

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANNE SÜTÜNÜN
BAKTERİYEL ANALİZİ

AYTÜL YILDIRIM
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

2008

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu çalışma, jürimiz tarafından, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ali ÇETİN.....

Üye: Doç. Dr. Naci DEĞERLİ.....

Üye: Ali Fazıl YENİDÜNYA.....

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

-----/-----/-----

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Prof. Dr. Hasan Hüseyin BAŞIBÜYÜK

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05.01.1984 tarihli toplantısında kabul edilen ve daha sonra 30.12.1993 tarihinde C. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'nce hazırlanan ve yayınlanan "Yüksek Lisans ve Doktora Tez Yazım Kılavuzu" adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
1.1. Anne Sütünün Önemi	3
1.2. Anne Sütünün İçeriği.....	4
1.2.1. Anne Sütünde Bulunan Bakteri Grupları ve Önemi.....	5
1.2.2. Anne Sütündeki Bakterilerin Orijini	9
1.2.3. Bebek Bağırsak Mikroflorasının Gelişimi ve Anne Sütünün Etkileri.....	14
1.3. Anne Sütünde Bulunan Bazı Önemli Cinsler	19
1.3.1. <i>Bifidobacterium</i>	19
1.3.2. <i>Enterococcus</i>	19
1.3.3. <i>Lactobacillus</i>	20
1.3.4. <i>Streptococcus</i>	20
1.3.5. <i>Staphylococcus</i>	21
1.4. Anne Sütü Bakterilerinin Karakterizasyonu	21
2. MATERYAL VE METOT	23
2.1. Materyal.....	23
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	23
2.1.2. Örnekler	25
2.1.3. Total DNA Özütlenmesi	26
2.1.4. Agaroz Jel Elektrofrezisi.....	28
2.1.5. 16S rRNA Geninin PCR ile Çoğaltımı.....	28
2.1.6. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi.....	29
2.1.7. Çoğaltım Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile İncelenmesi.....	29
2.1.8. Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	30
2.1.9. Kesim Ürünlerinin Temizlenmesi	30
2.1.10. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (PAGE) ile Ayrıştırılması.....	30
2.1.11. Veri Analizi.....	31

3.	BULGULAR.....	34
3.1.	Total DNA Özütleleri.....	34
3.2.	16S rDNA Bölgesinin PCR ile Çoğaltımı	35
3.3.	Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (PAGE) ile Ayrıştırılması.....	36
3.4.	Analiz.....	40
3.5.	PAGE Bant Verilerinin SPSS ile İstatistiksel Analizi.....	46
4.	TARTIŞMA ve SONUÇ.....	56
5.	KAYNAKLAR	63
6.	ÖZGEÇMİŞ	68
7.	EKLER.....	69

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi
Anne Sütünün Bakteriyel Analizi
AYTÜL YILDIRIM

Cumhuriyet Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA

Anne sütü, neonatal bağırsak mikroflorasının kompozisyonunda, başlaması ve gelişiminde önemli bir faktördür. Anne sütünde bulunan bakterilerin orijini tartışılmaktadır ve en azından bazı türlerin maternal bağırsaktan meme bezlerine içsel olarak taşıyıp olabileceği önerilmiştir. Bu tür hipotezler tartışılır olabilir ancak bu büyüleyici alanda ileriki araştırmaları tetikleyebilir. Bu çalışmada, hamile bireylerden doğuma kadar her ay fekal örnekler, doğumdan sonra ise, iki haftada bir düzenli olarak süt örnekleri alındı. Doğrudan total DNA özütleme takiben PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile bakteri 16S ribozomal RNA genleri çoğaltıldı. Çoğaltım ürünleri *Taq* I, *Hae* III restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesim ürünleri PAGE (poliakrilamid jel elektroforezi) ile ayrıştırıldı. Bant profillerinden bir veri matrisi oluşturuldu ve PAUP programı ile analiz edildi. Oluşturulan UPGMA dendrogramı kontrol, fekal ve süt örnekleri arasında ortak bir mikrofloranın varlığına işaret etmiştir. Sonrasında veriler SPSS programı yardımıyla frekans dağılımı, *ki-kare* (χ^2) ve korelasyon testleri ile analiz edildi. Süt örneklerinden elde edilen sonuçlar birbirleriyle, kontrol olarak annelerin kendi fekal örnekleriyle ve hamile olmayan kontrol bireylerin fekal örnekleri ile karşılaştırıldı. Sonuç olarak, süt örnekleri arasında kişisel farklılıklara rağmen, istatistiksel olarak anlamlı benzerlikler görüldü. Annelerin sütleri ve fekal örnekleri kıyaslandığında ise üç kişide istatistiksel açıdan anlamlı benzerlikler görüldü, diğer beş kişide benzerlikler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı.

Anahtar kelimeler: 16S rRNA geni, anne sütü, yenidoğan, mikroflora.

SUMMARY**MSc Thesis****Bacterial Analysis of Human Milk****AYTÜL YILDIRIM****Cumhuriyet University****Graduate School of Natural and Applied Sciences****Department of Biology****Supervisor: Assoc. Prof. Ali Fazıl YENİDÜNYA**

Human milk is an important factor in the initiation, development and composition of the neonatal gut microflora. The origin of the bacteria found in human milk is debated and it is suggested that, at least, some species may be endogenously delivered from the maternal gut to the mammary gland. However such hypothesis can be a subject of controversy, it should stimulate further research in this fascinating area. In this study fecal samples were collected from pregnant women every month until the delivery, after delivery breast-milk samples were collected every fortnight. Following the directly total DNA extraction procedure, 16 S rRNA genes of bacteria were amplified by PCR (polymerase chain reaction). Amplification products were cut with *Taq* I and *Hae* III restriction enzymes. Digestion products were resolved by PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis). A data matrix was formed from band patterns and analyzed by PAUP programme. The resulting UPGMA dendrogram has implied a common microflora between control, fecal and milk samples. Then, data were analyzed with frequency distribution, *chi-square* (χ^2) and correlation by using SPSS programme. Human milk results were compared with each others, mothers' fecal samples and control fecal samples from randomly chosen non-pregnant individuals. In conclusion, although personal differences between the milk samples, statically significant similarities were observed. In the case of the comparison of mothers' milk and fecal samples, significant similarities were observed in three person but other five persons' similarities were insignificant.

Keywords: 16S rRNA gene, breast-milk, newborn, microflora.

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasındaki yardımlarından dolayı danışman hocam Sn. Doç. Dr. Ali Fazıl Yenidünya' ya, sevgili eşim Yrd. Doç.Dr. Olgun Kitapcı'ya ve arkadaşım Arş. Gör. Canan Karakoç'a teşekkürlerimi bildiririm.

Arş. Gör. Aytül YILDIRIM

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Probiyotik bakterilerin fonksiyonları.	8
Şekil 1.2. LAB suşlarının fetal ve neonatal bağırsağa nasıl geçirildiğini açıklayan kuramsal bir model.	13
Şekil 3.1. Süte ait total DNA örnekleri..	34
Şekil 3.2. Fekal total DNA örnekleri.....	35
Şekil 3.3. Süt DNA özütlerinin 16S rDNA gen bölgesinin PCR ile çoğaltımı.	35
Şekil 3.4. Fekal DNA özütlerinin 16S rDNA gen bölgesinin PCR ile çoğaltımı..	36
Şekil 3.5. <i>Taq</i> I ve <i>Hae</i> III kesim ürünlerinin %8' lik poliakrilamid jeldeki görüntüleri.....	38
Şekil 3.6. PAGE'deki süt örnekleri bantlarının yan yana birleştirilmiş görüntüsü	39
Şekil 3.7. Bant varlığına göre kodlanmış veri matrisinin UPGMA dendrogramında görüntüsü..	40
Şekil 3.8. Dendrogramda görülen A grubu (kararlı) bant profillerinin poliakrilamid jelde görüntüleri.	42
Şekil 3.9. A grubu kararlı bantlarının kontrol, anne fekal ve sütteki görülme sıklığı grafikleri.....	43
Şekil 3.10. PAGE bantlarına ait görülme sıklığı grafiği.....	44
Şekil 3.11. Kontrol, anne fekal ve süt örneklerinin PAGE bantlarının görülme sıklıkları grafiği.....	53

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1. Sağlıklı anne sütünden izole edilen başlıca bakteri grup ve türleri	6
Tablo 2.1. Örnekler ve alım tarihleri	23
Tablo 2.2. Örnek alınan annelerin yaş, hamilelik sayısı, beslenme ve doğum şekli çizelgesi	25
Tablo 2.3. Molekül ağırlığına göre yukarıdan aşağıya doğru değerlendirilen bant profillerine verilen numaralar ve sağdan sola bant varlığına göre kodlanmış veri matrisi.	32
Tablo 3. 1. A grubu bantların süt, anne fekal ve kontrol örneklerinde toplam görülme yüzdeleri.....	43
Tablo 3. 2. A annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkinin dağılımı.....	46
Tablo 3. 3.C annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkinin dağılımı	47
Tablo 3. 4. D annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkinin dağılımı.....	47
Tablo 3. 5. E annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkinin dağılımı	48
Tablo 3. 6. F annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkinin dağılımı	48
Tablo 3. 7. N annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkinin dağılımı.....	48
Tablo 3. 8. O annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkinin dağılımı.....	49
Tablo 3. 9. P annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkinin dağılımı	49
Tablo 3. 10. H1 hipotezi ve alt hipotezleri ile ilgili hipotez testi sonuçları.....	50
Tablo 3. 11. Anne sütü örnekleri arasında korelasyon analizi	50
Tablo 3. 12. Korelasyon katsayılarının ilişki dereceleri	51
Tablo 3. 13. Doğum şekline göre süt örneklerinin karşılaştırılması.....	53
Tablo 3. 14. Kontrol, anne fekal ve süt örneklerinde tüm bantların bulunma yüzdelerinin korelasyonu.....	55

EKLER DİZİNİ

Ek 1. Kimyasallar.....	68
Ek 2. Oligonükleotitler, Restriksiyon Enzimleri ve dNTP.....	69
Ek 3. Tamponlar ve Stok Çözeltiler.....	70

KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
bç	Baz çifti
C	Sitozin
CTAB	Setil trimetil amonyum bromür
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
G	Guanin
LAB	Laktik asit bakterileri
ITS	İçeriden transkribe edilen ara parça (internal transcribed spacer)
NET	NaCl – EDTA – Tris HCl
PAGE	Poliakrilamit jel elektroforezi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon (kesim) parçası uzunluk polimorfizmi
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
subsp.	Alttür
T	Timin
TAE	Tris asetat EDTA
TBE	Tris borat EDTA
TE	Tris EDTA
TES	Tris EDTA sodyum
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Sanatsal açıdan anne ve bebek arasındaki emzirme insanoğlunun özünü sunmaktadır. Sosyobiyojik açıdan bakıldığında ise, emzirme hayvanlar aleminde fedakarlığın doruk noktası olarak kabul edilir. Burada, amaç insanoğlunun kendi neslinin en üst düzeyde devamlılığını sağlamak için kendi vücut salgılarından oluşan, koruyucu ve besleyici nitelikli anne sütü bileşenlerini bebeğine aktarabilmektir. İnsanlar için iki tanımlayıcı özellik; büyük bir beyine ve yavaş olgunlaşma sürecine sahip olmalarıdır. Bu birleşim, etkin ve süreklilik gösteren bir öğrenme potansiyelini açığa çıkarmıştır. Böylece karmaşık bir kültürün devamlılığının sağlanması için gerekli olan bilgi, nesiller arasında aktarılabilir olacaktır. Burada atasal bireylere düşen en önemli görev annenin bebeğini emzirmesidir. 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; Martín ve Ark., 2004).

Anne immüoglobulinleri ve immüno-kompetent hücreler gibi süt bileşenlerinin ya da birçok farklı antimikrobiyal maddenin birlikte sergilediği bir koruma şekli olarak ortaya çıkabilir. 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, sağlığımıza 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 sütünün bebek bağırsak mikroflorasının başlaması, gelişimi ve kompozisyonunda önemli bir faktör olduğu bilinmektedir (Martín ve Ark., 2004). Bunun doğal bir sonucu olarak da memeden beslenen bebeklerin bağırsak florası mama ile beslenen bebeklerinkinden farklılık gösterir. Yenidoğan bebekler özellikle enfektif 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.

Son zamanlarda, hızla gelişmekte olan batı toplumlarında, artık, bebek beslenmesinde çeşitli mama formülasyonları emzirmenin yerini almıştır. Buna ek olarak, kent yaşamına adaptasyon sonucunda anne, genellikle taze ve doğal besin maddelerini kapsamayan diyet şekillerinden oluşan, yeni beslenme alışkanlıkları edinmektedir. Bu iki faktör, süreç içinde, insan popülasyonlarına ait endojen bağırsak mikrobiyotasının tamamen değişmesine neden olabilir. Bu değişimin bir işareti, gelişmiş toplumlarda sıkça görülen ve yaşlanma ile ortaya çıkan bağırsak hastalıklarıdır. Kentleşme ve kentli nüfus, toplumların gelişmesi ile doğru orantılı arttığı için; durdurulması ya da yavaşlatılması mümkün değildir. Bu nedenle, yeni beslenme alışkanlıklarının insan sağlığında yol açtığı bu türden değişimleri dengeleyebilecek çeşitli teknolojik ürünler geliştirilmektedir. Bu ürünlerin temel kaynağı yine sağlıklı insanda bulunan doğal endojen mikrofloradır. Gelişmekte olan ülkelerde, özellikle kırsal kesimlerde, bebeklerin emzirme ile beslenmesi oldukça yaygındır. Kırsal kesimlerde yaşayan, anne sütü ve doğal fermente ürünlerle beslenen insanların daha sağlıklı bağırsak mikrobiyotasına sahip oldukları düşünülebilir. Geleceğin, kırsal toplumların aleyhinde değişeceği ortak bir beklentidir ve toplumların sağlıklı kuşaklar yetiştirebilmeleri için de anne

sütünün yerini alabilecek teknolojik ürünlerin geliştirilmesi kaçınılmaz olmaktadır.

Bu çalışmada, hamilelik sürecinin ilk döneminden itibaren takibe alınan 8 anne adayından doğuma kadar birer aylık periyotlarla fekal örnekler alındı. Doğum sonrasında aynı annelerden ikişer haftalık periyotlarla altı ay süresince süt örnekleri sağıldı. Alınan fekal örnekler ile 8 hamile olmayan kadından bir defada alınan fekal örnekler total DNA özütlemesi yapıldı ve çalışmada kontrol olarak kullanıldı. Anne sütü mikroflorasının sınırlı oluşu ve PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) için yeterli miktarda DNA sağlanamaması nedeniyle alınan süt örnekleri birleştirilerek total DNA özütlemesi yapıldı. DNA özütlerinden PCR ile bakterilerin yaklaşık 1,500 bp uzunluğundaki 16S rRNA gen bölgesi çoğaltıldı. Çoğaltım ürünleri *Taq* I ve *Hae* III restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi ve kesim ürünleri elektroforez ile ayrıştırıldı. Elde edilen kesim ürünleri profilleri analiz edildi.

1.1. Anne Sütünün Önemi

Bebek, olgunlaşmamış ve doğal olarak sonradan kazanılmış bağışıklık sistemi, mikrofloraca fakir bir bağırsak, patojenleri kovma yeteneği az bir karın boşluğu ve çevreyi ağızla keşfetme eğilimi ile doğar. Mukozal bağışıklığın doğuştan gelen bileşenleri tam olarak gelişmemiştir. Böylece anne sütü, doğuştan gelen bağışıklık sistemini geliştiren bağırsağın mukozal bariyeri için önemli bir tamamlayıcıdır. Bu ve diğer hususlar göz önüne alındığında bağışıklık sağlayıcı etkisi ile anne sütü, etkin bir biyoaktif bileşim olarak araştırılmıştır. Biyoaktif bileşenler bebeği koruma potansiyeline sahiptir. Bazı süt faktörleri bir patojeni, bazıları patojen ailelerini, bazıları da patojenlerin çok geniş bir aralığını inhibe eder. Patojenin, reseptörüne bağlanmasını baskılayan bazı fonksiyonlar doğrudan; bağırsağın mikroflorasını modifiye eden fonksiyonlar da dolaylı etkilidir.

Günümüzde, anne sütünün bebeğe hem doğal bağışıklık sistemini hem de kazanılmış bağışıklık sistemini içeren pek çok koruma tipini sağladığı çok iyi bilinmektedir. Emziren anne, süt sayesinde, bebeğine pek çok koruyucu faktör

sağlar. Bu koruyucuların sayısı, potansiyel ve önemi belki de önceden düşünülmediğinden çok daha fazladır: çok sayıda etkili koruyucu, yağ asitleri ve peptitler gibi antimikrobiyal maddenin parçalanıp salınımına kadar anne sütünde bulunmazlar. Anne sütünün koruyucu yapıları patojen süreçlerin farklı basamaklarını baskılar ve koruyucu olan her bir bileşenin daha az miktarında bir sinerji yaratırlar. Bazı koruyucu bileşenler, izolasyon ve test edilmedeki zorluklar yüzünden gerçek öneminin altında nitelendirilmiştir. Son çalışmalarda anne sütünün yenidoğanların bağışıklık sistemini yapılandıran koruyucu faktörlerin etkili karışımını yüksek miktarda içerdiği ve bu şekilde annenin bebeğini enterik ve diğer hastalıklardan koruduğu vurgulanmıştır. Buradan, anne sütünün belirli patojenlere karşı zengin bir sağaltıcı kaynağı olduğu sonucuna varılabilir (Newburg, 2005). Yenidoğan ve kazanılmış bağışıklık arasındaki başarılı etkileşim sağlık için gereklidir. Çünkü mukozal yapılar pek çok patojen, alerjen ve karsinogen için giriş kapısı işlevi görmektedir. Neonatal periyot bu konuda çok kritiktir. Çünkü yenidoğan, hemen çok sayıda mikroorganizma, yabancı protein ve kimyasala maruz kalır. Kazanılmış bağışıklık doğumdan sonra değişken bir periyot boyunca neredeyse yoktur. Anne sütüyle beslenme bu nedenle önemlidir. Sadece doğal immünolojik terapi veya pasif aşılama olarak değil, aynı zamanda anne sütünün bağışıklık oluşturan faktörler içermesi nedeniyle emzirilen bebeğin bağışıklık sisteminin gelişmesinde önemli etkiye sahip olabilir (Per Brandtzaeg, 2003).

1.2. Anne Sütünün İçeriği

Anne sütü yenidoğan bebek için en uygun olan ve pek çok farklı bileşiği bir arada bulunduran biyolojik olarak kompleks bir sıvıdır (Darragh, 2002). Anne sütü; mikroorganizmalar, bağışıklık sağlayan ajanlar, besin maddeleri, iltihabi engelleyen bileşenler, hormonlar, büyüme faktörleri, enzimler gibi bileşenleri içermektedir (Hamosh, 2001; Darragh, 2002). Süt kompleks proteinler, karbohidratlar, lipitler ve polinükleotitlerden oluşan ve sayısız koruma faktörleri içeren bir kokteyl şeklinde tanımlanmıştır (German, 2002). Bu eşsiz içerik, anne sütünü besin maddesi olmanın çok daha ötesine taşımaktadır.

1.2.1. Anne Sütünde Bulunan Bakteri Grupları ve Önemi

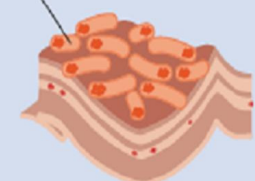
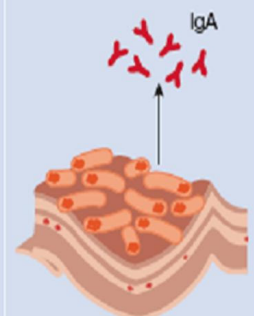
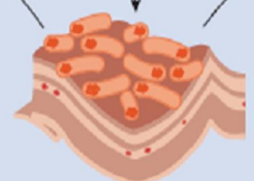
2000'li yıllarla başlayan birkaç araştırma sonucunda, anne sütü olarak bilinen biyolojik salgıdan izole edilen bakterilerin genellikle enterokok, laktobasil, mikrokok, stafilokok ve streptokok oldukları saptanmıştır. Bu bakteri grupları, bakteriyoterapötik ya da potansiyel probiyotik suşları içermektedir (Heikkilä ve Saris, 2003; Martín ve Ark., 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 bir yansımasıdır (Heikkilä ve Saris 2003; Martín ve Ark., 2004).

