T.C.

MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MEHMET SÖNMEZ

ANNE SÜTÜNDE İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN 16S rRNA DİZİ ANALİZİ İLE TANIMLANMASI, ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK VE ANTİBAKTERİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MUŞ-2018

T.C.

MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MEHMET SÖNMEZ

ANNE SÜTÜNDE İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN 16S rRNA DİZİ ANALİZİ İLE TANIMLANMASI, ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK VE ANTİBAKTERİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Yusuf ALAN

MUŞ-2018

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Muş Alparslan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "Anne Sütünde İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA Dizi Analizi ile Tanımlanması, Antibiyotik Dirençlilik ve Antibakteriyal Aktivitelerinin Belirlenmesi" adlı tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezimin kâğıt ve elektronik kopyalarının Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullarda saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

☑ Tezimin/Raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir.

☐ Tezim/Raporum sadece Muş Alparslan Üniversitesi yerleşkelerinden erişime açılabilir.

☐ Tezimin/Raporumun …… yıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir.

11/06/2018

Mehmet SÖNMEZ

Bu çalışma Muş Alparslan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: BAP-17-EMF-4901-08

TEZ KABUL TUTANAĞI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Dr. Öğr. Üyesi Yusuf ALAN danışmanlığında, Mehmet SÖNMEZ tarafından hazırlanan "Anne Sütünde İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA Dizi Analizi ile Tanımlanması, Antibiyotik Dirençlilik ve Antibakteriyal Aktivitelerinin Belirlenmesi" konulu bu çalışma 10/05/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Erdal ÖĞÜN İmza :

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Zeynal TOPALCENGİZ İmza :

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Yusuf ALAN İmza :

Yukarıdaki imzalar adı geçen öğretim üyelerine aittir.

..... /...../2018

Prof. Dr. Murad Aydın ŞANDA

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince büyük emeği geçen, bu süreçte sabrını ve bilgilerini esirgemeyen, tez çalışmalarımda her türlü konuda destek olan, deneyimlerinden çok şey kazandığım değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yusuf ALAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Sevgisini bizden esirgemeyen ve her zaman destekçimiz olan Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ALLAHVERDİ 'ye teşekkür ederim. Ayrıca tez aşamasında her türlü destek ve katkılarını esirgemeyen arkadaşım Kayhan MANĞ ve Nimetullah AKCAN'a teşekkür ederim. Yine, tez çalışmamda değerli katkılarından dolayı Songül KARAHANLI' ya ve desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Mehmet SÖNMEZ

Mayıs, 2018

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ÖZET iv
ABSTRACT v
ÇİZELGE LİSTESİ vi
ŞEKİLLER LİSTESİ vii
KISALTMA ve SİMGELER LİSTESİ viii
1. GİRİŞ 1
1.1. Laktik Asit Bakterileri 3
1.2. Anne Sütünde Bulunan Laktik Asit Bakteri ve Önemi 4
1.3. Anne Sütünde Bulunan Bazı Önemli Cinsler 6
1.3.1. *Lactobacillus* 6
1.3.2. *Pediococcus* 7
1.3.3. *Enterococcus* 7
1.3.4. *Bifidobacterium* 8
1.3.5. *Streptococcus* 8
1.3.6. *Staphylococcus* 9
1.4. Anne Sütünde Bulunan Laktik Asit Bakterilerinin Sağlık Açısından Yararları 9
1.5. Laktik Asit Bakterilerinin Plazmit Özellikleri 11
1.6. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Özellikleri 12
1.7. Laktik Asit Bakterilerinin Diğer Bakteriler Üzerindeki Etkileri 14
2. MATERYAL ve METOT 17
2.1. Kullanılan Cihazlar 17
2.2. Kimyasallar 17
2.3. Anne Sütü Örnekleri 17
2.4. Besiyeri ve Hazırlanması 18
2.5. Çözeltiler ve Hazırlanması 19
2.6. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu 20
2.7. Laktik Asit Bakterilerinin Ön Tanımlanması 20
2.7.1. Gram boyama 21
2.7.2. Katalaz testi 21
2.8. Moleküler Biyoloji Metotları 21
2.8.1. Oligonükleotit primerler 21
2.8.2. Kromozomal DNA izolasyonu 22
2.8.3. 16S rRNA PCR ve DNA dizi analizi 22
2.8.4. Plazmit DNA izolasyonu 22

2.8.4.1. Hazır kit kullanılarak yapılan plazmit DNA izolasyonu 22
2.8.4.2. Geleneksel plazmit DNA izolasyonu 23
2.8.5. DNA'nın jel elektroforezi 24
2.9. İzolatların Stoklanması 24
2.10. İzolatların Antibiyotiklere Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi 24
2.10.1. Disk difüzyon metodu 25
2.11. İzolatlarının Diğer Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkilerileri 25
3. BULGULAR ve TARTIŞMA 27
3.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması 27
3.1.1. İzolatların morfolojik ve biyokimyasal olarak tanımlanması 27
3.1.2. İzolatların 16S rRNA gen bölgesi PCR sonuçları 30
3.1.3. İzolatların 16S rRNA PCR ürünlerinin DNA dizi analiz sonuçları 32
3.2. Laktik Asit Bakterileri İzolatlarından Plazmit İzolasyonu 33
3.3. İzolatların Antibiyotik Direnç Özellikleri 35
3.4. İzolatların Diğer Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkileri 40
4. SONUÇ ve ÖNERİLER 41
5. KAYNAKLAR 43
ÖZGEÇMİŞ 53

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ANNE SÜTÜNDE İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN 16S rRNA DİZİ ANALİZİ İLE TANIMLANMASI, ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK VE ANTİBAKTERİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Mehmet SÖNMEZ

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Yusuf ALAN

2018, Sayfa 61

Bu çalışmada Sağlık Bilimleri Üniversitesi Van Eğitim ve Araştırma Hastanesi Süt Çocuğu Servisinden toplanan 30 anne sütü örneğinden toplamda 48 şüpheli laktik asit bakterilerisi izole edilmiştir. Belirlenen şüpheli izolatların 16S rRNA PCR analizi sonucunda 24 izolatın 1465 bç bölgesinde bant verdiği gözlemlenmiştir. Bu izolatların evrensel 16S rRNA primeri ile hazırlanan PCR ürünlerinin sekans analizi yapılarak elde edilen sonuçlar BLAST' landığında izolatların beş'i *Lactobacillus*, beş'i *Pediococcus* ve bir'i ise *Enterococcus* cinsine yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Laktik asit bakteri suşlarından izole edilen plazmit sayıları bir ile beş arasında değişmektedir. Plazmitler büyüklükleri yönünden değerlendirildiğinde, en büyük plazmitin yaklaşık 10000 bç'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Antibiyotiklere karşı dirençliliğin belirlenmesi için yapılan çalışmada LAB suşları en yüksek duyarlılığı kloramfenikol'e karşı (% 100) gösterirken, en düşük duyarlılık ise Rifampisin'e (% 36.4) karşı gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatlar en yüksek orta dereceli duyarlılığı Rifampisin'e (% 54.6) karşı gösterirken, en düşük orta dereceli duyarlılığı ise penisilin G' ye (% 18.2) gösterdiği belirlenmiştir. Suşlar en yüksek direnci vankomisin, gentamisin, nalidiksik asit ve polimiksin antibiyotiklerine karşı (%100) gösterirken, en düşük direnci ise Rifampisin'e (% 9.0) karşı gösterdiği tespit edilmiştir. Penisilin'e karşı dokuz izolat direçli iken geriye kalan iki izolat (6 ve 7) ise orta dereceli duyarlılık göstermiştir. İzole edilen 11 adet laktik asit bakterisinin diğer bakteriler üzerindeki etkileri incelendiğinde test bakterileri üzerinde hiç bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik Dirençlilik, Antibakteriyel Etki, Laktik Asit Bakterileri, Moleküler Tanımlama ve Plazmit.

ABSTRACT

Master's Thesis

THE IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED IN MOTHER'S MILK WITH 16S rRNA SEQUENCE ANALYSIS AND DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES

Mehmet SÖNMEZ

Supervisor: Lecturer Dr. Yusuf ALAN

2018, Page: 61

In this study, a total of 48 suspected lactic acid bacteria were isolated from the sample of 30 mother's milk from University of Health Sciences Van Education and Research Hospital Dairy Child Service. The 16S rRNA PCR analysis of the suspected isolates revealed that 14 isolates gave a band at 1465 bp. Sequence analysis of PCR products prepared with universal 16S rRNA primer of these isolates revealed that the isolates showed high similarity to following species *Lactobacillus* (5), *Pediococcus* (5) and *Enterococcus* (1) when they were BLAST. Plasmid counts isolated from lactic acid bacteria strains range from 1 to 5. When the plasmids were evaluated for their size, it was determined that the largest plasmid was above about 10,000 bp. LAB strains showed the highest sensitivity to chloramphenicol (100%) and the lowest sensitivity to rifampisin (36.4%) in the study to determine resistance to antibiotics. The isolates showed the highest moderate sensitivity to rifampisin (54.6%) while the lowest moderate sensitivity to penicillin G (18.2%). The strains showed the highest resistance to vancomycin, gentamicin, nalidixic acid and polymyxin antibiotics (100%) while the lowest resistance to rifampisin (9.0%). While 9 isolates were resistant against penicillin, the remaining 2 isolates (6 and 7) showed moderate susceptibility. When the antimicrobial effects of 11 isolated lactic acid bacteria on other bacteria were examined, it was observed that they had no effect on test bacteria.

Keywords: Antibiotic Resistance, Antibacterial Effect, Lactic Acid Bacteria, Molecular Description and Plasmid.

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1. Laktik asit bakteri kültürleri için kullanılan M17 ve MRS besi ortamlarının kompozisyonu 18

Çizelge 2.2. Laktik asit bakteri kültürleri için kullanılan Nutrient Agar besiyerlerinin kompozisyonu 19

Çizelge 2.3. Laktik asit bakterilerinin evrensel 16S rRNA genlerinin tanımlanması için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri 21

Çizelge 2.4. Antibiyotikler ve konsantrasyonları 25

Çizelge 3.1. Laktik asit bakterilerinin morfolojik ve biyokimyasal sonuçları 29

Çizelge 3.2. Anne sütünden izole edilen LAB suşlarının sekans analiz sonuçları 33

Çizelge 3.3. Anne sütlerinden izole edilen LAB suşlarının plazmit içerikleri 34

Çizelge 3.4. Anne sütünden izole edilen LAB suşların antibiyotik dirençlilikleri 36

Çizelge 3.5. Standart antibiyotiklerin karşılaştırma değerleri 37

Çizelge 3.6. Anne sütünden izole edilen LAB suşlarının direnç-duyarlılık durumlarının standart antibiyotiklerle karşılaştırması 38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Anne sütünden izole edilen LAB'ların MRS ve M17 besi ortamında aktifleştirilmesi 20

Şekil 3.1 MRS agar ve M17 agar petrilerine aşılanan LAB'a ait koloni görüntüsü 28

Şekil 3.2. Anne sütünden izole edilen laktik asit bakterilerinin gram boyama görüntüsü 28

Şekil 3.3. Anne sütünden izole edilen laktik asit bakterilerinin 16S rRNA PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü 31

Şekil 3.4. Anne sütünden izole edilen laktik asit bakterilerinin 16S rRNA PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. 31

Şekil 3.5. Anne sütünden izole edilen 1 nolu izolatın 16S rRNA genine ait dizi analizi sonuçları 32

Şekil 3.6. Anne sütünden izole edilen LAB suşlarının plazmit DNA izolasyonu sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü 34

Şekil 3.7. İzolatların antibiyotik direnç özelliklerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi sonucu elde edilen zon görüntüleri. 36

KISALTMA ve SİMGELER LİSTESİ

A	:	Adenin
AFLP	:	Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi
Bç	:	Baz çifti
°C	:	Santigrad derece
cm	:	Santimetre
C	:	Sitozin
CO_2	:	Karbondioksit
dH_2O	:	Distile su
dk.	:	Dakika
DNA	:	Deoksiribonükleikasit
g	:	Gram
H_2O_2	:	Hidrojen peroksit
Kb	:	Kilobaz
LAB	:	Laktik asit bakterileri
M	:	Markör
µl	:	Mikrolitre
ml	:	Mililitre
PFGE	:	Pulsed Field Gel Electrophoresis
R	:	Dirençli
RPM	:	Dakikadadevir
sp.	:	Tür
ssp.	:	Alt tür

1. GİRİŞ

Anne sütü, tüm beslenme ihtiyaçlarını karşılaması nedeniyle yeni doğan bebekler için en iyi gıda olarak bilinmektedir (Prentice, 1996). Anne sütü yenidoğan bebeklerin sağlıklı büyüme ve gelişmesi için en iyi beslenme seçeneğidir. Karbonhidrat, nükleotidler, yağ asitleri, immünglobulinler, sitokinler, lizozim, laktoferrin, poliaminler, canlı immün hücreler ve diğer immün düzenleyici maddeleri içermesinin yanı sıra bebek bağırsağı için sürekli bir bakteri kaynağıdır (Marques vd., 2010; Fernandez vd., 2013). Sağlıklı bir annenin sütü birçok farklı bakteri grubundan yaklaşık 10^9/L bakteri içermektedir (Fernandez vd., 2009; Morelli vd., 2008).

Anne sütü yenidoğan bebek için en uygun olan ve pek çok farklı bileşiği bir arada bulunduran biyolojik olarak kompleks bir sıvıdır. Anne sütü; mikroorganizmalar, bağışıklık sağlayan ajanlar, besin maddeleri, iltihabı engelleyen bileşenler, hormonlar, büyüme faktörleri, enzimler gibi bileşenleri içermektedir (Darragh, 2002). Süt kompleks proteinler, karbohidratlar, lipitler ve polinükleotitlerden oluşan ve sayısız koruma faktörleri içeren bir karışım şeklinde tanımlanmıştır (German, 2002). Anne, bebeğine dengeli bir beslenme ve hem doğuştan hem de kazanılmış bağışıklık ürünlerini en uygun düzeyde ancak emzirme yoluyla bebeğine sağlayabilir; emzirme sonucunda bebeğini çevreden kaynaklanabilen bakteri ve virüs enfeksiyonlarına karşı korur ve gelecekteki en sağlıklı Öğrenebilme ve olgunlaşma sürecini başlatır. Anne sütü biyoaktif faktörler içeren ve yapay besinlerle eşleşmeyen, özel bir biyolojik sıvıdır. İçerisinde gerekli bütün besinleri ideal dengesinde bulundurduğundan hızlı büyüme dönemindeki bebekler için en iyi besin kaynağıdır (Wright ve Fenny, 1998; Martin vd., 2004).

Anne sütü tüm bebekler, prematüreler ve hasta yeni doğanlar 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 (Fukushima vd., 1998; Musumeci vd., 2006).

Anne sütü, aynı zamanda, insan bağırsağında bulunan, bağışıklık sistemi için çok önemli ve bifidojenik faktörler olarak bilinen sınırlı sayıdaki bazı potansiyel probiyotikler ve bunların gelişimini sağlayan prebiyotikleri içermektedir. Probiyotikler konağın mikroflorasını değiştirerek, sağlığına yararlı etkiler oluşturan yeterli sayıda mikroorganizma topluluğudur. Anne sütü, probiyotikler ve besin kaynaklarını oluşturan oligo ve polisakkaritler olarak tanımlanmış prebiyotiklerce son derece zengin besinlerin başında geldiğinden içerik olarak eşsizdir. Modern bebek mamaları, anne sütü içeriği temel alınarak formüle edilseler bile, doğal biyolojik salgı olan anne sütünün yerini tutamamaktadır Anne sütünde bulunan bakterilerin kaynağı henüz tartışılmakla birlikte, özellikle bazı türlerin anne bağırsağından endojen yollardan meme bezlerine geçtiği öne sürülmektedir. Böyle bir hipotez, henüz bir tartışma konusu olsa da, bu ilginç alanda yapılacak araştırmaları cesaretlendirmelidir. Çünkü bu doğrulandığı takdirde, anne bağırsak mikroflorasının modüle edilebilmesi gibi bakteriyoterapi ve probiyotiklerin çok amaçlı kullanımı konusunda yeni ufuklar açılabilir. Bakteriyoterapi komensal veya yararlı bakterilerin, konağın patojenler tarafından kolonizasyonunu önlemek için kullanılmasına dayanan bir uygulamadır (Reid vd., 2001). Bu bağlamda, sağlıklı anne sütü, enfeksiyon hastalıklarına karşı hem anneyi hem de bebeği korumadaki rolü ile, biyoterapötik LAB veya potansiyel probiyotiklerin önemli bir kaynağı olabilir (Martin vd., 2004).

