



## Probiyotik *Escherichia coli* Suşu Nissle 1917 Probiotic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917

Seda ALTUNTAŞ<sup>1</sup>, Mihriban KORUKLUOĞLU<sup>2</sup>, Volkan ALTUNTAŞ<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Gıda Mühendisliği Bölümü, Doğa Bilimleri, Mimarlık ve Mühendislik Fakültesi, Bursa Teknik Üniversitesi, Bursa, Türkiye.  
seda.altuntas@btu.edu.tr

<sup>2</sup>Gıda Mühendisliği Bölümü, Ziraat Fakültesi, Uludağ Üniversitesi, Bursa, Türkiye.  
mihriban@uludag.edu.tr

<sup>3</sup>Bilgi İşlem Dairesi Başkanlığı, Bursa Teknik Üniversitesi, Bursa, Türkiye.  
volkan.altuntas@btu.edu.tr

Geliş Tarihi/Received: 27.09.2016, Kabul Tarihi/Accepted: 27.02.2017

\* Yazışılan yazar/Corresponding author

doi: 10.5505/pajes.2017.98475

Derleme Makalesi/Review Article

### Öz

Probiyotikler yeterli miktarda alındıklarında, konakçının sağlığı üzerine olumlu etkileri bulunan, patojen olmayan canlı mikroorganizmalardır. Probiyotik mikroorganizmalar genellikle fermente süt ürünleri veya gıda takviyeleri gibi gıda maddelerinin bileşenleridir. Gıda endüstrisinde, yaygın olarak Laktik Asit Bakterileri (LAB) kullanılmaktadır. Hayvan besleme, yem endüstrisi ve ilaç sanayiinde ise laktik asit bakterilerinin yanı sıra diğer patojen olmayan ve sağlık üzerine olumlu etkileri bulunan mikroorganizmalar da (*Saccharomyces boulardii* ve *Escherichia coli* Nissle 1917) kullanılır. Bu çalışmada; probiyotik *E. coli* suşu Nissle 1917'nin kökeni, tıbbi tarihi, mikrobiyolojik ve genetik özellikleri, biyolojik aktiviteleri, güvenilirliği ve toksikolojik yönü ele alınmıştır. Bunlara ek olarak *EcN* (*E. coli* Nissle 1917) ile yapılan klinik deneyler de özetlenecektir.

**Anahtar kelimeler:** *E. coli* suşu Nissle 1917, *EcN*, Probiyotikler

### Abstract

Probiotics are live microorganisms that confer a health benefit on the host when administered in adequate amounts. Probiotic microorganisms are usually components of foods such as fermented dairy products or food supplements. In the food industry, Lactic Acid Bacteria (LAB) is widely used. In livestock breeding, feed industry and pharmaceutical industry, microorganisms which are non-pathogenic and have positive effects on health (*Saccharomyces boulardii*, and *Escherichia coli* Nissle 1917) are used besides the lactic acid bacteria. This review focused on origin, medical history, microbiological and genetic characteristics, biological activity, biosafety and toxicological aspects of probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. Additionally, clinical trials conducted with *EcN* (*Escherichia coli* Nissle 1917) will be summarized.

**Keywords:** *E. coli* strain Nissle 1917, *EcN*, Probiotics

## 1 Giriş

### 1.1 Probiyotiklerin tanımı ve tarihsel süreci

“Yaşam için” anlamına gelen probiyotik terimi Yunanca’dan türetilmiştir [1]. İlk olarak 1954 yılında Ferdinand Vergin tarafından “Probiotika” terimi kullanılmış ve II. Dünya Savaşı’ndan kısa bir süre sonra fizikçi ve diyetisyen olan Alman asıllı Werner Kollath probiyotikleri “besleyici değerinin yanı sıra sağlığı destekleyici özellikleri bulunan gıda katkıları” olarak tanımlamıştır [2]. 1965 yılında Lilly ve Stillwell ise “Bir mikroorganizma tarafından salgılanıp başka birinin büyümesini destekleyen bileşiklerin” tanımlanmasında kullanmıştır [1]. Ancak bu tanım bilim dünyasında yaygın olarak kabul görmemiştir. Parker probiyotik kelimesini günümüzdeki tanımına oldukça yakın bir şekilde “Bağırsak mikrobiyel dengesine katkıda bulunan mikroorganizmalar ve maddeler” olarak tanımlamıştır. Parker’ın tanımında yer alan “maddeler” antibiyotikleri de içermektedir. 1989 yılında Fuller probiyotik tanımını “Bulunduğu hayvanın intestinal mikrobiyel dengesini geliştirerek, faydalı etkiler sağlayan canlı mikrobiyel gıda katkılarıdır” şeklinde yapmıştır [3]. Probiyotik teriminin tanımı, Avrupa Komitesince desteklenen ve Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu (LABIP) tarafından düzenlenen çalışmada, “Oral probiyotikler, ağız yoluyla belirli sayıda alındıklarında özgün temel beslenmenin ötesinde sağlık etkileri olan canlı mikroorganizmalardır” şeklinde yayınlanmıştır. 2001 yılında kabul gören probiyotik tanımında FAO (Gıda ve Tarım Örgütü) /WHO (Dünya Sağlık Örgütü)

komite uzmanları “Sadece ağız yoluyla alımı” kısmını tanımlamadan çıkartmış ve “Probiyotikler yeterli miktarda alındıklarında, konakçının sağlığı üzerine olumlu etkide bulunan, patojen olmayan canlı mikroorganizmalardır” olarak tanımlamışlardır.