Tablo 1.1. Sağlıklı anne sütünden izole edilen başlıca bakteri grup ve türleri (Díaz-Ropero ve Ark., 2006; 1993; Heikkila ve Saris, 2003; Wright ve Fenny,1998; Martín ve Ark., 2004; Martín ve Ark., 2005; Gueimonde ve Ark., 2007)

BAKTERİ GRUBU	ANA TÜR
<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. epidermis</i>
	<i>S. hominis</i>
	<i>S. capitis</i>
	<i>S. aureus</i>
<i>Streptococcus</i> sp.	<i>S. salivarius</i>
	<i>S. mitis</i>
	<i>S. parasanguis</i>
	<i>S. peroris</i>
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>L. gasseri</i>
	<i>L. rhamnosus</i>
	<i>L. acidophilus</i>
	<i>L. plantarum</i>
<i>Enterococcus</i> sp.	<i>L. fermentum</i>
	<i>E. faecium</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>E. faecalis</i>
	<i>B. animalis</i>
	<i>B. bifidum</i>
	<i>B. longum</i>
	<i>B. catenulatum</i>
	<i>B. breve</i>
	<i>B. adolescentis</i>

Yukarıdaki türlere ait bakteriler, birbirinden çok uzak ülkelerde sağlıklı annelerin taze sütlerinden kolayca izole edilebilmektedir (Martín ve Ark., 2004). Bu da bu bakterilerin anne sütündeki varlığının yaygınlığına işaret eder. Böylelikle, anne sütünün doğal mikroflorasının bileşenleri olarak görülebilirler.

Anne sütünde laktobasillerin varlığı, kısmen de olsa, prebiyotik oligosakkaritlerin varlığını da açıklayabilir. Çünkü bu gibi maddeler, insandan izole edilen laktobasillerin früktozil- ve glikozil transferaz enzimleri tarafından sentezlenebilmektedir (Martín ve Ark., 2004). İnsan sütünden izole edilen bakteriler arasında, bugüne kadar, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus rhamnosus* ve *Enterococcus faecium* potansiyel probiyotik (sağaltıcı) bakteriler olarak bilinmektedir (Holzapfel ve Ark., 1998). Ayrıca *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Enterococcus faecalis* gibi anne sütü mikroorganizmaları da ticari probiyotik değere sahiptir (Klaenhammer ve Kullen, 1999, Gorbach, 2002). Probiyotikler, 1989 yılından beri konak organizmanın bağırsak mikrobiyal dengesini iyileştirmek üzere besin içine katılan canlı mikrobiyal katkı olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde probiyotik bakterilerin çoğu *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait olmakla birlikte *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* (Salminen ve Von Wright 1998), *Propionibacterium*, *Streptococcus thermophilus* (Sreekumar & Hosono, 2000) *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Sreekumar & Hosono, 2000) türleri de probiyotik olarak nitelendirilmektedir (Gorbach, 2002). Probiyotik bakterilerin canlı hücrelerinin bağırsaklarda bulunmaları halinde, bağışıklık sistemini uyardıkları ve güçlendirdikleri belirtilmiştir (Şekil 1.1.) (O'Hara ve Shanahan, 2006).

Koruyucu fonksiyonlar	Yapısal fonksiyonlar	Metabolik fonksiyonlar
<p>Patojenle yerdeğiştirme (Amonyak, indol, merkaptan, toksik aminler sülfidler gibi maddeler üreten)</p> <p>Besin ve reseptör yarışı</p> <p>Bakteriyosin ve laktik asitler gibi anti mikrobiyal faktörlerin üretimi</p>	<p>Bariyer güçlendirme</p> <p>IgA'nın göreve getirilmesi</p> <p>Bağışıklık sisteminin gelişmesi</p>	<p>Besinlerle alınan karsinojenleri metabolize etme</p> <p>Vitaminlerin sentezi (Biotin, folik asit gibi B grubu vitaminleri ve K vitamini)</p> <p>Sindirilemeyen besin artıkları ve endojen kökenli mukusun fermente edilmesi</p> <p>İyon absorpsiyonu</p> <p>Enerji sağlama</p>
<p>Kommensal Bakteriler</p> 	<p>IgA</p> 	<p>Kısa zincir yağ asitleri</p> <p>Mg²⁺ Ca²⁺ Fe²⁺</p> <p>Vitamin K Biotin Folate</p> 

Şekil 1.1. Probiyotik bakterilerin fonksiyonları (O'Hara ve Shanahan, 2006).

İnsan vücudunun mukoz membranları dış çevre ile doğrudan etkileşim halindedir ve çok sayıda farklı bakterilerle kolonize olmuştur. Mukoz yüzeyler pek çok savunma mekanizması ile korunmaktadır. Çünkü bu bölgeler patojenler tarafından giriş kapısı olarak görülür ve özellikle neonatal dönem bu konuda önemlidir (Per Brandtzaeg, 2003).

Bağırsak, 7 m uzunluğunda ve yaklaşık 400 m² yüzey alanına sahip bir organdır. Bu geniş yüzey yaklaşık 100 trilyon bakteri hücrelerini (1,5 kg), barındırmaktadır. Bağırsağın normal flora ile erken kolonizasyonu, bağırsak koruma bariyerinin oluşumu için son derece önemlidir. Bağırsak mikroflorası konağın anatomik, fizyolojik ve immünolojik gelişiminde temel bir role sahiptir (Herich ve Levkut, 2002). Bağırsak bakterileri, bağırsakla ilişkili lenfoid dokunun gelişimi için birincil ve çok önemli bir tetikleyici olarak görülür ve anti-alerjik süreçleri yönetirler (Kalliomäki ve Ark., 2001). Doğumu izleyen ilk aylar

boyunca, özel olarak anne sütüyle beslenme, çocukluk çağında rastlanan atopik dermatit ve astım gibi hastalıkların sıklığını azaltmaktadır (Gdalevich ve Ark., Martín ve Ark., 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 etkidir (Kirjavainen ve Ark., 2001). Laktik asit bakteriler (LAB) dışında kalan bazı diğer bakteri türlerinin de bebekleri hastane ortamında bulunan bazı patojen bakterilere karşı koruduğu saptanmıştır (Martín ve Ark., 2004; Tannock, 1997). Örneğin metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un bebeklerde oral kolonizasyonu, *Streptococcus viridans* tarafından engellenebilmektedir (Martín ve Ark., 2004). Burada ilginç olan bir nokta da *Streptococcus viridans*'ın sağlıklı bebek bağırsağı mikrobiyotasında bulunmasıdır (Kirjavainen ve Ark., 2001).

Gelişimin erken döneminde yararlı bakteri alımı, bağırsak kolonizasyonunun kritik periyodu ile çakıştığı için, bağırsak kolonizasyonun oluşması ve devam etmesi açısından önemlidir.

1.2.2. Anne Sütündeki Bakterilerin Orijini

Anne sütünde bulunan bakterilerin orijini 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 ve Ark., 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 (Martín ve Ark., 2004).

Komensal stafilokoklar ve streptokoklar anne sütündeki baskın bakteri türleri arasındadır (Martín ve Ark., 2004; Heikkila ve Saris, 2003). Koagülaz-negatif stafilokoklar ile *S. epidermidis* gibi baskın türlerin, emzirme sürecinde anne sütünden köken aldıkları düşünülmektedir (Martín ve Ark., 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 ve Ark., 1999). Bu nedenle, streptokokların bebek ağızından 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.

İnsan laktobasil ve enterekokları genellikle mukozal ilişkili bakterilerdir ve hem gastrointestinal hem de ürogenital bölgelerden kolayca izole edilebilir. Heikkila ve Saris (2003) süttten birkaç LAB türü (*Lb. crispatus* gibi) izole ettiler ve bu türlerin sağlıklı kadınlarda baskın vajinal laktobasiller olduğundan bunların vajinal orijine sahip olduğunu ileri sürdüler (Martín ve Ark., 2004; Heikkila ve Saris, 2003). Bazı süt LAB türlerinin orijinini açıklamadaki zorluklar yeni iddiaları da beraberinde getirmektedir. Anne bağırsağında bulunan LAB'lerinin bazıları endojen bir yol izleyerek meme bezlerine ulaşabilir; yani bağırsak LAB'leri, sağlıklı konaklarda bağırsaktan farklı bölgelere yayılmak için yetenekli olabilirler.

Laktobasillerin yan etkilerinin rapor edildiği vakalar çok nadirdir. Fakat endokardit, zehirlenme veya karaciğer apsesi gibi birkaç vaka rapor edilmiştir. Genellikle hastalarda arka plandaki hastalık ile birlikte ortaya çıkmıştır (Alvarez–

Olmos ve Oberhelman, 2001; Martín ve Ark., 2004). Karaciğer apseleri vakası, *Lb. rhamnosus GG* içeren ürünlerin büyük miktarlarda tüketilmesinden kaynaklanabilmektedir. Bu gibi bulgular, sağlıklı bir konak içinde neler olabileceğini yansıtmasa da, laktobasillerin bağırsaktan diğer organlara yayılmak için bazı mekanizmalara sahip olduklarına işaret etmektedir. Son zamanlarda, oral yoldan alınan probiyotik laktobasillerin endojen yollarla vajinaya taşınmayarak olabileceğine yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Martín ve Ark., 2004). Her ne kadar LAB'lerinin bağırsak epitelini geçerek meme bezlerine ulaşabildikleri mümkün ise de diğer yollar henüz bilinmemektedir. Gelecekteki çalışmalar daha tutarlı açıklamalar sunabilir.

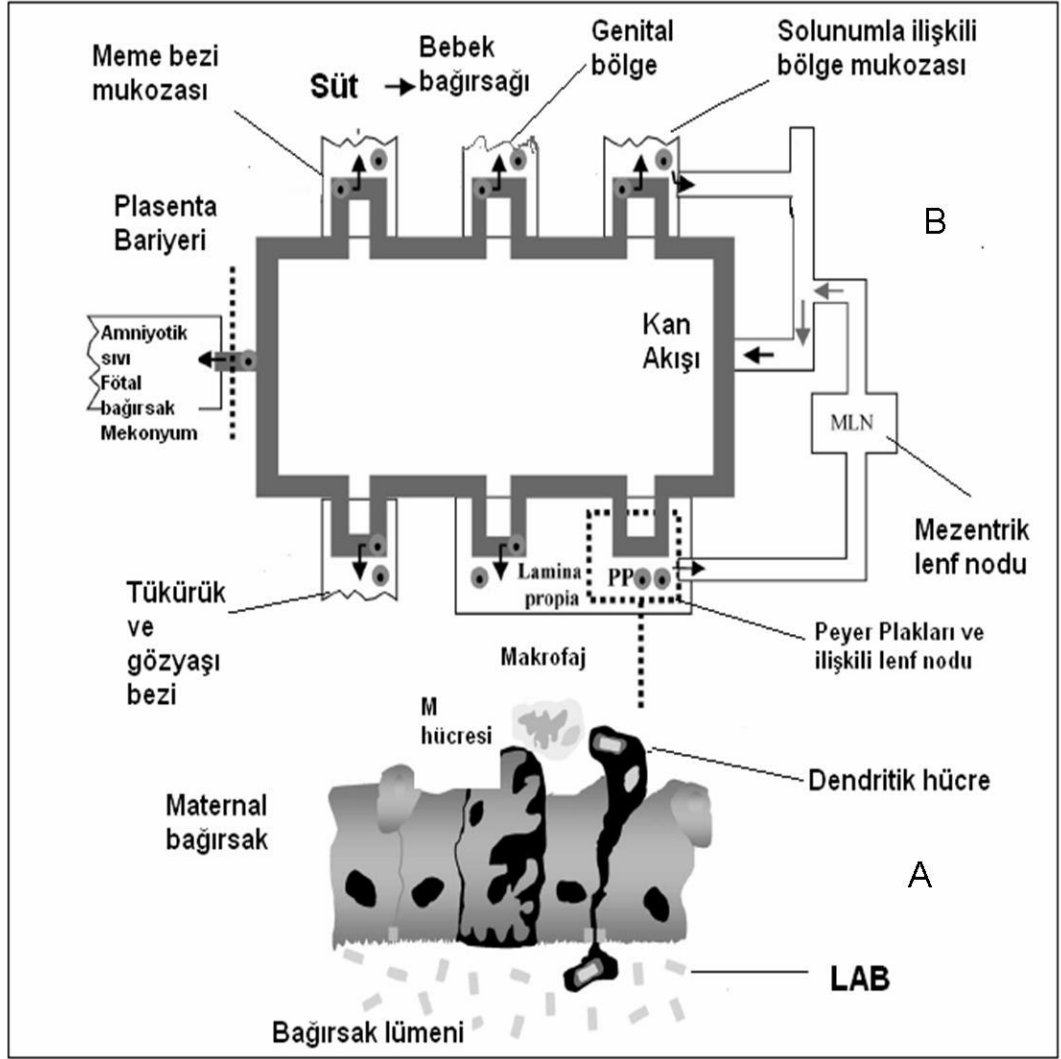
Patojenlerin ifade edilen istila genleri ile bağırsak mukozasına geçişinin, başlıca M hücreleri ve Peyer plaklarında yerleşen özelleşmiş epitel hücreleri aracılığı ile gerçekleştiğine inanılmaktadır. Son zamanlarda dendritik hücrelerin, bakterileri bağırsak lümeninden doğrudan yakalamak için bağırsak epiteline nüfuz edebileceği gösterilmiştir (Martín ve Ark., 2004).

Dendritik hücreler, primer bağışıklık yanıtında antijen sunucu hücreler arasında en etkili olanıdır. Antijenlerin sunumu ve T-hücrelerinin uyarılmasında rol alır. Kemik iliği, ince ve kalın bağırsağın mukozal yüzeyleri gibi pek çok mukozal yüzeyde bulunurlar. Dendritik hücreler bağırsak epitel hücreleri arasındaki dar bağlantı yerlerini açabilme yeteneğindedir. Bu özellikleri sayesinde, bakterilerin lümeninden alınarak antijen sunucu hücreler ile taşınmalarına aracı olurlar (Stagg ve Ark., 2004). Sıkı bağlantı proteinlerinin ifadesi sayesinde epitel doku bariyerinin bütünlüğünü muhafaza ederken, dendritlerini epitelin dışına uzatır ve doğrudan bakterileri yakalarlar. Böyle bir mekanizma kullanan patojenite adası I (SPI) tarafından kodlanmış istila genlerinden yoksun bir *Salmonella typhimurium* suşu, farelere oral uygulama sonrasında, dalağa ulaşabilmektedir (Martín ve Ark., 2004). Bağırsak bakterilerini taşıyan antijen sunucu dendritik hücreler, farelerin mezenterik lenf düğümlerinde de incelenmiştir (Stagg ve Ark., 2004). Komensal kökenli bakterileri taşıyan dendritik hücreler bu bakterilerle birlikte hareket

edebilmektedir. Ayrıca bağırsak bakterilerinin doku altına translokasyonu ve penetrasyonu, hayvanlarda ve sağlıklı insanlarda pek çok kez gözlenmiştir. Mukozal bağışıklık sistemi bu bakteriler tarafından şekillendirildiği için, bu bakteriler son derece önemlidir.

Dendritik hücreler normalde diğer bölgelerde de bulunmalarına karşın, kalın bağırsaktaki sayıları çok daha fazladır. Komensal bakteriler, immünmodülatör etkilerinin yanı sıra, mikrobiyal ürünleriyle dendritik hücreleri ve dolayısıyla da dendritik hücrelerin fonksiyonlarını modüle edebilirler. Komensal bakteriler; dendritik hücrelerin aktivasyonlarını epitel hücrelerle, sitokin ve kemokin modülasyonu ile ya da doğrudan dendritik hücrelere etki ederek azaltabilmektedir. Bu durumda komensal bakterilerin, dendritik hücrelerin aktivitelerini düzenlediği düşünülebilir. Buna karşılık olarak, dendritik hücreler kalın bağırsakta komensal florayı düzenlemekten sorumlu olabilir (Stagg ve Ark., 2004).

Dendritik hücreler, diğer lenfosit hücreler ve makrofajlar, mukozal lenfoid dokular arasında yerdeğiştirebilirler. Antijen sunan hücrelerin, bağırsak mukozasından solunum, genital bölgeler, tükürük ve gözyaşı bezleri ve en önemlisi süt veren meme bezi gibi uzak mukozal bölgelere taşınıp kolonize oldukları bilinmektedir. Buna ek olarak, emzirme dönemi boyunca bağışıklık sistemi hücreleri tarafından meme bezinin kolonizasyonu hormonlar tarafından düzenlenen seçici bir süreçtir. Bu süreç anne sütünde bu gibi hücrelerin bolluğundan sorumludur. Son zamanlarda *S. typhimurium* DT 104'ün bebeklere iletiminin anne sütü ile olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada bakterinin başlangıçta maternal bağırsakta yerleştiğini ve bahsedildiği gibi içsel bir yol izleyerek meme bezine ulaştığı gösterilmiştir (Martín ve Ark., 2004).



Şekil 1.2. LAB suşlarının fetal ve neonatal bağırsağa nasıl geçirildiğini açıklayan kuramsal bir model. (A) Dendritik hücreler LAB'leri doğrudan bağırsak lümeninden çıkarmak için önceden bağırsak epiteline nüfuz eder. (B) Hemen içteki antijen sunucu hücreler aracılığıyla LAB, bağırsak mukozasından uzak mukozal yüzeylere taşınabilir; çünkü mukoza ile ilişkili lenfoid dokular arasında (solunumla ilgili bölge, genital bölgeler, tükürük-gözyaşı bezleri ve en önemlisi süt veren meme bezleri) lenfositlerin sirkülasyonu söz konusudur (Martín ve Ark., 2004).

Meme bezi emzirme için erişkin ve hamilelikte oluşan bir dizi gelişim basamakları ile hazırlanır. Hamilelikte meme büyümesinin temel özelliği, birçok hormonun etkisi ile alveol ve kanallardaki büyük artıştır. Hamileliğin son dönemlerinde alveol sistemi lobcukları en üst düzeydedir. Meme ucu ve meme başını çevreleyen halka dikkat çekici şekilde genişler ve yağ bezleri içeride çok çıkıntılı olmaya başlar. Meme bezinin artmış lenf ve kan stoğu ve meme

alveolünü kuşatan miyoepitel hücrelerinin doğum sırasında rahim kaslarının kasılmasına neden olan oksitosin salınımı, anne sütünde endojen bakterilerin varlığını kolaylaştırabilir (Martín ve Ark., 2004). Bu değişiklikler meme başını çevreleyen bölge ve meme kanal sisteminde biyofilm oluşumuna elverişli koşullar sağlar.

Son yıllarda yapılan araştırmalar, doğum öncesi anne bağırsak ve süt doğal floralarının, fetus ve yenidoğan bağırsak florasının oluşumunda iki önemli kaynak olduğuna işaret etmektedir (Martín ve Ark., 2004; Heikkila ve Saris, 2003).

1.2.3. Bebek Bağırsak Mikroflorasının Gelişimi ve Anne Sütünün Etkileri

Tissier'in eski çalışmaları bebek bağırsak florasının oluşumuyla ilgilidir. İddiaya göre, rahimdeki fetus sterildir; yenidoğanların intestinal bölgelerinin bakteriyel kolonizasyonu, anne fekal ve vajinal mikroflorası ile geçiş kontaminasyonu yüzünden, doğum kanalından geçiş sırasında başlar. Bu hipotez geniş ölçüde kabul görmüştür (Martín ve Ark., 2004; Tannock, 1997; Bezirtzoglou, 1997). Bununla birlikte yeni bulgular; LAB ve diğer bakterilerin az sayıda da olsa plasentadan, amniyotik sıvıdan, göbek bağı damarlarından ve ilk olarak anne sütüyle beslenen sağlıklı yenidoğanların (sezaryenle doğanlar da dahil) ilk bağırsak florasından izole edilebilmektedir. Bu izolatlardan bazıları maternal (anneye ait) süt ve fekal örneklerinden sağlanmış türlerin suşları ile aynı Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) ve Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) profillerini paylaşıyor olmasına rağmen, vajinal, bacak arası veya deri izolatları ile ilişki kurulamamıştır. Bu sonuçlar genel olarak birkaç komensal türün plasenta bariyerini geçebileceğini güçlü bir şekilde düşündürmektedir. Bu nedenle bağırsak kolonizasyonunun doğumdan önce başladığı ileri sürülebilir (Martín ve Ark., 2004).

Bazı hücre dışı patojen bakterilerin, merkezi sinir sistemine girebildiği çok iyi bilinmektedir. Çünkü bu bakteriler serebral endotel ve kan beyin

bariyerini meydana getiren sıkı bağlantı oluşum hücrelerinin bir tabakasıyla etkileşime girebilmektedir. *Streptococcus pneumoniae* ve Grup-B streptokokları içeren bu patojen bakteriler, anne sütünde bulunan baskın türlerle yakından ilişkilidir. Beyin bariyerleri ile etkileşimi gerektiren bakteriyel karakteristikler başlangıçta mukozal kolonizasyona olanak vermek için seçilmiş olmalıdır (Nassif ve Ark., 2002). Kan akışındaki benzer bir mekanizma, özgül bağırsak bakterileri tarafından plasental bariyeri geçmek için kullanılmış olabilir. Placenta, uterus iç zarı ile yakından ilişkili olan özel olarak gelişmiş trofoblastlardan oluşur. Trofoblastlar hareketli hücrelerdir. Anne ve fetus arasında besin ve gaz alışverişi sağlarlar. Başlangıçta üç katman (vilüsta fetal kapılların duvarı, vilülü bağlayıcı dokunun değişken bir miktarı ve vilüsü örten trofoblastik epitel) maternal ve fetal sirkülasyonu ayırır. Fakat hamilelik sürecinde bu dokular incelendiği için kademeli olarak birbirlerine yakınlaşırlar. Başka bir söylemle besinler, atık ürünler ve gazların, anne ve fetus arasında değiş tokuşunun etkinliğinde bir artış vardır. Bu artan değiş tokuş, seçilmiş komensal bakterileri ihtiva edebilir. Sonuç olarak, anne dışındaki yaşam için fetal bağırsağın ilk adaptasyonu bağırsak kolonizasyonunu başlatabilir (Martín ve Ark., 2004).