Komensal stafilokoklar ve streptokoklar anne sütündeki baskın bakteri türleri arasındadır (Heikkila ve Saris, 2003; Martin vd., 2004). Koagülaz- negatif stafilokoklar ile *S. epidermidis* gibi baskın türlerin, emzirme sürecinde anne sütünden köken aldıkları düşünülmektedir (Martin vd., 2004). Buna karşın viridans streptokokları (*S. salivarius* gibi), deri konukları olarak, nadiren bulunur. Bebeğin ağız boşluğunun ve sindirimle ilgili bölgelerin yukarı kısmının, başlangıçta annenin vajinal ve fekal mikroflorası tarafından, doğum sırasında kolonize olduğu savunulmaktadır (Mackie vd., 1999). Bu nedenle, streptokokların bebek ağzından memeye ve buradan da süte geçtikleri sanılmaktadır (Heikkila ve Saris, 2003). Bununla birlikte meme bezleri tarafından üretilen süt, doğumdan önceki haftalar boyunca (ve ayrıca bebek ile temas olmaksızın) sağlanan süt ve doğumdan sonra sağlanmış taze süt benzer bakteriyel türler içerir. Buna ek olarak, benzer sonuçlar sezaryenle doğum yapmış annelerin sütlerinde de saptanmıştır. Bu gibi gözlemler en azından anne sütünde bulunan bazı bakterilerin asıl

kaynağının belirlenmesinde yeni zorluklar çıkarmıştır. Bu biyolojik maddede yaygın olarak bulunan LAB türlerinin özellikle bazılarının kökeni henüz bilinmemektedir.

Anne sütünün kommensal, mutualistik ve potansiyel olarak probiyotik özellik gösteren bakterilerin kaynağı olduğu gösterilmiştir. Anne sütüyle beslenen bir bebek sürekli olarak canlı bakteri almaktadır. Bu nedenle, anne sütüyle beslenen bebeklerin bağırsak mikrobiyotası kendi annelerinin süt florasını yansıtmakta, erişkinlere benzer çok çeşitli mikrobiyota sütten kesilme döneminde oluşmaya başlamaktadır (Favier vd., 2002). Anne sütünden izole edilen çok çeşitli bakterilerin içinde potansiyel probiyotik özelliği olan *Enterococcus faecium, Lactobacil gasseri, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus plantarum* gibi bakterilerin yanında bazı *Bifidobacterium* türleri de (*Bifidobacterium breve, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium bifidum vb*) bulunmaktadır (Martin vd., 2008; Martin vd., 2007).

1.1. Laktik Asit Bakterileri

"Laktik asit bakterileri (LAB)" terimi ilk defa sütteki laktozu fermente ederek laktikasit oluşturan ve buna bağlı olarak da sütü ekşitip koagüle eden bakteri grubunu isimlendirmek amacıyla kullanılan bir terim olarak ortaya çıkmıştır (Khalid, 2011).

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 (Turantaş, 1999).

LAB'ların çoğunluğu biyosentez yapamadığından heterotrofik organizmalardır. Bu sebeble çoğu türler, gelişme faktörü olarak çeşitli aminoasitler, nükleotidler,

peptitler, vitaminler, yağ asitleri, mineralleri ve karbonhidratlara gerek duymaktadır (Reddy vd., 2008).

LAB türleri gıda fermentasyonunda starter kültür olarak rol alması ya da ham materyalde doğal olarak bulunmasıyla koruyucu bir etki göstermektedir. LAB insan ve hayvanların sindirim sisteminde bifidobakterilerle bulunmakta ve probiyotik özelliği ortaya çıkarmakta, canlının sağlığını korumada birlikte etki göstermektedir (Ammor vd., 2008).

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 (Tannock vd., 1999).

1.2. Anne Sütünde Bulunan Laktik Asit Bakteri ve Önemi

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 vd., 1999).

Anne sütünün doğal mikroflorasında bulunan ve genellikle izole edilen bakteriler stafilokoklar, streptokoklar, mikrokoklar, laktobasiller ve enterokoklardır (Heikkila ve Saris, 2003; Martin vd., 2004). Sağlıklı annelerin sütünden izole edilen LAB türleri bakteriyoterapötik ya da probiyotik ajan olarak kullanılabilecek suşları içermektedir. Bu LAB türlerinin genellikle *L. gasseri, L. rhamnosus, L. acidophilus, L.*

plantarum, L. fermentum, E. faecium ve *E. faecalis* olduğu belirtilmektedir. Bu bakterilerden *L. gasseri, L. rhamnosus* ve *E. faecium* potansiyel probiyotik bakteriler arasında değerlendirilmekte ve bunlardan bazıları ticari probiyotik ürünlerde kullanılmaktadır (Martin vd., 2004).

Doğumu izleyen birçok hafta boyunca, insan sütü, bebek bağırsak mikroflorasının sürekli bir mikroorganizma kaynağıdır ve bu nedenle yenidoğan bağırsak mikroflorasının başlaması ve gelişiminde önemli bir faktördür. Örneğin; günde 800 ml süt tüketen bir bebek yaklaşık 10^5–10^7 adet bakteriyi de birlikte almaktadır. Daha ileri bir söylemle, bebek fekal florası anne sütü bakteri kompozisyonunun biryansımasıdır (Heikkila ve Saris, 2003; Martin vd., 2004). Yukarıdaki türlere ait bakteriler, birbirinden çok uzak ülkelerde sağlıklı annelerin taze sütlerinden kolayca izole edilebilmektedir (Martin vd., 2004). Bu da bu bakterilerin anne sütündeki varlığının yaygınlığına işaret eder. Böylelikle, anne sütünün doğal mikroflorasının bileşenleri olarak görülebilirler.

Doğumu izleyen ilk aylar boyunca, özel olarak anne sütüyle beslenme, çocukluk çağında rastlanan atopik dermatit ve astım gibi hastalıkların sıklığını azaltmaktadır (Martin vd., 2004). Laktobasiller değişik mekanizmalarla atopik hastalıklar ve atopiyi önlemekte etkili olabilir. Vurgulanması gereken ilginç bir nokta; sütte çok yaygın olan mikroorganizmalar, sağlıklı bebek bağırsağının, atopik bebek bağırsağından farklı olmasını sağlayan en önemli etkendir (Kirjavainen vd., 2001). Laktik asit bakteriler (LAB) dışında kalan bazı diğer bakteri türlerinin de bebekleri hastane ortamında bulunan bazı patojen bakterilere karşı koruduğu saptanmıştır (Tannock, 1997). Örneğin metisiline dirençli *S. aureus*'un bebeklerde oral kolonizasyonu, *S. viridans* tarafından engellenebilmektedir (Martin vd., 2004). Burada ilginç olan bir nokta da *Streptococcus viridans*'ın sağlıklı bebek bağırsağı mikrobiyotasında bulunmasıdır (Kirjavainen vd., 2001). Gelişimin erken döneminde yararlı bakteri alımı, bağırsak kolonizasyonunun kritik periyodu ile çakıştığı için, bağırsak kolonizasyonun oluşması ve devam etmesi açısından önemlidir.

1.3. Anne Sütünde Bulunan Bazı Önemli Cinsler

1.3.1. *Lactobacillus*

Laktobasiller Gram (+), spor oluşturmayan, DNA'larında genellikle %50'den daha az guanin+sitozin (G+C) içeren basil ya da kokobasillerdir. Oksijene toleranslı ya da anaerobik, asidürik ya da asidofilik ve karmaşık besin gereksinimleri olan (karbohidratlar, aminoasitler, peptitler, yağ asidi esterleri, tuzlar, nükleik asit türevleri ve vitaminler gibi) bakterilerdir. Bazı laktobasil türlerine ait suşlar çevreden aldıkları porfirinleri kullanabilir, katalaz aktivitesi ve nitrit redüksiyonu gösterebilirler. Glikozu karbon kaynağı olarak kullanan laktobasiller ya homofermantatif (%85'ten fazla laktik asit üretirler) ya da heterofermantatiftirler (eşit oranlarda laktik asit, karbondioksit ve etanol ve/veya asetik asit üretirler). Çok sayıda bileşiği (sitrat, malat, tartarat, nitrat, nitrit vb.) metabolize edilebilir ve enerji kaynağı ya da elektron akseptörü olarak kullanılabilirler (Hammes ve Vogel, 1995).

Lactobacillus cinsi ise homofermantatif (*Thermobacterium*), fakültatif heterofermantatif (*Streptobacterium*) ve heterofermantatif (*Betabacterium*) olarak üç gruba ayrılmışlardır (Temiz, 1989). Bu sınıflandırma günümüzde birçok değişikliğe uğramış olmasına rağmen temel olarak geçerliliğini korumaktadır.

Laktobasiller doğada karbohidrat içeren substratların zengin olduğu ortamlarda bulunurlar. Bundan dolayı da insan ya da hayvanların mukozal membranları (meme bezleri, ağız içerisindeki yarık ve boşluklar, kalın bağırsak ve vajina), bitkilerin ya da bitkisel materyallerin dış kısmı, gübreler ve fermente gıdalar gibi değişik çevrelerde bulunabilmektedirler (Hammes ve Vogel, 1995).

Lactobacillus türleri bir karbohidrat kaynağı varlığında asidik bir ortam oluştururlar (pH 4.0). Bu nedenle ortamda bulunan diğer bakteriler bu pH değerin de ölmekte ya da çoğalmaları durmaktadır (Stiles ve Holzapfel, 1997).

Sütte bulunan *L. gasserii*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*' un da aralarında bulunduğu pek çok türü probiyotik sağaltıcı öneme sahiptir (Gorbach, 2002).

1.3.2. *Pediococcus*

Gram-pozitif, katalaz-negatif, hareketsiz bakterilerdir. İki boyutlu olarak bölündükleri için çift halde veya tetrat formunda bulunurlar. *Pediococcus* cinsi bakterilerde zincir formlarına rastlanmaz. Bu morfolojik yapı pediyokokların zincir oluşturan koklardan ayrımını sağlayan bir özelliktir. Bu gruptaki türler fakültatif aerobik mikroaerofilik koşullarda gelişebilmektedir. Ayrıca bu bakteriler homofermantatif bakterilerdendir. Laktik asit üretirken CO_2 üretememektedirler. Ayrıca nitratı indirgeyememektedir. Hücreleri küresel veya nadiren ovaldir. Çap uzunlukları 0.6 -1.0 µm. değerleri arasında değişmektedir. Hareketsiz olan bu türler spor oluşturmamaktadır. Aynı zamanda genel olarak yüksek tuz konsantrasyonlarını tolere edebilme özelliğine sahiptirler. Gelişebildikleri pH değerleri de 9.0 kadar yüksektir ve pH 5.0'te gelişememektedir (Sun vd., 2014).

Pediokoklar bitki, meyve ve fermente gıdaları içeren farklı ortamlarda gelişim gösterebilmektedirler. Buna karşılık laktozu kullanımları zayıf ve gereksinimleri olan gelişme faktörlerinin bulunmaması nedeniyle sütte iyi gelişemezler. Bu bakteriye ait türler endüstriyel olarak gıda fermantasyonunda, gıdaların muhafazasında ve biyoteknolojik proseslerde kullanılmaktadırlar (Ayhan, 2000).

1.3.3. *Enterococcus*

Enterococcus cinsi oval şekilli, tek ya da kısa zincirler halinde bulunur. Gram (+), hareketli, katalaz-negatif ve fakültatif anaerobdurlar. Homofermentatiftirler ve karmaşık besin gereksinimleri vardır. Genellikle 10 °C ve 45 °C'de pH 9.6 ve % 6.5 NaCl konsantrasyonunda büyürler (Devriese ve Pot, 1995).

Genellikle omurgalıların fekal örneklerinde bulunur. En tipik türleri anne sütünde de mevcut ve ticari olarak probiyotik değere sahip olan *E. faecium* ve *E. faecalis*'tir. Birkaç suşu fermente ürünlerde başlatıcı (starter) veya probiyotik olarak kullanılır. Serolojik olarak D grubunda yer alırlar. Tür isimleri bu bakterilerin bağırsak kökenli olduğunu ifade etmektedir. İlk kez insan bağırsağından izole edilmişlerdir. İnsanların ve monogastrik hayvanların bağırsakları, yeşil bitkiler, süt ve toprak dahil değişik ortamlarda yaşarlar. Bu grubun başlıca üyeleri şunlardır: *E. faecalis (eski adı Streptococcus faecalis), E. faecium (Streptococcus faecium)* ve *E. durans*'dır.

Enterokoklar, fırsatçı çok iyi patojen olarak bilinmekte ve özellikle de hastane enfeksiyonlarında önemli rol oynamaktadır. Bu bakteriler, hastane enfeksiyonlarından olan, bakteriema, üriner sistem enfeksiyonu ve endokarditis olarak bilinen enfeksiyonlardan sorumludurlar. Bununla birlikte enterokoklar, bazı geleneksel fermente gıdalarda baskın mikroflora olarak rol oynarlar. Laktik asit bakterilerinden olan enterokoklar fermente gıdaların tat, sertlik ve yumuşaklık gibi özelliklerinde etkili olurlar (Lukasova vd., 2003). İnsan ve hayvanların doğal mikroflorasının önemli bir bölümünü oluşturan enrekokların temel habitatları gastrointestinal sistemdir. Enterokokların pastörizasyon sıcaklıklarına dirençli olmalarının yanı sıra, farklı substrat ile düşük ve yüksek sıcaklık, ekstrem pH ve tuz konsantrasyonları gibi gelişme koşullarına adapte olma yetenekleri sayesinde, süt ve et gibi çiğ materyallerden üretilen gıda ürünleri ile ısıl işlem uygulanan gıda ürünlerinden çok sık izole edilirler. Ayrıca enterokoklar, ürün işleme süresince son ürünü kontamine edebildikleri için özellikle peynir ve fermente etlerde gıda florasının önemli bir bölümünü oluştururlar (İşleroğlu vd., 2008).

1.3.4. *Bifidobacterium*

Bifidobakteriler ilk kez 1900'de Tissier tarafından anne sütüyle beslenen yenidoğanlardan alınan fekal örneklerde saptanmıştır. Çomak şekilli, Gram (+), gaz üretmeyen ve anaerob özellikli bu türe ilk olarak *Bacillus bifidus* adı verilmiştir (Sgorbati vd., 1995). Bifidobakteriler 20 – 46 °C arasında ve pH 6.5–7'de büyürler. Bu organizmalar anne sütü, insan ve diğer hayvanların fekal örnekleri, arılar, insan vajina ve diş çürükleri gibi farklı kaynaklardan izole edilmiştir (Arunachalam, 1999). Özellikle anne sütünde bulunan türlerinin bebek bağırsak mikroflorasının kurulması ve dengesinin korunmasında faydalı etkilere sahip olduğu bilinmektedir.

1.3.5. *Streptococcus*

Streptococcus üyeleri Gram (+), zincir veya çiftler halinde dizilmiş küresel veya yumurta şekilli koklardır (Hardie ve Whiley, 1995). Bazı *Streptococcus* türleri kapsüllüdür (Hardie ve Whiley, 1995; Stiles ve Holzapfel, 1997). Fakültatif anaerob, spor oluşturmayan, katalaz-negatif, homofermantatiftirler ve karmaşık besin gereksinimleri vardır (Hardie ve Whiley, 1995). Bilinen birçok türü insan ve diğer hayvanlarda parazittir ve bazıları önemli patojenlerdir.

Streptococcus thermophilus besin fermantasyonunda tek önemli türdür. Yoğurt ve peynir üretiminde starter kültür olarak önemli rol oynamaktadır (Stiles ve Holzapfel, 1997). Anne sütünde bulunan *Streptococcus salivarius* sağlıklı insanda ağız boşluğunda bulunan önemli bir komensal bakteridir.

1.3.6. *Staphylococcus*

Staphylococcus üyeleri Gram (+), fakültatif anaerob ve katalaz pozitiftir. Safra tuzları varlığında çoğalabilirler. İnsan, hayvan ve çevresel örneklerden sık sık izole edilebilirler. İnsan ve diğer organizmaların deri ve mukoz mebranlarında yerleşik olarak bulunurlar. *Staphylococcus* üyelerinin büyük bir kısmı koagulaz negatiftir. Koagulaz negatif türlerinin patojen oldukları saptanmıştır ve hastane enfeksiyonlarının nedenlerinden birisi olarak vurgulanmıştır (Hébert, 1990). Anne sütünde bulunan S. *aureus*' a bağlı mastisit (meme ucu iltihabı) vakaları çok fazladır (Heikila ve Saris, 2003). Anne sütü mikroflorasının bir üyesi olmasına karşın ortamda gereğinden fazla çoğaldığında meme ucu iltihabı ve buna bağlı bebek enfeksiyonlarına yol açmaktadır. Bu da diğer anne sütü bakterileri tarafından inhibe edilmektedir.

