

**HAMİLELİK SÜRECİNDE ANNE
KALIN BAĞIRSAK BAKTERİLERİ
16S rDNA PARMAK İZİ**

**CANAN KARAKOÇ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2008**

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAMİLELİK SÜRECİNDE ANNE
KALIN BAĞIRSAK BAKTERİLERİ
16S rDNA PARMAK İZİ

CANAN KARAKOÇ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ 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 onaylıyorum.

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

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. Kalın Bağırsak Mikroflorası ve Önemi	2
1.1.1. Kompozisyon	2
1.1.2. Mikrofloranın rolü.....	5
1.1.3. Probiyotikler.....	8
1.1.4. Prebiyotikler	10
1.1.5. Mikrofloranın Gelişimi	10
1.2. Hamilelik Sürecinde Kalın Bağırsak Mikroflorasının Fetüs Üzerindeki Önemi	12
1.3. Kalın Bağırsak Mikrobiyotasında Bulunan Bazı Önemli Cinsler	14
1.3.1. <i>Lactobacillus</i>	14
1.3.2. <i>Bifidobacterium</i>	15
1.3.3. <i>Streptococcus</i>	16
1.3.4. <i>Clostridium</i>	16
1.3.5. <i>Enterococcus</i>	17
1.3.6. <i>Bacteroides</i>	17
1.3.7. <i>Lactococcus</i>	17
1.4. Kalın Bağırsak Mikroflorasının Karakterizasyonu	18
1.4.1. Örnekleme	18
1.4.2. Klasik Yaklaşımlar.....	18
1.4.3. Moleküler Yöntemler	20
1.4.3.1. 16S ribozomal DNA (rDNA), ITS (Internal Transcribed Spacer) ve recA Gen Bölgelerinin Dizi Analizi.....	22
1.4.3.2. Denatüre edici Jel Elektrofrezisi (DDGE) ve Termal Gradyent Jel Elektrofrezisi (TGGE)	23
1.4.3.3. 16S rRNA Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	23

1.4.3.4. Atımlı Alan Jel Elektroforezi (PFGE).....	24
1.4.3.5. Ribotipleme	24
1.4.3.6. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD).....	24
1.4.3.7. Rivörs Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	25
1.4.3.8. Bakterilerin in situ Görüntülenmesi	25
1.4.3.9. Diğer PCR Tabanlı Yöntemler.....	26
2. MATERYAL VE METOT	27
2.1. Materyaller	27
2.1.1. Kimyasallar ve Kullanılan Çözeltiler.....	27
2.1.2. Örnekler.....	28
2.2. Metot	28
2.2.1. Genomik DNA Özütleme	28
2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi	29
2.2.3. 16S rDNA Bölgesinin PCR Reaksiyonu.....	30
2.2.4. Çoğaltım Ürünlerinin Ayrılması	30
2.2.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	31
2.2.6. Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	31
2.2.7. Kesim Ürünlerinin Saflaştırılması.....	31
2.2.8. Kesim Ürünlerinin Ayrıştırılması	32
2.2.9. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) ile Ayrıştırılması.....	32
2.2.10. Veri Analizi	33
3. BULGULAR	35
3.1. Genomik DNA Özütleme	35
3.2. 16S rDNA Bölgesinin PCR Reaksiyonu	36
3.3. RFLP	36
3.4. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) ile Ayrıştırılması	37

3.5.	Analiz	39
4.	TARTIŞMA ve SONUÇ.....	43
5.	KAYNAKLAR.....	48
6.	ÖZGEÇMİŞ	53
7.	EKLER.....	54

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi****Hamilelik Sürecinde Anne Kalın Bağırsak Bakterileri 16S rDNA Parmak İzi****CANAN KARAKOÇ****Cumhuriyet Üniversitesi****Fen Bilimleri Enstitüsü****Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman: Ali Fazıl YENİDÜNYA**

Son zamanlardaki bulgular maternal kalın bağırsak mikroflorasının, fetal ve neonatal kalın bağırsak mikroflorasının oluşumunda temel kaynak olabileceğini göstermiştir. Bu bulgular doğrulandığı takdirde, anne kalın bağırsak mikroflorasının modüle edilebileceği ve bunun da bebek sağlığı üzerinde doğrudan bir etkisinin olabileceği savından yola çıkarak bakteriyoterapi ve probiyotikler konusunda yeni ufuklar açılabilir. Bu durumda hamilelik süresince anne kalın bağırsak mikroflorasının tanımlanması bu alanda yapılacak araştırmaların ilk basamağıdır. Bu çalışmada anne adaylarından her ay fekal örnekler alınmıştır. Doğrudan total genomik DNA ekstraksiyonunu takiben, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile bakteri 16S ribozomal RNA genleri çoğaltılmıştır. Çoğaltım ürünleri *Hae* III restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Kesim ürünleri elektroforez ile ayrıştırılmıştır. Bant profilleri, PAUP programı ile analiz edilmiştir. UPGMA dendrogramı, çalışılan bütün anne adaylarında belirli bir mikrofloranın varlığını işaret etmiştir. Bu sonuçlar, kontrol olarak hamile olmayan bireylerin fekal örnekleri, süt ve yenidoğan fekal örnekleri ile karşılaştırılacaktır. Bu karşılaştırmalı çalışmaların, üç farklı örnekleme grubu arasında paylaşılan yaygın bir endojen mikroflorayı işaret edeceği beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: Kalın bağırsak mikroflorası, 16S rRNA parmak izi, RFLP.

SUMMARY**MSc Thesis****16S rDNA Fingerprinting Of Maternal Colon Bacteria During Pregnancy****CANAN KARAKOÇ****Cumhuriyet University****Graduate School of Natural and Applied Sciences****Department of Biology****Supervisor: Assoc. Prof. Ali Fazıl YENİDÜNYA**

In recent years investigations have indicated that maternal intestinal flora could be the main source of fetal and neonatal intestinal flora. If these findings are verified, it will imply that modulation of the intestinal microflora of pregnant women could have a direct effect on the health of infants and therefore would open new perspectives for bacteriotherapy and probiotics. Identification of intestinal microflora during pregnancy was the first step of investigations to be carried out in this area. In this study fecal samples were collected from pregnant women every month. After total DNA extracts were prepared directly from samples, 16S rRNA genes were amplified by PCR (polymerase chain reaction). Amplification products were cut with *Hae* III restriction enzyme. Digestion products were resolved by electrophoresis. Banding patterns were analyzed using PAUP program. UPGMA dendrogram indicated the presence of a specific microflora in all the pregnant women studied. These results will be compared with random fecal samples from nonpregnant individuals as control and with human milk and newborn's fecal samples. These comparative studies are expected to indicate a common endogenous bacterial microflora shared within these three different sample groups.

Keywords: Intestinal microflora, 16S rRNA fingerprinting, RFLP.

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında emeği geçen hocam Doç. Dr. Ali Fazıl Yenidünya' ya; arkadaşlarım Arş. Gör. Ertan Mahir Korkmaz ve Arş. Gör. Aytül Yıldırım Kitapcı' ya teşekkür ederim.

Canan KARAKOÇ

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sindirim sisteminde bakteriyel kolonizasyon	4
Şekil 1.2. Kalın bağırsak bakterilerinin bağışıklık sistemi üzerine etkileri.	7
Şekil 1.3. İnsan kalın bağırsak mikroflorasının analizi için çeşitli moleküler yaklaşımların akış diyagramı.....	21
Şekil 3.1. Bazı parçalanmış genomik DNA'lar.....	35
Şekil 3.2. Bazı parçalanmamış genomik DNA'lar.....	35
Şekil 3.3. Bazı DNA özütlelerinin 16S rDNA gen bölgesinin PCR reaksiyonu.	36
Şekil 3.4. <i>Taq</i> I kesim ürünlerinin %1,8' lik agaroz jeldeki görüntüleri	36
Şekil 3.5. <i>Hae III</i> kesim ürünlerinin %1,8' lık agaroz jeldeki görüntüleri	37
Şekil 3.6. <i>Hae III</i> kesim ürünlerinin %6' lık poliakrilamid jeldeki görüntüleri	38
Şekil 3.7. Bant varlığına göre kodlanmış veri matrisinin UPGMA dendrogramında görüntüsü	39
Şekil 3.8. Dendrogramda görülen A grubu (kararlı) bant profillerinin poliakrilamid jelde görüntüleri	40
Şekil 3.9. A grubu bantların gebelik dönemlerine göre artış, azalış ve değişmezlik grafikleri.....	42

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1. Bazı ticari öneme sahip probiyotik mikroorganizmalar	9
Tablo 1.2. Bağırsak türlerinin tanımlanması ve çalışılmasında klasik kültür tekniklerinin avantajları ve dezavantajlar.....	19
Tablo 1.3. Bağırsak türlerinin keşfinde moleküler tekniklerin kullanılmasının avantajları ve dezavantajları.....	22
Tablo 2.1. Örnekler ve alım tarihleri	27
Tablo 2.2. Molekül ağırlığına göre yukarıdan aşağıya doğru değerlendirilen bant profillerine verilen isimler ve sağdan sola bant varlığına göre kodlanmış veri matrisi.....	34
Tablo 3.1. A grubu bantların tüm anne adayları arasında gebeliğin ilk üç aylık (ilk trimester), ikinci üç aylık (ikinci trimester) ve üçüncü üç aylık (üçüncü trimester) periyotlarında ve toplam görülme yüzdeleri	41

EKLER DİZİNİ

Ek 1. Kimyasallar.....	54
Ek 2. Oligonükleotitler, Restriksiyon Enzimleri ve dNTP.....	55
Ek 3. Tamponlar ve Stok Çözeltiler.....	56

KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
bç	Baz çifti
C	Sitozin
CTAB	Setil trimetil amonyum bromür
DDGE	Denatüre edici jel elektroforezi
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksिनükleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
G	Guanin
LAB	Laktik asit bakterileri
ITS	İçeriden transkribe edilen ara parça (internal transcribed spacer)
PAGE	Poliakrilamit jel elektroforezi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PFGE	Atımlı alan jel elektroforezi
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon (kesim) parçası uzunluk polimorfizmi
Rep-PCR	Tekrarlı polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR	Rivörs transkriptaz PCR
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
subsp.	Alttür
T	Timin
TAE	Tris asetat EDTA
TAP-PCR	Hedefin rastgele başlandırıldığı PCR (target arbitrari primed PCR)
TBE	Tris borat EDTA
TE	Tris EDTA
TGGE	Termal gradyent (sıcaklık gradyenti) jel elektroforezi
TES	Tris EDTA sodyum
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Kalın bağırsak, büyük ve zengin bir mikrobiyal ekosistemin doğal habitatıdır. Mikroorganizmalar ve aktiviteleri bağışıklık sisteminin gelişmesi ve işleminde büyük etkiye sahiptir. Kalınbağırsağın mikrobiyal kompozisyonu (mikroflora) bireyler arasında ve aynı zamanda bir bireyin yaşamı boyunca farklıdır. Mikrofloranın gelişiminde genetik faktörler, çevreyle temas, diyet ve hastalıklar rol oynar. Sonuç olarak, her birey farklı karakterde bir mikrofloraya sahiptir.

Kalın bağırsakta, patojen bakterilere karşı bir bariyer oluşturan yararlı bakterilerin baskın olması mikroflora dengesinin korunması için önemlidir. Bu yararlı bakteriler bağırsak duvarına tutunur ve lümeninde bulunan besin maddelerinin tüketimi için patojen mikroorganizmalar ile yarışır, antimikrobiyal özellikte maddeler üretir ve bağırsak mukozası ile ilişkili bağışıklık işlevlerini düzenler.

Bir yetişkinin kalın bağırsak mikroflorasının probiyotik adı verilen yararlı mikroorganizmalardan oluşan besin katkı maddeleri ile modüle edilmesi mümkündür. Sağlıklı bir kalın bağırsakta yararlı bakteriler konağı inflamatuvar kalın bağırsak hastalıkları, ishal ve alerji gibi hastalıklardan korumaktadır.

Fetüsün steril olduğu ve bağırsak kolonizasyonunun yenidoğanların doğum kanalından geçişi sırasında maternal (anneye ait) fekal ve vajinal bakteriler ile kontaminasyonu başladığı fikri geniş ölçüde kabul görmesine rağmen (Isolauri ve Ark., 2001; Mackie ve Ark., 1999); yeni bulgular bağırsak kolonizasyonunun doğumdan önce başlayabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular kesinlik kazandığında maternal kalın bağırsak mikroflorasının modülasyonunun bebek sağlığı üzerinde doğrudan etkilerinin olabileceği gibi, birçok pratik sonuç ortaya çıkacaktır. Bu durumda hamilelik sürecinde kalın bağırsak mikroflorasının tanımlanması, bir temel teşkil etmektedir.

Bakterilerin endojen yollar izleyerek, kalın bağırsak mukozasından solunum, genital bölgeler, tükürük ve gözyaşı bezlerine ve en önemlisi meme

bezlerine taşınabileceği öngörülmektedir (Martín ve Ark., 2004). Bu nedenle maternal kalın bağırsak mikroflorasının, anne sütü yoluyla, bebek kalın bağırsak mikroflorası üzerinde dolaylı yoldan bir etkisi olduğu düşünülmektedir.