Bu düşüncelerden yola çıkılarak sezaryenle doğan sağlıklı bebeklerin göbek bağında bu bakterilerin varlığı araştırılmıştır. Agar tabaklara ekilen kan örneklerinden elde edilen izolatların tümü *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* veya *Propionibacterium* cinslerine aittir (*Enterococcus faecium*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus sanguinis*). Sonra gebe farelere, sağlıklı anne sütünden izole edilen işaretlenmiş *E. faecium* oral yoldan verilmiş ve hayvanların amniyotik sıvılarından izole edilmiştir. Ancak bu durum kontrol hayvan gruplarında gözlenmemiştir (Jiménez ve Ark., 2005).

Moleküler çalışmalar, vajinal LAB'lerin vajinal doğum sırasında anneden bebeğe geçtiğini göstermiştir. Ancak bu bakteriler sanıldığı gibi bebek bağırsağında kolonize olamamaktadır. Çünkü bu bakteriler anne sütündeki LAB üyeleri ile yer değiştirmektedir. Uterustaki fetusun sterilliği konusundaki

iddiaların aksine, laktik asit bakterileri ve diğerkomensal bakteriler hem vajinal hem sezaryenle doğan sağlıklı bebeklerin mekonyumundan izole edilmiştir (Jimenez ve Ark., 2005). Vajinal doğumda alınan bakterilerin bağırsakta kolonize olmadığı vurgulanmış olsa da, doğum şekli bebek için önem taşımaktadır. Sezaryenle dünyaya gelen bebeklerde LAB miktarı daha azdır. İshal riski yüksektir ve besinlere karşı alerjiye sıkça rastlanmaktadır (Collins ve Gibson, 1999). Sezaryenle doğum, bebeklerde hassasiyete yol açmaktadır. Normal doğumla dünyaya gelen bebeklerle karşılaştırıldığında, göbek bağındaki özgül IgE oranı daha fazladır. Bu immünoglobulin, besin kaynaklı alerjenlere karşı meydana gelmektedir. Göbek bağındaki bu yüksek oran daha ileri dönemdeki olası duyarlılığın habercisi olabilir (Laubereau ve Ark., 2004).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, oral bakterilerin rahimde bulunan çevreye kan akışı yoluyla girebileceği ve doğum sürecini etkilebileceği öne sürülmüştür. *Actinomyces naselundii* gibi bakteriler düşük doğum ağırlığı ve erken doğuma neden olurken LAB gibi bakterilerin yüksek doğum ağırlığı ve zamanına neden olduğu gözlenmiştir (Jiménez ve Ark., 2005). Bu tür çalışmalar bakterilerin mukozal yüzeyler arasında taşınımını desteklemektedir.

Geleneksel mikrobiyolojik teknikler, amniyotik sıvı ve kroamniyon dokudan bakteri saptanmasında yetersizdir. Bunun nedeni, düşük sayıda bakteri bulunması ve belirli bakteri türlerinin kültüre alınmasındaki zorluklardır. Fetusun önceleri steril olarak nitelendirilmesinin nedeni bu olabilir. Bununla birlikte, sağlıklı anne adaylarının amniyotik sıvılarında bakteri saptanmıştır (Martín ve Ark., 2004).

Doğum sonrasında ise bağırsak mikroflorasının kompozisyonu bebeğin beslenmesinden çok etkilenir. Katı gıdaların alınımı ve anne sütünün kesilmesi, büyük flora değişikliklerine neden olur (Martín ve Ark., 2004). Anne sütünün kesilmesi ve katı besinlerin alınımı ile yetişkin bağırsak mikroflorası kurulmaya başlanır (Collins ve Gibson, 1999).

Anne sütü ve mama ile beslenen bebeklerin bağırsak mikroflorası arasındaki farklılıklar pek çok kez vurgulanmıştır. Anne sütü alan bebeklerde

Laktobasil (özellikle *Bifidobacterium bifidum*) ağırlıklı bağırsak florası görülürken, mama ile beslenen bebeklerde baskın tür *Clostridium* ve *E. coli* gibi bakteriler olmaktadır (Newburg ve Ark., 2005; Martín ve Ark., 2004; Mackie ve Ark., 1999). Yine, anne sütü ile beslenen bebeklerde mikroorganizmaların dar bir spektrumu gözlenmektedir. Süt, anne meme epiteli ile bebek sindirim sistemi arasında aktif olarak bağlantı sağlamaktadır (German, 2002). Bugüne kadar çoğunlukla insan sütü üzerine yapılan mikrobiyolojik çalışmalar, saklanmış anne sütünde potansiyel patojen bakterilerin ve anne ya da bebek enfeksiyonunu kapsayan klinik olayların tanımlanmasıyla sınırlı kalmıştır (Martín ve Ark., 2004; Wright ve Fenny, 1998). Ancak, taze anne sütü doğal florasının bebek enfeksiyonlarının önlenmesine katkıda bulunduğu da açıktır; çünkü anne sütü bu antimikrobiyal özelliğini pastörizasyon sonrasında yitirmektedir. Bu bulgu, memeden beslenen bebeklerin bağırsak mikroflorasının niçin sınırlı bakteri grupları tarafından oluştuğunu da açıklamaktadır. Anne sütünde birkaç baskın Gram (+) türlerin varlığı anne sütüyle beslenen yenidoğanların bağırsak mikrobiyotasının dar bir tür spektrumundan oluşmasının ve sadece süttten kesildikten sonra çok çeşitli bir mikrobiyotanın gelişmesinin nedeni olabilir (Martín ve Ark., 2004). Bunun dışında, anne sütünün bazı özellikleri de tür sınırlılığını desteklemektedir:

1. Anne sütünün önemli bir kısmını oluşturan oligosakkaritler, glikoz, galaktoz ve fukoz oligomerleri veya bazı glikoproteinler, bifidobakteriler için özel büyüme faktörleridir (Collins ve Gibson, 1999).
2. Anne sütünün düşük protein içeriği ve indirgeyici tampon kapasitesi, bifidobakterilerin seçilmiş olarak büyümelerine izin verir. Bu düşük tamponlama kapasitesi sayesinde bebekte *Bacterioides*, *Clostridium* ve *E. coli* gibi bakterilerin büyümesine elverişli olmayan asit seviyesi sağlanır (Bezirtzoglou, 1997).
3. Laktoferin ve bazı lipitlerin de içinde olduğu bazı bileşenler mikroorganizmaları inhibe eder.

4. Bazı süt bakterileri, sIgA gibi immunoglobulinleri uyarır (Collins ve Gibson, 1999).

Anne sütü ile beslenen bebeklerin bağırsaklarında baskın olarak bulunan bifidobakteriler akut ishal gibi hastalıklara karşı koruyucu etkiye sahiptir. Epidemiyolojik çalışmalarda, anne sütü ile beslenen bebeklerde mama ile beslenen bebeklerden daha az sindirim sistemi enfeksiyonu görüldüğü vurgulanmaktadır. Bifidobakteriler, *Salmonella*, rotavirüsler gibi ishale yol açan patojenlerin çoğalmasını inhibe eder. Anne sütü, bifidobakterilerin çoğalmasını destekleyen özgül bifidus faktörler içerir (Martín ve Ark., 2003; Nascimento ve Issler, 2003). Bu çok önemli bifidojenik aktivitenin bir kısmı süt proteinleri ile ilgilidir. Süt proteinleri hem doğrudan büyümeyi uyarır hem de antimikrobiyal etkilere sahiptir. Anne sütünün bifidojenik aktivitesi, yüksek oranda, büyük süt proteinleri ve bunların küçük proteolitik parçacıkları sayesinde. Bu protein parçacıkları, süt proteinlerinin gastrik proteaz pepsini ile sindiriminden elde edilmektedir. Polimerik immünoglobulin reseptör salgı bileşeninin (hPIGR) ve insan laktoferininin izole edilen kısımları, bifidobakterilerin büyümesini teşvik etmektedir. Bu peptitler bifidojenik karbohidrat olarak bilinen N-asetilglukozaminden 100 kat daha etkilidir. Laktoferinin antimikrobiyal aktivitesi pek çok çalışmanın sonucu olarak açıklanmıştır. Bu protein ayrıca antibiyotik ve prebiyotik aktivitelerini birleştirerek yenidoğanların bağırsak içi bakteri florasının belirlenmesi için önemlidir (Liepke ve Ark., 2002).

İnsan sütünün bifidojenik aktivitesi, süt karbohidratlarından ziyade süt peptitlerine dayanmaktadır. Mikrobiyal kolonizasyonun başlangıcı olan kritik dönemde, özellikle kolostrumda, çok fazla olan bifidojenik faktörlerin alınımı önemlidir. Kolostrum özellikle peptit doğal bifidojenik faktörlerce zengindir. İnek sütünde bifidojenik aktivite düşüktür. Çünkü inek sütü insan sütüne oranla önemli derecede düşük peptit ve karbohidrat bifidus faktörlerine sahiptir. Bu nedenle inek sütü ve inek sütü içerikli mamalarla beslenen bebeklerde tipik bifid flora görülmez (Liepke ve Ark., 2002).

1.3. Anne Sütünde Bulunan Bazı Önemli Cinsler

1.3.1. *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 ve Ark., 1995). Bifidobakteriler 20 °C – 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.

1.3.2. *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.

1.3.3. *Lactobacillus*

Laktobasiller Gram (+), spor oluşturmeyan, DNA'larında genellikle %50'den daha az guanin+sitozin (G+C) içeren basil ya da kokobasillerdir. Oksijene toleranslı ya da anaerobik, asidürük 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 heterofermantatifler (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).

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 değerinde ölmekte ya da çoğalmaları durmaktadır (Stiles ve Holzapfel, 1997).

Sütte bulunan *Lb. gasseri*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*' un da aralarında bulunduğu pek çok türü probiyotik sağaltıcı öneme sahiptir (Holzapfel ve Ark., 1998; Gorbach, 2002).

1.3.4. *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, homofermantatifler ve karmaşık besin gereksinimleri vardır (Hardie ve Whiley, 1995). Bilinen birçok türü insan ve diğer hayvanlarda parazitir 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.

1.3.5. *Staphylococcus*

Staphylococcus üyeleri Gram (+), fakültatif anaerob ve katalaz pozitifdir. 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 Sütü Bakterilerinin Karakterizasyonu

Anne sütü ile yapılan çalışmalar genellikle patojen ve mastisite yol açan bakterilerle ilgili ya da bebek enfeksiyonu vakalarından yola çıkılan çalışmalardır. Anne sütü komensal bakterileri ile yapılan çalışmalar çok sınırlıdır (Martín ve Ark., 2005). Geçmiş yıllarda yapılan mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan saklanmış sütün bakterilerin tanımlanması için yetersiz olduğu vurgulanmıştır (Martín ve Ark., 2004). Antimikrobiyal anne sütünün bekletildikten sonra bu özelliğini yitirmesi bunun bir nedeni olabilir. Anne

sütünün fermente edilmesi ya da kültüre alınmasına dayalı teknikler anne sütünün doğal endojen florası ile ilgili yanıtıcı sonuçlar vermektedir. Sütte kültüre edilemeyen bakterilerin bulunuşu, kültür için gerekli ortamın tam olarak sağlanamaması gibi dezavantajlar bu çalışmaların güvenilirliğinden kuşku uyandırmaktadır. Sütte eser miktarda varolan bazı bakteri türlerinin daha fazla çoğalmasına ve belki de yaşama şansı bulamayan baskın türlerin göz ardı edilmesine neden olmaktadır. Ancak günümüzde taze sütle yapılan, kültüre bağımlı olmayan çalışmaların önemi üzerinde durulmaya başlanmıştır. Bu tarz çalışmalar bazı bakteri türlerinin karakterizasyonunda yetersiz kalsa da anne sütü mikroflorasının daha doğru yansıtılması bakımından önemlidir.

Mikrofloradaki bakterilerden bazılarının kültür koşullarının bilinmediği durumlarda mikrofloranın bilinmesi ve saptanması için klasik yöntemlerin yanı sıra moleküler metotların kullanılması oldukça önemlidir. Karmaşık komunitelerde bakterilerin bireysel kimliklerinin ve aralarındaki ilişkinin tanımlanmasında rRNA ve onu kodlayan genlere dayalı metotlar kullanılmaktadır. Ribozomal RNA'nın bütün canlı hücre formlarında bulunması ve tüm canlılarda protein sentezi gibi temel bir fonksiyonda rol alması, rRNA kodlayan genlerin oldukça korunmuş olmasını gerektirmiştir. Ayrıca rRNA'ların mutasyon oranları organizmaların evrimsel akrabalıkları hakkında bilgi verir. Bu bağlamda rRNA en kullanışlı filogenetik belirteçlerden biridir. 16S rRNA, 16S ve 23S rRNA genleri arasında transkribe edilen ayırıcı bölge (ITS- Internal transcribed spacer) saptama ve sınıflamada sıklıkla kullanılmaktadır (Vaughan ve Ark., 2000).

Bifidobacterium cinsi içerisinde rRNA dizisi yüksek oranda korunmuştur ve karşılaştırmalı analizi yeterince hassas olmayabilir. Bu nedenle ITS bölgesi bifidobakterilerin daha detaylı analizi için kullanılmaktadır (Leblond-Bourget ve Ark., 1996). Bu dizi evrensel olarak bütün bakterilerde bulunur. Ancak nispeten daha az korunmuştur (Barry ve Ark., 1991). Bu da filogenetik bir belirteç olarak güvenilirliğini sınırlar. ITS bölgesi aynı bakteri suşlarının arasında bile değişiklik gösterebilir (Christensen ve Ark., 2000).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Bu çalışmada kullanılan kimyasalların ve oligonükleotit, dNTP, tampon ve stok çözeltilerin tarifleri, sırasıyla Ek 1, Ek 2 ve Ek 3' de listelendi.

Tablo 2.1. Örnekler ve alım tarihleri (Örnek alınan kişiler A, C, D, E, F, N, O, P şeklinde kodlandı.)

Örnek Kodu	Alım Tarihi	Bebek (Gün)	Örnek Kodu	Alım Tarihi	Bebek (Gün)
AS1	10.04.2007	4	CS11	13.11.2007	210 (7 ay)
AS2	27.04.2007	21	DS1	05.04.2007	1
AS3	04.05.2007	29	DS2	17.04.2007	12
AS4	22.05.2007	47 (1 ay 17 gün)	DS3	01.05.2007	25
AS5	08.06.2007	63 (2 ay 3 gün)	DS4	18.05.2007	42 (1 ay 12 gün)
AS6	21.06.2007	76 (2 ay 26 gün)	DS5	06.06.2007	60 (2 ay)
AS7	17.07.2007	102 (3 ay 12 gün)	DS6	21.06.2007	75 (2 ay 15 gün)
AS8	09.08.2007	125 (4 ay 5 gün)	DS7	18.07.2007	103 (3 ay 13 gün)
AS9	28.08.2007	152 (5 ay 2 gün)	DS8	13.08.2007	128 (4 ay 8 gün)
AS10	21.09.2007	175 (5 ay 25 gün)	DS9	27.08.2007	142 (4 ay 28 gün)
AS11	09.10.2007	194 (6 ay 14 gün)	DS10	18.09.2007	163 (5 ay 13 gün)
AS12	03.11.2007	218 (7 ay 8 gün)	ES1	19.03.2007	4
AS13	13.11.2007	228 (7 ay 18 gün)	ES2	10.04.2007	25
CS1	10.04.2007	3	ES3	27.04.2007	42 (1 ay 12 gün)
CS2	27.04.2007	20	ES4	18.05.2007	63 (2 ay 3 gün)
CS3	04.05.2007	28	ES5	06.06.2007	81 (2 ay 21 gün)
CS4	22.05.2007	46 (1 ay 16 gün)	ES6	21.06.2007	96 (3 ay 6 gün)
CS5	08.06.2007	62 (2 ay 2 gün)	ES7	17.07.2007	122 (4 ay 2 gün)
CS6	21.06.2007	75 (2 ay 15 gün)	ES8	09.08.2007	144 (4 ay 24 gün)
CS7	17.07.2007	101 (3ay 11 gün)	ES9	28.08.2007	173 (5 ay 23 gün)
CS8	16.08.2007	130 (4 ay 10 gün)	ES10	18.09.2007	193 (6 ay 13 gün)
CS9	15.09.2007	160 (5 ay 10 gün)	ES11	15.10.2007	220 (7 ay 10 gün)
CS10	15.10.2007	190 (6 ay 10 gün)	ES12	12.11.2007	247 (8 ay 7 gün)

Örnek Alım			Örnek		
Kodu	Tarihi	Bebek (Gün)	Kodu	Alım Tarihi	Bebek (Gün)
FS1	27.04.2007	7	OS1	02.08.2007	4
FS2	04.05.2007	15	OS2	15.08.2007	17
FS3	22.05.2007	33 (1 ay 3 gün)	OS3	27.08.2007	29
FS4	08.06.2007	49 (1 ay 19 gün)	OS4	18.09.2007	50 (1 ay 20 gün)
FS5	26.06.2007	71 (2 ay 21 gün)	OS5	15.10.2007	77 (2 ay 17 gün)
FS6	18.07.2007	93 (3 ay 3 gün)	OS6	24.10.2007	86 (2 ay 26 gün)
FS7	13.08.2007	118 (3 ay 28 gün)	OS7	13.11.2007	105 (3 ay 15 gün)
FS8	13.09.2007	148 (4 ay 28 gün)	OS8	01.12.2007	122 (4 ay 2 gün)
FS9	15.10.2007	176 (5 ay 26 gün)	OS9	27.12.2007	148 (4 ay 28 gün)
FS10	13.11.2007	204 (6 ay 24 gün)	OS10	10.01.2008	162 (5 ay 12 gün)
NS1	18.07.2007	2	OS11	25.01.2008	177 (5 ay 27 gün)
NS2	09.08.2007	23	PS1	13.09.2007	1
NS3	19.08.2007	33 (1 ay 3 gün)	PS2	18.09.2007	6
NS4	27.08.2007	41 (1 ay 11 gün)	PS3	09.10.2007	28
NS5	18.09.2007	62 (2 ay 2 gün)	PS4	10.11.2007	57 (1 ay 27 gün)
NS6	09.10.2007	83 (2 ay 23 gün)	PS5	28.12.2007	65 (2 ay 5 gün)
NS7	12.11.2007	116 (3 ay 26 gün)	PS6	10.01.2008	87 (2 ay 27 gün)
NS8	01.12.2007	134 (4 ay 14 gün)	PS7	25.01.2008	105 (3ay 15 gün)
NS9	27.12.2007	160 (5 ay 10 gün)	PS8	28.02.2008	138 (4 ay 18 gün)
NS10	20.01.2007	183 (6 ay 3 gün)	PS9	03.03.2008	153 (5 ay 3 gün)

Anne sütünün bahsedilen özellikleri, mikroflorasının son derece sınırlı olmasına neden olmaktadır. Bu sınırlı mikroflora izolasyonda çeşitli zorluklar yarattı. Elli mililitre süt örneğinden PCR için gerekli miktarda bakteri DNA' sını özütlenemediğinden bir kişiye ait örneklerin tümü birleştirilerek DNA izolasyonunda kullanıldı ve ancak bu şekilde istenen gen bölgesi çoğaltılabildi.

Tablo 2.2. Örnek alınan annelerin yaş, hamilelik sayısı, beslenme ve doğum şekli çizelgesi

	A	C	D	E	F	N	O	P
Yaş	30	25	33	35	28	22	31	25
Hamilelik Sayısı	1	1	1	4	1	2	4	2
Beslenme Şekli	Doğal değil	Doğal	Doğal Değil	Doğal	Doğal	Doğal	Doğal Değil	Doğal Değil
Doğum Şekli	Sezaryen	Normal	Sezaryen	Sezaryen	Normal	Normal	Normal	Normal

Çalışmada örnek alınan annelerin, hamileliklerinin başlangıcında yaşları, hamilelik sayıları, beslenme şekilleri, herhangi bir hastalıklarının bulunup bulunmadığı sorgulanarak kayıt altına alındı. Anneler hamilelik ve emzirme süresi boyunca beslenme şekilleri ve sağlık durumları açısından sürekli olarak takip altında tutuldu. Özellikle kullandıkları süt ve süt ürünlerinin doğal ürünler olup olmadıkları takip edildi. A,D,O,P kodlu annelerin marketten alınan hazır gıdalarla beslendikleri diğer annelerin ise köy yapımı doğal ürünlerle beslendikleri görüldü. Doğal olmayan gıdalarla beslenen annelerin diğerlerine göre daha sık kabızlık sorunu ile karşılaştıkları gözlemlendi. Annelerin beslenme şekillerinin fekal ve sütlerindeki mikrofloranın kararlılığı açısından önem taşıyabileceği göz önünde bulunduruldu.