### 1.2 Bağırsak mikroflorası

Bağırsak mikroflorası epitel doku, bağışıklık ve mikroorganizmalar ile doğrudan ilişkilidir. Sağlıklı bir bireyin bağırsağında bulunan mikroorganizmalar konakçının yararına olan faaliyetleri gerçekleştirirler. Bu faaliyetler sindirim ve bağışıklık sistemini düzenleme, patojen mikroorganizmalar ile rekabeti kazanarak sağlık üzerine olumlu etkilerde bulunma, fonksiyonel özellikleri yerine getirme olarak sıralanabilir [4].

Bağırsak epitelyum yüzeyi, lümen içeriğiyle ve değişken bağırsak florasıyla sürekli etkileşim halindedir. Bağırsak bariyeri, epitel bütünlüğünü ve organizmayı dış etkenlerden koruyan en önemli savunma mekanizmasıdır. Bu mekanizma mukoz tabakası, antimikrobiyal peptitler, IgA salgısı ve epitelyum bağlanma noktalarını içermektedir. Bariyer zarar gördüğünde, bakteri ve gıda antijenleri alt tabakaya ulaşır ve enflamatuar bağırsak sendromu gibi intestinal bozukluklar meydana gelebilir [5]. Mukus tabakası kalınlığı 50-800 µm arasında değişmektedir. Kalınlık 30 µm altına düştüğünde mukus tabakasını parçalamak için farklı mekanizmalara sahip patojenik türlerin istilası olası hale gelmektedir. *Helicobacter pylori* musin disülfid bağlarını parçalayarak, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, ve *Entamoeba histolytica* proteaz

ve glikosidaz aktivitesi ile bağırsak epitelyum bariyerini aşır bağırsakta kolonize olma fırsatını elde etmektedirler [6].

Bağırsak mikroflorası iki şekilde ele alınabilir;

**Kalıcı Flora:** Belirli bölgelerde genellikle değişmeyen, kısa süreli ortadan kaldırılsa bile yeniden oluşabilen, süreklilik gösteren mikroorganizma topluluğudur.

**Geçici Flora:** Kalıcı floranın yanında, çoğu hastalık oluşturmeyen, bazen patojen olabilen, birkaç saatten birkaç haftaya değişebilen sürelerde kalan mikroorganizma topluluğudur. Kalıcı flora üyeleri ortadan kalktığında, geçici flora kolonize olur, çoğalır ve hastalık yapıcı özellik kazanabilir [7]. Bağırsak mukozası 300 m<sup>2</sup>'den fazla olan yüzeyi ile sürekli olarak alınan besinler ve mikroorganizmaların yabancı antijenleri ile temas halindedir. Gastrointestinal sistemin normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için istenmeyen bir immün reaksiyon olmaksızın besin maddelerinin yeterli miktarlarda emilmesi ve aynı zamanda bağırsağın (ve dolayısıyla konağın) lümeni içindeki potansiyel zararlı ajanlardan korunması gereklidir [8].

Bağırsak mikrobiyel dengesinin bozulmasına birçok iç ve dış etken neden olabilir. Bu etkilerin sonucunda mikrofloranın kompozisyonu, sayısı ve aktivitesi değişir. Bağırsak fonksiyonel bozuklukları ve hastalıklarına ilişkin bilgiler Tablo 1'de verilmiştir. 20. yy. ikinci yarısına kadar insan hastalıklarının tedavisinde antibiyotik kullanımı oldukça yaygındı. Ancak yapılan çalışmalarda antibiyotiklerin yan etkilerinin belirlenmesi, patojen mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç oluşturmaları, antibiyotik kullanımına bağlı gelişen diyare gibi nedenlerden dolayı probiyotiklerin kullanımı gündeme gelmiştir [4],[9].

Genel olarak *E. coli*'nin insan ve sıcakkanlı hayvanların bağırsak kanalında normal flora olarak yer alması, gıda ve sularındaki varlığı fekal bulaşma indikatörü olarak değerlendirilmesine neden olmaktadır. Ancak, *E. coli* suşu Nissle 1917 patojen olmayıp, taşıdığı özellikler nedeniyle probiyotik bir mikroorganizmadır. Günümüzde *E. coli* suşu Nissle 1917 gastrointestinal sistemde fonksiyon bozukluğuna neden olan birçok hastalığın tedavisinde antibiyotiklere alternatif olarak kullanılmaktadır.

Bu derlemenin amacı *E. coli* suşu Nissle 1917'nin patojen *E. coli*'den farklarını irdelemek, klinik deneyler ve yapılan çalışmalar ile probiyotik yönünü desteklemektir.

## 2 *Escherichia coli* suşu Nissle 1917

### 2.1 EcN'nin kökeni

*E. coli* suşu Nissle 1917 (EcN), günümüzde Almanya ve diğer Avrupa ülkelerinde çeşitli iltihaplı bağırsak hastalıklarının klinik tedavisinde kullanılan Mutaflor'un içeriğinde bulunur [10].

Mutaflor'un serüveni 20. yy. ilk yıllarında, fizikçi ve bakteriyolog olan Alfred Nissle tarafından *E. coli* suşunun *Salmonella*, *Shigella* cinsi ve diğer patojen mikroorganizmaları inhibe ettiğini keşfetmesiyle başlamıştır. *In vitro* koşullarda bu patojen mikroorganizmalara karşı antagonistik etki gösteren bazı *E. coli* suşlarını tanımlamıştır. Nissle EcN suşunu 1917'de, I. Dünya Savaşı sırasında, Balkan yarım adasında kurulmuş olan askeri kamplardaki askerlerin dışkısından izole etmiştir. Nissle, bu tarihlerde enteropatojen türlerle kontamine olmuş Dobruca bölgesinde kalan askerlerde enfeksiyona bağlı diyarenin gelişmesini beklerken, bu askerlerin sağlıklı bireyler

olduklarını tespit etmiştir. Bu sonuca istinaden Nissle, askerleri bu enfeksiyondan koruyan oldukça antagonistik etkiye sahip *E. coli* suşunun askerlerin bağırsaklarında bulunduğu fikrini öne sürmüştür. Bu görüşünü laboratuvar çalışmaları ile kanıtlamıştır [10],[11].