Kalın bağırsak mikroflorasının tanımlanması için, çeşitli kültür ve moleküler teknikler kullanılabilir. Bu organizmalardan birçoğunun kültür oluşturma sırasında kaybolması, yetersiz veri elde edilmesine yol açmaktadır.

Birçok moleküler metodoloji, ribozomal RNA (rRNA) ve bunları kodlayan genlerin kullanımını esas alır. Ribozomal RNA dizilerinin nükleotit dizileri, mikroorganizma türlerinin saptanması ve tanımlanması için oldukça uygun, değişken ve korunmuş bölümler (domain) içerir (Vaughan ve Ark., 2000).

Bu çalışmada yedi anne adayından aylık periyotlarla fekal örnekler alınmış (toplam 40 adet) ve doğrudan total genomik DNA özütlemesi yapılmıştır. DNA özütlerinden PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile bakterilerin yaklaşık 1.500 baz çifti büyüklüğündeki 16S rRNA gen bölgesi çoğaltılmıştır. Çoğaltım ürünleri *Hae* III restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmiş ve kesim ürünleri elektroforez ile ayrıştırılmıştır. Oluşan bant profilleri PAUP programı ile analiz edildiğinde, UPGMA dendrogramı belirli bir mikrofloranın her anne adayında mevcut olduğuna işaret etmiştir.

1.1. Kalın Bağırsak Mikroflorası ve Önemi

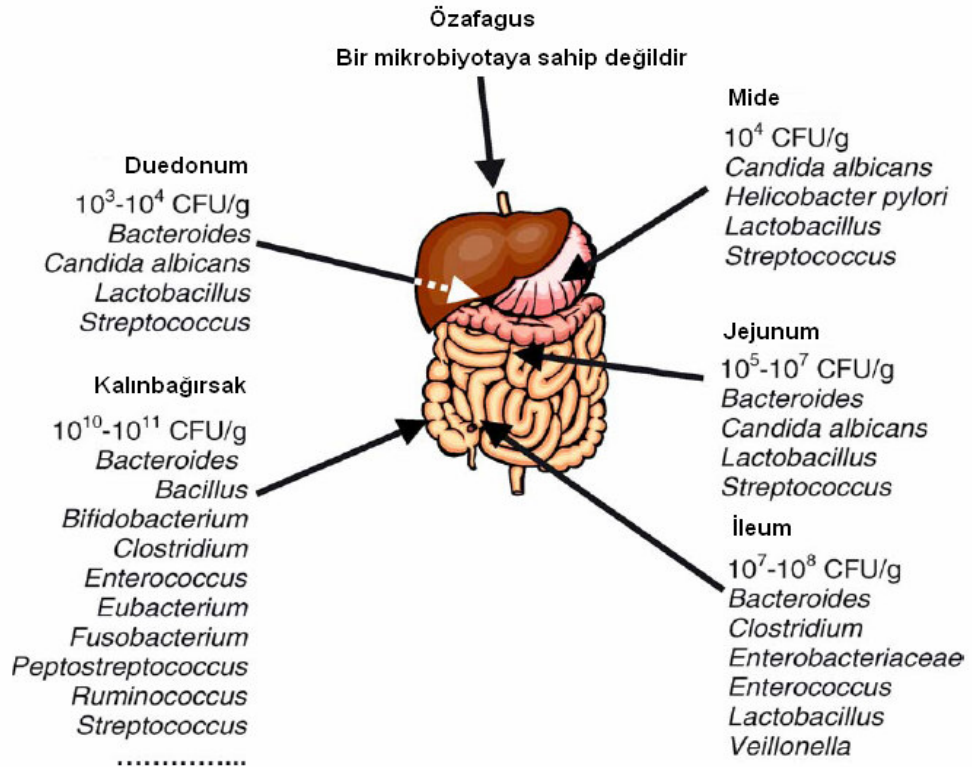
1.1.1. Kompozisyon

Bağırsak, yaklaşık yedi metre uzunluğa ve 400 m² yüzey alanına sahip bir organdır. Bakteriler tüm bağırsağa yayılmış olsalar da mikrobiyal metabolik aktivite büyük oranda kalın bağırsakta görülür. Ağız streptokok, bakteroit, laktobasil ve mayaları kapsayan fakültatif ve zorunlu anaeroblardan oluşan karmaşık bir mikroflorayı barındırır. Bağırsağın üst kısmında seyrek bir populasyon görülürken ileumdan itibaren bakteri konsantrasyonu yavaş yavaş artmaya başlar ve kalın bağırsakta 10¹¹ -10¹² koloni oluşturma birimine (cfu/g) kadar ulaşır. Kalın bağırsakta 500 kadar tür olduğu; bunların da kalın bağırsak

içeriğinin toplam hacminin %35-50' ne karşılık geldiği tahmin edilmektedir (Isolauri ve Ark., 2004). *Acidaminococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Megamonas*, *Megasphaera*, *Peptostreptococcus*, *Proteus*, *Ruminococcus* ve *Veillonella* bu karmaşık mikroflorada bulunan cinsler arasında sayılabilir (Tannock, 2001). Bağırsak kolonizasyonu, mikroorganizmaların bağırsağa yerleşmesidir. Belirli bir türün kolonizasyonu kısa veya uzun süreli olabilir. Ancak birçok durumda kolonizasyon terimi bağırsakta uzun süreli varlığı belirtmektedir. Kısa zamanlı kolonizasyon için “geçici kolonizasyon” terimi kullanılabilir (Saarela ve Ark., 2000). Bağırsakta bulunan bakteriler “kommensal (ortak yaşayan)” olarak adlandırılmaktadır. Bir yetişkinin bağırsak mikroflorası cins düzeyinde sabit görünmektedir (Donskey ve Ark., 2003); tür düzeyinde bile mikroflora kompozisyonundaki varyasyonlar az görünmektedir (Zoetendal ve Ark., 1998). Ancak suş (bir bakterinin farklı alttürlerinin, aralarında genetik farklılıklar bulunan grupları) düzeyinde fekal mikrofloranın kompozisyonunda dikkate değer bir varyasyon gözlenmiştir. Bununla birlikte bağırsak sürekli yeni mikroorganizmalarla kolonize olabilmektedir (McCartney, ve Ark., 1996).

Sindirim sistemi boyunca fizyolojik koşulların farklı olması nedeniyle, farklı bölgelere farklı mikroorganizmalar yerleşmiştir (Şekil 1.1). Bileşenlerin hızlı akışı; mide, karaciğer ve pankreas salgıları nedeniyle sindirim sisteminin üst kısmı geniş bir mikrofloranın oluşmasına izin vermemektedir. Sindirim sisteminin alt kısımlarında sindirilmiş besinlerin akışı daha yavaştır ve kompozisyonu daha az antimikrobiyaldir. Bu nedenle daha zengin bir mikrofloranın oluşmasını desteklemektedir. Oksijensiz ortamı nedeniyle, anaerobik mikroplar sayıca üstün olmaya başlar (Tannock, 1999).

Bağırsak lümeni anaerobik bir ortam olabilirken, mukozada dokudan sızan oksijen mikroaerobik bir çevre yaratabilir. Sonuç olarak aynı mikrobiyal türler içinde yer alsalar bile, mukozayla karşılaştırınca, lümendeki suşlar farklı olabilir.



Şekil 1.1. Sindirim sisteminde bakteriyel kolonizasyon

Kalın bağırsakta geçici (transient) ve kalıcı (endojen) olmak üzere iki tip mikroorganizma vardır. Endojen mikroorganizmalar, bazen, zararlı ve yararlı olarak sınıflandırılabilir. Yararlı mikroorganizmaların birçoğu komensal mikroflorayı oluşturmaktadır. Ancak bağırsak mikroflorasının fonksiyonu genel olarak henüz bilinmemektedir. Belirli cinsleri patojen, diğerlerini yararlı olarak etiketlemek zordur. Örneğin; *Candida* sp., *Clostridium* sp. gibi fırsatçı patojenler düşük seviyelerde bağışıklık sisteminin olgunlaşmasına katkı sağlayarak, sindirim sisteminde yararlı etki göstermektedir (Isolauri ve Ark., 2004).

Kalın bağırsak mikroflorası, bireyler arasında ve aynı zamanda bir bireyin yaşamı boyunca farklıdır. Beslenme, iklim, yaş, ilaç kullanma (özellikle antibiyotik tüketimi), hastalık, stres ve yaşam tarzı gibi birçok faktör bu dengeyi olumsuz yönde değiştirebilir ve bu da ishal, mukozal inflamasyon veya diğer ciddi rahatsızlıklara neden olabilir.

1.1.2. Mikrofloranın rolü

Kalın bağırsak mikroflorasının başlıca metabolik fonksiyonu sindirim sistemi tarafından parçalanamayan besin bileşenlerinin ve epitel hücreleri tarafından üretilen mukusun fermantasyonudur. Ayrıca epitel hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının kontrolü, zenobiyotiklerin (doğanın üretmediği kimyasallar) metabolizması, iyon konsantrasyonu ve absorpsiyonunun kontrolü (kalsiyum, magnezyum ve demir emilimi), vitamin üretimi, lipitlerin absorpsiyonu ve depolanması, kalın bağırsak pH' sının kontrolü ve bağışıklık sisteminin modülasyonu komensal mikrofloranın etkileri arasında sayılabilir.

İnsan kalınbağırsağında mikrobiyal fermantasyon için birçoğu diyet kaynaklı olmak üzere mukus gibi konak kaynaklı karbohidratlar ve proteinler kullanılmaktadır. Endojen proteinler; salgı orijinli bileşenler, besinlerdeki kolajen ve elastin, ölü bakteri ve konak hücreleri olabilir. Karbohidrat fermantasyonu sağaltıcı metabolitlerin (kısa zincirli yağ asitleri ve laktat) oluşmasını sağlarken, protein fermantasyonu toksik metabolitlerin (sülfür içeren bileşikler, amonyak, fenolik ve indolik bileşenler) oluşmasına neden olmaktadır. Karbohidrat fermantasyonu kalınbağırsağın sağ kısmında (ascending colon) görülürken, protein fermantasyonu sol (descending colon) kısmında görülmektedir. Kolon kanseri ve çeşitli bağırsak hastalıkları distal bölgede başladığı için, bunların protein fermantasyonu ürünlerinin neden olduğu düşünülmektedir (Egert ve Ark., 2006).

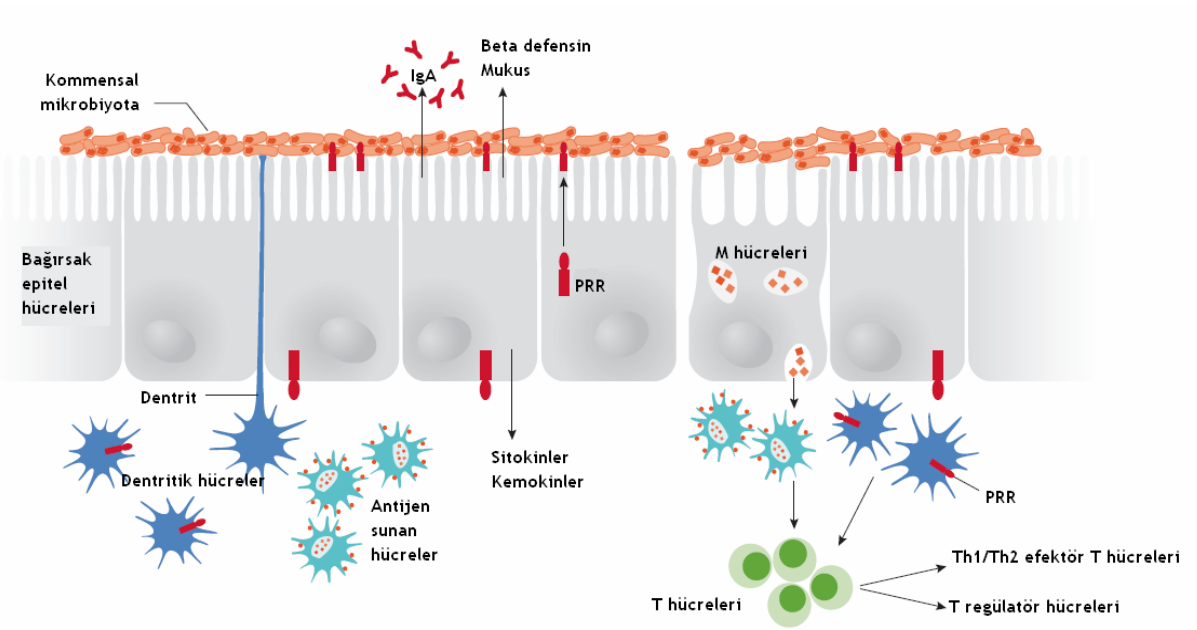
Karbohidrat fermantasyonu sonucunda kısa zincirli yağ asitleri (propiyonat, asetat ve bütirat), organik asitler ve kısa zincirli karboksil asitler ortaya çıkar. Kısa zincirli yağ asitleri kalın bağırsak pH'sını düşürür. Bu ortamda mineral, özellikle de kalsiyum emilimi daha iyi olur. Asidik ortamda yararlı mikroorganizmalar çoğalabilirken, patojen mikroorganizmalar çoğalamaz. Kısa zincirli yağ asitleri kalın bağırsak epitel hücreleri (enterositler) için de enerji kaynağıdır. Propiyonik asit, hepatik yağ asidi sentezini baskılayarak düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) düzeylerini düşürür. Asetat kuvvetli bir asit olduğundan, bağırsak pH' sını düşürür. Bütirat ise enterositlerin yakıtıdır ve

kanserli hücrelerin çoğalmasını baskılayarak kolon karsinogenezini etkiler. İnülin ve oligofruktoz, lif etkileri sayesinde kalın bağırsakta sıvı hacmini artırır. Buna bağlı olarak dışkı kütle ve ağırlığında artış meydana gelir. Kolon kanseri gelişme riski ile dışkı ağırlığı arasında ters bir ilişki vardır (Coşkun, 2006).

