T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANNE SÜTÜ (KOLOSTRUM) VE BEBEK FEÇESLERİNDEN *LACTOBACİLLUS* CİNSİ BAKTERİ SUŞLARININ İZOLASYONU VE API 50 CHL SİSTEMİ İLE İDENTİFİKASYONU

DİLEK ÖZGÜN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
ANABİLİM DALI

KONYA, 2009

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANNE SÜTÜ (KOLOSTRUM) VE BEBEK FEÇESLERİNDEN *LACTOBACİLLUS* CİNSİ BAKTERİ SUŞLARININ İZOLASYONU VE API 50 CHL SİSTEMİ İLE İDENTİFİKASYONU

Dilek ÖZGÜN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hasibe CİNGİLLİ VURAL
2009, 60 Sayfa
Jüri: Prof. Dr. Yusuf DURAK
Yrd. Doç. Dr. Hasibe CİNGİLLİ VURAL
Yrd. Doç. Dr. Nesrin TURAÇLAR

Laktik asit bakterileri, çeşitli gıdaların üretiminde starter kültür olarak kullanılan, bazı antimikrobiyal maddeleri üreten ve zararlı bakterileri inhibe edebilen mikroorganizmalardır.

Bu çalışmada, Konya Dr. Faruk Sükan Doğum ve Çocuk Hastanesi'nden 100 adet anne sütü (kolostrum) ve 50 adet bebek feçes (sadece anne sütü alan 3-30 günlük bebekler) örnekleri toplandı. Örnekler, Konya İl Kontrol Laboratuvarı'nda MRS Agar besiyerlerine ekilerek incelendi. 48 saat süre ile 37 ˚C'de inkübe edilen besiyeri plaklarında üreyen koloniler, API 50 CHL sistemiyle teşhis edildi. 100 kolostrum örneğinin 20'sinde (% 20) üreme gözlendi. Üreme gösteren *lactobacillus* spp. suşlarının 5 farklı türe ait oldukları (*L. acidophilus*, *L. acidophilus*-3, *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum*) belirlendi. 50 feçes örneğinin 17'sinde (% 34) üreme gözlendi ve bunların da 5 farklı türe ait oldukları (*L. brevis*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*) gözlendi.

Sonuç olarak feçes örneklerinden kolostruma göre, daha fazla *lactobacillus* spp. suşlarının izole edilmesi, kolostrumun steril olmasından kaynaklandığı görüşüne varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Lactobacillus*, MRS Agar, API 50 CHL

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

ISOLATION OF STRAINS OF GENUS *LACTOBACILLUS* IN BABY FAECES AND HUMAN MILK (COLOSTRUM) AND IDENTIFICATION BY API 50 CHL SYSTEM

Dilek OZGUN

Selcuk University, Life Sciences Institute

Biology Department

Advisor: Assis.Prof.Dr. Hasibe (Cingilli)VURAL

2009, 60 Page

Jury : Assoc. Prof. Dr. Yusuf DURAK
Assis. Prof. Dr. Hasibe CİNGİLLİ VURAL
Assis. Prof. Dr. Nesrin TURAÇLAR

Lactic acid bacteria are microorganisms which are used as starter culture in various food production, can produce some antimicrobial substances, and inhibit harmful bacteria.

In this study, 100 human milk (colostrum) samples and 50 infant (which are fed only by breast milk and from 3 to 30-day-old) faeces samples were collected from Konya Dr. Faruk Sukan Maternity and Children Hospital. Samples were analyzed by spreading on MRS Agar in Konya Province Control Laboratuary. After a 48- hour incubation at 37°C, colonies were identified by API 50 CHL systems. In colostrum samples, the growth was observed in 20 of 100 (20%) samples. The isolated strains were from 5 different species of *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. acidophilus*-3, *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum*). In faeces samples, the growth was observed in 17 of 50 (34%) samples and the isolated strains from faeces, too, were from 5 different species of *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*).

In conclusion, the higher isolation rate of *Lactobacillus* spp. in faeces than in colostrum may indicate the sterility of colostrum.

Key Words: *Lactobacillus*, MRS Agar, API 50 CHL

ÖNSÖZ

Tezimin her aşamasında büyük desteğini gördüğüm Danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. Hasibe CİNGİLLİ VURAL'a (Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji A.B.D.), en zor anımda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Yusuf DURAK hocama (Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji A.B.D. başkanı), Mukadderat GÖKMEN'e, Güler ŞAVLI'ya ve Emrah TORLAK'a(Konya İl Kontrol Laboratuvarı), Doç. Dr. Leyla GÜLER'e (Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü), tez projemi 08201034 No'lu proje ile destekleyerek gerekli maddi olanağı sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (BAP) ve çalışma arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dilek ÖZGÜN

2009- Konya

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....i
ABSTRACT.....ii
ÖNSÖZ…..,…….iii
İÇİNDEKİLER iv
ŞEKİLLER ve ÇİZELGELER…….....v
SİMGELER ve KISALTMALAR……...vi
1.GİRİŞ 1
2.KAYNAK ARAŞTIRMASI.....3
3. MATERYAL VE METOT…….18
3.1. Materyal…….....18
3.2. Metot……...…….18
3.2.1. Örneklerin incelenmesi…….....18
3.2.2. Örneklerin besiyerlerine ekimi…….19
3.2.3. Besiyerleri…….19
3.3. API 50 CHL Sistemi ile İdentifikasyon……...21
3.3.1. API 50 CH sisteminin çalışma prensibi……22
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI…….27
4.1. Kolostrum ve Feçes Örneklerinden Laktobasillerin İzolasyonu……..27
4. 2. Laktobasil Suşlarının API 50 CHL Sistemi ile İdentifikasyon Sonuçları……...27
5. TARTIŞMA ve SONUÇ…….36
KAYNAKLAR…….....43

ŞEKİLLER ve ÇİZELGELER

Şekil 3. 1. Anaerobik jar…….21
Şekil 3. 2. API 50 CHL Tanımlama Yöntemini Şeması…….24
Çizelge 3. 1. API 50 CHL Sistemininin mikrotüpleri ve içerdikleri madde miktarları…….25
Şekil 4. 1. MRS Agarda gelişen laktobasil kolonileri……27
Şekil 4. 2. *Lactobacillus* spp.'in 48 Saatlik inkübasyondan sonraki API strip'indeki görünümü……28
Çizelge: 4. 1. Kolostrum ve feçes örneklerinden (n=150) MRS Agar besiyerinde *Lactobacillus* spp. suşlarının izolasyonu ve API 50 CHL sistemi ile identifikasyonu……29
Çizelge: 4. 2. Kolostrum ve feçes örneklerinden (n=150) MRS Agar besiyerinde gelişen ve API 50 CHL sistemiyle *Lactobacillus* spp. suşlarının türlere göre dağılımı ve % oranları……...33
Çizelge 4. 3. Kolostrum (n=100) örneklerinden MRS Agar besiyerinde *Lactobacillus* spp. suşlarının izolasyonu ve API 50 CHL sistemi ile identifikasyonu……..34
Çizelge 4. 4. Feçes (n=50) örneklerinden MRS Agar besiyerinde *Lactobacillus* spp. suşlarının izolasyonu ve API 50 CHL sistemi ile identifikasyonu…….34

SİMGELER ve KISALTMALAR

DNA: Deoksiribonükleik Asit

GIS: Gastrointestinal Sistem

GRAS: Generally Recognized as Safe

H_2O_2: Hidrojen Peroksit

LAB: Laktik Asit Bakterileri

MRD: Maximum Recovery Diluent

MRS: de Man Rogosa Sharpe

PCR: Polymerase Chain Reaction

RAPD: Random Amplified of Polymorphic DNA

SDS-PAGE: Sodyum Dodecil Sulfat Polyacrilamid Gel Electrophoresis

1. GİRİŞ

İnsan vücudunda trilyonlarca bakteri parazit olarak bulunmakla birlikte mide-bağırsak sisteminde de 500 civarında farklı mikroorganizma türünün bulunduğu bildirilmektedir. Sağlıklı bir konakçının normal florasında bu gruplar denge halindedir. Mide-bağırsak florasının uygun bir şekilde sürdürülmesi, bu florayı oluşturan yararlı ve zararlı mikroorganizmaların denge halinde bulunmasına bağlıdır (Çakır 2003).

Mide-bağırsak sisteminde bulunan yararlı mikroorganizmalar, besin maddelerinin sindirilmesine yardımcı olurken, bu besin maddelerinden açığa çıkardıkları bazı maddeler yardımı ile organizmayı patojen mikroorganizmaların zararlı etkilerinden korurlar. Bunlar "probiyotik mikroorganizmalar grubu'' olarak adlandırılırlar. Laktik asit bakterilerinin (LAB) bazı cins ve türleri probiyotik mikroorganizmalar grubu içerisinde bulunurlar. LAB insan sağlığı ve gelişimi için çok önemli bir yer tutan süt ürünlerinin üretilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. LAB türleri çok eski çağlardan beri çeşitli fermente gıda ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadırlar. Bunların bazıları günümüzde fermente gıda ürünlerinin elde edilmesinde starter (başlatıcı) kültür olarak hala yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. İnsan mide-bağırsak sisteminin normal mikrobiyal florasının önemli bir kısmını LAB türleri oluşturmaktadır. Laktik asit bakterileri sindirim sisteminden başka, vajina, deri ve saç gibi vücudun diğer bölgelerinde de bulunmaktadırlar. Bulundukları bölgede ürettikleri asetaldehit ve CO_2 gibi maddeler yardımıyla ortamın pH değerini değiştirir, salgıladıkları bakteriosin benzeri maddelerle de diğer bakterilerin gelişmelerini önlemeye çalışırlar. Ayrıca LAB enfeksiyonlardan koruma, laktozu parçalama, kanserden koruma ve serum kolesterol düzeyini düşürme gibi etkilerinin arştırılmasına yönelik çalışmalar artmaktadır (Tannock ve ark. 1999, Shinoda ve ark. 2001, McCartney ve ark. 1996, Matsumiya ve ark. 2002, Tannock ve ark. 2000, Klein ve ark. 1998, Kışla ve Ünlütürk, 1998, Heyman 2002).

Günümüzde antibiyotiklere karşı mikroorganizmalarda ortaya çıkan yüksek dirençlilik özelliği, antibiyotik kullanımına bağlı çeşitli zararlı yan etkiler, gıda maddeleri ile birlikte vücuda giren çok sayıdaki kanserojenik madde kalıntıları gibi zararlı etkilere karşı *Lactobacillus, Enterococcus* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerden yararlanmaya yönelik uygulamalar artmaktadır (Salminen ve ark. 1998, Salminen 1999, Klaenhammer 2000).

Bu araştırmada 100 adet anne sütü (kolostrum) ve sadece anne sütü ile beslenen bebeklerden alınan 50 feçes (3-30 günlük) örneği, laktobasiller yönünden API 50 CHL sistemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Laktik asit bakterileri prokaryot, heterotrof ve kemo-organotrof olan canlı grubu içinde yer alırlar. Bu özellikleri taşıyan bakteriler 4 sınıf altında toplanmışlardır. Bunlar; *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc*'lardır (Yeniel 2006).

Laktik asit bakterileri, Gram pozitif, katalaz negatif, fakültatif anaerobik, spor oluşturmayan, kokobasil ya da basil şekilli, kromozomal DNA yapısındaki guanin+sitozin (G+C) oranı % 55'den az olan bakterilerdir. Karbohidrat fermentasyonu sırasında en fazla laktik asit üretirler. Bunun yanında tür ve cins özelliklerine bağlı olarak asetik asit, karbondioksit, alkol ve bazı tat ve aroma maddelerini de üretebilmektedirler. Ayrıca laktik asit bakterileri gıdaların bozulmasında rol oynayan mikroorganizmalar ve insanda hastalıklara neden olan patojen mikroorganizmalar üzerinde de ürettikleri laktik asit ve bazı antimikrobiyal maddeler (bakteriosin v.s.) nedeniyle öldürücü etkiye sahiptirler (Stiles ve Holzaphel 1990, Turantaş 1999).

Laktik asit bakterilerinin hiçbir üyesi, içinde yalnız glukoz ve amonyum bulunan bir besiyeri ortamında gelişemez. Pek çoğu vitaminlerden bir veya birkaçına ve amino asitlere ihtiyaç duyarlar (Vural 1998, Klaenhammer ve Kulen 1999).

Laktik asit bakterileri, gıdalarda, bitkilerde, toprakta, silajda, insan ve hayvanların genital, intestinal ve solunum sistemlerinde olmak üzere doğada oldukça yaygın olarak bulunmaktadırlar. Karbohidrat, protein ve vitamince zengin gıdalarda temel florayı oluştururlar. Starter olarak kullanılan laktik asit bakterileri fermente olabilen şekerleri tüketip diğer mikrobiyotayı oluşturan bakterilerin çoğalmasını kontrol ederler, ortamın oksidasyon-redüksiyon potansiyelini düşürürler. Ayrıca

proteolitik ve lipolitik etkileriyle aroma bileşikleri sentezleyerek lezzet oluşumuna yardım ederler. Bazı laktik asit bakterileri mikrobiyal aktiviteye sahip bazı peptitler veya metabolitler üreterek, gıdaların mikrobiyal bozulmalarını önlemede etkili olabilirler. Başta *Lactobacillus* türleri olmak üzere çeşitli laktik asit bakterileri günümüzde probiyotik olarak kullanılmaktadırlar (Tunail ve Köşker 1986, Olson 1990, Willem 1999, Dağdemir 2006).