2.1.2. Örnekler

Bu çalışmada, Sivas bölgesinde Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Doğum Anabilim Dalı, Kadıburhanettin ve Çayyurt Mahalleleri Sağlık Ocakları'ndan hamilelik başlangıcından itibaren kontrolü yapılan sağlıklı sekiz anne adayı seçildi. Seçilen anne adaylarından her ay fekal örnekler aseptik koşullarda steril plastik kaplar içerisine alındı. Son hacim %20 gliserol içerecek şekilde steril peptonlu su çözeltisinde homojenize edilerek ikişer ml, 50 ml' lik falkon tüpüne ve 2 ml'lik krayo-tüplere dağıtıldı. Falkon tüplerdeki örnek DNA hazırlamada kullanıldı; krayo-tüpler -80 °C'de saklandı. A, D ve E kodlu anneler sezaryen, diğer anneler normal yoldan doğum yapmıştır. Doğum şeklinin

gözlenmesi ve mümkün olan en kısa sürede süt alınımının sağlanması için doğum sırasında bulunuldu. Doğum gerçekleşikten sonra aynı sekiz anneden ikişer haftalık peryotlarla her seferinde yaklaşık 50 ml süt örneği, steril koşullar altında kişiye özel sağma başlıkları kullanılarak pompa ile sağıldı. Sağılan süt örnekleri 5000g'de 30 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülüp, pelet % 20 gliserol içerecek şekilde steril peptonlu su çözeltisinde süspanse edilerek bir adet 50 ml'lik falkon tüpüne ve üç adet 2 ml'lik krayo-tüplere dağıtıldı. Falkon tüpündeki örnek DNA hazırlamada kullanılıp; krayo-tüpler -80 °C'de saklandı.

2.1.3. Total DNA Özütlenmesi

Süt Örneklerinden Total DNA Özütlenmesi

Total DNA özütleri Gramley ve Ark. (1999) tarafından geliştirilen yöntemin modifiye edilmesiyle hazırlandı. Falkon tüplerdeki 2 ml örnek 30 ml NET (50 mM NaCl, 125 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl [pH 7.6]) tamponu içerisinde süspanse edildikten sonra 5,000 g'de 30 dakika santrifüjleme ile bakteri hücreleri çöktürüldü. Hücre peleti üzerine 400 µl, % 25 sükröz çözeltisi ve bir kürdan yardımıyla lizozim konulup, 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Hücre lizatı üzerine 1 mg/ml Proteinaz K (Stok: 20 mg/ml) , 680 µl 1x TE ve 60 µl SDS konuldu ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Örnek üzerine 200 µl NaCl ve 160 µl %10'luk setil trimetil amonyum bromür (CTAB) çözeltisi eklenerek 65 °C su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. Falkon tüpündeki örnek iki Eppendorf tüpe bölündü. Örnek üzerine 1 hacim fenol, 1 hacim kloroform eklenerek, 1 dakika el ile karıştırıldıktan sonra 10,000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Üst fazlar yeni bir falkonda birleştirilerek, 1 hacim izopropanol (%99) eklendi; sonraki basamaklara tekrar Eppendorf tüplerde devam edildi. DNA yumağı bir pipet ucuyla alınıp, yeni bir tüpe aktarıldı; %70 etanolde 10,000 rpm'de 6 dakika santrifüj yapılarak iki kez yıkandı. Yumak oluşmadığında; örnek 10,000 rpm'de 6 dakika santrifüj edilip, pelet 10,000 rpm'de 6 dakika santrifüj edilerek iki kez yıkandı. Alkolün tamamı uzaklaştırıldıktan sonra, pelet üzerine 50 µl 1x TE (10mM Tris, pH: 8, 1mM EDTA pH: 8) eklenerek DNA çözününceye kadar 65

°C'de inkübe edildi. Sütten elde edilen peletler çok küçük ve çok temiz olduğu için RNaz kullanılmadı.

Fekal Örneklerden Total DNA Özütleme

Falkon tüplerde bulunan 2 ml örnek 15 ml TES tamponu içerisinde süspansiyon edildikten sonra 1,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek, büyük parçacıklar çöktürüldü. Üst faz yeni bir falkon tüpe alınarak 5,000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip bakteri hücreleri çöktürüldü. Hücre peleti üzerine 800 µl %25 sükröz çözeltisi ve bir kürdan yardımıyla lizozim konulup, 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Hücre lizatı üzerine 1 mg/ml Proteinaz K (Stok: 20 mg/ml), 1,360 µl 1x TE ve 120 µl SDS konuldu ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Örnek üzerine 400 µl NaCl ve 320 µl %10'luk CTAB çözeltisi eklenerek 65 °C su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. Falkon tüpündeki örnek dört Eppendorf tüpe bölündü. Örnek üzerine 1 hacim fenol, 1 hacim kloroform eklenerek, 1 dakika el ile karıştırıldıktan sonra 10,000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Üst fazlar yeni bir falkon tüpe alınarak, 1 hacim izopropanol (%99) eklendi, sonraki basamaklara tekrar Eppendorf tüplerde devam edildi. DNA yumağı bir pipet ucuyla alınıp, yeni bir tüpe aktarıldı; %70 etanolde 10,000 rpm'de 6 dakika santrifüj yapılarak iki kez yıkandı. Yumak oluşmadığında; örnek 10,000 rpm'de 6 dakika santrifüj edilip, pelet 10,000 rpm'de 6 dakika santrifüj edilerek iki kez yıkandı. Alkolün tamamı uzaklaştırıldıktan sonra, pelet üzerine 300 µl 1x TE eklenip DNA çözününceye kadar 80 °C'de 20 dakika, -20 °C'de 20 dakika ardışık sıcak-soğuk şoku uygulandı. Yumak görülmeyen örneklerle 1 µl RNaz (100 mg/µl) eklendi ve 37 °C'de bir saat inkübe edildi.

Örnekler üzerine bir hacim fenol bir hacim kloroform eklenip, 1 dakika elde karıştırıldıktan sonra 10,000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Üst faz üzerine 1 hacim kloroform eklenip, bir dakika karıştırıldıktan sonra 10,000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Üst faz üzerine 1/10 hacim 5M NaCl eklenip karıştırıldıktan sonra iki hacim %99 etanol eklenip tekrar karıştırıldı ve 10,000 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Pelet üzerine %70 etanol eklenip, 10,000 rpm'de

6 dakika santrifüj edilerek iki kez yıkandı. Örnek oda sıcaklığında hafif nemli kalacak şekilde kurutulup, pelet üzerine 100 µl 1x TE eklenerek DNA çözününceye kadar 65 °C’de inkübe edildi.

2.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA özütlerinin kalitesi ve miktarı %0,8’lik agaroz jelde incelendi. Bunun için; 1,2 gr agaroz, 150 µl 1x TAE tamponunda kaynatılarak çözüldü. Agaroz çözeltisi 40 °C’ye kadar soğutuldu. Soğutmadan sonra 15 µl etidyum bromür çözeltisi (10 mg/ml) eklendi. Agaroz jel, jel kasetine döküldü ve taraklar yerleştirildi. Jel katılaştıktan sonra taraklar çıkartılıp 1x TAE tamponu ile doldurulan elektroforez tankına yerleştirildi. Beş mikrolitre DNA örneği, 1 µl 6x yürütme tamponuyla yüklendi. Örneklerin yüklenmesinden sonra 500 ng DNA moleküler ağırlık belirteci (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas, 1 kb) ilk kuyuya yüklendi. Elektroforez 50 mA’de 3 saat yapıldı ve DNA miktar ve kalitesi jel dokümantasyon sisteminde (GeneLine, ABD) incelendi.

2.1.5. 16S rRNA Geninin PCR ile Çoğaltımı

Bu metot 16S ribozomal RNA (rRNA) gen bölgesinin çoğaltılmasını temel almaktadır. Çoğaltma için kullanılan primerler şunlardır.

İleri primer; EGE1: 5’-AGAGTTGATGATCCTGGCTC-3’

Geri primer; EGE2: 5’-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3’

İleri primer 16S rRNA genlerinin 5’ ucuna komplementer iken, geri primer 3’ ucuna komplementerdir. İki mikrolitre kalıp DNA (yaklaşık 200 ng) kullanıldı. Çoğaltma işlemi 5 µl PCR tamponu (Sigma 10x), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 32 µl steril distile su, 1 µl ileri oligo 10 pmol/ µl, 1 µl geri oligo 10 pmol/ µl, 5 µl dNTP (10x), 0,1 µl *Taq* DNA polimeraz (Sigma 5 u/ µl) olmak üzere 50 µl toplam reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu aşağıdaki program kullanılarak gerçekleştirildi (Thermo Electron Corp., ABD).

Adım 1: 5 dakika 94 °C

Adım 2: 1 dakika 94 °C (denatürasyon)

Adım 3: 1 dakika 58 °C (yapışma)

Adım 4: 1 dakika 72 °C (uzama)

Adım 5: 10 dakika 72 °C (son uzama)

40 döngü

2.1.6. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi

Her bir örnekten farklı sayıda birleştirilmiş halde bulunan PCR ürünleri eşit şekilde ikiye bölündü. Daha sonrada tüm tüpler 1x TE tamponu ile 300 µl'ye eşitlendi. İki hacim kloroform/izoamil (24:1) alkol çözücü eklendi ve karıştırıldı. Bundan sonra örnekler 10,000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Sulu faz yeni bir Eppendorf tüpe alınıp, 1/10 hacim 3 M sodyum asetat eklenip karıştırıldı. Bundan sonra, 600 µl %99 etanol eklenerek karıştırıldı. Örnekler 10,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. DNA peletini elde ettikten sonra, sıvı faz uzaklaştırıldı. Peletler 500 µl %70 etanolde yıkandı. Beş dakika 10,000 rpm'de santrifüjden sonra, etanol uzaklaştırıldı ve peletler oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Son olarak, peletler başlangıçtaki PCR sayısına göre her bir PCR için 10 µl olacak şekilde 1x TE' de çözüldü. Bu örneklerin yarısı 1/10 hacim sodyum asetat ve 2 hacim %99 etanolde -20 °C'de saklandı.

2.1.7. Çoğaltım Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile İncelenmesi

Çoğaltılan ve temizlenen PCR ürünleri %0,8'lik agaroz jelde incelendi. Yürütme için 2 µl çoğaltma ürününe, 3 µl 1x TE tamponu ve 1 µl 6x yürütme tamponu eklendi. Örneklerin yüklenmesinden sonra 1 µl DNA moleküler ağırlık belirteci ilk kuyuya yüklendi. Elektroforez 30 mA'de gerçekleştirildi. Çoğaltım ürünleri jel görüntüleme sisteminde (DNR Bio-imaging systems) görüntülendi. Yaklaşık 1,500 bp uzunluğundaki hedef gen bölgesinin çoğaltıldı. Çoğaltım

ürünleri arasında karşılaştırmalar yapılarak her birinden kesim için gerekli miktar hesaplandı.

2.1.8. Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Jel sonuçlarına göre her örnekten alınan çoğaltım ürünleri 1x TE tamponla 50 µl'ye tamamlandı. Kesim, 10 µl restriksiyon enzim tamponu (10x), 39 µl steril distile su, 50 µl (yaklaşık 1 µg) PCR ürünü, 1 µl (10 u/µl) restriksiyon enzimi kullanılarak 100 µl son hacminde gerçekleştirildi. *Taq I* ve *Hae III* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanıldı. Örnekler önce *Hae III* enzimi ile 37 °C' de gece boyunca inkübe edilerek kesilip temizlendikten sonra *Taq I* ile kesildi. *Taq I* enzimi reaksiyon başlangıcında ve 3 saat sonra olmak üzere iki aşamada konuldu 6 saat 65 °C'de inkübe edildi. Ayrıca örneklerin buharlaşmasını önlemek için, örneklerin üzeri mineral yağ ile (yaklaşık 50 µl) kaplandı. Sonrasında ise kesim ürünleri tekrar temizlendi.

2.1.9. Kesim Ürünlerinin Temizlenmesi

Kloroform ile temizleme 2 hacim kloroform/izoamil alkol çözücü kullanılarak gerçekleştirildi. Saflaştırmadan sonra, sulu faz 1/10 hacim 3 M sodyum asetat çözeltisi (pH 5,2) içeren yeni bir Eppendorf tüpe alınıp, karıştırıldı. İki buçuk hacim %99'luk etanol eklenip, tekrar karıştırıldıktan sonra 10,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek sıvı faz uzaklaştırıldı. Daha sonra DNA peletleri 500 µl %70 etanolde yıkandı. Etanol uzaklaştırıldı ve örnekler oda sıcaklığında kurutuldu. Son olarak, örnekler 10 µl 1x TE'de çözündürüldü.

2.1.10. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (PAGE) ile Ayrıştırılması

Poliakrilamid jel elektrofrezisi 35x45x0,4 cm boyutlu camlar arasında gerçekleştirildi. Camlar iyice temizlenip etanol ile silindikten sonra, jelin yapışması istenilen cama silan çözeltisi diğer cama ise dimetildiklorosilan ile ince bir film oluşturacak şekilde kaplandı. Poliakrilamid jel için (%8'lik); 24 ml

akrilamit çözeltisi, 12 ml 10x TBE çözeltisi, 7,5 ml gliserol, 76,5 ml distile suyla 120 ml'ye tamamlandı ve jeli dökmeden hemen önce 800 µl %10'luk amonyum per sülfat çözeltisi, 100 µl tetrametilendiamin (%99) eklendi. Daha sonra jel dökülerek iki saat polimerleşmeye bırakıldı; sonrasında 2 µl 6x yükleme tamponuyla birlikte 4 µl kesim ürünü ile yükleme yapıldı. Örnekler yüklendikten sonra, iki kuyuya 1 µl moleküler ağırlık belirteci yüklendi (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas, 1 kb). Elektroforez 200 mA'de 30 saat süreyle gerçekleştirildi.

Elektroforezden sonra DNA bantları Qu ve Ark. (2005) yayımladığı yöntem kullanılarak boyandı. Bunun için jel 2,5 L hacimde %25 etanol, %1 nitrik asit, %0,2 gümüş nitrat içeren çözeltide 10 dakika tespit ve boyama yapıldıktan sonra, 3 dakika süreyle iki kez distile suyla yıkandı. Daha sonra jel DNA bantları görününceye dek, %3 sodyum karbonat, %0,2 formaldehit içeren çözeltide bekletildi, bantlar belirginleştikten sonra reaksiyon %10'luk asetik asit çözeltisinde 5 dakika bekletilerek sonlandırıldı.

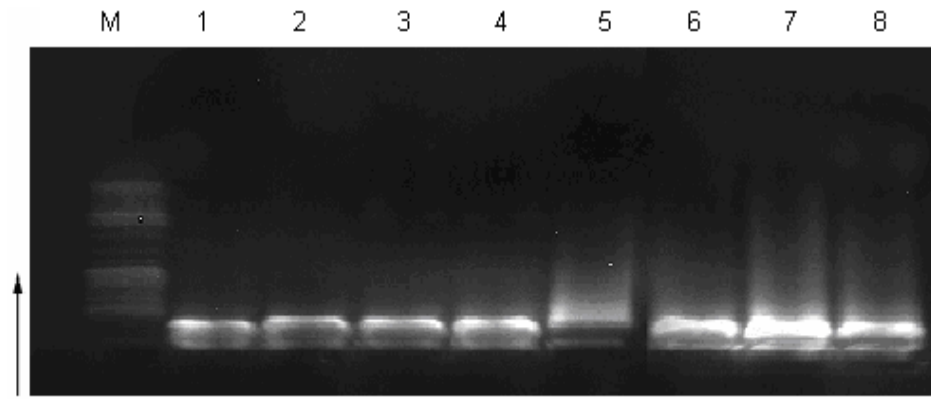
2.1.11. Veri Analizi

Restriksiyon profilleri, bilgisayar ortamında (Power Mac G4) PAUP (Pylogenetic Analysis Using Parsimony) programı (Macmillian Distribution, England) 4.0b10 (Altivec) versiyonu kullanılarak analiz edildi. Bant profilleri 600 bç DNA moleküler ağırlık belirtecinden başlayarak aşağıya –molekül ağırlığının azaldığı yöne- doğru isimlendirildi. Jelde tam olarak görünmeyen ve ihmal edilebilir derecede az ve süreksiz bantlar yok sayıldı. DNA miktarından dolayı bant profilleri tam olarak görünmeyen K3, OK5, PK3 örnekleri dışında, soldan sağa doğru restriksiyon profilleri bantların varlığına ya da yokluğuna göre; mevcut bantlar “1”, olmayanlar “0” olarak kodlanarak bir veri matrisi oluşturuldu (Tablo 2.2). Bu veri matrisi UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) dendrogramında görüntülendi.

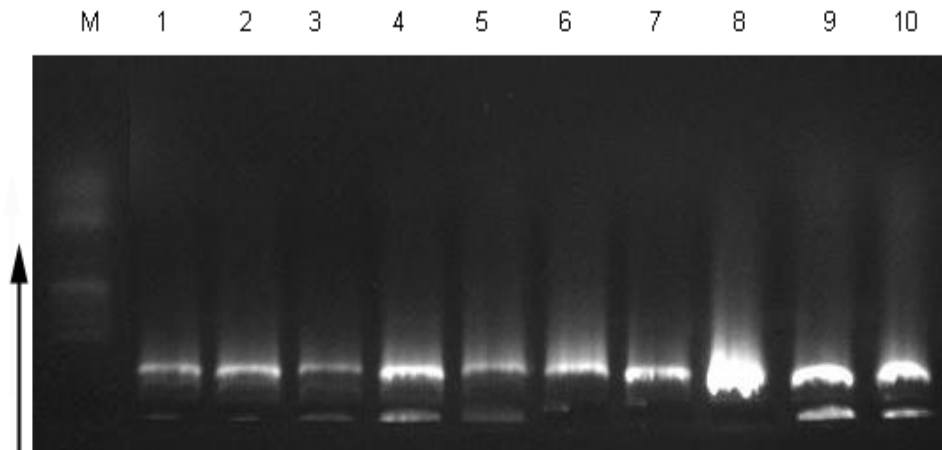
3. BULGULAR

3.1. Total DNA Özütleri

Şekil 3.1 ve 3.2' de özütlenen DNA örneklerinin kalitesi %0,8' lik agaroz jelde kontrol edildi.



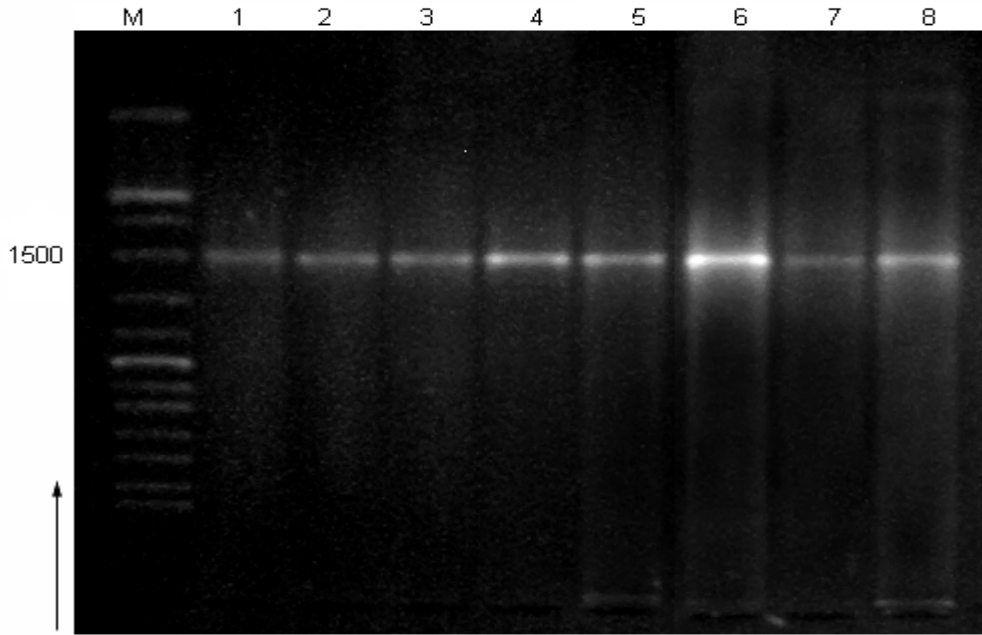
Şekil 3.1. Süte ait total DNA örnekleri. M. 1kb Moleküler Ağırlık Belirteci; 1. AS ; 2. CS; 3. DS; 4. ES; 5. FS; 6. NS; 7. OS; 8. PS.