Komensal mikrofloranın önemli fonksiyonlarından biri de zararlı mikroorganizmaların kalın bağırsakta kolonize olmalarının önlenmesidir. Mantarlar ve *Clostridium difficile* (fazla üremesi “psödomembranoz kolite” neden olur) gibi zararlı bakteriler ile besin ve tutunma bölgesi için rekabete girerek, üremelerini engeller. Bariyer etkisi olarak da adlandırılan bu fonksiyon, hem dışarıdan gelen hem de normalde mikroflorada düşük miktarlarda bulunan zararlı mikroorganizmaların büyümesini önlemektedir. Ayrıca komensal bakterilerin ürettiği bakteriyosinler, zararlı bakterilerin yerleşmesini engellemektedir (Sears, 2005).

Enterositler lümeninde bulunan mikroflora ile doğrudan ilişkidir. Mikroorganizmalar, epitel hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen tanıma reseptörlerine bağlanabilir ve pro-inflamatuar (yangı artırıcı) ve anti-inflamatuar (yangı önleyici) sitokinlerin üretimi gibi bir dizi savunma mekanizmasını harekete geçirebilirler (Şekil 1.2). Doğal bağışıklık sistemi, lipopolisakkaritler (LPS), lipotaykoik asitler ve DNA’ nın metillenmemiş Sitozin-fosfat-Guanin (CpG) motifleri gibi korunmuş moleküler yapıları tanır (Raghavan ve Ark.). Bu yapılar, Toll benzeri reseptörler (TLR-Toll-like receptors) gibi, patojen bakterilerce aktiflenen yapılara uyumlu reseptörler tarafından tanınır (Cummings ve Ark., 2004). Örneğin; bağışıklık yanıtının *Lactobacillus rhamnosus*’ta Gram (+) patojen *Streptococcus pyogenes*’le karşılaştırıldığında daha zayıf olmasına rağmen, pro-inflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin oluşumundan sorumlu temel elementleri aktiflediği bulunmuştur (Veckman ve Ark., 2003). Olgunlaşmamış antijen sağlayan dendritik hücrelerin (DC) modülasyonu, Gram (-) patojen *Klebsiella pneumoniae* ve *L. rhamnosus*’ta karşılaştırılmıştır. Bu iki bakteri de DC olgunlaşmasını arttırmıştır. Fakat farklı sitokin profilleriyle karşılaşılmıştır. *K. pneumoniae* daha çok T-yardımcı hücrelerin üretimini arttırırken, *L. rhamnosus*

olgunlaşmamış DC'lerden pro-inflamatuar sitokinlerin (tümör öldürücü faktör a [TNF-a] ve interlekin [IL] 6 ve 12) ve olgunlaşmış DC'lerden IL-12 ve IL-18 üretimini arttırmıştır. Bu sonuçlar, komensal bakterilerin pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar bağışıklık cevabını düzenlediğini desteklemektedir. Komensal bakteriler aynı zamanda sonradan kazanılmış bağışıklık cevabı ve antikor oluşumunu da arttırmaktadır. (Cross, 2002; Vaarala, 2003). Bağışıklık yanıtına katkı suş ve türler arasında farklılık göstermektedir.



Şekil 1.2. Kalın bağırsak bakterilerinin bağışıklık sistemi üzerine etkileri. Yüze enterositleri antijenlere karşı antibakteriyel peptitler, immüoglobülin A (IgA) ve kemokinler salgılar. Mast (M) hücreleri olarak adlandırılan özelleşmiş epitel hücreleri, antijenleri antijen sunan hücelere taşır. Bunlar antijenleri işleyerek T-hücelere sunar. Antijen sunan dendritik hücreler (DC'ler) de mukozal mikroçevreyi denetler. Profil tanıyıcı reseptörler (PRR'ler) DC'ler ve enterositler tarafından sentezlenir, bakteriyel antijenlerin saptanmasına yardım ederler ve DC'ler efektör/regülatör T-hücelere yardımcı olarak bağışıklık cevabı veya toleransı ayarlarlar (O'Hara ve Shanahan, 2006)

Yararlı bakteriler, kalınbağırsağın mukozal koruyucu epitelinin seçici geçirgenliğine katkıda bulunur. Zararlı bakteriler geçirgenliği artırır. Bu da makromoleküllerle birlikte bakterilerin de mukozadan geçmesine neden olabilir. Birçok yararlı bakteri, besin antijenleri veya ilaçlardan kaynaklanan mukozal hasarını önleme ve onarma özelliği gösterir. Ayrıca, *Lactobacillus acidophilus*'un

sıkı bağlantı proteinlerine gelebilecek olası bir hasarı önlediği bulunmuştur (Saxelin ve Ark., 2005). Bakteriler mukusu fermente ettikleri için, mukus üreten genlerin aktivitesinin arttığı bulunmuştur (Mack ve Ark., 2003).

Laktozu sindiremeyen kişiler, laktozu hidrolizleyen β -galaktozidaz enzimini üretememektedir. Kalın bağırsak bakterileri ve çoğunlukla bazı *Lactobacillus* türleri, belirli koşullarda ince bağırsağa yerleşerek, yiyeceklerle alınan laktozu hidrolizleyebilirler.

Kalın bağırsaktaki bazı laktik asit bakterilerinin β -glukuronidaz, azoredüktaz ve glikolik asit hidrolaz gibi karsinojenleri aktifleyen enzimleri inhibe ettiği düşünülmektedir (Goldin ve Gorbach, 1984).

Endojen mikrofloranın konağın fizyolojik reaksiyonları üzerine faydalı etkilerinin yanı sıra, mikrofloranın beyin ve sinir sistemi üzerine de önemli etkileri olduğu ön görülmektedir. Kalın bağırsak mikroflorasının strese karşı, hipotalamus-hipofiz-adrenal reaksiyonunun gelişmesini etkilediği gösterilmiştir (Sudo, 2006).

1.1.3. Probiyotikler

Optimum kalın bağırsak mikroflorası için, patojen bakterilere karşı bir bariyer oluşturan *Lactobacilli* ve *Bifidobacterium* gibi Gram (+) yararlı bakteriler baskın (total mikrofloranın %85'inden büyük) olmalıdır. Sağlıklı bir kalın bağırsakta yararlı bakteriler konağı birçok hastalığa karşı korur. Bu bilgi kalın bağırsak mikroflorasını güçlendirecek besin tasarımına büyük ilgi doğurmuştur. Kalın bağırsak mikroflorasının modülasyonu için en iyi yol, probiyotik adı verilen yararlı bakterilerin alımıdır.

Fuller probiyotik terimini: “Konak hayvanın yararına olacak şekilde bağırsak mikrobiyal dengesini iyileştiren canlı mikrobiyal besin katkısı” olarak tanımlamıştır (Schrezenmeir ve de Vrese, 2001).

Yirminci yüzyılın başlarında Metchnikoff'un zehirlenme teorisini (intoxication theory) ileri sürmesi, probiyotiklerin nasıl etki gösterdiklerinin

anlaşılmasında ilk adımdır. Metchnikoff, yaşlanmanın başlıca nedeninin bağırsaktaki çürüme (intestinal putrefication) ve fermantasyon ile oluşturulan zehirli maddeler olduğunu vurgulamış; “Bulgar köylülerinin uzun ve sağlıklı yaşamları fermente süt ürünleri tüketmelerinin bir sonucudur” önermesiyle, yoğurt gibi laktik asit bakterileri içeren besinleri tüketmenin yaşlanmayı önleyebileceğinin üzerinde durmuştur. Birçok probiyotik suş tanımlanmış, çalışılmış ve ticarileştirilmiştir (Tablo 1.1).

Tablo 1.1. Bazı ticari öneme sahip probiyotik mikroorganizmalar (Gorbach, 2002)

Laktobasiller	Gram (+) Koklar	Bifidobakteriler
<i>Lactobacillus. acidophilus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>L. casei</i>	<i>diaacetylactis</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>B. animalis</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>S. salivarius</i> subsp.	<i>B. infantis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>thermophilus</i>	<i>B. longum</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>B. thermophilum</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp.	
<i>L. fermentum</i>	<i>cremoris</i>	
<i>L. plantarum</i>		

Yayınlanmış bulgulara göre, mevcut probiyotiklerle tedavinin riskleri çok küçük görünmektedir. Ancak, probiyotiklerin fırsatçı enfeksiyon riskinin çok yüksek olduğu veya sindirim sistemi çok zarar görmüş hastalarda dikkatli kullanılması gerektiği vurgulanmaktadır.

Probiyotikler, kalın bağırsak mikroflora dengesinin korunmasında ve akut viral ishal, antibiyotik alımıyla ilişkili ishal, *Clostridium difficile*’ ye bağlı ishal, seyahat ishali, kabızlık, inflamatuvar (yangılı) bağırsak hastalıkları, irritabl

bağırsak sendromu, nekrotizan enterokolit, *Helicobacter pylori* enfeksiyonları, alerji, bazı otoimmün hastalıklar, çeşitli kanser tipleri, kolesterol, akut pankreatit, ürogenital enfeksiyonlar, kolesterol, laktoz intoleransı, hepatik ensefalopati, graft versus host hastalığı, çölyak hastalığı, steatohepatit ve diş çürükleri gibi birçok olguda tedavi veya destek tedavi olarak kullanılabilir (Coşkun, 2006).

1.1.4. Prebiyotikler

Prebiyotikler yararlı bakterilerce metabolize edilen, seçici olarak bir veya birden fazla bakteri türünün üremesini artırarak mikroflorayı pozitif yönde etkileyen, konağın sindiremediği besin maddeleridir. Prebiyotik özellik taşıyan bileşikler arasında bitki ve sebzelerde doğal olarak bulunan inülin, laktuloz, frukto-oligosakkaritler, galakto-oligosakkaritler, soya oligosakkaritleri, laktosukroz, izomalto-oligosakkaritler, gliko-oligosakkaritler, ksilo-oligosakkaritler, platinoz, gentio-oligosakkaritler sayılabilir (Manning ve Gibson, 2004). Prebiyotikler kalınbağırsağa değişikliğe uğramadan ulaşırlar ve burada bakteriler tarafından fermente edilirler.

1.1.5. Mikrofloranın Gelişimi

Yenidoğanlarda sindirim sisteminin kolonizasyonu doğumdan hemen sonra başlamakta ve birkaç gün içerisinde oluşmaktadır (Isolauri ve Ark., 2004). Doğum yolu (vajinal doğum veya sezaryen), beslenme şekli (emzirme veya mamayla beslenme), coğrafik konum (gelişmiş ülkeler veya gelişmekte olan ülkeler), doğumun gerçekleştiği yer (evde ya da hastanede doğum) kolonizasyon modelini etkilemektedir (Fanaro ve Ark., 2003). Bununla birlikte, yeni bulguların ışığında, bağırsak kolonizasyonunun doğumdan önce başlayabileceği hipotezinden de bahsedilecektir.

Vajinal doğumda bebek önce başlıca *Lactobacillus*, *Bacterioides*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus* cinslerini kapsayan anne vajina ve bağırsak mikroflorasına; daha sonra çevresel mikroplara maruz kalmaktadır (Larsen ve Monif, 2001).

Yaşamın ilk gününde zorunlu anaerobların da tespit edilebilmesine rağmen, kolonize olan ilk mikroplar fakültatif anaeroblardır. Her durumda, iki üç gün sonra anaeroblar bebek dışkısında bulunan başlıca mikroplar olmaktadır. Bunun nedeni fakültatif anaerobların kalın bağırsakta redoks potansiyelini düşürmesiyle, zorunlu anaeroblar için uygun ortamın sağlanmış olmasıdır (Isolauri ve Ark., 2004).