Laktik asit bakterileri, glikoz metabolizması sonucunda ürettikleri son ürüne bağlı olarak iki ana gruba ayrılırlar (Turantaş 1999).

1. Hekzoz şekerinden fermentasyon sonucu birincil dereceden laktik asit üreten türlere homofermentatif laktik asit bakterileri adı verilmiştir. Homofermentatif laktik asit, homolaktik karakterleri ortamın pH'sı, besin maddeleri ve ortamın glukoz konsantrasyonu gibi kültürel koşulların değişmesiyle farklılık gösterirler. Bazı homofermentatif laktik asit bakterileri, pentozları kullanarak laktik asit ve asetik asit üretebilirler. Bu gruba dahil laktik asit bakterileri heterofermentatif laktik asit bakterilerine kıyasla iki kat daha fazla enerji üretebilmektedirler (Andrighetto ve ark. 1998).

2. Metabolik faaliyetler sonucu hekzozlardan laktik asit, karbondioksit ve etanol üreten laktik asit bakterileri ise heterofermentatif laktik asit bakterileri olarak adlandırılırlar. Heterofermentatif türler asetaldehit ve diasetil gibi tat ve aroma maddelerinin üretimi açısından önem taşırlar (Turantaş 1999).

Homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri, genetik ve fizyolojik farklılıklarından dolayı glukozu farklı metabolik yollar izleyerek kullanmakta ve farklı son ürünler üretmektedirler (Klein ve ark. 1998).

Laktik asit bakterilerinin dahil olduğu grubun sınırı henüz kesin olarak çizilememiştir ve bu konuda değişik genetik çalışmalar sürdürülmektedir. Şu ana kadar tanımlanmış ve değişik laktik asit bakteri grubuna dahil edilmiş mikroorganizmaların genel özellikleri aşağıda sıralanmıştır:

1. Bu mikroorganizmalar gelişebilmek için amino asitlere ve B grubu vitaminler gibi besin ögeleri ile pürin ve pirimidin bazlarına ihtiyaç duyarlar (Turantaş 1999).

2. Çoğu mezofilik mikroorganizmalardır. Ancak bazıları 5 ºC'nin altında, termofilik türler ise optimum 45 ºC gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebilmektedirler (Turantaş 1999).

3. Bu mikroorganizmaların çoğu optimum 4,0-4,5 pH'da gelişebilmelerine rağmen bazıları 3,2 gibi düşük ve 9,6 gibi yüksek pH'larda gelişebilmektedirler (Turantaş 1999).

4. Ayrıca bu mikroorganizmaların bazıları zayıf proteolitik ve lipolitik özelliğe sahiptirler (Turantaş 1999).

Birçok bakterilerde ve bazı ökaryotik hücrelerde bulunan, ekstrakromozomal element olan plazmitler, küçük, çift sarmal DNA molekülleridir. Bakteriyel plazmitler, antibiyotik direnci, virulans özelliği veya çeşitli metabolik aktiviteler gibi fenotipik özelliklere dair genler taşırlar. Bazı plazmitler ise, fenotipte gözlenmeyen özelliklere ait genler taşırlar (kriptik plazmitler). Kendi kendine transfer olabilen veya konjugatif plazmitler, içerdikleri "tra" genleri sayesinde, diğer tür veya bakteriyel suşlara, plazmit kopyalarını transfer edebilme yeteneğindedirler (Woodford ve Johnson 1998).

Lactobacillus familyası üyeleri doğada oldukça yaygındırlar. Hayvan ve insan bağırsaklarında, fermente süt ürünlerinde, ağız boşluğunda ve deri üzerinde

bulunabilmektedirler. Basil şeklinde olan bu bakteriler, düzgün çubuk, kokobasil veya uzun zincir oluşturan basil şeklinde bulunabilirler. Çok az tür veya suşun dışında genellikle hareketsizdirler. Gram pozitif olarak boyanabilen bu bakteriler, kültürlerin eskimesi ile gram negatif ve uzun zincir görünümünü de gösterebilirler. Spor oluşturmayan, anaerob veya mikroaerofil bakterilerdir. Üreme sıcaklıkları 5–55 ºC arasında değişebilir. Optimum üreme pH 5,5–5,8 aralığında görülmektedir. Bu bakteriler gelişebilmek için kompleks besin maddeleri ve vitaminlere ihtiyaç duyarlar ve bu türler fermente et, süt ve sebze ürünlerinin üretiminde rol oynarlar (Tannock 1999, Turantaş 1999, Sneath ve ark. 1986). *Lactobacillus* cinsi üç büyük gruba ayrılmaktadır.

1. Betabakterium
2. Streptobakterium
3. Thermobakterium

Zorunlu heterofermentatif *Lactobacillus* türlerinin hepsi betabakterium grubuna dahildir. Bu türler son ürün olarak laktik asidin yanı sıra asetik asit ve diğer organik asitleri, etil alkol ve CO_2 üretirler. Homofermentatif ve fakültatif heterofermentatif *Lactobacillus* türleri optimum gelişme sıcaklığına göre Streptobakterium ve Thermobakterium olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Streptobakterium grubundaki hekzoz şekerinden fermentasyon yoluyla yüksek oranda laktik asit üretirler. Ancak glukoz yokluğunda bazı türleri laktik asit, asetik asit, etil alkol ve formik asit üretirler. Bu grupta fakültatif heterofermentatif türler yer almaktadır. Optimum gelişme sıcaklıkları 30 ºC ve % 1,5 laktik aside kadar üretebilmektedirler. Thermobakterium grubundaki *Lactobacillus* türleri hekzoz şekerinden başlıca laktik asit üretirler, pentoz şekeri ve glukonatları fermente edemezler. Bu grupta zorunlu homofermentatif türler yer alır, optimum gelişme sıcaklıkları 40 ºC civarındadır ve % 3 düzeyinde laktik asit üretirler (Andrighetto ve ark. 1998, Turantaş 1999, Sneath ve ark. 1986, Gögebakan 2003).

Lactobacillus cinsinin taksonomisi tam olarak bilinmekte ve bu cins içinde 50 tür bulunmaktadır. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin gelişebilmesi için amino asit, peptit, nükleik asit türevi vitamin, tuz, yağ asidi veya yağ asidi esterleri ile fermente edebilecekleri besin maddelerine ihtiyaç duyarlar. 10-30 µ uzunluğunda, 0,7-2 µ kalınlığında, tek tek veya zincirler halinde bulunurlar. Genç bakteriler genelde zincir oluşturmazlar (Yetişmeyen 1995, Yeniel 2006).

Lactobacillus acidophilus, ilk olarak 1900 yılında Alman bilim adamı Ernst Moro tarafından çocuk dışkısından izole edilmiştir. 1936 yılında Winther tarafından "*Thermobacterium intestinale*" olarak adlandırılan bu bakteri, 1970 yılında Hansen ve Mocquat tarafından *Lactobacillus acidophilus* olarak kabul edilmesi önerilmiştir. Bu terim, asidik ortamda gelişme gösterebilen laktik asit bakterisi anlamına gelmektedir. Çubuk şeklinde olan bu bakteri tekli, ikili ya da kısa zincir oluşturmaktadır. Kolonileri genellikle S tipindedir ve karakteristik pigmentleri yoktur. Mikroskopta tek ya da kısa zincirler şeklinde görülmektedir. Anaerob ya da fakültatif anaerob, hareketsiz, katalaz negatif, flagellasız ve homofermentatif bir bakteri olup % 0,3–1,9 oranında DL laktik asit üretebilmektedir. Gelişebildiği sıcaklık aralığı 35–38 ºC olup optimum 37 ºC'dir. Optimum pH değeri ise 5,5–6,0'dır. Gelişmesi için ortamın başlangıç pH'sının 5–7 arasında olması gerekmektedir. Arginin'den amonyak üretmemekte fakat amigdalin, sellobiyoz, fruktoz, glukoz, galaktoz, mannoz, trehaloz, sakkaroz, eskülin ve maltozu fermente edebilmektedir. Mannitol'ü kullanamamaktadır (Kılıç 2001, Yılmaztekin 2001, Gürsoy ve Kayardı 1999).

Lactobacillus acidophilus'un safra tuzlarına çok dayanıklı olduğu, bu bakteriyi diğer potansiyel *Lactobacillus* türlerinin ve bifidobakterilerin takip ettiği bildirilmiştir (Vinderola ve Reinheimer 2003).

Lactobacillus acidophilus gibi probiyotik türler 70 yıldan daha uzun bir süredir güvenli bir şekilde kullanılmaktadır. *Lactococcus* ve *Lactobacillus* cinsine ait türler büyük bir çoğunlukla GRAS (Generally recognized as safe-genel olarak güvenli bilinen) statüsünde bulunurken, *Streptococcus* ve *Enterococcus* cinslerine ait türler ve birkaç LAB (laktik asit bakterileri) cinsi üyesi fırsatçı patojenleri içermektedir. Mevcut veriler, laktobasiller ve bifidobakterilerle yürütülen kontrollü klinik çalışmalarda bu bakterilerin hiçbir zararlı etkilerinin saptanamadığını göstermektedir. Bağırsak mukoz tabakasının bozulması, yapılan çalışmalarda toksisitenin oluşumunu gösteren bir belirti olarak kullanılmış ve ticari probiyotik suşların mukoz tabakasının bozulmasında rollerinin olmadığı ispatlanmıştır. Bu bakteriler çok nadir olarak sindirim sistemi ve diğer enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiş ve teknolojide kullanılan türlerin patojen olmayıp güvenilir oldukları kabul edilmiştir (Wright ve ark. 2002, Gomes ve Malcata 1999, Sanders ve Huis in't Veld 1999, Shortt 1999).

Lactobacillus brevis, laktik asit bakterileri içindeki türlerden biridir. Farklı çevresel ve fermente gıdalarda bulunabilir. Araştırmalar, insan immün sisteminin etkilediğini ortaya çıkarmıştır. Laktik asit ve etanol üretiminde bulunur. Polisakkaritlerin (dekstran) üretiminden sorumlu tür olarak tanımlanır (Kishi ve ark. 1996).

İnsan bağırsağı ve ağızda bulunan *Lactobacillus casei*, laktik asit üreticisi olarak tercih edilir. *Lactobacillus casei* süt endüstrisinde çok fazla kullanılmakla birlikte, *Helicobacter pylori*'yi inhibe ettiği belirtilmektedir (Randazzo ve ark. 2004).

Laktobasil cinsi içerisinde, gram pozitif bir tür olarak bulunan *Lactobacillus fermentum*, çoğunlukla fermente hayvan ve bitki maddelerinde bulunur. Anaerobik bitki maddelerinin yanı sıra birçok fermente gıdada yaygın olarak bulunur. İlk kez salyadan izole edilmiştir Probiyotik bakteriler içerisinde bulunan *Lactobacillus*

fermentum kadınların ürogenital infeksiyon tedavisinde kullanılır (Dickson ve ark. 2005, Niedzielin ve ark. 2001,).

*Lactobacillus plantarum'*un fermente edilebildiği şekerlerin sayısı fazla olduğundan, yaygın olarak kullanılan starter kültürlerden biridir. Ayrıca ürettiği bakteriosin ve bakteriosin benzeri metabolitler nedeniyle de fermente et ürünlerinde önemli bir işleve de sahiptir (Gökalp ve ark. 2004).

Fermente sosislerden izole edilen *Lactobacillus plantarum'* un (7 suş) hiç birinin tiramin, feniletilamin, triptamin, putresin ve kadaverin üretmediği belirlenmiştir (Bover-Cid ve ark. 2001). Masson ve ark. (2004) ise et ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus plantarum*' un bazı suşlarının tiramin ürettiğini belirlemişlerdir.

Bover-Cid ve Holzapfel (1999), yaptıkları çalışmada test edilen *Lactobacillus plantarum'* un 16 suşundan bir tanesinin dekarboksilaz aktivitesine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Genellikle dekarboksilaz aktivitesine sahip suşların tiramin ürettiklerini ve *Lactobacillus plantarum'un* starter kültür olarak fermente et ürünlerinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Lactobacillus reuteri, 1980'li yılların başlarında memelilerin ve kuşların bağırsaklarında doğal olarak bulunan gram pozitif bakterilerdir. *Lactobacillus reuteri*'nin probiyotik özelliği ise son araştırmalara kadar bulunamamıştır. Yirminci yüzyılın başlarına kadar *Lactobacillus fermentum* olarak adlandırılırken, daha sonraki çalışmalar farklı bir tür olduğunu göstermiştir. Böylece *Lactobacillus reuteri* olarak adlandırılmıştır. Tanımlanmasından sonra birçok gıdadan (özellikle et ve süt)

izole edilmiştir. 1960'larda Gerhard Reuter insan feçesinden ve intestinal örneklerden *Lactobacillus reuteri*'yi izole etmişlerdir. Aynı deneyler sağlıklı hayvanlarda da bulunduğunu ortaya çıkarmıştır (Molin ve ark. 1993).