1.4. Anne Sütünde Bulunan Laktik Asit Bakterilerinin Sağlık Açısından Yararları

Sağlıklı annelerin sütünde bulunan kommensal ya da potansiyel probiyotik bakteriler hakkındaki bilgiler çok sınırlıdır. Bununla birlikte anne sütünden genellikle stafilokoklar, streptokoklar, laktobasiller ve enterokoklar gibi belirli bazı Gram-pozitif bakteriler izole edilmektedir. Bu bakteriler anne sütünün doğal mikroflorasında bulunmakta ve çeşitli ülkelerde sağlıklı annelerin sütlerinden kolaylıkla izole edilmektedir (Mackie vd., 1999). Bu nitelikteki bakteriler sayesinde bu bakterileri içeren anne sütü ile beslenen bebeklerin bağırsağındaki enfeksiyöz hastalıklara karşı artan oranda direnç kazanılabileceği düşünülmektedir (Wright vd., 1998).

Anne sütü bebeklerin hastalıklara karşı korunmasında önemli rol oynamaktadır. Anne sütündeki bu koruyucu etkinin yapısındaki immunoglobulinler, immunokomponent hücreler veya bazı antimikrobiyal bileşikler gibi bazı bileşenlerin tümleşik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bileşimindeki prebiyotik maddeler ise yeni doğmuş bağırsak florasının oluşumunu desteklemektedir. Anne sütündeki mikroorganizmaların yeni doğan bebeklerin bağırsak florasının oluşumunda ve gelişiminde önemli bir faktör olarak rol aldığı belirtilmiştir (Martin vd., 2004).

Laktik asit bakterileri (LAB) güvenli kabul edilebilir listesinde yer almakta ve ürettikleri organik asitler, hidrojen peroksit ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler ile gıdalarda patojen ve bozulma yapıcı mikroorganizmaların inhibisyonunda önemli bir rol oynamaktadırlar (O'Sullivan vd., 2002; Parada vd., 2007). LAB grubunda yer alan bazı probiyotik suşların (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Pediococcus acidilactici*) *Listeria monocytogenes*, enterohemorajik *Escherichia coli*, *Salmonella* typhimurium, *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri* ve *Yersinia enterocolitica* gibi patojen bakterilerin üremesini önlediği bilinmektedir (Karaoğlu vd., 2003; Klingberg vd., 2005; Aslim ve Kilic, 2006). Probiyotik LAB türleri ayrıca serum kolesterol seviyesinin düşürülmesi, laktoz sindirimindeki bozuklukların düzeltilmesi, immün sistemin güçlendirilmesi, kanser oluşumunda rol alan fekal enzimlerin azaltılması, ishal tedavisi, rotavirus ve kolite neden olan *Clostridium difficile*'nin kontrolü ve *Helicobacter pylori* kaynaklı ülserin önlenmesinde de etkin roller üstlenebilmektedirler (Franz vd., 1999; Saavedra, 2001).

Probiyotikler, vücuda canlı olarak yeterli miktarda alındıklarında bağırsaklardaki mikrobiyel florayı dengeleyerek insan ve hayvan sağlığına olumlu yönde etki edebilen mikroorganizmalardır. Probiyotikler, antimikrobiyal etki ve antagonistik aktivite göstererek gastrointestinal enfeksiyonların kontrol edilmesine yardımcı olmakta, antibiyotik kaynaklı ishalleri engellemekte, β-galaktosidaz gibi önemli sindirim enzimlerinin üretimi ile birlikte laktoz kullanımını iyileştirmekte ve serum kolesterol düzeyinin ve kan basıncının azaltılmasına yardımcı olmaktadır. Bunların yanı sıra, probiyotiklerin antimutajenik ve antikanserojenik aktivite gösterebilmeleri, bağışıklık sistemini düzenleyici özellikleri ve anti-alerji fonksiyonları da diğer terapötik faydaları arasında yer almaktadır. Metal detoksifikasyonu sağlamaları, kalsiyum, çinko, demir, manganez, bakır ve fosfor gibi mineral ve iz elementlerin biyo yararlanımını arttırmaları, proteinlerin sindirimini kolaylaştırmaları ve vitamin sentezi gerçekleştirmeleri de sağlık üzerinde gösterdikleri olumlu etkiler arasında değerlendirilmektedir (Franz vd., 1999; Saavedra, 2001; Ahmed, 2003).

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 vd., 1998; Salminen, 1999; Klaenhammer, 2000).

İnsan sağlığı açısından gıdalarla birlikte alınması gereken probiyotik hücre sayısı 108 hücre/gün'dür. Bu probiyotiklerin sindirim sisteminden tüm vücuda dağılması söz konusudur. Düşük pH ve yüksek tuza olan toleranslarından dolayı önemli seçici kriterlere sahiptirler. Probiyotik kültürler, bağırsaktaki epitel hücrelere yerleşir, zararlı bakterilerle savaşarak immün sistemi desteklerler (Klinberg vd., 2005). Fermentasyon sonucunda oluşan laktik asit, midenin asit seviyesini dengelemesinin dışında, protein ve demirin özümlenmesinde etkili rol oynamaktadır. Kanser tedavisine yardımcı olması nedeniyle düzenli bir şekilde fermente ürünlerin tüketimi bazı araştırmacılar tarafından tavsiye edilir (Schoneck ve Kaufmann, 1998; Fallon ve Enig, 1999).

1.5. Laktik Asit Bakterilerinin Plazmit Özellikleri

Plazmit tabiri, ilk olarak Joshua Lederberg tarafından 1952 yılında kromozom dışı genetik parçalar için kullanılmıştır. Yalnız plazmitleri Chassy ve arkadaşları ilk defa 1976'da gözlemlemiştir. Plazmitler; kromozom DNA'dan bağımsız, sıtoplazma içinde, farklı sayılarda, bakteri kromozomal DNA'sına oranla çok daha küçük boyutta olan halka şekilli çift polinükleotit ipliğinden oluşmuş DNA moleküleridir. Aynı zamanda doğrusal plazmitlere de rastlanmaktadır (Pouwels ve Leer, 1993; Wright vd., 2004; Yüksekdağ ve Beyatlı, 2009).

Çoğu bakterilerde, bazı maya ve mantarlara özgü kromozomlardan ayrı olarak bulunan bir başka kalıtsal yapıya plazmit adı verilmektedir. Plazmitler temelde hücre kromozomlarından ayrılarak oluşan sirküler kalıtsal yapılardır. Hücre bölüneceği zaman genomik DNA gibi plazmitler de replike olur (Dilsiz, 2009).

Bakterilerin ve mayaların fermentasyon özellikleri sadece kromozom üzerindeki genlerden ibaret değildir. Bakteriler, diğer mikroorganizmalardan zamanla genetik materyal olan plazmitleri kazanabilmektedirler. Bu türden plazmitler lezzet sebebi olarak tarif ettiğimiz metabolitleride üretebilecekleri gibi bakterilere olumsuz şartlarda dayanıklılık sağladıkları genleri de bulundurmaktadırlar. Plazmitler aminoasit metabolizması, glikoliz, yağ asidi sentezide gerçekleştirirler. Aynı zamanda plazmitler

kültürlerde bakteriyosin sentezi disakkaritlerin yıkılması, gibi özellikleri kazandırabilmektedir. Plazmitler bulunduğu mikroorganizmayı enfeksiyon bloklama, adsorbsiyon, kesme değişimi ve abortif enfeksiyon gibi işlevlerle fajlardan koruyabilmektedir (Aslım ve Beyatlı, 2004). Plazmitlerde, replikasyonuna izin veren, bağımsız ve yarı-bağımsız olarak adlandırılan replikasyon orijini özel DNA bölgeleri mevcuttur. Hücre ikiye bölüneceği zaman plazmit replikasyonuda, kromozomal DNA replikasyonuyla aynı zamanda gerçekleşmektedir. Ayrıca plazmit kaynaklı replikasyon enzimlerini de içermektedir, bundan dolayı plazmitler de kendi replikasyonlarını yapabildikleri açıklanmıştır. Başka bir kopyası oluşan plazmitler, krozomal DNA'da olduğu gibi iki yavru hücreye aktarılmıştır. Hücrenin büyümesi, gelişmesi ve üremesi için plazmitler yaşamsal öneme sahip moleküllerin kodlandığı kalıtsal yapılar değildir, çünkü plazmiti çıkarılan bakteri mutantlarının hiçbir sıkıntı yaşamadan aynı ortam koşullarında ve besi ortamında çok iyi bir şekilde üredikleri görülmektedir (Tunail, 2009; Yüksekdağ ve Beyatlı, 2009).

Plazmitleri başka bir bakteriye kendini aktarabilmesine görede sınıflandırlandırılır. Tra-genleri konjügatif plazmitleri taşırlar, bunlar bir plazmitin başka bir mikroorganizmaya transferi olan konjügasyonun oluşmasını sağlarlar. Nonkonjügatif plazmitler konjügasyonu başlatıcı etkiye sahip değildir. Sadece konjügatif plazmitlerin desteğiyle, aktarılabilirler. Başka bir deyimle seferber plazmitler denilebilir, bu kalıtsal bilgiyi aktarmak için gereken genlere sahip olduğundan dolayı konjügatif plazmitlerin paraziti gibi görünürler, ancak onların bulunduğu ortamda yüksek frekansta transfer edilirler (Lederbeg, 1952).

Lactobacillus türleri içerisinde plazmitlerin varlığı, bu cinslerin ilk keşfinden beri bildirilmektedir. Laktobasil türlerinin bir kaçında bakteriyosin üretimi, bağışıklık, laktoz metabolizması ve antibiyotik dirençliliği gibi fenotiplerin ekstra kromozomal DNA'ya bağlı olduğu bilinmesine rağmen plazmitlerin varlığı halen tam olarak açıklanmamıştır.

1.6. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Özellikleri

Antibiyotiklerin tıp, veterinerlik, su ürünleri teknolojisi gibi geniş bir kullanım alanına sahip olması, bazı bakterilerinde direnç kazanmasını sağlamıştır. Direnç geninin varlığı antibiyotiğe dirençli bakterilerin gelişmesinde ve seçici antibiyotiklerin kullanılması önemli bir yer tutmaktadır (Mathur ve Singh, 2005). Canlıların doğal

yapısında antibiyotik dirençlilik bulunmakla birlikte sonradan da kazanılmış olabilmektedir. Laktik asit bakterileri bazı antibiyotiklere karşı doğal olarak direnç kazanmıştır. Probiyotik suşların güvenliği ve seçilmesi, sindirim sisteminin sağlığı için antibiyotik direnç geni taşımayan ve patojenik olmayan bakterilerden seçilmelidir. *Lactobacilli, Leuconostoc, Pediococci* ve diğer gram pozitif bakterilerden bazıları doğal olarak fusidik asit, gentamisin, basitrasin, sefoksitin, siproflaksasin, kanamisin, sülfadiazin, metronidazol, nitrofuratoin, norflaksasin, streptomisin, teikoplanin, trimetoprim ve vankomisin gibi antibiyotiklere direnç göstermektedir (Hamilton Miller ve Shah, 1998; Danielsen ve Wind, 2003). Antibiyotik direnç genlerinin transferinde plazmidlerin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Çataloluk ve Göğebakan, 2004). Yapılan çalışmalarda bazı bakterilerde plazmide bağlı antibiyotik direnç özelliğinin ortamdaki plazmidin uzaklaştırılması ile kaybolduğu belirtilmektedir (Morelli vd., 1983). Plazmide bağlı antibiyotik direnci içeren LAB suşlarının insan ve hayvanlarda probiyotik olarak kullanımının güvenli olmadığı belirtilmektedir. Plazmide bağlı antibiyotik direnci, bu özelliğin suşların yapısındaki plazmidler aracılığı ile gıda ortamında bulunabilecek patojen ya da starter bakterilere aktarılma olasılığı nedeniyle önem arz etmektedir (Salminen vd., 1998).

Laktobasiller, hücre duvarı sentezini engelleyen β-laktamlara duyarlıdır, ama sefalosporin ve okzasilinlere karşı çok dirençlidir. Laktobacillus cinslerinin geneli üst düzeyde vankomisine direnç göstermektedir. Laktobasiller aminoglikozidaz türleri streptomisin, neomisin, kanamisin, gentamisine karşı dirençliyken protein sentezini önleyen kloramfenikol, klindamisin, eritromisin ve tetrasiklin gibi antibiyotiklere duyarlıdır. (Mathur ve Singh, 2005).

Bakterilerin antibiyotiklere gösterdiği direnç sorununu çözmek için geliştirilmesinin önemli miktarda ekonomik kaynak gerektirmesi konunun ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Antibiyotiklere özellikle de vankomisine karşı dirençli olmaları, enterokoklardan ileri gelen enfeksiyonların tedavisini güçleştirmektedir. Bu durum, büyük ölçüde, enterokokların diğer bakterilerden direnç genlerini elde etmelerinden ileri gelmektedir. Son yapılan araştırmalara çocukluk çağı infeksiyonlarının etkeni olan *Streptococcus pneumoniae*'nin direnç geliştirmesi büyük sorunlara yol açmaktadır. Aynı zamanda stafilokoklar ve enterokoklar gibi bazı

bakterilerin etkeni olduğu enfeksiyonları bu günün şartlarında hiçbir antibiyotiğin tedavi edememeside potansiyel bir tehlikedir (Favret ve Yousten, 1989).

1.7. Laktik Asit Bakterilerinin Diğer Bakteriler Üzerindeki Etkileri

Son yıllarda klinik öneme sahip patojen bakterilerin, antibiyotiklere karşı yaygın olarak direnç kazanma özelliklerinden dolayı, konakçının mikroflorasında baskın hale geldiği bilinen bir gerçektir. Bu patojenlerin baskın hale gelmesini önleyebilecek ya da bu patojenlerden koruyacak yararlı bakterilerin kullanımı enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik kullanımına karşı alternatif bir yaklaşım oluşturmuştur. Bu yaklaşım, kommensal ya da probiyotik bakterilerin potansiyel patojenlerle başarılı bir şekilde rekabet edebilme özelliğine dayanmaktadır. Sağlıklı annelerin sütleri, anneleri ve/veya bebekleri enfeksiyon hastalıklarına karşı korumada rolü olan potansiyel probiyotik ya da biyoterapotik LAB'nin kaynağı olabilmektedir. Anne sütünden izole edilen bakteriler patojenlere karşı koruma sağlamanın yanı sıra insan probiyotikleri için genel olarak önerilen insan orijinli olma, bebekler tarafından uzun süre güvenle tüketilebilme, süt ve bağırsak mukoza yapısına adaptasyon ve mukozaya tutunabilme gibi özellikleri de taşıdığından dikkatleri üzerlerine çekmiştir (Martin vd., 2004).

Probiyotik olarak kullanılacak bir ürünün güvenilir olması, kullanıldığı insan ve hayvanda yan etkisi olmaması, stabil olması, düşük pH ve safra tuzları gibi olumsuz çevre koşullarından etkilenmeden midede canlı kalabilmesi ve bağırsakta metabolize olması, antimikrobiyal maddeler üreterek patojenik bakterilere antimikrobiyal etki göstermesi, antibiyotiklere dirençli olması istenmektedir. Antibiyotiğe bağlı ortaya çıkan hastalıklarda bağırsak florasını düzeltmek amacı ile kullanılabileceklerinden, bağırsaktaki antibiyotiklerden etkilenmemeli ve gıdalara ilave edildiğinde kaliteyi düşürmemelidirler. Yapılan çalışmalar sağlıklı annelerin sütlerinden izole edilen laktobasillerin probiyotik potansiyellerinin ticari probiyotik ürünlerinde kullanılan suşlarla benzerlik gösterdiklerini ortaya koymaktadır. Anne sütünden izole edilen kommensal bakterilerin, *S. aureus*'un neden olduğu yeni doğan enfeksiyonları ve annedeki meme enfeksiyonlarını önlemede bakteriyoterapötik ajan olarak kullanılma potansiyeli olduğu gösterilmiştir (Heikkila ve Saris, 2003).

Anne sütünde bulunan *Lactobacillus* spp. gibi LAB'nin bulundukları ortamda pH'yı düşürerek patojen bakterilerin üremesine engel olduğu ve bu şekilde enfeksiyonlara karşı savunma geliştirdiğine inanılmaktadır (Lönnerdal, 2000).

Bununla beraber anne sütündeki LAB ürettikleri bakteriyosin gibi antimikrobiyal etkili metabolitler sayesinde patojenleri inhibe ederek yararlı etki de sağlayabilmektedir. Ayrıca enterokoklar, antibiyotiklere karşı kısmen direnç göstermekte ve *E. coli, Salmonella, Shigella* ve *Enterobacter* türlerinin gelişimini in vitro koşullarda önlemektedir. Klinik çalışmalarda, iyileşme periyodunu önemli düzeyde kısalttığı belirlendiği için, diyare tedavisinde antibiyotiklerin yerine kullanılabileceği bildirilmektedir (Olivares vd., 2006).