Sezaryen doğumda, ilk karşılaşılan mikroplar çevreden gelmektedir. Farklı mikroplara maruz kalma şekli kalın bağırsak mikroflorasını ve gelişimini etkiler (Grönlund ve Ark., 2000). Kalın bağırsak mikroflorası enterobakteriler ve koliformlar gibi fakültatif anaeroblarla yavaş kurulan bir süreç olarak düşünülmektedir. Daha sonra hızlı bir şekilde *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi laktik asit bakterileri yerleşmektedir (Isolauri ve Ark., 2004).

Anne sütü, neonatal (bebeğin ilk bir aylık dönemi) bağırsak mikroflorasının gelişiminde önemli bir faktördür. Anne sütü ve mama ile beslenen yenidoğanların fekal mikroflorasında farklılıklar mevcuttur. Anne sütüyle beslenen yenidoğanlarda mikroflorada laktik asit bakterilerinin baskın olduğuna dair bazı kanıtlar varken, hazır mamayla beslenenlerde baskın tür *Clostridium* ve *Escherichia coli* gibi bakteriler olmaktadır. Bebek süttten kesildikten sonra, yetişkin bağırsağına benzer karmaşık bir mikroflora kurulmaya başlamaktadır. Bebeğe verilen besinler arasındaki farklılık kalın bağırsak mikroflorasını etkilemektedir. Floradaki eksiklikler diyetle yapılacak katkılarla giderilebilir. Anne sütünün doğal mikroflorasında bulunan *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Enterococcus* gibi cinslere ait üyelerin probiyotik ajanlar veya bakteriyoterapötik olarak potansiyel kullanıma sahiptir (Martín ve Ark, 2004).

1.2. Hamilelik Sürecinde Kalın Bağırsak Mikroflorasının Fetüs Üzerindeki Önemi

Fetüsün steril olduğu ve yenidoğanlarda bağırsak kolonizasyonunun yenidoğanların doğum kanalından geçişi sırasında, maternal fekal ve vajinal bakteri kontaminasyonu ile başladığı geniş ölçüde kabul görmüştür (Mackie ve Ark., 1999; Isolauri ve Ark., 2001). Uterusta fetüsün steril olduğu iddialarının aksine, laktik asit bakterileri ve diğer komensal bakteriler hem vajinal doğumla hem sezaryenle dünyaya gelen sağlıklı bebeklerin mekonyumundan izole edilmiştir (Jimenez ve Ark., 2005). Yine bir çalışmada altı kadına hamileliklerinin son aylarında probiyotik *Lactobacillus rhamnosus* GG suşu verilmiştir. Doğumdan sonra bebeklere ve anneye bu suş verilmediği halde, sezaryenle doğanlar da dahil olmak üzere bebeklerin fekal örneklerinde en az altı ay boyunca bu suşa rastlanmıştır (Schultz ve Ark., 2004). Amniyotik sıvı ve kroamniyon dokunun düşük konsantrasyonda bakteri içermesi ve belirli bakteri türlerinin kültüre alınmasındaki zorluklar, fetüsün önceleri steril olarak nitelendirilmesinin nedeni olabilir (Martín ve Ark., 2004).

Laktik asit bakterileri ve diğer bakteriler plasenta, amniyotik sıvı, göbek bağı damarları, sezaryenle doğanlar da dahil, yeni doğanların ilk bağırsak florasından izole edilebilmektedir. Bu izolatlardan bazıları maternal süt ve fekal örneklerinden sağlanmış türlerin suşları ile aynı RAPD ve RFLP profillerini paylaşıyor olmasına rağmen, vajinal, bacak arası veya deri izolatları ile ilişki kurulamamıştır (Martín ve Ark., 2004). Bu sonuçlar bazı komensal türlerin plasenta bariyerini aşarak doğumdan önce kolonizasyonu başlattığı görüşünü güçlendirmektedir.

Bazı hücre dışı patojen bakterilerin, sıkı bağlantı hücreleriyle ilişki kurarak kan/beyin bariyerini aşarak, merkezi sinir sistemine girdiği çok iyi bilinmektedir (Nassif ve Ark., 2002). Buna benzer bir mekanizma plasenta bariyerini geçmek için de kullanılmış olabilir.

Başlangıçta üç katman olan plasenta anne ile fetüs dolaşımını ayırır. Hamilelik sürecinde bu katmanlar incelik ve dokular birbirine yaklaşır. Besinlerin, artık ürünlerin ve gazların fetüs ve annesi arasında değiş tokuşu artar (Martín ve Ark., 2004). Bu artış ve plasentadaki hareketli trofoblast hücrelerinin varlığı, komensal bakterilerin de taşınmasına olanak sağlayabilir.

Primer bağışıklık yanıtında, antijen sunumunda ve T-hücrelerinin uyarılmasında rol alan dendritik hücreler, vücutta birçok mukozal yüzeyde bulunurlar. Bağırsak epitelindeki sıkı bağlantı bölgelerini açabilme yeteneğinde olan bu hücreler, bakterileri lümeninden alarak birlikte hareket ettirebilirler. Bakteri hücrelerin bağırsak mukozasından solunum, genital bölgeler, tükürük ve gözyaşı bezlerine ve en önemlisi meme bezlerine kolonize oldukları bilinmektedir. Böylece bazı komensal türlerin böyle bir endojen yol izleyerek kan yoluyla, bağırsaktan meme bezlerine taşınabileceği söylenebilir. Örneğin; *L. rhamnosus* GG içeren günlük ürünün büyük miktarlarını her gün tüketen bir hastada karaciğer apsesi vakasına rastlanmıştır. Bu gibi koşullar laktobasillerin bağırsaktan diğer organlara yayılmak için mekanizmalara sahip olabileceğini göstermektedir (Martín ve Ark., 2004).

Bu sonuçlar, bağırsak kolonizasyonunun doğumdan önce başlayabileceğini düşündürmektedir. Bu durumda, maternal kalın bağırsak mikroflora dengesi bebek kalın bağırsak mikroflorasını doğrudan etkileyebilir. Bu hipotez doğrulandığında maternal kalın bağırsak mikroflorasının modülasyonunun bebek sağlığı üzerinde doğrudan etkilerinin olabileceği gibi birçok pratik sonuç ortaya çıkacaktır. Ayrıca bakteriyoterapi (zararlı olmayan bakterileri patojen bakterilerin yerine geçmesi için kullanma) ve fonksiyonel besinlerin formülasyonları ve probiyotikler konusunda yeni ufuklar açılacaktır.

Sonuç olarak hamilelik sürecinde kalın bağırsak mikroflorasının izlenmesi ve tanımlanması yukarıda anılan yeni araştırma alanlarının oluşturulmasında büyük önem taşımaktadır.

1.3. Kalın Bağırsak Mikrobiyotasında Bulunan Bazı Önemli Cinsler

1.3.1. *Lactobacillus*

Laktobasiller Gram (+), spor oluşturmeyen, DNA'larında genellikle % 50 den daha az guanin+sitozin (G+C) içeren basil ya da kokobasillerdir. Oksijene toleranslı ya da anaerobik, asidürik ya da asidofilik ve karmaşık besin gereksinimleri olan (karbohidratlar, aminoasitler, peptitler, yağ asidi esterleri, tuzlar, nükleik asit türevleri ve vitaminler gibi) mikroorganizmalardır. Bazı laktobasil türlerine ait suşlar çevreden aldıkları porfirinleri kullanabilir, katalaz aktivitesi ve nitrit redüksiyonu gösterebilirler. Glikozu karbon kaynağı olarak kullanan laktobasiller ya homofermentatif (% 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 and Vogel, 1995).

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

Lactobacillus türleri karbohidrat kaynağı içeren bir ortamda 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).

Laktik asit bakterilerinin taksonomisi uzun yıllardan beri fenotipik özellikleri baz almaktadır. Bu tip bir değerlendirmede laktik asit bakterileri; "*Thermobacterium*", "*Streptobacterium*" ve "*Betabacterium*" olmak üzere üç alt grupta incelenmektedir. Moleküler teknikler, laktik asit bakterilerinin fenotipik özellikleri baz alınarak yapılan bu alt gruplandırmanın uygun olmadığını göstermiştir. Hammes and Vogel (1995) laktobasilleri hücre duvarındaki peptidoglikan tipi ve pentoz (arabinoz, riboz, ksiloz) ve hekzozları (galaktoz,

mannoz, glikoz, fruktoz) fermantasyon şekillerine göre gruplandırmıştır. Buna göre Grup A, zorunlu homofermentatif laktobasilleri içerir. Bu organizmalar fosfoketolaz enzimine sahip değildir. Bu nedenle pentozları fermente edemezler. Sahip oldukları aldolaz enzimiyle heksozlar Embden Meyerhof-Parnas (EMP) metabolik yoluyla hemen hemen tamamını laktik asite fermente ederler. Grup B, fakültatif heterofermantatif laktobasilleri içerir. İki tip enzime de sahiptirler, pentoz ve heksozları fermente edebilirler. Heksozların neredeyse tamamı EMP metabolik yoluyla laktik asite dönüştürülür. Glikoz varlığında fosfoglikonat metabolik yolu enzimleri baskılanır. Grup C, zorunlu heterofermantatif laktobasilleri içerir. Heksozlar fosfoglikonat yolu ile eşit hacimlerde laktat, etanol (asetik asit) ve CO₂ oluşturacak şekilde fermente edilir. Pentozlar da bu metabolik yola katılır ve fermente edilebilirler (Hammes ve Vogel, 1995). Hem fenotipik karakterizasyonu hem de genotipik analizleri kullanan modern taksonomi metotları laktik asit bakterilerine uygulanmış ve *Lactobacillus* türleri üç grup altında toplamıştır:

- *L. acidophilus* grubu
- *L. casei* grubu
- *L. reuteri /fermentum* grubu

L. delbrueckii, *L. acidophilus* gibi birçok *Lactobacillus* türü fermente ürünlerin yapımında kullanıldığı için ekonomik açıdan değerlidir.

1.3.2. *Bifidobacterium*

Bifidobakteriler ilk kez 1900' de Tissier tarafından anne sütüyle beslenen yenidoğanlardan alınan fekal örneklerde saptanmıştır. Çomak şekilli, Gram (+), gaz üretmeyen ve anaerobik 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. Karbohidratları metabolize etme şekilleri açısından *Lactobacillus* türlerinden ayrılırlar. Laktobasiller heksoz fermantasyonu için glukoz 6-fosfat metabolik yolunu kullanırken, bifidobakteriler früktoz 6-fosfat yolunu kullanırlar.

Bu organizmalar insan ve diğ er hayvanların fekal örnekleri, arılar, insan vajina ve diş  r kleri gibi farklı kaynaklardan izole edilmiştir (Arunachalam, 1999).

Özellikle kalın bağırsakta yaşayan türlerinin mikroflora dengesinin korunmasında ve onarımında faydalı etkilere sahip olduğu bilinmektedir.

1.3.3. *Streptococcus*

Streptococcus  yeleri 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, homofermantatifirler ve karmaşık besin gereksinimleri vardır (Hardie ve Whiley, 1995). Bilinen birçok türü insan ve diğ er hayvanlarda parazitir ve bazıları önemli patojenlerdir.

Streptococcus cinsi *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* ve *S. agalactiae* gibi oldukça önemli patojenler, *S. faecalis* ve *S. jitecium* gibi bağırsak mikroflorasında bulunan streptokoklar gibi birçok farklı türü kapsar (Stiles ve Holzapfel 1997).

Streptococcus thermophilus besin fermantasyonunda tek önemli cinstir. Yoğurt ve peynir üretiminde starter kültür olarak önemli rol oynamaktadır (Stiles ve Holzapfel 1997).

1.3.4. *Clostridium*

Clostridium cinsi endospor oluşturan, zorunlu aneorobik, düşük G+C içeriğine sahip Gram (+) bakterilerden oluşur. Elektron transport fosforilasyonu için bir sitokrom sistemine ve mekanizmaya sahip değildir. Bu nedenle ATP sadece substrat düzeyinde fosforilasyon ile sağlanır. Birçok *Clostridium* türü son ürün bütirik asit, bütanol ve aseton olacak şekilde şekerleri fermente eder. Bir başka grup *Clostridium* alanin, glisin, sistein, glutamat, histidin, serin veya thereonin aminoasitlerini fermente etmektedir.  r nler genelde asetat, bütirat, CO₂ ve H₂'dir. Birçok aminoasit fermantasyonu ürünü kötü kokulu bileşenlerdir ve kötü koku başlıca *Clostridium* kaynaklı  r rmenin sonucudur. Bütirik asite ek

olarak diğerkokulu bileşikler arasında izovalerik asit, kaproik asit, hidrojen sülfid, putresin ve amonyak sayılabilir. Bazı *Clostridium* türleri ürik asit ve diğerpürinleri ve etanolü fermente etmektedir. Başlıca habitatu toprak olmasına karşın, insan ve diğermemelilerin sindirim sistemine de adapte olmuştur. Ayrıca birkaç türü insanlar için ciddi patojenlerdir. *C. botulinum* botülizm, *C. tetani* tetanoz, *C. perfringens* gazlı gangren etkenidir (Madigan ve Ark., 2003).