Bağırsak florasındaki *Lactobacillus reuteri* araştırılması yapılırken, içerisinde *Lactobacillus acidophilus* da bulunduğu 18 ana tür bulunmuştur. *Lactobacillus reuteri*'nin bağırsaklara yerleşerek, gram negatif ve gram pozitif bazı zararlı bakterilerin yerleşmesini engellediği (diğer laktobasillerle birlikte) belirlenmiştir. 2008 yılında yapılan bir çalışmada GIS (Gastrointestinal sistem)'de *Lactobacillus reuteri*'nin üremesinin *Escherichia coli'*nin üremesini engellediği gözlenmiştir (Cleusix ve ark. 2008).

Lactobacillus rhamnosus GG suşu ilk olarak 1990 yılında yapılan çalışmalarda kullanılmış ve sonrasında özellikle de çocuk sağlığına olan katkıları nedeniyle günümüzde bebek ve çocuk ürünlerinin üretiminde kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu mikroorganizma fakültatif anaerobtur. Oksijensiz ortamda L(+) laktik asit ve etanol üretmektedir. Doğal olarak insan bağırsak florasında bulunması, düşük pH'daki ortamlara karşı dirençli olması, gastrointestinal sistem duvarına tutunabilmesi başlıca özellikleridir (Reid 2002, Goldin ve ark. 1992).

Prebiyotikleri kullanma özelliklerini araştırmak için yapılan bir çalışmada *Lactobacillus rhamnosus*'un, *Bifidobacterium* türlerinden farklı olarak düşük polimerizasyon seviyesine sahip şekerleri tercih ettikleri ve trisakkarit ve polisakkaritlerin bulunduğu ortamda ilk olarak monosakkarit ve disakkaritleri fermente ettikleri saptanmıştır. Laktobasiller ve bifidobakteriler sağlıklı insanların sindirim sistemi mikroflorasının asıl elemanlarıdır (Gopal ve ark. 2001, Saarela ve ark. 2002, Silvi ve ark. 2003).

Sağlıklı bağırsak epitel dokusu, normal bağırsak mikroflorası ile birlikte patojen bakterilerin, çeşitli antijenlerinin ve diğer toksik bileşiklerinin sindirim kanalından kana geçmesine karşı bariyer görevi yapar. Bariyer fonksiyonuna ek olarak bağırsak epitel dokusu antijenlerinin asimilasyonu da etkilidir. Sağlıklı insanlarda bu bariyer dayanıklı bir halde olup böylelikle konakçı korunmakta ve normal bağırsak fonksiyonları emniyete alınmış olmaktadır. Sağlıklı bireylerde bulunan bu canlı bariyer sindirim sistemini korur ve bağışıklık sisteminin direncini destekleyici olarak görev yapar. Normal mikroflorada veya epitel hücrelerde patojenler, antijenler, radyasyon veya kimyasal bileşikler tarafından başlatılan bir karışıklık olduğu zaman bariyer mekanizmasında oluşan hasarlar sebebiyle geçirgenlik bozulmakta ve patojen bakterilerin antijenlerinin ve diğer zararlı maddelerin kana geçişleri kolaylaşmaktadır. Bağırsak mikroflorasının değiştiği hastalık durumlarında bariyer tabakanın koruyuculugu azalmakta ve farklı tipteki bağırsak enfeksiyonları sık sık görülmektedir. Bu nedenle probiyotik bakterilerden sadece tedavi amacı ile değil aynı zamanda koruyucu olarak da yararlanılması önerilmektedir (Holzapfel ve ark. 1998, Kailasapathy ve Chin 2000, Holzapfel ve Schillinger 2002, Gomes ve Malcata 1999).

Bifidobacterium ve *Lactobacillus* cinslerine ait türler bazı gıda maddelerinde probiyotik olarak en çok bulunması istenen bakterilerdir. Bu bakteriler insanlarda, zararlı bakterilerin gelişmelerinin engellenmesi, sindirime yardımcı olmaları, vitamin ve minerallerin vücuda alımı, vitamin sentezi gibi faydalı faaliyetler yaparlar (Charteris ve ark. 1997, Chou ve Weimer 1999, Schillinger 1999, Alamprese ve ark. 2001, Saarela ve ark. 2002, Gürsoy ve Kayardı 1999, Vinderola ve ark. 2000, Bielecka ve ark. 2001, Stanton ve ark. 2001, Temmerman ve ark. 2002, Avonts ve ark. 2004, Penner ve ark. 2005).

Laktoz ön fermentasyona uğratılınca, emilimi daha kolay olan laktik asit oluşur. Laktoz (süt şekeri) diğer şekerlerden farklı olarak fizyolojik üstünlüğe sahiptir. Laktozun yapısındaki galaktozun beyin dokusundaki glikolipitlerin

kaynağını teşkil etmesi ve özellikle gençlerde sinir dokusunun sentezinde önemli olması nedeniyle de beslenmede büyük önem taşımaktadır. Laktoz önemli bir enerji kaynağıdır. Gastrointestinal işlevi motive eder ve bağırsaklardaki istenmeyen mikroorganizmaları inhibe ederek bağırsak florasını geliştirici etki yapar. Ayrıca vücudun kalsiyum ve fosfordan daha iyi yararlanmasını sağlar. Oluşan laktik asit, kalsiyum ve fosforun emilimini kolaylaştırır (Yeniel 2006, Tekinşen ve Atasever 1994).

Laktik asit bakterileri (LAB) birçok gıdalarda (özellikle süt ve süt ürünlerinde) doğal olarak ya da başlangıç kültürü olarak bulunmalarının yanı sıra insanlarda ve hayvanlarda doğal mikroorganizma florasının (mikroflora) bir elemanı olarak bulunur. Bu bakterilerin insan vücudu normal florasında en fazla bulunduğu yerler; ağız, sindirim sistemi, dışkı, vajina, deri ve saçtır (Gögebakan 2003).

Sindirim sistemi ve vajina bakteriyel açıdan düşünüldüğünde birçok patojen ve patojen olmayan bakteri türü için doğal yerleşim bölgeleridir. Özellikle *Lactobacillus* türleri ürettikleri laktik asit sonucu ortamın pH'sını düşürmeleri, bazı türlerin ürettiği bakteriosinler ve ürettikleri H_2O_2 ile sindirim sistemi ve vajinal floranın düzenlenmesinde ve belirlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. LAB'ların birçok türü katalaz negatiftir ve H_2O_2'yi parçalayamadıklarından bunu ortama salarlar ve H_2O_2 diğer bakteriler için öldürücü etki yaparak gelişmelerine engel olur, böylece mikroflorayı kendi faydalarına değiştirmiş olurlar (Gögebakan 2003).

Sağlıklı fetüs anne karnındayken mikroorganizmalar açısından sterildir. Yeni doğan bebekler sindirim sistemi florasını doğumdan sonra anneden aldığı süt ve diğer yediği bitki kökenli gıdalarla kazanır. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin yeni doğanların sindirim sisteminde nasıl kolonize olduğu hakkında çok kısıtlı fakat değerli çalışmalar vardır. LAB vücut sıvılarında doğal olarak bulunmazlar. Bulundukları durumlar ise patolojiktir. Oysaki LAB normal ya da patolojik

durumdaki insanların sistemlerinda ve vajinal bölgelerinde normal flora elemanı olarak bulunurlar ve çevresel şartlara bağlı olarak sürekli sayı ve tür açısından fark gösterirler. Ağız yoluyla alınan bu bakteriler midedeki asit engelini aşarak bağırsaklara ulaşırlar. Oluşturdukları asit yoğunluğunun da yardımı ile bağırsak epitel hücrelerine yapışarak, yerleşirler. Matsumiya ve ark. (2002), yaptıkları çalışmada anne dışkısı ve vajinasında bulunan *Lactobacillus* cinsi bakterilerin yeni doğan bebeğe geçebildiğini ve sindirim sistemi florasının oluşturulmasında etkili olduğunu göstermişlerdir.

Probiyotik kelimesi Yunanca pros ve bios kelimelerinden türetilmiş, yaşamı kolaylaştıran anlamına gelmektedir. Probiyotik mikroorganizmaların sağlık üzerindeki olumlu etkileri 1908 yılında, Nobel ödüllü Rus araştırmacı Elie Metchnikoff tarafından kanıtlanmıştır. Metchnikoff Kafkasya'da yaşayan insanların uzun ömürlü ve daha sağlıklı olduklarını gözlemlemiştir. Bunun nedeninin fermente süt ürünleri tüketimi sonunda bu ürünlerdeki çubuk şeklindeki bakterilerin (*Lactobacillus* spp.) bağırsaktaki mikroflorayı olumlu yönde etkilemesi ve toksik mikrobiyal aktiviteyi azaltması olduğunu belirtmiştir. Metchnikoff sindirim sisteminde bulunan mikroorganizmaların insan sağlığına faydalarından çok zararlı olduklarını düşünmesine rağmen yoğurt bakterileriyle sindirim sistemindeki zararlı bakterilerin faydalı duruma geçtiğini düşünmüştür. Fermente süt ürünleri üzerinde yapılan çalışmaların başlangıcı çok eskilere dayanmakla birlikte, probiyotikler konusunda yapılan çalışmalar son 10-15 yılda büyük hız kazanmıştır (Fooks ve ark. 1999, Lourens-Hatting ve Viljoen 2001, Sullivan ve Nord 2002, Coşkun 2006, Holzapfel ve Schillinger 2002, Çakır ve ark. 2002).

Probiyotik kavramı ile çeşitli değişikliklere uğramasına rağmen en son, sindirim sistemi mikroflorasını geliştirerek konakçının sağlığı üzerine yararlı etkiler sunan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır (Holzapfel ve ark. 1998, Itsaranuwat ve ark. 2003, Vinderola ve Reinheimer 2003, Commane ve ark. 2005, Hoesl ve Altwein 2005, Olejnik ve ark. 2005, Stanton ve ark. 2005).

1969 yılından sonra, Swann Komitesi antibiyotiklerin tedavi amacıyla kullanımının sınırlandırılmasını tavsiye etmiştir. Antibiyotik kullanımına karşı olanların tepkisi, diyare gibi antibiyotik kullanımının yan etkilerinden kaynaklanmaktadır. Antibiyotiklere karşı daha büyük tepkiler ise gıda katkı maddelerine karşı olanlardan gelmiştir. Bu tepkilerin asıl nedeni, antibiyotiklerin gıda zincirine yabancı madde olarak katılmasıdır. Antibiyotiklerin bu dezavantajlarına karşın probiyotikler, hiçbir yan etkisi olmadıklarından kabul görmektedir (Fuller 1999, Mitsuoka 1996, Gomes ve Malcata 1999, Tannock 1997).

Probiyotiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri uzun yıllardan beri bilinmektedir. Bağırsak florasındaki bakterilerin sağlık açısından önemleri ise günümüzde daha iyi anlaşılmaktadır. Bu sebeple, yapılan araştırmalar sağlıklı bir yaşam, vücut direncini arttırılması, bağırsak düzensizlikleri ve hastalıklarla mücadele etmek için probiyotik ürün tüketimi önerilmektedir (Laurens-Hattingh ve Viljoen 2001).

Karsinojen maddeler vücut dışında üretilmekte ve "ön karsinojen" maddeler olarak alındıktan sonra kanser etmeni bileşiklere dönüşmektedir. Mide-bağırsak sisteminde bulunan bakterilerin karsinojenik etkilerinin inaktivasyonunda, yayılmasında ve özellikle de nitrozaminlerin ve safra sterollerinin kanser etmeni maddelere dönüşmesini engellemede önemli rol oynarlar. Probiyotiklerin kanser oluşumu riskini azalttığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur. *Lactobacillus acidophilus* tüketiminin kolon kanserini önlediği tespit edilmiştir. Bu çalışmaya sağlıklı bireylerden 21 adet gönüllü katılmış ve *Lactobacillus acidophilus* kültürü süt veya yoğurda katılarak deneklere verilmiştir. Araştırmacılar bir aylık uygulama periyodundan sonra feçesteki prokarsinojenleri karsinojene dönüştüren bakteriyel enzim konsantrasyonunda önemli azalmalar olduğunu bildirmişlerdir. Benzer çalışmalarda *Lactobacillus acidophilus* katılmayan sütlerde ise aynı sonuç alınamamıştır (Çakır 2003, Goldin ve ark. 1992, Sanders 1999, Brady ve ark. 2000, Goldin ve Gorbach 1984, Gmeiner ve ark. 2000).