Anne sütünün pediatrik patojenlere (*S. epidermidis, P. aeruginosa, E. coli, S. typhimurium, V. cholera, S. flexneri*) karşı antimikrobiyal aktivitesinin *in-vitro* olarak araştırıldığı bir çalışmada, test edilen tüm patojen bakterilerin çeşitli oranlarda inhibe olduğu bildirilmiştir. Enterokokların, *Listeria* türlerine karşı sekonder koruyucu madde olarak kullanılabileceği açıklanmaktadır. Özellikle, yumuşak tipteki bazı peynirlerde, pH değerinin kabuk kısmında belirli bir düzeye kadar artışı ile *Li. monocytogenes*'in gelişiminin belirli ölçüde kontrol altına alınabildiği bu konuda yürütülen çalışmalarda ortaya konulmuştur. İnhibisyonların, sütte bulunan imminoglobluinler, lökositler, laktoperoksidaz, lisozim ve laktoferrinin yanı sıra ortamdaki LAB'nin metabolitlerinden kaynaklanabileceğine de dikkat çekilmistir (Esperanza ve Ricarchito, 1989).

Pediyokoklar tarafından üretilen bakteriyosinlerin etki spektrumu geniş olup bu bakteriler ikincil metabolitleri de üretmektedirler. Pediyokoklar pediyosin olarak isimlendirilen protein tabiatındaki bakteriyosinler sentezleyerek, zararlı birçok bakteriye karşı antimikrobiyal etki göstermektedir (Ahmad vd., 2017).

Bakteriler içerisinde en başta *Lactobacillus* olmak üzere *Leuconostoc, Lactococcus, Escherichia, Bacillus, Pediococcus* ve *Staphylococcus* cinslerinin pek çok türü bakteriyosin üretmektedir. Bakteriyosinleri üreten bakteri suşlarına akraba türler de dahil olmak üzere birçok gıda patojeni ve bozulma nedeni olan bakteri türü üzerinde olumsuz etkileri olmasına rağmen bu maddelerin üretici bakteriye karşı hasar veya öldürücü hiçbir etkileri bulunmamaktadır. Pediyokokların bazı suşları antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu için, fermente ürünlerde bu bakterilere yer verilmektedir. Bakteriyosin üretme yeteneğine sahip bakterilerdir. Pediyosin olarak adlandırılan bu madde ticari olarak piyasada bulunmakta ve gıdaların güvenli hale getirilmesinde, özellikle *Listeria sp.* gelişiminin kontrol altına alınmasında kullanılabilmektedir. Ayrıca, bakteriyosini kodlayan genler, aynı zamanda üretici suşu öldürmeyi önlemek

için, birden çok bağışıklık proteinleri oluştururlar. Bağışıklık proteinleri bakteriyosinin hücre membranına geçmesinini engelleyebilir. Bakteriyosini hücre içine alarak sindirebilir veya membrana adsorbe olan bakteriyosini hücre dışına tekrar yollayabilir (Bizani vd., 2008).

Bu bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen protein veya peptit yapısındaki maddelere bakteriyosin adı verilir. Bakteriyosinler, protein doğasındaki antagonistik, üretici hücreler üzerinde öldürücü etki yapmayan ve genellikle dar etki spektrumuna sahip olarak tanımlanan maddelerdir. Birçok kaynakta bakteriyosinler ve antibiyotikler eşdeğer özelliklerinden dolayı, birbiriyle karıştırılmaktadır. Bunları birbirinden ayıran çok fark olmasına rağmen temel koşul, bakteriyosinler antibiyotiklere göre dar bir etki spektrumuna sahip olmasıdır. Ayrıca bakteriyosin sentezleyen suşa yakın akraba türlere karşı da antimikrobiyal etki göstermektedirler (Riley ve Wertz, 2002; Kurt ve Zorba, 2005).

Bu çalışmadaki temel amacımız Sağlık Bilimleri Üniversitesi Van Eğitim ve Araştırma Hastanesi Süt Çocuğu Servisinden toplanan anne sütü örneklerinden laktik asit bakterilerisi izole etmektir. İzolasyonu yapılan suşların biyokimyasal ve moleküler tanımlamasını yapmaktır. Belirlenen şüpheli izolatların moleküler tanımlamasını 16S rRNA PCR analizi sonuclarını BLAST' layıp benzerlik oranlarını belirlemektir. BLAST' lanmış izolatların plazmit içerikleri, antibiyotik direçlilikleri ve antimikrobiyal aktiviteleri tespit etmektir.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmamız Muş Alparslan Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarında yapılmıştır. Kullanılan alet ve cihazlar; Otoklav (Nüve, OT 40L, TÜRKİYE), Etüv (Nüve NB 20, BELÇİKA), Mikroskop (OLYMPUS, Cx21, ALMANYA), Su banyosu (Nüve NB 20, BELÇİKA), PCR cihazı (NYX Technik, USA), Jel Görüntüleme Cihazı (Micro DOC, Cleaver Scientific Ltd.UK), Elektroforez Güç Kaynağı (NYX Technik, USA), jel elektoforez tankı (CleaverScientific Ltd. UK) ve santrifüj (Centurion Scientific, UK)'den oluşmaktadır.

2.2. Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Merck (Almanya), antimikrobiyal testler için kullanılan antibiyotik diskleri Oxoid (Almanya)' dan elde edilmiştir. Moleküler biyoloji malzemeleri Favorgen (Tayvan), Fermentas, Thermo Scientific'den (USA), gen varlığını tespit etmek amacıyla kullanılan primerler ise Sentagen'den (Türkiye) temin edilmiştir.

2.3. Anne Sütü Örnekleri

Bu çalışmada laktik asit bakterileri izolasyonu için anne sütü örnekleri Sağlık Bilimleri Üniversitesi Van Eğitim ve Araştırma Hastanesi Süt Çocuğu Servisinden toplanmıştır. Toplanan süt örnekleri steril kaplara alınarak ve mümkün olan en kısa sürede ve soğuk şartlarda +4 °C'de Muş Alparslan Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuarları Uygulama Araştırma Merkezi Laboratuarına getirilip hemen izolasyona tabi tutularak, bakteri izolasyonu ve genetik tanımlamadan sonra örneklerden izole edilen bakteriler numaralandırılmış ve -20 °C'de stoğa alınmıştır.

2.4. Besiyeri ve Hazırlanması

In vitro (canlı hücre dışında) yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde laktik streptokokların geliştirilmesi için sıvı besiyeri olarak kullanılır.

Laktik asit bakterileri Çizelge 2.1'de kompozisyonu verilen MRS ve M17 besi ortamında geliştirilmiştir. İzolasyon sonucu tespit edilen şüpheli suşları M17 besi ortamında 42±2°C'de, MRS besi ortamında 37±2°C'de inkübe edilmiştir. M17 broth besiyerinde litreye 42.5 g ve MRS broth besiyerinde litreye 52.2 g olacak şekilde tartılarak 121°C de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. MRS broth ve M17 broth'a 15 g/l agar ilave edilerek 121°C de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek MRS Agar ile M17 Agar hazırlandı.

Çizelge 2.1. Laktik asit bakteri kültürleri için kullanılan M17 ve MRS besi ortamlarının kompozisyonu

M17 Broth (Merck)	Kimyasallar Miktar (g/1)
Bacto tripton	5
Bacto soyton	5
Et özütü	5
Maya özütü	2.50
Askorbik asit	0.50
Magnezyum sülfat	0.25
Disodyum-β-gliserol-fosfat	19

MRS kültür ortamı, laktobasilin yanı sıra zengin bir besin maddesi tabanı için özel büyüme faktörleri olarak hareket ettiği bilinen polisorbat, asetat, magnezyum ve manganez içerir.

MRS Broth (Merck)	Kimyasallar Miktar (g/1)
Pepton	10
Et özütü	8
Maya özütü	4
Glikoz	20
Potasyum hidrojen fosfat	2
Diamonyum hidrojen fosfat	2
Sodyum asetat	5
Magnezyum sülfat	0.2
Mangan sülfat	0.04

Laktik asit bakteri kültürleri için kullanılan Nutrient Agar besiyerlerinin kompozisyonu Çizelge 2.2'deki gibi 20 g dehidre besiyeri 1 litre su ile çözülür ve otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilir.

Çizelge 2.2. Laktik asit bakteri kültürleri için kullanılan Nutrient Agar besiyerlerinin kompozisyonu

Nutrient Agar (Merck)	Kimyasallar Miktar (gr/l)
Pepton	5
Et ekstraktı	13
Agar- agar	12

2.5. Çözeltiler ve Hazırlanması

RNA az A çözeltisi: 0.05 M sodyum asetat 5 ml steril saf su içerisinde karıştırılıp üzerine 5 mg RNaz A ilave edilmiştir. Kaynayan su ortamında 5 dk. bekletikten sonra -20°C' de saklanmıştır. %3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinin hazırlanışı: 20 ml saf steril su içerisine 3 g NaCl ve 100 g fenol ilave ederek 45±2°C' deki su banyosunda çözülerek oda sıcaklığında bırakılmıştır.

Kristal Violet stok solüsyonu

Kristal violet	:1.0 g
Etanol	:% 95
dH_2O	:100 ml

Bazik Fuksin stok solüsyonu

Bazik fuksin	:3.0 g
Etanol	:%95
dH_2O	:100 ml

Lügol

İyot	:1.0 g
Potasyum iyodür	:2.0 g
Sodyum karbonat	:%5 60.0 ml
dH_2O	:140.0 m

Metilen Mavisi

Metilen mavisi	: 0.3 g
Etil alkol	: 30.0 ml
dH_2O	: 100 ml'ye tamamlanır.

Sakkaroz çözeltisi

Tris	: 0.7 g
EDTA	: 0.05 g
Sakkaroz	: 6.5 g
Distile su	: 100 ml pH 8.0± 0.0

SDS çözeltisi

Tris	: 0.6 g
EDTA	: 0.8 g
SDS	: 20 g
Distile su	: 100 ml pH 8.0± 0.02

Tris-EDTA-2

Tris	: 0.15 g
Distile su	: 100 ml

pH 7.5± 0.02

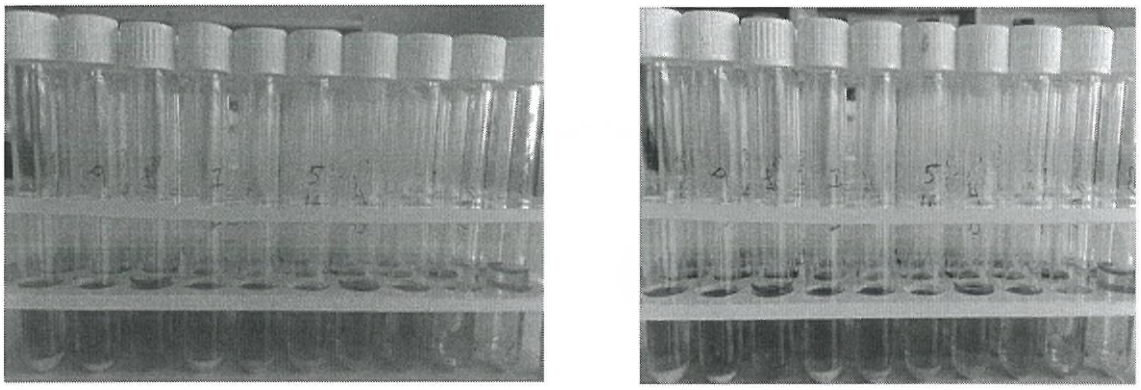
Tris-HCl

Tris-HCl	: 31 g
Distile su	:100 ml

pH 7.0± 0.02

2.6. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Anne sütünde laktik asit bakterileri izolasyonu; Kao vd., (2006)'nin izolasyon metodunda kullandıkları işlem basamakları modifiye (santrifüj işleminin sayısı artırılarak) edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla soğuk şartlarda laboratuvara getirilen süt örneğinden, homojen olarak 1 ml steril tüplere alınıp, 3500 devir/dk.'de 3 dk. santrifüj edildikten sonra supernatant kısmı ependorf tüplere alınıp, 10 000 devir/dk.'de 30 s. ve yine supernatant kısmı yeni tüplere aktarıldıktan sonra 10 000 devir/dk.'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Pelete 100 µl steril distile su ilave edilip 10-1, 10-2, 10-3, 10-4, 10-5' e kadar dilüsyon hazırlanmıştır. Örnekler MRS agar ve M17 agar petrilerine inoküle edilmiş ve sırasıyla ekimi yapılan plaklar 37±2°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan ve laktik asit bakteri kolonisi olduğu düşünülen koloniler alınıp stoklanmak üzere besi ortamında aktifleştirilmiştir Şekil 2.1. de verilmiştir.



Şekil 2.1. Anne sütünden izole edilen LAB'ların MRS ve M17 besi ortamında aktifleştirilmesi

2.7. Laktik Asit Bakterilerinin Ön Tanımlanması

Anne sütü örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında izolatların biyokimyasal (katalaz), morfolojik (kok, çubuk gibi) ve kültürel özelliklerine (gram boyama, koloni morfolojisi) bakılarak tanımlama yapılmıştır. Koloni morfolojisi inkübasyondan sonra petrilerdeki koloniler görünüşlerine, şekline, rengine ve kokusuna bakılarak değerlendirme yapılmıştır.

2.7.1. Gram boyama

İzole edilen potansiyel LAB'lar gram boyama tekniği ile boyanmıştır. Boyama yapılacak preparatlar petrilerdeki koloniler steril özelerle lamlara alınıp kurutulup sabitlenmiştir. Kristal violet solüsyonu ile 2-3 dk. boyanmış, boya yıkanmış ve preparat üzerine lügol solüsyonu damlatılarak 1-2 dk. bekletilmiştir. Lügol solüsyonu önce saf alkol ile sonra saf su ile yıkanmış ve safranin ile de 5-10 saniye boyanıp, su ile yıkanarak boya giderilmiştir (Collins vd., 1989; Gücin ve Dülger, 1995). Kurutma kâğıdı ile kurutulduktan sonra immersiyon yağı konarak immersiyon objektifi ile bakılıp görüntüler değerlendirilmiştir.

2.7.2. Katalaz testi

İzolasyonu yapılan LAB'ların petrilerindeki kolonileri alınıp üzerine %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatılarak gaz kabarcıklarının oluşumuna göre gözlemlenmiştir. Gaz kabarcığı oluşturan örnekler katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Hammes ve Vogel, 1995).

2.8. Moleküler Biyoloji Metotları

Laktik asit bakterilerinin moleküler olarak tanımlanması; primerlerin belirlenmesi, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) işlemi ve plazmit DNA izolasyonunu kapsamıştır.

2.8.1. Oligonükleotit primerler

İzole edilen laktik asit bakterilerinin kolonileri, 16S rRNA'yı kodlayan DNA bölgesi üzerinden belirlenen primerler ile yapılan PCR ile de teyit edilmiştir. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan evrensel 16S rRNA gen primerlerinin dizilimleri (5'→3') ve bant uzunlukları Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Laktik asit bakterilerinin evrensel 16S rRNA genlerinin tanımlanması için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri

Gen	Primer Adı	Dizilim (5'→3')	Uzunluk(bç)
16S rRNA	27F 1492R	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	1465

2.8.2. Kromozomal DNA izolasyonu

Çalışma boyunca kullanılan 23 LAB suşu MRS broth ve M17 broth besi yerlerinde 37±2°C'de 48 saat aktifleştirilmiştir. Daha sonra ependorf tüplerine her örnekten 1.5 ml bırakılmıştır ve 5 dak. 13.000 rpm'de santrifüjlenip süpernatant kısmı başka bir yere alınmıştır. Elde edilen peletlerin genomik DNA izolasyonlarını Vivantis Genomik DNA izolasyon Kiti ile yapılmıştır. İzolasyonu yapılan DNA daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.8.3. 16S rRNA PCR ve DNA dizi analizi

PCR işlemi toplam 50 µl içerisinde gerçekleştirilmiştir. 31.5 µl dH_2O, 1'er µl ileri ve geri primerlerden, 5 µl PCR buffer (10X), 2 µl dNTP (10 mM), 4 µl $MgCl_2$ (25 mM) 0.5 µl Taq DNA polimeraz (5 U/ml) ve 5 µl genomik DNA karıştırılarak hazırlanmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız primerler ticari firmalardan sipariş edilmiştir (Sentagen, Ankara). PCR işlemi 94°C'de 3 dk. ilk ayrıştırma ile başlatılmış daha sonra 30 döngü olmak üzere 94°C'de 1 dk. denatürasyon, primerler için uygun yapışma sıcaklığı 61°C' de 1 dk. ve 72 °C'de uygun sentez zamanı boyunca gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri % 1'lik jel hazırlanarak, elektroforeze yüklenmiş PCR ile çoğaltılan bölgeler UV ışığında gözlenmiş ve fotoğraflanmıştır. DNA Dizi Analizi hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

2.8.4. Plazmit DNA izolasyonu

Çalışmada toplanan anne sütü örneklerinden izole edilen, kimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanan suşların plazmit DNA izolasyonları yapılmıştır. Bu amaçla, hazır kit ile izolasyonu ve manuel plazmit DNA izolasyon metotları uygulanmıştır.