### 2.2 EcN'ye ait özellikler

#### 2.2.1 Genel özellikler

Geçtiğimiz yirmi yıl boyunca *E. coli* suşu Nissle 1917; mikrobiyolojik, biyokimyasal ve moleküler genetik metotlar sayesinde analiz edilmiştir. Temel özelliklerine ilişkin bilgiler Tablo 2'de yer almaktadır. Suş herhangi bir virülens faktör göstermez ve probiyotik kimliğine katkı sağlayan genomik adalar üzerinde bulunan gen kümelerine sahiptir. Serolojik olarak, EcN O6 grubuna aittir ve serotipi O6:K5:H1'dir [12].

EcN, *Enterobacteriaceae* sınıfına ait tipik gram negatif bakteridir. Hücre dışı membranında yapısal bileşen olan lipopolisakkarit içerir. EcN K5 hücre dışı kapsüle sahiptir [13]. Bu kapsül izolatların %1'inde görülmüştür. Birçok ekstra intestinal patojen *E. coli* suşunda kapsül varlığı kan serumunda bulunan savunma bileşenlerinin saldırılarına karşı bakteriyi dirençli kılar (serum direnci) [14]. Ancak EcN suşunda kapsül varlığına rağmen, yapılan klasik serum direnç testlerinde serum duyarlı olduğu ve insan veya memeli canlıların serumlarında hızlıca öldüğü saptanmıştır. EcN H1 tipi flajellaya sahiptir, bu sayede oldukça hareketlidir. Flajellanın varlığı viskoz yapıdaki intestinal mukozada hareket etmesini ve epitel hücreler ile sinyal alışverişi yapabildiğini sağlar [15]. Siderofor, bakterinin demir edinimi için gerekli demiri bağlayan maddelerdir. EcN enterobaktin, salmokin, aerobaktin, yersiniabaktin sideroforlarını üretir. EcN enteropatojen mikroorganizma türlerinin gelişimini, üretmiş olduğu kolisin H ve mikrosinler (H47 ve M) ile inhibe eder. Ayrıca EcN, filogenetik alt grup olan *E. coli* B2 grubuna ait olduğundan peptid/poliketid hibridlerini sentezleyerek antimikrobiyel-antitümör aktivitesi kazanır ve bu hibridler diğer mikroorganizmalara karşı antagonistik etki göstermesine katkıda bulunur [2].

#### 2.2.2 Metabolik özellikler

EcN'nin metabolik özellikleri Tablo 3'te tipik *E. coli* türü ile kıyaslanarak verilmiştir. Metabolik özellikleri değerlendirildiğinde tipik *E. coli* suşlarından tek farkı Arjinini dehidrolize etmesidir. EcN'nin aerobik ve anaerobik şartlarda gelişebildiği, karbonhidrat metabolizmasının son ürünü olarak kısa zincirli yağ asitleri, başlıca asetik asit ve formik asit, az miktarda ise propiyonik ve butirik asit ürettiği saptanmıştır [16].

### 2.3 Probiyotik etki mekanizmaları

#### 2.3.1 Antagonistik etki

EcN mikrosin olarak bilinen bakterisidal ürünler üretir. Bu ürünler diyare ile yakından ilişkili mikroorganizmalara karşı etki gösterir [17]. *In vitro* koşullarda EcN'nin antagonistik etkisi farklı enteropatojenik, üropatojenik ve diğer *E. coli* suşları ile yapılan kültür yöntemiyle belirlenmiştir (Şekil 1). Agar yüzeyine *E. coli* DSM 423 süspansiyonu homojen olarak yayılmış, bu yüzeye kuyucuklar açılmıştır. İçerisinde 2.0x10<sup>9</sup> kob/ml EcN bulunan bir gece önceden hazırlanmış besiyeri kültürü 10, 20 ve 50 µl olarak açılan bu kuyucuklara ilave edilmiştir. 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda çukurların etrafında inhibisyon zonları oluşmuş, Şekil 1 elde edilmiştir [2].

Tablo 1: Bağırsak mikroflorasının bozulmasıyla ilişkili gastrointestinal hastalıklar [2].

Hastalık	Örnekler
Enfeksiyon hastalıkları	Kolera, Salmonellosis, Shigellosis, <i>Campylobacter</i> tarafından görülen enfeksiyon, patojenik <i>E.coli</i> (ETEC, EPEC, EHEC)
Fonksiyonel hastalıklar	Rahatsız Bağırsak Sendromu(İBS), Sindirim güçlüğü, Kabızlık
İltihaplı bağırsak hastalıkları (IBD)	Ülseratif Kolitler, Crohn Hastalığı, Whipple Hastalığı, Kollajenöz Kolit
Morfolojik ve anatomik değişikliklerle ilişkili hastalıklar	Kolon rahatsızlığı(divertikülozis), İdrar yolu tıkanması, Blind Loop Sendromu, Kanser
İmmunolojik rahatsızlıklar nedeniyle oluşan hastalıklar	Çölyak Hastalığı, Gıda Alerjileri
İyatrojenik hastalıklar (bir hekimin hatalı teşhis veya tedavisinden kaynaklanan)	Antibiyotik kullanımına bağlı olarak fonksiyonel hastalıklar ve diyare, kemoterapötik ajanlar ve radyasyon

Tablo 2: *E. coli* suşu Nissle 1917'nin temel mikrobiyolojik ve moleküler genetik özellikleri (EcN, serotip O6:K5:H1) [2].