Çocuklarda ve yetişkinlerde görülen akut diyarenin tedavi edilmesinde ve *Clostridium difficile* etmeni ile oluşan infeksiyonların tedavisinde farmasötik probiyotiklerin başarı ile kullanıldıkları gösterilmiştir. Enterotoksijenik *Escherichia coli* en yaygını olmakla birlikte seyahat diyarelerine neden olan çok çeşitli etkenler vardır. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* ve *Saccharomyces* gibi bazı probiyotik bakterilerin seyahat diyarelerini engelleme yeteneklerini araştırmışlardır. Diğer yandan özellikle gelişmekte olan ülkelerde rotavirüsler, bebek hastalıkları ve ölümlerinin en önemli nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Araştırmalar ayrıca diyareli hastaların iyileşme süresinin *Lactobacillus* GG suşunun kullanımı ile önemli oranda (2,4 günden 1,4 güne) kısaldığını da göstermiştir (McFarland ve Elmer 1997, Karahan ve Çakmakçı 1996, Lee ve ark. 1999).

Probiyotiklerin yüsek kolesterol seviyelerini azaltabilme yeteneği de yararlı etkiler arasında yer alır ve son yıllarda bu konu üzerine yapılan araştırmalar büyük bir artış götermiştir. Bazı kan lipidlerinin yüksek düzeyleri kardiyovasküler hastalıklar açısından risk oluşturur. Birçok araştırmacı laktik asit içeren süt ürünleri ve probiyotiklerin kolesterol düşürücü etkileri olduğunu bildirmiştir. Probiyotik mikroorganizmaların kolesterol düşürücü etkisi önemli bulunmuş ve toplam kolesterolde %2,4–23,2, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) kolesterolünde ise %9,0–9,8 oranlarında azalma tespit edilmiştir (Tok ve Aslım 2007, Rolfe 2000, Sanders 1999).

Dünya üzerindeki yetişkinlerin yaklaşık 2/3'ü laktoz intoleransından (laktozun sindirilememesinden) dolayı sıkıntılar yaşamaktadır. Laktoz yalnızca sütte bulunan ve galaktoz ve glukoz moleküllerinin $\beta_{(1\rightarrow4)}$ glikozidik bağı ile bağlanması sonucu oluşan bir disakkarittir (Gökalp ve ark. 1996). Laktozun sindirilebilmesi için öncelikle aktif olarak absorbe edilebilen galaktoz ve glukoza hidrolize olması gerekmektedir. Bağırsaklarda laktaz aktivitesi yoksa ya da düşükse sindirilmeden kalan laktoz osmotik dengeyi bozarak bağırsak içinde sıvı ve elektrolit birikmesine neden olur. Genişleyen bağırsaklarda hareketlilik artar ve ishal ortaya çıkar. Öte

yandan serbest halde yıkılmadan kalın bağırsaklara ulaşan laktoz buradaki bakteriler tarafından fermantasyona uğrar, hidrojen, metan ve karbondioksit gazları ortaya çıkar. Zubillaga ve ark. (2001) probiyotik olarak Laktobasil içeren ürünlerin tüketiminin beta-glukoronidaz, nitroredüktaz ve azonitroredüktaz gibi fekal bakteri enzimlerinin aktivitesini azalttığını rapor etmişlerdir.

Probiyotiklerin kronik gastrit, peptik ülser ve mide kanseri ile yakından ilgisi olduğu bilinen *Helicobacter pylori*'nin aktivitesini ve kolonizasyonunu engelleme yetenekleri araştırılmıştır. İnsan ve hayvanlarla yapılan deneme sonuçları probiyotiklerin *Helicobacter pylori* infeksiyonlarını durdurabileceğini göstermiştir (Sanders 1999, McNaught ve McFic 2001).

Lactobacillus spp. ve *Bifidobacterium* spp. gibi probiyotik bakterilerin antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda probiyotik bakterilerin *Salmonella typhimurium*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* ve *Shigella* spp. gibi patojen bakteriler üzerinde inhibisyon etkisine sahip olduğu kanıtlanmıştır (Klebanof ve Hillier 1991)

Anne sütü tüm bebekler, prematüreler ve hasta yenidoğanlar için ideal bir besindir. Yeni doğanların savunma sisteminde geniş bir yer tutar. Anne sütü içeriği bebeğin yaşına ve fizyolojik özelliklerine göre değişen en uygun besindir. İnek sütünde kazein, anne sütünde albümin ve globülin fazladır. Anne sütündeki kalsiyumun emilimi daha kolay iken, demir oranı daha yüksektir. İçerisinde enfeksiyonlara karşı direnci artıran immünglobülinler vardır. Son yıllarda yapılan çalışmalar probiyotiklerin spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sistemini güçlendirerek mide-bağırsak hastalıklarına karşı konakçıyı koruduğunu ortaya koymuştur (Musumeci ve ark. 2006, Fukushima ve ark. 1998).

İmmunize bebeklerde antikor düzeyleri, anne sütü alanlarda, hazır mama ile beslenenlere göre daha fazla bulunmuştur. Bu bulgular emzirmenin ilk bir yılda aktif humoral immun yanıtı arttırdığını gösteren güçlü kanıtlardır. Anne sütü ile beslenen bebeklerde peroral ve parenteral aşılara serum ve salgısal yanıtların daha iyi olduğu gösterilmiştir (Pabst ve Spady 1990, Van-Coric 1990).

Günlük miktarı ortalama 30 ml olan kolostrum, ilk 24–48 saat boyunca annenin meme bezlerinden salgılanan koyu sarı renkte ve kıvamlı bir maddedir. Kolostrumun miktarı zamanla birbirini izleyen beslenme ile birlikte annenin doğumdan sonraki 3 gün boyunca normal bileşimde süt başlayana kadar azalmaktadır. Kolostrum immunoglobulinleri, büyüme faktörlerini, antikorları, vitaminleri, mineralleri, enzimleri, aminoasitleri, değişik mikroorganizmaların saldırısına ve çevresel toksinlere karşı vücudu koruyan özel maddeleri içermektedir. Kolostrumun içeriğinde daha fazla antikor benzeri maddeler ve akyuvar olması bebeğin doğumdan sonra karşılaşacağı hastalıklara karşı ilk bağışıklığı sağladığından, bebeğin ilk pasif aşısı olarak nitelendirilebilir. Kolostrum bebeğin olgunlaşmamış bağırsaklarının doğumdan sonra olgunlaşmasına yardımcı olan epidermal büyüme faktörü içerir. Bu bağırsağın erken olgunlaşmasını sağlar ve bebekte allerji ve diğer besinlere karşı antitolerans gelişmesini önler. Yüksek doz K vitamini içermesi yeni doğanın hemorajik hastalığından korunmasında önemlidir. Kolostrumun bazı vitaminlerce (özellikle A) zengin olması ve bazı immunglobulin miktarlarının (özellikle IgA) yüksek olması, bebekte gelişebilecek enfeksiyonların hafif geçirilmesine neden olur. Kolostrumun miktarı az olduğu için böbreklerde önemli bir metabolik yük oluşturmaz. Bu şekilde billuribin de barsaktan atılır ve sarılığın önlenmesi kolaylaşır (Bayarer ve ark. 2006).

3. MATERYAL VE METOT

3. 1. Materyal

Bu çalışma Eylül 2008- Haziran 2009 tarihleri arasında Konya Dr. Faruk Sükan Doğum ve Çocuk Hastanesi ve Konya İl Kontrol Laboratuvarı'nda yapıldı. 100 adet kolostrum ve 50 adet bebek feçes (3-30 günlük) örnekleri Konya Dr. Faruk Sükan Doğum ve Çocuk Hastanesi'nden steril küçük kavanozlar içerisine alındı. Toplanan örnekler yaklaşık iki saat içerisinde Konya İl Kontrol Laboratuvarı'na götürüldü ve çalışılmaya başlandı.

3. 2. Metot

3. 2. 1. Örneklerin incelenmesi

Steril kavonozlara alınmış olan anne sütü (kolostrum) örnekleri steril şartlarda herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan doğrudan ekildi.

Steril kavonozlara alınmış olan bebek feçeşleri (3-30 günlük) ise steril şartlarda 10 µl MRD (Maximum Recovery Diluent) ile sulandırılarak, ekim aşamasına başlandı.

3. 2. 2. Örneklerin besiyerlerine ekimi

Alınan kolostrum ve bebek feçesleri (3-30 günlük), % 0,25 L-sisteinli MRS (de Man Rogosa Sharpe) Agar besiyeri plaklarına ekildi. Ekim işlemi; kolostrum örnekleri mikropipetle 1 ml alınarak katı besiyeri yüzeyine homojen şekilde steril cam baget yardımı ile, feçes örnekleri ise 1/10 oranında MRD içerisinde sulandırıldıktan sonra mikropipetle 1 ml alınarak aynı şekilde katı besiyeri yüzeyine ekildi. Ekilen besiyeri plakları ağzı sıkıca kilitlenen kavanozlara (jar) 8'er adet olarak yerleştirildi. Anaerobik ortam; GENbox (Bio-merieux, Marcy l'Etoile, France) firmasından sağlanan anaerobik kit aracılığıyla gerçekleştirildi. Kit'e su ilavesi yapılmadı. Kit, jardan içerisindeki hava ortamında bulunan oksijeni absorbe ederken karbondioksidi serbest bırakarak, anaerobik ortamın oluşmasını sağladı. Daha sonra 37 ˚C'de 48 saat etüvde inkübasyona bırakıldı. 48 saatin sonunda üreme gözlenen petri kutularındaki koloniler API 50 CHL sistemi ile identifikasyona tabi tutulurken, bu kolonilerden paralel olarak pasajlama yapılarak stok kültürleri hazırlandı. Pasajlamadan sonra laktik asit bakterileri, % 85 nutrient broth içeren ependorf tüpleri hazırlandı. Bu tüplere stok bakteri suş kültürlerine ait kolonileri aşılandı. Üzerlerine % 15 oranında gliserin ilave edildi. Hazırlanan tüpler – 20 ˚C'de derin dondurucuda saklandı.

3. 2. 3. Besiyerleri

Besiyerleri, kullanma kılavuzlarına göre hazırlandı.

MRS (Man Rogosa Sharpe, Merck) Agar

Kazeinden elde edilen pepton: 10,0 g
Et ekstraktı: 10,0 g
Maya ekstraktı: 4,0 g
D(+) Glukoz: 20,0 g
K_2HPO_4: 2,0 g
Tween 80: 1,0 g
di-Ammonyum hidrojen sitrat: 2,0 g
Sodyum asetat: 5,0 g
$MgSO_4$: 0,2 g
$MnSO_4$: 0,04 g
Agar-agar: 14,0 g

68,2 g MRS Agar ve % 0,25 L-sistein 1 litre distile suya ilave edildi ve sıcak su banyosunda eritilinceye kadar ısıtıldı. Besiyeri kapaklı silindirik cam şişelere alınarak, 121 °C'de 1 atmosfer basınç altında 15 dakika otoklavda steril edildi. Steril edilen besiyeri 45–50 °C'ye soğutularak, 9 cm çapındaki steril plastik (tek kullanımlık) petri kutularına 15-20 ml olacak şekilde döküldü. Besiyeri plakları, besiyerinin katılaşması için oda sıcaklığında yaklaşık 1-2 saat bekletildi. Hazırlanan besiyeri berrak veya açık kahve renkli olarak görüldü. Besiyeri plakları kullanılıncaya kadar laboratuvarda buzdolabı içerisinde +4 °C'de saklandı.

MRD (Maximum Recovery Diluent, Merck)

Pepton: 1g
Sodyum Klorit: 8,5 g
pH: 7.00 ± 2 25˚C

MRD, feçes örneklerini sulandırmak için kullanıldı. Bir litre distile suya 9,5 g MRD ilave edildi. Sıcak su banyosunda eritildikten sonra pH:7'e ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi.



Şekil 3. 1. Anaerobik jar.

3. 3. API 50 CHL Sistemi ile İdentifikasyon

50 testlik kit içerisinde;

50 adet API 50 CH stripi,

50 inkübasyon kutusu,

50 sonuç şeması,

10'ar adet olmak üzere 5 paket şeklinde bulunmaktadır.

API 50 CH, standart hale getilmiş bir sistem olup mikroorganizmaların karbohidrat metabolizmalarının araştırılması için 49 biyokimyasal testi incelemektedir. API 50 CH sistemi API 50 CHL besiyeriyle birlikte *Lactobacillus* ve benzer cinsleri araştırmak için kullanılmaktadır.

3. 3. 1. API 50 CH sisteminin çalışma prensibi

API 50 CH strip, 50 mikro tüpten ibaret olup karbohidratları ve onların metabolik türevlerini inceler. Fermentasyon testleri API 50 CHL besiyeri ile yapılarak karbohidratların dehidratasyonu gerçekleştirilir. İnkübasyondan sonra fermentasyon olayı tüp içerisinde renk değişimiyle anlaşılmaktadır. Renk değişimi; anaerob kültür işlemi sırasında kullanılan besiyerindeki pH'nın değişmesi ve indikatör boyaların renk değişmesiyle gerçekleşir. Herhangi bir aktif bileşik taşımayan ilk tüp negatif kontrol için kullanılmaktadır.

API 50 CHL sistemi içerisindeki stripler 2-8 ˚C'de saklanır. Klinik çalışmalarda direk olarak kullanılmaz. Standart mikrobiyolojik tekniklere göre, mikroorganizmaların tanımlanmasında ilk olarak, uygun kültür ortamından izole edilir.