2.8.4.1. Hazır kit kullanılarak yapılan plazmit DNA izolasyonu

Plazmit DNA izolasyonu; Favorgen Plasmid DNA Extraction Mini Kiti kullanarak firmanın (FAVORGEN) verdiği prosedüre lizozim eklenerek modifiye edilmiş ve gerçekleştirilmiştir. Bunun için MRS ve M17 besi ortamında bir gece inkübasyona bırakılmış bakteri kültürü kullanılmıştır. Gelişmiş olan bakteri kültüründen 1 ml tüplere alınarak, 3500 devir/dk. 15 dk. santrifüj edilmiş ve bakteri hücreleri

çöktürülüp supernatant dökülür, pelette 1ml steril distile su eklenip vortekslenerek 2 dk. da 10000 rpm'de santrifüjlenir ve üstte kalan sıvı kısmı uzaklaştırılır, iki kez bu işlem yapılır. Oluşan peletin üzerine 200 µl lizozim (8 mg/ml) konsantrasyonu eklenerek karıştırılır ve 37±2°C 30 dk. su banyosunda lizozim inkübasyonu yapılmıştır. Daha sonraki aşamalar üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen potansiyel plazmit DNA'ları jelde görüntülenir, fazla kalan kısmıda sonraki çalışmalarda kullanılmak için -20°C'de saklanmıştır.

2.8.4.2. Geleneksel plazmit DNA izolasyonu

Laktik asit bakteri kültürleri MRS broth ve M17 broth besi ortamında 37±2°C'de 24 saat geliştirilip, 5 ml'lik MRS broth ortamlarına birer ml inokülasyonlar yapılmış ve alınan tüpler 30±2°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Bakteri kültürleri sonra santrifüj tüplerine alınıp, 6000 devirde 15 dk. santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Tüplerdeki hücre çökeltisi kurutulduktan sonra 380 µl sükroz tamponunda çözülmüştür. 37±2°C'ye kadar ısıtılan bu ortama 96 µl lizozim ilave edilmiş ve su banyosunda 37°C'de 5 dk. bekletilmiştir 48 µl Tris-EDTA-1 uygulamasından sonra, tüplere 28 µl % 20 SDS çözeltisinden eklenerek karıştırılmıştır. Son aşamada santrifüj tüpleri 37±2°C su banyosunda 10 dk. süre ile bırakılmış lizizin tamamlanması sağlanmıştır.

Elde edilen kültürlere yeni hazırlanmış 28 µl 3 N NaOH çözeltisinden ilave edilmiş ve düz bir zemin üzerinde tüpler 10 dk. Süre ile yavaşça çevrilerek kromozomal DNA'nın alkali denatürasyon koşulları sağlanmıştır. Denatürasyon aşamasının sonunda santrifüj tüplerine 50 µl Tris-HCl çözeltisi eklenerek, 3 dk. süre ile yine düz bir zeminde hafifçe karıştırılmıştır. Tüplere, %3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinden 0.7 ml ve 4°C'de tutulan 5 M NaCl çözeltisinden 72 µl aktarılarak, 4°C'de 15 dak. 15000 devirde santrifüj işlemi yapılmıştır. Mikropipetlerle tüplerde oluşan üst faz alınıp yeni tüplere aktarılmış ve 0.7 ml kloroform/izoamilalkol (24:1) çözeltisi eklenmiştir. Oluşan bu karışıma 4°C'de 15000 devirde 15 dk. santrifüj işlemi uygulanmış, tekrar elde edilen üst faz yeni tüplere alınmış ve aynı hacimde soğuk etanol ilave edilmiştir. Etanol aktarılan tüpler -20°C'de bir gece bırakıldıktan sonra, 15 dk. 15000 devirde santrifüjlenerek plazmit DNA çöktürülmüş ve sıvı faz uzaklaştırılarak çökeltiler kurutulmuştur. Kurutulan çökeltiler 20 µl Tris-EDTA-2 içerisinde çözülmüş ve RNaz A stok

çözeltisinden 2 µl ilave edilerek su banyosunda 37±2°C'de 45-50 dk. inkübe edilmiştir (Anderson ve McKay, 1983).

2.8.5. DNA'nın jel elektroforezi

PCR ürünleri için agaroz jel hazırlamak üzere; %1 oranında agaroz, 1X TBE tamponu içerisinde homojen olarak karıştırılıp eritilmiş ve elektroforez tabağına dökülmüştür. Analiz edilecek örnekler uygun dilüsyonlarından genellikle 4 µl alınarak, 1 µl yükleme tamponu (%0.25 bromfenol mavisi; %40 sukroz; 100 mM EDTA; pH 8.0) ile karıştırılmıştır. Bu şekilde örnekler jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. DNA kontrolü olarak uygun boyutlardaki DNAreferansı; λDNA 1000 baz çiftlik veya 100 baz çiftlik DNA markörleri (Favorgen) kullanılmıştır. Elektroforez tankında 500 mA (NYXTechnik; V37) ve (Cleaver), jel 80 V altında 60 dk. boyunca koşturulmuştur. DNA örnekleri UV ışığı (312 nm) altında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

Plazmit DNA ürünleri için agaroz jel hazırlamak üzere; % 0.7 oranında agaroz, 1X TBE tamponu içerisinde eritilmiş ve elektroforez tabağına aktarılmıştır. Örneklerin analiz için uygun dülüsyonlarından genellikle 4 µl alınarak, 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılmıştır. Bu şekilde örnekler jele yüklenmiştir. DNA kontrolü olarak uygun boyutlardaki DNA referansı; λ DNA 1000 baz çiftlik DNA markörleri (Favorgen) kullanılmıştır. Elektroforez tankında, jel 20-40 V ve 500 mA altında 4 saat boyunca koşturulmuştur. DNA örnekleri UV ışığı (312 nm) altında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

2.9. İzolatların Stoklanması

Bakteri suşları kısa süreli stoklamalar için %15'lik gliserol içerisine alınarak 20°C'de saklanmıştır. Uzun süreli saklama için ise, besiyerinde 16 saat geliştirilen bakterilerden 200 µl alınarak 3 dk. 12.000 rpm'de santrifüjlenerek süpernatant kısmının uzaklaştırılması ve peletlerin %30 gliserol içeren MRS ve M17 besi ortamında çözdürüp, şok soğutma ile -80°C'de gerçekleştirilmiştir.

2.10. İzolatların Antibiyotiklere Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan antibiyotikler Oxoid'den sağlanmıştır. Kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. Antibiyotikler ve konsantrasyonları

Antibiyotik	Konsantrasyon(mg)
Penisilin	10
Vankomisin	30
Rifampisin	5
Kloramfenikol	30
Gentamisin	10
Nalidiksik Asit	30
Polimiksin	300

2.10.1. Disk difüzyon metodu

Anne sütünden izole edilen laktik asit bakteri izolatlarının antibiyotik direnç özellikleri disk difüzyon metoduna ile belirlenmiştir. Bu amaçla penisillin, vankomisin, rifampisin, kloramfenikol, gentamisin, nalidiksik asit ve polimiksin antibiyotiklerine karşı direnç veya duyarlılık özellikleri incelenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan ve 4°C'de muhafaza edilen laktik asit bakteri suşları sıvı MRS besiyerine aşılanarak 37±2°C de 24 saat süre ile aktivasyonu sağlamak için inkübasyona bırakılmıştır. Deney tüplerinde sterilize edilen ve 45±2°C ye kadar soğutulan MRS agarda aktivleştirilmiş laktik asit bakteri izolatlarıyla hazırlanan 24 saatlik (0.1 ml de 108 adet/ml) kültür ile aşılanmıştır (Anonymous, 1999). Deney tüplerine ekim yapıldıktan sonra iyice karıştırılıp 9.0 cm çapındaki steril petri kutularına 15'er ml aktarılmış ve besiyerinin homojen bir şekilde petri kutusu içinde dağılması sağlanmıştır (Collins vd., 1989). Katılaşan besi yerleri üzerine antibiyotik diskler uygun mesafelerle yerleştirilmiştir. Ekimi yapılan plaklar ön inkübasyon için 4°C'de 2 saat bırakılmıştır. Sonrasında 37±2°C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Son aşamada oluşan inhibisyon zonları mm olarak ölçülmüştür. Çalışmamız üç tekrar şeklinde yapılmiştir.

2.11. İzolatlarının Diğer Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkilerileri

Anne sütünden izole edilen laktik asit bakteri izolatlarının antibakteriyel etkileri oyuk agar difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Bu amaçla *Staphylococcus aureus* ATCC

25923, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeroginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Bacillus megaterium* DSM 32, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 ve *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883 gibi bakterilere karşı direnç-duyarlılık özellikleri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan laktik asit bakteri suşları sıvı MRS besiyerine, indikatör bakteriler ise Nütrient sıvı besiyerine aşılanarak 37°C de 24 saat süre aktivasyonu sağlamak için inkübasyona bırakılmıştır (Anonymous, 1999). Çalışmada kullanılan indikatör bakteriler agar ortamında 24 saatlik kültürlerinden distile suda 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyonlar hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonları, her bir indikatör bakteri suşu için uygun olan agar ortamlara, steril eküvyon çubuğu ile inkübe edilmiştir. Plaklara steril agar delici ile kuyucuklar açılmıştır. Hazırlanan kuyucuklara izolatlardan 100 µl konularak indikatör bakteriler için uygun sıcaklıklarda 24 saat'lik inkübasyona bırakılmıştır (Pringsulaka vd., 2012). Son aşamada oluşan inhibisyon zonları mm olarak ölçülmüştür.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

Anne sütü özel yapıda, sindirimi kolay ve enfeksiyondan koruyucu nitelikleri zengin bir protein içeriğine sahiptir. Anne sütünün canlı, biyolojik bir karışım olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar anne sütü mikrobiyal içeriğinin bireyler arasında hem türce hemde sayıca belirgin değişkenlik gösterdiğini ileri sürmektedir Ayrıca anne sütünde bulunan 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).

Laktik asit bakterileri doğada özellikle süt ve süt ürünlerinde, canlıların bağırsak sistemlerinde, bitkilerde ve fermente gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Laktik asit bakterileri; fermantasyon da oluşan ürünlere göre sınıflandırıldıklarında homofermantatif (glukozdan % 95-100 oranında laktik asit üretirler) ve heterofermantatif (glukozdan % 50 oranında laktik asit üretir, ayrıca asetik asit, etanol, fruktoz, gliserol ve mannitol oluştururlar) olarak ikiye ayrılırlar. Gıda endüstrisi açısından *Lactococcus, Enterococcus, Leuconostoc, Pediococcus ve Lactobacillus*'lar önemli laktik asit bakteri gruplarıdır (Evren vd., 2011).

Albesharat vd. (2011) yaptıkları çalışmada anne sütünden *L. brevis, L. oris, L. animalis, E. durans, E. hirae, Pediococcus* spp., *S. gallolyticus, S. vestibularis, S. australis* ve *S. haemolyticus* bakterilerini izole etmişlerdir.

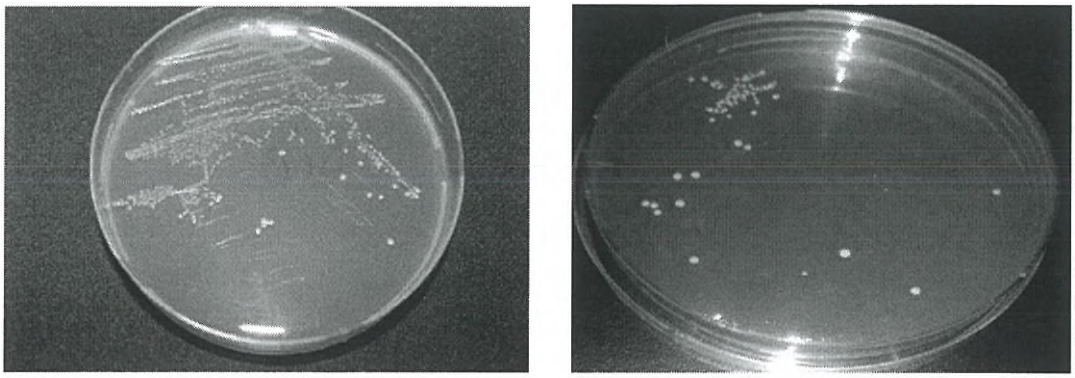
Çalışmanın bu kısmında 30 anne sütü örneğinden 48 laktik asit bakteri izolasyonu yapılmıştır ve daha sonraki yapılacak olan çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de stoklanmıştır.

3.1.1. İzolatların morfolojik ve biyokimyasal olarak tanımlanması

Laktik asit bakterilerinin tanımlanmalarında geleneksel sınıflandırmanın temeli, morfolojik, fizyolojik ve farklı sıcaklıklarda, ph değerlerinde, arjinin degredasyonu, tuz konsantrasyonlarında gelişimi ve karbonhidrat katabolizması gibi

metabolik/biyokimyasal özelliklerin araştırılmasını içeren fenotipik yöntemlere dayanmaktadır (Gobbetti vd., 2005)

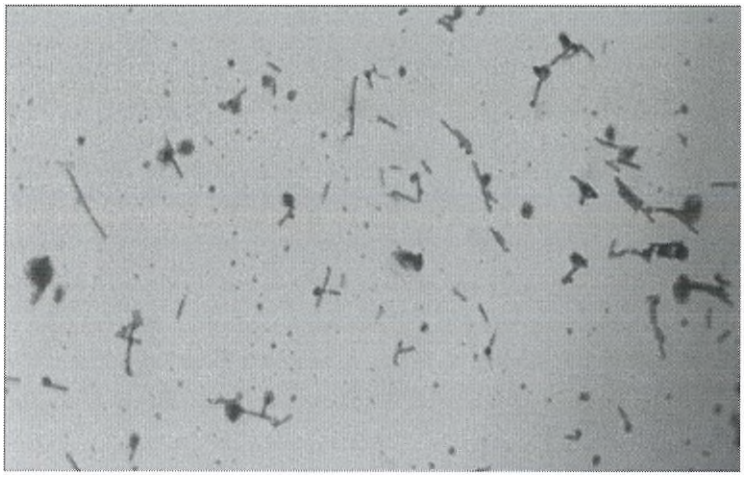
Saf kültür olarak elde edilen laktik asit bakteri izolatlarının, biyokimyasal yöntemlerle tanımlanmasında, gram boyama reaksiyonu, mikroskobik morfoloji ve katalaz aktivitesine bakılmıştır. LAB'ların izolasyonu yapıldıktan sonra, petrilerde koloni görünüşleri beyaz-krem renkli ile ayırt edilebilmektedir. İnoküle edilen MRS ve M17 agar petrilerine ve 48 saat inkübe edildikten sonra oluşan koloni görüntüleri Şekil 3.1' de verilmiştir.