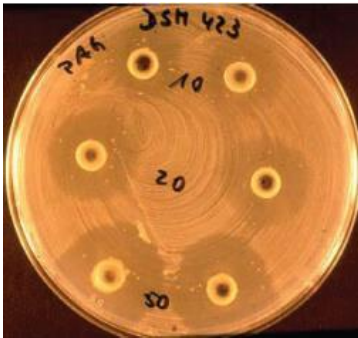
Özellikler	Gen ürünleri/ Biyosentez Sonuçları	Genler/ DNA problemleri	EcN de Varlığı Genotip	EcN de Varlığı Fenotip
Adhezyon	Yaygın tip I fimbria(FIA)	fim	+	+
	FIC fimbria	foc	+	+
	Curli fimbria	csgA	+	+
	S-tip fimbria	sfa	-	-
	P-tip fimbria	pap	-	-
	M-tip fimbria	NA	ND	-
	CFA I/II (kolonizasyon faktör antijenleri I/II)	cfa I/II	ND	-
Toksin	a-Hemolizin	hly	-	-
	CNF I(sitotoksik nekrotizan faktör I)	cnfI	-	-
	H-LT(ısıya dayanıksız enterotoksin)	etx	-	-
	H-ST(ısıya dayanıklı enterotoksin)	est	-	-
	Şiga toksin	stx	-	-
Demir Çelasyonu (siderofor)	Enterobaktin	ent	ND	+
	Salmokelin	iro	+	+
	Aerobaktin	iuc/aer	+	+
	Yersiniabaktin	ybt	+	+
	Hemin edinim sistemi	chu	+	+
	Sitrat edinim sistemi	cit	+	ND
Diğer Özellikler	Kapsül (tip K5)*	kps	+	+
	Flagella (tip H1)	fla	+	+
	Arjinin dehidrolaz **	NA	ND	+
	Selüloz biyosentezi	bcs	+	+
	Mikrosin H47	mch	+	+
	Mikrosin M	mcm	+	+
	Kolibaktin sentezi	clp/pks	+	+
	LPS	wa	+	+
	LPS O6 tekrarlayan birim	wb	+	+
	O6 antijen polimeraz-fonksiyonel olmayan	wzy(rfb)II	+	+
Ekstrakromozomal elementler (iki gizli transfer edilmeyen pilazmid***)	pMUT1(3173 bp)	Muta 5/6	+	ND
	pMUT2 (5526 bp)	Muta 7/8	+	ND
		Muta 9/10	+	ND

+: Var. -: Yok. ND: Belirlenemedi. NA: Spesifik DNA probu mevcut değil. \*: *E. coli* izolatların %1 inde var. \*\*: *E. coli* izolatların %7 sinde var. \*\*\*: Antibiyotiklere direnç ve virülens genleri taşımaz.

Tablo 3: *E. coli* suşu Nisse 1917'de taksonomik açıdan önemli enzimlerin varlığı ve biyokimyasal reaksiyonlar; tipik *E. coli* türü ile karşılaştırılması [2].

Aktivite/Enzim	Tipik <i>E. coli</i>		
	EcN	(+/-/v)	(% pozitif)
Oksidaz	-	-	0
Dekstroz metabolizması	+	+	100
Voges-Proskauer reaksiyonu	-	-	0
$\beta$ Galaktosidaz(ONGP testi)	+	+	95
H <sub>2</sub> S üretimi	-	-	1
Lizin dekarboksilaz	+	+	87
Arjinin dehidrolaz	+	-	7
Ornitin dekarboksilaz	+	+	72
Üreaz	-	-	0
Sitrat metabolizması	-	-	1
Malonat metabolizması	-	-	0
Triptofan deaminaz	-	-	0
İndol üretimi	+	+	98
Laktoz metabolizması	+	+	91
Sakkaroz metabolizması	-	v	44
Arabinoz metabolizması	+	+	99
Rafinoz metabolizması	-	-	27
Ramnoz metabolizması	+	+	87
Sorbitol metabolizması	+	+	94
İnositol metabolizması	-	-	2
Ribitol metabolizması	-	-	2

+: Pozitif reaksiyon. -: Negatif reaksiyon. v: Değişken.

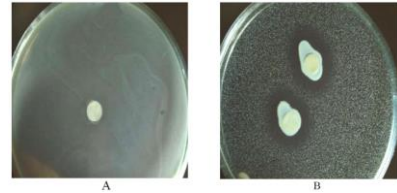


Şekil 1: EcN'nin diğer *E. coli* suşu (*E. coli* DSM 423) üzerindeki antagonistik etkinin belirlenmesi [2].

*In vivo* koşullarda EcN'nin antagonistik etkisi, germ-free (Bünyelerinde hiçbir mikroorganizma barındırmayan ve kanlarında bu mikroorganizmalara karşı oluşmuş antikorlar bulunmayan çok özel deney hayvanlarıdır) ve gnotobiyotik deney hayvanları ile patojen ve patojen olmayan *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Candida albicans*, *Lactobacillus johnsonii* bakterileri ile çalışılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

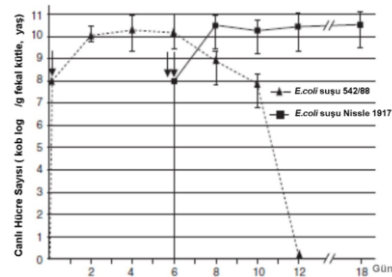
Dezfulian ve ark. (2008) 10 $\mu$ l EcN süspansiyonunun ürettiği mikrosinin *Salmonella* spp., *Clostridium difficile*, *Campylobacter* spp., *E. coli* K12 H5316 üzerinde inhibisyon etkisini araştırmış, *E. coli* K12 H5316'nın test edildiği agarda 13 mm çapında inhibisyon zonu görülürken, diğer mikroorganizmalara karşı inhibisyon tespit etmemişlerdir [17].