API 50 CHL sisteminin aşamaları aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

Etüv optimum sıcaklık olan 35 ˚C'ye ayarlandı.
API 50 CHL sisteminin inkübasyon kutusu (tepsi şeklinde) ve kapağı hazırlandı.
Nemli bir atmosfer oluşturmak için, inkübasyon kutusunun içine 10 ml distile su dağıtıldı.
Strip inkübasyon kutusuna yerleştirildi.
MRS Agar besiyerinde üreme gösteren bakteri kolonileri alınarak, API 50 CHL sistemi içerisinde bulunan, API 50 CHL Medium (5 ml) içerisinde, 2 McFarland konsantrasyonda [2 McF bakteri yoğunluğu= 10^{32} koloni Oluşturan Birim (kob)/ml] hazırlandı. Konsantrasyon az ise tekrar inkübe edildi. Konsantrasyon yoğun olduğunda ise serum fizyolojik ile sulandırıldı.

Hazırlanan süspansiyon strip kuyucuklarına dağıtıldı. Kuyucuklar işaret çizgisine kadar süspansiyonla doldurulduğu. Üzerlerine mineral yağ ilave edildi. Anaerobik şartlarda 35 ˚C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun ilk aşaması 24 saat sonra tamamlandı. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki renk değişimi incelendi. İnceleme tablosuna göre renk değişimi belirgin olmayan veya değişiklik göstermeyen kuyucukların renk ayrımı için stripler 24 saat daha inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda (48 saat), kuyucuklardaki renk değişimleri ikinci kez incelendi. Pozitif sonuç kuyucuklardaki rengin sarıya dönüşmesiyle anlaşılır. Eskulin testi için ise (tüp no:25) kuyucuğun rengi mor'dan siyah'a değiştiği görülür (Şekil 3. 2.).



MRS Agar

48 saat- jar ortamında- 37°C

↓

Süspansiyon medium (5ml, ref. 20150)

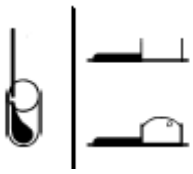
n damla 2 McF (ref. 70900 nokta 2)



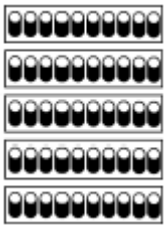
2 McF (ref. 70900 nokta)

Süspansiyon medium (5ml, ref. 20150) 2n damla

↓



Mineral yağ (ref. 70100)



API 50 CH (ref. 50300)

48 saat- jar ortamında – 35°C

↓

+ - + - + - + - + - + -

↓

apiweb™ bilgisayar programı

Şekil 3. 2. API 50 CHL Tanımlama Yöntemi Şeması.

Çizelge 3. 1. API 50 CHL Sistemininin mikrotüpleri ve içerdikleri madde miktarları.

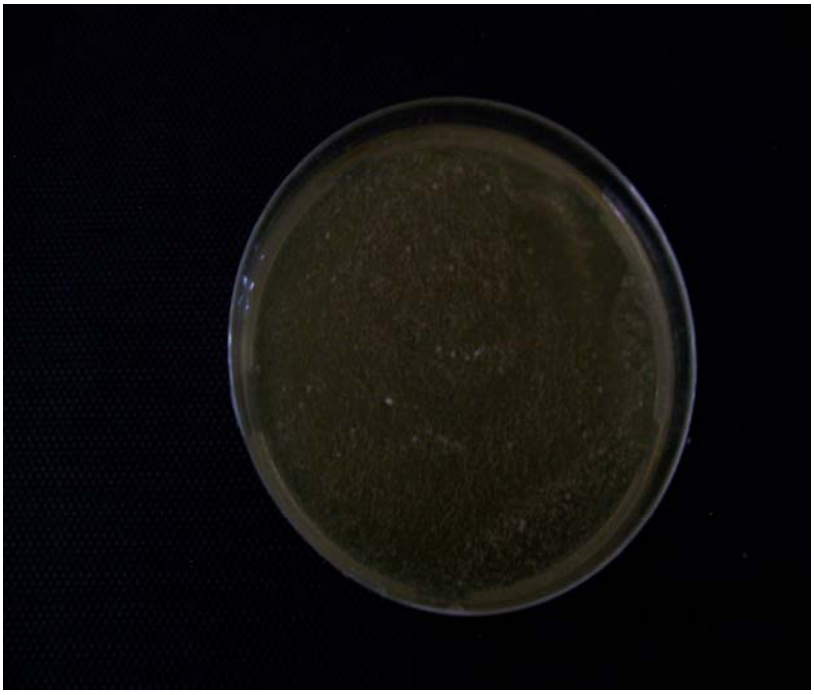
TÜP	TEST	AKTİF İÇERİK	MİKTAR(mg)
0		Control	
1	GLY	Glycerol	1,64
2	ERY	Erythritol	1,44
3	DARA	D-Arabinose	1,4
4	LARA	L-Arabinose	1,4
5	RIB	D-Ribose	1,4
6	DXYL	D-Xylose	1,4
7	LXYL	L-Xylose	1,4
8	ADO	D-Adonitol	1,36
9	MDX	β Methyl-D-Xyloside	1,26
10	GAL	D-Galactose	1,4
11	GLU	D-Glucose	1,56
12	FRU	D-Fructose	1,4
13	MNE	D-Mannose	1,4
14	SBE	L-Sorbose	1,4
15	RHA	L-Rhamnose	1,36
16	DUL	Dulcitol	1,36
17	INO	Inositol	1,4
18	MAN	D-Mannitol	1,36
19	SOR	D-Sorbitol	1,36
20	MDM	α-Methyl-D-Mannoside	1,28
21	MDG	α -Methyl-D-Glucoside	1,28
22	NAG	N-Acetyl-Glucosamine	1,28
23	AMY	Amygdalin	1,08
24	ARB	Arbutin	1,08
25	ESC	Esculin	1,16
26	SAL	Salicin	1,04

27	CEL	D-Cellobiose	1,32
28	MAL	D-Maltose	1,4
29	LAC	D-Lactose	1,4
30	MEL	D-Melibiose	1,32
31	SAC	D-Sucrose	1,32
32	TRE	D-Trehalose	1,32
33	INU	Inulin	1,28
34	MLZ	D-Melezitose	1,32
35	RAF	D-Raffinose	1,56
36	AMD	Starch	1,28
37	GLYG	Glycogen	1,28
38	XLT	Xylitol	1,4
39	GEN	Gentiobiose	0,5
40	TUR	D-Turanose	1,32
41	LYX	D-Lyxose	1,4
42	TAG	D-Tagatose	1,4
43	DFUC	D-Fucose	1,28
44	LFUC	L-Fucose	1,28
45	DARL	D-Arabitol	1,4
46	LARL	L-Arabitol	1,4
47	GNT	Gluconate	1,84
48	2KG	2-Keto-Gluconate	2,12
49	5KG	5-Keto-Gluconate	2,12

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4. 1. Kolostrum ve Feçes Örneklerinden Laktobasillerin İzolasyonu

Toplanan kolostrum ve feçes örnekleri, L-sisteinli MRS Agara ekildikten sonra 37 ˚C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda üreme gösteren plaklar belirlendi (Şekil 4. 1.)



Şekil 4. 1. MRS Agarda gelişen laktobasil kolonileri.

4. 2. Laktobasil Suşlarının API 50 CHL Sistemi ile İdentifikasyon Sonuçları

Kolostrum ve feçes örneklerinden izole edilen bakteri suşlarının karbohidratları fermente etme durumları belirlenerek identifikasyonları yapıldı. API striplerindeki reaksiyon sonuçlarının değerlendirilmesinde, önce renk değişimine göre +/- tanımlama tabloları hazırlandı. Tablodaki pozitiflik gösteren değerler

toplanarak suşların sayısal profilleri belirlendi. Bu profiller apiweb^{TM} tanımlama yazılımı ile değerlendirilerek, tür karşılıkları belirlendi.



Şekil 4. 2. *Lactobacillus* spp.'in 48 Saatlik inkübasyondan sonraki API strip'indeki görünümü.

Çizelge: 4. 1. Kolostrum ve feçes örneklerinden (n=150) MRS Agar besiyerinde *Lactobacillus* spp. suşlarının izolasyonu ve API 50 CHL sistemi ile identifikasyonu.

S. N.	CİNS ADI	TÜR ADI	A. W. T. S. %	S. N.	CİNS ADI	TÜR ADI	A. W. T. S. %
1	-	-	-	76	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus brevis*	% 98
2	-	-	-	77	-	-	-
3	-	-	-	78	-	-	-
4	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus brevis*	% 83	79	-	-	-
5	-	-	-	80	-	-	-
6	-	-	-	81	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus brevis*	% 86
7	-	-	-	82	-	-	-
8	-	-	-	83	-	-	-
9	-	-	-	84	-	-	-
10	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus fermentum*	% 65	85	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus plantarum*	% 88
11	-	-	-	86	-	-	-
12	-	-	-	87	-	-	-
13	-	-	-	88	-	-	-
14	-	-	-	89	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus casei*	% 63
15	-	-	-	90	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus acidophilus*	% 76
16	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus plantarum*	% 78	91	-	-	-
17	-	-	-	92	-	-	-
18	-	-	-	93	-	-	-

19	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus casei*	% 60	94	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus brevis*	% 75
20	-	-	-	95	-	-	-
21	-	-	-	96	-	-	-
22	-	-	-	97	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus acidophilus*-3	% 83
23	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus plantarum*	% 77	98	-	-	-
24	-	-	-	99	-	-	-
25	-	-	-	100	-	-	-
26	-	-	-	101	-	-	-
27	-	-	-	102	-	-	-
28	-	-	-	103	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus plantarum*	% 79
29	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus brevis*	% 79	104	-	-	-
30	-	-	-	105	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus brevis*	% 73
31	-	-	-	106	-	-	-
32	-	-	-	107	-	-	-
33	-	-	-	108	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus acidophilus*	% 72
34	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus brevis*	% 83	109	-	-	-
35	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus plantarum*	% 76	110	-	-	-
36	-	-	-	111	-	-	-
37	-	-	-	112	-	-	-
38	-	-	-	113	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus plantarum*	% 85
39	-	-	-	114	-	-	-
40	-	-	-	115	-	-	-
41	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus brevis*	% 87	116	-+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus acidophilus*	% 81

42	-	-	-	117	-	-	-
43	-	-	-	118	-	-	-
44	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus brevis*	% 87	119	-	-	-
45	-	-	-	120	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus brevis*	% 78
46	-	-	-	121	-	-	-
47	-	-	-	122	-	-	-
48	-	-	-	123	-	-	-
49	-	-	-	124	-	-	-
50	-	-	-	125	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus acidophilus*	% 73
51	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus casei*	% 61	126	-	-	-
52	-	-	-	127	-	-	-
53	-	-	-	128	-	-	-
54	-	-	-	129	-	-	-
55	-	-	-	130	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus plantarum*	% 86
56	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus fermentum*	% 63	131	-	-	-
57	-	-	-	132	-	-	-
58	-	-	-	133	-	-	-
59	-	-	-	134	-	-	-
60	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus plantarum*	% 77	135	-	-	-
61	-	-	-	136	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus brevis*	% 74
62	-	-	-	137	-	-	-
63	-	-	-	138	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus acidophilus*-3	% 82
64	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus rhamnosus*	% 72	139	-	-	-

65	-	-	-	140	-	-	-
66	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus brevis*	% 83	141	-	-	-
67	-	-	-	142	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus brevis*	% 78
68	-	-	-	143	-	-	-
69	-	-	-	144	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus plantarum*	% 89
70	-	-	-	145	-	-	-
71	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus plantarum*	% 87	146	-	-	-
72	-	-	-	147	-	-	-
73	-	-	-	148	-	-	-
74	-	-	-	149	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus reuteri*	% 68
75	+ (*Lactobacillus* spp.)	*Lactobacillus rhamnosus*	% 73	150	-	-	-

S. N.: Suş No. A. W. T. S. %: API WEB Tanımlama Sistemi %'si.

Çizelge: 4. 2. Kolostrum ve feçes örneklerinden (n=150) MRS Agar besiyerinde gelişen ve API 50 CHL sistemiyle *Lactobacillus* spp. suşlarının türlere göre dağılımı ve % oranları.

TÜR ADI	SUŞ NO	SAYISI	%
Lactobacillus brevis	4, 29, 34, 41, 44, 66, 76, 81, 94, 105, 120, 136, 142	13	35,1
Lactobacillus plantarum	16, 23, 35, 60, 71, 85,103, 113, 130, 144	10	27
Lactobacillus acidophilus	90, 108, 116, 125	4	10,8
Lactobacillus casei	19, 51, 89	3	8,1
Lactobacillus acidophilus-3	97, 138	2	5,4
Lactobacillus fermentum	10, 56	2	5,4
Lactobacillus rhamnosus	64, 75	2	5,4
Lactobacillus reuteri	149	1	2,7
TOPLAM	37	37	100

MRS Agar besiyerine ekilen 150 örnekten 37'si üreme gösterdi. API 50 CHL sistemi ile teşhis edilen 37 suşun 13'ü *Lactobacillus brevis* (% 35,1), 10'u *Lactobacillus plantarum* (% 27), 4'ü *Lactobacillus acidophilus* (% 10,8), 3'ü *Lactobacillus casei* (% 8,1), 2'si *Lactobacillus acidophilus*-3 (% 5,4), 2'si *Lactobacillus fermentum* (% 5,4), 2'si *Lactobacillus rhamnosus* (% 5,4), 1'i *Lactobacillus reuteri* (% 2,7) olarak apiweb^{TM} tanımlama programı ile belirlendi (Çizelge 4. 1., Çizelge 4. 2.).

