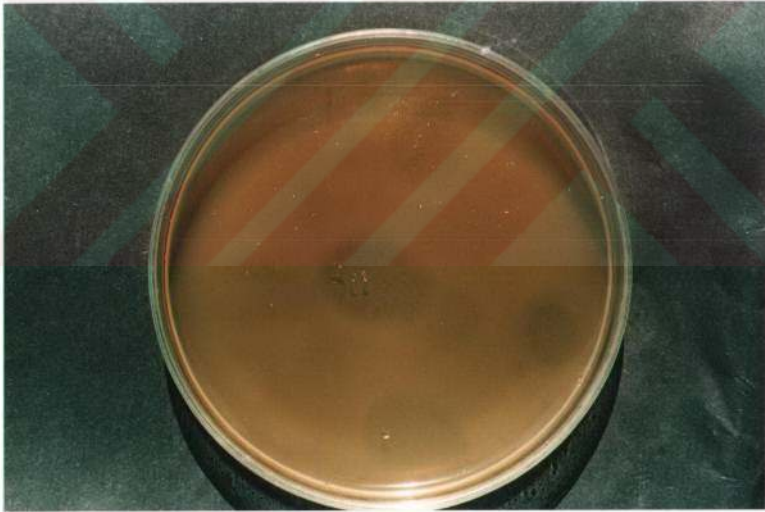
Profaj belirlenen 56 laktobasil suşunun tür dağılımları Tablo 7'de sunulmuştur. Bakteriyofaj taşıyıcılığı en fazla %71 ile %66.6 oranlarında *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis* suşlarında belirlendi.

Tablo 7. Bakteriyofaj İzole Edilen Laktobasil Suşlarının Türlerine Göre Dağılımı.

Türler	Sayı	Bakteriyofaj Sayı	%
<i>L. gasseri</i>	44	26	59.0
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	14	11	78.5
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	9	6	66.6
<i>L. acidophilus</i>	12	7	58.3
<i>L. fermentum</i>	4	2	50.0
<i>L. jensenii</i>	2	-	-
<i>L. casei</i>	2	-	-
<i>L. agilis</i>	1	1	100
<i>L. coryniformis</i>	1	-	-
<i>Lactobacillus</i> spp.	11	3	27.2
Toplam	100	56	56.0

4.3.2. Bakteriyofaj ve Bakteriyosinlere Duyarlı İndikatörlerin Saptanması

Çalışmada izole edilen 100 laktobasil suşuna ait lizatlar, indikatör olarak kullanılan aynı laktobasiller ile test edilerek (Şekil 5) bakteriyosin, bakteriyofaj, H_2O_2 içerikleri ile ve antibakteriyel etkileri belirlendi (89). İzole edilen bakteriyofajların bulunduğu laktobasil türleri, içerdikleri bakteriyofaj morfotipleri ve enfekte ettikleri indikatör laktobasiller saptandı (Tablo 8).



Şekil 5. Yumuşak Agarda Damla Yöntemi İle Gözlenen Antibakteriyel Aktivite

Tablo 8. Bakteriyofaj, Bakteriyosin ve Antibakteriyel Aktiviteye Sahip Laktobasillerin Duyarlı Konaklarının Dağılımı

Bakteriyofajlar (Φ tl) / Konaklar (TL)	İndikatör Laktobasil Suşları
Φtl016 / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL016	TL109 ¹
Φtl021 / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL021	TL021, TL023a, TL023b, TL025a, TL025b, TL028, TL032a ⁴ , TL035, TL044a, TL054, TL055a, TL055b, TL056a, TL056c, TL078b, TL081 ³ , TL082 ⁴ , TL150b, TL143a ⁴ , TL154 ⁴
Φtl023a / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL023a	-
Φtl023b / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL023b	-
Φtl024 / <i>L. gasseri</i> TL024	TL018, TL024, TL025b ¹ , TL026 ⁶ , TL035 ⁶ , TL038 ⁴ , TL039a, TL039b, TL042b ⁶ , TL049 ⁶ , TL060a ⁵ , TL060b ⁵ , TL061a ⁵ , TL065 ⁵ , TL067 ³ , TL072 ⁵ , TL074a ⁵ , TL074b ⁶ , TL081 ⁵ , TL085b ⁵ , TL093c ⁵ , TL101 ³ , TL102 ⁸ , TL109a ⁵ , TL109b ⁶ , TL109c ⁵ , TL110 ⁶ , TL122b ⁶ , TL129 ⁵ , TL132a ⁶ , TL136 ⁶ , TL137 ⁶ , TL139c ⁵ , TL143a ⁵ , TL145b ⁷ , TL147 ³ , TL149 ⁵
Φtl025a / <i>L. gasseri</i> TL025a	TL054 ⁴ , TL74a ⁵ , TL081 ⁵
Φtl027 / <i>Lactobacillus</i> spp. TL027	TL74a ⁵ , TL081
Φtl028 / <i>L. fermentum</i> TL028	-
Φtl032a / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL032a	-
Φtl032b / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL032b	TL081 ⁵ , 109b ¹
Φtl033a / <i>L. gasseri</i> TL033a	TL016 ⁶ , TL026 ⁴ , TL035 ⁵ , TL042b ⁵ , TL054, TL055b, TL060b ⁵ , TL067 ⁵ , TL074a ⁵ , TL081 ⁵ , TL109a ¹ , TL109b ⁶ , TL109c ⁶ , TL129 ⁵ , TL145b ⁵ , TL147 ³
Φtl034c / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL034c	TL013 ⁶ , TL016 ⁶ , TL018, TL025b ⁶ , TL026 ⁶ , TL029 ⁵ , TL033a ⁴ , TL035 ⁶ , TL038a ⁴ , TL038b ⁶ , TL039a ⁸ , TL039b, TL041 ⁴ , TL042b ⁵ , TL049 ⁵ , TL056b ⁹ , TL060b ⁶ , TL061a ⁵ , TL065 ⁵ , TL067 ⁸ , TL072 ⁴ , TL073 ⁸ , TL074a ³ , TL074b ⁸ , TL075a ⁸ , TL076 ⁹ , TL084 ⁵ , TL085b ⁵ , TL087 ⁸ , TL093c ⁵ , TL101 ³ , TL102 ⁸ , TL109a ⁸ , TL109b ⁶ , TL109c ¹¹ , TL110 ¹¹ , TL113 ⁶ , TL114 ⁸ , TL122b ⁶ , TL129 ³ , TL132a ⁸ , TL132b ³ , TL136 ¹ , TL137 ⁸ , TL138 ¹⁰ , TL139a ⁴ , TL139c ⁵ , TL141 ⁸ , TL143a ⁵ , TL145b ⁵ , TL146 ³ , TL147 ³

Tablo 8'den Devam...

Φtl035 / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL035	TL013, TL021, TL023a ⁶ , TL025a ⁵ , TL028 ⁴ , TL035, TL039b, TL054 ⁴ , TL055b ⁴ , TL060c ⁵ , TL074a ⁵ , TL080, TL081 ² , TL083 ⁶ , TL084, TL085b ³ , TL113, TL147 ⁵ , TL150b, TL154 ⁵
Φtl038a / <i>L. gasseri</i> TL038a	TL055b
Φtl038b / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL038b	-
Φtl039a / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL039a	-
Φtl039b / <i>L. gasseri</i> TL039b	TL013 ⁴ , TL018 ⁵ , TL023a ⁴ , TL025a ⁶ , TL028 ⁴ , TL035 ⁴ , TL038b ⁶ , TL054 ⁴ , TL055b ⁵ , TL056c, TL060c, TL060d ⁴ , TL074a ⁵ , TL080 ⁴ , TL081 ¹ , TL083 ⁴ , TL084, TL085b, TL104, TL113, TL150b, TL154 ⁵
Φtl041 / <i>L. gasseri</i> TL041	-
Φtl042a / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL042a	-
Φtl042b / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL042a	-
Φtl049 / <i>L. gasseri</i> TL049	-
Φtl056b / <i>L. gasseri</i> TL056b	TL016 ⁶ , TL018 ⁵ , TL026 ⁶ , TL032a, TL032b ⁴ , TL039b, TL042b ⁵ , TL060a ⁵ , TL060b ⁵ , TL061a ⁵ , TL065 ⁵ , TL067 ⁵ , TL074a ⁷ , TL081 ⁵ , TL083 ⁴ , TL101 ⁵ , TL104 ⁴ , TL109a ¹ , TL109b ⁶ , TL109c ⁵ , TL110 ⁵ , TL122b ⁶ , TL129 ⁵ , TL134 ⁵ , TL136 ¹ , TL139c ⁵ , TL143a ⁵ , TL145b ⁷ , TL147 ⁵ , TL150b, TL153 ⁴
Φtl056c / <i>L. gasseri</i> TL056c	TL013 ⁴ , TL023a ⁶ , TL025a ⁶ , TL028 ⁵ , TL038b ⁶ , TL039b ⁴ , TL044a, TL054 ⁴ , TL055b ⁵ , TL056c ⁴ , TL060c, TL060d ⁴ , TL065 ⁴ , TL074a ³ , TL080 ⁴ , TL081 ¹ , TL083 ⁴ , TL085b, TL099a ⁶ , TL102 ⁶ , TL104 ⁴ , TL113, TL119a, TL147 ⁵ , TL150b, TL154 ⁵
Φtl060a / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL060a	TL054, TL060c, TL104
Φtl060b / <i>L. acidophilus</i> TL060b	-
Φtl061a / <i>L. acidophilus</i> TL061a	TL013 ⁴ , TL018 ⁵ , TL023a, TL025a ⁵ , TL025b ⁵ , TL028, TL035 ⁵ , TL038b ⁶ , TL054 ⁵ , TL055b, TL056c ⁵ , TL060c, TL060d ⁴ , TL074a ⁴ , TL080 ⁴ , TL081 ¹ , TL083 ⁴ , TL084, TL085b, TL104 ⁴ , TL113, TL147 ⁵ , TL150b, TL154 ⁵

Tablo 8'den Devam...

Φtl061b / <i>L. acidophilus</i> TL061b	TL013 ⁴ , TL018 ⁵ , TL023a ⁵ , TL025a ⁴ , TL025b ⁵ , TL028, TL035 ⁵ , TL038b ⁶ , TL054, TL055b, TL056c, TL059b ⁴ , TL060c, TL060d ⁴ , TL074a ⁴ , TL080 ⁴ , TL081 ¹ , TL083 ³ , TL084, TL085b, TL104 ⁴ , TL113, TL119a, TL147 ⁵ , TL150b, TL154 ⁵
Φtl065 / <i>L. acidophilus</i> TL065	TL013, TL018 ⁵ , TL021, TL023a, TL025a, TL025b ⁵ , TL028, TL035 ⁵ , TL038a ⁴ , TL038b ⁶ , TL039b ⁵ , TL044, TL054 ⁵ , TL055a, TL055b, TL056c, TL059a, TL059b, TL060d, TL061a, TL061b, TL065, TL074a ³ , TL080, TL081 ¹ , TL083 ³ , TL084, TL085b ⁵ , TL099a ⁵ , TL102 ⁶ , TL104 ⁴ , TL108, TL111b, TL113, TL119a, TL129 ⁵ , TL134, TL135 ³ , TL143a, TL147 ³ , TL150b, TL154 ⁵ ,
Φtl067 / <i>L. gasseri</i> TL067	TL044a
Φtl072 / <i>L. gasseri</i> TL072	TL026 ⁶ , TL038b ⁵ , TL055a, TL060b ⁵ , TL067 ⁵ , TL081 ⁵ , TL109a ¹ , TL109b ⁶ , TL129 ⁶ , TL132a ¹ , TL145b ⁵ , TL147 ⁵
Φtl073a / <i>L. gasseri</i> TL073a	TL056c
Φtl074c / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL074c	TL026 ⁶ , TL060b ⁵ , TL102 ¹⁰ , TL109b ¹ , TL114 ¹ , TL129 ⁶ , TL132b ⁷ , TL136 ¹ , TL145b ⁵ , TL147 ³
Φtl075a / <i>Lactobacillus</i> spp. TL075a	TL016 ⁶ , TL024 ⁴ , TL025a ⁶ , TL025b ⁶ , TL026 ⁶ , TL028 ⁶ , TL038b ⁶ , TL041 ⁶ , TL042a ⁶ , TL042b ⁵ , TL049 ⁶ , TL060a ⁵ , TL060b ⁵ , TL061a ³ , TL065 ⁵ , TL067 ³ , TL072 ⁵ , TL081 ⁵ , TL084 ⁵ , TL093c ⁵ , TL102 ³ , TL109b ⁶ , TL109c ³ , TL110 ⁵ , TL114 ⁹ , TL122b ⁵ , TL129 ³ , TL132a ⁷ , TL132b ⁷ , TL138 ¹⁰ , TL139c ⁵ , TL145a ⁵ , TL147 ³
Φtl076 / <i>L. gasseri</i> TL076	TL013 ⁶ , TL016 ⁶ , TL024 ⁶ , TL025a ⁶ , TL025b ⁶ , TL026 ³ , TL028 ⁶ , TL033a ³ , TL035 ⁶ , TL038a ⁹ , TL038b ⁶ , TL041 ⁶ , TL042b ⁵ , TL049 ⁵ , TL056b ⁴ , TL060b ⁵ , TL061a ³ , TL065 ⁵ , TL067, TL072 ⁵ , TL073 ⁸ , TL074b ⁸ , TL075a ⁴ , TL081 ⁵ , TL084 ⁵ , TL085b ⁵ , TL087 ⁸ , TL093c ⁵ , TL102 ⁸ , TL109a ⁸ , TL109b ⁶ , TL109c ³ , TL110 ⁵ , TL114 ¹⁰ , TL122b ⁶ , TL129 ⁷ , TL132a, TL132b ⁷ , TL136 ³ , TL137 ⁹ , TL138 ¹⁰ , TL139c ⁵ , TL141 ⁸ , TL145b ⁵ , TL146 ³ , TL147 ³
Φtl087 / <i>L. gasseri</i> TL087	TL016 ⁶ , TL025a ⁶ , TL026, TL028 ⁶ , TL038b ⁶ , TL041 ⁶ , TL042b ⁵ , TL060a ⁵ , TL060b ³ , TL061a ³ , TL065 ⁵ , TL067 ⁵ , TL072 ⁵ , TL081 ⁵ , TL084 ⁵ , TL093c ⁵ , TL102 ¹ , TL109b ⁶ , TL109c ⁵ , TL110 ⁵ , TL122b ⁵ , TL129 ⁵ , TL139c ⁵ , TL145a ⁵ , TL147 ³
Φtl102a / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL0102a	TL016 ⁶ , TL025a ⁵ , TL026, TL029, TL038a ⁹ , TL038b ⁶ , TL041 ⁶ , TL042b ⁵ , TL049 ⁵ , TL056b ¹ , TL060b ³ , TL067 ⁵ , TL075a, TL081 ⁵ , TL084 ⁵ , TL093c ⁵ , TL109b ⁶ , TL109c ⁵ , TL129 ⁷ , TL122b ⁶ , TL136 ² , TL139c ⁵ , TL145b ⁵ , TL147 ³
Φtl108 / <i>L. gasseri</i> TL108	TL083

Tablo 8'den Devam...

Φtl109a / <i>L. gasseri</i> TL109a	TL026 ⁶ , TL035 ⁶ , TL038b ⁶ , TL042b ⁵ , TL060b ⁵ , TL067 ⁵ , TL074a ⁵ , TL101 ⁶ , TL109b ⁶ , TL109c ⁵ , TL122b ⁵ , TL129 ⁵ , TL132b, TL136 ¹ , TL139c ⁵ , TL145b ³ , TL147
Φtl109c / <i>L. gasseri</i> TL109c	TL035 ⁶ , TL074a, TL081 ⁵
Φtl110 / <i>L. gasseri</i> TL110	TL035 ⁶ , TL038b ⁶ , TL042b ⁶ , TL060b ⁵ , TL060d ⁵ , TL067 ⁵ , TL074a ⁵ , TL081 ⁵ , TL109b ⁶ , TL109c ⁵ , TL145b ³ , TL147 ⁵
Φtl111b / <i>L. acidophilus</i> TL111b	TL013, TL018 ⁵ , TL023a ⁶ , TL025a ⁴ , TL025b ⁶ , TL028, TL038b ⁶ , TL054 ⁵ , TL055a, TL055b, TL056c, TL059a ⁴ , TL060c ⁴ , TL074a ³ , TL080 ⁵ , TL081 ¹ , TL084, TL085b, TL104 ⁴ , TL113, TL119a, TL150b, TL154 ⁵
Φtl113 / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL113	TL013, TL025a ⁶ , TL028, TL035, TL044a ⁵ , TL054 ⁵ , TL055b ⁵ , TL060c ⁴ , TL074a ³ , TL080 ⁵ , TL081 ¹ , TL084, TL085b, TL104 ⁴ , TL113, TL119a, TL135 ⁴ , TL143a, TL150b, TL154 ⁵
Φtl122b / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL122b	TL109b ¹
Φtl125 / <i>L. gasseri</i> TL125	TL132b, TL134 ⁶ , TL136 ²
Φtl127 / <i>Lactobacillus</i> spp. TL127	TL074a ⁵
Φtl129 / <i>L. fermentum</i> TL129	TL039b ⁶ , TL042b ⁵ , TL060b ⁵ , TL067 ⁵ , TL074a ³ , TL109b ⁶ , TL109c ⁵ , TL134 ⁶ , TL145b ³
Φtl132a / <i>L. gasseri</i> TL132a	TL026 ⁶ , TL028 ⁶ , TL035 ⁶ , TL038b ⁶ , TL041 ⁶ , TL042a ⁶ , TL042b ⁶ , TL049 ⁵ , TL060b ⁵ , TL067, TL074a ⁵ , TL101, TL109a ⁵ , TL109b ⁶ , TL109c ⁵ , TL122b ⁵ , TL129 ⁵ , TL132b ⁶ , TL134 ⁶ , TL139c ⁵ , TL145b ⁵ , TL147 ³
Φtl132b / <i>L. gasseri</i> TL132b	TL013 ⁶ , TL025a ⁵ , TL026 ⁶ , TL028 ⁶ , TL035 ⁶ , TL038b ⁶ , TL041 ⁶ , TL042a ⁶ , TL042b ⁶ , TL049 ⁵ , TL060a ⁵ , TL060b ⁵ , TL067, TL074a ⁵ , TL101, TL109a ⁵ , TL109b ⁶ , TL109c ³ , TL122b ⁶ , TL129 ⁵ , TL132b ⁶ , TL134 ⁶ , TL139c, TL143a ⁵ , TL145b ⁵ , TL147 ³
Φtl134 / <i>L. acidophilus</i> TL134	TL013, TL016 ⁶ , TL023a ⁶ , TL025a, TL025b ⁶ , TL028, TL035, TL038b ⁶ , TL054 ⁵ , TL055b, TL056c, TL059a ⁴ , TL060c ³ , TL060d ⁵ , TL074a ³ , TL080 ³ , TL081 ¹ , TL084, TL085b, TL104 ⁴ , TL113, TL119a ⁶ , TL150b, TL154 ⁵
Φtl138 / <i>L. gasseri</i> TL138	TL025a ⁵ , TL026 ⁶ , TL035 ⁶ , TL038b ⁶ , TL041 ⁶ , TL042a ⁶ , TL042b ⁵ , TL049 ⁵ , TL060a ⁵ , TL060b ⁵ , TL060d ⁵ , TL067, TL074a ³ , TL075a ⁸ , TL081 ⁵ , TL084 ³ , TL101 ⁵ , TL102 ⁸ , TL109a ¹¹ , TL122b ⁶ , TL129 ⁶ , TL132b ⁸ , TL136 ¹ , TL139c ⁵ , TL141 ³ , TL147 ⁵
Φtl139a / <i>L. gasseri</i> TL139a	TL026 ⁵ , TL039, TL042b ⁵ , TL060a ⁵ , TL060b ⁵ , TL060d ⁵ , TL067, TL074a ³ , TL081 ⁵ , TL084 ⁵ , TL101 ⁵ , TL109b ⁶ , TL109c ⁵ , TL122b ⁷ , TL139c ⁵ , TL145b ⁵ , TL147 ³

Tablo 8'den Devam...