EcN'nin invazif türler üzerine etkisini inceleyen araştırmada, EcN'nin *Salmonella enterica* istilasını %70 oranında azalttığı, dahası *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Legionella pneumophila* ve *Listeria monocytogenes* üzerinde inhibe edici etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2). Ancak bu etkinin EcN tarafından üretilen mikrosin kaynaklı olmadığı mikrosin üretmeyen EcN mutan suş SK22D ile belirlenmiştir. EcN'nin epitel yüzeye invazif türlerin bağlanmasını engelleyen bir bileşen salgıladığı hipotezi ortaya atılmış, anti-invazif etkinliğinden sorumlu EcN genlerini belirlemek için çalışmaların sürdüğü ifade edilmiştir [18]. Bu çalışma EcN'nin antagonistik etkisinin birden çok mekanizma ile gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 2: EcN'nin ürettiği mikrosinin inhibisyon etkisi. A: *Salmonella* spp., B: *E. coli* K12 H5316 [18].

Yedi günlük dört domuz ağız yoluyla 10<sup>8</sup> kob/mL *E. coli* 542/88 ile enfekte edilmiştir. Enteropatojen *E. coli* kolayca bağırsakta kolonize olmuş ve 2 gün içinde 10<sup>10</sup> kob/mL'ye ulaşmış, enfeksiyondan kısa bir süre sonra hayvanlarda diyare başlamıştır. Deneyin 6.gününde, görsel olarak da hasta görülen domuzlara 2.0x10<sup>8</sup> kob/mL EcN ağız yoluyla verilmiştir. Bağırsakta enteropatojen *E. coli* nin kolonize durumuna rağmen, EcN'nin domuzların bağırsaklarında kolonize olduğu ve 6 gün sonra enteropatojen *E. coli*'nin bağırsaktan tamamen uzaklaştığı, domuzların sağlığına kavuştuğu tespit edilmiştir (Şekil 3).



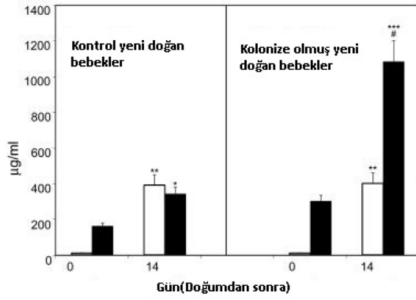
Şekil 3: Gnotobiyotik domuz hayvanlarında EcN nin enteropatojen *E. coli* 542/88'e karşı gösterdiği antagonistik etki.



### 2.3.2 İmmün sistemini düzenleyici ve anti-inflamatuar etki

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda EcN'nin kayda değer bir şekilde immün sistemini düzenleyici ve anti-inflamatuar etki gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmalar gnotobiyotik deney hayvanlarında, yeni doğan bebeklerde, hasta hayvan ve insanlarda yapılmış olup, sadece sağlıklı yetişkin insanlarda ve hayvanlarda EcN'nin immün düzenleyici aktivitesinin oldukça düşük olduğu ya da hiç olmadığı tespit edilmiştir [19].

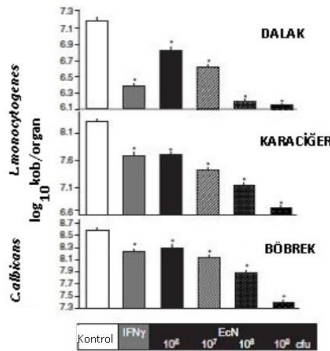
İmmünglobulin(Ig) vücutta kanda bulunan antikordur ve A, D, E, G ve M olmak üzere 5 farklı çeşidi bulunmaktadır. IgA sindirim sistemi, ağız, burun, kulak, göz, vajina ve nefes yolları gibi yerlerde bulunan ve vücudu dışarıdan gelen yabancı maddelerden koruyan antikordur. Yeni doğum yapmış annenin ilk sütü olan kolostruma kadar pek çok hassas bölgede, vücudu enfeksiyonlardan koruyacak şekilde yer alır. Bağışıklık sisteminin bol IgA türü antikor ürettiği kişilerde sık enfeksiyon gözlenmez. IgM ise B hücreleri tarafından oluşturulan ilk antikorudur. Lenf sıvısı ve kanda bulunan, yabancı maddelere ilk tepkiyi veren antikor olarak görev alır. Yapılan bir çalışmada, EcN ile kolonize olmuş yeni doğan bebeklerin IgM seviyesinde kolonize olmamış bebeklere göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiş ve kolonize bebeklerde IgM seviyesi yüksek tespit edilmiştir. IgA açısından kontrol grupla istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Bu çalışma EcN'nin doğal immün yanıtı artırıcı etkisinin olduğunu göstermektedir (Şekil 4),[20].



Şekil 4: EcN ile kolonize ve kolonize olmamış prematüre bebeklerin serumlarındaki IgM (siyah bar) ve IgA (beyaz bar) miktarlarının belirlenmesi [20].

### 2.3.3 Enfeksiyon önleyici etki

Fareler üzerine yapılan çalışmada, belirlenen dozda *Candida albicans* ve *Listeria monocytogenes* enfekte edilmeden önce EcN, farelere ağız yoluyla verilmiş ve sonuçlar incelenmiştir (Şekil 5).

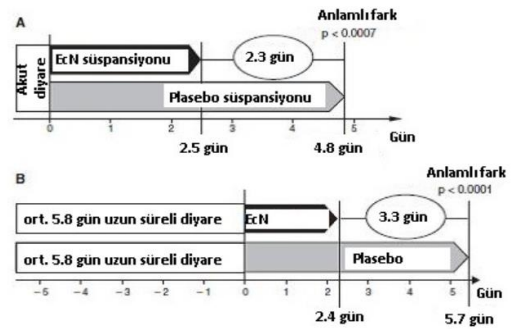


Şekil 5: EcN'nin *C. albicans* ve *L. monocytogenes* üzerine etkisi [21].