Çizelge 4. 3. Kolostrum (n=100) örneklerinden MRS Agar besiyerinde *Lactobacillus* spp. suşlarının izolasyonu ve API 50 CHL sistemi ile identifikasyonu.

TÜR ADI	SUŞ SAYISI	SUŞ % ORANI
Lactobacillus brevis	6	% 30
Lactobacillus plantarum	5	% 25
Lactobacillus acidophilus	4	% 20
Lactobacillus casei	3	% 15
Lactobacillus acidophilus-3	2	% 10
TOPLAM: 5	20	%100

100 kolostrum örneği MRS Agara ekildi. Üreme gösteren 20 suş, API 50 CHL sistemiyle teşhis edildi. 20 suşun 6'sı *Lactobacillus brevis* (% 30), 5'i *Lactobacillus plantarum* (% 25), 4'ü *Lactobacillus acidophilus* (% 20), 3'ü *Lactobacillus casei* (% 15), 2'si *Lactobacillus acidophilus*-3 (% 10) olarak apiweb^{TM} tanımlama programı ile belirlendi (Çizelge 4. 3.).

Çizelge 4. 4. Feçes (n=50) örneklerinden MRS Agar besiyerinde *Lactobacillus* spp. suşlarının izolasyonu ve API 50 CHL sistemi ile identifikasyonu.

TÜR ADI	SUŞ SAYISI	SUŞ % ORANI
Lactobacillus brevis	7	% 41,18
Lactobacillus plantarum	5	% 29,42
Lactobacillus fermentum	2	% 11,76
Lactobacillus rhamnosus	2	% 11,76
Lactobacillus reuteri	1	% 5,88
TOPLAM: 5	17	%100

50 feçes örneği MRS Agara ekildi. Üreme gösteren 17 suş, API 50 CHL sistemiyle teşhis edildi. 17 suşun 7'si *Lactobacillus brevis* (% 41,18), 2'si *Lactobacillus fermentum* (% 11,76), 5'i *Lactobacillus plantarum* (% 29,42), 1'i *Lactobacillus reuteri* (% 5,88), 2'si *Lactobacillus rhamnosus* (% 11,76) olarak apiweb^{TM} tanımlama programı ile belirlendi (Çizelge 4. 4.).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

100 adet kolostrum ve 50 adet bebek feçes (3-30 günlük) örneklerinin incelenmesi sonucunda; 100 kolostrum örneğinin 20'sinde (%20) ve 50 feçes örneğinin 17'sinde (% 34) üreme gözlendi (Çizelge 4. 3., Çizelge 4. 4.).

Gronlund ve ark. (1999), araştırmalarında 3 günlük ve yeni doğmuş bebeklerden aldıkları feçes örneklerinde laktobasillerin oranını % 20, Ahrne ve ark. (2005), da araştırmalarında bir haftalık 112 bebek feçesinden laktobasil türlerinin identifikasyon sonucunu % 21 olarak bulmuşlardır. Biz ise 3-30 günlük 50 bebek feçesinde, % 34 oranında daha yüksek bir sonuç belirledik. Bu sonuç 3-30 günlük bebek feçeslerinde laktobasillerin daha yoğun bulunduğunu göstermektedir (Çizelge 4. 4.).

100 adet kolostrum örneğinin incelenmesi sonucunda; üreme gösteren 20 örnekten izole edilen suşlar sırasıyla; 6 *Lactobacillus brevis* (% 30), 5 *Lactobacillus plantarum* (% 25), 4 *Lactobacillus acidophilus* (% 20), 3 *Lactobacillus casei* (% 15) ve 2 *Lactobacillus acidophilus*-3 (% 10) olarak teşhis edilmiştir. *Lactobacillus brevis'*in dominant tür olduğu görülmüştür (Çizelge 4. 3).

Román-Méndez ve ark. (2009), çalışmalarında 6-12 yaşlarındaki Fransız ve Meksikalı çocuklardan topladıkları salya örneklerini MRS Agar besiyerlerine ekmişlerdir. *L. rhamnosus*'u ve *L. acidophilus'*u PCR ile tanımlayıp, diğer laktobasil türlerini API 50 CH sistemiyle tanımlamışlardır. Laktobasil türleri RAPD-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. RAPD-PCR ile API 50 CH test sonuçları benzerlik göstermiştir. 42 Fransız çocuktan toplanan örneklerden sadece *L. rhamnosus* % 85,72 oranında bulunurken, 121 Meksikalı çocuktan toplanan örneklerden *L. rhamnosus* % 39,5 ve *L. acidophilus* % 36,8 olarak bulunmuştur. Farklılığın nedeni beslenmede kullanılan fermente süt ürünleri ve probiyotiklere bağlanmıştır. Çalışmamızda ise,

API 50 CHL sistemiyle yapılan identifikasyonda feçesten izole edilen *L. rhamnosus* % 5,4, kolostrumdan izole edilen *L. acidophilus* % 10,8 oranında bulunmuştur. Sonuçlarımız bu çalışmayla karşılaştırıldığında düşük oranda görülmüştür. Ağız sindirim sisteminin dışa açılan bir penceresi olduğundan, ağızda ve salya örneklerinde fazla miktarda bakteri türlerinin olması beklenen bir sonuçtur. Anne sütü ise normal şartlarda steril olduğundan, dışarıdan bulaşma olması durumunda üreme gösterebilir. 3-30 günlük bebek feçeslerinden laktobasil bakteri türlerinin daha fazla sayıda izole edimesi; sindirim sistemine süt ve süt ürünleri başta olmak üzere çeşitli besin maddeleri ile birlikte ulaşmaları ve feçes yoluyla dışarıya atımlarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Colloca ve ark. (2000), yaptıkları çalışmada ağzın dört bölgesini incelemişlerdir. *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*'u baskın olarak bulunduğunu belirtmişlerdir. *L. acidophilus'*un sadece diş kirinden izole edildiğini ve *L. brevis*'in izole edilmediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda kolostrum ve feçesten, ağız bölgelerinden izole edidiği belirtilen, *L. fermentum*, *L. plantarum ve L. rhamnosus* türlerinin izolasyonu gerçekleştirilirken, *L. salivarius* izole edilememiştir. Farklı olarak *L. brevis* izole edilmiştir. Smith ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada salya örneklerinde *L. brevis*'i % 24,6, *L. fermentum'*u %18,5, *L. casei*'yi % 16,9, *L. plantarum*'u % 9,3, *L. delbruekii*'i % 15,4, *L. acidophilus*'u % 7,69 ve *L. salivarius*'u % 1,54 oranlarında izole etmişlerdir. Çalışmamızda kolostrum örneklerinden *L. acidophilus* %20, *L. brevis* % 30, *L. casei* % 15, *L. plantarum* % 25 oranlarında izole edilmiştir. Feçes örneklerinden ise *L. brevis* % 41,18, *L. fermentum* % 11,76, *L. plantarum* % 29,42 oranlarında izole edilmiştir. Sonuçlarımızın daha yüksek olduğu görülmüştür.

50 adet feçes örneğinin incelenmesi sonucunda; üreme gösteren 17 örnekten izole edilen suşlar sırasıyla; 7 *Lactobacillus brevis* (% 41,18), 5 *Lactobacillus plantarum* (% 29,42), 2 *Lactobacillus fermentum* (% 11,76), 2 *Lactobacillus rhamnosus* (% 11,76) ve 1 *Lactobacillus reuteri* (% 5,88) olarak teşhis edilmiştir. Feçes örneklerinde de *Lactobacillus brevis'*in dominant tür olduğu görülmüştür (Çizelge 4. 4).

Xanthopoulos ve arkadaşları (2000), araştırmalarında bebek feçeslerinden izole edilen laktobasillus türlerinin gastrointestinal sistemdeki durumlarını incelemişler ve türler arasında dayanıklılık (dirençlilik) sonuçlarına bakmışlardır. Buna göre *Lactobacillus rhamnosus* suşunun *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri* ve *Lactobacillus acidophilus*'a göre daha dayanıklı olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda türler arasındaki dayanıklılık araştırılmamış fakat API 50 CHL sistemi ile identifikasyon sonucunda kolostrumdan ve bebek feçeslerinden izole edilen laktobasil türleri arasında en çok *Lactobacillus plantarum*'un ve *Lactobacillus brevis*'in ürediği gözlenmiştir. Ángeles-López ve ark. (2001), vajinada bulunan laktobasilleri çalışmışlardır. Topladıkları 156 örnekten, 25 heterofermentatif tür ve 61 homofermentatif türü API 50 CHL sistemi ile tanımlamaya çalışmış, bunlardan 67 örnek API 50 CHL sistemi ile tanımlanırken, 19 örnek biyokimyasal testlerle tanımlanmıştır. Heterofermentatif türler arasında *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* tanımlanmış iken, homofermentatif türler arasında *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus coprophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis* olarak tanımlanmışlardır. Wall ve ark. (2007), 11 yetişkin ve 16 bebek feçesinden laktobasil identifikasyonunu araştırıp, yetişkin örneklerde *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei* yaygın olarak bulurken, bebek feçeslerinde *L. gasseri*, *L. salivarius'*u daha yaygın izole etmişlerdir. Arici ve ark. (2004), yeni doğmuş bebek feçeslerinden 21 laktobasil suşu izole etmişlerdir. API 50 CH sistemini kullanarak karbohidrat fermentasyonunu daha ileri bir aşama olarak karakterize etmişlerdir.

Khail ve ark. (2007), 3-6 aylık bebek feçeslerinden izole ettikleri laktik asit bakterilerinin 55 suşunun probiyotik özellikler taşıdığını belirtmişlerdir. API 50 CH ve SDS-PAGE tekniklerini kullanarak; *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecium* ve *E. faecalis*'i dominant olarak bulmuşlardır. SDS-PAGE, API sonuçlarının % 28'ini doğrulamıştır. Embley ve ark. (1989), *Lactobacillus vaginalis*'i ve *Lactobacillus fermentum'*u farklı türler olarak tanımlarken, Boyd ve ark. (2005),

araştırmalarında sadece API 50 CHL sistemi kullanarak *Lactobacillus vaginalis* türlerinin % 50'e yakın sayısını *Lactobacillus fermentum* olarak tanımlamışlardır.

Lourens-Hattingh ve Viljoen (2001), araştırmalarında L-sistein katkılı MRS besiyerini, ticarî fermente süt ürünleri ve yoğurttan bifidobakterlerin izolasyonu için en iyi ortam olarak önermişlerdir. Biz bu besiyerini kullanarak anne sütü (kolostrum) ve bebek (3-30 günlük sadece anne sütü alan) feçeslerinden laktobasil türlerini izole ettik. Çalışmamızda MRS besiyeri başarı ile kullanılmış olup, besiyerinin kendisinden kaynaklanan bir inhibisyon tespit edilmemiştir. MRS besiyeri Corsetti ve ark. (1996), Sanni ve ark. (1999) ve Oh ve ark. (2000) başta olmak üzere birçok araştırmacı tararafından da kullanılmıştır.

Feçes ve kolostrum örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin kesin tanılarının yapılması ve özelliklerinin mikrobiyolojik yöntemlerle belirlenmesi ile geniş bir kültür koleksiyonu hazırlanmalıdır. Normal bağırsak florasında anne sütü ile beslenen bebeklerde bulunan bakteri sayısı azaldığında bireyin sağlığı tehlikeye girebilir. Normalde laboratuvar ortamında gelişebilmek için optimum koşullara ve anaerobik ortamlara gereksinim duyan bu mikroorganizmaların gerek ticari ürünlerden gerekse doğal ortamlardan çok az sayıda izole edildikleri görülmektedir.

Mikroorganizmaların izolasyonu ve identifikasyonu konusunda, klasik kültürel yöntemlerle yapılan çalışmalar; bazı mikroorganizma türlerinin üremede güçlük göstermesi, kültüre alınamamaları, farklı kültür yöntemlerinin uygulanmasında deneyimli araştırmacılara gereksinin duyulması gibi çeşitli nedenler, mikrobiyolojik çalışmaların yanı sıra moleküler yöntemlerin gelişmesine de katkı sağlamıştır. Probiyotik olarak bilinen LAB'lerinin fizyolojik ve taksonomik özellikleri açısından gruplandırılması konusunda yapılan çalışmalar, günümüzde moleküler tiplendirme yöntemlerinin kullanılmasıyla daha da geliştirilmiştir.