Φtl139c / <i>L. acidophilus</i> TL139c	TL084 ⁵
Φtl141 / <i>L. gasseri</i> TL141	TL025a ⁶ , TL026 ⁶ , TL033a ⁴ , TL035, TL038b ⁵ , TL039b, TL042a ⁶ , TL042b ⁵ , TL049 ⁵ , TL056b ³ , TL060a ⁵ , TL060b ⁵ , TL060d ⁵ , TL067 ³ , TL074a ³ , TL074b ⁸ , TL075a ⁸ , TL076 ⁸ , TL081 ⁵ , TL084 ³ , TL088 ⁶ , TL101 ⁶ , TL102 ⁸ , TL109a ¹¹ , TL109b ⁶ , TL109c ¹¹ , TL110 ³ , TL114 ⁸ , TL122b ⁵ , TL129 ⁵ , TL132a ¹ , TL132b ⁸ , TL136 ¹⁰ , TL137, TL138 ⁹ , TL139a ⁹ , TL139c ³ , TL145b ⁵ , TL146 ³ , TL147 ³
Φtl143b / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL143b	TL132b ⁶
Φtl145a / <i>L. agilis</i> TL145a	TL024 ⁴ , TL033a ⁴ , TL038a, TL039b, TL041 ⁴ , TL049 ⁴ , TL060a ⁵ , TL084 ⁵ , TL132a ⁵ , TL141
Φtl147 / <i>L. gasseri</i> TL147	-
Φtl152	TL132 ⁴
Bakteriyosinler (Konakları)	İndikatör Laktobasil suşları
TL029 / <i>L. casei</i> TL029	TL081 ⁵ , TL143 ⁴
TL059a / <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL059a	TL074a, TL081 ⁵ , TL147 ⁵
TL080 / <i>L. gasseri</i> TL080	TL024 ⁶
TL093c (<i>L. gasseri</i> TL093c)	TL013, TL023a ⁴ , TL025a ⁶ , TL028, TL038b ⁶ , TL054, TL055b, TL056c, TL060c ⁵ , TL060d ⁴ , TL080 ⁶ , TL081 ⁵ , TL083 ⁶ , TL084, TL085b, TL104 ⁴ , TL113, TL150b,
TL099a / <i>L. acidophilus</i> TL099a	TL081 ⁵ , TL054 ⁴ ,
TL143a / <i>L. gasseri</i> TL143a	TL013, TL023a ⁶ , TL025a, TL025b ⁶ , TL028, TL035 ⁶ , TL038b ⁵ , TL054, TL055b, TL056c, TL060c ³ , TL060d ³ , TL074a, TL080 ⁶ , TL081 ⁵ , TL084, TL085b, TL104, TL113, TL150b, TL154
Diğer Antimikrobial Ajan Üreten (H ₂ O ₂ veya asit) Laktobasiller	İndikatör Laktobasil suşları
<i>L. jensenii</i> TL013	-
<i>L. fermentum</i> TL018	-
<i>L. gasseri</i> TL025b	TL054, TL081
<i>Lactobacillus</i> spp. TL026	TL054

Tablo 8'den Devam...

<i>L. acidophilus</i> TL044a	TL038b ⁶ , TL081 ⁵ , TL084 ⁴ , TL085 ⁴ , TL154 ⁵
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL048a	-
<i>Lactobacillus</i> spp. TL048b	-
<i>L. gasseri</i> TL054	TL108, TL044a
<i>L. cacei</i> TL055a	TL081
<i>L. acidophilus</i> TL055b	TL081, TL035
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL059b	TL054, TL060b
<i>L. gasseri</i> TL060c	-
<i>L. gasseri</i> TL060d	TL093c
<i>Lactobacillus</i> spp. TL074a	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL074b	TL016 ⁶ , TL024 ⁴ , TL026 ⁵ , TL038b ⁶ , TL041 ⁶ , TL042b ⁵ , TL056c ⁴ , TL060a ⁵ , TL060b ⁵ , TL067 ⁵ , TL081 ⁵ , TL084 ⁵ , TL093c ⁵ , TL109c ⁶ , TL122b ⁶ , TL129 ⁶ , TL145b ⁵ , TL147 ⁵
<i>L. gasseri</i> TL075b	TL026 ⁶ , TL038b ⁶ , TL041 ⁶ , TL042b ⁵ , TL049 ⁶ , TL060b ⁵ , TL067 ³ , TL072 ⁵ , TL081 ⁵ , TL093c ⁵ , TL109b ⁶ , TL109c ⁵ , TL122b ⁶ , TL129 ⁵ , TL109c ⁵ , TL145b ⁵ , TL147 ³
<i>L. acidophilus</i> TL080	-
<i>L. gasseri</i> TL083	-
<i>Lactobacillus</i> spp. TL084	-
<i>L. gasseri</i> TL085b	-
<i>L. gasseri</i> TL101	-
<i>L. coryniformis</i> TL104	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL109b	-
<i>L. jensenii</i> TL112	-
<i>Lactobacillus</i> spp. TL114	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> TL119a	TL074a, TL081
<i>L. gasseri</i> TL135	TL134 ⁶
<i>L. gasseri</i> TL136	-

Tablo 8'den Devam...

<i>L. gasseri</i> TL137	TL025a ⁵ , TL026 ⁶ , TL035 ⁶ , TL038b ⁶ , TL041 ⁶ , TL042a ⁶ , TL042b ⁵ , TL049 ⁵ , TL060a ⁵ , TL060b ⁵ , TL060d ⁵ , TL067 ⁴ , TL074a ³ , TL101, TL109a ⁵ , TL109b ⁶ , TL109c ³ , TL122b ⁵ , TL129 ⁵ , TL132b ⁶ , TL134 ⁶ , TL136 ³ , TL139c, TL143a ³ , TL145b ³ , TL147 ³
<i>L. gasseri</i> TL145b	TL024 ⁴ , TL033a ⁴ , TL038a, TL039b, TL041 ⁴ , TL049 ⁴ , TL060a ⁵ , TL084 ⁵ , TL132b ⁵ , TL141
<i>L. gasseri</i> TL146	TL018, TL025a ⁶ , TL026, TL038b ⁶ , TL039b, TL041 ⁵ , TL042a ⁵ , TL042b ⁵ , TL049 ⁵ , TL060a ⁵ , TL060b ⁵ , TL067 ⁴ , TL074a ³ , TL081 ⁵ , TL084 ³ , TL088 ⁶ , TL101 ⁶ , TL109a ⁶ , TL110 ⁶ , TL129 ⁵ , TL132b ⁵ , TL139c ⁵ , TL145b ⁵ , TL147 ³
<i>L. gasseri</i> TL149	TL016 ⁵ , TL018, TL026 ⁵ , TL038b ⁵ , TL039b, TL042b ⁵ , TL060a ⁵ , TL060b ⁵ , TL067 ⁴ , TL074a ³ , TL081 ⁵ , TL084 ³ , TL101 ⁷ , TL109b ⁶ , TL109c ³ , TL110 ³ , TL122b ⁵ , TL129 ³ , TL132b ⁵ , TL139c ⁵ , TL145b ⁵ , TL147 ³
<i>Lactobacillus</i> spp. TL150a	-
<i>L. gasseri</i> TL150b	TL075a, TL132b ⁶
<i>L. gasseri</i> TL153	TL016 ⁵ , TL018, TL025a ⁶ , TL026, TL038b ⁵ , TL039b, TL042b ⁵ , TL060a ⁵ , TL060b ⁵ , TL067 ⁴ , TL074a ³ , TL081 ⁵ , TL084 ³ , TL101 ⁷ , TL109b ⁵ , TL109c ³ , TL110 ³ , TL122b ⁵ , TL129 ³ , TL132b ⁵ , TL139c ⁵ , TL145b ⁵ , TL147 ³
<i>L. acidophilus</i> TL154	TL132b ⁶

Numara verilmemiş indikatör suşlar test edilen lizat tarafından inhibe edilerek tam açılma şeklinde zon oluşturdu. ¹Tek plak, ² Tek plak ve çift inhibisyon zonu, ³ Çift inhibisyon zonu, ⁴ Bulanık inhibisyon zonu, ⁵ Diffüz inhibisyon zonu, ⁶ Bir hafta sonra inhibisyon zonlarının genişlemesi, ⁷ Geniş, diffüz, çift inhibisyon zonu, ⁸ Yüzük şeklinde açılma, ⁹ Bulanık, yüzük şeklinde açılma, ¹⁰ Yüzük şeklinde açılma ve tek plak, ¹¹ Yüzük şeklinde açılma ve çift inhibisyon zonu.

Bakteriyofaj, bakteriyosin ve diğer antibakteriyel aktivite bulunduran laktobasillerden (Tablo 8), bakteriyofaj içerenlerin enfekte ettikleri duyarlı konakları Tablo 9'da saptandı. Morfotip A olarak belirlenen 14 bakteriyofajın 8'i *L. gasseri* suşlarından izole edildiği ve *L. gasseri* suşlarına karşı oldukça duyarlı oldukları belirlendi. Ayrıca,, bu grup bakteriyofajlar diğer laktobasil suşlarını da enfekte edebilmekte idi. B1 morfotipi bakteriyofajlarından Φtl024, Φtl034c, Φtl075a, Φtl076 ve Φtl141 bakteriyofajlarının *L. gasseri* ve diğer laktobasil türlerine karşı geniş duyarlılık gösterdikleri belirlendi.

Tablo 9'dan Devam...

33	Φtl060b	B1	(b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Φtl074c	B1	(d)	4	1	2	-	1	2	-	-	-	-
35	Φtl075a	B1	(f)	15	4	6	2	2	3	1	-	-	-
36	Φtl076	B1	(a)	28	5	3	2	2	5	-	-	1	-
37	Φtl108	B1	(a)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	Φtl109a	B1	(a)	7	2	4	1	1	2	-	-	-	-
39	Φtl109c	B1	(a)	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-
40	Φtl111b	B1	(b)	10	3	1	3	2	3	-	1	1	-
41	Φtl113	B1	(d)	9	4	-	2	1	3	-	-	1	-
42	Φtl122b	B1	(c)	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
43	Φtl125	B1	(a)	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
44	Φtl127	B1	(f)	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
45	Φtl129	B1	(e)	4	2	2	-	-	1	-	-	-	-
46	Φtl139a	B1	(a)	6	3	4	1	-	3	-	-	-	-
47	Φtl139c	B1	(b)	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
48	Φtl141	B1	(a)	21	3	5	4	1	6	-	-	-	-
49	Φtl143b	B1	(c)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	Φtl147	B1	(a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	Φtl152	B1	(a)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	Φtl072	B2	(a)	6	2	1	1	1	1	-	-	-	-
53	Φtl110	B2	(a)	5	2	3	1	-	1	-	-	-	-
54	Φtl132a	B2	(a)	10	2	4	2	2	2	-	-	-	-
55	Φtl132b	B2	(a)	11	3	4	3	2	2	-	-	1	-
56	Φtl145a	B2	(g)	8	-	-	1	-	1	-	-	-	-

a) *L. gasseri*, b) *L. acidophilus*, c) *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, d) *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, e) *L. fermentum*, f) *Lactobacillus* spp., g) *L. agilis*, h) *L. coryniformis*, i) *L. jensenii*, j) *L. casei*

Damla yönteminde 100 laktobasil suşunun 72'inde bakteriyosin veya antibakteriyel aktivitenin bulunduğu, duyarlı konaklar üzerinde tam veya kısmen açılma şeklinde oluşturdukları inhibisyonlar ile belirlendi.

Test edilen laktobasil lizatlarından 35'inde, en az bir indikatör konak üzerinde tek plak oluşturması ile bakteriyofaj taşıdıkları belirlendi. Bakteriyofaj

içeren suşların belirlenmesinde izole edilen bakteriyofaj DNA'ları kalıp olarak kullanılarak DNA-DNA hibridizasyonu yapıldı (Tablo 13). Bu çalışma sonucunda ise belirlenen bakteriyofajlara ek olarak 21 laktobasil suşunun daha profaj içerdiği tespit edildi. Bu bakteriyofajlar test edilen indikatör laktobasil suşlarından herhangi birini enfekte etmediği için bakteriyofaj plakları gösterilemedi.

Çalışmada, duyarlı konak üzerinde tam yada yarım açılma şeklinde inhibisyon oluşturan 6 laktobasil suşunun bakteriyosin içerdiği, H₂O₂ veya asit etkisi ile duyarlı laktobasilleri inhibe ettikleri belirlendi.

Bakteriyofaj belirlenen laktobasiller, inhibe ettikleri duyarlı konaklar açısından incelendiğinde, profaj içeren laktobasillerin 18'inin 1 ile 10 farklı laktobasil suşları arasında değişen dar, 26'sının ise 11 ile 50 gibi oldukça geniş konak aralığına sahip oldukları gözlemlendi. Bu laktobasiller, duyarlı konaklarından bazılarının üzerinde tek plak oluşturmakta iken, büyük çoğunluğunda ise tam veya kısmi açılma şeklinde inhibisyon alanları oluşturdıkları belirlendi.

Çalışmada, 16 laktobasil suşunun, izole edilen bakteriyofajlar yüksek duyarlı oldukları belirlendi. Bu suşlardan 9 tanesi (TL026, TL048a, TL074a, TL075b, TL081, TL109b, TL114, TL136 ve TL150b) kendileri de bakteriyofaj taşımakta idi. Diğer 7 suşun (TL039b, TL042b, TL060b, TL067, TL109a, TL138 ve TL147) ise kendilerinin bakteriyofaj taşımadıkları belirlendi.

Laktobasil suşlarından üçünün bakteriyofajlara karşı dirençli olduğu saptandı. Bunlardan *L. gasseri* TL125 suşu Φtl125 bakteriyofajı ile lizojenikti ve de üç farklı laktobasile karşı antibakteriyel aktivite göstermekte idi. Diğer iki suş *Lactobacillus* ssp. TL150a ve *L. fermentum* TL153 profaj taşımadığı belirlendi. *L. fermentum* TL153, laktobasil suşlarının 23'üne karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edildi.

Çalışmamızda 7 kadından izole edilen laktobasillerde belirlenen bakteriyofajların, kendi orijinal laktobasil suşlarını enfekte ettikleri gözlemlendi (Tablo 10).

Tablo 10. Kendi Konaklarını Enfekte Eden (Otoenfeksiyon Yapan) Bakteriyofajlar

Sayı	Bakteriyofaj	Konak
1	Φtl021	<i>L. delbrueckii</i> subps. <i>delbrueckii</i> TL021
2	Φtl024	<i>L. gasseri</i> TL024
3	Φtl035	<i>L. delbrueckii</i> subps. <i>lactis</i> TL035
4	Φtl056c	<i>L. gasseri</i> TL056c
5	Φtl065	<i>L. acidophilus</i> TL065
6	Φtl113	<i>L. delbrueckii</i> subps. <i>lactis</i> TL113
7	Φtl132b	<i>L. gasseri</i> TL132b

Çalışmada, 4 kadından izole edilen birden fazla sayıdaki laktobasil suşlarında belirlenen bakteriyofajların, aynı hastadan izole edilen diğer laktobasil suşlarını enfekte ettikleri gözlemlendi. Bu laktobasil suşlarından *L. gasseri* TL109a taşıdığı bakteriyofaj Φtl109a aynı kadından izole edilen ve aynı türün farklı iki suşu olan *L. gasseri* TL109b ve *L. gasseri* TL109c'yi enfekte ettikleri belirlendi. *L. gasseri* TL139a'dan izole edilen Φtl139a'nın aynı hastadan izole edilen ve farklı bir tür olan *L. acidophilus* TL139c suşunu enfekte ettiği tespit edildi (Tablo 11).

Tablo 11. Aynı Bireyden İzole Edilen Laktobasil Bakteriyofajlarının Vaginal Florada Birlikte Bulunan Diğer Laktobasilleri Enfeksiyonu

Bakteriyofaj	Grup	Orjinal Konak	Enfekte Ettiği İndikatörler
Φtl056a	A1	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>L. gasseri</i> TL056c
Φtl056b	A1	<i>L. gasseri</i> TL056b	-
Φtl056c	A1	<i>L. gasseri</i> TL056c	-
Φtl109a	B1	<i>L. gasseri</i> TL109a	<i>L. gasseri</i> TL109b <i>L. gasseri</i> TL109c
Φtl109c	B1	<i>L. gasseri</i> TL109c	-
Φtl132a	B2	<i>L. gasseri</i> TL132a	<i>L. gasseri</i> TL132b
Φtl132b	B2	<i>L. gasseri</i> TL132b	<i>L. gasseri</i> TL132b
Φtl139a	B1	<i>L. gasseri</i> TL139a	<i>L. acidophilus</i> TL139c
Φtl139c	B1	<i>L. acidophilus</i> TL139c	-

4.3.3. Bakteriyofajların Kısmi Karakterizasyonları

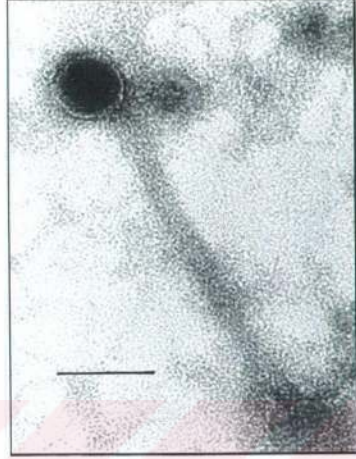
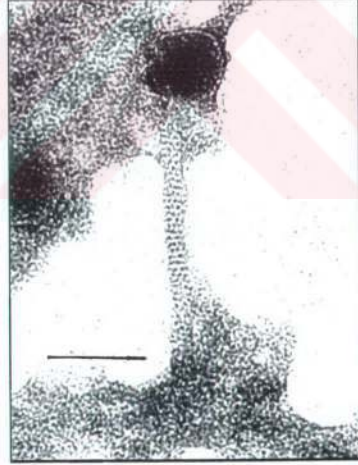
4.3.3.1. Bakteriyofajların Morfolojik Özelliklerinin Saptanması

Bakteriyofajların EM fotoğrafları incelenerek (89), Bradley'in sınıflandırmasına göre, A ve B gurubu bakteriyofajlar içinde yer aldıkları ve de 3 ayrı morfotipten (A, B1 ve B2) oluştukları gözlemlendi (Şekil 6 ve Şekil 7).