A B

Şekil 3.1. MRS agar (A) ve M17 agar (B) petrilerine aşılanan LAB'a ait koloni görüntüsü

Anne sütü örneklerinden izolasyonu yapılan 48 izolatın gram boyama sonucunda 37 izolatın gram pozitif, 11 izolatında gram negatif olduğu belirlenmiştir. İzolasyonu yapılan LAB suşlarından gram boyama da elde edilen mikroskobik görüntüsü Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Anne sütünden izole edilen laktik asit bakterilerinin gram boyama görüntüsü

LAB oksidatif stres sonucu oluşan oksijen türevlerinden hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturmakta fakat katalaz enzimi eksikliğinden dolayı hidrojen peroksiti oksijen ve H_2O'ya parçalayamamaktadır. LAB tayininde basit bir yöntem olarak katalaz özelliği kullanılmaktadır. Çalışmada kullanılan izolatlara morfolojik incelemeden sonra katalaz testi yapılmıştır ve 48 izolatın tamamının katalaz negatif olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, suşların mikroskobik özellikleri incelendiğinde, 26 bakterinin basil geriye kalan 22 suşunda kok şeklinde olduğu görülmektedir. Suşların biyokimyasal özellikleri araştırıldığında, LAB'a ait özellikleri gösterdiği yani Gram pozitif olduğu ve katalaz aktivitesinin bulunmadığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Laktik asit bakterilerinin morfolojik ve biyokimyasal sonuçları

İzolatlar	**Gram reaksiyonu**	**Katalaz testi**	**Mikroskobik morfolojisi**	
			Basil	**Kok**
MS1	+	-	+	
MS2	-	-		+
MS3	-	-		+
MS4	+	-		+
MS5	-	-		+
MS6	+	-	+	
MS7	+	-		+
MS8	-	-	+	
MS9	-	-		+
MS10	+	-	+	
MS11	+	-		+
MS12	+	-	+	
MS13	+	-	+	
MS14	+	-	+	
MS15	+	-	+	
MS16	+	-	+	
MS17	+	-	+	
MS18	-	-		+
MS19	+	-		+
MS20	+	-		+
MS21	-	-		+
MS22	+	-		+
MS23	+	-		+
MS24	+	-	+	
MS25	+	-	+	
MS26	+	-	+	
MS27	+	-	+	
MS28	+	-		+
MS29	+	-	+	
MS30	+	-	+	
MS31	+	-	+	

Çizelge 3.1' in devamı

İzolatlar	Gram reaksiyonu	Katalaz testi	Mikroskobik morfolojisi	
			Basil	Kok
MS32	-	-		+
MS33	-	-		+
MS34	+	-	+	
MS35	+	-	+	
MS36	+	-	+	
MS37	+	-	+	
MS38	+	-		+
MS39	+	-	+	
MS40	+	-	+	
MS41	-	-	+	
MS42	+	-		+
MS43	+	-		+
MS44	+	-		+
MS45	+	-	+	
MS46	+	-	+	
MS47	-	-		+
MS48	+	-		+

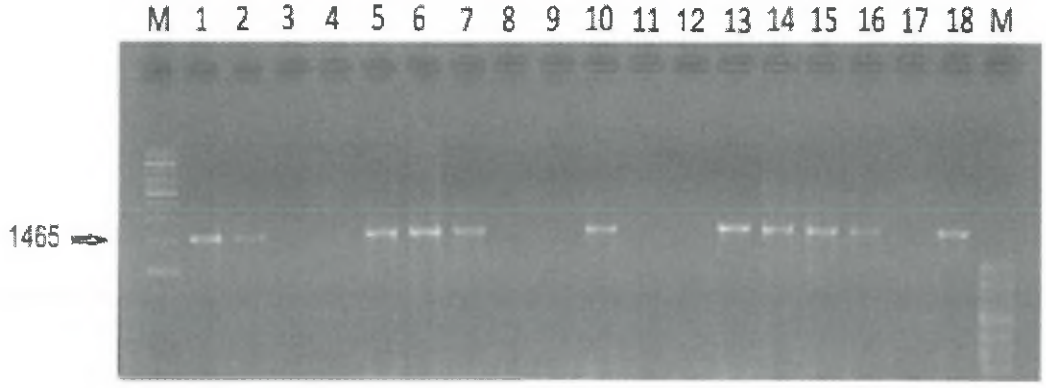
3.1.2. İzolatların 16S rRNA gen bölgesi PCR sonuçları

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'ların fizyolojik ve taksonomik özellikleri açısından gruplandırılması konusunda yapılan çalışmalar, günümüzde moleküler tiplendirme yöntemlerinin kullanılmasıyla daha da geliştirilmiştir.

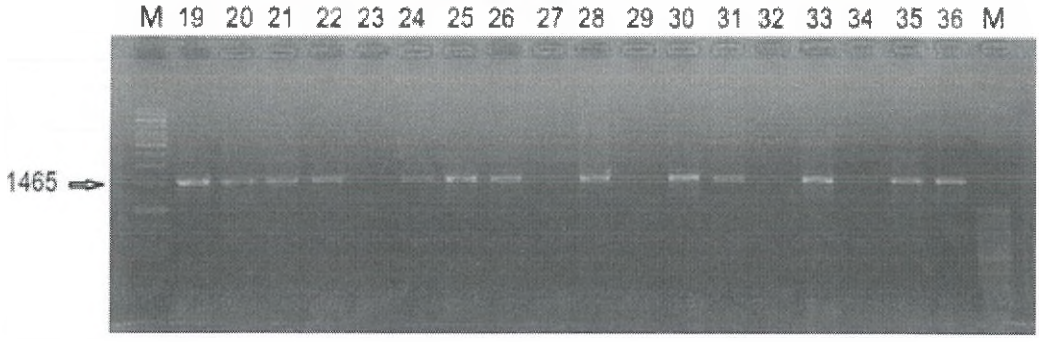
16S rRNA genleri tüm hücrelerde en çok korunmuş olan, yani en az değişikliğe uğrayan bölgelerdir. Bu nedenle diğer canlılar gibi bakterilerde de filogenetik (akrabalık ilişkilerinin tanımlanabilmesi için) ayrıca bakteride gen ekspresyonu düzeyinde proteinin belirlenmesi için öncelikli olarak 16S rDNA'nın 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 türüne özgün sekans bölgelerinin tespit 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 vd., 1991; Budai, 2008).

Çalışmada izolatların; morfolojilerine, gram boyama reaksiyon özellikleri ve katalaz testleri yapılan ve laktik asit bakterisi olduğu tespit edilen 36 izolatın MRS ve M17 Agar petrilerine ekimi yapılmıştır. Moleküler olarak tanımlama yapılması için petrilerden alınan tek laktik asit bakterilerinin kolonilerinden, DNA izolasyonu yapılarak 16S rRNA'yı kodlayan DNA bölgesi üzerinden tasarlanmış primerler ile yapılan PCR ile de teyit edilmiştir. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanılan evrensel 16S rRNA gen primerlerinin dizilimleri Çizelge 2.3'te verilmiştir. 16S rRNA PCR çalışma şartlarında çoğaltılan PCR ürünleri Şekil 3.3 ve Şekil 3.4' te %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.



Şekil 3.3. Anne sütünden izole edilen laktik asit bakterilerinin (1-18. izolatlar) 16S rRNA PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı.



Şekil 3.4. Anne sütünden izole edilen laktik asit bakterilerinin (18-36. izolatlar) 16S rRNA PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı

Bu tarz çalışmalarda biyokimyasal tanımlama yapılamadan planlanan moleküler tanımlamalar için kullanılacak primerler genelde kolonilerden bazılarında yanlış tanımlamalara neden olabilmektedir. Bu nedenle moleküler tanımlama ile biyokimyasal tanımlamalar beraber değerlendirildiğinde daha etkin bir tanımlama olmaktadır (Tabasco vd., 2007).

Çalışmamızda 36 izolattan 24' ü 1465 bç bölgesinde bant verdiği gözlemlenmiş olup şüpheli laktik asit bakteriler olabileceği düşünülmektedir. Bu şekilde LAB olabilecek izolatların biyokimyasal ve moleküler yöntem ile tanımlanarak doğrulanmıştır. Elde edilen bulgularımız literatür bilgileriyle eşdeğer olduğu belirlenmiştir.

3.1.3. İzolatların 16S rRNA PCR ürünlerinin DNA dizi analiz sonuçları

PCR sonucunun 16S rRNA genine ait olup olmadığını doğrulamak için 24 şüpheli LAB izolatının dizi analizi (sekanslama) yapılmıştır. Sekans sonucunda elde edilen diziler Şekil 3.5'te belirtilmiştir.

1 nolu izolat

TATAGCAGTCGACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTG
GTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACT
TGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGT
GGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG
CCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGT
ATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAAGTCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAAGTGCATCG
GAAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGA
AGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATT
AGATACCCTGGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTTGTTGGAGGGATTCCGCCCTTTCAGTGCTGCAGCT
AACGCATTAAGCATTCCCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGCCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGA
GATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGT
ACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCC
TACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC
CCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTAGGAACCAGCCGCTAAGG

Şekil 3.5. Anne sütünden izole edilen1 nolu izolatın 16S rRNA genine ait dizi analizi sonuçları

Evrensel 16S rRNA primeri kullanılarak yapılan PCR sonucundaki ürünlerin DNA sekans analizi ile elde edilen diziler Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

programı kullanılarak LAB suşlarına olan benzerlikleri tespit edilmiştir. Çizelge 3.2' de görüldüğü gibi beş izolatın *Lactobacillus*, beş izolatın *Pediococcus* ve bir izolatında *Enterococcus* cinsine yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.2. Anne sütünden izole edilen LAB suşlarının sekans analiz sonuçları

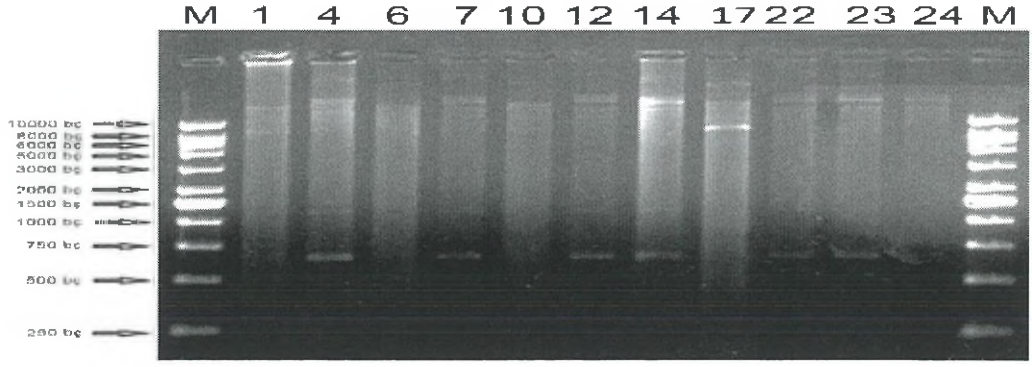
İzolatlar	16S rRNA	Benzerlik oranı (%)
1	*Lactobacillus fabifermentans* DSM 21115	% 98
4	*Pediococcus claussenii* ATCC BAA-344	% 97
6	*Lactobacillus fabifermentans* DSM 21115	% 96
7	*Pediococcus claussenii* ATCC BAA-344	% 97
10	*Pediococcus claussenii* ATCC BAA-344	% 97
12	*Lactobacillus fabifermentans* DSM 21115	% 98
14	*Pediococcus claussenii* ATCC BAA-344	% 97
17	*Lactobacillus senmaizukei* DSM 21775	% 94
22	*Enterococcus rivorum strain* LMG 25899 73	% 96
23	*Lactobacillus fabifermentans* DSM 21115	% 97
24	*Pediococcus claussenii* ATCC BAA-344	% 96

3.2. Laktik Asit Bakterileri İzolatlarından Plazmit İzolasyonu

Bakterilerin fermentasyonu sadece kromozom üzerindeki genlerden sağlanmamıştır. Gelişim esnasında bakteriler genetik materyal olan plazmitleri zamanla diğer mikroorganizmalardan kazanabilmektedirler. Plazmitler bakterilere kötü şartlarda direnç sağladıkları gibi aroma oluşumuna sebeb olan metabolitleride üretebilecek genleri de bulundurmaktadırlar. Bu plazmitler glikoliz, bakteriyosin sentezi, yağ asidi sentezi, aminoasit metabolizması, disakkaritlerin parçalanması gibi görevlerini de yerine getirmektedirler. Plazmitler mikroorganizmasını fajlara karşı korumanın yanında lezzet oluşumu görevi de üstlenmektedirler (Aslım ve Beyatlı, 2004).

Plazmit kökenli genlerin kodladıkları önemli metabolik fonksiyonlar başlangıç kültürlerinin gelişimini ve kapasitelerini artırmakdır. Plazmitler antibiyotik direnç özelliklerinin ilave olarak bakteriyosin üretimi laktoz fermentasyonu ve ağır metallere dayanıklılık gibi önemli özellikler bulundurmakta ve bu tür özellikler başlangıç kültürleri için kabul görmektedir (Perreten vd., 1997). Plazmitler farklı (3-60 kbç) büyüklükte olabilmekte ve büyüklüğüne bağlı olarak birkaç proteinden yüzlerce proteine kadar değişen sayıda proteini kodlayabilmektedirler (Aslım ve Beyatlı, 2004).

Çalışmanın bu bölümünde izole edilen 11 adet laktik asit bakterisinden izole edilen plazmitler sayı, büyüklük ve direnç özellikleri açısından incelenmiştir. Plazmit DNA izolasyonu materyal ve metot bölümünde belirtildiği gibi hazır kit ve manuel geleneksel yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. İzolatların içerdikleri plazmitler sayısal olarak değerlendirildiğinde 1-5 arasında plazmit içerdiği tespit edilip, Şekil 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Anne sütünden izole edilen LAB' ların plazmit DNA izolasyonu sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü. M: 1 kbç DNA standard

Laktik asit bakter isuşlarından izole edilen plazmit sayıları 1 ile 5 arasında değişmektedir. Plazmitler büyüklükleri yönünden değerlendirildiğinde, en büyük plazmitin yaklaşık 10000 bç'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Laktik asit bakteri izolatlarında toplam üç (6, 10 ve 24) tanesinde tek plazmit var iken 17, 22 ve 23 nolu izolatlarda ise iki plazmit varlığı tespit edilmiştir. Laktik asit bakteri suşlarından 7 ve 12 nolu izolatlar ≥10000, 1000 ve 500 bç büyüklüğünde dört adet plazmit içerdiği belirlenmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Anne sütlerinden izole edilen LAB suşlarının plazmit içerikleri

İzolatlar	Plazmit Sayısı	Plazmit Büyüklüğü (bç)
1	3	≥10000, 8000
4	5	≥10000, 1000, 500
6	1	≥10000
7	4	≥10000, 1000, 500
10	1	≥ 8000
12	4	≥10000, 1000, 500
14	3	≥10000, 1000, 500
17	2	≥10000, 8000
22	2	≥10000, 8000
23	2	≥10000, 500
24	1	≥10000

L. plantarum suşlarından izole edilen plazmit sayıları 1 ile 3 arasında değişmektedir. Plazmitler büyüklükleri yönünden değerlendirildiğinde, en büyük

plazmitin yaklaşık 10000 bç''nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. *L. plantarum* izolatlarında toplam 26 tane tek plazmit varlığı tespit edilmiştir (Alan, 2014). Ayrıca tek plazmit içeren izolatların yanlızca ticari kültürlerden oluşamayacağı görüşünü desteklemektedir. Aynı zamanda plazmitlerin taşıdıkları transpozonlar diğer plazmitlerin geçişini sınırlayabilir (Romero ve Klaenhammer, 1990).

Pediococcus acidilactici PBF suşundan izole edilen pilazmidlerin büyüklüklerinin saptanmasında, moleküler büyüklükleri bilinen CCC (covalently closed circular) DNA markörünün (Supercoiled DNA ladder) elektroforetik hareketleri ile büyüklüklerinin logaritmaları arasında belirlenen doğrusal ilişkiden yararlanıldı. Kullanılan CCC DNA markörünün agaroz jel fotoğrafları üzerinde ölçülen göç aralıkları ile bilinen büyüklüklerinin logaritmik değerlerine bağlı olarak eğrileri çıkarılmıştır. İstatistik analizlerle her farklı jel için korelasyon katsayısı ve eğrinin eğimi belirlenerek agaroz jeldeki fragmentlerin büyüklükleri saptanmıştır (Macrina vd., 1978; Elder ve Southern, 1983).