1.3.5. *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 *E. faecium* ve *E. faecalis*'tir. Birkaç suşu fermente ürünlerde başlatıcı (starter) veya probiyotik olarak kullanılır.

1.3.6. *Bacteroides*

Bacteroides cinsi zorunlu anaerob, spor oluşturmayan, başlıca fermantasyon ürünleri asetat ve süksinat olacak şekilde, şekerleri fermente eden türleri kapsar. *Bacteroides* türleri sayısal olarak insan kalınbağırsağının dominant bakterileridir. Bunun yanında patojen türleri de vardır ve insan hastalıklarında en önemli anaerobik bakteriler arasındadır. *Bacteroides* cinsi ayrıca bakteriler arasında özellikle sinir dokusunda bulunan, sinyal iletimi ve hücre tanınmasında rol oynayan sifingolipidleri sentezleyebilen nadir gruplardan biridir.

1.3.7. *Lactococcus*

Hücreleri oval şekilli, çiftler halinde veya kısa zincirler halinde görünen, mikroaerofilik Gram (+) koklardır. Karmaşık besin gereksinimleri vardır; bol miktarda laktik asit üretirler. 10 °C ve 45 °C sıcaklıkları arasında büyüeyebilirler

(Teuber, 1995). Laktoz, kazein ve sitrat gibi süt bileŖenlerinin fermantasyonu sayesinde süt ürünleri üretiminde özellikle *L. lactis* ve *L. cremoris* türleriyle önemli bir cinstir.

1.4. Kalın Bağırsak Mikroflorasının Karakterizasyonu

1.4.1. Örnekleme

Feğes, kalın bağırsak mikroflorasının ęalıŖılması için kullanılabilir en önemli örnektir. Feğesin mikroflorayı temsil edip etmemesi tartıŖma konusudur. Çünkü bu baŖlıca kalınbağırsağın lümenindeki mikroflorayı temsil eder. Kalın bağırsak mikroflorasının kompozisyonu, hem sindirim sistemi boyunca hem de lümen ve mukoza arasında farklılık gösterir. Ancak endoskopi veya operasyon gibi yöntemler pratik olarak insan kalın bağırsak mikroflorasının analizinde kullanılamayacağı için, fekal örnekler büyük önem teŖkil etmektedir.

1.4.2. Klasik YaklaŖımlar

Kalın bağırsak mikroflorasının klasik yöntemlerle analizi, kültüre bağımlı ve kültürden bağımsız metotları kapsar.

Kültür-bağımlı teknikler, fekal veya diğer bağırsak örneklerinden kültürü yapılabilen bakterileri izole etmek için kullanılır. Karakterizasyon ise birçok morfolojik ve biyokimyasal test aracılığıyla gerekleŖtirilir. Ne kadar çok test yapılırsa, tür karakterizasyonunun güvenilirliği o kadar artar. Fakat en geliŖmiŖ testler dizisi bile türlerin sınıflanmasında belirsizliklere neden olabilmektedir (O’Sullivan, 2000).

Seçici ve seçici olmayan kültür metotları

Taze fekal veya bağırsak materyalinin besiyerine ekilmesini temel alır. Seçici olmayan besiyerleri genellikle mikrofloranın toplam miktarını tahmin etmek için kullanılır. Belirli bir cinsin üyelerinin çoğaltılması isteniyorsa genellikle seçici (diğer bakterilerin çoğalmasını azaltan veya belirli bir türün üremesini arttıran) besiyeri kullanılır. Örneğin; bifidobakterilerin üremesini

arttırmak için, bazı antibiyotikler (kanamisin, naladisik asit, paramisin ve polimiksin B) ve propionik asit kullanılabilir (O'Sullivan, 2000).

Kültürden bağımsız klasik metotlar belirli organizmaların karakterizasyonunda yetersiz kalsa da bazı bakteri gruplarının kültüre alınmaması nedeniyle fekal örneklerde bakteri sayıları daha doğru tahmin edilebilir (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. Bağırsak türlerinin tanımlanması ve çalışılmasında klasik kültür tekniklerinin avantajları ve dezavantajlar (Furrie, 2006)

Avantajlar	Dezavantajlar
Nispeten ucuz.	Yavaş, zaman alıcı işgücü gerektirir.
Büyük oranda mevcut.	Örnekler anında çalışılmalıdır.
Bakteriyel populasyonların sayılmasına izin verir.	Zorunlu anaerobların izole edilebilmesi için üstün beceriye ve özelleşmiş donanıma ihtiyaç vardır.
Deneyimli ve yetenekli bir mikrobiyolog tarafından yürütüldüğünde, ekosistem karmaşıklığının belirlenmesini sağlayabilir.	Kültüre edilebilir organizmalarla sınırlıdır.
Fizyolojik çalışmalar mümkündür.	Büyüme ortamının seçilmesi sonuçları büyük oranda etkileyebilir. Yaşayan bütün bakteriler elde edilemez.
Biyokimyasal çalışmalar mümkündür.	

Doğrudan Mikroskopik Analizler

Genelde tespit ve boyama ile gerçekleştirilen bu yöntemle, tüm bakteriler boyanmasa da, ışık mikroskobu kullanılarak fekal örneklerde total bakteri sayısını tahmin etmede kullanışlıdır.

Enzim-Metabolit Analizleri

Fekal örneklerde belirli enzimlerin ve metabolitlerin ölçümü, belirli mikrofloranın varlığı hakkında, dolaylı olarak, hızlı bir şekilde bilgi verir. Örneğin; kısa zincirli yağ asitleri (asetat, propionat ve bütirat) anaerobik fermentasyonun son ürünleridir. Fekal örneklerde bu asitlerin ölçümü kalın bağırsakta laktik asit bakterilerinin metabolizmasına işaret eder.

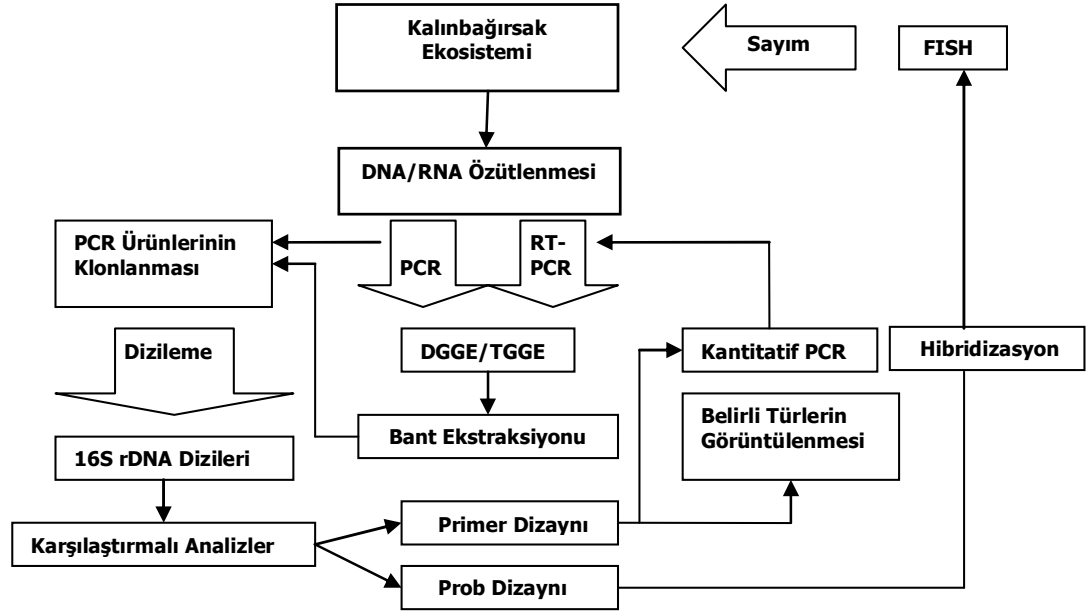
Kültür tekniklerinin aşağıda bahsedilen çeşitli sınırlamalarına ve eksiklerine rağmen, bu karmaşık kalın bağırsak ekosistemi, özellikle ekosistemdeki bakterilerin rollerini belirlemek için moleküler tekniklerle klasik yöntemlerin bir kombinasyonunun birlikte kullanılması gereklidir.

1.4.3. Moleküler Yöntemler

İnsan kalınbağırsağı karmaşık bir ekosisteme sahiptir. Bu karmaşık mikrofloradaki birçok bakterinin kültür koşulları bilinmemektedir. Bu nedenle mikrofloranın saptanması ve tanımlanması için klasik metotlara ek olarak moleküler metotların kullanılması oldukça önemlidir (Tablo 1.3). Ayrıca gen ifadesi, substrat kaynağı, pH, sıcaklık ve redoks potansiyeli gibi çevresel faktörlerden etkilendiğinden dolayı, bir organizmanın genotipi, fenotipinden daha karardır.

Birçok moleküler metodoloji (Şekil 1.3), böyle karmaşık komünitelerde bakterilerin bireysel kimliklerini ve aralarındaki ilişkiyi tanımlamak için, rRNA ve onu kodlayan genlerin kullanılmasına dayanır. 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. Dahası rRNA'ların mutasyon oranları organizmaların evrimsel akrabalıkları hakkında bilgi verir. Saptama ve sınıflama için, 16S rRNA, 16S, 23S rRNA genleri arasında transkribe edilen ayırıcı bölge (ITS- Internal transcribed spacer) sıklıkla kullanılır. Bakterilerin adaptasyon ve türleşmesinde önemli rol oynayan horizontal gen transferi gibi durumlar rRNA verilerinin güvenilirliğine

engel olsa da rRNA en kullanışlı filogenetik belirteçlerden biridir (Vaughan ve Ark., 2000).



Şekil 1.3. İnsan kalın bağırsak mikroflorasının analizi için çeşitli moleküler yaklaşımların akış diyagramı (Vaughan ve Ark., 2000)

Bütün bir komunitenin belirlenmesinde örnekten DNA ve/veya RNA'nın özütleme ve saflaştırılması en temel adımdır. Bütün mikrobiyal hücreler eşit oranda parçalanmazlar. Fekal örneklerden nükleik asitlerin özütleme için sayısız protokol mevcuttur (Vaughan ve Ark., 2000). Son zamanlarda en çok tercih edilen metotlardan biri "bead beating" ve bunun diğer uygulamalarla kombinasyonudur (Zoetendal ve Ark., 1998).

Tablo 1.3. Bağırsak türlerinin keşfinde moleküler tekniklerin kullanılmasının avantajları ve dezavantajları (Furrie, 2006)

Avantajlar	Dezavantajlar
Birçok teknikle yüksek kapasiteli ve nispeten kısa sürede öğrenilebilir.	Her türden eşit olarak genetik materyalin özütlenmesini standartlaştırmak zordur.
Anaerobiklerin çalışılmasında beceri ve uzmanlık gerektirmez	Karışık populasyonlarda birçok yanlıgı mevcuttur.
Örnekler sonraki analizler için dondurulabilir.	Çok pahalı olabilir.
DNA laboratuvarlar arasında kolaylıkla taşınabilir.	Primerlerin ve problemlerin seçimi saptamada birçok yanlıgıya neden olabilir.
Kültüre edilemeyen türler saptanabilir.	Birçok metot doğrulayıcı analizler gerektiğinde kantitatif değildir.
Teoride, hedef DNA' nın bir molekülüne kadar	Bir ekosistem modeli çıkarmak imkansızdır.

1.4.3.1. 16S ribozomal DNA (rDNA), ITS (Internal Transcribed Spacer) ve recA Gen Bölgelerini Dizi Analizi

Bir populyasyonda 16S rDNA havuzunun klonlanması ve dizilenmesi, bağırsağın çeşitli bölgelerinde bol miktarda bulunan ve kültüre edilemeyen bakteriler hakkında nükleotit dizisi düzeyinde bilgi elde edilmesini sağlar (Malinen, 2002). Ribozomal DNA dizileri doğrudan rRNA' dan veya rRNA' yı kodlayan genlerden elde edilebilir. Bu yöntem evrensel olarak korunmuş bölgelerin iki ucuna bağlanan primerleri kullanır ve kolonilerden 16S rRNA genini doğrudan PCR ile çoğaltarak, yaklaşık 1.500 baz uzunluğundaki PCR ürününü dizilemeyi temel alır. GenBank gibi veritabanlarında diziler karşılaştırılarak suş düzeyinde karakterizasyon gerçekleştirilir. Bu teknoloji filogenetik ilişkilerin anlaşılmasını sağlar.

Bifidobacterium cinsi içerisinde rRNA dizisi yüksek oranda korunmuştur ve karşılaştırmalı analizi yeterince hassas olmayabilir. Bu nedenle ITS bölgesi bifidobakterilerin daha detaylı analiz için kullanılır (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 bakteriyel suşlar arasında bile değişiklik gösterebilir (Christensen ve Ark., 2000).

RecA geni, rekombinasyonda, DNA onarımında, SOS cevabında rol oynayan recA proteinini kodlar. Bakterilerde evrensel olarak mevcuttur ve yüksek oranda korunmuştur ve filogenetik analizler için oldukça değerli bir araçtır (O'Sullivan, 2000).