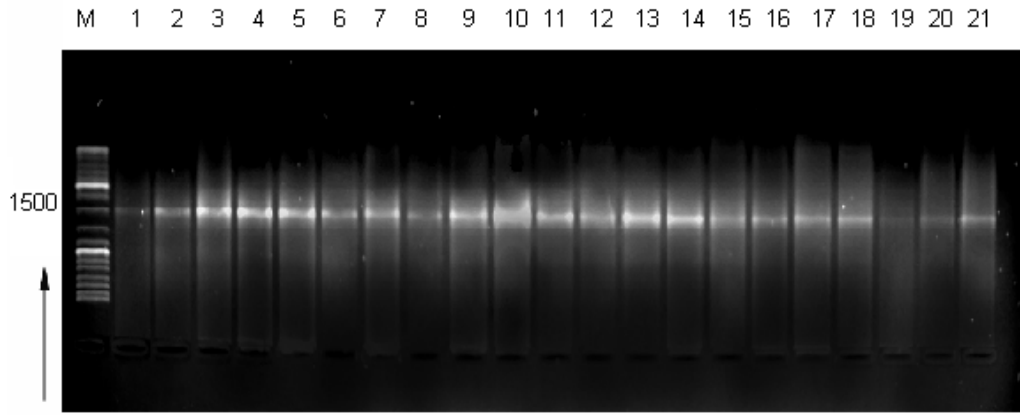
Şekil 3.2. Fekal total DNA örnekleri. M. 1kb Moleküler Ağırlık Belirteci; 1. AK6; 2. CK3; 3. CK5; 4. EK2; 5. EK3; 6. FK2; 7. FK3; 8. FK4; 9. NK2; 10.NK5.

3.2. 16S rDNA Bölgesinin PCR ile Çoğaltımı

Ribozomal RNA (16S) bölgesinin çoğaltılmasıyla yaklaşık 1500 bp DNA parçası elde edildi (Şekil 3.3).



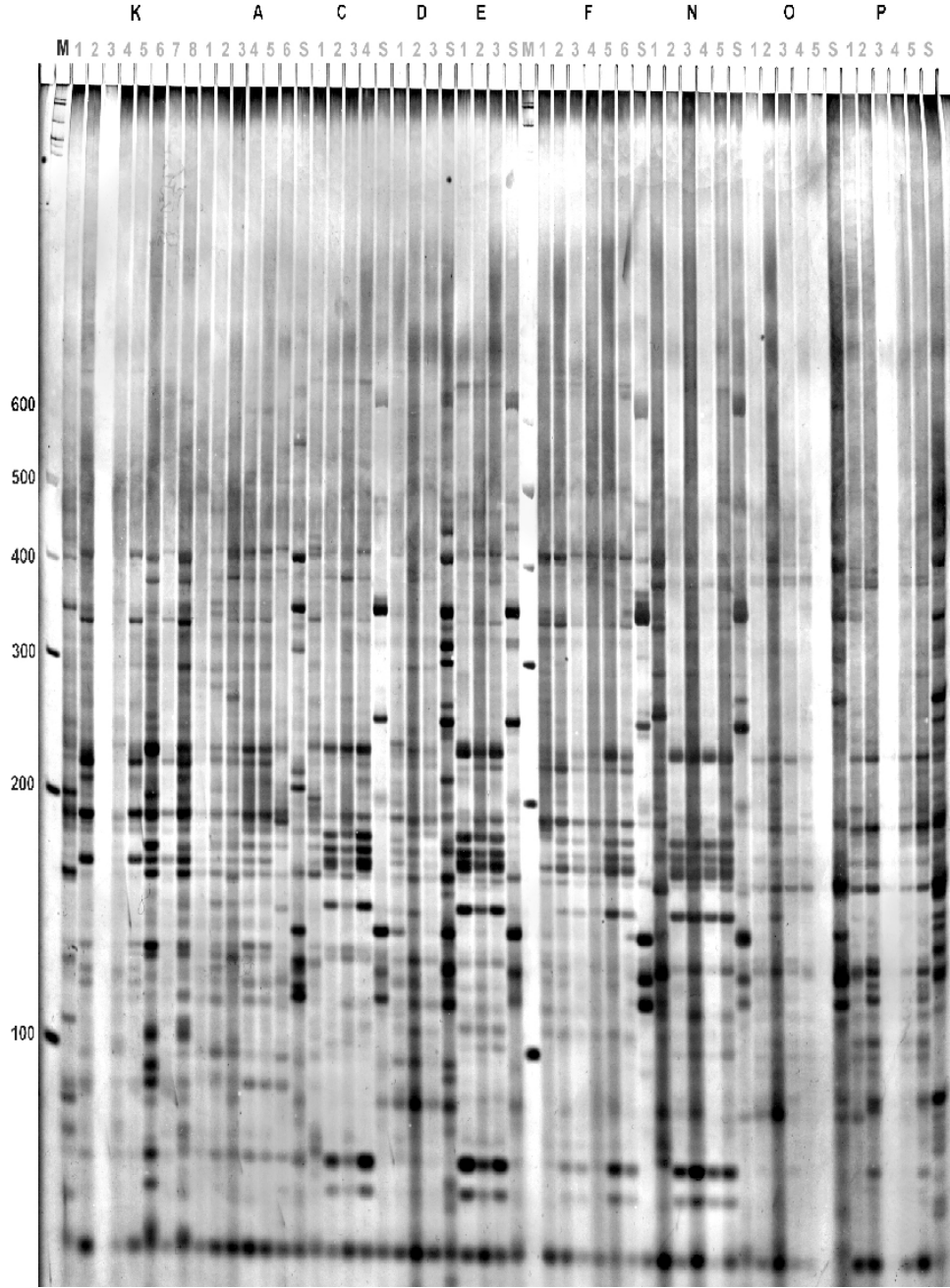
Şekil 3.3. Süt DNA özütlerinin 16S rDNA gen bölgesinin PCR ile çoğaltımı. M. 1kb Moleküler Ağırlık Belirteci; 1. AS; 2. CS; 3. DS; 4. ES; 5. FS; 6. NS; 7. OS; 8. PS.



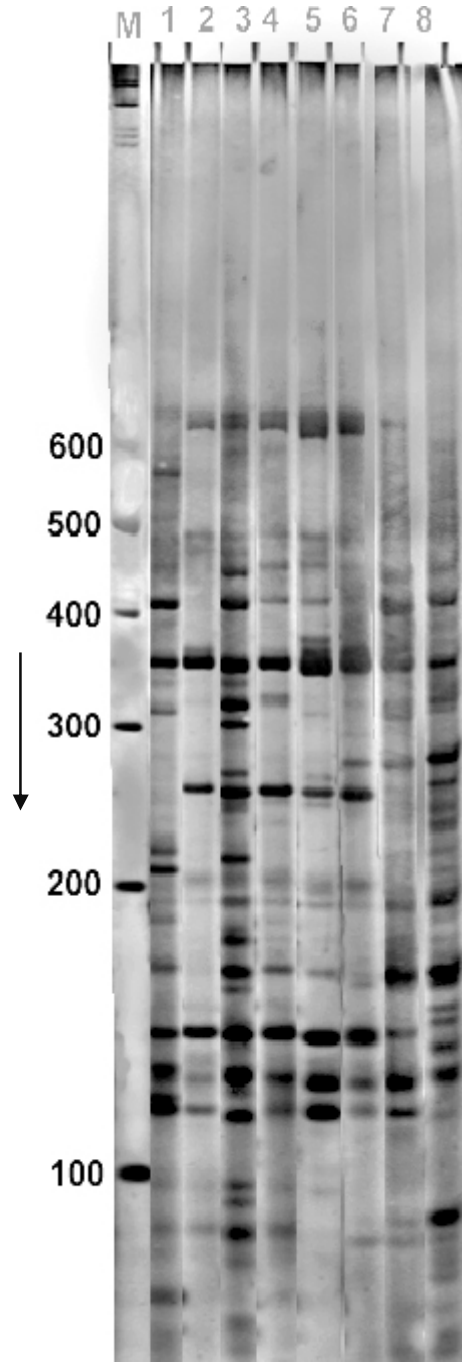
Şekil 3.4. Fekal DNA özütlerinin 16S rDNA gen bölgesinin PCR ile çoğaltımı. M. 1kb Moleküler Ağırlık Belirteci; 1. AK1, 2. AK2, 3. AK3, 4. AK4, 5. AK5, 6. AK6, 7. CK2, 8. CK5, 9. CK6, 10. CK7, 11. DK1, 12. DK2, 13. DK3, 14. EK1, 15. EK2, 16. EK3, 17. FK1, 18. FK2, 19. FK3, 20. FK4, 21. FK5.

3.3. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) ile Ayrıştırılması

Taq I ve *Hae* III ile kesilmiş örnekler %8'lik poliakrilamid jelde yürütüldü. K3, OK5, PK3 no'lu örnekler jele yüklenemediği için boş gözükmektedir. Bu nedenle analizlerde değerlendirmeye alınmadı.

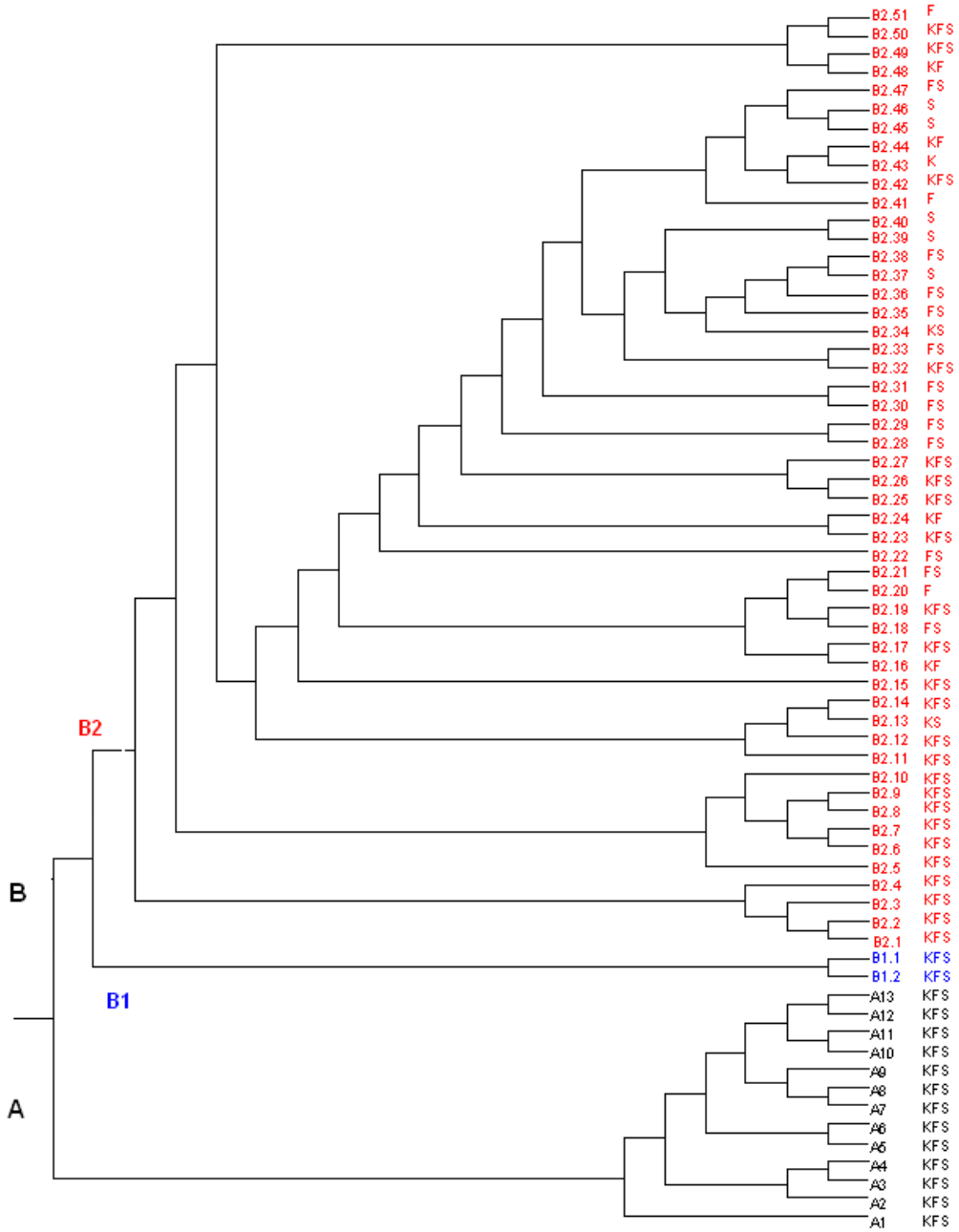


Şekil 3.5. *Taq* I ve *Hae* III kesim ürünlerinin %8' lik poliakrilamid jeldeki görüntüleri. M) 1kb Moleküler Ağırlık Belirteci. K) 1. K1, 2. K2, 3. K3, 4. K4, 5. K5, 6. K6, 7. K7, 8. K8. A) 1. AK1, 2. AK2, 3. AK3, 4. AK4, 5. AK5, 6. AK6, 7. AS. C) 1. CK1, 2. CK2, 3. CK3, 4. CK4, 5. CS. D) 1. DK1, 2. DK2, 3. DK3, 4. DS. E) 1.EK1 2.EK2, 3. EK3, 4. ES. F) 1. FK1, 2. FK2, 3. FK3, 4. FK4, 5. FK5, 6. FK6, 7. FS. N). 1.NK1, 2. NK2, 3. NK3, 4. NK4, 5. NK5, 6. NS. O) 1.OK1, 2. OK2, 3. OK3, 4. OK4, 5. OK5, 6. OS. P) 1. PK1, 2. PK2, 3. PK3, 4. PK4, 5. PK5, 6. PS.



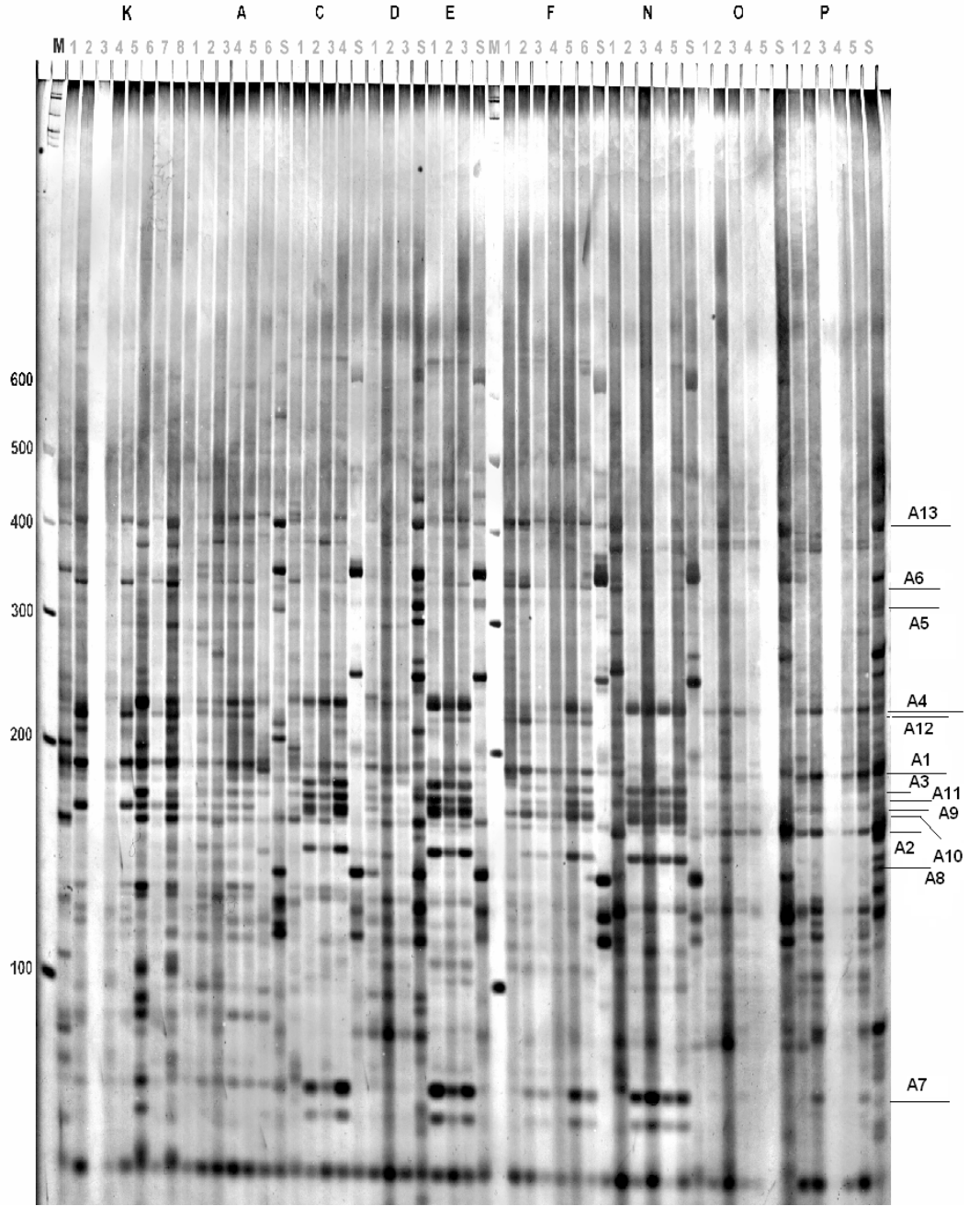
Şekil 3.6. PAGE'deki süt örnekleri bantlarının yan yana birleştirilmiş görüntüsü. M) 1kb Moleküler Ağırlık Belirteci. 1. AS, 2. CS, 3. DS, 4. ES, 5. FS, 6. NS, 7. OS, 8.PS.

3.4. Analiz



Şekil 3.7. Bant varlığına göre kodlanmış veri matrisinin UPGMA dendrogramında görüntüsü. A) Kararlı bantlar, B1) Yarı kararlı bantlar, B2) Kararsız bantlar. (K: Kontrol grubu, F: Anne fekal, S: Süt).

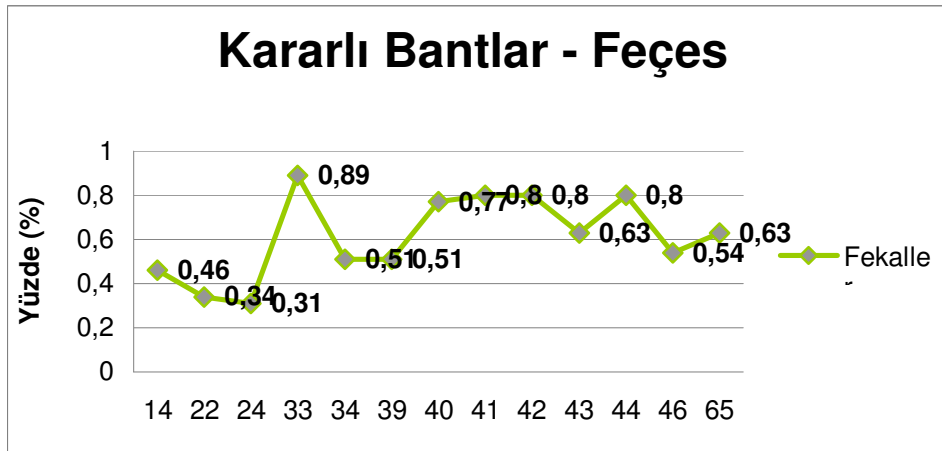
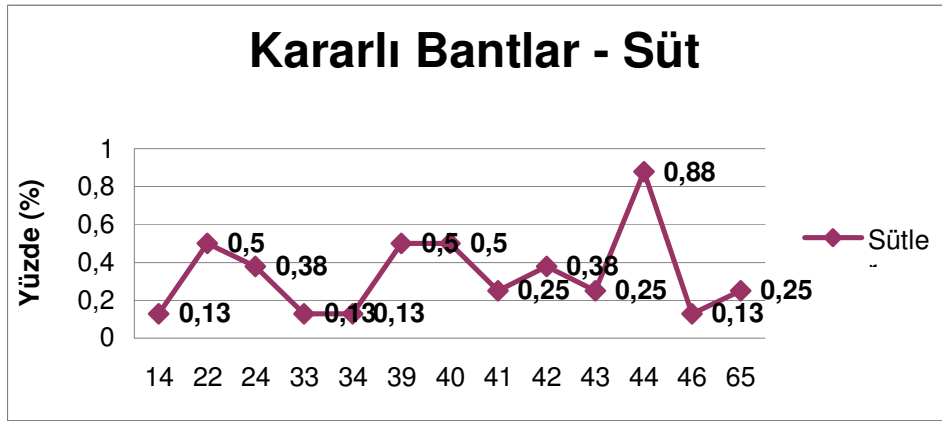
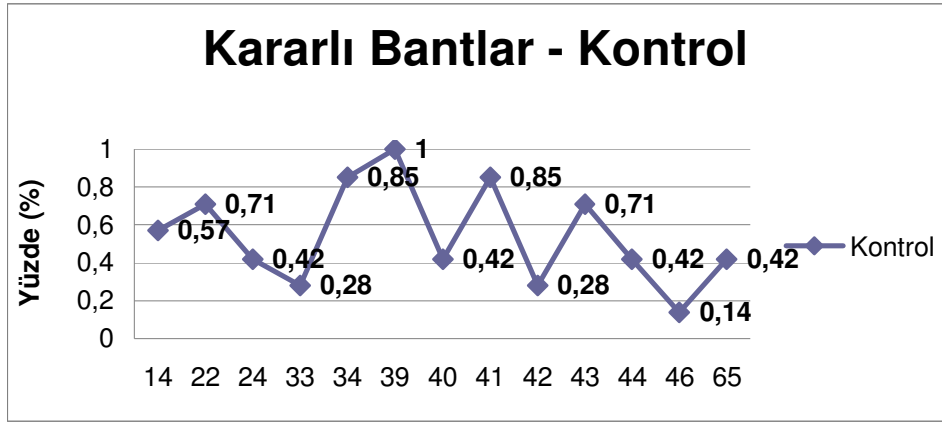
Restriksiyon profil verileri Tablo 2.2' deki gibi kodlandığında elde edilen UPGMA dendrogramı Şekil 3.7' deki gibidir. A, B1 ve B2 olarak gösterilen gruplar sırasıyla kararlı, yarı kararlı ve kararsız mikroflorayı işaret etmektedir. Kararlı mikroflorayı işaret eden bant profilleri Şekil 3.8' de gösterildi.