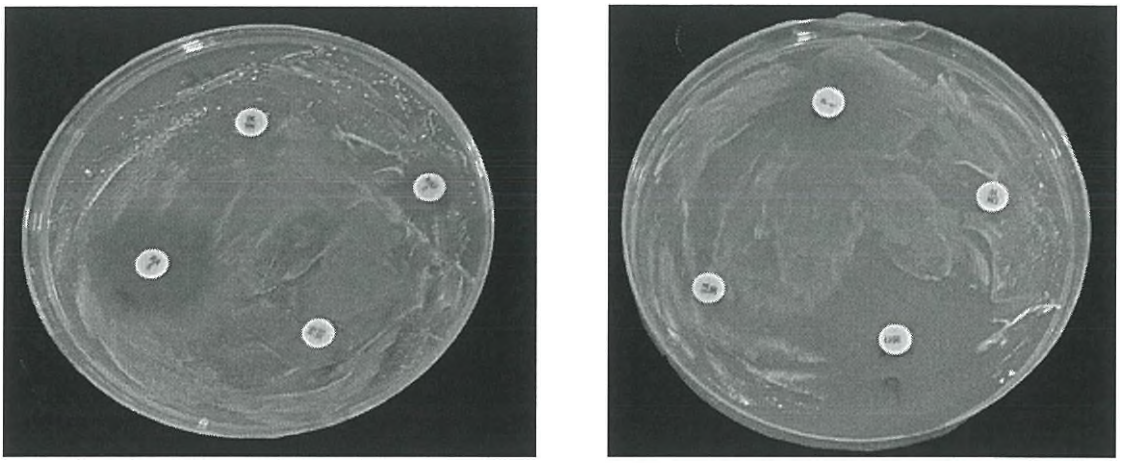
Laktobasiller de karbonhidratları fermente etme özelliği hem kromozal hemde plazmitlerde kodlu olmasına rağmen, laktokoklar da yalnızca plazmit DNA kaynaklı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca laktobasiller de laktoz metabolizması yapan plazmit kodlu türler bulunmaktadır. Bu türlere *L. plantarum, L. casei* ve *L. acidophilus* örnek verilebilir. *L. plantarum* bakterilerinin plazmitlerinde bulunan gal, FIIILac ve phg genlerinin laktoz metabolizmasına neden olduğu belirtilmektedir. Aynı zamanda *L. plantarum* bakterilerinde β-galaktozidaz enzimini kodlayan genetik madde de plazmitlerde bulunmaktadır (Mayo vd., 1994)

3.3. Laktik Asit Bakteri İzolatlarının Antibiyotik Direnç Özellikleri

Antibiyotiklerin kullanılması probiyotik bakteriler, faydalı bakteriler ve fermente ürünlerde rol alan laktik asit bakterileri gibi, gıda zinciri içerisinde ki bakterilerin insan ve hayvanlarda tedavi için kullanılan antibiyotiklere karşı direnç kazanmasını sağlamaktadır. Laktik asit bakterilerinde en çok eritromisin ve tetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı direnç göstermektedir. Aktarılan bu antibiyotik direnç genlerinin, çoğu dikey (hortizal) taşınma ile yayıldığı öngörülmektedir. Araştırmaların çoğunda, insan ve hayvan bağırsağındaki bakterilerin genelinde aynı antibiyotiklere karşı dirençli

olmaları da organizmalar arasında direnç geninin transferini ve dağılmasını doğrulamıştır (Ammor vd., 2007).

Çalışmanın bu kısmında izole edilen bakterilerin Penisilin (10µg), Vankomisin (30µg), Rifampisin (5µg), Kloramfenikol (30µg), Gentamisin (10µg), Nalidiksik asit (30µg) ve Polimiksin (300µg), gibi yedi farklı antibiyotiğe karşı üç tekrar yapılmıştır. Antibiyotiklerin göstermiş olduğu direnç-duyarlılık sonuçları Şekil 3.7' deki gibi belirlenmiştir. Antibiyotiğe karşı direnç özelliği her bir izolat için başlık 2.10.1' deki gibi belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.4.'de verilmiştir.



Şekil 3.7. İzolatların antibiyotik direnç özelliklerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi sonucu elde edilen zon görüntüleri.

Çizelge 3.4. Anne sütünden izole edilen LAB suşların antibiyotik dirençlilikleri

İzolatlar	Penisilin G	Vankomisin	Rifampisin	Kloramfenikol	Gentamisin	Nalidiksik asit	Polimiksin
1	16	R	14	22	R	R	R
4	14	R	21	24	R	R	R
6	10	R	22	25	R	R	R
7	10	R	19	20	R	R	R
10	R	R	18	22	R	R	R
12	13	R	17	22	R	R	R
14	15	R	21	25	R	R	R
17	R	R	19	21	R	R	R
22	R	R	18	22	R	R	R
23	14	R	22	26	R	R	R
24	R	R	17	23	R	R	R

(*): İnhibisyon zonu, mm; (R): Dirençli

Penisilin'e karşı en duyarlı olan 1 nolu izolat 16 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiş olup, en az duyarlılığı ise 6 ve 7 nolu izolatlar 10 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir. Penisilin'e karşı oluşan inhibisyon zon çapları 10 mm ile 16 mm arasında değişim göstermektedir. 10, 17, 22, ve 24 nolu izolatlar ise penisilin'e karşı direçli oldukları tespit edilmiştir.

Rifampisin'e karşı en az duyarlı olan 1 nolu izolat 14 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu, en fazla duyarlı ise 6 ve 23 nolu izolat 22 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir. Rifampisin'e karşı oluşan inhibisyon zon çapları 14 mm ile 22 mm arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir.

LAB suşları Kloramfenikol'e karşı 20-26 mm aralığında inhibisyon zonu oluşturmuştur. Bu izolatlardan sadece 23 nolu izolat en duyarlı olup 26 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu ve 7 nolu izolat en az duyarlı olup 20 mm çapında zon oluşturduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmamızdaki laktik asit bakteri suşları Vankomisin (30µg), Gentamisin (10µg), Nalidiksik asit (30µg) ve Polimiksin (300µg), antibiyotiklerine karşı % 100 dirençli olduğu tespit edilmiştir. İzolatlar içerisinde en fazla duyarlılığı 23 nolu suş kloramfenikol'e karşı 26 mm çapında inhibisyon zonu oluştururken en az duyarlılığı 6,7 nolu izolatlar penisilin antibiyotiğine karşı 10 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir.

İzolatların antbiyotiklere karşı göstermiş oldukları dirençlilik, orta derece dirençlilik ve duyarlılık aralıkları Çizelge 3.5' de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Standart antibiyotiklerin karşılaştırma değerleri (Han vd., 2015; Çelik vd., 2016).

ANTİBİYOTİK	Disk İçeriği	Zon Çapı, mm		
		Dirençli	Orta derecede duyarlı	Duyarlı
Penisillin G	10 µg	≤14	15-17	≥18
Vankomisin	30 µg	≤9	10-11	≥12
Rifampisin	5 µg	≤16	17-19	≥20
Kloramfenikol	30 µg	≤12	13-17	≥18
Gentamisin	10 µg	≤12	13-14	≥15
Nalidiksik asit	30 µg	≤13	14-18	≥19
Polimiksin	300 µg	≤11	12-14	≥15

Kullanılan antibiyotiklere karşı laktik asit bakterileri izolatlarının göstermiş olduğu 3 (dirençlilik, orta derece dirençlilik ve duyarlılığını) parametrenin yüzde (%) hesaplamaları Çizelge 3.6' da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Anne sütünden izole edilen LAB suşlarının direnç-duyarlılık durumlarının standart antibiyotiklerle karşılaştırması (%) n=11

Antibiyotikler	Duyarlı (%)	Orta derecede duyarlı (%)	Dirençli (%)
Penisillin G	0.0	18.2	81.8
Vankomisin	0.0	0.0	100
Rifampisin	36.4	54.6	9.0
Kloramfenikol	100	0.0	0.0
Gentamisin	0.0	0.0	100
Nalidiksik asit	0.0	0.0	100
Polimiksin	0.0	0.0	100

Çizelge 3.6'da görüldüğü gibi LAB suşları en yüksek duyarlılığı kloramfenikol'e karşı (% 100) gösterirken, en düşük duyarlılık ise rifampisin'e (% 36.4) karşı gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatlar en yüksek orta dereceli duyarlılığı rifampisin'e (% 54.6) karşı gösterirken, en düşük orta dereceli duyarlılığı ise penisilin G' ye (% 18.2) gösterdiği belirlenmiştir. Suşlar en yüksek direnci vankomisin, gentamisin, nalidiksik asit ve polimiksin antibiyotiklerine karşı (%100) gösterirken, en düşük direnci ise rifampisin'e (% 9.0) karşı gösterdiği tespit edilmiştir. Penisilin'e karşı 9 izolat direçli iken geriye kalan 2 izolat (6 ve 7) ise orta dereceli duyarlılık göstermiştir.

Hummel vd. (2007) laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliği üzerine yaptıkları çalışmada, *Lactobacillus, Leuconostoc, Lactococcuc, Pediococcus ve Streptococcus* cinslerine ait 45 izolat üzerinde çalışmışlardır. Bu izolatlarının, 40'ının fermente gıdalarda starter kültür olarak kullanılan, 3'ü 29 probiyotik 2' si ise ticari olarak kullanılan türlerden seçilmişlerdir. Sonuç olarak, suşların eritromisin, kloramfenikol, tetrasiklin ya da β-laktamaz dirençleri %7 gibi çok düşükken buna karşılık, aminoglikosid (gentamisin ve streptomisin) ve siprofloksasine %70 gibi yüksek direnç oluşturduğunu bildirmişlerdir .

Temmerman vd. (2003) 55 probiyotik üründen izole ettikleri toplam 268 bakterinin tanımlanmaları ve 187 suşun antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını araştırmışlardır. Bakteri suşlarının % 79'u kanamisine, % 65'inin vankomisine, %26'sının tetrasikline, %23'ünün penisilin G, % 16'sının eritromisine ve %11'inin ise kloramfenikol 'e karşı dirençlilik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Anne sütünden izole ettikleri *L. rhamnosus* GG, *L. fermentum* CECT5714, *L. gasseri* CECT5714 ve *L. gasseri* CECT5715 suşlarınının gentamisin, siprofloksasin, kanamisin, nalidiksik asit ve trimethoprime karşı dirençli, ampisilin, amoksisilin, kloramfenikol, sefalotin, eritromisin, penisilin ve tetrasikline ise duyarlı olduğunu belirlemişlerdir (Martin vd., 2005a ; 2005b). *S. salivarus* spp. *thermophilus*'un genel olarak kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin ve siprofloksasin'e duyarlı, gentamisin, kanamisin ve streptomisin'e ise dirençli olduğu bildirilmiştir (Ammor vd., 2007a; 2007b). Temmerman vd. (2003) 55 adet probiyotik üründen izole ettiği 187 adet LAB izolatının % 79'unun kanamisin, % 65'inin vankomisin, % 26'sının tetrasiklin, % 23'ünün penisilin, % 16'sının etiromisin, % 11'inin ise kloramfenikole dirençli olduğunu bildirmiştir. Bu suşlarının % 64' ünde ise çoklu antibiyotik dirençliliği bulunmuştur.

Barton ve Wilksin (2001) toplam 1286 kümes hayvanı örneğinden izole ettikleri Enterococcus cinsine ait bakterilerin antibiyotik dirençlerini test etmişlerdir. Araştırmada, 160 izolat vankomisine karşı duyarlı bulunurken, 109 izolat vankomisine dirençli, 92 izolat ise yüksek seviyede dirençli bulunmuştur. Diğer 17 izolat ise, düşük seviyede direnç göstermiştir. *Enterococcus faceum* ise en çok izole edilen tür olarak bulunmuştur. İsveç'te perakende satışa sunulan tavuklardan izole edilen Enterococcus türlerinin tetrasiklin, eritromisin ve vankomisin gibi antibiyotiklere karşı dirençli olduğunu belirlemişlerdir sucuk ve çiğ sütten izole ettikleri Enterococcus türlerinin, tetrasiklin, kloramfenikol, gentamisin, eritromisine karşı dirençli olduklarını belirlemişlerdir.

Yılsay vd. (2000) yaptıkları araştırmada *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. mundtıs* ve *E. hırae* türlerine ait 101 izolatın, 13 farklı antibiyotiğe karşı dirençlerini Kirby- Bover disk testi ile saptamışlar ve izolatların çoğununun streptomisin, oksasilin, eritromisin ve vankomisine karşı yüksek direnç gösterdiklerini ve beyaz peynirden izole edilen suşların % 89.1'inin streptomisine, % 88.1'inin oksasiline, % 93'ünün eritromisin ve % 86.1'inin vankomisine dirençli olduklarını bulmuşlardır.

Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, ve Leuconostoc cinslerine ait 45 LAB suşunun kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin ve β-laktam (% 7)'ye, karşılık siprofloksasine, gentamisin ve streptomisin karşı % 70'den daha çok direnç gösterdikleri bildirilmiştir (Hummel vd., 2007).

Ammor vd. (2007) *Lactobacillus, Lactococus* ve *Bifidobakterium*'un antibiyotik direnç profilleri oldukça farklı olduğunu belirtmişlerdir. Bazı LAB'leri basitrasin, sefoksitin, siprofloksasin, fusidik asit, kanamisin, gentamisin, metronidazol, nitrofurantoin, norfloksasin, streptomisin ve vankomisin karşı yüksek doğal dirençlilik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, LAB genellikle peniciline (piperacilin ve ampicilin) ve ß-laktamaz inhibitörlerine karşı duyarlı olduğu, fakat oxacillin ve sefhalosporinlere karşı çok dirençli olduğunu belirtmişlerdir (Daniels vd., 2003). Ayrıca çalışmamızda, antibiyotik dirençlilik testinin sonucunda, suşların test edilen antibiyotiklere karşı genellikle duyarlı oldukları belirlenmiştir. Literatürde laktik asit bakterilerinin özellikle kloramfenikol, ampisilin, gentamisin, vankomisin ve penisiline karşı duyarlılığının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

3.4. İzolatların Diğer Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkileri

Anne sütünden izole edilen laktik asit bakteri izolatlarının antibakteriyal etkileri oyuk agar difüzyon testi ile belirlenmiştir. Bu amaçla *S. aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeroginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Bacillus megaterium* DSM 32, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 ve *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883 kodlu bakterilere karşı direnç ve duyarlılık özellikleri araştırılmıştır.

Yapılan bir çalışmada, anne sütünden izole edilen *L. gasseri* CECT 5715, *L. gasseri* CECT 5714 ve *L. fermentum* CECT 5716 suşlarının pediatrik patojenlere (*S. choleraesuis, E. coli, S. aureus, Listeria spp.*) karşı antimikrobiyal etkili olduğu tespit edilmiştir (Olivares vd., 2006). Martin vd. (2004) anne sütünden izole edilen ve *L. mesenteroides*, *L. lactis*, *L. crispatus*, *L. rhamnosus* ve *E. faecalis* olarak tanımlanan LAB suşlarının yeni doğan bebeklerde *S. aureus* enfeksiyonlarına karşı korunmasında rol alabileceklerini belirtmişlerdir. Bebeklerin diyareye karşı korunmasında anne sütünün yararlı olduğu pek çok çalışma bulgularıyla desteklenmektedir (Brown vd., 1989; Lopez Alarcon vd., 1997).

Çalışmanın bu bölümünde izole edilen 11 adet laktik asit bakterisinin diğer bakteriler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Oyuk agar difüzyon yöntemi kullanılarak yapılan, çalışmada kullandığımız test bakterileri üzerinde hiç bir etkisi olmadığı teyit edilmiştir.

4. SONUÇ ve ÖNERİLER

Anne sütünün bebek bağırsak mikroflorasının başlaması, gelişimi ve kompozisyonunda önemli bir faktör olduğu bilinmektedir. Bunun doğal bir sonucu olarak da memeden beslenen bebeklerin bağırsak florası mama ile beslenen bebeklerinkinden farklılık gösterir. Yenidoğan bebekler özellikle bulaşıcı hastalıklara duyarlıdır. Anne sütünden insan sağlığı için yararlı bakteriler izole edilirse bunlar, üzerinde önemle durulması gereken probiyotik organizmalar olarak değerlendirilebilir. Çünkü bu bakteriler insan orijinli olduklarından güvenilirlik, uzun süreli kullanılabilirlik ve süt ürünlerine adaptasyon gibi insan probiyotiklerinde aranan bazı temel kriterleri doğal olarak karşılayabilirler (Martin vd., 2004).

Anne sütünden izole edilen LAB suşlarının genetik elementleri, antimikrobiyal direçlilik gibi özelliklerinin belirlendiği bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Van Eğitim ve Araştırma Hastahanesi Süt Çocuğu Servisinden Etik Kurulu izni ile annelerden toplanan süt örneklerinden LAB'lar izole edilmiştir. Bu izolatların bazı kimyasal ve evrensel 16S rRNA primeri kullanılarak PCR ile tanımlanması yapılmış ve sonuç olarak toplam 24 adet şüpheli LAB elde edilmiştir. Bu izolatların evrensel 16S rRNA primeri ile hazırlanan PCR ürünlerinin sekans analizi yapılmış ve izolatların 5'i *Lactobacillus*, 5'i *Pediococcus* ve 1'i ise *Enterococcus* cinsine yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Laktik asit bakteri suşlarından izole edilen plazmit sayıları 1 ila 5 arasında değişmektedir. Plazmitler büyüklükleri yönünden değerlendirildiğinde, en büyük plazmitin yaklaşık 10000 bç'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Laktik asit bakteri izolatlarında toplam 3 (6, 10 ve 24) tanesinde tek plazmit var iken 17, 22 ve 23 nolu izolatlarda ise 2 plazmit varlığı tespit edilmiştir.

Antibiyotiklere karşı dirençliliğin belirlenmesi için yapılan çalışmada LAB suşları en yüksek duyarlılığı kloramfenikol'e karşı (% 100) gösterirken, en düşük duyarlılık ise rifampisin'e (% 36.4) karşı gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatlar en yüksek orta dereceli duyarlılığı rifampisin'e (% 54.6) karşı gösterirken, en düşük orta dereceli duyarlılığı ise penisilin G' ye (% 18.2) gösterdiği belirlenmiştir. Suşlar en yüksek direnci vankomisin, gentamisin, nalidiksik asit ve polimiksin antibiyotiklerine karşı (%

100) gösterirken, en düşük direnci ise rifampisin'e (% 9.0) karşı gösterdiği tespit edilmiştir. Penisilin'e karşı 9 izolat direçli iken geriye kalan 2 izolat (6 ve 7) ise orta dereceli duyarlılık göstermiştir. İzole edilen 11 adet laktik asit bakterisinin diğer bakteriler üzerindeki etkileri incelendiğinde test bakterileri üzerinde hiç bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir.