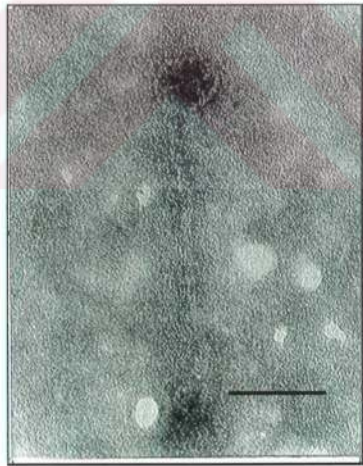
Bakteriyofajların EM'de çekilen fotoğraflarında, bakteriyofajların kuyruk ile baş büyüklükleri hesaplandı. Bu çalışmada izole edilen bakteriyofajların kuyruk uzunlukları 260-300 nm, baş büyüklükleri 50-85 nm oldukları tespit edildi. Bu bakteriyofajların morfotipleri, baş ve kuyruk büyüklükleri literatürlerde belirtilen bazı bakteriyofajlar ile karşılaştırıldı (Tablo 12).

Tablo 12. Bakteriyofajların Morfolojik Özellikleri

Bakteriyofajlar		Büyüklükleri (nm)	
Φtl No	Faj Tipi	Kuyruk	Baş
Φtl056c	A	350	65
Φtl087	A	300	85
Φtl138	A	290	60
Φtl033a	A	300	65
Φtl034c	B1	285	55
Φtl074c	B1	260	50
Φtl076	B1	285	55
Φtl122b	B1	325	70
Φtl125	B1	280	50
Φtl139c	B1	290	60
Φtl072	B2	265	68X75
Φkc021 ⁶²	A	175	40
Φkc039	B2	240	56X72
ΦJ-1 ¹⁰⁶	B1	290	55
ΦPL-1 ¹⁰⁷	B1	282X12	60
ΦPL-1 ¹⁰⁸	B1	276X10-12	56

Bakteriyofaj (ϕ tI033a)Bakteriyofaj (ϕ tI056c)Bakteriyofaj (ϕ tI087)Bakteriyofaj (ϕ tI138)

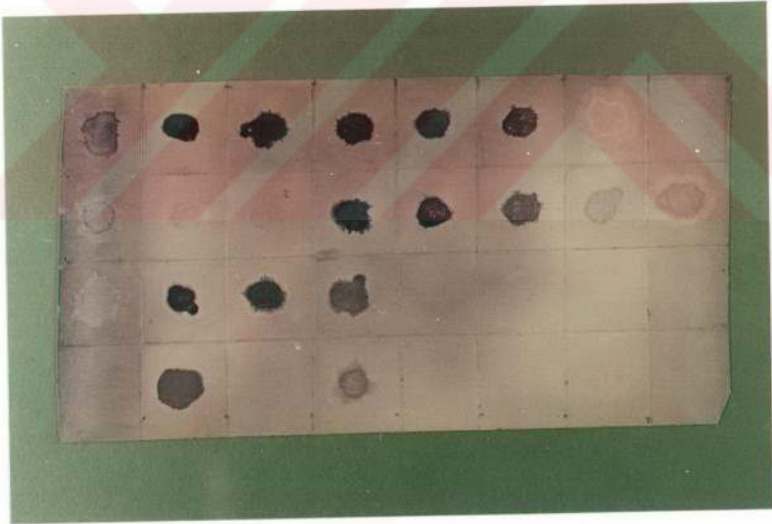
Şekil 6. Vajinal Kaynaklı Laktobasillerden İzole Edilen Morfotip A (ϕ tI033a, ϕ tI056c, ϕ tI087 ve ϕ tI138) Bakteriyofajları. (Bar = 100 nm).

Bakteriyofaj ϕ tl172Bakteriyofaj ϕ tl122bBakteriyofaj ϕ tl125Bakteriyofaj ϕ tl139c

Şekil 7. Vajinal Kaynaklı Laktobasillerden İzole Edilen Morfotip B 1 (ϕ tl122b, ϕ tl125 ve ϕ tl139c) ve B2 (ϕ tl072) Bakteriyofajları. (Bar = 100 nm).

4.3.3.2. Bakteriyofajların Genetik Karakterizasyonları

Bakteriyofaj grupları arasındaki genetik ybenzerliği saptamak için A grubu bakteriyofajlardan; Φ t1056b, Φ t1138, B1 grubundan; Φ t1032b, Φ t1034c, Φ t1075a, Φ t1141 ve B2 grubundan; Φ t1072 bakteriyofaj DNA'ları prob olarak kullanılarak dot blot hibridizasyon yapıldı. Hibridizasyon için; bakteriyofaj içeren laktobasillerin saflaştırılmış kromozomal DNA'ları ile bunlardan 13 tanesinin bakteriyofaj DNA'ları ve bakteriyofaj varlığı tek plak yöntemi ile tespit edilmeyen laktobasillerin kromozomal DNA'ları kullanıldı (Şekil 8, Tablo 13). Grup B1 bakteriyofaj DNA'larından yalnızca Φ t1075a ve Φ t1141 grupA bakteriyofaj probu ile hibridizasyon verdiği gözlemlendi. Grup A bakteriyofajları ise her üç grup bakteriyofaj probu ile hibridizasyon verdiği belirlendi. Laktobasil kromozomal DNA'ları ise grup B1 bakteriyofaj probu ile en sık hibride olduğu tespit edildi.



Şekil 8. Φ t1034c Probu ile Dot Blot Hibridizasyon.
a; 1-6, b; 4-6, C;2-4, d; 2 : Kuvvetli pozitif
a; 7, b; 1-3 ve 7-8, c;1, d;4 : Zayıf pozitif
Diğer örnekler: Negatif

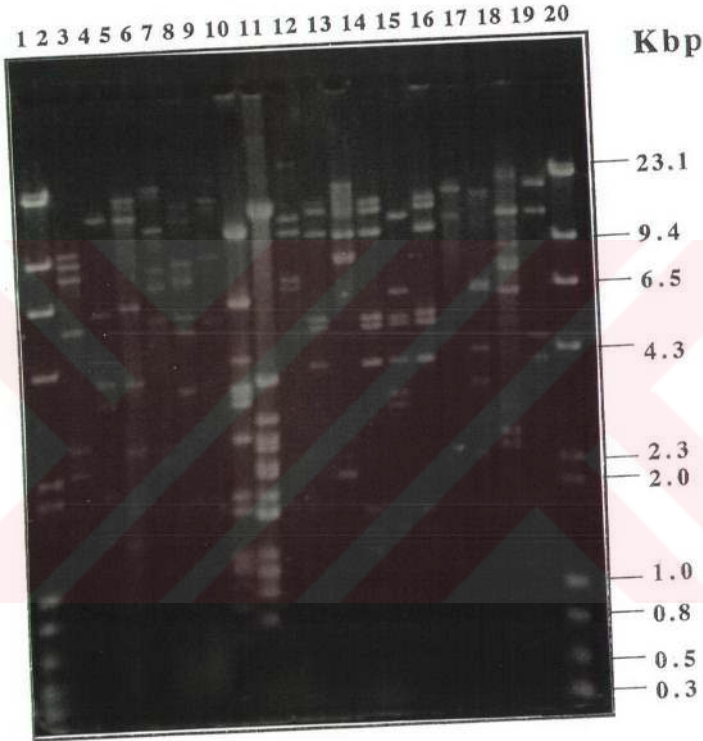
Tablo 13. Dot Blot Hibridizasyon Yöntemi İle Bakteriyofaj Grupları Arasındaki Benzerlik.

Bakteriyofaj DNA'ları	Probe A1		Probe B1				Probe B2
	Φtl056b	Φtl138	Φtl032b	Φtl034c	Φtl075a	Φtl141	Φtl072
Grup A							
Φtl033a	+	+	-	-	-	-	-
Φtl056b	-	+	-	-	+	-	-
Φtl087	+	+	-	+	+	+	+/-
Φtl102	-	-	-	+	+	+	+
Grup B1							
Φtl016	-	-	+	-	+	-	-
Φtl032a	-	-	+	+	-	-	-
Φtl034c	-	-	-	+	+	-	-
Φtl075a	+	+	-	+	+	+	-
Φtl076	-	-	-	-	+	+	-
Φtl141	-	+	-	+	+	+	-
Grup B2							
Φtl072	+	+	-	-	-	-	+
Lizojenik Bakteri Kromozomal DNA'ları							
TL033a	+	+	-	+	-	+	-
TL035	-	-	-	-	-	-	-
TL039b	-	-	-	-	+/-	-	-
TL056b	+	+	-	+	+	-	+
TL056c	-	-	-	-	-	-	-
TL061a	-	-	-	-	-	-	-
TL061b	-	-	-	-	-	-	-
TL065	-	-	-	-	-	-	-
TL067	+	+	-	-	-	-	+
TL073a	+	-	-	-	+	+	+
TL087	+	+	-	+	+	+	+
TL102	+	+/-	+	+	+	+	+
TL134	-	-	-	-	-	-	-
TL138	+	+	-	+	+	+	+
TL016	-	+/-	+	-	+	+/-	+/-
TL021	-	-	-	-	+	-	-
TL023a	-	-	-	-	+	-	-
TL023b	-	-	-	-	+	-	-
TL024	-	-	-	+	+	+	+
TL025a	+	+	-	+	+	+	+/-
TL027	-	-	-	-	+	-	-

Tablo 13'den Devam...

TL028	-	-	-	-	+	-	-
TL032b	-	-	+	+	-	-	-
TL034c	-	-/+	-	+	+	+	-
TL038a	-	+/-	-	+	+	+	-
TL038b	-	-	-	-	+	-	-
TL039a	-	-	-	-	+	-	-
TL041	-	-	-	+	+	+	-
TL042a	-	-	+	-	-	-	-
TL042b	-	-	+	-	-	-	-
TL049	-	-	-	+	-	+	-
TL060a	-	-	-	-	+	-	-
TL060b	-	-	-	+	-	-	-
TL074c	-	+/-	+	+	+	-	-
TL075a	+/-	+/-	-	+	+	+	+
TL076	-	-	-	+	+	+	-
TL108	-	-	-	-	+/-	+	-
TL109a	-	-	-	+	+	+	-
TL109c	-	-	-	+	-	-	-
TL111b	-	-	-	-	-	-	-
TL113	-	-	-	-	-	-	-
TL122b	-	-	+	-	-	-	-
TL125	-	-	-	+	+	-	-
TL127	-	-	-	-	+	-	-
TL129	-	-	-	-	-	+	-
TL139a	-	-	-	-	-	-	-
TL139c	-	-	-	-	-	-	-
TL141	-	+/-	+	+	+	+	-
TL143b	-	-	+	-	+	-	-
TL147	-	-	-	+	-	+/-	-
TL152	-	-	-	-	+	-	-
TL072	+	+	-	+	-	-	+
TL110	+	-	-	-	-	-	+
TL132a	-	-	-	+/-	-	-	+
TL132b	-	-	-	+/-	-	-	+
TL145a	-	-	-	-	+	-	+

Genom büyüklüğünün saptanması amacı ile 11 bakteriyofajın DNA'ları izole edilerek *EcoR* I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi (Şekil 9). Bu bakteriyofajların genom büyüklükleri, 36 -75 kb arasında değişen çift zincirli DNA'ya sahip oldukları saptandı (Tablo 14).

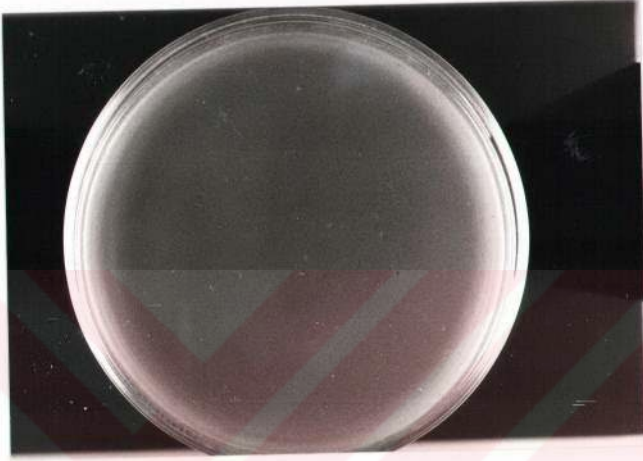


Şekil 9. Bakteriyofaj DNA'larının *EcoR* I ile Restriksiyon Enzim Analizi (89).
1-20; Moleküler ağırlık standardı, 2; Φ kc005, 3; Φ kc007, 4; Φ kc012, 5; Φ kc021, 6; Φ kc023, 7; Φ kc031, 8; Φ kc039, 9; Φ tl032b, 10; Φ tl033a, 11; Φ tl034c, 12; Φ tl072, 13; Φ tl074c, 14; Φ tl075a, 15; Φ tl76, 16; Φ tl122b, 17; Φ tl125, 18; Φ tl138, 19; Φ tl141.

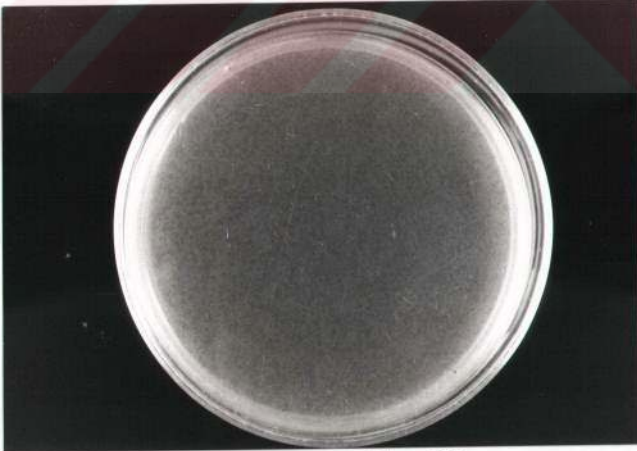
Tablo 14. Bakteriyofaj DNA'larının *EcoRI* Restriksiyon Enzim Analizi

FRAGMENT BÜYÜKLÜĞÜ (kb)										
ΦH032b	ΦH033a	ΦH034c	ΦH074c	ΦH076	ΦH072	ΦH075a	ΦH122	ΦH125	ΦH138	ΦH141
16.0	29.0	15.5	15.5	15.5	22.0	13.5	22.0	18.5	22.0	20.0
4.0	14.2	11.5	11.5	11.5	17.5	6.6	13.5	6.0	14.0	13.5
3.25	11.5	10.0	10.0	10.0	15.0	5.85	2.8	6.6	9.2	4.9
2.9	7.7	5.8	5.8	5.8	11.0	5.5	2.45	4.5	8.2	4.3
2.7	7.2	5.5	5.5	5.5	8.7	4.35		3.75	6.7	1.7
2.5		4.2	4.2	4.3	2.35	3.6		2.5	6.4	1.45
2.35		1.8	1.8	1.8		3.4			3.3	1.25
2.05		1.65	1.6	1.6		1.6			2.8	
1.8		1.37	1.37	1.37		1.35			2.6	
1.4										
11.25										
1.07										
41.27	69.6	57.32	57.27	57.27	59.05	45.75	36.95	40.35	51.78	42.7

İzole edilen bakteriyofajların spontan indüklenme oranları yaklaşık 10^{-6} olduğu (milyonda bir), duyarlı indikatörler üzerinde küçük, 0.5-1 mm çaplarında açılmış alanlar şeklinde plak morfolojisi gösterdikleri belirlendi (Şekil 10).



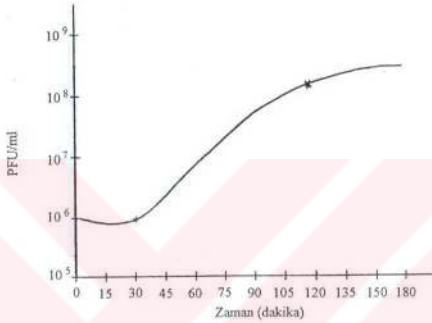
Bakteriyofaj Φtl033a (Grup A)



Bakteriyofaj Φtl122b (Grup B1)

Şekil 10. Bakteriyofaj Plak Morfolojileri.

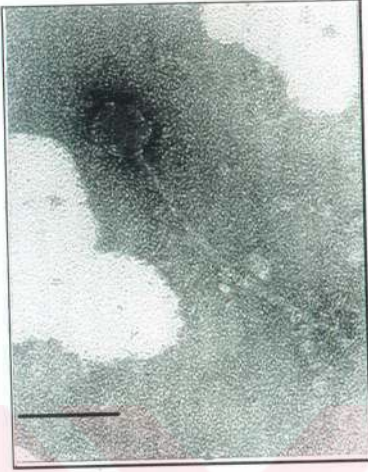
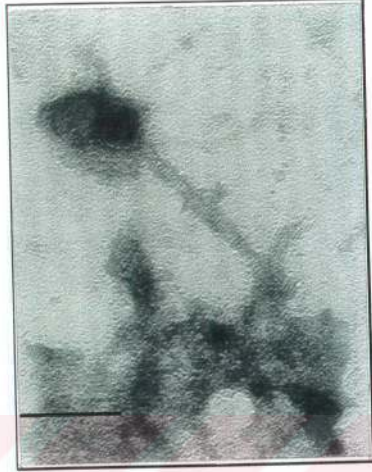
Bakteriyofaj Φ tl122b'nin yaşam siklusu incelendiğinde bakteriyofajın adsorbsiyon için gerekli zamanın 30 dak (latent periyot), enfeksiyon için gerekli zamanın (yükselme periyodu) 90 dak ve indikatör hücre başına üretilen bakteriyofaj partikülü sayısının (burst size) 200 olduğu tespit edildi (Şekil 11).



Şekil 11. Bakteriyofaj Φ tl122b Yaşam Siklusu.

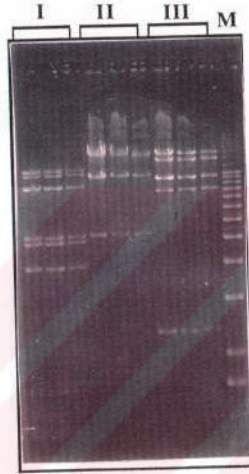
DNA analizi yapılan 11 bakteriyofajdan üçünün, (Φ tl034c, Φ tl074c ve Φ tl076) benzer *Eco*RI restriksiyon fragmanlarına sahip B1 morfortipindeki bakteriyofajlar oldukları tespit edildi. Bu bakteriyofajlar, farklı coğrafik bölgelerde; Giresun (NVF), (Φ tl034c), Trabzon (araform), (Φ tl074c) ve Gümüşhane'de (BV), (Φ tl076) yaşayan ve birbirleri ile akraba olmayan üç ayrı kadından izole edilen laktobasillerde tespit edildi.

Restriksiyon enzim analizlerinde benzer oldukları görülen üç bakteriyofajın morfolojik olarak da birbirlerine çok benzer oldukları, 50x55 nm büyüklüğünde hegzogonal başlı ve 260-285 nm uzunluğunda kılıfsız-kasılamayan kuyruklu bakteriyofajlar oldukları saptandı (Şekil 12, Tablo 13).