16S rRNA genleri tüm hücrelerde en çok korunmuş olan, yani en az değişikliğe uğrayan bölgelerdir. Bu nedenle diğer canlılar gibi bakterilerde de filogenetik (akrabalık ilişkilerinin tanımlanabilmesi için) ayrıca bakteride gen ekspresyonu düzeyinde proteinin belirlenmesi için öncelikli olarak 16S rDNA'nın yerine 16S rRNA deneysel çalışmalarda tercih edilen gen bölgesidir. Oysaki, bakteriler arasındaki türe özgün farklılıkların taksonomik olarak tanımlanması için, herhangi bir bakteri cinsine dahil olan türlerin tamamı 16S rDNA'daki değişken gen bölgelerinin dizi analizinin belirlenmesi ile kesin olarak tanımlanabilmektedir. 16S rDNA dizisinin referans olarak kullanılmasıyla anaerobik bakterilerin identifikasyonu diğer geleneksel fenotipik identifikasyon yöntemlerden daha kısa sürede çalışılan bakteri türününe özgün sekans bölegelerinin tesbit edilebilmesi açısından son derece önemlidir. Kısaca, anaerobik ve aerobik bakteri identifikasyonunda mikrobiyolojik testlerin yanı sıra moleküler metodları uygularken öncelikli olarak 16s rDNA bölgesi tercih edilmektedir (Klijn ve ark.1991, Budai 2008)

Probiyotik LAB'lerinin spesifik olarak belirlenmesi ve tanımlanması konusunda Castellanos ve ark. (1996), araştırmasında daha önceden seçilmiş ve domuz yemlerinde probiyotik olarak kullanılan üç laktik asit bakterisini 16S rDNA üzerinde bulunan V1 gen bölgesinin üç adet primer ile PCR'da çoğaltılarak dizi analizinin belirlenmesi yöntemiyle tanımlanmasını amaç edinmiştir. Araştırma sonucunda probiyotik olarak kullanılan *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum* için çok kısa sürede ve az miktardaki kültürden güvenilir bir tanımlama yapılabileceğini göstermiştir.

Bir mikrorganizma türünün probiyotik olarak kabul edilmesi için, öncelikle şu şartları taşıması gerekmektedir.

Söz konusu bakteri bilimsel literatürde rapor edilmiş olmalıdır.
Sağlığı destekleyici olduğuna dair açık ve net kanıtlar olmalıdır.

Gastrointestinal bölgede kolonize olarak bu bölgedeki mikropların dengesini yönetici role sahip olmalıdır.
Doğal antibiyotik etkisine sahip olarak hastalık yapıcı patojenleri durdurmalıdır.
Tüketilmesi güvenli olmalıdır.
Ticari üretimde kullanılmaya elverişli olmalıdır (Casas ve Dobrogosz 2000).

Yukarıda probiyotik olarak kabul edilen şartlara göre, özelikleri belirlenen ve kesin tanıları yapılan anne sütünden izole edilen *L. acidophilus*, *L. acidophilus*-3 ve *L. casei* suşlarını feçesten izole edilemedi. Bu suşların anne sütüne eş değer besin içeriğine sahip bebek mamalarının üretimi için bir kaynak oluşturacağına ve teknolojik özelliklerinin detaylı olarak belirlenmesinden sonra seçilen suşlarla, yeni probiyotik formülasyonlarının geliştirilebileceğine inanılmaktadır. Sadece feçesten izole ettiğimiz *L. fermentum'*un, *L. reuteri'*nin ve *L. rhamnosus'*un ise, starter kültür olarak kullanılması önerilir.

Morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri tanımlamaya yönelik olan klasik fenotiplendirme testleri her ne kadar kullanışlı ve vazgeçilmez bir yöntem olsa da bir suşun karakteristik özelliklerini tam olarak yansıtamamaktadır Bu geleneksel kriterler oldukça zaman alıcı, ayrım gücü ve hassasiyeti bakımından da şüphe uyandırıcıdır. Bununla beraber LAB'ların büyüme koşulları hücre morfolojisini etkileyebilmekte ve bazı durumlarda cins düzeyinde dahi tanımlama işlemlerinde zorluk oluşturmaktadırlar. Bu kriterler kaba bir tanımlama amacı için yeterli olsalar da net ve kesin bir identifikasyon amacına yönelik değillerdir. API 50 CHL sistemi çok geniş aralığa sahip birçok LAB türlerinde hızlı bir şekilde fermentasyon profili sergilemektedir. Tekrarlanabilir sonuçların olmaması sorun teşkil etmektedir. Standardize edilmiş bir klasik tanımlama metodu, rutin olarak kullanılmakla birlikte pahalı bir sistemdir. Bununla birlikte özellikle fazla sayıda bakteri izolatı tanımlanabilirken bu bakterilerin taksonomisine ilişkin bir sonucuna gidilememektedir. Bu nedenle son yıllardaki çalışmalar gıda, süt (kolostrum), mide-bağırsak sistemi'nde bulunan LAB'ların mikrobiyal identifikasyonları için genetik

özelliklerin belirlenmesine dayalı olan moleküler metotların kullanımı yönündedir. Bakteri identifikasyonunda özellikle de LAB gibi anaerobik koşullarda çoğalan bakterilerin tanımlanabilmesi ve olumsuz sonuçlardan kurtulabilmek için moleküler identifikasyon teknikleri fenotipik testlere alternatif olarak geliştirilmektedir. Ayrıca LAB suşları arasında ürüne ve üretime uygun olanların seçiminde (üretilmesi için gerekli optimum koşulların zor sağlanmasından dolayı) moleküler biyolojik yöntemler önem arz etmektedir (Stiles ve Holzapfel 1997).

Yaygın olarak kullanılan biyokimyasal testleri (API 50 CHL) bakteriler açısından pratikte uygulamak önemlidir. Fakat şeker fermentasyonu gibi farklılık içeren ve stabil olmayan sonuçlar nedeniyle daha az tercih edilir olmuşlardır. Genellikle fizyolojik olarak birbiriyle ilgisi gözlenmeyen yakın akraba olan bakteri türlerinin sayısındaki artış ile birlikte, bunların tanımlandırılması ve sınıflandırılmasında moleküler teknikler ayırt edici yöntemleri oluşturmaktadır. Bakterilerin bulundukları kaynaklardan, izolasyon sonrasında önemli olan husus gerek aerobik gerekse anaerobik floranın identifikasyonunda kullanılan, geleneksel yöntemlerin yanı sıra API 50 CHL gibi kite dayalı testlerin kullanılmasıdır. Şayet tür tanımlanması yapılamıyorsa PCR'a dayalı moleküler teknikler kullanılarak LAB'ların hızlı ve doğru şekilde tanımlanması için yeni alternatifler oluşturulabilir.

KAYNAKLAR

Ahrne, S., Lonnermark, E., Wold, A. E., Aberg, N., Hesselmar, B., Salman, R., Strannegard, I. L., Molin, G., Adlerberth, I. 2005. Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. Microbes. Infect. 7: 1256–1262.

Alamprese, C., Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C., Savani, L. 2002. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail- manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. Int. Dairy J. 12: 201–208.

Andrighetto, C., Dea, P. D., Lombardi, A., Neviani, E., Rossetti, L., Giraffa, G. 1998. Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products, Res. Microbiol. 149, 631-643.

Ángeles-López, M., Ramos, E. G., Santiago, C.A. 2001. Hydrogen peroxide production and resistance to nonoxinol-9 in Lactobacillus spp. isolated from the vagina of reproductive age women. 43: 171 – 176

Arici, M., Bilgin, B., Sagdic, O., Ozdemir, C. 2004. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. Food Microbiology. 21: 19–24.

Avonts, L., Uytven, E.V., De Vuyst, L. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. Int. Dairy J. 14: 947–955.

Bayarer, M., Karagözlü, C., Akbulut, N. 2006. İnsan Beslenmesinde Kolostrumun Önemi ve Kullanım Olanakları. HR.Ü.Z.F.Dergisi. 10.11–21.

Bielecka, M., Biedrzycka, E., Majkowska, A. 2001. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. Food Res. Int. 35: 125–131.

Bover-Cid, S., Holzapfel, W.H. 1999. Improved Screening Procedure for Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria, International Journal of Food Microbiology. 53: 33-41.

Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C. 2001. Amino Acid-Decarboxylase Activity of Bacteria Isolated from Fermented Pork Sausages, International Journal of Food Microbiology, 66: 185-189.

Boyd, M. A., Antonio, M. A. D., Hillier, S. L. 2005. Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species. Journal of Clinical Microbiology. 43: 5309–5311.

Brady, L.J., Gallaher, D.D., Busta, F.F. 2000. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. Journal of Nutrition. 130: 410–414.

Budai, M. 2008. Identification of anaerobic bacteria by means of 16S rDNA sequencing. Project Microbial Biotechnology.

Casas, I. A., Dobrogosz, W. J. 2000. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. Microbioal Ecology in Health and Disease. 12: 247-285.

Castellanos, M., Chauvet, A., Deschamps, A., Barreau C. 1996. PCR Methods for Identification and Specific Detection of Probiotic Lactic Acid Bacteria. Current Microbiology. 33: 100–103

Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. Int. J. Food Microbiol. 35: 1-27.

Chou, L. S., Weimer, B. 1999. Isolation and characterization of acid- and biletolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus.* J. Dairy Sci. 82: 23-31.

Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Le Blay, G. 2008. Glycerol induces reuterin production and decreases Escherichia coli population in an in vitro model of colonic fermentation with immobilized human feces. FEMS. Microbiol. Ecol. 63: 56-64.

Colloca, M. E., Ahumada, M.C., López, M.E., Nader-Macias, M.E. 2000. Surface properties of Lactobacilli isolated from healthy subjets. Oral Dis. 6: 227-233.

Commane, D., Hughes, R., Shortt, C., Rowland, I. 2005. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. Mutation Research. 591: 276–289.

Corsetti, A., Gobbetti, M., Smacchi, E. 1996. Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. Food Microbiology. 13: 447-456.

Coşkun, T. 2006. Pro-, Pre- ve Sinbiyotikler. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi. 49: 128–148.

Çakır, İ., Gül Karahan A. ve Çakmakçı, M. L. 2002. Probiyotikler ve etki mekanizmaları. Gıda Müh. Der. 6: 179–187.

Çakır, İ. 2003. Laktobasillus ve Bifidobakterlerde Bazı Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi. Ankara Üniv., Fen Bil. Enst., Doktora Tezi, Ankara, 84s.

Dağdemir, E. 2006. Salamura beyaz peynirlerden izole edilen laktik asit bakterilerin tanımlanması ve seçilen bazı izolatların kültür olarak kullanılma imkanları. Doktora tezi. Gıda mühendisliği anabilim dalı.

De Angelis M, Corsetti A, Tosti N, Rossi J, Corbo MR, Gobbetti M. 2000. Characterization of non starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic and cell wall protein analyses. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2011–2020.

Dickson, E. M., Riggio M. P., Macpherson, L. 2005. A novel species-specific PCR assay for identifying Lactobacillus fermentum. J. Med. Microbiol. 54: 299-303.

Embley, T. M., N. Faquir, W. Bossart, and M. D. Collins. 1989. *Lactobacillus vaginalis* sp. nov. from the human vagina. Int. J. Syst. Bacteriol. **39:** 368–370.

Fooks, L. J., Fuller, R., Gibson, G. R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. Int. Dairy J. 9: 53–61.

Fuller, R. 1999. Probiotics for farm animals. pp. 15–22. Probiotics A Critical Review. Editor G. W. Tannock, Horizon Scientific Press, 164. Wymondham, UK.

Fukushima, Y., Kawata, Y., Hara, H., Terada, A. Mitsuoka, T. 1998. Effect of probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. Int. J. Food Microbiol. 42; 39–44.

Gmeiner, M., Kneifel, W., Kulbe, K. D., Wouters, R., De Boever, P., Nollet, L., Verstraete, W. 2000. Influence of a synbiotic mixture consisting of *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and a fructooligosaccharide preparation on the microbial ecology sustained in a simulation of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME reactor). Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 219–223.

Goldin, B., Gorbach, S. L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., Salminen, S. 1992. Survival of *Lactobacillus* Species in Human Gastointestinal Tract. Dig. Dis Sci. 37: 121–128.

Goldin, B. R., Gorbach, S. L. 1984. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. Amer. J. Clin. Nutr. 39: 756–761.

Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. 1999. *Bifidobacterium* ssp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends Food Sci. Technol. 10; 139–157.

Gopal, P. K., Sullivan, P. A., Smart, J. B. 2001. Utilisation of Galacto-oligosaccharides as Selective Substrates for Growth by Lactic Acid Bacteria Including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20, Int. Dairy J. 11: 19–25.

Gögebakan, B. 2003. Peynir ve insan örneklerinden elde edilen *Lactobacillus* cinsi bakterilerin antibiyotik dirençliliklerinin araştırılması. Yüksek lisans tezi.Tıbbi biyoloji anabilim dalı.

Gökalp, H. Y., Kaya, M., Zorba, ö. 2004. Et ürünleri işletme mühendisliği. Atatürk Üniversitesi Yayın No:786, Ziraat Fakültesi Yayın No:320 Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset tesisi, 562s, Erzurum.