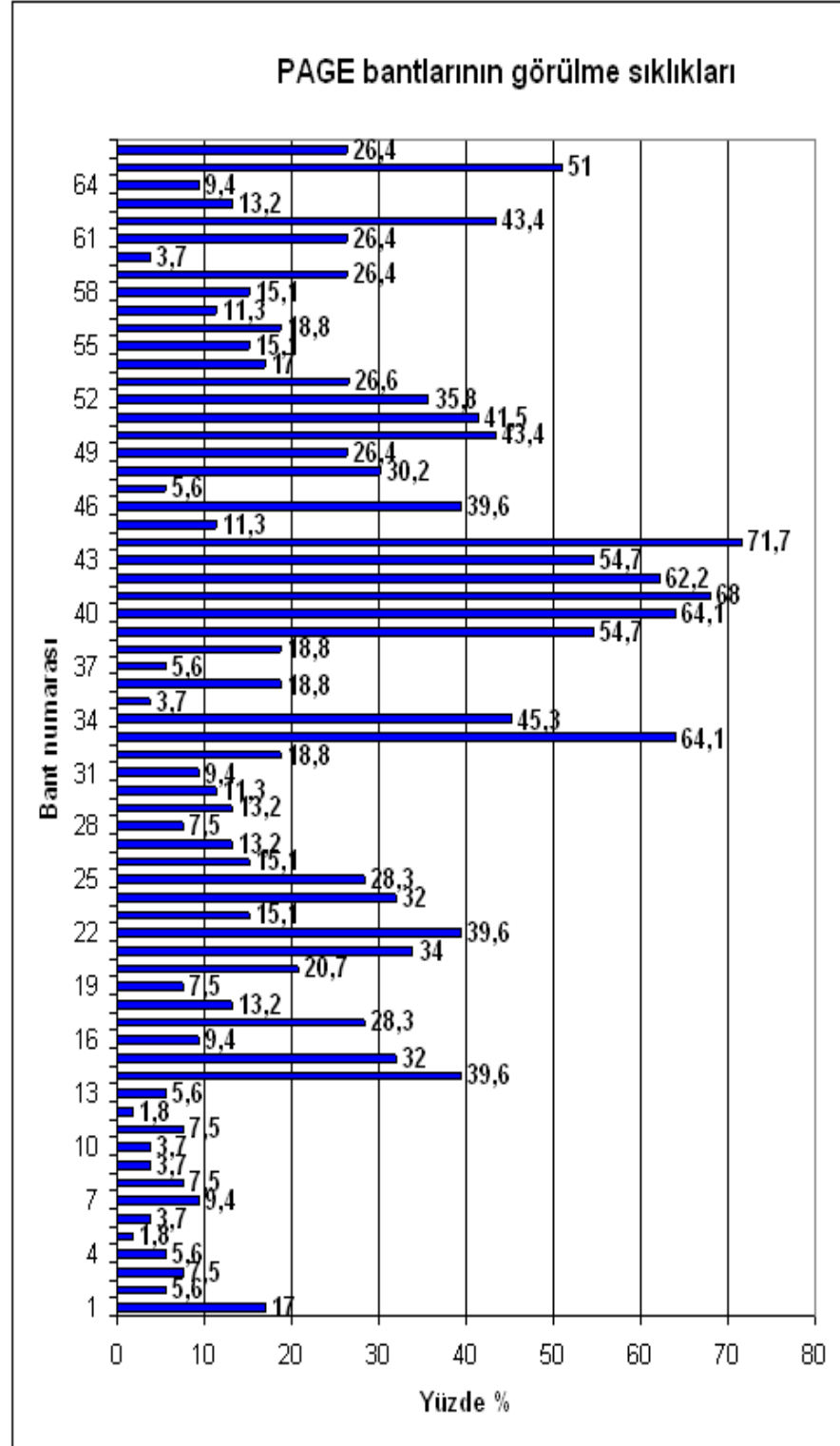
Şekil 3.8. Dendrogramda görülen A grubu (kararlı) bant profillerinin poliakrilamid jelde görüntüleri.

Tablo 3. 1. A grubu bantların süt, anne fekal ve kontrol örneklerinde toplam görülme yüzdeleri

Kararlı Bantlar	Kontrol (%)	Süt (%)	Feçes (%)
(A13) 14	57	13	46
(A6) 22	71	50	34
(A5) 24	42	38	31
(A4) 33	28	13	89
(A12) 34	85	13	51
(A1) 39	100	50	51
(A3) 40	42	50	77
(A11) 41	85	25	80
(A9) 42	28	38	80
(A10) 43	71	25	63
(A2) 44	42	88	80
(A8) 46	14	13	54
(A7) 65	42	25	63



Şekil. 3.9. A grubu kararlı bantlarının kontrol, anne fekal ve sütteki görülme sıklığı grafikleri.



Şekil 3.10. PAGE bantlarına ait görülme sıklığı grafiği.

3.5. PAGE Bant Verilerinin SPSS ile İstatistiksel Analizi

Araştırmadan elde edilen verilerin analizinde SPSS (SPSS inc. Versiyon 15-Chicago, America) istatistik paket programında yer alan non-parametrik testlerden yararlandı. Bu program yardımıyla veriler üzerinde frekans dağılımı, *ki-kare* (χ^2) ve korelasyon analizi uygulandı.

Ki-Kare analizi, frekans dağılımının kategorilere dengeli veya eşit ihtimalle dağılıp dağılmadığını test etmektedir (Akgül ve Çevik, 2003). Annelerin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkileri test etmek için χ^2 analizi kullanıldı. Bu örnekler arasındaki ilişki ile ilgili olan H_1 hipotezi ve alt hipotezler geliştirildi. Aşağıda hipotez ve alt hipotezler gösterilmektedir.

H_1 = Annelerin fekal ve sütleri arasında bir ilişki vardır.

H_{1a} = A annesinin fekal ve sütü arasında bir ilişki vardır.

H_{1c} = C annesinin fekal ve sütü arasında bir ilişki vardır.

H_{1d} = D annesinin fekal ve sütü arasında bir ilişki vardır.

H_{1e} = E annesinin fekal ve sütü arasında bir ilişki vardır.

H_{1f} = F annesinin fekal ve sütü arasında bir ilişki vardır.

H_{1h} = N annesinin fekal ve sütü arasında bir ilişki vardır.

H_{1o} = O annesinin fekal ve sütü arasında bir ilişki vardır.

H_{1p} = P annesinin fekal ve sütü arasında bir ilişki vardır.

Tablo 3. 2. A annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkinin dağılımı

	Var		Yok	
	F	%	F	%
A Anne				
Süt	19	14,5	47	85,5
Fekal	112	85,5	284	85,8
Toplam	131	100	63	100

$p < 0,01 (n=462)$ $\chi^2 = 0,007$ sd= 1 Anlamlılık Seviyesi =0,933

A annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişki test edildi; yapılan *ki-kare* testi sonucunda anlamlı bir ilişki bulunamadı. Tablo 1'e göre, A annenin fekal örneği içerisindeki PAGE bantlarının görülme sıklık oranı %85,5 iken bu oranın sütte %14,5 olduğu görülmektedir. Diğer bir ifadeyle, H_{1a} hipotezi red edildi.

Tablo 3. 3.C annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkinin dağılımı

	Var		Yok	
	F	%	F	%
C Anne				
Süt	12	18,5	54	20,4
Fekal	53	81,5	211	79,6
Toplam	66	100	264	100

$$p < 0,01 (n=330) \chi^2 = 0,120 \text{ sd} = 1 \text{ Anlamlılık Seviyesi} = 0,729$$

C annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişki test edildi; yapılan *ki-kare* testi sonucunda anlamlı bir ilişki bulunamadı. Tablo 2'e göre, C annenin fekal örneği içerisindeki PAGE bant oranı %81,5 iken bu oranın sütte %18,5 olduğu görülmektedir. Diğer bir ifadeyle, H_{1c} hipotezi red edildi.

Tablo 3. 4. D annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkinin dağılımı

	Var		Yok	
	F	%	F	%
D Anne				
Süt	31	50	35	17,3
Fekal	31	50	167	82,7
Toplam	62	100	202	100

$$p < 0,01 (n=264), \chi^2 = 27,010, \text{ sd} = 1, \text{ Anlamlılık Seviyesi} (p) = 0,000, C = 0,32$$

D annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişki test edildi; yapılan *ki-kare* testi sonucunda gruplar arasında 0,01 anlamlılık düzeyinde bir ilişki bulundu. Değişkenler arasında ilişki bulunduktan sonra *ki-kare* ilişki katsayısına bakılarak ilişkinin gücü belirlendi. C ile ifade edilen bu katsayı, bire yaklaştıkça iki değişken arasındaki ilişkinin güçlü, sıfıra yaklaştıkça da zayıfladığını göstermektedir. *Ki-kare* ilişki katsayısına (contingency coefficient) bakıldığında bu iki değişken arasında %32'lik nispeten zayıf bir ilişki vardır. Tablo 3.4'e göre

D annenin fekal ve süt örnekleri içerisindeki PAGE bant oranının %50 olduğu görülmektedir. Diğer bir ifadeyle, H_{1d} hipotezi kabul edildi.

Tablo 3. 5. E annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkinin dağılımı

	Var		Yok	
	F	%	F	%
E Anne				
Süt	13	20	53	26,6
Fekal	52	80	146	73,4
Toplam	65	100	199	100

$p > 0,01$ (n=264), $\chi^2 = 1,150$, sd= 1, Anlamlılık Seviyesi (p) =0,284

E annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişki test edildi; yapılan *ki-kare* testi sonucunda anlamlı bir ilişki bulunamadı. Tablo 4'e göre E annenin fekal örneği içerisindeki PAGE bant oranı %80 iken bu oranın sütte %20 olduğu görülmektedir. Diğer bir ifadeyle, H_{1e} hipotezi red edildi.

Tablo 3. 6. F annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkinin dağılımı

	Var		Yok	
	F	%	F	%
F Anne				
Süt	16	16,7	50	13,7
Fekal	80	83,3	316	86,3
Toplam	96	100	366	100

$p > 0,01$ (n=462), $\chi^2 = 0,561$, sd= 1, Anlamlılık Seviyesi (p) =0,454

F annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişki test edildi; yapılan *ki-kare* testi sonucunda anlamlı bir ilişki bulunamadı. Tablo 5'e göre F annenin fekal örneği içerisindeki PAGE bant oranı %83,3 iken bu oranın sütte %16,7 olduğu görülmektedir. Diğer bir ifadeyle, H_{1f} hipotezi red edildi.

Tablo 3. 7. N annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkinin dağılımı

	Var		Yok	
	F	%	F	%
N Anne				
Süt	15	13,4	51	17,9
Fekal	97	86,6	234	82,1
Toplam	112	100	285	100

$p > 0,01$ (n=397), $\chi^2 = 01,176$, sd= 1, Anlamlılık Seviyesi (p) =0,278

N annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişki test edildi; yapılan *ki-kare* testi sonucunda anlamlı bir ilişki bulunamadı. Tablo 3.7'ye göre N annenin fekal örneği içerisindeki PAGE bant oranı %86,6 iken bu oranın sütte %13,4 olduğu görülmektedir. Diğer bir ifadeyle, H_{1n} hipotezi red edildi.

Tablo 3. 8. O annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkinin dağılımı

	Var		Yok	
	F	%	F	%
O Anne				
Süt	28	50	38	13,9
Fekal	28	50	236	86,1
Toplam	56	100	274	100

$p < 0,01$ (n=330), $\chi^2 = 37,938$, sd= 1, Anlamlılık Seviyesi (p) =0,000, C =0,339

O annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişki test edildi; yapılan *ki-kare* testi sonucunda gruplar arasında 0,01 anlamlılık düzeyinde bir ilişki bulundu. *Ki-kare* ilişki katsayısına (contingency coefficient) bakıldığında bu iki değişken arasında %33,9'luk nispeten zayıf bir ilişki bulunmaktadır. Tablo 7'ye göre O annenin fekal ve süt örnekleri içerisindeki PAGE bant oranının %50 olduğu görülmektedir. Diğer bir ifadeyle, H_{1o} hipotezi kabul edildi.

Tablo 3. 9. P annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişkinin dağılımı

	Var		Yok	
	F	%	F	%
P Anne				
Süt	39	39	27	11,7
Fekal	61	61	203	88,3
Toplam	100	100	330	100

$p < 0,01$ (n=430), $\chi^2 = 32,372$, sd= 1, Anlamlılık Seviyesi (p) =0,000, C =0,313

P annenin fekal ve süt örnekleri arasındaki ilişki test edildi; yapılan *ki-kare* testi sonucunda gruplar arasında 0,01 anlamlılık düzeyinde bir ilişki bulundu. *Ki-kare* ilişki katsayısına (contingency coefficient) bakıldığında bu iki değişken arasında %31,3' lük zayıf bir ilişki bulunmaktadır. Tablo 3.9' a göre P annenin fekal örneği içerisindeki PAGE bant oranı %61 iken bu oranın sütte %39 olduğu görülmektedir. Diğer bir ifadeyle, H_{1p} hipotezi kabul edildi.

Tablo 3. 10. H1 hipotezi ve alt hipotezleri ile ilgili hipotez testi sonuçları

Hipotezler	Kabul/Ret
H ₁ = Annelerin fekal ve süt örnekleri arasında ilişki vardır.	Ret
H _{1a} = A grubu annenin fekal ve süt örnekleri arasında ilişki vardır.	Ret
H _{1c} = C grubu annenin fekal ve süt örnekleri arasında ilişki vardır.	Ret
H _{1d} = D grubu annenin fekal ve süt örnekleri arasında ilişki vardır.	Kabul
H _{1e} = E grubu annenin fekal ve süt örnekleri arasında ilişki vardır.	Ret
H _{1f} = F grubu annenin fekal ve süt örnekleri arasında ilişki vardır.	Ret
H _{1h} = N grubu annenin fekal ve süt örnekleri arasında ilişki vardır.	Ret
H _{1o} = O grubu annenin fekal ve süt örnekleri arasında ilişki vardır.	Kabul
H _{1p} = P grubu annenin fekal ve süt örnekleri arasında ilişki vardır.	Kabul

Tablo 3. 11. Anne sütü örnekleri arasında korelasyon analizi

Değişkenler	A Grubu	C Grubu	D Grubu	E Grubu	F Grubu	N Grubu	O Grubu	P Grubu
A Grubu	1,00							
C Grubu	0,308*	1,00						
D Grubu	0,139	0,343**	1,00					
E Grubu	0,358* *	0,557**	0,450**	1,00				
F Grubu	0,109	0,283*	0,318**	0,253*	1,00			
N Grubu	0,214	0,307*	0,286*	0,368**	0,706**	1,00		
O Grubu	0,131	0,231	0,298*	0,269*	0,301*	0,412**	1,00	
P Grubu	-0,152	-0,007	0,227	0,025	0,039	0,084	0,153	1,00

p<* 0,05; p<** 0,01

Korelasyon Analizi iki değişken arasında ilişki veya bağımlılık olup olmadığını; var ise yönünü ve gücünü göstermek amacıyla kullanılan çok yaygın bir analiz tekniğidir. Korelasyon katsayısı (r), 0 ile 1 arasında bir değerdir. Eğer katsayı 1'e yakın ise değişkenler arasında güçlü bir ilişki vardır. Aksi durumda ilişki zayıf veya yoktur (Nakip, 2003).

Korelasyon yorumları Nakip'in (2003) geliştirdiği korelasyon katsayılarının ilişki dereceleri dikkate alınarak yorumlandı (Tablo 3.12).

Tablo 3. 12. Korelasyon katsayılarının ilişki dereceleri (Nakip, M., 2003)

Korelasyon Katsayısı	İlişki Derecesi
0	İlişki Yok
0,01-0,1	Çok Zayıf
0,11-0,2	Nispeten Çok Zayıf
0,21-0,3	Zayıf
0,31-0,4	Nispeten Zayıf
0,41-0,5	Çok Az Zayıf
0,51-0,6	Çok Az Güçlü
0,61-0,7	Nispeten Güçlü
0,71-0,8	Güçlü
0,81-0,9	Nispeten Çok Güçlü
0,91-1	Çok Güçlü

Korelasyon tablosuna genel olarak bakıldığında, C annenin süt örneği ile A, D, E, F ve N annelerin süt örnekleri arasında ilişki test edildi; yapılan korelasyon analizi sonucunda gruplar arasında ilişki bulundu. Bulunan sonuçları kısaca şöyledir:

C anne ile A annenin süt örnekleri arasında ilişki test edildi yapılan korelasyon analizi sonucunda 0,05 önem düzeyinde anlamlı ($p=0,012$) ve nispeten zayıf ($r=0,308$) bir ilişki bulundu. C anne ile D annenin süt örnekleri arasında ilişki test edildi, analiz sonucunda 0,01 düzeyinde anlamlı ($p=0,005$) ve nispeten zayıf ($r=0,343$) bir ilişki bulundu. Tabloya göre, C anne ile E annenin süt örnekleri arasında ilişki test edildi, analiz sonucunda 0,01 düzeyinde anlamlı ($p=0,000$) ve çok az güçlü ($r=0,557$) bir ilişki bulundu. Yine tabloya göre, C grubu ile F annenin süt örnekleri arasında ilişki test edildi; analiz sonucunda 0,05

düzeyinde anlamlı ($p=0,021$) ve zayıf ($r=0,283$) bir ilişki bulundu. C anne ile N annenin süt örnekleri arasında ilişki test edildi; yapılan korelasyon analizi sonucunda 0,05 düzeyinde anlamlı ($p=0,012$) ve nispeten zayıf ($r=0,307$) bir ilişki bulundu.

Tabloya bakıldığında, D annenin sütü ile E, F, N ve O annelerin sütleri arasında ilişki test edildi; yapılan korelasyon analizi sonucunda gruplar arasında ilişki bulundu. Bulunan sonuçlar aşağıda kısaca açıklanmaktadır.

D annesi ile E annesinin sütleri arasında ilişki test edildi; analiz sonucunda 0,01 önem düzeyinde anlamlı ($p=0,000$) ve çok az zayıf ($r=0,450$) bir ilişki bulundu. D anne ile F annenin sütleri arasında ilişki test edildi yapılan korelasyon analizi sonucunda 0,01 önem düzeyinde anlamlı ($p=0,009$) ve nispeten zayıf ($r=0,318$) bir ilişki bulundu. Tabloya göre, D anne ile N annenin sütleri arasında ilişki test edildi; analiz sonucunda 0,05 düzeyinde anlamlı ($p=0,02$) ve zayıf ($r=0,286$) bir ilişki bulundu. Yine tabloya göre, C anne ile O annenin sütleri arasında ilişki test edildi; analiz sonucunda 0,05 düzeyinde anlamlı ($p=0,015$) ve zayıf ($r=0,298$) bir ilişki bulundu.

Tabloya göre, E annenin süt örneği ile A, F, N ve O annelerin süt örnekleri arasında ilişki test edildi yapılan korelasyon analizi sonucunda gruplar arasında ilişki bulundu. Bulunan sonuçlar aşağıda kısaca özetlendi.

E anne ile A annenin süt örnekleri arasında ilişki test edildi; yapılan korelasyon analizi sonucunda 0,01 önem düzeyinde anlamlı ($p=0,003$) ve nispeten zayıf ($r=0,358$) bir ilişki bulundu. E anne ile F annenin süt örnekleri arasında ilişki test edildi; analiz sonucunda 0,05 önem düzeyinde anlamlı ($p=0,04$) ve nispeten çok zayıf ($r=0,253$) bir ilişki bulundu. Tabloya göre, E anne ile N annenin süt örnekleri arasında ilişki test edildi; yapılan korelasyon analizi sonucunda 0,01 önem düzeyinde anlamlı ($p=0,002$) ve nispeten zayıf ($r=0,368$) bir ilişki bulundu. Yine tabloya göre, E anne ile O annenin süt örnekleri arasında ilişki test edildi; analiz sonucunda 0,05 düzeyinde anlamlı ($p=0,029$) ve zayıf ($r=0,269$) bir ilişki bulundu.