Bakteriyofaj ϕ tl034cBakteriyofaj ϕ tl074cBakteriyofaj ϕ tl076

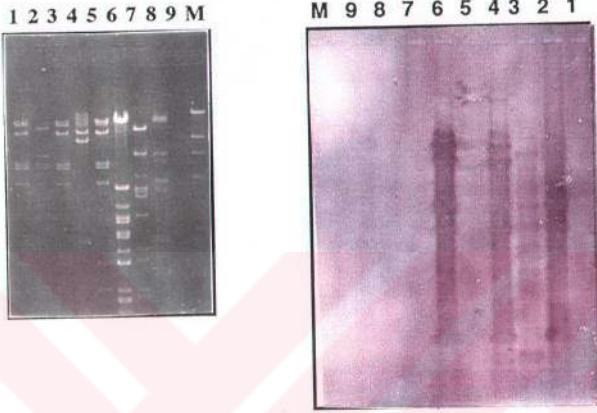
Şekil 12. Restriksiyon Enzim Analizleri Benzer Olan B1 Grubu Üç Bakteriyofajın Morfolojisi. (Bar=100 nm).

Grup B1 içinde yer alan ve morfolojik olarak benzer olan Φ t1034c, Φ t1074c ve Φ t1076 bakteriyofajlarının genetik olarak da benzer oldukları, bakteriyofaj DNA restriksiyon enzim analizi ile belirlendi. *EcoRI*, *PstI* ve *SalI* restriksiyon enzimleri ile elde edilen bakteriyofaj DNA fragmanlarının aynı olduğu saptandı (Şekil 13).



Şekil 13. Farklı Üç Kadından İzole Edilen Laktobasillere Ait B1 Grubu Bakteriyofajlardan Φ t1034c, Φ t1074c ve Φ t1076 Genomlarının Restriksiyon Analizi. I; *EcoRI*, II; *PstI*, III; *SalI*.

Birbirine benzerlik gösteren üç bakteriyofajın DNA fragmanlarının tümünün homolog olup olmadığı, Southern hibridizasyon yöntemi ile araştırıldı. *EcoRI* ile elde edilen bakteriyofaj DNA fragmanlarının tümünü biyotin ile işaretli bakteriyofaj Φ t1076 probu ile hibridize olduğu, aynı gruptan bir başka bakteriyofaj olan Φ t1075a'nın ise bir kısım bantlarının prob ile homoloji gösterdiği saptandı (Şekil 14).



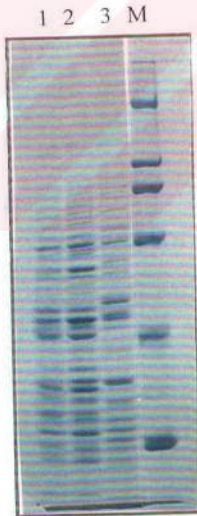
Şekil 14. *EcoRI* Restiksiyon Enzimi ile Kesilmiş B1 grubu Bakteriyofajlardan Φ tl034c, Φ tl074c ve Φ tl076 Genomlarının Sauthern Hibridizasyon Analizi. Prob; Φ tl076. 1; Φ tl076 2; Φ tl075a, 3; Φ tl074c, 4; Φ tl072 5; Φ tl034c, 6: Φ tl032b, 7; Φ kc039, 8; kc007, 9: Boş, 10: Lambda DNA (*Hind* III).

Morfolojik ve genetik olarak birbirlerine benzer bulunan üç bakteriyofajın izole edildiği laktobasil suşlarının identifikasyonu ve birbirlerine olan benzerlikleri konvansiyonel testler ve AP-PCR ile analiz edildi. TL034c ve TL074c S tipi koloni morfolojisine sahip, biyokimyasal özelliklerinin aynı olması ile Bergey's Manuel'e göre *L. delbrueckii* subs. *lactis*, TL076 ise R tipi koloni morfolojisi ve biyokimyasal özelliğine göre *L. gasseri* olarak tanımlandı (Tablo 15).

Tablo 15. Lactobasil TL034c, TL074c ve TL076'nın Biyokimyasal Özellikleri

Suş	Cellobiose	Galactose	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Starch	Glucose	Glycogen	Esculin	H ₂ O ₂	45°C
TL034c	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+
TL074c	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
TL076	+	+	-	+/-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-

Üç benzer bakteriyofajın konaklarının identifikasyonu için total hücre protein profilleri SDS-PAGE ile analiz edildi (Şekil 15).



Şekil 15. TL034c, TL074c ve TL076'nın Total Hücre Proteinlerinin SDS-PAGE Analizi.

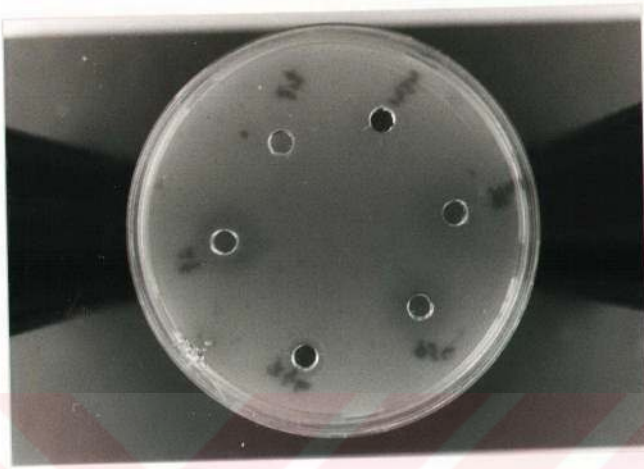
Suşlardan TL034c ve TL074c'nin total hücre protein profillerinin aynı, TL076'nın farklı olduğu belirlendi. Ayrıca *L. gasseri* adh integras genine spesifik primerler ve TL034c, TL074c ve TL076'nin kromozomal DNA'ları kullanılarak yapılan AP-PCR'da TL076'nın diğeri iki suştan farklı bir genotipe sahip olduğu tespit edildi (Şekil 16).



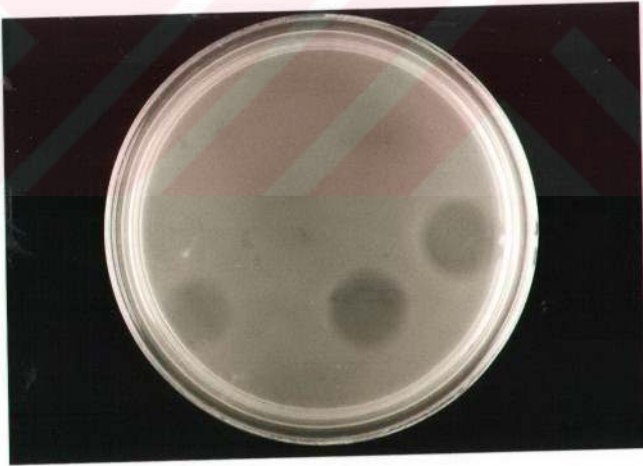
Şekil 16. TL034c, TL074c ve TL076'nın AP-PCR Analizi.

4.3.4. Bakteriyosinlerin Kısmi Karakterizasyonu

Antibakteriyel aktivite gösteren fakat bakteriyofaj belirlenemeyen lizatlar; bakteriyosin, H_2O_2 ve asit içeriğı yönünden incelendi. İncelenen lizatlarından *L. casei* TL029, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* TL059a, *L. gasseri* TL080, *L. gasseri* TL093c, *L. acidophilus* TL099a ve *L. gasseri* TL143a olmak üzere 6 suşun bakteriyosin ürettiğı belirlendi (Şekil 17). Bakteriyosin ile H_2O_2 üretiminin ayırt edilmesi için katalaz enzimine duyarlılıkları (Şekil 18) araştırıldı.



Agar Kuyucuk Yöntemi



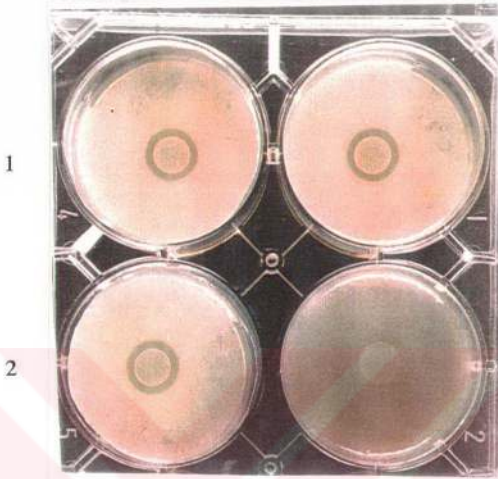
Damla (Drop Assay) Yöntemi

Şekil 17. Laktobasil Suşları Üzerine Bakterisinlerin Etkisi.

a) İnhibisyon zonu pozitif, b) İnhibisyon zonu negatif.

Katalaz Mevcut

Katalaz Yok



**Şekil 18. H_2O_2 Etkisinin Katalaz Enzimi İle İnhibisyonu.
İndikatör Laktobasil TL081**

1) Bakteriyosin Üreten Laktobasil (TL080)

2) H_2O_2 Üreten Laktobasil (TL074a)

Katalaz enzim aktivite testi sonucunda 6 suşun, (*L. gasseri* TL060d, *Lactobacillus* spp. TL074a, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* TL074b, *L. gasseri* TL137, *L. gasseri* TL146 ve *L. fermentum* TL154) H_2O_2 üretimi ile duyarlı konakları inhibe ettiği belirlendi.

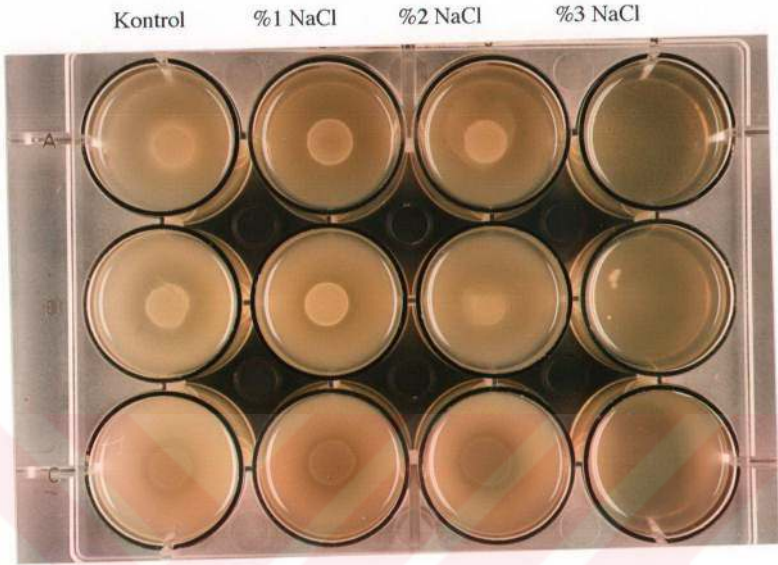
Bakteriyosinlerin fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı olan duyarlılıkları Tablo 16'de verilmiştir. Bakteriyosin TL029, TL059, TL080 ve TL099a'lar ısıya dirençli, tripsine duyarlı ve düşük molekül ağırlıklı bakteriyosin grubunda yer aldıkları belirlendi.

Bakteriyosin üreten laktobasil suşlarının, değişik besiyerlerinde spontan olarak bakteriyosin üretme özellikleri incelendi. Bu incelemede; MRS-T sıvı besiyerinde TL059a, TL080, TL099a ve TL143a'nın Rogosa SL sıvı besiyerinde TL093c, TL099a ve TL143a'nın, bakteriyosin ürettiği tespit edildi. TL029 spontan olarak, kullanılan MRS-T, MRS-H ve Rogosa SL besiyerlerinde bakteriyosin üretmediği veya düşük konsantrasyonda ürettiği için belirlenemediği, ancak mitomisin C ile indüklendiğinde bakteriyosin ürettiği gözlemlendi (Tablo 17)

Tablo 17. Antimikrobiyal Maddelerin İndüklenme Özellikleri

Suş No	Mitomisin C indüksiyonu	Spontan indüksiyon			% 4 NaCl	
	MRS-T	MRS-T	MRS-H	Rogosa	Üreme	Aktivite
TL029	1	0	0	0	-	
TL059a	4	1	0	0	+	0
TL080	1	1	0	1	+	0
TL093c	2	0	0	3	-	
TL099a	2	2	0	2	-	
TL143a	2	2	1	3	-	

Bakteriyosin üreten laktobasillere NaCl'ün değişik konsantrasyonlarının etkili olduğu belirlendi (Tablo 18). Bakteriyosin ürettiği belirlenen laktobasillerin hepsi %1, %2 ve %3 NaCl bulunan sıvı ortamda üreme özelliklerine sahip oldukları, yalnızca TL099a'nın %3'lük NaCl konsantrasyonunda üremediği tespit edildi. Laktobasillerden TL059 ve TL080'nin %4 NaCl ortamında üreyebildikleri fakat bakteriyosin üretmedikleri gözlemlendi. NaCl içeren katı agar ortamında da benzer sonuçlar elde edilmiş olup (Şekil 19) NaCl'ün %1 ve %2'lik konsantrasyonlarında suşların üreyebildiği ve %1 NaCl'ün bakteriyosin üretimini olumlu yönde etkilediği gözlemlendi. TL080'nin %3'lük NaCl ortamında ürediği fakat bakteriyosin üretimi aktivitesinin azaldığı izlendi. NaCl'ün %1 konsantrasyonu bakteriyosin üretimini artırırken, %2, %3 ve %4 gibi artan konsantrasyonlarında ise aktiviteyi azalttığı ya da inhibe ettiği gözlemlendi.



Şekil 19. NaCl'nin Bakteriyosin Üretimine Etkisi.

A) İndikatör *L. acidophilus* TL081, Bakteriyosin Üreten *L. gasseri* TL143a, B) İndikatör *L. gasseri* TL074a, Bakteriyosin Üreten *L. delbrueckii* subsp. *lactis* TL059a, C) İndikatör *L. acidophilus* TL081, Bakteriyosin Üreten *L. gasseri* TL080.

Tablo 18. Bakteriyosin Üretimine NaCl'ün Etkisi

Suş No	Kontrol	% 1 NaCl	% 2 NaCl	% 3 NaCl	% 4 NaCl
	mm	mm	mm	mm	Sıvı
TL029	0.5	0.5	-	ÜY	ÜY
TL059a	1	1.5	-	ÜY	0
TL080	1	1.5	1	1	0
TL093c	1	2	0.1	-	ÜY
TL099a	1	4	ÜY	ÜY	ÜY
TL143a	-	-	-	-	ÜY

ÜY: üreme yok, 0: Üreme var fakat indüklenme yok,
(-): İnhibisyon zonu yok

4.3.5. Bakteriyosinlerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Saptanması

Çalışmada belirlenen bakteriyosinlerin *G. vaginalis* ATCC 14018, *E. coli* ATCC 25922, *P. vulgaris* ATCC 13315, *P. aeruginosa* ATCC 10145, *E. cloacae* ATCC 13047, *S. milleri* IS51, *S. aureus* ATCC 25923 ve *C. albicans* ATCC 60193 suşlar üzerine antibakteriyel aktiviteleri agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile test edilmiştir (Tablo 19). Bakteriyosinlerin, *P. aeruginosa* ATCC 10145 suşuna karşı güçlü bir antibakteriyel etkiye sahip oldukları belirlendi.

Tablo 19. Bakteriyosin Üreten Laktobasil Suşlarının Antibakteriyel Aktiviteleri

İndikatör Suşlar	Bakteriyosinjenik Suşlar					
	TL029 (c)	TL059a (d)	TL080 (a)	TL093c (a)	TL099a (b)	TL143a (a)
<i>L. gasseri</i> (a)	0/44	2*/44**	1/44	10/44	0/44	13/44
<i>L. acidophilus</i> (b)	1/11	1/11	0/11	1/11	1/11	2/11
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> (c)	0/14	0/14	0/14	1/14	0/14	1/14
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> (d)	0/9	0/9	0/9	2/9	0/9	3/9
<i>L. fermentum</i>	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4	1/4
<i>L. jensenii</i>	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	1/2
<i>L. coryniformis</i>	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	1/1
<i>L. agilis</i>	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>L. casei</i>	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
<i>G. vaginalis</i> ATCC14018	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1
<i>S. milleri</i> IS51	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>C. albicans</i> ATCC 60193	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

* Enfekte ettiği suş sayısı, ** Test edilen suş sayısı

H₂O₂'in laktobasil suşları üzerine, hangi konsantrasyonun inhibisyon etkisi gösterdiği ve de katalazın H₂O₂'i hangi konsantrasyonda inhibe ettiğini belirlemek amacı ile katalaz ihtiya eden ve etmeyen %1, %2, %3 ve %4'lük H₂O₂ konsantrasyonları TL081 ve TL074a suşları üzerinde test edildi (Tablo 20). Laktobasillerin %3 H₂O₂ konsantrasyonunda inhibe oldukları ve kullanılan katalaz konsantrasyonunun bu %3'lük H₂O₂'yi nötralize ettiği belirlendi.

Tablo 20. Laktobasil Suşlarına H₂O₂ Etkisi

İndikatör	%1 H ₂ O ₂	%1 H ₂ O ₂ + Katalaz	%2 H ₂ O ₂	%2 H ₂ O ₂ + Katalaz	%3 H ₂ O ₂	%3 H ₂ O ₂ + Katalaz	≥4% H ₂ O ₂	≥ %4 H ₂ O ₂ + Katalaz
TL081	-	-	+/-	-	+	-	+	+
TL074a	-	-	+/-	-	+	-	+	+

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Trabzon çevresindeki kadınların laktobasil popülasyonu ve bunların bakteriyofaj veya bakteriyosin içerikleri saptanarak literatür bilgileri ışığında tartışıldı.

Artmış vajinal akıntı şikayetleri nedeni ile kadın doğum polikliniklerine başvuran 15-60 yaş grubundaki 75 kadından alınan vajinal sürüntü örneğinden 100 laktobasil suşu izole edildi. Doğurganlık yaş gruplarındaki kadınların daha sık vajinal enfeksiyon şikayetleri ile karşılaşmaları ve jinekoloji polikliniklerine başvurmaları nedeni ile çalışma grubundaki kadınların %93'ü 18-49 yaşları arasında yer almaktaydı (Tablo 3).

Vajinal sürüntü örnekleri makroskobik ve mikroskobik olarak incelenerek BV tanı kriterlerine göre değerlendirildi. Kadınların %18'inin BV, %11'inin VK, %6'sının araform olduğu belirlenirken %60'ı normaldi (Tablo 4).

Çalışmamızda izole edilen fakültatif anaerobik laktobasil suşlarının identifikasyonu, klasik ve biyokimyasal testler ile yapılarak laktobasillerin tür dağılımları tespit edildi (Tablo 5). Kadınların 44'ünde *L. gasseri*, 23'ünde *L. delbrueckii* 12'sinde *L. acidophilus* en sık rastlanan laktobasil türleri oldukları belirlendi. *L. fermentum*, *L. jensenii* ve *L. casei* ise nadir izole edildi. Laktobasil türlerinin dağılımlarına bakıldığında, *L. gasseri* suşlarının hem enfeksiyonlu hem de sağlıklı kadınlarda en yüksek oranda izole edilen tür olduğu ve enfeksiyon oluşumu ile laktobasil türlerinin farklılığı arasında bir ilişki olmadığı gözlemlendi.