4 gruba ayrılmış farelere, bakteri ve maya enfeksiyonuna karşı konakçının savunmasını arttırmak amacıyla ağızdan  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  kob/mL içeren EcN verilmiştir. 24 sa. sonra *Listeria monocytogenes* ( $6.0 \times 10^3$  kob) ya da *Candida albicans* ( $5.0 \times 10^5$  kob) ile enfekte edilmiştir. Bu gruplara ilave olarak kontrol ve IFN $\gamma$  (interferon gamma) grubuna da aynı sayıda *L. monocytogenes* veya *C. albicans* verilmiştir. *L. monocytogenes* enfeksiyonundan 3 gün, *C. albicans* enfeksiyonundan 1 gün sonra fareler ölmüştür, böylece hedeflenen organlarda parazit mikroorganizma sayısına ulaşılabilmektedir. *L. monocytogenes* ile enfekte olmuş farelerin dalak ve karaciğerinde, kontrol grup ile IFN $\gamma$  grup kıyaslandığında belirgin olarak parazit mikroorganizma sayısının IFN $\gamma$  grupta düşük olduğu görülmüştür. *C. albicans* ile enfekte olmuş farelerin böbreklerinde de aynı durum gözlenmiştir. Parazit mikroorganizmalar ile enfekte olmadan önce EcN verilmiş farelerin dalak, karaciğer ve böbreklerinde ise kontrol gruptan daha az sayıda parazit mikroorganizmaya ulaşılmıştır [21].

Akut diyare görülen 113 bebek ve yeni yürümeye başlayan çocuklarla (2-46 aylık, ortalama 23 aylık) EcN grup (n=55) ve plasebo grup (n=58) olarak yapılan çalışmada, EcN grubundaki hastalara  $10^8$  kob/mL EcN süspansiyonu, yaşlarıyla orantılı bir şekilde 9. güne kadar verilmiştir (<1 yaş için 1x1mL süspansiyon/gün; 1 yaş <x<3 yaş için 2x1 mL süspansiyon/gün; 3 yaş <x<4 yaş için 3x1 mL süspansiyon/gün). Bu uygulamadan önce EcN grupta ortalama diyare süresi 1.4 gün iken, plasebo grupta 1.6 gün olarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonucu olarak EcN grupta 55 hastadan 52 hastada (%94.5); plasebo grupta ise 58 hastadan 38 hastada(67.2) bağırsak hareketi azalmıştır. EcN grupta akut diyare 2.5 gün sürerken; plasebo grupta 4.8 gün sürmüştür (Şekil 6).

İkinci olarak yapılan çalışma ise uzun süreli diyare problemi olan 151 bebek ve yeni yürümeye başlayan çocuklarla (1-47 aylık) yapılmıştır. EcN grup (n=75), plasebo grup (n=76) ların ikisinde de ortalama diyare gün sayısı 5.8 gün olarak belirlenmiştir. Hastalara 20 gün boyunca yukarıdaki çalışmanın aynı dozlarında uygulama yapılmış, EcN gruptaki hastalarda diyare 2.4 gün sonunda biterken, plasebo grupta 5.7 günde son bulmuştur (Şekil 6) [2].



Şekil 6: EcN'nin diyare gelişimine etkisi [2].

335 yeni doğan buzağı üzerine yapılan plasebo kontrollü çalışmada EcN'nin yeni doğan diyaresini %63 (plasebo grup) ten %12 (EcN grup) oranına düşürdüğü saptanmıştır [2].

### 2.3.4 Konstipasyon ve Antimutajenik aktivite

Rahatsız bağırsak sendromu (IBS), karın ağrısı veya düzensiz dışkılamaya bağlı şikayetler ile karakterize edilen fonksiyonel

bir hastalıktır [22],[23]. Akut diyare hastalarının %25 inde IBS görülmektedir. Sıçanlar üzerine yapılan çalışmada ağız yoluyla uygulanmış EcN'nin IBS'yi azalttığı tespit edilmiştir. Diğer fonksiyonel bağırsak hastalıklarından biri olan kronik konstipasyonda (kolon hareketinin azaldığı) EcN'nin pozitif yönde kolon hareketini düzenlediği saptanmış bu etkinin karbonhidarat metabolizması son ürünü olan asetik asitten kaynaklanabileceği belirtilmiştir [24].

Standart mutajenik testler kullanılarak yapılan çalışmalarda EcN 'nin bazı bilinen mutajenlere (4-Nitrokinolein 1-oksit (NQO), benzo(a)pyrene,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) karşı antimutajenik aktivite gösterdiği görülmüştür [2].

#### 2.4 Kolonizasyon kapasitesi

Ağız yoluyla alınan EcN'nin gnotobiyotik sıçan ve domuzların bağırsaklarında yüksek kapasitede kolonize olduğu görülmüştür. EcN'nin selüloz üretme ve salgılama kabiliyetinin kolonizasyonu kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Probiyotik *E. coli* suşu Nissle 1917'nin 37 °C'de biyofilm oluşturduğu ve diğer *E. coli* suşlarından farklı olarak daha düşük sıcaklıklarda (<30°C) bile biyofilm oluşturabilme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturabilme özelliği sayesinde EcN, oral inokulasyondan sonra bağırsakta varlığını sürdürebilme yeteneği kazanır. Ayrıca fimbriaların varlığı epitel hücrelerine tutunmayı sağlar [2],[25],[26].

#### 2.5 Toksikolojik potansiyeli ve biyo güvenilirlik

##### 2.5.1 Toksin üretimi

EcN suşu diğer *E. coli* suşlarının ürettiği sitotoksin, şigatoksin, ısıya dayanıklı enterotoksinler, ısıya duyarlı enterotoksinlerden hiçbirini üretmez. Spesifik DNA problemlerinin kullanıldığı PCR tekniklerinde, herhangi bir toksin sentezleyen gen belirlenmemiştir [27].