1.4.3.2. Denatüre edici Jel Elektrofrezisi (DDGE) ve Termal Gradyent Jel Elektrofrezisi (TGGE)

Bu metotlar nükleik asit moleküllerinin, boyutlarına ve dizi farklılıklarına göre ayırt edilmelerini sağlar. Kısaca, bu yöntem uygun primerler kullanılarak 16S rDNA bölgesinin PCR ile çoğaltılıp, denatüre edici koşullarda iki iplikçiğin birbirinden ayrılarak sahip oldukları dizi ve büyüklüğe göre yeniden konformasyon kazanmasına dayanır (Vaughan, 2000). Bu yöntemlerle farklı bireylerin veya aynı bireyin farklı zamanlarındaki bağırsak mikroflorası karşılaştırılabilir. Bant yoğunluğuna göre dominant bakteriler saptanabilir. Ancak bakterilerin suş düzeyinde karakterizasyonu için, her bantta bulunan DNA parçalarına dizi analizi uygulamak gerekmektedir.

1.4.3.3. 16S rRNA Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Bu teknik, 16S rDNA bölgesinin uygun primerlerle çoğaltılıp, uygun restriksiyon enzimleriyle kesilerek, bant profillerinin jel elektrofrezinde görüntülenmesine dayanır. Genel olarak uygulanabilir; hızlı, ucuz ve kolay bir yöntemdir. Ancak birbirine çok benzer diziler içeren DNA parçalarını

yorumlamak zordur. Bu nedenle birkaç restriksiyon endonükleaz birlikte kullanılır.

1.4.3.4. Atımlı Alan Jel Elektroforezi (PFGE)

PFGE temelde, bir agaroz jelde çok büyük DNA moleküllerinin bir elektrik atım sistemi kullanılarak ayrılmasıdır. Diğer moleküler tekniklerle karşılaştırıldığında, çok fazla genomik DNA özütlenmesine ve zamana ihtiyaç vardır. Bu yöntemde ender kesen restriksiyon endonükleazlar kullanılır. Örneğin; *Bifidobacterium* suşları için *XbaI*, *SpeI*, *DraI* ve *AseI* seçici kesim profilleri oluşturabilir. Kesim ürünleri elektrik alanının periyodik yön değiştirmesi ile 18–24 saat yürütülür (Ward ve Roy, 2005).

1.4.3.5. Ribotipleme

Bu yöntemde bakterilerden özütlenen DNA uygun bir restriksiyon endonükleazla kesilir. Kesim ürünleri bir agaroz jelde yürütülür; naylon veya nitroselüloz bir membrana aktarıldıktan sonra radyoaktif olarak işaretlenmiş rRNA gen dizisini hedef alan bir proba hibritlenir. Bakteri kromozomunda rRNA operonları çok kopyalıdır; restriksiyon kesiminde birkaç parça, proba hibritleşir. Böylece oluşan profillerle bakteri suşları ayırt edilebilir (Tannock, 2001). Ribozomal RNA operonları ne kadar çok kopyalıysa, ayırım o kadar kolay olur.

1.4.3.6. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

Bu teknikle tüm genom özütlerinden rastgele seçilen primerler aracılığıyla PCR gerçekleştirilir. Bu primerler genelde 10–12 baz uzunluğundadır. Primerler genomda komplementeri olan dizilere bağlanıp, çoğaltım sonucunda farklı büyüklüklerde parçalar meydana getirecek, her bakterinin kendine özgü bant profilleri oluşacaktır. Bu yöntem, reaksiyon koşullarındaki değişikliğe karşın çok hassas olsa da, genom hakkında bir ön bilgiye sahip olunmadığında oldukça kullanışlıdır (O’Sullivan, 2000).

1.4.3.7. Rivörs Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

PCR, kalıp dizilerini, çok az konsantrasyonda bulunsalar bile, çoğaltmada oldukça kullanışlıdır. Ancak primer çiftlerindeki varyasyonlar, kalıp DNA'nın erime sıcaklığı, reaksiyon sürecinde substratların bitmesi, farklı büyüklükteki diziler için çoğaltma etkinliğinin değişmesi reaksiyonun hassasiyetini etkiler. Ayrıca PCR'da ilk uzayan dizinin farklı bir rDNA ipliğine tekrar yapışması ve diğer PCR döngülerinde bu dizilerin birlikte çoğaltılmasıyla genellikle filogenetik olarak birbirinden ayrı iki atanın dizilerini kapsayan kimerik diziler oluşmaktadır (Huber ve Ark., 2004). Homolog genlerin birlikte çoğaltılması, var olmayan türlerin tanımlanmasına imkan verebilmektedir.

Ribozomlardan doğrudan özütlenen 16S rRNA çoğaltılabilir ve böylece bağırsaklarda metabolik olarak en aktif gruplar belirlenebilir (Vaughan ve Ark., 2000). Örneğin; insan bağırsağında bulunan 12 farklı grubun 16S rRNA'larına özgü primerler kullanılarak, *Clostridium clostridii*, *Fusobacterium prousnitzii* ve *Peptostreptococcus products'* un *Eubacterium bifforme*, *E. coli* ve çeşitli laktik asit bakterilerine göre daha baskın olduğu bulunmuştur (Wang ve Ark., 1996)

1.4.3.8. Bakterilerin in situ Görüntülenmesi

Bu yöntem, uçları floresan boyalarla işaretli rRNA' ya özgü oligonükleotit probalar, sindirim sistemi örneklerinde bakteri hücrelerinin sayılması ve tanımlanmasında başarılı olmuştur (Aman ve Ark., 1995). Bu probalar hücrelere girecek kadar küçüktür ve hücre içi rRNA' ya bağlanır. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği, görüntü analizleriyle birleştirilerek otomatize edilmiş ve insan sindirim sisteminin çok çeşitli filogenetik gruplarının sayılmasını mümkün kılmıştır (Vaughan ve Ark., 1999). Bu yöntem, bazı türlere özgü genler için geliştirilen probalarla da gerçekleştirilebilir.

1.4.3.9. Diğer PCR Tabanlı Yöntemler

Rep-PCR (Tekrarlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Bu yöntem PCR ile kromozomda belirli tekrarlı dizileri çoğaltmak için kullanılır. Farklı suşlarda tekrarlı diziler farklı yerlerde ve farklı sayıda tekrarlara sahiptir. Çoğaltılan diziler jel elektroforeziyle ayrılır ve karakteristik profiller görüntülenir.

Multiplex-PCR

Bu yöntem ile bir PCR reaksiyonunda birden fazla primer kullanılarak daha çok hedef bölge çoğaltılır. Oluşan parçalar jel elektroforezinde yürütülür, profiller karşılaştırılarak yorumlanır. Ancak bu yöntemde genom hakkında ön bilgiye sahip olmak gerekir (O'Sullivan, 2000).

TAP-PCR (Target arbitrarily primed PCR)

Bu yöntemde üç farklı reaksiyon koşulu kullanılarak (örneğin; yapışma (annealing) sıcaklığı; 40 °C, 50 °C, 60 °C) PCR ile üç farklı çoğaltma reaksiyonu uygulanır. Profil sayısı artar, ayırım kolaylaşır (O'Sullivan, 2000).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyaller

2.1.1. Kimyasallar ve Kullanılan Çözeltiler

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

Tablo 2.1. Örnekler ve alım tarihleri

Örnek Kodu	Alım Tarihi	Hamilelik Süresi (Gün)	Örnek Kodu	Alım Tarihi	Hamilelik Süresi (Gün)
AK1	23.08.2006	52 (7hafta 3 gün)	FK3	07.11.2006	139 (19 hafta 6 gün)
AK2	29.09.2006	89 (12 hafta 5 gün)	FK4	14.12.2006	176 (25 hafta 1 gün)
AK3	30.10.2006	121 (17 hafta 2 gün)	FK5	26.01.2007	219 (31hafta 2 gün)
AK4	07.12.2006	158 (22 hafta 4 gün)	FK6	08.03.2007	262 (37 hafta 3 gün)
AK5	12.01.2007	94 (27 hafta 5 gün)	HK1	07.09.2006	91 (13 hafta)
AK6	21.02.2007	232 (33 hafta 1 gün)	HK2	04.10.2006	118 (16 hafta 6 gün)
AK7	28.03.2007	297 (42 hafta 3 gün)	HK3	07.11.2006	152 (21 hafta 5 gün)
CK1	02.10.2006	94 (13 hafta 3 gün)	HK4	06.12.2006	181 (25 hafta 6 gün)
CK2	07.11.2006	130 (18 hafta 4 gün)	HK5	12.01.2007	218 (31 hafta 1 gün)
CK3	05.12.2006	158 (22 hafta 4 gün)	IK1	07.09.2006	91 (13 hafta)
CK4	12.01.2006	191 (27 hafta 2 gün)	IK2	12.10.2006	126 (18 hafta)
CK5	14.02.2007	224 (32 hafta)	IK3	07.11.2006	152 (21 hafta 5 gün)
CK6	15.03.2007	254 (36 hafta 1 gün)	IK4	08.12.2006	183 (26 hafta 1 gün)
EK1	06.09.2006	56 (8 hafta)	IK5	12.01.2007	218 (31 hafta 1 gün)
EK2	17.10.2006	97 (13 hafta 6 gün)	IK6	15.02.2007	252 (36 hafta)
EK3	22.11.2006	133 (19 hafta)	JK1	02.10.2006	56 (8 hafta)
EK4	04.01.2007	176 (25 hafta 1 gün)	JK2	29.11.2006	114 (16 hafta)
EK5	09.02.2007	222 (31 hafta 5 gün)	JK3	09.01.2007	155 (22 hafta 1 gün)
FK1	06.09.2006	77 (11 hafta)	JK4	12.02.2007	189 (27 hafta)
FK2	12.10.2006	113 (16 hafta 1 gün)	JK5	27.03.2007	232 (33 hafta 1 gün)

2.1.2. Örnekler

Bu çalışmada, Sivas bölgesinde Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Doğum Anabilimdalı, Kadıburhanettin Sağlık Ocağı ve Çayyurt Sağlık Ocağı'ndan hamilelik başlangıcından itibaren kontrolü yapılan sağlıklı yedi anne adayından her ay fekal örnekler aseptik koşullarda steril plastik kaplar içerisine alınmıştır. 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 dağıtılmıştır. Falkon tüpündeki örnek DNA hazırlamada kullanılmış; krayo tüpler -80 °C'de saklanmıştır. Örnek kodları, alım tarihleri ve anne adaylarının bu tarihte hamileliklerinin kaçınıcı gününde olduğu Tablo 2.1'de listelenmiştir.

2.2. Metot

2.2.1. Genomik DNA Özütleme

Genomik DNA özütleme Gramley ve Ark. (1999) tarafından geliştirilen yöntemin modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Falkon tüplerindeki 2 ml örnek 15 ml TES çözeltisi içerisinde homojenize edildikten sonra 1.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek, partiküller çöktürülmüştür. Üst faz yeni bir falkon tüpüne alınarak, 5.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve bakteri hücreleri çöktürülmüştür. Hücre peleti üzerine 800 µl % 25 sükröz çözeltisi ve bir kürdan yardımıyla lizozim konulmuş, 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Hücre lizatı üzerine 1 mg/ml Proteinaz K (Stok: 20 mg/ml), 1.360 µl 1x TE ve 120 µl SDS konulmuş ve 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Örnek üzerine 400 µl NaCl ve 320 µl %10' luk CTAB çözeltisi eklenerek 65 °C su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. Falkon tüpündeki örnek dört Eppendorf tüpe bölünmüştür. Örnek üzerine 1 hacim fenol, 1 hacim kloroform eklenerek, 1 dakika elde karıştırıldıktan sonra 10.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiş, üst faz yeni bir tüpe alınmıştır. Üst fazlar yeni bir falkonda birleştirilerek, 1 hacim izopropanol (%99) eklenmiş, sonraki basamaklara tekrar Eppendorf tüplerde devam edilmiştir. DNA yumağı bir pipet ucuyula alınmış, yeni bir tüpe aktarılmış,

%70' lik etanolle 10.000 rpm' de 6 dakika santrifüj yapılarak iki kez yıkanmıştır. Yumak oluşmadığında; örnek 10.000 rpm' de 6 dakika santrifüj edilmiş, pelet 10.000 rpm' de 6 dakika santrifüj edilerek iki kez yıkanmıştır. Alkolün tamamı uzaklaştırıldıktan sonra, pelet üzerine 300 µl 1x TE eklenmiş ve DNA çözülünceye kadar 80 °C' de 20 dakika, -20 °C' de 20 dakika ardışık sıcak-soğuk şoku uygulanmıştır. Yumak görülmeyen örnekler 1 µl RNaz (100 mg/µl) eklenmiş ve 37 °C' de bir saat inkübe edilmiştir.