Normal flora olarak belirlenen çalışma grubunda, laktobasillerin kantitatif miktarları, farklı tür ya da suş sayıları enfeksiyonlu hastalardan daha fazla (1-4) olduğu, BV'li ve araformdaki kadınlarda ise laktobasil popülasyonunun azaldığı gözlemlendi. BV'li ve araformdaki hastalarda, çalışmanın amacı doğrultusunda (özellikle enfeksiyon etkeni olarak bakteriyofaj taşıyıcılığı) tek koloni laktobasil üreyen örnekler dahi değerlendirildi ve izole edilen suşlar çalışma kapsamına alındı.

Laktobasil izolasyonunda, yalnızca mikroaerofilik kültür yöntemi kullanılmış olması, zorunlu anaerobik laktobasillerin izolasyonunu önlemiştir. Enfeksiyonlu ve normal vajinal floraya sahip kadınlarda birden fazla sayıda laktobasil suşu izole edilmekle birlikte, obligat anaerobik kültür koşullarında (anaerobik transfer ve anaerobik ekim vb) laktobasil izolasyonunun yüksek olacağı düşünülmektedir.

BV'li 14 kadının üçünde (%21) iki farklı laktobasil suşu izole edilmiş, bunlardan birinde *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*'nin (TL023a ve TL023b) iki suşu olduğu gözlenirken, diğer ikisinde ise *L. gasseri*'nin *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (TL038a ve TL038b) ile *L. agilis* (TL145a ve TL145b) birlikteliği gözlenmiştir (Tablo 5). Diğer 11 BV'li kadından 8'inde *L. gasseri*, 2'sinde *L. fermentum* ve birinde ise *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* izole edilmiştir. *L. gasseri*, BV'li kadınlarda en fazla bulunan suş olarak tespit edilmiştir.

VK'lı 9 kadından 3'ünde (%33) iki farklı laktobasil türü izole edildi. Bunlar *L. casei* TL055a ve *L. acidophilus* TL055b olarak tanımlandı (Tablo 5). İki kadında ise aynı türün iki farklı alt türü, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* TL042a ve TL042b ile *L. delbrueckii* subsp. *lactis* TL059a ve TL059b izole edildi. Tek laktobasil izole edilen 6 kadından 3'ünde *L. gasseri*, 1'inde *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, 1'inde *L. jensenii* ve 1'inde de *L. acidophilus* belirlendi. VK'lı bu kadınlarda farklı laktobasil türlerinin bulunabildiğini göstermiştir.

Ara form klinik tablo gösteren 6 kadından 3'ünün (%50) vajinal florasında birden fazla ve değişik laktobasil türleri izole edilmiştir (Tablo 5). Bunlardan birinde iki *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (TL074b ve TL074c) ile *Lactobacillus* spp. TL074a, diğerinde iki *L. gasseri* (TL109a ve TL109c) ile *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (TL109b) ve birinde de *L. gasseri* (TL139a) ile *L. acidophilus* (TL139c) birliktelikleri gözlenmiştir. Tek suş izole edilenlerde ise, *L. acidophilus*, *L. gasseri* ve *Lactobacillus* spp. belirlenmiştir. BV ve VK enfeksiyonlu kadınlarda olduğu gibi ara form kliniğe sahip kadınlardan da en sık *L. gasseri* izole edilmiştir.

NVF'li 46 kadından 12'sinde (%26) birden fazla laktobasil suşu izole edildi ve bunların 7'sinde, farklı tür laktobasillerin bulundukları belirlenmiştir. Kadınlardan yalnızca birinde, 4 farklı suş izole edilmiş olup ikisi *L. gasseri* (TL060c ve TL060d), biri *L. acidophilus* (TL060b) ve biri de *L. delbrueckii*

subsp. *lactis* (TL060a) olarak tespit edilmiştir. NVF'li kadınlarda, *L. gasseri* ile *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. gasseri* ile *Lactobasillus* spp. ve *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ile *Lactobasillus* spp. Birliktelikleri gözlenmiştir.

Çeşitli popülasyonlarda yapılan çalışmalarda BV insidansının %15-45 arasında değiştiği bildirilmektedir (14, 109, 110). Hamile kadınlarda yapılan bir çalışmada, BV %23, ara form %27 ve NVF %50 olarak belirlenmiş, NVF'lilerin %95'inde, araformdaki kadınların %85'inde ve BV'lilerin %65'inde laktobasil izole edilmiştir (1). Bazı çalışmalarda, sağlıklı kadınların %96'sında ve BV'lilerin %52'sinde laktobasil izole edilmiş, NVF'li kadınların birinde ve BV'li kadınların 7'sinde anaerobik laktobasil suşları belirlenmiştir (14, 111). Hill ve ark (112), NVF'li kadınlarda %88 fakültatif, %10 zorunlu anaerobik, Horowitz ve ark (113), vajinozisli hastalarda %97, NVF'lilerde %40 zorunlu anaerobik, McGroarty ve ark (114), NVF'lilerde %96.8 fakültatif laktobasil ve bunların 5'inde de iki farklı laktobasil türü izole etmişlerdir.

Vajinal florada, *L. acidophilus* ve *L. fermentum* dominant, *L. jensenii*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. delbrueckii* ve *L. salivarius* türlerinin daha nadir bulundukları bildirilmektedir (81). George ve ark (115), biyokimyasal testler ve DNA-DNA hibridizasyon teknikleri ile yaptıkları çalışmada, vajinal florada en sık *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. fermentum* ve *L. crispatus* türlerini belirlerken *L. acidophilus*'u tespit edememişlerdir. Başka bir çalışmada, en sık *L. jensenii* ve sırası ile *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. brevis* türleri izole edilmiştir (114). Sağlıklı kişilerde yapılan bir çalışmada, *L. jensenii*, *L. acidophilus*, *L. casei* ve *L. gasseri* en sık izole edilen suşlar olarak bildirilmiştir (111). Çalışmamız, bu sonuçları kısmen desteklemektedir.

Konvansiyonel yöntemler kullanılarak yapılan tür identifikasyonu, yaygın kullanılmakla birlikte laktobasil tür sayısının artması, türler arasında benzerliklerin fazla olması ve karbohidrat testlerinde değişkenliklerin bulunması, identifikasyonda sorun yaratmaktadır. *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, ve *L. amylovorus* türleri konvansiyonel test yöntemleri ile birbirlerinden güç ayırt edilmektedir (116). Bu nedenle, tür tayininde konvansiyonel testlerin yanı sıra, suşların total protein profillerinin karşılaştırılması, DNA homolojileri, 16S rRNA sekansları, türe spesifik primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler yöntemlerin kullanılması tercih nedenidir.

İncelenen toplam 100 laktobasil suşunun 56'sında bakteriyofaj bulunduğu tespit edildi (Tablo 6). VK, ara form ve NVF'ye sahip kadınlarda bakteriyofaj taşıyıcılığı, %45 ile %50 arasında olduğu belirlenirken BV'li kadınlarda bu oran %88 olarak tespit edildi. VK'lı kadınlarda bakteriyofaj taşıyıcılığı diğer klinik bulgulara sahip kadınlar ile kıyaslandığında, farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p= 0.033$). Bu sonuçlar, BV oluşumunda bakteriyofajın etkili olduğu ve bakteriyofaj enfeksiyonu ile vajinal florada laktobasil popülasyonunun ortadan kalktığı ya da azaldığı düşüncesini desteklemektedir.

Ara form ve VK'lı kadınlarda bakteriyofaj taşıyıcılığı sağlıklı olanlara yakın oranda belirlendi. Vajinal kandidiyazis durumunda florada laktobasil sayısında azalma görülmemekte ve normal vajinal florada olduğu gibi bol miktarda laktobasil popülasyonu bulunmaktadır (116).

Çalışmamızda 14 yaşında bir hastada bakteriyofaj belirlendi. Seksüel aktivitesi olmayan bu hastada bakteriyofaj belirlenmesi, bakteriyofaj kaynağının ne olduğu sorusunu akla getirmektedir. Hasta, adet düzensizliği şikayeti ile kliniğe başvurmuş, fakat VK belirlenmiş olup izole edilen laktobasil suşunda bakteriyofaj tespit edilmiştir. Hastaya sorulan kişisel sorularda; antibiyotik kullanmadığı, yoğurt gibi probiyotik ürünlerle beslendiği ve hijyen koşullarına dikkat ettiği belirlenmiştir. Kız çocukları, doğum esnasında anneden bulaşan lizojenik laktobasiller ile enfekte olabilmektedirler. Bu konunun desteklenmesi için; hastanın intestinal laktobasilleri, annesinin laktobasilleri ve beslendiği gıdalardaki laktobasil suşları incelenmelidir.

Son yapılan çalışmalarda bir çok kadında vajinal laktobasil türlerinin rektal ve intestinal laktobasil türleriyle benzer olduğu ve bu suşların vajinal kaynaklı laktobasilleri enfekte edebildikleri belirlenmiştir (62, 117). İntestinal flora, çevresel etkilere açık olup değişik kaynaklı laktobasilleri içermektedir. Dolayısı ile intestinal laktobasil bakteriyofajları vajinal laktobasilleri enfekte etmek için bir rezervuar görevi görebilmektedir. Bakteriyofaj ile enfekte olmuş laktobasillerin, kadınlar arasında nasıl yayıldığı tam olarak bilinmemekle birlikte, kaynak olarak çevresel etkilerin, anneden çocuğa doğum kanalından geçerken enfektif bir suşun geçmesi ve kolonize olması şeklinde veya partner değişimi nedeni ile kadınlar arasında birbirlerine taşınma şeklinde olabileceği düşünülmektedir.

Laktobasiller, süt endüstrisinde başlatma kültürü olarak büyük bir öneme sahiptir. Bu nedenle gıda orjinli laktobasil bakteriyofajları ve bakteriyosinleri

oldukça fazla sayıda (süt, salam, sosis, et kültürleri, ince barsak ve vajen orjinli) çalışılmıştır. Bu sayede çevrede, değişik kaynaklarda, farklı laktobasil türlerinin bulunmakta olduğu ve bunların tempere bakteriyofaj taşıdıkları ortaya konmuştur (118). İnsanların farklı laktobasil türlerini içeren besin kaynakları ile beslenmeleri, intestinal florada farklı laktobasil türlerinin kolonize olması ve bunların da farklı bakteriyofajları içermesi değerlidir. Bir kadının vajinal kaynaklı laktobasillerinden izole edilen lizojenik bir bakteriyofaj, diğer bir kadının vajinal kaynaklı laktobasilleri için litik olabildiği yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (42, 61). Yapılan diğer bir çalışmada, vajinal orjinli laktobasillerin %20'sine yakını intestinal floradan izole edilen laktobasil bakteriyofajları tarafından enfekte olabildikleri bildirilmektedir (119). Bu durum, bakteriyofajların bir konak sınırlandırması yaptığını göstermekle birlikte, farklı laktosabil bakteriyofajları ve bunları içeren ürünler ile beslenen insanlar düşünüldüğünde, dış kaynaklı bakteriyofaj ile enfekte olma olasılığının yüksek olduğu görülmektedir.

Bakteriyofaj taşıyıcılığı *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. agilis*, *L. fermentum* türlerinde tespit edilmiştir (Tablo 7). *L. gasseri* suşlarının en fazla izole edilen laktobasil türü olmasına rağmen bakteriyofaj taşıyıcılık oranı en yüksek *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (%78.5) ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (%66.6) suşlarında bulunduğu belirlenmiştir.

Yapılan çapraz enfeksiyonda, lizojenik olarak bulunan ve indüklenme ile elde edilen bakteriyofajların, bir çok farklı hastadan izole edilen laktobasil suşlarını veya kendi orjinal suşunu enfekte ederek litik aktivite gösterdiği saptandı (Tablo 8).

Bakteriyofaj içeren lizatların bir kısmının litik aktivite gösterdikleri konakların sayısı sınırlı iken (1-10), diğer bazılarında oldukça geniş olduğu (11-50) belirlendi.

Bakteriyofajların çoğu, konağa spesifik olup az sayıda konağa sahiptir ve konak bakterinin gelişme aktivitesi durduğunda onların da işlevi durmaktadır (116, 120). Buna karşın çalışmamızda, dar konak aralığına sahip bakteriyofajlardan 3'ü ve geniş konağa sahip fajların tümü, indikatörün üremesinin durduğu durumda da litik evreye devam ettiği ve inhibisyon zonunun genişlediği gözlemlendi. Bu, suşların bakteriyofaj içeriği ile birlikte antibakteriyel aktiviteye de sahip olduğunu ve test plaklarının bir iki hafta gibi uzun süre bekletildiğinde,

oluşan antibakteriyel ürünler nedeni ile inhibisyon zonların genişlemesi şeklinde düşünülmektedir.

İzole edilen laktobasil suşlarının 16'sının, belirlenen 56 bakteriyofaja yüksek oranda duyarlı konaklar oldukları görüldü. Bunların 7'si (TL039b, TL042b, TL060b, TL067, TL109a, TL138 ve TL147) bakteriyofaj içeren laktobasil suşları idi. Bu suşlar, bakteriyofajların karakterizasyon çalışmalarında kullanıma uygun suşlar oldukları tespit edildi.

İzole edilen laktobasil suşlarından TL125, TL150a ve TL153 izole edilen 56 bakteriyofaj ile enfekte olmadıkları, dolayısı ile bakteriyofaj enfeksiyonlarına karşı dirençli oldukları tespit edildi. Dirençli bulunan bu üç suştan birinin profaj içerdiği (Φtl125), diğer ikisinin içermediği ve de her üçünün de normal vajinal floraya sahip hastalardan izole edildikleri saptandı. Bu suşlarda, muhtemelen bakteriyofaj direnç mekanizmaları bulunduğu, dolayısı ile bakteriyofaj enfeksiyonlarına karşı dirençli oldukları tahmin edilmektedir. *Lactobacillus* spp. TL150a'nın yavaş üreyen bir laktobasil suşu olması, bu suşun bakteriyofaj enfeksiyonuna dirençli olmasının bir nedeni olabilir.

Yapılan bir çalışmada *Streptococcus cremoris*'de spontan bakteriyofaja direncin, 8×10^{-4} ile 6×10^{-7} arasında olduğunu belirlenmiştir. Laktik asit bakterilerinde bakteriyofaj defans mekanizması olarak lizojenik immünitinin oluşumu oldukça sıktır. Lizojenik immünite, yalnızca yakın ilişkili fajlarda gözlenmektedir (121).

İzole edilen toplam 56 bakteriyofajın EM fotoğrafları, DNA-DNA homoloji analizi ve konak genişlikleri göz önüne alınarak yapılan gruplandırmada; 14 bakteriyofajın gurup A, 41'inin gurup B (37'si morfotip B1 ve 5'i morfotip B2) bakteriyofajları olduğu belirlendi. Bakteriyofajların damla yöntemi ile inhibe ettikleri konakların türleri ve sayıları incelendiğinde, morfotip A grubundaki bakteriyofajların daha fazla sayıda konağa ve konak tür çeşitliliğine sahip oldukları belirlendi (Tablo 9). Bakteriyofajların tek plak oluşturdıkları indikatör türlerin, *L. gasseri*, *L. acidophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* türleri oldukları saptandı. İncelenen populasyon içinde bakteriyofaj taşıyan ve bakteriyofajlara konaklık edebilen suşların yaygın olduğunu, dolayısı ile bakteriyofaj kontaminasyonu veya indüksiyonu nedeni ile vajinal enfeksiyonların oluşabileceği düşünülmektedir.

Bakteriyofajlardan Φ tl016 ve Φ tl122b, yalnızca izole edildikleri orjinal konak türlerinden birini tek plak oluşturarak enfekte ettikleri, dolayısı ile sınırlı bir konağa sahip oldukları görüldü. Bakteriyofajların 14'ü ise kullanılan konakların hiç birini, hatta orjinal konak türündeki diğer suşları dahi enfekte etmediği, dolayısı ile bu fajların konak spesifikliği gösterdikleri belirlendi. Grup A bakteriyofajlarından Φ tl067 ve Φ tl073a hariç diğerleri hem izole edildikleri, hem de farklı laktobasil türlerini enfekte etme özellikleri, grup B bakteriyofajlarından daha fazla olduğu gözlemlendi. Grup B1 bakteriyofajlarından Φ tl024, Φ tl034c, Φ tl075a ve Φ tl076 geniş konak aralığına sahip bakteriyofajlar olduğu saptandı.

Çalışmada, 7 kadından izole edilen laktobasil suşuna ait bakteriyofajların, kendi konaklarını enfekte ettikleri (otoenfeksiyon) saptandı (Tablo 10).

Profaj taşıyan lizojen bakteriler, bakteriyofaj genomunda kodlanan süper enfeksiyon immünite'den dolayı taşıdıkları bakteriyofajlara karşı immüdürlere ve enfekte olmazlar. Bu olay, konak bakteri kromozomu üzerinde bulunan profaj genleri veya bakteriyofaj reseptör proteinleri aracılığı ile kontrol edilmekte ve bir vajinal laktobasil suşu tarafından salınan bakteriyofajın tekrardan aynı konağı niçin enfekte etmediğini açıklamaktadır (120). Bazı bilinmeyen nedenlerle profaj, bakteri kromozomundan atılmakta (cure) ve bu konak aynı bakteriyofaja duyarlı hale gelmektedir. Çalışmamızda, kendi konağını enfekte eden 7 laktobasil bakteriyofajın bu şekilde atıldığı ve bakterilerin aynı bakteriyofaja duyarlı hale geldiği tahmin edilmektedir. Bu konunun aydınlatılması için detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Aynı kadından izole edilen laktobasil bakteriyofajlarının vajinal florada birlikte bulunduğu diğer laktobasil suşlarının enfekte ettiği belirlendi (Tablo 11). Laktobasil TL109a suşundan izole edilen Φ tl109a bakteriyofajı; aynı hastadan izole edilen ve bakteriyofaj içermeyen TL109b (*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*) ile bakteriyofaj içeren TL109c (*L. gasseri*) suşlarını enfekte ettiği saptandı. Bakteriyofajların, aynı hastadan izole edilen diğer laktobasil suşlarını enfekte etmesi, vajinal enfeksiyon oluşması açısından oldukça önemli bulunmuştur. Çünkü, herhangi bir nedenle indüklenen bir bakteriyofaj, florada bulunan duyarlı laktobasilleri enfekte edip popülasyondaki sayılarını azaltacak, ortamın pH'sının yükselmesine ve fırsatçı patojenlerin hakim duruma geçip enfeksiyon oluşturmalarına zemin hazırlayacaktır. Bu bulgular, vajinal florada

birden fazla laktobasil türünün bulunabileceğini, her birinin de farklı bir profaj taşıyabileceğini ve asıl konak üzerinde ılımlı olan bu bakteriyofajların, diğer laktobasil suşları üzerinde litik özellik gösterebileceklerini ortaya koymaktadır.

Pavlova ve ark (62) yaptıkları bir çalışmada, çapraz enfeksiyon ile aynı kadından elde edilen farklı laktobasil suşlarını ve değişik kadınlardan izole edilen farklı tür laktobasilleri enfekte ettiklerini, in vitro olarak tespit edilmişlerdir. Vajinal orjinli laktobasil bakteriyofajlarının bir çok farklı laktobasil türünü enfekte etmesi, vajinal sağlığı tehdit etmesi açısından önemli bir etken oluşturmaktadır.