Tabloya bakıldığında, F anne süt örneği ile N ve O annelerin süt örnekleri arasında ilişki test edildi; yapılan korelasyon analizi sonucunda gruplar arasında ilişki bulundu. Bulunan sonuçlar aşağıda özetlendi.

F anne ile N annenin süt örnekleri arasında ilişki test edildi; analiz sonucunda 0,01 önem düzeyinde anlamlı ($p=0,000$) ve güçlü ($r=0,706$) bir ilişki bulundu. Tabloya göre, F anne ile O annenin süt örnekleri arasında ilişki test edilerek yapılan korelasyon analizi sonucunda 0,05 önem düzeyinde anlamlı ($p=0,014$) ve nispeten zayıf ($r=0,301$) bir ilişki bulundu.

Tabloya göre, N ve O annelerin süt örnekleri arasında ilişki test edilerek yapılan korelasyon analizi sonucunda gruplar arasında ilişki bulundu. Bulunan sonuç kısaca şöyledir:

N anne ile O annenin süt örnekleri arasında ilişki test edilip, analiz sonucunda 0,01 önem düzeyinde anlamlı ($p=0,001$) ve çok az zayıf ($r=0,412$) bir ilişki bulundu.

Korelasyon tablosunda bulunan diğer anne süt örnekleri arasında başka ilişki bulunmamaktadır.

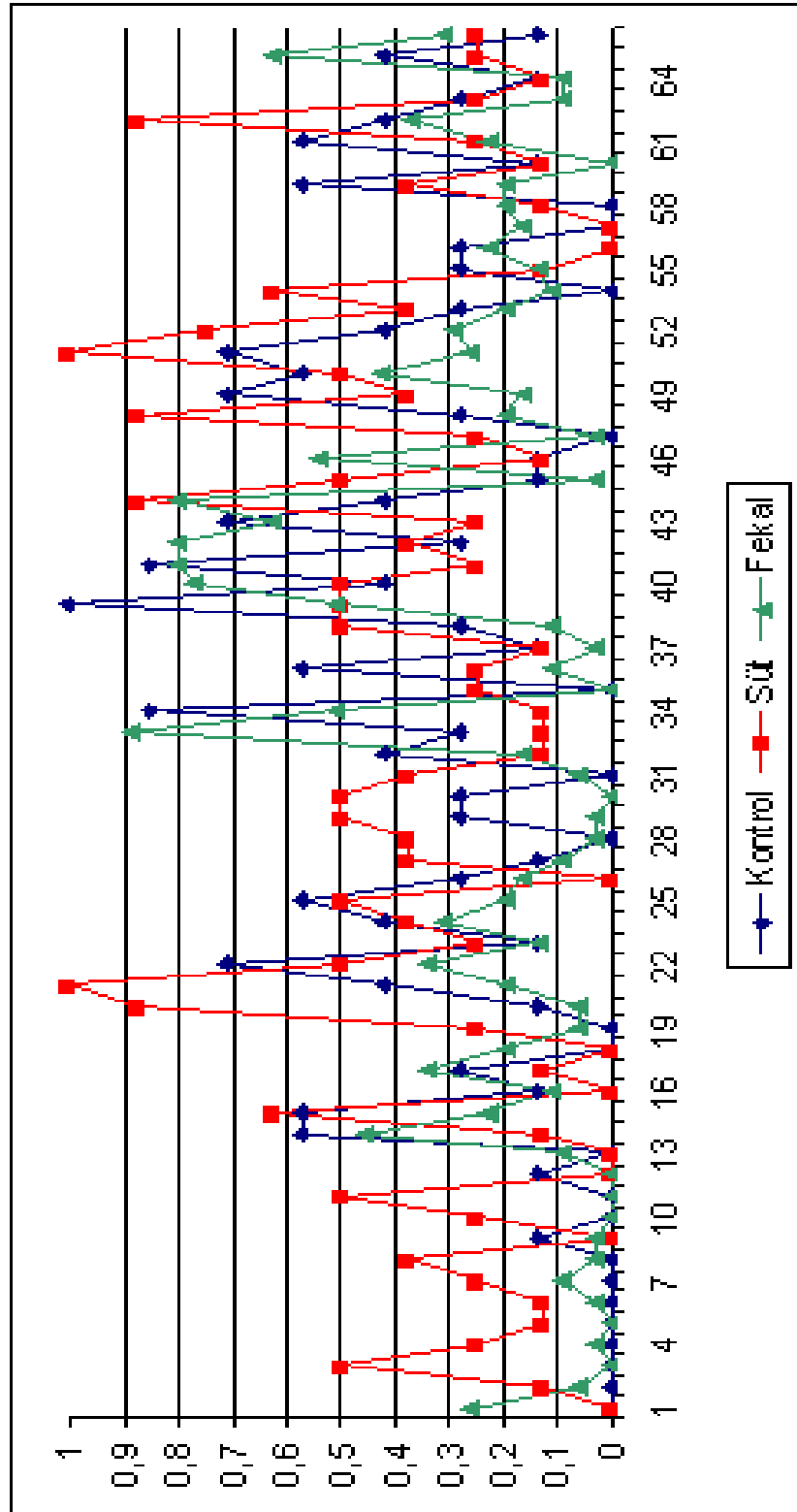
Tablo 3. 13. Doğum şekline göre süt örneklerinin karşılaştırılması

Değişkenler	A,D,E	C,F,N,O,P
A,D,E	1,00	
C,F,N,O,P	0,324**	1,00

$p<^{**} 0,01$

A, D ve E anneleri sezaryen, diğer anneler ise normal yoldan doğum yapmıştır. A,D,E annelerinin süt örnekleri ile C,F,N,O,P grubu annelerin fekal örnekleri arasında ilişki test edildi; yapılan korelasyon analizi sonucunda 0,01 önem düzeyinde anlamlı ($p=0,000$) ve nispeten zayıf ($r=0,324$) bir ilişki bulundu.

Örneklerin geneline bakılacak olursa; aşağıdaki grafik kontrol anne fekali, sütü ve kontrol örnekleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir.



Şekil 3.11. Kontrol, anne fekal ve süt örneklerinin PAGE bantlarının görülme sıklıkları grafiği.

Yukarıdaki grafikte bulunan değişkenler arasındaki ilişki korelasyon analizi ile test edildi ve aşağıdaki tablo oluşturuldu.

Tablo 3. 14. Kontrol, anne fekal ve süt örneklerinde tüm bantların bulunma yüzdelerinin korelasyonu

Değişkenler	K Grubu Anne Fekal Örneği	Tüm Annelerin Süt Örnekleri	Tüm Annelerin Fekal Örnekleri
K Grubu Anne Fekal Örneği	1,00		
Tüm Annelerin Süt Örnekleri	0,311*	1,00	
Tüm Annelerin Fekal Örnekleri	0,573**	0,117	1,00

p<* 0,05; p<** 0,01

Bütün denek annelerin süt örnekleri ile kontrol grubu fekal örneği arasında ilişki test edilerek yapılan korelasyon analizi sonucunda 0,05 önem düzeyinde anlamlı (p=0,011) ve nispeten zayıf (r=0,311) bir ilişki bulundu. Buna ek olarak, bütün denek annelerin fekal örnekleri ile kontrol grubunun örnekleri arasında ilişki test edildi, yapılan korelasyon analizi sonucu 0,01 önem düzeyinde anlamlı (p=0,000) ve çok az güçlü (r=0,573) bir ilişki bulundu. Son olarak, bütün denek annelerin süt örnekleri ile bütün denek annelerin fekal örnekleri arasında, anlamlı bir ilişki bulunamadı.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Gelişmiş ülkelerde artan teknoloji ve zorlaşan yaşam koşulları pek çok doğal besin kaynağının yerine yapay besin maddelerinin kullanılmasına öncülük etmektedir. Anne sütü de bunların başında gelmektedir. Günümüz koşullarında anneler, uzun çalışma saatleri başta olmak üzere pek çok nedenden dolayı bebek beslenmesi için anne sütü yerine yapay bebek mamalarını tercih eder hale gelmiştir. Bu durumun oluşmasında yapay gıda kullanımının gelişmişliğin göstergesi olarak gösterilmesi ve özendirilmesi de son derece etkili olmuştur. Yapay bebek mamaları anne sütü temel alınarak üretilse bile, anne sütünün yerini alamamaktadır. Bu da gelecek nesillerde doğal endojen floranın değişmesine, bunun sonucu olarak da sindirim sistemi hastalıkları başta olmak üzere pek çok hastalığın ortaya çıkmasına neden olacaktır. Bu yüzden, doğru olan, annenin bebeğini kendi vücut salgılarından oluşan, bebeğine özgü sütüyle beslemesidir. Yapılan çalışmalar anne sütünün pek çok hastalığa yakalanma riskini düşürdüğünü ve daha sağlıklı bireyler yetişmesine yardımcı olduğunu göstermektedir.

Ülkemizin de yer aldığı gelişmekte olan ülkelerde insanlar besin kaynağı olarak daha çok doğal besinler kullanmaktadır. Özellikle Sivas'ın içinde bulunduğu bölgede bebeklerin anne sütü ile beslenmesi henüz oldukça yaygındır. Bu açıdan ilimiz bu tarz bir çalışmanın yapılması için çok uygundu. Bölgemiz insanının hem kendisi hem de bebekleri için doğal besin maddeleri tercih etmesi, gerek bağırsakta gerekse anne sütünde doğal endojen bir mikrobiyotaya sahip olmasını sağlamaktadır. Bu mikrobiyotanın da kırsal bölge insanı açısından bir örnek oluşturması söz konusudur. Sağlıklı olmasının yanı sıra, ucuz ve kullanışlı olması ülkemiz insanı için anne sütünün öneminin vurgulanıp emzirmenin teşvik edilmesinde önemli etkenlerdir.

Anne sütünün en önemli özelliği, bebek için gerekli bütün besin maddelerini aynı anda ve dengeli biçimde içeriyor olmasıdır. Mevcut bebek mamaları, anne sütünün yalnızca bir veya birkaç özelliğini taşımaktadır. Bunun da bebekler açısından yeterliliği tartışılır düzeydedir. Anne sütü bebek için en

uygun olan ve pek çok farklı bileşimi bir arada bulunduran biyolojik olarak kompleks bir sıvıdır (Darragh, 2002). Bu bileşiklerin başında mikroorganizmalar, bağışıklık sağlayan ajanlar, besin maddeleri, iltihabı engelleyen bileşenler, hormonlar, büyüme faktörleri ve enzimler gibi bileşenler gelmektedir (Hamosh, 2001; Darragh, 2002). Süt, kompleks proteinler, karbohidratlar, lipitler ve polinükleotitlerden oluşan ve sayısız koruma faktörleri içeren eşsiz bir sıvıdır (German, 2002). Anne sütü içerdiği pek çok besin maddesinden öte içeriğinde bulunan yararlı mikroorganizmalar bakımından yapay besin maddelerinden üstündür. Daha önce de vurgulandığı gibi anne, süt aracılığıyla bebeğine sürekli bakteri aktarımında bulunmaktadır. Anne sütü mikroorganizmaları neonatal bağırsak mikroflorasının kompozisyonunun, başlaması ve gelişiminde önemli bir faktördür. Bu da bebek bağışıklık sistemi açısından son derece önemlidir. Anne, sütü ile bebeğini beslerken, bebeğinin organlarının gelişmesini sağlamakta hem de korumaktadır. Geçmiş yıllarda anne sütü ile yapılan çalışmalar genellikle patojen ve mastisite yol açan bakterilerle ilgili ya da bebek enfeksiyonu vakalarından yola çıkılan çalışmalardır. Anne sütü komensal bakterileri ile yapılan çalışmalar çok sınırlıdır (Martín ve Ark., 2005). Bu yüzden anne sütü, değerinin belki de çok altında nitelendirilmiştir. Ancak son zamanlarda anne sütü komensal mikroorganizmaları ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu eşsiz sıvı içerisinde komensal pek çok tür keşfedilmiş ve de keşfedilmeye devam edilmektedir. Her bir yeni türün keşfi bu mikroorganizmaların bazılarının nereden köken aldığına ilişkin yeni soru işaretlerine yol açmıştır. Son zamanlarda daha önceden vurgulandığı üzere anne sütünde bulunan mikroorganizmaların en azından bazılarının endojen yollarla maternal bağırsaktan meme bezine taşınıyor olabileceğine ilişkin iddialar gündeme gelmiştir (Martín ve Ark., 2004). Bu iddialar olabilecek içsel rotalar açısından değerlendirilip incelenmiştir. Bu çalışmada, anne sütü mikroflorasının total olarak parmakizi analizini çıkarmak ve maternal fekal florası ile karşılaştırma yaparak bu tür iddialara farklı bir bakış açısı sağlamak amaçlandı.

Çalışmada farklı sosyoekonomik düzeyde ve kültürde donörler kullanıldı. Bu donörlerden alınan örneklerle doğrudan total DNA izolasyonu yapıldı. Kalın

bağırsak ve süt mikroflorasının tayini için, kültüre bağımlı tekniklerin tercih edilmemesinin nedeni kuşkusuz bu organizmalardan birçoğunun kültür koşulları hakkında yetersiz bilgiye sahip olunması ve anaerobik grupların çoğaltılmasındaki güçlüklerdir. Doğrudan DNA özütleme ile bu sorunların aşılması amaçlandı.

Süt örnekleri ikişer haftalık periyotlarla ve her seferinde yaklaşık 50 ml süt sağımı ile yapıldı. Uzun süre yapılan çalışmalar sonucunda yeterli DNA elde edilemedi. Ancak, tüm süt örnekleri birleştirildikten sonra her donöre ait tek bir süt profili elde edildi.

Birçok moleküler yöntem, rRNA ve kodlandığı genlerin kullanımını esas almıştır. Tüm rRNA dizilerinin birincil yapıları, mikroorganizma türlerinin saptanması ve tanımlanması için oldukça uygun, değişken ve korunmuş bölümleri (domain) içerir (Vaughan ve Ark., 2000). Bu nedenle PCR aracılığıyla 16S rRNA gen bölgesi bütün bakteri gruplarının 16S rRNA gen bölgesine özgü evrensel primerler kullanılarak çoğaltıldı. Daha sonra bu ürünler *Taq* I ve *Hae* III enzimleri ile kesildi. *Taq* I düşük G+C içeriğine sahip grupları tanımlamayı, *Hae* III yüksek G+C içeriğine sahip türleri tanımlamayı kolaylaştırmaktadır. Örneğin; birçok enterokok türünün tanımlanmasında *Hae* III enzimi (Bulut ve Ark., 2005), *Lactobacillus* türlerinin tanımlanmasında ise *Taq* I daha bilgi vericidir (Yavuz ve Ark., 2004). İki enzimle birden kesilmiş örneklerin daha zengin bir bant profili sergileyebileceği düşünüldü. Elde edilen kesim ürünleri %8' lik poliakrilamit jelde yürütülmüştür. Oluşan profiller veri matrisine dönüştürülerek (Tablo 2.2) UPGMA dendrogramında görüntülendi (Şekil 3.7). A ile gösterilen bantlar kararlı bantlar olarak nitelendirildi. Kararlı bantlar; kontrol, anne fekal ve süt örneklerinin büyük bir kısmında süreklilik gösteren bant profillerinden oluşmaktadır. B grubu bantlar ise genellikle süreksiz, örneklerin bir kısmında ortaya çıkan, yarı kararlı ya da kararsız bantları içermektedir. A grubu kararlı bantlar burada önem arz etmektedir. Jel üzerinde de açıkça görüldüğü gibi, A grubu bantlar her üç grubun da büyük bir kısmında kararlı bir şekilde görülmektedir (Şekil 3.8). Tablo 3.1'de bu bantların süt, fekal ve kontrol

örneklerindeki yüzde dağılımı verildi. Özellikle bazı bantlar hemen hemen bütün örneklerde gözlemlendi. Örneğin 44 numaralı bant sütlerde %88 ve anne fekalinde %80 oranında mevcuttur. Aynı bant tüm örneklerin %71.7'sinde vardır (Şekil 3.10). Yine 40, 22 ve 39. bantlar da süt ve fekal örneklerde benzer şekilde varlık göstermektedir. Şekil 3.10'da jeldeki tüm bantlara ait görülme sıklığı grafiğinde kararlı bantlar açık şekilde görülmektedir. Şekil 3.9'da bu kararlı bantlara ait çizgi grafikleri verildi.

Araştırmadan elde edilen sonuçlar birden fazla istatistiksel analiz yöntemi kullanılarak elde edildi. Bunun için SPSS istatistik paket programında yer alan non-parametrik testlerden yararlanıldı. Non-parametrik analiz, parametrik olmayan yani karşılaştırma yapılacak verilerin birbirine paralel ve eşit sayıda olmadığı durumlarda kullanılan analiz yöntemidir. Bu program yardımıyla frekans dağılımı, *ki-kare* ve korelasyon analizleri uygulandı. Fekal ve sütler arasındaki ilişkinin analizi için öncelikle *ki-kare* testi uygulandı. Örnekler arasındaki ilişki ile ilgili hipotez ve alt hipotezler geliştirildi (bakınız Bulgular). D,O ve P kodlu annelerde istatistiksel açıdan nispeten zayıf ancak anlamlı bir ilişki bulundu (Tablo 3.4., Tablo3.8. ve Tablo3.9). Diğer beş fekal ve süt örnekleri arasındaki PAGE bantlarına dayalı benzerlik hipotezleri red edildi. Yani bu bireylerin fekal ve süt örneklerine ait PAGE bantlarının toplam analizi istatistiksel açıdan önem arz edecek bir benzerlik bulamadı. Bunun anlamı bu kişilere ait fekal ve süt örneklerin ortak bantların bulunmaması değildir. Ancak, toplam olarak karşılaştırma yapıldığında istatistiksel açıdan anlamlı ve yeterli olmaması söz konusudur. Kararlı bantlara bakıldığında tüm fekal ve süt örnekleri arasında ortak belirli bantların olduğu görülmektedir (Şekil 3.5).

Bütün annelere ait süt örnekleri için korelasyon analizi ile karşılaştırma yapıldı (Şekil 3.6). Buradan elde edilen sonuçlara göre Tablo 3.11.'de görüldüğü ve bulgularda vurgulandığı gibi Tablo 3.12'deki ilişki derecesi birbirinden farklı olmak üzere pek çok annenin sütleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı benzerlikler bulundu. Bu benzer bantlar jelde de gözle görülebilir niteliktedir (Şekil 3.6).

Doğum şekillerine göre gruplandırma ile yapılan korelasyon analizinde, sezaryenle doğum yapan A, D, E kodlu annelerin sütleri ile normal yoldan doğum yapan C, F, N, O ve P annelerinin sütleri arasında nispeten zayıf sayılabilecek bir ilişki bulundu (Tablo 3.12).

En sonunda tüm annelere ait fekal örnekler, süt örnekleri ve kontrol grubu örneklerinde herbir bandın bu üç gruptaki yüzdeleri alınarak korelasyon analizi yapıldı. Tüm bantların yüzdelerinin korelasyonundan elde edilen sonuç: anne fekal ve kontroller arasında az güçlü, kontrol ve süt arasında nispeten zayıf ilişki bulundu; anne fekal ve süt örnekleri arasında toplamda bir ilişki bulunamadı. Bu korelasyon testine ait görülme sıklığı grafikte gösterildi (Şekil 3.11).

Bu analizlerden yola çıkarak bütün annelerin süt örnekleri göz önüne alındığında; hem kişiden kişiye değişen hem de ortak bir anne süt mikroflorasının varlığından söz etmek mümkündür. Annenin beslenme şekli, yaşadığı çevre, geçirdiği veya geçirmekte olduğu hastalıklar burada oluşabilecek flora farklılıklarında etkindir. Ancak gözle görülür şekilde her annenin sütünde olan, kesinlikle birbirini tanımayan ve farklı ortamlarda yaşayan kişiler arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda tamamen aynı olamamakla birlikte benzerlikler olduğu açıktır. Doğum şekilleri farklı olsa bile (sezaryen veya normal doğum) süt örneklerine ait bazı ortak bantlar bulundu. Bu bulgu anne sütünün dış etmenlerden etkilenmeyen, kendi içinde doğal bir mikroflorasının varlığına işaret edebilir.

Annelerin fekal örnekleri ile süt örneklerine bakıldığında bazı annelerde zayıf da olsa benzerlikler görüldü. Ancak, tüm anne fekal ve tüm süt örnekleri iki ayrı grup olarak karşılaştırıldığında bu zayıf benzerliğin kaybolduğu gözlemlendi. Buna fekal örneklerde bulunan bakterilerin çok sayıda ve çeşitli, süttekilerin ise daha sınırlı oluşu neden olmuş olabilir. Kararlı bantlar için anne süt ve fekal örnekleri arasındaki benzerlikler açıktır. Buradan yola çıkılarak; anne fekal bakterilerinin içsel bir rota izleyerek süte taşınımı ne kabul edilebilir ne de

reddedilebilir. Anne kalınbağırsağından süte taşınım söz konusu olabilir ancak bu taşınım sınırlı ve sadece birkaç tür için geçerli olabilir.