Örnekler üzerine bir hacim fenol bir hacim kloroform eklenip, 1 dakika elde karıştırıldıktan sonra 10.000 rpm' de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz üzerine 1 hacim kloroform eklenip, bir dakika manuel olarak karıştırıldıktan sonra 10.000 rpm' de iki dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz üzerine 1/10 hacim 5M NaCl eklenip karıştırıldıktan sonra iki hacim %99' luk etanol eklenmiş, tekrar karıştırılmış ve 10.000 rpm' de 6 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet üzerine %70' lik etanol eklenmiş, 10.000 rpm' de 6 dakika santrifüj edilerek iki kez yıkanmıştır. Örnek oda sıcaklığında hafif nemli kalacak şekilde kurutulmuş, pelet üzerine 100 µl 1x TE eklenip, DNA çözününceye kadar 65 °C' de inkübe edilmiştir.

2.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA özütlelerinin kalitesi ve miktarı %0,8' lik agaroz jelde incelenmiştir. Bunun için; 1,2 gr agaroz, 150 µl 1x TAE tamponunda kaynatılarak çözülmüştür. Agaroz çözültisi 40 °C' ye kadar soğutulmuştur. Soğutmadan sonra 10 µl etidyum bromür çözültisi (10 mg/ml) eklenmiştir. Agaroz jel, jel tankına dökülmüş ve taraklar yerleştirilmiştir. Jel katılaştıktan sonra taraklar çıkarılmış, 1x TAE tamponu ile doldurulan elektroforez sistemine yerleştirilmiştir. Beş µl DNA örneği, 1 µl 6x yürütme tamponuyla yüklenmiştir. Örneklerin yüklenmesinden sonra 500ng DNA moleküler ağırlık belirteci (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas, 1 kb) ilk kuyuya yüklenmiştir. 50 mA' de 3 saat süreyle elektroforez yapılmış ve DNA miktar ve kalitesi jel dokümantasyon sisteminde (GeneLine, ABD) incelenmiştir.

2.2.3. 16S rDNA Bölgesinin PCR Reaksiyonu

Bu metot 16S ribozomal RNA (rRNA) bölgesinin çoğaltılmasını temel almıştır. 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 µl kalıp DNA (yaklaşık 200 ng) kullanılmıştır. Çoğaltma işlemi 5 µl PCR tamponu (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 (5 u/ µl) olmak üzere 50 µl toplam reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu aşağıdaki program kullanılarak gerçekleştirilmiştir (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)

40 döngü

Adım 5: 10 dakika 72 °C (son uzama)

2.2.4. Çoğaltım Ürünlerinin Ayrılması

PCR reaksiyonunu tamamladıktan sonra, çoğaltılan ürünler %0,8' lik agaroz jelde ayrılmıştır. Yürütme için 5 µl çoğaltma ürünü mineral yağın altından alınarak 1 µl 6x yürütme tamponu eklenmiştir. Örneklerin yüklenmesinden sonra 1 µl DNA moleküler ağırlık belirteci ilk kuyuya yüklenmiştir. Elektforez 50 mA' de gerçekleştirilmiştir. Çoğaltma ürünleri jel dokümantasyon sisteminde görüntülenmiştir. Yaklaşık 1.500 bç DNA parça büyüklüğü hedef çoğaltmanın başarıldığını göstermiştir.

2.2.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

İlk olarak örneklerin hacmini 150 µl' ye ayarlamak için 100 µl 1x TE tamponu eklenmiştir. İki hacim kloroform/izoamil alkol çözücü eklenmiş ve karıştırılmıştır. Bundan sonra örnekler 4.000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Sulu faz yeni bir Eppendorf tüpe alınıp, karıştırılmıştır. Bundan sonra, 450 µl %99' luk etanol eklenmiş ve karıştırılmıştır. Örnekler 10.000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. DNA peletini elde ettikten sonra, sıvı faz uzaklaştırılmıştır. Peletler 500 µl %70' lik etanolla yıkanmıştır. Beş dakika 10,000 rpm' de santrifüjden sonra, etanol uzaklaştırılmış ve peletler oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Son olarak, peletler 30 µl 1x TE' de çözülmüş, -20 °C' de saklanmıştır.

2.2.6. Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Çoğaltım ürünlerinden, restriksiyon enzim kesimlerinin her biri için 15 µl kullanılmıştır. Kesim, 5 µl restriksiyon enzim tamponu (10x), 28,5 µl steril distile su, 15 µl (yaklaşık 1 µg) PCR ürünü, 1,5 µl (10 u/µl) restriksiyon enzimi kullanılarak 50 µl son hacminde gerçekleştirilmiştir. *Taq I* ve *Hae III* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılmıştır. *Taq I* kesimi 65 °C' de gerçekleştirilirken, *Hae III* kesimi 37 °C' de gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımları 6 saat boyunca inkübe edilmiştir. *Taq I* enzimi reaksiyon başlangıcında ve 3 saat sonra olmak üzere iki aşamada konulmuş ayrıca örneklerin buharlaşmasını önlemek için, örneklerin üzeri mineral yağ ile (yaklaşık 50 µl) kaplanmıştır.

2.2.7. Kesim Ürünlerinin Saflaştırılması

Kesimden sonra, örneklerin hacimleri 1x TE tamponuyla 100 µl' ye tamamlanmıştır. Kloroform saflaştırması 2 hacim kloroform/izoamil alkol çözücü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Saflaştırmadan sonra, sulu faz 1/10 hacim 3 M sodyum asetat çözeltisi (pH 5,2) içeren yeni bir Eppendorf tüpe alınıp, karıştırılmıştır. İki buçuk hacim %99' luk etanol eklenip, karıştırılmıştır. 10,000 rpm' de 15 dakika santrifüjden sonra sıvı faz uzaklaştırılıp, DNA peletleri 300 µl

%70 etanolla yıkanmıştır. Etanol uzaklaştırılmış ve örnekler oda sıcaklığında kurutulmuştur. Son olarak, örnekler 15 µl 1x TE' de çözündürülmüştür.

2.2.8. Kesim Ürünlerinin Ayırıştırılması

Kesilen parçalar %1,8 agaroz jelde ayırıştırılmıştır. Bunun için, 6,3 gr agaroz 350 ml 1x TAE tamponunda kaynatarak çözülmüştür. 45 °C' ye kadar soğutulduktan sonra 30 µl etidyum bromür (10 mg/ml) eklenmiştir. Jel, katılaştıktan sonra, taraklar çıkarılmıştır. Tank 1x TAE tamponuyla doldurulmuştur. Örneklerden 4' er µl, 2 µl 6x yükleme tamponuyla birlikte kuyulara yüklenip, ilk kuyuya 500 ng DNA moleküler ağırlık belirteci (1 kb) yüklenmiştir. Son olarak ilk 60 dakika 30 mA' de olmak üzere, 80 mA' e çıkarılarak 8 saat elektroforez gerçekleştirilmiştir.

2.2.9. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamit Jel Elektroforezi (PAGE) ile Ayırıştırılması

Poliakrilamit jel elektroforezi 35x45x4 mm boyutlu camlar arasında gerçekleştirilmiştir. Camlar iyice temizlenip etanol ile silindikten sonra, jelin yapışması istenilen cama silan çözeltisi diğer cama ise yağmur kaydırıcı solüsyon (444, Rain Dance) sürülmüştür. Poliakrilamit jel için (%6' lık); 15 ml akrilamit çözeltisi, 10 ml 10x TBE çözeltisi, 69 ml distile su, 6 ml gliserol distile suyla 100 ml' ye tamamlanmış ve jeli dökmeyden hemen önce 800 µl %10' luk amonyum per sülfat çözeltisi, 100 µl tetrametilendiamin (%99) eklenmiştir. İki saat polimerleşmeye bırakılan jele 2 µl 6x yükleme tamponuyla birlikte 4 µl kesim ürünü ile yükleme yapılmıştır. İlk kuyuya her gurubun ilk örneği 95 °C' de 5 dakika denatüre edilerek yüklenmiştir. Örnekler yüklendikten sonra, iki kuyuya 1 µl moleküler ağırlık belirteci yüklenmiştir. Elektroforez 150 mA' de 12 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.

Elektroforezden sonra DNA bantları Qu ve Ark. (2005) yayımladığı boyama yöntemi kullanılarak boyanmıştır. Bunun için jel 2,5 lt 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 yıkanmıştır. Daha sonra jel DNA bantları görününceye dek, %3 sodyum karbonat, %0,2 formaldehit içeren çözeltide bekletilmiş, bantlar belirginleştikten sonra reaksiyon %10'luk asetik asit çözeltisinde 2–5 dakika bekletilmiştir.

2.2.10. Veri Analizi

Restriksiyon profilleri, Power Mac G4 markalı bilgisayarda PAUP (Pylogenetic Analysis Using Parsimony) programı 4.0b10 (Altivec) versiyonu aracılığıyla analiz edilmiştir. Bant profilleri 600 bç DNA moleküler ağırlık belirtecinden başlayarak aşağıya –molekül ağırlığının azaldığı yöne doğru isimlendirilmiştir. Jelde tam olarak görünmeyen ve ihmal edilebilir derecede az ve devamsız bantlar ihmal edilmiştir. Örnek miktarından dolayı bant profilleri tam olarak görünmeyen AK2 örneği hariç, soldan sağa doğru restriksiyon profilleri bantların varlığına ya da yokluğuna göre; mevcut bantlar “1”, olmayanlar “0” olarak kodlanarak bir veri matrisi oluşturulmuştur (Tablo 2.2). Bu veri matrisi UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) dendrogramında görüntülenmiştir.

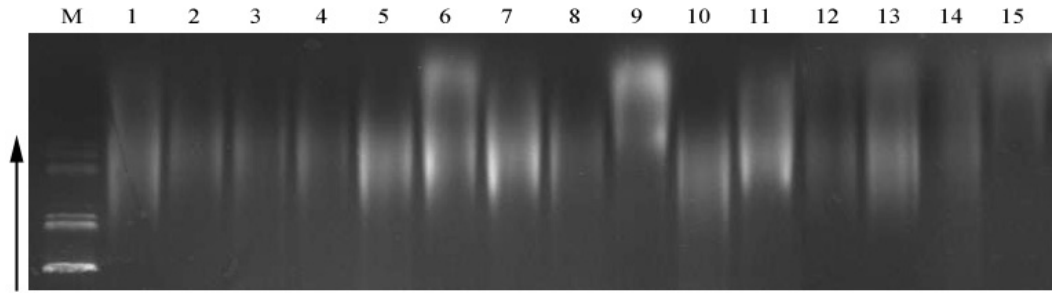
Tablo 2.2. Molekül ağırlığına göre yukarıdan aşağıya doğru değerlendirilen bant profillerine verilen isimler ve sağdan sola bant varlığına göre kodlanmış veri matrisi

Sıra	Kod	Veri Matrisi
1	B2.19	11111001100000000011000100011110100000
2	B2.14	01000100000000000001000100010001100000
3	B2.17	11111010111000010001000100001111100010
4	B2.10	00000001010000100000000000000011010011
5	B1.11	11000000001000101101110000011001010011
6	A18	1111111111110101000011111111111101011
7	B2.9	00000011011100000000000000101010000000
8	B1.10	01000000000000111111110000000000000000
9	A4	1111111111100111011110100011101010111
10	B2.6	01011100000000000000010101110111110011
11	B2.5	01011100000000000000010101110111110011
12	A7	1111111111111111111111011111101110111000
13	A2	01011001100011111000101111110011101011
14	B1.4	01111100011101011111000001000000100000
15	B2.8	01100001010000000010100101001100000011
16	B2.3	00101110101100001000000000001111010011
17	B2.16	11111001110001110000011000001111100000
18	A16	11111011111111111111111111111111011111
19	A15	11111011101111111111111111111111111111
20	B2.2	1110011111110000000001101001101100001
21	B2.18	0111011111000000000000100001110100000
22	B2.4	11011000000011000000000010111111001000
23	A3	1101111011110111000000010110010101001
24	A17	01111110111111111101011111111111101011
25	A9	01111110001010111001110111111111111011
26	B1.9	01111010001011111001110000000000000000
27	A11	1111111010111011111111111111111110101011
28	A14	11111111111111111111111111111111111111
29	A13	11111111111111111111111111111111111111
30	B1.3	00000010001111111111111111100000011111
31	B2.1	000000101111101001000010011111101000000
32	B2.7	01000001010000000011100100001110000000
33	A12	00011111111111111111111111111111111111
34	B1.7	00000001110000110011000110000001100000
35	A8	11111110011001111101110101111111111011
36	B2.13	11111111111000000000001000000000000000
37	B1.6	00000001000001110111100110001001001000
38	B2.12	11111101000000000000000000000000000000
39	A1	000100001001111110111011101111111111000
40	B1.2	00000011111111101111111001100000000010
41	B2.15	1111100111000011100000000000010100000
42	B2.11	11111100000000000000000000000000000000
43	A10	1111111111110111111110111111111111100010
44	A6	111111111111111111101111000101110110010
45	B1.1	001000111111111111101111101000000010011
46	B1.8	11010101101001110001100000000010000001
47	B1.5	00000001111110111101100101000001000000
48	A5	11111111111010101101110110101110110001