##### 2.5.2 Yayılabilirlik (Invasiveness)

EcN invazif aktivitesine sahip değildir. Enteroinvazif *E. coli* (EIEC) ya da *Shigella* da bulunan gen kodlarını taşımaz [28].

##### 2.5.3 Serum-direnci

EcN suşu O6 yüzey antijeni nedeniyle inoküle edildiği insan, büyükbaş hayvanlar ve domuzların serumlarına karşı direnç göstermez [17].

##### 2.5.4 Antibiyotik direnci

EcN antibiyotik direnci olmayan iki gizli plazmide sahiptir (pMUT1,pMUT2). Bunun yanı sıra diğer tüm *E. coli* suşlarının göstermiş olduğu klindamisin, eritromisin, metronidazol, penisilin G, rifampisin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı doğal direnç gösterir (Tablo 4),[2].

##### 2.5.5 Genetik kararlılığı

Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda EcN'nin genetik olarak kararlı olduğu tespit edilmiştir. EcN konjugatif yabancı DNA'ya karşı zayıf alıcı özellik gösterir. Çeşitli plazmid grupları kullanılarak yapılan standart konjugasyon tekniklerinde, *E. coli* K-12 suşu (pozitif kontrol) ile EcN'nin konjugasyon frekansları karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak EcN, virüls faktörleri içeren IncFI ve IncFII tip plazmidleri yapısına almamıştır. EcN'nin konjugasyon frekansı %0 olarak belirlenmiştir (Tablo 5) [29].

### 3 Sonuç

İnsan ve hayvan sağlığı üzerine yapılmış çalışmalarda, probiyotik mikroorganizmaların çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı ve olumlu sonuçlar alındığı görülmektedir. Kökeni, mikrobiyolojik yönü, etki mekanizmaları, biyo güvenilirliği açısından detaylandırılmış olan EcN, probiyotik mikroorganizma tanımına uymaktadır. EcN birçok gastro intestinal klinik çalışmaya konu olmuş ve sonuç olarak sağlık üzerine olumlu etkileri saptanmıştır.

EcN'nin etkili olmasının nedenlerinden biri bağırsaktaki kapasitesinin yüksek olmasıdır. Bu sayede bağırsaktaki patojen mikroorganizma ile rekabet edebilmekte ve etki mekanizmaları sayesinde baskın flora haline gelmektedir.

Tablo 4: EcN'nin duyarlı ve dirençli olduğu farklı antibiyotikler [2].

	Duyarlı		Dirençli
Amikasin	Mezlosilin	Sefotaksim	Eritromisin
Amoksisilin/klavulanik asit	Nitrofurantoin	Seftriakson	Klindamisin
Ampisilin	Norfloksasin	Sefalotin	Metronidazol
Azlosilin	Pipemidik asit	Siprofloksasin	Quinupristin/dalfopristin
Doksisiklin	Piperasilin	Streptomisin	Penisilin G
Gentamisin	Rifampisin	Tetrasiklin	Rifampin
İmipenem	Sefaklor	Tikarsilin	Sefsulodin
Kloramfenikol	Sefazolin	Tobramisin	Teikoplanin
Latamoksef	Sefoperazon	Trimetoprim/sulfametoksazol	Vankomisin

Tablo 5: EcN'nin yabancı DNA plazmidleri kabul etme yüzdeleri [2]

Ing grup plazmidler	DNA'nın kabulü %	Ing grup plazmidler	DNA'nın kabulü %	Ing grup plazmidler	DNA'nın kabulü %
IncB	1	IncH3	0.01	IncU	0.1
IncC	10	IncI1	0.5	IncW1	0.1
IncD	5	IncI2	0	IncW2	0.2
IncFI	0	IncJ	0	IncW4	0.1
IncFII	0	IncK	0	IncX	0.1
IncFIII	0.5	IncN	0	IncY	0
IncOF	1	IncP	5	IncZ	1
IncH1	0.05	IncQ	1		
IncH2	0.01	IncT	5		

Literatürde *E. coli* suşu Nissle 1917' nin gıdalarda kullanımı ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamıştır. Fonksiyonel ürün olan probiyotik gıdalarda suş seçimi kritik bir süreçtir. Ancak dondurma, dondurma-kurutma işlemlerinde zayıf yaşam aktivitesi göstermeleri, yüksek verim sağlayamamaları nedeniyle tüm probiyotik suşlar endüstriyel olarak üretilmemektedir [30]. Probiyotik mikroorganizmanın gıdalarda kullanılabilmesi için, insan orjinli olması, patojen özellik göstermemesi, gastrik asit ve safra tuzlarına direnç göstermesi, bağırsak epitelyum dokusuna tutunması gibi şartların yanı sıra gıdanın duyuşal özelliklerini kötü yönde etkilememesi, raf ömrü boyunca istenilen sayıda gıda içerisinde kalabilmesi ve teknolojik açıdan uygulanabilir olması gerekmektedir. EcN'nin gıda endüstrisinde kullanılabilmesi için, bu şartları sağladığını gösteren kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

#### 4 Teşekkür

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi ve Bursa Teknik Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