Gökalp, H. Y., Nas, S., Certel, M. 1996. Biyokimya-I: Temel Yapılar ve Kavramlar. PAÜ Müh. Fak. Ders Kitapları Yay. No: 001, Müh. Fak. Matb., Çamlık, Denizli. 400.

Gronlund, M. M., Lehtonen, O. P., Eerola, E., Kero, P. 1999. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. J Pediatr Gastroenterol. Nutr. 28: 19–25.

Gürsoy, O., Kayardı, S. 1999. Diyet acidophilus bifidus yoğurdu ve diyet yoğurdun kalite niteliklerinin incelenmesi. Pamukkale Üniv. Müh. Bil. Der. 5: 1109–1114.

Hertel, C., Lutwik, W., Pot, B., Kersters, K., Schleifer, K. H. 1993. Differentiation of lactobacilli occurring in fermented milk products by using oligonucleotide probes and electrophoretic protein profiles. System Appl Microbiol. 16: 463–467.

Heyman, M. 2002. Effect of Lactic Acid Bacteria on Diarrheal Diseases, National Institue of Health and Medical Research, INSERM E9925, Faculté Necker, 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris, France.

Hoesl, C. E., Altwein, J. E. 2005. The probiotic approach: an alternative treatment option in urology. European Urology. 47: 288- 296.

Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J. H. J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. Int. J. Food Microbiol. 41: 85–101.

Holzapfel, W. H., Schillinger, U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. Food Res. Int. 35: 109–116.

Ingham, S. C. 1999. Use of modified *Lactobacillus* selective medium and *Bifidobacterium* iodoacetate medium for differential enumeratin of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in powdered nutritional products. J. Food Protec. 62: 77-80.

Itsaranuwat, P., Al-Haddad K. S., Robinson, R. K. 2003. The potential therapeutic benefits of consuming 'health-promoting' fermented dairy products: a brief update. Int. J. Dairy Tech. 56: 203–210.

Kailasapathy, K., Rybka, S. 1997. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.–their therapeutic potential and survival in yogurt. The Aust. J. Dairy Technol. 52: 28-35.

Kailasapathy, K., Chin, J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Immunol. Cell Biol. 78: 80–88.

Karahan, A. G., Çakmakçı, M. L. 1996. Probiyotikler. 21: 297–302.

Kılıç, S. 2001. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 542, 451 s, İzmir.

Kışla, D., Ünlütürk, A. 1998. A new type of fermented milk product manufactuered by Lactobacillus acdophilus, Lactobacillus casei, and Bifidobacterium longum. Adv. Food Sci (CMTL). 20: 234-39.

Kishi, A., Uno, K., Matsubara, Y., Okuda, C., Kishida, T. 1996. Effect of the oral administration of *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans* on interferon-alpha producing capacity in humans. J. Am. Coll. Nut. 15: 408-12.

Khalil, R., Mahrous, H., El-Halafawy, K., Kamaly, K., Frank, J., El Soda, M. 2007. Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt. African Journal of Biotechnology. 6: 935-945.

Klaenhammer, R.T., Kullen, J.M. 1999. Selection and design of propertics. Int. J. Food Microbiol. 50: 45-57.

Klaenhammer, T. 2000. Probiotic bacteria: Today and tommorrow. J. of Nutr. 130: 415–416.

Klebanof, S. J., Hillier, S. L. 1991. Aschenbacch D.A., Walllersdorp A. M. J. of Infec. Dis. 164: 94–100.

Klein. G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. 1998. Taxomony and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol. 41: 103-25.

Klijn, N., Weerkamp, A. H., De Vos, W. M. 1991. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. Appl. Environ. Microbiol. **57:** 3390–3393.

Lee, Y. K., Nomoto, K., Salminen, S., Gorbach, S. L. 1999. Handbook of Probiotics.

Lourens-Hattingh, A. and Viljoen, B. C. 2001. Yoghurt as probiotic carrier food. Int. Dairy J. 11: 1–17.

Masson, F., Talon, R., Montel, M. C. 1996. Histamine and Tyramine Production by Bacteria from Meat Products, International Journal of Food Microbiology, 32: 199-207.

Matsumiya, Y., Kato, N., Watanabe, K. 2002. Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal Lactobacillus species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. J. Infect Chemother. 8: 43-49.

McCartney, A. L., Wenzhi, W., Tannock, G. F. 1996. Molecular Analysis of the Bifidobacterial and Lactobacillus Microflora of Human, Applied and Environmental Microbiology. 4608-4613.

McFarland, L.V., Elmer, G. W. 1997. Pharmaceutical probiotics for the treatment of anaerobic and other infections. Anaerobe. 3: 73–78.

McNaught, C. E., McFic, J. 2001. Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. Nutrition Research. 21: 343–353.

Mitsuoka, T. 1996. Intestinal flora and human health. Asia Pasific J. Clin. Nutr. 1: 2–9.

Molin, G., Jeppsson, B., Johansson, M. L., et al. 1993. Numerical taxonomy of Lactobacillus spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. J. Appl. Bacteriol. 74: 314-23.

Musumeci, M., Simpore, J., D`Agata, A., Sotgiu, S., Musumeci, S. 2006 Oligosaccharides in Colostrum of Italian and Burkinabe Women. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 43: 372–378.

Niedzielin, K., Kordecki, H., Birkenfeld B. 2001. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of Lactobacillus plantarum 299V in patients with irritable bowel syndrome. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 13: 1143-7.

Oh, S., Kim, S.H., Worobo, R. W. 2000. Characterization and purification of bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. J. Dairy Sci. 83: 2747-2752.

Olejnik, A., Lewandowska, M., Obarsa, M., Grajek, W. 2005. Tolerance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains to low pH, bile salts and digestive enzymes. Electronic J. Polish Agricultural Universities. 8: 1–12.

Olson, N. F. 1990. The impact of lactic acid bacteria on cheese Flavour. FEMS Microbiology. 87: 131-138.

Pabst, H. F., Spady, D. W. 1990. Effect of Breast Feeding on Antibody Response to Conjugate Vaccine. Lancet. 336:269-70.

Penner, R., Fedorak, R. N., Madsen, K. L. 2005. Probiotics and nutraceuticals: nonmedicinal treatments of gastrointestinal diseases. Curr. Opin. Pharmacol. 5: 596–603.

Randazzo, C. L., Restuccia, C., Romano, A. D., Caggia, C. 2004. *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. Int. J. Food. Microbiol. 1: 9-14.

Rolfe, R. D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. J. Nutr. 130: 396-402.

Román-Méndez, C., Badet, C., Yáñez, A., Dominguez, M. A., Giono, S., Richard, B., Nancy, J., Dorignac, G. 2009. Identification of oral strains of *Lactobacillus* species isolated from Mexican and French children. Journal of Dentistry and Oral Hygiene. 1: 009-016.

Saarela, M., Lähteenmäki L., Crittenden, R., Salminen, S., Mattila, S. T. 2002. Gut bacteria and health foods- the European perspective. Int. J. Food Microbiol. 78: 99–117.

Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M. C., Roberfroid, M., Rowland, I. 1998.

Functional food science and gastrointestinal physiology and function. British J. Nutr. 80: 147.

Salminen, S. 1999. Probiotics: Scientific support for use. Food Technol. 53–66.

Sanders, M. E. 1999. Probiotics. Food Technol. 53: 67–77.

Sanders, M. E. and Huis in't Veld J., 1999. Bringing a probiotic- containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. Antonie van Leeuwenhoek. 76: 293–315.

Sanni, A. I., Onilude, A. A., Ogunbanwo, S. T., Smith, S. I. 1999. Antagonistic activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus* species from ogi, an indigenous fermented food. J. Basic Microbiol., 39: 189-195.

Schillinger, U. 1999. Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. Int. J. Food Microbiol. 47: 79–87.

Shortt, C. 1999. The probiotic century: historical and current perpectives. Trends Food Sci. Tech. 10: 411–417.

Silvi, S., Verdenelli, M. C., Orpianesi, C., Cresci, A. 2003. EU project Crownalife: functional foods, gut microflora and healthy ageing. Isolation and identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from faecal samples of elderly subjects for a possible probiotic use in functional foods. J. Food Eng. 56: 195–200.

Shinoda, T., Kusuda, D., Ishida, Y., Ikeda, N., Kaneko, K., Masuda, O. 2001. Survival of Lactobacillus helveticus strain CP53 in the human gstrointestinal tract. Letters in Applied Microbiology. 32: 108-113.

Smith, S., Awed ,A., Coker, A., Savege, K., Abosede, D., Oyedeji, K. 2001. Lactobacilli in human dental caries and saliva. Microbiology 105: 77-85.

Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Hold, J. G. 1986. Bergey's Manuel of Sistematic Bacteriology. 2: 1208-1234.

Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P. B., Ross, R. P. 2001. Market potential for probiotics. Am. J. Clin. Nutr. 73: 476–83.

Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D. 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. Curr. Opin. Biotechnol. 16: 198–203.

Stiles, M. E. and Holzapfel W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxomony. International Journal of Food Microbiolgy. 36: 1-29.

Sullivan, A., Nord, C. E. 2002. The place of probiotics in human intestinal infections. Int. J. Antimicrob. Ag. 20: 313–319.

Tannock, G. W., 1997. Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D. Tıbtech. 15: 270–274.

Tannock, G. W. 1999. Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria. Current Issues Molec. Biol. 1: 53–64.

Tannock, G. W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., et.al. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4264-4267.

Tannock, G. W., Munro, K., Harsmen, H. J., Welling, G. W., Smat, J., Gopal, P. K. 2000. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a product containing Lactobacillus rhamnosus DR20. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2578-88.

Tekinşen, O. C. ve Atasever, M. 1994. Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Konya.

Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J. 2002. Identification and antibiotic the para-lacto-*N*-octaose. Eur. J. Biochem. 215: 361–371.

Tok, E., Aslım, B. 2007. Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri. Türk Mikrobiyol Cem Dergisi. 37: 62–68.

Tunail, N. ve Köşker, Ö. 1986. Süt Mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 966, Ankara.

Turantaş, F. 1999. Fermantasyonda Rol Oynayan Mikroorganizmalar. İçinde Gıda Mikrobiyolojisi (Ünlütürk, A., Turantaş, F. ed.). İkinci Baskı. İzmir. 425-473.

Turgut, T. 2006. Bazı Probiyotik Bakterilerin Dondurma Üretiminde Kullanım İmkanları. Doktora Tezi. Gıda Müh. A. B. D.

Turner, P. C., McLennon, A. G., Bates, A. D., White, M. R. H. 2000. Instant Notes Molecular Biology. School of Biological Sciences, University of Liverpool, 103.

Van-Coric, M. 1990. Antibody Responses to Parental & Oral Vaccines Where Impaired by Conventional and Low-Protein Formulas as Compared to Breast Feeding. Acta Paediatr Scand. 79: 1137-42.

Vinderola, C. G., Bailo, N., Reinheimer, J. A. 2000. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. Food Res. Int. 33: 97–102.

Vinderola, C. G., Reinheimer, J. A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristic and biological barrier resistance. Food Res. Int. 35: 117–124.

Vural, T. 1998. Probiyotikler. XXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Özet Kitabı. 33-34.

Wall, R., Fitzgerald, G., Hussey, S., Ryan, T., Murphy, B., Ross, P., Stanton, C. 2007. Genomic diversity of cultivable Lactobacillus populations residing in the neonatal and adult gastrointestinal tract. FEMS. Microbiol. Ecol. 59: 127–137.

Willem, M. de Vos. 1999. Gene expression systems for lactic acid bacteria. Current Opinion Microbiology. 2: 289-95.

Wright, A. T., Vilpponen-Salmela M. P. L., Collins K., Kiely B., Shanahan F., Dunne, C. 2002. The survival and colonic adhesion of *Bifidobacterium infantis* in patient with ulcerative colitis. Int. Dairy J. 12: 197–200.

Woodford, N (ed), Johnson, A. P. 1998. Plasmid Analysis. Humana Press, New Jersey, USA, 356 p.

Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E. Tzanetakis, N. 2000. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. Food Microbiology. 17: 205-215.

Yeniel, N. 2006. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *streptococcus thermophilus* suşlarının melas, peynir altı suyu ve pancar suyunda ekzopolisakkarit (EPS) ve laktik asit üretimlerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi. Biyoloji bölümü.

Yetişmeyen, A. 1995. Süt Teknolojisi. A.Ü.Ziraat Fak. Yayın No:1420. Ankara. 229 sayfa.

Yılmaztekin, M. 2001. Beyaz peynir üretiminde *Lactobacillus acidophilus Bifidobacterium bifidum*'dan yararlanma olanakları üzerine bir araştırma. Yük. Lis. Tezi. Harran Üniv., Fen Bil. Enst., Gıda Müh. A. B. D., Şanlıurfa, 102s.

Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y. 2009. Bazı laktik asit bakterilerinin fizyolojik, biyokimyasal, plazmit DNA ve protein profil özelliklerinin incelenmesi. 34: 91-98.

Zubillaga, M., Weill, R., Postaire, E., Goldman, C., Caro, R., Boccio, J. 2001. Effects of probiotics and functional foods and their use in different diseases. Nutr. Res. 21: 569.