İzole edilen bakteriyofajlardan 11'inin EM fotoğrafları çekilerek baş büyüklüğü ve kuyruk uzunlukları ölçüldü (Tablo 12). Grup A bakteriyofajlarının (Şekil 6), 290-350 nm uzunluğunda kasılabilir kuyruk ve 60-85 nm çapında hekzagonal baş içerdikleri, grup B bakteriyofajlarının (Şekil 7), 260-350 nm uzunluğunda kılıfsız, uzun kuyruk içerdikleri, fakat baş morfolojilerine göre, B1 ve B2 şeklinde iki morfotipe ayrıldıkları görüldü. Bradley'in grup C bakteriyofajları, vajinal orjinli laktobasillerde saptanamadı. Literatürlerde belirtilen laktobasil bakteriyofaj morfolojileri ile bu çalışmada elde edilen bulguların benzerlik gösterdiği belirlendi (62, 99, 107, 122).

Günümüze kadar karakterize edilen laktobasil bakteriyofajlarının büyük çoğunluğu Bradley'in yapmış olduğu bakteriyofaj sınıflandırmasına göre grup A ve B fajları içinde yer almaktadır (51). Bunlar; kılıflı-kasılabilir ve kılıfsız-kasılamayan uzun kuyruklu bakteriyofajlardır. Morfolojik olarak, kuyruk tablası ve fiberleri içerip içermemeleri, kuyruk-baş büyüklükleri ve baş morfotipi gibi küçük farklılıklarla ayrılmaktadırlar. Cluzel (123), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bakteriyofajlarında üçlü bir halka, Sechaud (118), *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ve *L. salivarius*'da uzamış baş (51) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *L. helveticus* 'da (119) morfotip A diye sınıflandırılan kasılabilir kuyruklu fajları belirlemişlerdir.

Bakteriyofaj gruplarının genetik benzerlikleri, dot blot hibridizasyon tekniği ile araştırıldı (Şekil 8, Tablo 13). Grup A'dan Φ tl056b ve Φ tl138, grup B1'den Φ tl034c, Φ tl075a ve Φ tl141 ve grup B2'den Φ tl072 bakteriyofajlarına ait DNA'lar prob olarak işaretlendi. Bu problemlerin izole edilen bakteriyofajlardan Φ tl056b, Φ tl072, Φ tl073a, Φ tl075a Φ tl087 ve Φ tl102 bakteriyofajları her üç gruba ait bakteriyofaj problemleri ile hibridizasyon verdikleri gözlemlendi. Bu sonuç,

farklı kadınlardan izole edilen değişik laktobasil türlerinde belirlenen bakteriyofajlar arasında genom düzeyinde benzerliklerin, dolayısı ile akrabalığın olduğunu göstermektedir. Ayrıca, üç morfotip ile hibridizasyon veren bakteriyofajların konak genişliklerinin de benzer olduğu ve çok sayıda farklı laktobasilleri enfekte ettikleri görüldü.

Lizojenik konak, litik baktiroyofaj için bir rezervuar görevi görür. *Lactobacillus* spp., *S. thermophilus* ve *Lactococcus* spp.'nin içerdikleri bazı litik ve lizojenik bakteriyofajlar arasında genetik bir akrabalığın bulunduğu belirtilirken, çoğu virulan bakteriyofajların lizojenik bakteriyofajlar ile genetik akrabalıklarının bulunmadığı hatta bir çok çalışmada litik ve lizojenik bakteriyofajlar arasında homoloji gözlenmediği kaydedilmiştir (51).

Bakteriyofajların bir kısmında, DNA restriksiyon enzim analizi yapılarak genom büyüklükleri saptandı (Şekil 9, Tablo 14). İzole edilen bakteriyofajların lineer (restriksiyon enzimleri ile kesilmesinden dolayı), çift zincirli ve 36 ile 70±0.5 kb büyüklüğünde DNA genomlarına sahip oldukları belirlendi. Bakteriyofaj Φ tl034c, Φ tl074c ve Φ tl076'nın genom fragmentlerinin ve büyüklüklerinin tamamen benzer olduğu görüldü.

B1 gurubunda yer alan ve genetik olarak birbirine çok benzer olan Φ tl034, Φ tl074c ve Φ tl076 bakteriyofajlarında morfolojik olarak da birbirlerine benzemekte oldukları (Şekil 12), 50X55 nm büyüklüğünde hegzogon bir baş ile kılıfsız-kasılmayan kuyruktan oluştukları görüldü. Spontan indüklenme oranları, plak morfolojileri ve yaşam siklusları gibi davranış özellikleri ile bakteriyofaj DNA restriksiyon enzim (*EcoRI*, *PstI* ve *SalI*) analizleri (Şekil 13) bir birlerine benzer bulundu. Bu bakteriyofajlar arasındaki genetik benzerlik, Sauthern hibridizasyon yöntemi (Şekil 14) ile araştırıldı ve bu üç bakteriyofaj DNA fragmentlerinin, biyotin işaretli prob Φ tl076 ile tüm DNA fragmentlerinin hibridize olduğu, dolayısı ile benzer bakteriyofajlar oldukları belirlendi.

Bazı çalışmalarda, *L. gasseri* ϕ adh, *L. casei* FSV J-I ve PL-1 bakteriyofajlarının genom büyüklükleri incelenmiş ve 34-41 kb arasında oldukları belirtilmiştir (47, 108, 122, 124.). *L. plantarum* B2 bakteriyofajında 73 kb ve *L. delbrueckii* bakteriyofajlarında 75 kb büyüklüğünde olduğu bildirilmiştir (69, 70). Çalışmamızda belirlenen bakteriyofaj genom büyüklükleri literatür sonuçları ile uyum göstermektedir.

İzole edilen bakteriyofajların plak morfolojileri birbirlerine benzer olup B1 grubu bakteriyofaj plakların 0.5 ile 1 mm çapında ve A grubunda bulunan bakteriyofajlardan daha büyük olduğu tespit edildi (Şekil 10).

İzole edilen bakteriyofajların yaşam siklusu 120 dak olduğu (Şekil 11) ve hücre başına salınan bakteriyofaj partikül sayısının 200 olduğu tespit edildi. Laktobasil bakteriyofajlarında, latent periyodun 40-75 dak ve burst size 80-300 partikül/ml arasında değiştiği bildirilmiştir (103). En düşük burst size 12-14 faj partikülü ile *L. plantarum* B2 bakteriyofajında belirlenmiştir (69, 51).

Birbirlerine benzer bulunan üç bakteriyofaj efekte ettikleri duyarlı konaklar yönünden de incelendi. Bu incelemede, Φ tl034c ve Φ tl076'nın 6 farklı türe ait 46 suşu, Φ tl074c ise üç farklı türün 13 suşunu enfekte edebildikleri gözlemlendi. Bu sonuç, bakteriyofajların farklı laktobasil suş ve türlerini enfekte edebilme özelliğini ve bakteriyofajların çevreye kolaylıkla yayılabileceğini, dolayısı ile toplumsal sağlığı önemli ölçüde etkileyebileceğini göstermektedir.

Üç laktobasil suşunun tür tayinlerinde TL034c ve TL074c aynı, TL076'nın farklı bir tür olduğu tespit edildi (tablo 15). Aynı bakteriyofajı taşıyıp farklı laktobasil türleri olmaları ilginç bulunup, tür tayininin doğrulanması amacı ile total protein profillerine bakıldı ve Φ tl034c ve Φ tl074c'nin total protein profillerinin benzer, Φ tl076'nın farklı olduğu belirlendi (Şekil 15).

Bu sonuçları desteklemek için bu üç laktobasilin kromozomal DNA'ları ile *L. gasseri* adh bakteriyofajı integras genine spesifik primerler kullanılarak AP-PCR yapıldı (Şekil 16). Laktobasil TL034c ve TL074c suşları aynı, TL076'nın farklı bir genotipe sahip olduğu tespit edildi.

Farklı coğrafik bölgelerde yaşayan insanlarda morfolojik ve genetik olarak benzer bakteriyofajların bulunması, insan kaynaklı laktobasillerin yanısıra, gıda orjinli bir çok laktobasil suşunu enfekte edebilme yeteneklerinin olması bu bakteriyofajların insanlara çevreden veya fermente gıdalar yolu ile yayıldıkları fikrini doğrulamaktadır.

Laktobasillerin kromozomuna entegre bakteriyofajların (profaj), kimyasal, kontraseptif veya antibiyotik gibi değişik ajanlar ile indüklenmeleri sonucu litik sıklusa geçtiği ve duyarlı konakları enfekte ettiği bildirilmektedir. Litik enfeksiyon oluşturan bakteriyofajların, vajinal florada bulunan duyarlı laktobasil popülasyonunu elemine ederek fırsatçı patojenlerin dominant hale geçmelerine ve enfeksiyon oluşturmalarına neden olduğu düşünülmektedir.

Damlatma yöntemi ile indikatör suşlara inhibitör etki gösteren fakat, bakteriyofaj plağı oluşturmeyen ve bakteriyofaj probu kullanıldığında hibridizasyon vermeyen izolatlar, H_2O_2 , asit ve bakteriyosin içeriği yönünden araştırıldı. Bunlardan 6'sının bakteriyosin, 6'sının da H_2O_2 üretiminden dolayı duyarlı konaklar üzerinde inhibitör etki gösterdikleri belirlendi.

İzole edilen bakteriyosinlerin ısıya, değişik pH değerlerine ve proteolitik enzimlere olan duyarlılıkları araştırıldı (Tablo 16). Laktobasil TL029, TL059a, TL080 ve TL099a suşları tarafından üretilen bakteriyosinler; 10 dak $100^\circ C$ 'de bekletmeye dirençli, proteolitiklere duyarlı düşük molekül ağırlığında lantibiyotik içermeyen, düşük molekül ağırlıklı bakteriyosinler içinde yer aldıkları saptandı. TL093c ve TL099a suşları tarafından üretilen bakteriyosinler, ısıya, proteolitik enzimlere ve kloroforma duyarlı oldukları, dolayısı ile yüksek molekül ağırlığında ve yapısında lipid bulunan kompleks bakteriyosinler oldukları düşünüldü.

TL099a ve TL059a suşlarında bulunan bakteriyosinlerin düşük pH'da aktivitelerini kaybetmedikleri, buna karşın bazik pH'da ise belirlenen tüm bakteriyosinlerin aktivitelerini kaybettikleri gözlemlendi. Bakteriyosinlerin, pH 7.0'de aktivite göstermeleri, inhibisyonun asit üretiminden kaynaklanmadığını doğrulamaktadır. Tagg ve ark (32) tarafından yapılan çalışmada, bakteriyosinlerin bir çoğunun asidik pH'ya bazik pH'dan daha dayanıklı oldukları bildirilmektedir.

Antibakteriyel etkenlerin katalaza dirençli olması ve pH7.0'de aktivite göstermeleri; bakteriyosin olduklarını, proteolitik enzimlere karşı duyarlı olmaları; protein yapısında olduklarını, kloroforma dirençli olmaları ise; lipid içermediklerini göstermektedir. Toba ve ark (125), fekal orjinli *L. gasseri* ve *L. acidophilus* suşlarında bakteriyosin belirlemişlerdir. Bu bakteriyosinlerin katalaza, tripsine, aktinaza ve ısıya olan duyarlılıklarını agar kuyucuk diffüzyon yöntemi ile test ederek katalaz enzimine ve ısıya karşı dirençli olduklarını göstermişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar, belirledikleri *L. gasseri* bakteriyosinlerinden ikisini gasserisin A olarak tanımlamışlardır.

Çalışmamızda izole edilen *L. gasseri* suşlarından TL080'in ürettiği bakteriyosinin, katalaz enzimine ve kaynamaya dirençli, proteolitik enzimlere duyarlı olması yönünden, kaynamaya 20 dak dayanıklı ve proteolitik enzimlere duyarlı olan gasserisin A'ya benzer bir bakteriyosin olduğunu düşündürmektedir (125).

Tahara ve ark (126), *L. acidophilus* JCM1132 suşunda belirledikleri asidosin J1132'yi kısmen karakterize etmişler ve 80°C'de stabil, kaynamaya 30 dak dayanıklı, proteolitik enzimlere duyarlı, iki peptid yapılı bir bakteriyosin, Toba ve ark (127), *L. acidophilus*'da 60°C 'de 10 dak bekletme ile inaktive olabilen, proteolitik enzimlere duyarlı asidofilusin A'yı, Klaenhammer ve ark (128), ısıyadirençli olan laktosin F'yi ve Barefoot ve ark (34), *L. acidophilus* N2 suşunda, ısıya 100°C'de 60 dak dayanıklı, proteinaz K'ya duyarlı ve kloroforma dirençli, lipid içermeyen laktosin B'yi tespit etmişlerdir.

L. acidophilus TL099a tarafından üretilen bakteriyosinin, laktosin B'ye benzer bir bakteriyosin olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, vajinal orjinli laktobasilden izole edilen bakteriyosinlerin geniş hacimde üretilerek saflaştırılması ve de karakterize edilmesi gerekmektedir.

Bakteriyosin ürettiği belirlenen 6 suştan 5'inin spontan olarak da bakteriyosin üretebildiği, ancak TL029'un spontan bakteriyosin üretmediği saptandı (Tablo 17). Rogosa SL broth besiyerinin, bakteriyosin üretimi için en uygun besiyeri olduğu belirlendi. Bunun nedeninin Rogosa SL besiyerinde MRS'den farklı olarak pepton yerine tripton bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmamızda bakteriyosin üretimi yönünden spontan veya mitomisin C ile indüklenmenin değişik besiyerlerinde farklılık gösterdiği tespit edildi.

Bakteriyosin üreten suşların bazılarında, kültürlerin inkübasyon sürelerinin uzatılması ile bakteriyosin aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir. Kültürlerin inkübasyon sürelerinin uzaması sonucu aktivitelerinin azalması, ortamda spesifik bakteriyosin inaktivatörlerinin oluşması ve bu inaktivatörlerin enzimatik kesimleri veya alternatif olarak besiyeri içine salınan bakteriyosinlerin yeniden adsorbe edilmesi gibi nedenlerden kaynaklanabilmektedir (32).

İncelenen suşlar arasında bakteriyosin üretiminin TL093c ve TL099a suşlarında ilk 24 saat içinde yüksek olduğu belirlenirken 48 saat sonra aktivitenin azaldığı, TL143a suşunda aktivitenin değişmediği izlendi. Ayrıca, izole edilen 6 bakteriyosinin antibakteriyel aktivitelerinin, 4°C'de 6 ay kadar devam ettiği belirlendi.

Bakteriyosinlerin NaCl'li ortamdaki aktiviteleri incelendi ve suşların büyük çoğunluğunun, yüksek tuz konsantrasyonlarında üreyemedikleri görüldü. TL059a ve TL080 maksimum %4, diğer 4 suş ise %1-%2 NaCl bulunan MRS sıvı

besiyerinde üreyebildikleri, bununla birlikte, yüksek NaCl konsantrasyonun bakteriyosin üretimlerini inhibe ettiği tespit edildi. Katı besiyerinde yapılan çalışmada, TL080'in %3 NaCl konsantrasyonunda üreyebildiği ve bakteriyosin ürettiği, buna karşın %1'lik tuz konsantrasyonun bakteriyosin üretimini indüklediği belirlendi. Bakteriyosin belirlenen diğer 5 suşun yüksek NaCl konsantrasyonunda üremedikleri %1'lik konsantrasyonun üremelerini engellemediği ayrıca, bakteriyosin üretimini indüklediği tespit edildi (Tablo 18, Şekil 19).

Atrih ve ark (96) bir çalışmada, gıda orjinli 5 *L. plantarum* suşunun ürettiği bakteriyosinin karakterizasyonunda; lipolitik ve glikolitik enzimlerden etkilenmeyip proteolitik enzimlere duyarlı olduğunu bildirmektedir. *L. bavaricus*'un bravarisin A üretiminin kültür ortamına %1 oranında tuz ilavesi ile etkilenmediği, fakat 4°C'de %3, 10°C'de ise %5 tuz konsantrasyonlarında aktivitelerinin tamamını kaybettikleri bildirilmektedir (98).

Bakteriyosin ürettiğini belirlediğimiz suşlardan yalnızca TL080, 15°C'de üreyebilmekte, diğerleri düşük ısılarda üreyememektedir. Bu nedenle suşların değişik ısılarda bakteriyosin üretme aktiviteleri incelenmemiştir.

Bakteriyosin üreten suşların, aynı ve farklı laktobasil türlerini inhibe etkileri damla, agar kuyucuk ve disk difüzyon yöntemleri ile test edildi. Agar kuyucuk yönteminin, fazla miktarda lizat kullanma imkanı sağladığı için diğer yöntemlerden daha kullanışlı olduğu gözlemlendi. Belirlenen bakteriyosinlerden en geniş inhibitör aktivite, *L. gasseri* TL093c ve *L. gasseri* TL143a suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin, benzer *L. gasseri* türlerine karşı gösterdikleri etki olarak tespit edildi.

Lizatların asit etkileri, KOH ve CaCO₃ ile nötralize edilerek test edildi. Konak suşların üremesini kullanılan CaCO₃'ün yoğunluğu etkilediği için KOH ile lizat pH nötralizasyon yönteminin çok daha uygun olduğu kanısına varıldı. Silva ve ark (129) bakteriyosinlerin asidik koşullara nispeten dayanıklı olduklarını belirlemişlerdir.

Bakteriyosinler, büyük ölçüde ürettildikleri bakterinin benzer suşlarına (32), H₂O₂ ise katalaz negatif tüm bakterilere inhibitör etkiye sahip oldukları bilinmektedir (26).

Bakteriyosinlerin, farklı türlere olan inhibisyon etkilerinin araştırılması için, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aurogenes*, *E. cloacea*, *S. aureus*, *C. albicans* ATCC

suşları ve *S. milleri* IS51 klinik suşları kullanıldı. Bakteriyosin üreten laktobasil suşlarının tümü, *G. vaginalis* ATCC 14018 ve *P. aeruginosa* ATCC 10145 suşlarına, TL029a'nın *P. vulgaris*'e, TL059a'nın *E. coli* suşuna, TL080'in *S. milleri* IS51 suşuna ve TL099a ile TL143a'nın *E. cloacea* suşuna karşı antibakteriyel etkiye sahip oldukları belirlendi. Değişik bakteriler üzerine suşların antibakteriyel aktivitelerini test ederken, asit etkisinin nötralize edilmesine rağmen H_2O_2 'in nötralize edilmediği için antibakteriyel aktivitenin H_2O_2 , bakteriyosin veya her ikisinin üretiminden kaynaklanabileceği düşünüldü. Üretilen bakteriyosinlerin değişik patojen bakteriler üzerine olan etkilerinin tam olarak belirlenmesi için bu bakteriyosinlerin saf olarak elde edilmesi ve etkili konsantrasyonlarının belirlenmesi gerekmektedir.