Kontrol ile annelere ait örnekler karşılaştırıldığında az güçlü bir benzerlik bulundu. Her ikisi de fekal örnek olmasına karşın gözlemlenen farklılıklar kişilerin yaşam şekillerinin veya hormonal değişime bağlı olarak hamile bireylerde belirli flora değişikliğinin bir sonucu olarak değerlendirilebilir.

Doğal besin maddeleriyle, özellikle ev yapımı süt ürünleri ile beslenen annelerde daha kararlı ve düzenli bir bant profili olduğu yapılan çalışmada açıkça gözlemlendi. Yapay gıdalarla ve marketten alınan hazır ürünlerle beslenen kişilerin başta kabızlık olmak üzere daha sık bağırsak problemleri ile karşılaştıkları görüldü. Ayrıca bu kişilerin bant profilleri diğerleri ile karşılaştırıldığında son derece kararsız ve çeşitli olduğu gözlemlendi (Tablo 2.2). Annelerin sürekli takip altında tutulması pek çok açıdan değerlendirme yapılmasına olanak sağlamıştır. Yapay gıdaları çok tüketen, süt ve süt ürünlerince fakir bir beslenme şekli olan kişilerin hamilelikleri süresince çok fazla kabızlık sorunu yaşadığı ve doğum sonrasında ise aynı sorunun bebeğinde yansıdığı gözlemlendi (O,P). Bu kişilerin bant profillerine bakıldığında diğer annelerden çok farklı kararsız ve çeşitli bir profile sahip olduğu gözlenmektedir.

Anne sütü ile yapılacak çalışmalar gelecek kuşakların daha sağlıklı olmalarına yardımcı olacaktır. Anne sütü ile yapılan bu ve benzeri çalışmalar, gelecek daha ileri araştırmaları cesaretlendirmelidir. Bu sayede anne sütü bakterilerinin orijinin bulunarak; bebek bağırsak mikroflorası yararlı bakteriler yönünde modüle edilebilir. Çünkü bebek bağırsak mikroflorası, özellikle ilk aylar boyunca, anne sütünün bir yansıması şeklindedir. Çalışmalar anne fekal bakterilerinin bebek bağırsağına geçiş yolu olarak iddia edilen göbek kordonu ve amniyotik sıvı bakterilerini de kapsayacak şekilde genişletilebilir. Böyle bir geçiş yolunun araştırılması, taşıyıcı olarak vurgulanan dendritik hücrelerin, bunların komensal bakteriler ile arasındaki ilişkilerin çalışılmasını da gerektirmektedir. Tez kapsamında yapılan çalışmalara total bebek bağırsak mikroflorasının

analizleri de eklenecek ve anne, süt ve bebek üçgeninin tanımlanması sağlanacaktır.

5. KAYNAKLAR

- Alvarez-Olmos, M. ve I., Oberhelman, R. A.,** 2001, Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy: *Clinical Infectious Diseases*, 32, s.1567–1576.
- Akgül, A. ve Çevik O.,** 2003, İstatistiksel analiz teknikleri: SPSS’de işletme yönetimi uygulamaları, Yeni Mustafa Kitabevi, Ankara.
- Arunachalam K.D.,** 1999, Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology: *Nutrition Research*, 19, s.1559–1597.
- Barry T., Colleran G., Glennon M., Dunican L.K., Gannonl F.,**1991, The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify: *PCR Methods Appl.*, 1, s.51-56.
- Bezirtzoglou, E.,** 1997, The Intestinal Microflora During the First Weeks of Life: *Anareobe Akademik Press*, Volume 3: Number 2–3, s.173–177(6).
- Bulut C., Gunes, H., Okuklu B., Harsa S., Kilic S., Coban H. S., Yenidunya A. F.** (2005). Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese comlek peyniri from Cappadocia region. *Journal of Dairy Research*. 72: 19–24.
- Christensen H., Møller P.L., Vogensen F.K. ve Olsen E.** 2000, Sequence variation of the 16S to 23S rRNA spacer region in *Salmonella enterica*: *Res. Microbiol.*, 151, s.37–42.
- Collins,D. ve Gibson G.,** 1999, Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulatings the microbial ecology of the gut: *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 69: No. 5, s.1052–1057.
- Darragh, A.,** 2002, Human Milk., Massey University, Palmerston North, New Zealand Elsevier Science, s.1350-1360
- Devriese L.A. ve 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), s.327–367.
- Díaz-Ropero, M.P., Martín, R., Sierra, S., Villoslada, F.R., Rodriguez, J.M., Xaus, J. ve Olivares, M.** 2006, Two lactobacillus strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response: *Journal of Applied Microbiology*, s.1-7.
- Gdalevich, M., Mimouni, D., David, M., ve Mimouni, M.,** 2001, Breast-feeding and the onset of atopic dermatitis in childhood: a systematic review with meta-analysis of prospective studies: *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45, s.520–527.
- German, J. B., Dillard, C. J., Ward, R. E.,** 2002, Bioactive components in milk: *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 5(6),

s.653-658.

- Gorbach S.**, 2002, Probiotics in the third millennium: *Digest Liver*, 21: s.2–7.
- Gramley W.A., Asghar A., Frierson H.F. ve Powell S.M.**, 1999, Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Fecal Samples from Infected Individuals: *Journal Of Clinical Microbiology*, 37, s.2236–2240.
- Gueimonde, M., Laitinen, K., Salminen, S. ve Isolauri E.**, 2007, Breast Milk: a source of bifidobacteria for Infant gut development and maturation?: *Neonatology*, 92, s.64-66.
- Hammes W.P. ve Vogel R.F.**, 1995, “The genus *Lactobacillus*” in *The Lactic Acid Bacteria, The Genera of Lactic Acid Bacteria, Volume 2*, edited by B.J.B. Wood and W.H. Holzapel (Blackie Academic & Professionals, Glasgow), s.19–54.
- Hamosh, M.**, 2001, Bioactive factors in human milk. Professor of Pediatrics, Department of Pediatrics, Georgetown University Medical Center Washington, D.C., s.2007–2197
- Hardie J.M. ve 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. Holzapel (Blackie Academic & Professionals, Glasgow), s.55-124.
- Hébert, G.A.**, 1990, Hemolysins and other characteristics that help differentiate and biotype staphylococcus lugdunensis and staphylococcus schleiferi: *Journal of Clinical Microbiology*, vol.28, no.11, s.2425-2431
- Heikkila, M.P. ve Saris, P.E.J.**, 2003, Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk: *Journal of Applied Microbiology*, 95, s.471–478.
- Herich, R. ve Levkut, M.**, 2002, Lactic acid bacteria, probiotics and immune system: *Vet. Med. – Czech*, 47, 2002 (6), s.169–180.
- Holzapel W, Haberer P, Snell J, Schillinger U ve Huis in’t Veld J.**, 1998, Overview of gut flora and probiotics: *International J. Food Microbiology*, 41. s.85–101.
- Jiménez E., Fernández L., Marín M., Martín Rocío, Odriozola J. M., Nueno-Palop C., Narbad A., Mónica Olivares, Xaus J. ve Rodríguez J.M.**, 2005. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section: *Current Microbiology*, 51, s.270–274.
- Kalliomäki M, Salminen S. ve Poussa T.**, 2001, Probiotics and prevention of atopic disease—a 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial: *Lancet*, 361, s.1869–1870.

- Kirjavainen, P.V., Apostolou, E., Arvola, T., Salminen, S.J., Gibson, G.R. ve Isolauri, E.,** 2001, Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease: *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 32, s.1–7.
- Klaenhammer, T. R. ve Kullen, M. J.,** 1999, Selection and design of probiotics: *International Journal of Food Microbiology*. 45, s.45–57.
- Laubereau, B., Filipiak-Pittroff, B., Von Berg, A., Grubl, A., Reinhardt, D., Wichmann, H. ve Koletzko, S.,** 2004, Caesarean section and gastrointestinal symptoms, atopic dermatitis, and sensitisation during the first year of life: *Arch Dis Child*, 89, s.993–997.
- Leblond-Bourget N., Philippe H., Mangin I. ve Decans B.,** 1996, 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny: *International Journal Of Systematic Bacteriology*, 46, s.102–111.
- Liepke, C., Adermann, K., Raida, M., Mägert, H. J., Forssmann, W. G. ve Zucht H. D.,** 2002, Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria: *European Journal of Biochemistry*, 269(2): s.712–718.
- Mackie R. I., Sghir A., Gaskinsvitro H.R.,** 1999, Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69, s.1035–1045.
- Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín M.L., Olivares M., Boza J., Jiménez J., Fernández L., Xaus J. ve Rodríguez M.J.** ,2003, Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut: *J. Pediatr.*, 143, s.754–758.
- Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín M.L., Olivares M., Boza J., Jiménez J., Fernández L., Xaus J. ve Rodríguez M.J.,** 2004, The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics: *Trends in Food Science and Technology*, 15, s.12–27.
- Martín R., Olivares M., Marin M.L., Fernandez L., Xaus J., ve Rodriguez J.M.,** 2005, Probiotic potential of 3 Lactobacilli strains isolated from breast milk: *Journal of Human Lactation*, 21(1), s.8-17.
- Nascimento, M. ve Issler, H.,** 2003, Breastfeeding: making the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns: *Rev. Hosp. Clin. Fac. med. S. Paulo*, 58(1), s.49–60.
- Nakip M.,** 2003, Pazarlama Araştırmaları Teknikleri ve (SPSS Destekli) Uygulamalar, Seçkin Yayıncılık, Ankara, s.322.
- Nassif X., Bourdoulous S., Euge'ne E. ve Couraud P. O.,** 2002, How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier?: *Trends in Microbiology* 10, s.227–232.

- Newburg, D. S.**, 2005. Innate Immunity and Human Milk.: *American Society for Nutritional Sciences*, 135, s.1308-1312.
- Newburg, D. S., Ruiz–Palacios, G. M. ve Morrow A. L.**, 2005, Human milk glycans protect infants against enteric pathogens: *Annual Review of Nutrition*, Vol. 25, s. 37–58.
- O’Hara A.M. ve Shanahan F.**, 2006, The gut flora as a forgotten organ: *EMBO reports*, 7, s.688–693.
- Per Brandtzaeg**, 2003, Mucosal immunity: integration between mother and the breast–fed infant: *Vaccine*, 21, s.3382–3388.
- Qu L., Li X., Wu G.** (2005). Efficient and sensitive method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 26: 99–101.
- Reid, G., Howard, J., ve Gan, B. C.**, 2001, Can bacterial interference prevent infection?: *Trends in Microbiology*, 9, s. 424–428.
- Salminen, S. ve Von Wright, A.**, 1998, Current probiotics —safety assured?: *Microbial Ecology in Health and Disease*, 10, s.68 –77. *Scandinavian University Press*.
- Sgorbati B., Biavati B. ve Palenzona D.**, 1995, “The genus *Bifidobacterium*” 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), s.279–306.
- Sreekumar, O. ve Hosono, A.**, 2000, Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the *in vitro* inhibition of *Escherichia coli* in coculture: *Journal of Dairy Science*, 83, s.931–939.
- Stagg, A. J., Hart, A.L., Knight, S.C.**, 2004, Interactions between dendritic cells and bacteria in the regulation of intestinal immunity: *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, Vol. 18, No. 2, s.255–270.
- Stiles M.E. ve Holzapfel W.H.**, 1997, Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy: *International Journal of Food Microbiology*, 36, s.1–29.
- Tannock, G.W.**, 1997, Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D: *Trends in Biotechnology*, 15, s.270 –274.
- Vaughan E.E., Schut F., Heilig H.G.H.J., Zoetendal E.G., de Vos W.M. ve Akkermans A.D.L.**, 2000, A molecular view of the intestinal ecosystem: *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 1, s.1-12.
- Wright, K. C. ve Fenny, A. M.**, 1998, The bacteriological screening of donated human milk: Laboratory experience of British Paediatric Association’s published guidelines: *Journal of Infection*, 36, s.23–27.

Yavuz E., Gunes H., Bulut C., Harsa S., Yenidunya A. F. (2004). RFLP of 16S-ITS rDNA region to differentiate Lactobacilli at species level. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 20: 535–537.

6. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Sivas'ta doğdu. Lise eğitimini Sivas'ta tamamladı. 1998 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı ve 2003 yılında mezun oldu. 2003 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ortaöğretim Alan Öğretmenliği dalında tezsiz yüksek lisans yaptı. 2005 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilimdalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Bu alanda eğitimine devam etmektedir.

7. EKLER

Ek 1. Kimyasallar

No	Kimyasal	Kod
1	<i>Hae</i> III	Fermentas ER0701
2	<i>Taq</i> I	Fermentas ER0671
3	Lizozim	Applichem A4972
4	Rnaz	Applichem A3832
5	Pepton	Merk 107213
6	Tetrametilendiamin (TEMED)	Merk 1107320
7	dNTP Set	Fermentas R0181
8	β -Merkaptoetanol	Merk 444203
9	Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA)	Merk 324503
10	İzopropanol	Merk 818766
11	Sodyum Asetat	Merk 567418
12	Tris	Sigma 93362
13	Sodyum Klorür	Merk 567441
14	Gliserol	Merk 356352
15	Borik Asit	Merk 203667
16	Glasiyel Asetik Asit	Merk ACS003
17	İzoamilalkol	Merk 818969
18	Formaldehit	Merk 344198
19	Kloroform	Merk 822265
20	Etanol	Merk 107017
21	Sukroz	Amresco 0335
22	Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Amresco 0227
23	Agaroz	Bioron 604001
24	Bromfenol Mavisi	Amresco 0449
25	Etidyum Bromür	Amresco 0492
26	Gümüş Nitrat	Applichem A3944
27	Akrilamit	Sigma A9099
28	Bisakrilamit	Applichem A3636
29	3-(Trimetilsilil)propil metakrilat	Sigma M6514
30	Amonyum Per Sülfat	Applichem A2941
31	Nitrik Asit	Merk NX0412
32	Sodyum Karbonat	Merk 106392
33	<i>Taq</i> DNA Polimeraz	Fermentas EP0402
34	Mineral yağ	Applichem A2135
35	Formamit	Merk 344205
36	Setil Trimetil Amonyum Bromür (CTAB)	Biochemica A6284
37	8-Hidroksikinolin	Sigma H6878
38	Dimetildiklorosilan	Applichem A1655

Ek 2. Oligonükleotitler Restriksiyon Enzimleri ve dNTP

1. Ege 1 Primeri

EGE 1: 5'-AGAGTTTGATGATCCTGGTCG -3'

İki µg/ml stok çözelti elde etmek için, 293,3 µg EGE 1 150 µl steril distile su içerisinde çözündürüldü. 5,6 µl stok solüsyonu 94,4 µl steril distile suyla karıştırıldı. Böylece 100 µl, 10 pmol/µl kullanılan çözelti elde edildi. Kullanılan ve stok çözeltileri -20 oC' de saklandı.

2. Ege 2 Primeri

EGE 2: 5'- CTACGGCTACCTTGTTACGA -3'

İki µg/ml stok çözelti elde etmek için, 498,2 µg EGE 2 200 µl steril distile su içerisinde çözündürüldü. 4,9 µl stok solüsyonu 95,1 µl steril distile suyla karıştırıldı. Böylece 100 µl, 10 pmol/µl kullanılan çözelti elde edildi. Kullanılan ve stok çözeltileri -20 °C' de saklandı.

3. Taq I

5'- T ▼ CGA - 3'

Hae III

5'- GG ▼ CC - 3'

4. dNTP (10x)

Her 100 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP' den 10 µl alınarak, 460 µl steril distile su eklendi ve karıştırıldı. Böylece her biri için 2 mM konsantrasyon elde edildi.

Ek 3. Tamponlar ve Stok Çözeltiler**1. 1 M Tris-HCl (pH 8)**

Tris (121,1 g) 800 ml distile suda çözündürüldü. pH, konsantre HCl ile 8,0' ye ayarlandı, hacim distile suyla 1000 ml' ye tamamlandı. Çözelti 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

2. EDTA (0,5 M, pH 8)

EDTA (186,12 g) 800 ml distile suda çözündürüldü ve pH, 10 N NaOH ile 8,0' e ayarlandı. Çözelti 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3. 50x TAE

Tris (242 g) distile suda çözündürüldü. Sonra, 57,1 ml glasiyel asetik asit ve 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8) eklendi. Hacim 1000 ml distile suyla 1000 ml' ye tamamlandı. Çözelti 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

4. Sodyum Klorür (5 M)

NaCl (292,2 g) distile suda çözündürülerek, hacim 1000 ml' ye tamamlandı. Çözelti 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

5. Sodyum Asetat Çözeltisi (3 M, pH 5.2)

Sodyum asetat (408,1 g) 800 ml distile suda çözündürüldü ve pH glasiyel asetik asitle 5,2' ye ayarlandı. Hacim distile suyla 1000 ml' ye tamamlandı. Çözelti 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

6. TE (40x)

Tris-Cl (100mM, pH 8)

EDTA (10mM, pH 8)

Çözelti 121 °C' de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

7. CTAB/NaCl (0,7 M NaCl İçerisinde %10' luk CTAB)

NaCl (4,1 g) 80 ml su içerisinde çözündürüldü. Karıştıarak yavaş yavaş 10 g CTAB eklendi. Eğer gerekliyse karışım 65 °C' ye kadar ısıtıldı ve son hacim 100 ml' ye tamamlandı.

8. SDS (% 10)

SDS (10 gr) 80ml distile suyla 68°C' de ısıtılarak çözündürüldü, HCl ile pH 7,2' ye ayarlandı ve son hacim distile suyla 100 ml' ye tamamlandı.

9. Sukroz özeltisi (% 25)

Sukroz (25 gr) bir miktar 1x TE' de çözündürüldü ve hacim 1x TE ile 100 ml' ye tamamlandı.

10. Fenol

İlk olarak, fenol +4 °C' den çıkarılıp, oda sıcaklığına kadar ısıtıldı ve 68 °C' de eritildi. Son konsantrasyon %0.2 olacak şekilde hidroksikinolin eklendi. Daha sonra eşit hacimde 0,5 M Tris HCl (pH 8) eklenerek, karışım 15 dakika karıştırıldı, iki faz oluşması beklendi. Üst faz ayırma hunisiyle uzaklaştırıldı ve fenol üzerine eşit hacimde 0,1 M Tris HCl (pH 8,0) eklendi. Karışım tekrar 15 dakika karıştırıldıktan sonra üst faz uzaklaştırıldı. Özütmeye fenolik fazın pH'ı 7,8' den büyük oluncaya kadar devam edildi. PH, pH kağıdı kullanılarak ölçüldü. PH dengelendikten ve son kez üst faz uzaklaştırıldıktan sonra, 0,1 M Tris HCl' den (pH 8) 0,1 hacim eklendi. Karışım parçalara ayrılarak -20 °C' de saklandı. Fenol, kullanmadan önce oda sıcaklığına kadar eritildi, %0,1 β-merkaptöetanol eklendi.

11. Kloroform İzoamil Alkol (24:1)

Kloroform (96 ml) 4 ml izoamil alkolle karıştırıldı.

12. Akrlamit Çözeltisi (%40)

Akrlamit (38,93 gr) ve 1,06 gr bisakrlamit bir miktar distile suda çözüldürüldükten sonra, 100 ml' ye tamamlandı.

13. TBE (10x)

Tris (54 gr), 22,5 gr borik asit ve 4,1 gr EDTA bir miktar distile suda çözüldürüldükten sonra, 500 ml' ye tamamlandı.

14. TES Tamponu

Beş mililitre 1 M Tris, 1ml 5 M NaCl, 1 ml 0,5 M EDTA distile suyla 100 ml' ye tamamlandı.

15. NET Tamponu

İki buçuk mililitre 5M NaCl, 12.5 ml 1 M Tris, 62.5 ml 0.5 M EDTA distile suyla 250 ml' ye tamamlandı.

16. Etidyum Bromür Stok Çözeltisi (10 mg/ml)

Etidyum bromür (0,5 g) 50 ml distile suda çözüldürüldü.

17. DNA Moleküler Ağırlık Markörü Dilüsyonu

Altı mikrolitre markör, 6 µl yükleme tamponu ve 49 µl distile su karıştırılarak 100 ng/ µl konsantrasyon elde edildi.

18. TBE Jel Yürütme Tamponu (6x)

Altı mililitre gliserol, 2 ml 10x TBE ve 12 ml distile su karıştırıldı, yeterli rengi elde etmek için bir kürdan yardımıyla brom fenol mavisi eklendi. Agaroz jel için TAE tamponuyla hazırlanan yürütme tamponu kullanıldı.

19. Amonyum Per Sülfat (% 10'luk) Çözeltisi

Amonyum per sülfat (0,1 gr) tartılmış, 1000 µl distile suda çözüldü. Taze olarak kullanıldı.

20. Silan Çözeltisi

Absolüt etanol (950 µl), 5 µl glasiyel asetik asit ve 2 µl 3-(Trimetilsilil) propil metakrilat 4 Eppendorf tüpte taze olarak hazırlanarak kullanıldı.