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre izolatların incelenen bütün özellikleri ele alındığında; plazmit sayısı az olan, antibiyotiklere karşı dirençli ve patojen mikroorganizmalar üzerindeki etkilerine göre anne sütünden izole edilen laktik asit bakterileriden 6, 10 ve 24 nolu izolatların gıda endüstrisinde kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

5. KAYNAKLAR

Ahmad, V., Khan MS., Jamal QMS., Alzohairy MA., Karaawi MA., Siddiqui SD., 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. International Journal of Antimicrobial Agents, 49, 1–11.

Ahmed, E.F. , 2003. Genetically modified probiotics in foods. Trends in Biotechnology, 21 (11), 491 - 497.

Alan, Y., 2014. Doğal *Lactobacillus plantarum* izolatlarının gıda güvenliği ve aromatik özeliklerinin araştırılması. Doktora Tezi, Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, Türkiye.

Albesharat, R., Ehrmann, M.A., Korakli, M., Yazaji, S., Vogel, R.F., 2011. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. Systematic and Applied Microbiology, 34, 148-155.

Ammor, M.S., Florez, A.B., Van Hoek, A.H.A.M., De Los Reyesgavilán, C.G., Aarts, H.J.M., Margolles, A., Mayo, B., 2008. Molecular chracterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 14 (1-3), 6- 15.

Ammor, M.S., Mayo, B., 2007a. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. Meat Science, 76, 138-146.

Ammor, M.S., Florez, A.B., Mayo, B., 2007b. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiology, 24(6), 559-570.

Anderson, D.G., Mckay, L.L., 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. Applied and Environmental Microbiology, 46 (3), 549- 552.

Anonymous, 1999. Yoğurt Standardı. TS 1330. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Arunachalam K.D., 1999. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. Nutrition Research, 19, 1559–1597.

Aslım, B., Beyatlı, Y., 2004. Antibiotic resistance and plasmid DNA contents of *Streptoccoccus thermophilus* strains isolated from Turkish yogurts, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 28, 257-263.

Aslim, B., Kilic, E., 2006. Some probiotic properties of vaginal lactobacilli isolated from healthy women. Japanese Journal of Infectious Diseases, 59, 249- 253.

Ayhan K., 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar. 2. Baskı. Sim Matbaacılık. Ankara.

Barton, M.D., Wilkins, J., 2003. Antibiotic Resistance in Bacteria Isolated from Poultry, RIRDC Publication, NO:01/105 USA, (2001).

Bizani, D., Morrissy, J.A.C., Dominguez, A.P.M., Brandelli, A., 2008. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. International Journal of Food Microbiology, 121 (2), 229-233.

Brown, K.H., Black, R.E., Lopez, R.G., Creed, K.H., 1989. Infant feeding practices and their relationship with diarrheal and other diseases in Huascar (Lima), Peru. Pediatrics, 83, 31-40.

Collins, C.H., Lyne, P.M., Grange, J.M., 1989. Microbiological Methods. Sixth Edition, Butterworths and Co. Ltd. 410s, London

Çataloluk, O., Göğebakan, B., 2004. Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey, FEMS Microbiology Letters, 236, 7-12.

Çelik, H., Durak, Y., Uysal, A., 2016. Bazı ticari ve ev yapımı yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları, Selçuk Üniversitesi Fen Fakultesi Fen Dergisi, 42 (2), 149-160.

Daniels, J.A.R., Krishnamurthi, S.S., Rizvi, H. 2003. A Review of effects of carbondioxide on microbial growth and food Quality. Journal of Food Protection, 48, 532-537.

Danielsen, M., Wind, A., 2003. Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobialagents. International Journal of Food Microbiology, 82 (1), 1-11.

Darragh, A., 2002. Human Milk., Massey University, Palmerston North, New Zealand Elsevier Science, 1350-1360

De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.M., Weckx, S., 2014. Microbial ecology of sourdough fermentations. Diverse or uniform. Food Microbiology, 37, 11-29.

Devriese, L.A., Pot, B., 1995. The genus Enterococcus in The Lactic Acid Bacteria,_The Genera of Lactic Acid Bacteria, Volume 2, edited by B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel (Blackie Academic& Professionals, Glasgow), p327–367.

Dilsiz, N., 2009. Moleküler Biyoloji. Palme Yayıncılık No:279, Ankara, p49.

Elder, J.K., Southern, E.M., 1983. Measurement of DNA length by gel electrophoresis comparison of methods for plating mobility of fragment length. Analytical Biochemistry, 170, 38-44.

Esperanza, F.R., M.D., Ricarchito, B.M., 1989. Antimicrobial activity of breastmilk against common pediatric pathogens. Philippine Journal of Microbiology and Infectious Diseases, 18 (2), 67-74.

Evren M, Apan M, Tutkun E, Evren S. 2011. Geleneksel Fermente Gıdalarda Bulunan Laktik Asit Bakteriler. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, 9, 11-17.

Fallon, S., Enıg, M.G., 1999. Nourishing Traditions (2nd Edition), New Trends Publishing. 688p.

Favier C.F., Vaughan E.E., de Vos W.M., Akkermans, A.D.L., 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. Applied and Environmental Microbiology, 68(1), 219–226.

Favret, M.E., Yousten, A.A., 1989. Thuricin: the bacteriocin by a Bacillus thuringiensis. Journal of In vertebrate Pathology, 53 (2), 206-216.

Fernández, C., Reigstad, C.S., Backhed, F., 2009. Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. Journal of Pediatr Gastroenterology Nutrition, 48, 249-56.

Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martin, R., Rodríguez, J.M., 2013. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. Pharmacologial Research, 69, 1-10.

Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., 1999. Enterococci at the crossroads of food safety. International Journal of Food Microbiology, 47,1–24.

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

German, J.B., Dillard, C.J., Ward, R.E., 2002. Bioactive components in milk. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 5(6), 653-658.

Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R., 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. Trends in Food Science and Technology, 16 (1), 57-69.

Gorbach S., 2002. Probiotics in the third millennium. Digestive and Liver Disease, 21, 2–7.

Gücin, F., Dülger, B., 1995. Genel Mikrobiyoloji Laboratuar Kılavuzu. Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları No: 3, Ders Kitabı No:1, p155, Bursa.

Hamilton-Miller, J.M.T., Shah, S., 1998. Vancomycin susceptibility as an aid to the ıdentification of lactobacilli. Letters in Applied Microbiology, 27, 121-123.

Hammes W.P., Vogel R.F., 1995. The genus Lactobacillu in The Lactic Acid Bacteria.The Genera of Lactic Acid Bacteria, Volume 2, edited by B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel (Blackie Academic& Professionals, Glasgow), p19–54.

Han, J.H., Chen, D.H., Li, S.S., Li, X.F., Zhou, W.W., Zhang, B.L., Jia, Y.M., 2015. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus strains. Italian Journal of Food Science, 27, 282–289.

Hardie, J.M., Whiley, R.A., 1995. The genus Streptococcus in The Lactic Acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria, Volume 2, edited by B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel (Blackie Academic& Professionals, Glasgow), p55-124.

Hébert, G.A., 1990. Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype staphylococcus lugdunensis and staphylococcus schleiferi. Journal of Clinical Microbiology, 28 (11), 2425- 2431.

Heikkila, M.P., Saris, P.E.J., 2003. Inhibition of Staphylococcus aureus by the commensal bacteria of human mik. Journal of Applied Microbiology, 95, 471-478.

Hummel, A., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., 2007. Characterisation and Transfer of Antibiotic Resistance Genes From Enterococci Isolated From Food. Systematic and Applied Microbiology, 30, 1- 7.

İşleroğlu, H., Yildirim, Z., Demirpençe, Y., Yildirim, M., 2008. Enterekokların Biyokimyasal, Fizyolojik Ve Fonksiyonel Özellikleri ile Patojenitesi. Akademik Gıda Bilimi ve Teknolojis Dergisi, 6 (3), 16-26.

Kao, Y. T., Lıu, Y. S., Shyu, Y. T. 2006. Identification of *Lactobacillus* spp. In probiotic products by real- time PCR and melting curve analysis. Food Research International, 40, 71- 79.

Karaoğlu, Ş.A., Aydın, F., Kılıç, S.S., Kılıç, A.O., 2003. Antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by vaginal lactobacilli. Turkish Journal of Medical Sciences, 33, 7-13.

Khalid, K., 2011. An Overview of Lactic Acid Bacteria. International Journal of Biosciences, 1 (3), 1-13.

Kirjavainen, P.V., Apostolou, E., Arvola, T., Salminen, S.J., Gibson, G.R., Isolauri, E., 2001. Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 32, 1 –7.

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

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. Applied and Environmental Microbiology, 57, 3390–3393.

Klingberg, T.D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D., Buddle, B.B., 2005. Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian- Type fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, 105, 419-431.

Kurt, Ş., Zorba, Ö., 2005. Bakteriyosinler ve gıdalarda kullanım olanakları. YYÜ Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 16 (1), 77-83.

Lederberg, J., 1998. Personal Perspective, Plasmid (1952-1997). Plasmid, 39, 1-9.

Lopez Alarcon, M., Villalpando, S., Fajardo, A., 1997. Breast-feeding lowers the frequency and duration of acute respiratory infection and diarrhea in infants under six months of age. The Journal of Nutrition, 127 (3), 436- 443.

Lönnerdal, B., 2000. Breast milk: a truly functional food. Nutrition, 16 (7/8), 39-86.

Lukasova, J., Sustackova, A., 2003. Enterococci and Antibiotic Resistanc. Acta Veterinary Brno, 72, 315-323.

Mackie, R.I., Sghir, A., Gaskinsvitro, H.R., 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. The American Journal of Clinical Nutrition, 69, 1035–1045

Macrina, F.L., Kopecko, D.J., Jones, K.R., Ayers, D.S., McCoven, S.M., 1978. A multiple plasmid containing Escherichia coli strain: Conveinent source of size reference plasmid molecules. Plasmid, 1, 417-420.

Marques, T.M., Wall, R., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Ryan, C.A., Stanton, C., 2010. Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. Current Opinion Biotechnology, 21, 149-156.

Martin, R., Heilig, G.H.J., Zoetendal, E.G., Smidt, H., Rodriguez, J.M., 2007. Diversity of the Lactobacillus group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. Journal of Applied Microbiology, 103, 2638-2644.

Martin, R., Jimenez, E., Heilig, H., Fernandez, L., 2008. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-DGGE and qRTi-PCR. Applied Environmental Microbiology, 75, 965-969.

Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Olivares, M., Boza, J., Jiménez, J., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, M.J., 2004. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. Trends in Food Science and Technology, 15, 12–27.

Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T., 2005a. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. Journal of Applied Microbiology, 98, 1177–1190.

Martin, R., Olivares, M., Marin, M.L., Fernandez, L., Xaus, J., Rodriguez, J.M., 2005b. Probiotic potential of 3 *lactobacilli strains* isolated from breast milk. Journal of Human Lactation, 21(1), 8-17.

Mathur, S., Singh, R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria- A Review. International Journal of Food Microbiology, 105, 281-295.

Mayo, B., Gonzalez, B., Arca, P., Snarez, J.E., 1994. Cloning and expression of theplasmid encoded p-D-galactosidase gene from a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. FEMS Microbiology Letters, 122 (1-2), 145–152.

Morelli, L., 2008. Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition. The Journal of Nutrition, 138, 1791-1795.

Morelli, L., Vescovo, M. and Bottazzi, V., 1983. Identification of chloramphenicol resistance plasmids in Lactobacillus reuteri and *Lactobacillus acidophilus*. International Journal of Microbiology, 1, 1–5.

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.

O'Sullivan, L.O., Ross, R.P., Hill, C., 2002. Potential of bacteriocin producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie, 84, 593-604.

Olivares, M., Diaz-Ropero, M.P., Martin, R., Rodriguez, J.M., Xaus, J., 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus strains* isolated from breast milk. Journal of Applied Microbiology, 101, 72-79.

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

Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., Soccol, C.R., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification properties and use as biopreservatives. Brazillian Archives of Biology and Technology, 50 (3), 521-542.

Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G., M, Teuber., 1997. Antibiotic resistance spread in food. Nature, 389, 801-802.

Pouwels, P.H., Leer, R.J., 1993. Genetics of Lactobacillius plasmids and gene expression. Antonie van Leeuwenhoek, 64 (2), 85–107.

Prentice, A., 1996. Constituents of human milk. Food and Nutrition Bulletin, 17(4), 305-305

Pringsulaka, O., Thongngam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., Rangsiruji, A., 2012. Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acidbacteria isolated from thai fermented meat and fish. Food Control, 23 (2), 547-551.

Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Kumar, E.V., 2008. Amylolytic Bacterial Lactic Acid Fermentation. Biotechnology Advances, 26 (1), 22-34.

Reid, G., Howard, J., Gan, B.C., 2001. Can bacterial interference prevent infection. Trends in Microbiology, 9, 424–428.

Riley, M.A., Wertz J.E., 2002. Bacteriocins: Evolution, ecology and epplication. Annual Reviews in Microbiology, 56, 117-137.

Romero, D.A., Klaenhammer, T.R., 1990. Characterization of Insertion-Sequence is 946, an iso iss1 Element, Isolated from The Conjugative Lactococcal Plasmid Ptr2030. Journal of Bacteriology, 172, 4151-4160.

Saavedra, J.M., 2001. Clinical applications of probiotic agents. The American Journal of Clinical Nutrition, 73, 1147–1151.

Salminen, S., Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Sandholm, T.M., 1998. Demonstration of safety of probiotics- a review. International Journal of Food Microbiology, 44, 93-106.

Salminen, S., 1999. Probiotics: Scientific support for use. Food Technology, 11, 53–66.

Schoneck, A., Kaufmann, K., 1998. The Cultured Cabbage: Rediscovery the Art of Making Sauerkraut, Alive Books, p80.

Sgorbati, B., Biavati, B., Palenzona, D., 1995. The genus Bifidobacteriu in The Lactic Acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria, Volume 2, edited by B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel (Blackie Academic & Professionals, Glasgow), p279–306.

Stiles, M.E., Holzapfel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36, 1–29.

Sun, Z., Yu, J., Dan, T., Zhang, W., Zhang, H., 2014. Phylogenesis and evolution of lactic acid bacteria. In H. Zhang, & Y. Cai (Eds.), Lactic Acid Bacteria, (1st ed., Vol.2, pp.103-203). Netherlands: Springer.

Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Pelaez, C., Requena, T., 2007. Selective enumerationand identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus, L. acidophilus, L. paracasei subsp. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. International Dairy Journal, 17 (9), 1107-1114.

Tannock, G.W., 1999. Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria. Current Issues in Molecular Biology, 1, 53–64.

Tannock, G.W., 1997. Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D. Trends in Biotechnology, 15(7), 270–274.

Temiz, A., 1989. Et ve et ürünlerindeki laktobasillerin hızlı ve basit olarak tanımlanmaları için geliştirilen tanımlama tabloları. Gıda, 14 (6), 385-391.

Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J., 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. International Journal of Food Microbiology, 81, 1-10.

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

Tunail, N., 2009. Gıda Biyoteknolojisi. Nobel yayınları. 1. Baskı. ISBN978–605– 395–299–2.

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

Wright, A.V., Morelli, L., Vogensen, F.K., 2004. Lactic acid bacteria. Microbiological and Functional Aspects. CRC Press. Third Edition.

Wright, K.C., Fenny, A.M., 1998. The bacteriological screening of donated human milk: Laboratory experience of British Paediatric Association's published guidelines. Journal of Infection, 36, 23–27.

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, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi, Ankara, Türkiye.

Yılsay, T.Ö., Kurdal, E., 2000. Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerindeki etkisi. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri), Tekirdağ, 279-294,

Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y., 2009. Bazı laktik asit bakterilerinin fizyolojik, biyokimyasal, plazmit DNA ve protein profil özelliklerinin incelenmesi. Gıda, 34 (2), 91–98.

6. ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyadı	: Mehmet SÖNMEZ
Doğum Yeri	: MUŞ
Doğum Tarihi	: 28.09.1989
Medeni Durumu	: Bekar
Yabancı Dili	: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yılı)

Lise	: Korkut Çok Programlı Lisesi
Lisans	: Muş Alparslan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 2010 - 2015
Yüksek Lisans	: Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabili Dalı 2015 - 2018