Dembele ve ark (130), 11'i vajinal orjinli olmak üzere 17 laktobasil suşu ile yaptıkları çalışmada, *E. coli*, *Serratia marcescens* (*S. marcescens*), *Shigella boydii* (*S. boydii*), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *L. ivanovii*, *L. innocua* ve *S. aureus*'a karşı başta organik asitler, daha az olarak da bakteriyosin üretimi ile antibakteriyel aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir. Gupta ve ark (131)'nin 140 kadında yaptıkları çalışmada, vajinal florada H_2O_2 üreten laktobasillerin bulunması ile *E. coli* kolonizasyonunu önlediğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda bir kısım suşların antibakteriyel aktivite etkeni olarak H_2O_2 ürettikleri ve duyarlı laktobasilleri inhibe ettikleri gözlemlendi. H_2O_2 'nin laktobasil suşları üzerine inhibisyon etkilerini belirlemek ve katalaz enziminin aktivitesini kontrol etmek amacı ile yapılan çalışmada, laktobasillerin %2'lik H_2O_2 varlığından etkilenmeye başladıkları, %3'lük konsantrasyonda ise tamamen inhibe oldukları belirlendi (Tablo 20). Duyarlı konaklara inhibisyon etkisi gösteren, bakteriyofaj, bakteriyosin veya asit etkisi belirlenemeyen suşların H_2O_2 üretimi nedeni ile inhibisyonun olduğu saptandı.

Eschenback ve ark (12), vajinal florada H_2O_2 oluşturan mikroorganizmaları incelemişler ve bir çok anaerobik bakterilerin peroksidaz enzimi içermemelerinden dolayı H_2O_2 etkisinden korunamadıklarını, dolayısı ile BV'li hastalarda H_2O_2 üreten laktobasillerin bulunmadığını ileri sürmüşlerdir. Aynı araştırmacılar, H_2O_2 üreten fakültatif laktobasil türlerini, normal vajinal florada %96, bakteriyel vajinozisli florada ise %6 olarak belirlemişlerdir.

Laktobasiller, vajinal florada bakteriyosin, H_2O_2 ve asit üretimi gibi çeşitli

mekanizmalar aracılığı ile patojen mikroorganizmalara karşı koruyucu görevi görürler. Yapılan in vitro bir çalışmada, B grubu streptokok, *N. gonorrhoeae* ve *G. vaginalis* gibi patojenlerin vajinal epitel hücrelerine adhere olma özelliklerinin laktobasillerden daha güçlü oldukları bildirilmektedir (24). Bununla birlikte, laktobasil suşlarının, fırsatçı patojen mikroorganizmaların epitel hücrelerine adhezyonunu interfere edebildiği, ayrıca laktobasil suşları arasında da adhezyon özelliklerinde değişikliklerin bulunduğu belirlenmiştir (29). Laktobasillerin bu koruyuculuk özelliklerinden dolayı, yoğurt gibi gıdalarda kullanılmakta ve bu gıdalar probiyotik amaçla tüketilmektedir. Hilton ve ark (40) tarafından yapılan bir çalışmada, *L. acidophilus* suşu ile hazırlanmış yoğurt ile beslenen kişilerde vajinal kandida kolonizasyonu engellenerek enfeksiyondan korunma sağlandığı bildirmiştir.

Bakterilerin geniş bir grubunu inhibe eden antibiyotiklerin tersine bakteriyosinler, normalde aynı veya benzer bakterileri inhibe edebilen protein yapısında bileşiklerdir. Bu nedenle laktobasil suşları tarafından üretilen bakteriyosinler, bir çok laktobasil türünü aynı mekanizma ile inhibe etmektedirler (50). Laktobasiller in vitro olarak, bakteriyofaj veya bakteriyosinlerin her ikisi ile de inhibe olabilmektedir. Bakteriyosin üreten suşların aynı hastadan izole edilen diğer laktobasil türlerini inhibe etmediği saptanmıştır. Bakteriyosinler, hedef hücrede üretilmediği, ancak hedef hücreler ile direk temas ettiklerinde antibakteriyel aktivite gösterdiklerinden dolayı patojen mikroorganizmalara karşı sınırlı etkiye sahiptirler. Bunun yanında laktobasillerin oluşturdukları asit ve H_2O_2 etkisi ile bir çok patojen mikroorganizmalara karşı geniş antibakteriyel aktivite göstererek vajinal sağlığı korumaktadırlar.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çeşitli şikayetler ile kadın doğum polikliniklerine baş vuran hastalardan alınan vajinal sürüntü örnekleri, klinik tanı ve laktobasil içeriği yönünden mikrobiyolojik olarak incelendi.

İncelemeye alınan 75 hasta örneğinden toplam 100 laktobasil suşu izole edildi ve klinik dağılımları, %17 BV, %12 VK, %11 araform ve %60 NVF şeklinde belirlendi.

İzole edilen laktobasil suşlarının tür tayinleri, konvansiyonel test yöntemleri ile yapıldı. En sık olarak *L. gasseri* (% 44) izole edildi. Yüz laktobasil suşunun 56'sında A, B1 ve B2 grubuna ait bakteriyofajlar tespit edildi. En yüksek oranda bakteriyofaj *L. delbrueckii* suşlarında belirlendi.

BV'li kadınlardan izole edilen laktobasillerde bakteriyofaj bulunma sıklığı (%88, $p= 0.0332$) diğer gruplara oranla daha yüksek bulundu.

Bakteriyofajların, in vitro olarak aynı veya farklı kadınlardan izole edilen değişik laktobasil tür ve suşlarını enfekte ettikleri belirlendi. Bunun sonucu vajinal pH'nın bazikleşmesi ile BV patojenlerinin dominant duruma geçmesine neden olabilecekleri gösterildi.

Lizojenik laktobasil suşlarının, aynı tür veya farklı laktobasil türlerine ait ikinci bir bakteriyofaj ile enfekte olabildiği, hatta bakteriyofaj içeren suşların bir kısmı oldukça fazla sayıda farklı bakteriyofaja konaklık ettikleri görüldü. Bunların farklı bakteriyofaj enfeksiyonuna duyarlı olma nedenlerinin aydınlatılması için detaylı araştırmalar gerekmektedir.

İzole edilen laktobasil suşlarından üçünün, belirlenen bakteriyofaj, bakteriyosin, asit ve H_2O_2 etkilerine karşı dirençli oldukları belirlendi.

Farklı coğrafik bölgelerde yaşayan üç kadından izole edilen laktobasillerde morfolojik ve genetik olarak birbirinin aynı üç bakteriyofajın varlığının gösterilmesi, bakteriyofajlarının gıda, çevre veya insan gibi ortak rezervuarlardan alına laktobasiller ile insanlar arasında yayıldığını desteklemektedir.

Vajinal orjinli laktobasillerin 6'sının bakteriyosin ürettiği, bunlardan 2'si ısıya dirençli, düşük molekül ağırlıklı, 4'ü ısıya duyarlı ve yüksek molekül ağırlıklı bakteriyosinler oldukları belirlendi.

Tespit edilen bakteriyosinlerin in vitro olarak *G.vaginalis*, *P. aeruginosa*, *E. cloacea*, *P. vulgaris*, *E. coli* ve *S. milleri*'ye karşı antibakteriyel etkili olduğu belirlendi. Bu bakteriyosinlerin patojen bakterilere karşı antibakteriyel aktivite göstermesi, florayı korumada H_2O_2 ve asit etkisine ek bir destek sağladıkları düşünülmektedir.

Bakteriyosin üreten suşların belirlenmesi, bakteriyosinlerin karakterize edilerek antimikrobial etkinliklerinin ortaya konması tıbbi, gıda sektörü veya diğer amaçlar için kullanılabilirliklerinin araştırılması ile bilime ve ekonomiye katkı sağlanacaktır.

Bakteriyofajlara dirençli laktobasillerin izole edilecek, vajinal enfeksiyonların özellikle cinsel yolla bulaşan hastalıkların önlenmesinde kullanılabilirliklerinin araştırılması toplum sağlığına önemli katkılar sağlayacaktır. Özellikle, sosyo-ekonomik olarak gelişmekte olan toplumlarda, kadının vajinal sağlığının önemsenmediği ve kondom kullanımının yaygın olmadığı gözönüne alındığında, bir aşı alternatifi olarak cinsel yolla bulaşan hastalıklardan korunmada laktobasillerin kullanılmasının ucuz ve oldukça pratik bir çözüm yolu olabileceği düşünülmektedir.

Vajinal orjinli laktobasil tür ve tiplerinden H_2O_2 , asit ve bakteriyosin üreten, insan mukozal yüzeylerinde iyi kolonize olma yeteneğinde olan, bakteriyofaj içermeyen ve bakteriyofaj enfeksiyonuna dirençli olan suşların karakterize edilmesi, vajinal enfeksiyonların tedavisinde vajinal ovul veya tablet olarak kullanılmakta olan veya kullanılacak olan ideal laktik asit bakterilerinin seçimine yardımcı olacaktır.

BV oluşumunda, vajinal laktobasillerin taşıdığı profajların rolünün daha iyi anlaşılması için; profaj içeren ve içermeyen laktobasiller ile kolonize edilmiş deney hayvanlarında BV modelinin geliştirilmesi, profajların çeşitli ajanlar (antibiyotik vs) ile indüklenerek laktobasil popülasyonunu etkilemedeki rolleri, bunun sonucunda vajinal floraya BV patojenlerinin hakim olarak enfeksiyon tablosu oluştuğunu destekleyecek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sağlıklı ve BV'li kadınların vajinal yıkama sıvılarında lizojenik laktobasillerden spontan veya litik enfeksiyon sonucu salınan serbest bakteriyofajların tespit edilmesi, bu bakteriyofajların zenginleştirme yöntemi ile saflaştırılarak aynı kadından veya farklı kadınlardan izole edilen laktobasilleri enfekte etme yetenekleri araştırılmalı ve BV oluşumundaki rollerini destekler bulgular elde edilmelidir.

Bu çalışma, vajinal orjinli laktobasillerde profajların varlığını ve BV ile ilişkisini göstermeyi hedefleyen ilk çalışma olması nedeni ile;

- İzole edilen 56 fajın her birinin morfolojik, konak aralığı, fonksiyonel ve genetik özellikleri yönünden ayrıntılı olarak incelenmeli,
- Bakteriyofaj enfeksiyonu ve bakteriyofajlara direnç mekanizması, transdüksiyon yetenekleri (özellikle taşıdıkları veya mobilize ettikleri genler yönünden) araştırılmalı,
- Farmasötik amaçlı veya gıdalara ilave edilen maddelerin toksite/mutajen veya indükleyici özelliklerin saptanmasında *E. coli* lambda fajına alternatif olarak kullanılabilecek özellikleri incelenmelidir.

7. ÖZET

Bu çalışmada, Farabi Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine ve Trabzon Doğum Hastanesi'ne başvuran, doğurganlık dönemindeki 75 kadından alınan vajinal sürüntü örneklerinden toplam 100 laktobasil suşu izole edilerek identifiye edildi ve bakteriyofaj (profaj) içerikleri ve bakteriyosin üretimleri yönünden araştırıldı.

Yüz laktobasil içinde, dokuz farklı laktobasil türü belirlendi ve *L. gasseri*'nin en yaygın (%44) tür olduğu bulundu. Mitomisin C ile indüklenen laktobasillerin %56'sının bakteriyofaj taşıdığı tespit edildi. İzole edilen bu bakteriyofajlar karakterize edilerek üç farklı morfotip içinde gruplandırıldı: 14'ünün grup A, 37'sinin grup B1 ve 5'inin grup B2 bakteriyofajları olduğu belirlendi. Profaj varlığı %88 oranında en yüksek bakteriyel vajinozisli kadınlardan izole edilen laktobasillerde tespit edildi. İzole edildiği kaynağa bakılmaksızın, laktobasillerden *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*'nin diğer türlere göre daha fazla bakteriyofaj içerdiği saptandı.

Farklı coğrafik bölgelerde yaşayan üç kadından izole edilen Φtl034c, Φtl074c ve Φtl076 adlı üç bakteriyofajın morfolojik ve genetik olarak aynı oldukları tespit edildi.

Laktobasillerden altısının diğer laktobasil suşları yanında *G. vaginalis* ve *P. aurogenes* suşlarına karşı aktif bakteriyosin aktiviteye sahip oldukları gözlemlendi.

Sonuç olarak, bakteriyofajların in vitro olarak farklı kadınlardan izole edilen değişik laktobasilleri enfekte etmeleri, vajinal florada bulunan ve profaj taşıyan laktobasillerin profaj indüksiyonu sonucu vajinal florada bulunan diğer laktobasilleri ortadan kaldıracak potansiyele sahip olduklarını ve bunun da vajinal pH'nın yükselmesini, dolayısı ile diğer patojenlerin vajinada kolonize olarak vajinal enfeksiyonlara zemin hazırladığını desteklemektedir.

8. SUMMARY

INVESTIGATION OF BACTERIOPHAGES AND BACTERIOCINS IN VAGINAL LACTOBACILLI

In this study, a total of 100 lactobacilli were isolated and identified by standard bacteriological methods and screened for the presence of bacteriophages (prophage) and production of bacteriocins from the vaginal samples of 75 reproductive women admitted to the Obstetrics and Gynecology Department of Farabi Hospital and Trabzon Delivery Hospital.

Of 100 lactobacilli, nine different species were identified, among which *L. gasseri* was found to be the most common (%44) species. Using mitomycin C induction, 56% of all lactobacilli were found to carry prophages. These prophages were characterized and grouped into three different morphotypes: 14 of them belonged to group A, 37 to group B1 and 5 to group B2 bacteriophages. Prophages were mostly detected in 88% of lactobacilli isolated from the women with bacterial vaginosis. Regardless of the source of lactobacilli, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* was found to carry prophages more frequently compared to the other species.

Three bacteriophages namely the Φ tl034c, Φ tl074c and Φ tl076 carried by three lactobacilli isolated from three women, who were inhabitants of three distinct regions, were found to be identical by morphology and genetic analysis.

Six strains of lactobacilli were observed to have bacteriocin activity against *Gardnerella vaginalis* and *Pseudomonas aeruginosa* as well as other lactobacilli.

As a result, in vitro bacteriophage infection of different lactobacilli isolated from different women suggested that prophage carrying lactobacilli in the vaginal flora of women may have the potential to eliminate the sensitive indigenous lactobacilli upon prophage induction. This in turn may lead to an increase in the vaginal pH and provide environment for the other pathogens to colonize the vagina and cause vaginal infections.

9. KAYNAKLAR

1. Hillier, S.L., Krohn, M.A., Rabe, L.K., Klebanoff, S.J., Eschenbach, D.A.: The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli and bacterial vaginosis in pregnant women. Clin. Infect. Dis., 16: 273-281, 1993.
2. Chateau, N., Castellanos, I., Deschamps, A.M.: Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. J. Appl. Bacteriol., 174: 36-40, 1993.
3. Itoh, T., Fujimoto, Y., Kawai, Y., Toba, T. and Saito, T.: Inhibition of food borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*. Lett. Appl. Microbiol., 21: 137-141, 1995.
4. Coconnier, M.H., Lievin, V., Camard, M.F.B., Hudault, S., Servin, A.L.: Antibacterial effect of adhering human *Lactobacillus acidophilus* Strain LB. Antimicrob. Agents Chemother., 41: 1046-1052, 1997.
5. Klebanoff, S.L., Coombs, R.W.: Virucidal effect of *Lactobacillus acidophilus* on human immunodeficiency virus type 1: possible role in heterosexual transmission. J. Exp. Med., 174: 289-92, 1991.
6. Drutz, D.J.: *Lactobacillus* prophylaxis for *Candida* vaginitis. Ann. Intern. Med., 116: 419-420, 1992.
7. Hook, E.W., Canon, R.O. and Nahmias, A.J.: Herpes simplex virus infection as a risk factor for human immunodeficiency virus infection in heterosexuals. J. Infect. Dis., 165: 251-255, 1992.
8. Plummer, F.A., Simonsen, D.V.: Cofactors in male-female sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. J. Infect. Dis., 163: 223-292, 1991.
9. Agnew, K.J., Hillier, S.L.: The effect of treatments for vaginitis and cervicitis on vaginal colonization by lactobacilli. Sex. Transm. Dis., 22: 296-273, 1995.
10. Mortin, L.S., Mc Dougel, S., Laskoski, J.L.: Disinfection and inactivation of human T lymphotropic virus type III / Lymphadenopathy associated virus. J. Infect. Dis., 152: 400-403, 1985.
11. Kandler, O., Weiss, N.: Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2, Sneath, A.P., Mair, N.S., Sharpe, M.S., and Holt, J.G., (Eds.). Williams and Wilkins, Baltimore, 1986, pp. 1208-1225.
12. Kişnişci, H.A., Gökşin, E., Durukan, T., Üstay, K., Gürkan, T., Önderoğlu, L.S.: Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Güneş Kitabevi, Ankara, 1996, s. 778-787.

13. Blackwell, A.L., Fox, A.R., Phillips, and Barlow, D.: Anaerobic vaginosis (nonspecific vaginitis): Clinical, microbiological and therapeutic findings. *Lancet.* ii:1379-1382, 1983.
14. Eschenbach, D.A., Davick, P.R., Williams, B.L., Klebanoff, S.J., Young-Smith, K. Critchlow, C.M. and Holmes, K.K.: Prevalance of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.*, 27: 251-256, 1989.
15. Jones, H.W., Jones, G.S.: Kadın Hastalıkları. Novak. (Çev. Göksü, M., Üstün, M.). Menteş Kitabevi. İstanbul, 1985, s. 324-348.
16. Kanne, B., Patz, B., Wackerle, L.: Local treatment of infections with Doederlein bacteria and estriol in climacterium and senium. *Der Frauenarzt; Bulletin of the Berufsverband der Frauenärzte.* 3: 1-20, 1986.
17. Klinikte vajina ve vulva enfeksiyonları değerlendirme ve yöntemi: Organon yayınları. 1996/2.
18. Guyton, A.C.: Fizyoloji. Birinci Baskı, Güven Kitabevi Yayınları, cilt: III, Ankara, 1978, s. 466-469.
19. Sobel, J.D.: Vaginitis. *N. Engl. J. Med.*, 25: 1896-1903, 1997.
20. Sobel, J.D.: Candidial vaginitidis. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 36: 153-164, 1993.
21. Huggins, G.R., Petri, G.: Vaginal odors and secretions. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 24: 355-377, 1981.
22. McGrory, T., Meysick, K., Lemchuk-Favel, L.T., Garber, G.E.: The interaction of *Lactobacillus acidophilus* and *Trichomonas vaginalis* in vitro. *J. Parasitol.*, 80(1): 50-54, 1994.
23. Golman, G. : *Streptococcus* And *Lactobacillus*. In Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. Eighth Ed., Parker, M.T., Collier, L.H., Duerden, B.I., (Eds.). London, Melbourne, Auckland, 1990, pp. 148-153.
24. Frazier, W.C., Marth, E.H., Deibel, R.H.: Laboratory Manuel for Food Microbiology. Fourth Ed., University of Wisconsin Madison, Wisconsin. Burgess Publishing Company, 1968, pp. 7-8.
25. Helferich, W., Westhoff, D.: All about yogurt. Prentice-Hall, Inc, Englewood Cliffs. N.J., 1980, p. 128.
26. Zheng, H., Alcorn, T.M., Cohen, M.S.: Effects of H₂O₂-producing *Lactobacilli* on *Neisseria gonorrhoeae* growth and catalase activity. *J. Infect. Dis.*, 170: 1209-1215, 1994.

27. Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, J.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C.: Collar Atlas and Textbooks of Diagnostic Microbiology. Fifth Ed. Lippicott-Raven Publishers. Philadelphia, New York, 1997, p. 670.
28. Açıkgöz, Z.C.: Biyofilmler. Microbioloji Bülteni. 31: 299-313, 1997.
29. Wood, J.R., Sweet, R.L., Catena, A., Hadley, W.K., Robbie, M.: In vitro adherence of *Lactobacillus* species to vaginal epithelial cells. Am. J. Obstet. Gynecol., 153: 740-743, 1985.
30. Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L.: *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. Gut., 35: 483-489, 1994.
31. Crabtree, K.T., Hinsdill, R.D.: Fundamental experiments in microbiology. W.B. Saunders Company. West Washington Square, Philadelphia, 1974, p. 122.
32. Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W.: Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. Bacteriol. Rev., 40: 722-756, 1976.
33. Kanatani, K., Oshimura, M., Sano, K.: Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *L. acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol., 61: 1061-1067, 1995.
34. Barefoot, S.F., Klaenhammer T.D.: Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. Antimicrob. Agents Chemother., 26: 328-334, 1984.
35. Hallen, A., Jarstrand, C., Pahlson, C.P.: Treatment of bacterial vaginosis with lactobacilli. Sex. Transm. Dis., 19: 146-148, 1992.
36. Hughes, V.L., Hillier, S.L.: Microbiologic characteristics of *Lactobacillus* products used for colonization of the vagina. Obstet. Gynecol., 75: 244-248, 1990.
37. Neri, A., Sabah, G. and Samra, Z.: Bacterial vaginosis in pregnancy treated with yogurt. Acta. Obstet. Gynecol. Scand., 72: 17-19, 1993.
38. Cleassen, E. Van Winsen, R., Posno, M., Boersma, W.J.A.: New and safe "oral" vaccines based on *Lactobacillus*. Adv. Exd. Biol., 371B: 1553-1558, 1995.
39. Powels, P.H., Leer, R.J., Boersma, W.J.A.: The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: Development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. J. Biotech., 44: 183-192, 1996.
40. Hilton, E., Isenberg, H.D., Alperstein, P., France, K., Borenstein, M.T.: Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidial vaginitis. Ann. Internal Med., 166: 251-255, 1992.

41. Bradley, D.E.; Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocin. *Bacteriol. Rev.*, 31: 230-314, 1967.
42. Kılıç, A.O., Pavlova, S.I., Ma, W., Tao, L.: Analysis of *Lactobacillus* phages and bacteriocins in American dairy products and characterization of a phages isolated from yogurt. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2111-2116, 1996.
43. Akan, E.: Genel ve Özel Viroloji. Üçüncü Baskı. Saray Medikal Yayıncılık, No:7816, İstanbul, 1994, s. 63-75.
44. Conrat, H.F., Kimbal, P.C., Levy, J.A.: Medium and large DNA bacteriophages. In: *Virology*. Second Edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1988, pp. 240-296.
45. Joklik, W.K., Willett, H.P., Amos, D.B.: The Bacteriophages. In *Zinsser Microbiology*. Eight Ed. Appleton-Century-Crofts/Norwalk, Connecticut, 1984, pp. 957-976.
46. Ptashne, M.: A Genetic Switch Gene Control and Phage Lamda, Cell Press & Blackwell Scientific Publications, Chambridge, 1987.
47. Boyd, R.F., Basic Medical Microbiyology. Fifth Ed. Little, Brown and Company, London, 1995, pp. 403-405.
48. Ackermann, H.W., DoBow, M.S., Jarvis, A.W., at al: The species concept and its application to tailed phages. *Arch. Virol.*, 124: 69-82, 1992.
49. Pelczar, M.J., Chan, E.C.S., Krieg, N.R.: Viruses: morfology, classification, replication. In: *Microbiology Concepts and Applications*. McGraw-Hill, London, 1993, p. 409-421.
50. Dodd, H.M., Gasson, M.J.: Bacteriocin of lactic acid bacteria. In: *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. First ed., Gasson, J.M., De Vos, W. (Eds). Chapman - Hall, New York, 1994, pp. 211-251.
51. Klaenhammer, T.R. and Fitzgerald, G.F.: Bacteriophages and bacteriophage resistance. In: *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. First ed. Gasson JM, De Vos W, Chapman – Hall (Eds). New York, 1994, pp. 106-168.
52. Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S.: *Microbiology Including Immunology and Molecular Genetics*. Third Ed. Harper & Row, Publishers London, 1980, pp. 919-940.
53. Lewin, B.: Phage strategies: Lytic cascades and lysogenic repression. *Genes V*. First ed. Chapter 17. Oxford University, New York, 1994, pp. 495-523.
54. Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S.: *Microbiology Including Immunology and Molecular Genetics*. Third Ed. Harper & Row, Publishers London, 1980, pp. 885-918.

55. Ustaçelebi, Ş.: Genel Viroloji. Hacettepe-Taş Kitapçılık. Sıhhiye, Ankara, 1992, s. 89-99.
56. Freifelder, D.: Microbial Genetics. Chapter 5, Jones and Bartlett Publishers, Inc. Boston, 1987, p. 89-110.
57. Yokokura, T., Kodaira, S., Ishiwa, H. and Sakuria, T.: Lysogeny in lactobacilli. J. Gen. Microbiol., 84: 277-284, 1974.
58. Fremaux, C., De Antoni G.L., Raya, R.R. and Klaenhammer, T.R.: Genetic organization and sequence of the region encoding integrative functions from *Lactobacillus gasseri* temperate bacteriophage ϕ adh. Gene. 126: 61-66, 1993.
69. Hill, C., Bacteriophage and bacteriophage resistance in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 87-108, 1993.
60. Nes, I.F., Sorheim, O.: Effect of infections of a bacteriophage in a starter culture during the production of salami dry sausage: a model study. J. Food Sci., 49:337-340, 1984.
61. Raya, R.R., Kleeman, E.G., Luchansky, J.B., Klaenhammer, T.R.: Characterization of the temperate bacteriophage ϕ adh and plasmid transduction in *Lactobacillus* ADH. Appl. Environ. Microbiol., 55: 2206-2213, 1989.
62. Pavlova, S.I., Kılıç, A.O., Mou, S.M., Tao, L.: Phage infection in vaginal lactobacilli: An in vitro study. Infec. Dis. Obstet. Gynecol., 5: 36-44, 1997.
63. Accolas, J.P. and Spillmann, H.: Morphology of bacteriophages of *Lactobacillus bulgaricus*, *L. lactis* and *L. helveticus*. J. Appl. Bacteriol., 47: 309-319, 1979.
64. Raya, R.R., Fremaux, C., De Antoni, G.L., Klaenhammer, T.R.: Site specific integration of a temperate bacteriophage ϕ adh into the *L. gasseri* chromosome and molecular characterization of the phage (*attP*) and the bacterial (*attB*) attachment site. J. Bacteriol., 174: 5584-5592, 1992.
65. Forsman, P., Atatossava, T.: Genetic variation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* bacteriophages isolates from cheese processing plants in Finland. Appl. Environ. Microbiol., 57: 1805-1812, 1991.
66. Ackermann, H.W. and DuBow, M.S.: Viruses of Prokaryotes, CRC Press, Inc., Boca, Raton, FL., U.S.A., 1987.
67. Jarvis, A.W.: Conjugal transfer in lactic streptococci of plasmid-encoded insensitivity to prolate- and small isometric-headed bacteriophages. Appl. Environ. Microbiol., 54:777-783, 1988.
68. Yokokura, T.: Phage receptor material in *Lactobacillus casei*. J. Gen Microbiol., 100: 139-145, 1977.

69. Nes, I.G., Brendehaug, J., von Husby, K.O.: Characterization of the bacteriophage B2 of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *Biochimie.*, 70: 423-427, 1988.
70. Jimeno, J., Casey, M.G., Jenni, E., Accolas, J.P.: A new type of bacteriophage of *L. delbrueckii*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87: 58, 1990.
71. Klaenhammer, T.D.: Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 39-86, 1993.
72. Nes, I.G., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B.: Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70: 113-128, 1996.
73. Kandler, O.: Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 49: 209-224, 1983.
74. Akkuş, İ.: Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler. Konya, 1995, s. 3-10.
75. Farr, S.B. and Kogoma, T.: Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.*, 55: 561-585, 1991.
76. McGroarty, J.A., Reid, G.: Detection of a *lactobacillus* substance that inhibits *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.*, 34: 974-978, 1988.
77. Fang, W., Shi, M., Huang, L., Chen, J., Wang, Y.: Antagonism of lactic acid bacteria towards *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* on agar plates and in milk. *Vet. Res.*, 27: 3-12, 1996.
78. Hillier, S.L., Krohn, M.A., Klebanoff, S.J., Eschenbach, D.A.: The relationship of hydrogen peroxide-producing lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women. *Obstet. Gynecol.*, 79: 369-373, 1992.
79. Spigel, C.A., Amsel, R., Eschenbach, D., Schoenknecht, F., and Holmes, K.K.: Anaerobic bacteria in nonspecific vaginitis. *N. Engl. J. Med.*, 303: 601-607, 1980.
80. Nugent, R.P., Korhn, M.A., Hillier, S.L.: Reliability of diagnosis bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 297-301, 1991.
81. Kandler, O., Weiss, N.: Genus *Lactobacillus*. In: Sneath P (ed): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Baltimore: William & Wilkins, 1986, pp. 1209-1234.
82. Balows, A., Hausler, W., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J.: *Manual of Clinical Microbiology*. Fifth Ed. American Society for Microbiology, Washington, 1991, p. 1270.

83. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth ed., A Waverly Company, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994, p. 1.19.39.
84. Kraus, F.W., Nickerson, J.F., Perry, W.I., and Walker, A. P.: Peroxide and Peroxidogenic bacteria in human saliva. J. Bacteriol., 773: 727-735, 1957.
85. Trevors, K.E., Holley, R.A., Kempton, A.G.: Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage isolated from a meat starter culture. J. Appl. Bacteriol., 54: 281-288, 1983.
86. Foschino, R., Galli, A., Pagani, M.A.: *Lactobacillus fermentum* bacteriophages isolated from sour dough. Ann. Microbiol. Enzimol., 43: 225, 1993.
87. Forsman, P., Tanskanen, J., Alatossava, T.: Structural similarity and genetic homology between *Lactobacillus casei* bacteriophages isolated in Japan and in Finland. Biosci. Biotech. Biochem., 57: 2043-2048, 1993.
88. Harvard Medical School: Short Protocols In Molecular Biology: Second ed. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.). Greene Publishing Associates and John Wiley and Sons. New York, 1995, p. A1-55.
89. Çalışmanın bu bölümü; Kılıç, A.O., Pavlova, S.I., Tao, L., tarafından University of Missouri Kansas City'de gerçekleştirilmiştir.
90. Arda, M.: Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler). Üçüncü Baskı. Kükem Derneği Bilimsel Yayınları No 3, Ankara, 1995, p. 186.
91. Sambrooks, J., Fritsch, E.F., Maniatis, N.T.: Molecular Cloning A Laboratory Manual. Second ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press. USA, 1989, p. 9.31-9.57.
92. Lewington, J., Greenmay, S.D., Spillane, B.J.: Rapid small scale isolation of bacterial genomic DNA, suitable for cloning and hybridization analysis. Lett. Appl. Bacteriol., 5: 51-52, 1987.
93. Klaenhammer, T.R.: A general method for plasmid isolation in lactobacilli. Current Microbiol., 10: 23-28, 1984.
94. Henrich, B., Binishofer, B., Blasi, U.: Primary structure and functional analysis of the lysis genes of *Lactobacillus gasseri* bacteriophage Φ adh. J. Bacteriol., 177: 723-732, 1995.
95. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London). 227: 680-685, 1979.
96. Toba, T., Samant, S.K., Itoh, T.: Assay system for detecting bacteriocin in microdilution wells. Lett. Appl. Microbiol., 13: 102-104, 1991.

97. Atrih, A., Rekhif, N., Michel, M., Lefebvre, G.: Detection of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different foods. *Microbios.*, 75: 117-123, 1993.
98. Spjelhaug, S.R., Hardlender, S.K.: Initiation of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *J. Food Protection.*, 52: 856-862, 1989.
99. Geis, A., Singh, J., Teuber, M.: Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 205-211, 1983.
100. Larsen, A.G., Vogensen, F.K., Josephsen, J.: Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavarecin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1401. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 113-122, 1993.
101. Diaz, R.J., Sanchez, R.M.R., Desmazeud, M., Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.C.: Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPC010 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 1416-1424, 1993.
102. Harvard Medical School: Short Protocols In Molecular Biology: Second ed. Ausubel, F.M., Brent, Roger, Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.). Greene Publishing Associates and John Wiley and Sons. New York, 1995, p. A1-52.
103. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.*, 72: 248-254, 1976.
104. Alpay, Ş., Söylev, N., Kılıç, A.O.: Laktobasillerin Tür Ayırımında Şeker Fermentasyonunun Tanısal Değeri. Yayınlanmamış çalışma.
105. Saunders, B.D., Trapp, R.G.: Basic Clinical Biostatistics. Second ed. Prentice Hall International Inc. USA, 1994, p. 310.
106. Khosaka, T.: *J Gen Virol.* 37:209-214, 1977. In; Sechaud, L., Cluzel, P.J., Pousseau, M., Baumgartner, A., Acolas, J.P.: Bacteriophages of lactobacilli. *Biochimie.* 70: 401-410, 1988.
107. Watanabe, K., Takesue, S., Ishibashi, K., Iwamoto, T., Kondo, J.: *J. Gen. Appl. Bacteriol.*, 28: 1-6, 1982. In; Sechaud, L., Cluzel, P.J., Pousseau, M., Baumgartner, A., Acolas, J.P.: Bacteriophages of lactobacilli. *Biochimie.* 70: 401-410, 1988.
108. Stetter, K.O., Priess, H., Delius, H.: *Lactobacillus casei* phage PL-1; molecular properties and first transcription studies in vivo and in vitro. *Virology.* 87:1-12, 1978. In: Sechaud, L., Cluzel, P.J., Pousseau, M., Baumgartner, A., Acolas, J.P.: Bacteriophages of lactobacilli. *Biochimie.* 70: 401-410, 1988.

109. Hill, L.V., Luther, E.R., Yung, J.D., Preira, K., Embil, J.A.: Prevalance of lower genital tract infections in pregnancy. *Sex. Transm. Dis.*, 15: 5-10, 1988.
110. Mead, P.B.: Epidemiology of bacterial vaginosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 169: 446-449, 1993.
111. Reid, G., McGroarty, J.A., Tomeczek, L., Bruce, A.W.: Identification and Plasmid profiles of *Lactobacillus* species from the vagina of 100 healthy women. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 15: 23-26, 1996.
112. Hill, G.B., Eschenbach, D.A., and Holmes, K.K.: Bacteriology of the vagina. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.*, 86: 23-39, 1985.
113. Horowitz, B.J., Mardh, P.A., Nagy, E., Rank, E.L.: Vaginal lactobacillosis, *Am. J. Gynecol.*, 1170: 857-861, 1994.
114. McGroarty, J.A., Tomeczek, L., Pond, D.G., Reid, G., Bruce, A.W.: Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species: Correlation with susceptibility to the spermicidal compound nonxynol-9. *J. Infect. Dis.*, 165: 1142-4, 1992.
115. Giorgi, A., Torrani, S., Dellaglio, F., Bo, G., Stola, E., Bernuzzi, L.: Identification of lactobacilli from asymptomatic women. *Microbiologica*. 10: 377-384, 1987.
116. Ross, R.A., Lee M.L.T., Delaney, M.L., Onderdonk, A.B.: Mixed-effect models for predicting microbial interactions in the vaginal ecosystem. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 871-875, 1994.
117. Antonio, M., Hillier, S. : The identification of *Lactobacillus* species in the rectum of women. 96 th General Meeting of American Society for Microbiology. Abstract C394, 1996.
118. Sechaud, L., Cluzel, P.J., Pousseau, M., Baumgartner, A., Acolas, J.P.: Bacteriophages of lactobacilli. *Biochimie*. 70: 401-410, 1988.
119. Tao, L., Pavlova, S.I., Mao, S.M., Ma, W., and Kılıç, A.O.: Analysis of *Lactobacillus* products for phages and bacteriocins that inhibit vaginal lactobacilli. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, 5: 244-251, 1997.
120. Joklik, W.K., Willett, H.P., Ammos, D.B.: *Zinsser Microbiology*. 17th ed. Appleton-Century-Crofts. New York, 1980, p. 1179.
121. Sanders, M.E.: Phage resistance in lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70: 411-421, 1988.
122. Khosaka, T.: *J. Gen. Virol.* 37, 209-214, 1977. In: Sechaud, L., Cluzel, P.J., Pousseau, M., Baumgartner, A., Acolas, J.P.: Bacteriophages of lactobacilli. *Biochimie*. 70: 401-410, 1988.

123. Cluzel, P.J., Veaux, M., Rousseau, M., Accolas, J.P.: Evidence for temperate bacteriophages in two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. J. Dairy Research. 54: 397-405, 1987.
124. Shimizu, K.M., Sakurai, T., Tsuchida, N.: Appl. Environ. Microbiol. 45:669-674, 1983. In: Sechaud, L., Cluzel, P.J., Pousseau, M., Baumgartner, A., Acolas, J.P.: Bacteriophages of lactobacilli. Biochimie. 70: 401-410, 1988.
125. Toba, T., Yoshioka, E., Itoh, T.: Potential of *Lactobacillus gasseri* isolated from infant faeces to produce bacteriocin. Lett. Appl. Microbiol., 12: 228-231, 1991.
126. Tahara, T., Oshimura, M., Umezawa, C., Kanatani, K.: Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. Appl. Environ. Microbiol., 62: 892-897, 1996.
127. Toba, T., Yoshioka, E., Itoh, T.: Acidohpallucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. Lett. Appl. Microbiol., 12: 106-108, 1991.
128. Klaenhammer, T.R., Fremayux, C., Milton, K.: Molecular properties of *lactobacillus* bacteriocins. In: Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics. James, R., Ladzunski, C., Pattus, F. (eds). NATA ASI Series H, 65, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, 1992, pp. 37-58.
129. Silva, M., Jacobus, N.V., Deneke, C., Gorbach, S.L.: Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. Antimicrob. Agents Chemother., 31: 1231-1233, 1987.
130. Dembele, T., Vatova, M., Obdrzalek, V.: Antibacterial activity of lactobacilli. Epidemiol. Mikrobiol. Immunol., 47: 43-46, 1998.
131. Gupta, K., Stapleton, A.E., Hooton, T.M., Roberts, P.L., Fennel, C.L., Stomm, W.E.: Inverse association of H₂O₂-producing lactobacilli And vaginal Escherhia coli colonization in women with recurrent urinary tract infections. J. Infect. Dis., 178: 446-450, 1998.

ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Rize'nin Fındıklı ilçesi'nde tamamladıktan sonra 1984-1985 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde Lisans öğrenimine başladı. Haziran 1988 tarihinde aynı bölümden "Biyolog" unvanı ile mezun oldu. Eylül 1988'de Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitime başladı. Eylül 1994'de "Mikrobiyoloji Bilim Uzmanı" unvanı ile Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. Aynı dönemde Doktora eğitime başladı ve 7 Ocak 1999 tarihinde eğitimini tamamladı. 28 Haziran 1993-14 Ocak 1999 tarihleri arasında, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yaptı.