#### 5 Kaynaklar

- [1] Yaşar B, Kurdaş OÖ. "Probiyotikler ve gastrointestinal sistem". *Güncel Gastroenteroloji*, 13(1), 23-28, (2009).
- [2] Sonnenborn U, Jürgen S. "The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917-features of a versatile probiotic". *Microbial Ecology in Health and Disease*, 21(3-4), 122-158, 2009.
- [3] Fuller R. "Probiotics in man and animals". *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365-378, 1989.
- [4] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Relman DA. "Diversity of the human intestinal microbial flora". *Science*, 308(5728), 1635-1638, 2005.
- [5] Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. "Probiotic mechanisms of action". *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160-174, 2012.
- [6] Metehan Ö. *Sağlıklı Kalmak için Probiyotikler, Prebiyotikler Anlatılmayan Tarihçe*. İstanbul, Türkiye, Nobel Tıp Kitapevleri, 2011.
- [7] Ceyhan N, Alç H. "Bağırsak mikroflorası ve probiyotikler". *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5(1), 107-113, 2012.
- [8] Altenhoefer A, Oswald S, Sonnenborn U, Enders C, Schulze J, Hacker J, Oelschlaeger TA. "The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens". *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 40(3), 223-229, 2004.
- [9] Nami Y, Haghshenas B, Abdullah N, Barzegari A, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY. "Probiotics or antibiotics: future challenges in medicine". *Journal of Medical Microbiology*, 64(2), 137-146, 2015.
- [10] Scaldaferrri F, Gerardi V, Mangiola F, Lopetuso LR, Pizzoferrato M, Petito V, Gasbarrini A. "Role and mechanisms of action of *Escherichia coli* Nissle 1917 in the maintenance of remission in ulcerative colitis patients: an update". *World Journal of Gastroenterology*, 22(24), 5505-5511, 2016.
- [11] Konturek PC, Sliwowski Z, Koziel J, Ptak-Belowska A, Burnat G, Brzozowski T, Konturek SJ. "Probiotic bacteria *Escherichia coli* strain Nissle 1917 attenuates acute gastric lesions induced by stress". *Journal of Physiology and Pharmacology*, 60(6), 41-48, 2009.
- [12] Kruis W, Frič P, Pokrotnieks J, Lukáš M, Fixa B, Kaščák M, Wolff C. "Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine". *Gut*, 53(11), 1617-1623, 2004.
- [13] Kleta S, Steinru H, Breves G, Duncker S, Laternus C, Wieler LH, Schierack P. "Detection and distribution of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 clones in swine herds in Germany". *Journal of Applied Microbiology*, 101(6), 1357-1366, 2006.
- [14] Taylor PW. "Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria". *Microbiological Reviews*, 47(1), 46-83, 1983.
- [15] Seo EJ, Weibel S, Wehkamp J, Oelschlaeger TA. "Construction of recombinant *E. coli* Nissle 1917 (EcN) strains for the expression and secretion of defensins". *International Journal of Medical Microbiology*, 302(6), 276-287, 2012.
- [16] Losurdo G, Iannone A, Contaldo A, Ierardi E, Di Leo A, Principi M. "Escherichia coli Nissle 1917 in Ulcerative Colitis Treatment: Systematic Review and Meta-analysis". *Journal of Gastrointestinal Liver Diseases*, 24(4), 499-505, 2015.
- [17] Dezfulian A, Ardekani AMZ, Aslani MM, Dabiri H, Zali MR. "Influence of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on the growth of different pathogenic bacteria isolated from patients with diarrhea". *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, 1(3), 113-117, 2008.
- [18] Ohland CL, Wallace KM. "Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function". *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(6), 807-819, 2010.
- [19] Montanaro J, Inic-Kanada A, Ladurner A, Stein E, Belij S, Bintner N, Leisch N. "Escherichia coli Nissle 1917 bacterial ghosts retain crucial surface properties and express chlamydial antigen: an imaging study of a delivery system for the ocular surface". *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 37-41, 2015.
- [20] Cukrowska B, Lodinova-Zadnikova R, Enders CSU, Schulze J, Tlaskalova H. "Specific Proliferative and Antibody Responses of Premature Infants to Intestinal Colonization with Non pathogenic Probiotic *E. coli* Strain Nissle 1917". *Scandinavian Journal of Immunology*, 55(2), 204-209, 2002.
- [21] Hockertz S. "Augmentation of host defence against bacterial and fungal infections of mice pretreated with the non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917". *Arzneimittel-Forschung*, 47(6), 793-796, 1997.
- [22] Uymaz B. "Probiyotikler ve kullanım alanları". *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 95-104, 2010.
- [23] Malaguarnera M, Vacante M, Condorelli G, Leggio F, Rosa MD, Motta M, Malaguarnera G, Alessandria I, Rampello L, Chisari G. "Probiotics and prebiotics in the management of constipation in the elderly". *Acta Medica Mediterranea*, 29, 791-798, 2013.

- [24] Dembiński A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Dembiński M, Cieszkowski J, Gosiewski T, Christopher KP. "Synergic interaction of rifaximin and Mutaflor (*Escherichia coli* Nissle1917) in the treatment of acetic acid-induced colitis in rats". *Hindawi Publishing Corporation Gastroenterology Research and Practice*, 2016, 1-11, 2016.
- [25] Hancock V, Dahl M, Klemm P. "Probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 outcompetes intestinal pathogens during biofilm formation". *Journal of Medical Microbiology*, 59(4), 392-399, 2010.
- [26] Adediran J. "Modification of the *Escherichia coli* Nissle 1917 Envz Gene to Improve its Probiotic Potential". MSc Thesis, University of Rhode Island, Rhode Island, USA, 2013.
- [27] Zhang Y, Zhang Y, Xia L, Zhang X, Ding X, Yan F, Wu F. "*Escherichia coli* Nissle 1917 targets and restrains mouse B16 melanoma and 4T1 breast tumors through expression of azurin protein". *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21), 7603-7610, 2012.
- [28] Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U. "Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917". *Journal of Bacteriology*, 186(16), 5432-5441, 2004.
- [29] Zyrek AA, Cichon C, Helms S, Enders C, Sonnenborn U, Schmidt MA. "Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC $\zeta$  redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair". *Cellular Microbiology*, 9(3), 804-816, 2007.
- [30] Champagne CP, Gardner NJ. "Challenges in the addition of probiotic cultures to foods". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(1), 61-84, 2005.