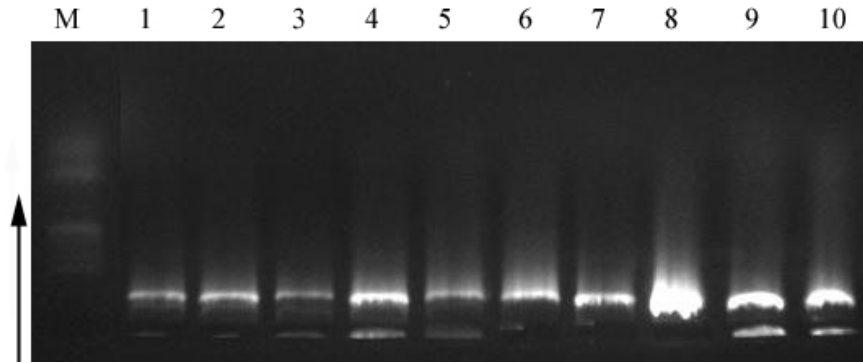
3. BULGULAR

3.1. Genomik DNA Özütleri

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



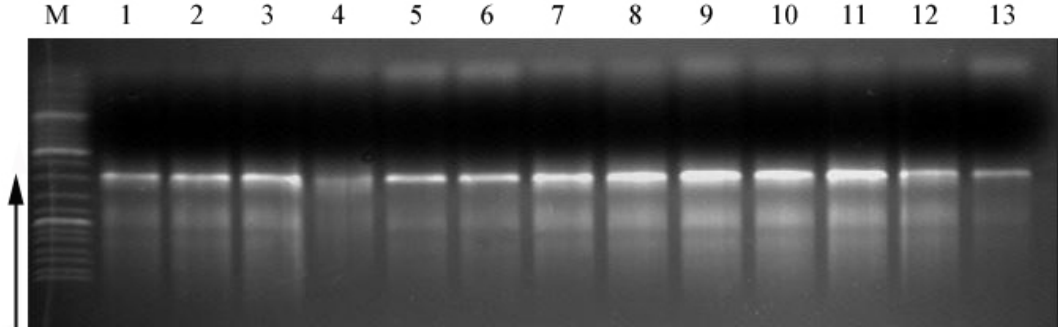
Şekil 3.1. Bazı parçalanmış genomik DNA'lar. M. 1kb Moleküler Ağırlık Belirteci; 1-2. EK1; 3-4. EK2; 5-6. EK3; 7-8. FK1; 9-10. FK2; 11. FK3; 12. FK3; 13. FK4; 14-15. CK3



Şekil 3.2. Bazı parçalanmamış genomik DNA'lar. M. 1kb Moleküler Ağırlık Belirteci; 1. AK6; 2. CK3; 3. CK5; 4. EK2; 5. EK3; 6. FK2; 7. FK3; 8. FK4; 9. IK2; 10. JK5

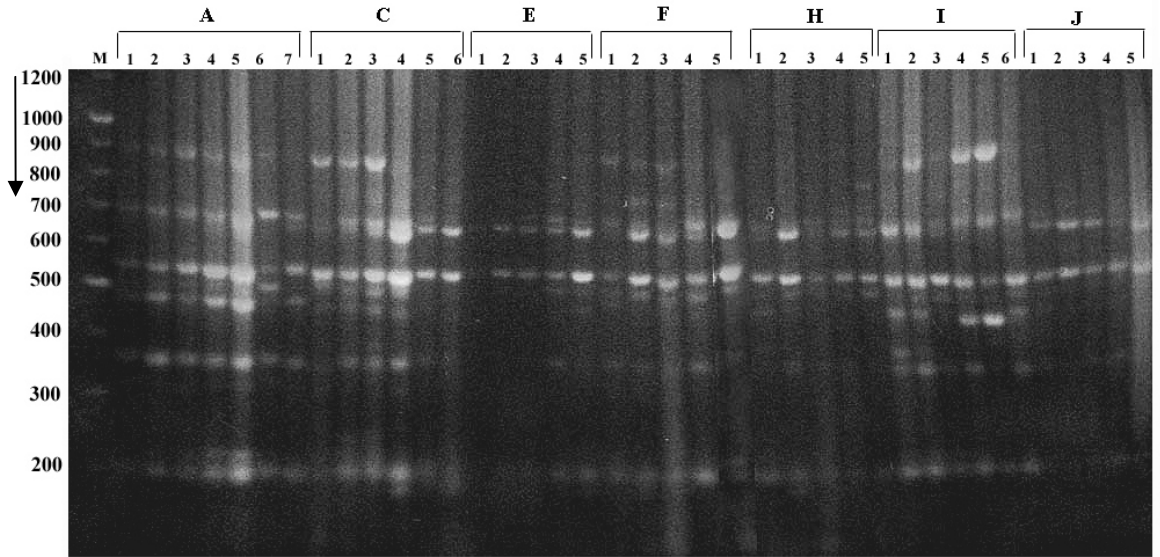
3.2. 16S rDNA Bölgesinin PCR Reaksiyonu

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



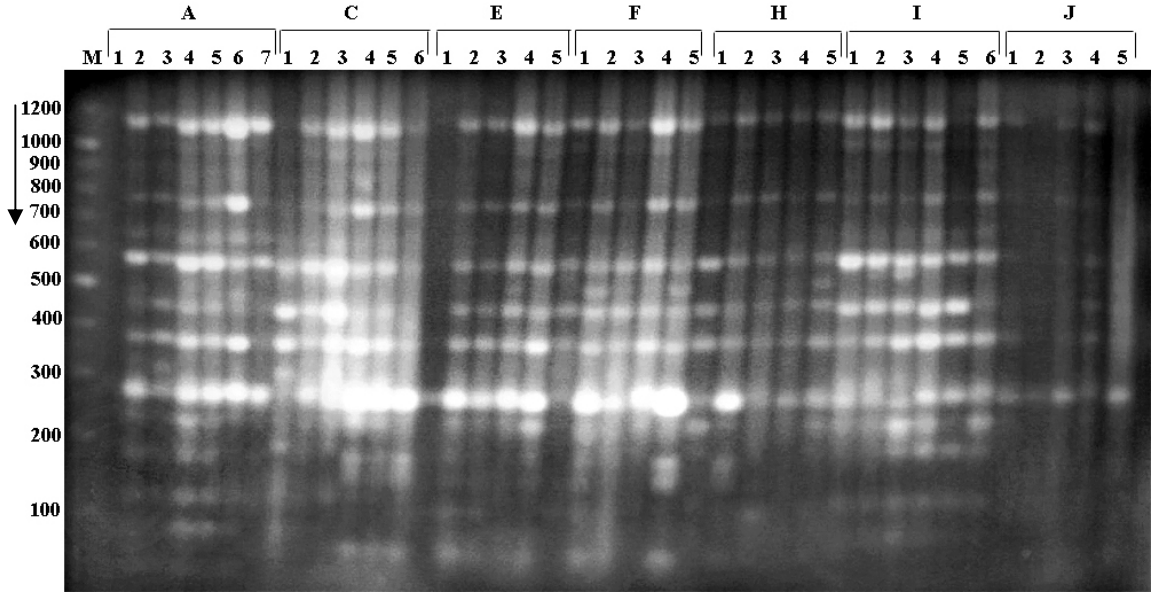
Şekil 3.3. Bazı DNA özütlelerinin 16S rDNA gen bölgesinin PCR reaksiyonu. 1. 1kb Moleküler Ağırlık Belirteci; 1. AK1; 2. AK2; 3. AK3; 4. AK4; 5. EK1; 6. EK2; 7. EK4; 8. EK5; 9. FK1; 10. FK2; 11. AK5; 12. AK6; 13. EK3

3.3. RFLP



Şekil 3.4. *Taq* I kesim ürünlerinin %1,8' lik agaroz jeldeki görüntüleri. M) 1kb Moleküler Ağırlık Belirteci. A) 1. AK1, 2. AK2, 3. AK3, 4. AK4, 5. AK5, 6. AK6, 7. AK7. C) 1. CK1, 2. CK2, 3. CK3, 4. CK4, 5. CK5, 6. CK6, E) 1. EK1, 2. EK2, 3. EK3, 4. EK4, 5. EK5. F) 1. FK1, 2. FK2, 3. FK3, 4. FK4, 5. FK5. H) 1. HK1, 2. HK2, 3. HK3, 4. HK4, 5. HK5. I) 1. IK1, 2. IK2, 3. IK3, 4. IK4, 5. IK5, 6. IK6. J) 1. JK1, 2. JK2, 3. JK3, 4. JK4, 5. JK5

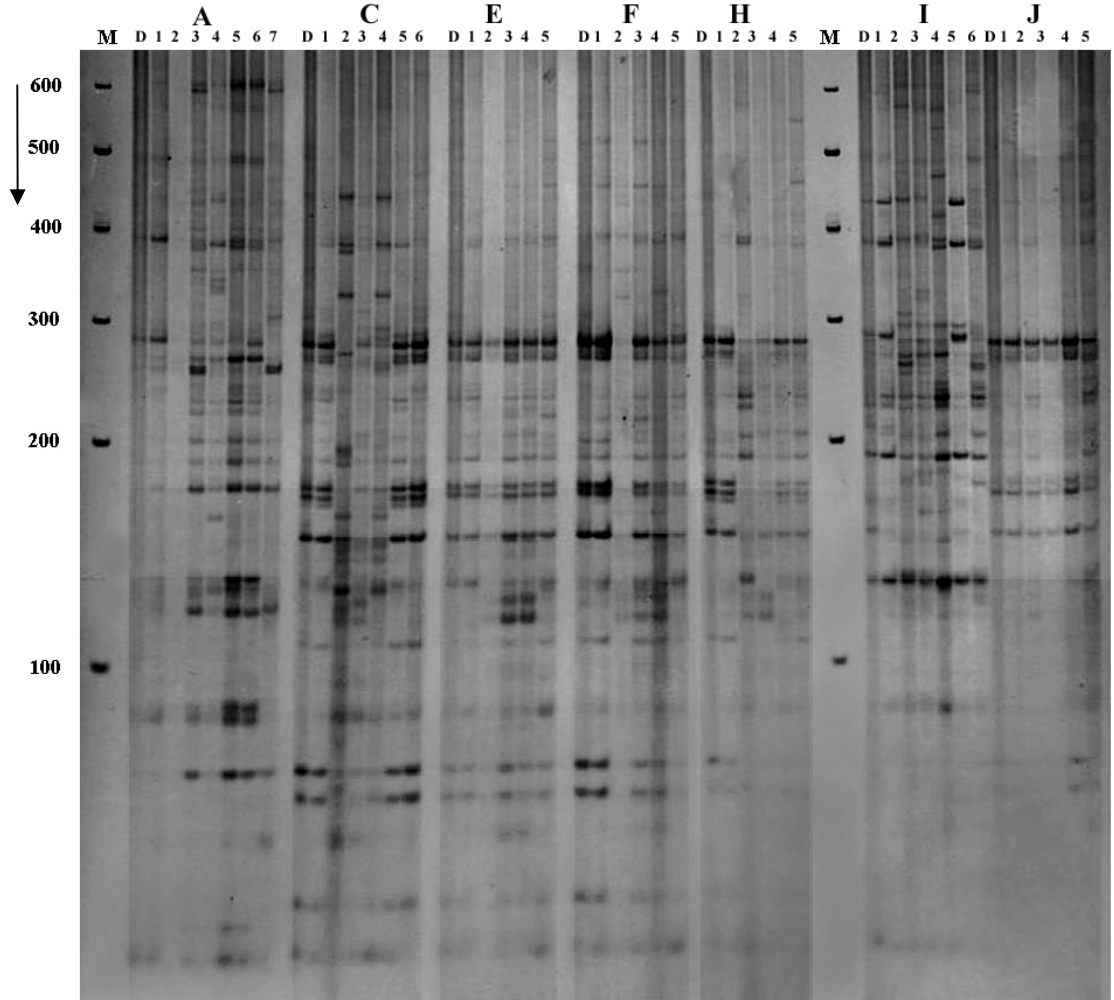
PCR ürünleri *Taq I* ve *Hae III* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile ayrı ayrı kesilmiş ve parçalar %1,8' lik agaroz jelde ayrıştırılmıştır (Şekil 3.4, Şekil 3.5)



Şekil 3.5. *Hae III* kesim ürünlerinin %1,8' lık agaroz jeldeki görüntüleri. M) 1kb Moleküler Ağırlık Belirteci. A) 1. AK1, 2. AK2, 3. AK3, 4. AK4, 5. AK5, 6. AK6, 7. AK7. C) 1. CK1, 2. CK2, 3. CK3, 4. CK4, 5. CK5, 6. CK6, E) 1. EK1, 2. EK2, 3. EK3, 4. EK4, 5. EK5. F) 1. FK1, 2. FK2, 3. FK3, 4. FK4, 5. FK5. H) 1. HK1, 2. HK2, 3. HK3, 4. HK4, 5. HK5. I) 1. IK1, 2. IK2, 3. IK3, 4. IK4, 5. IK5, 6. IK6. J) 1. JK1, 2. JK2, 3. JK3, 4. JK4, 5. JK5

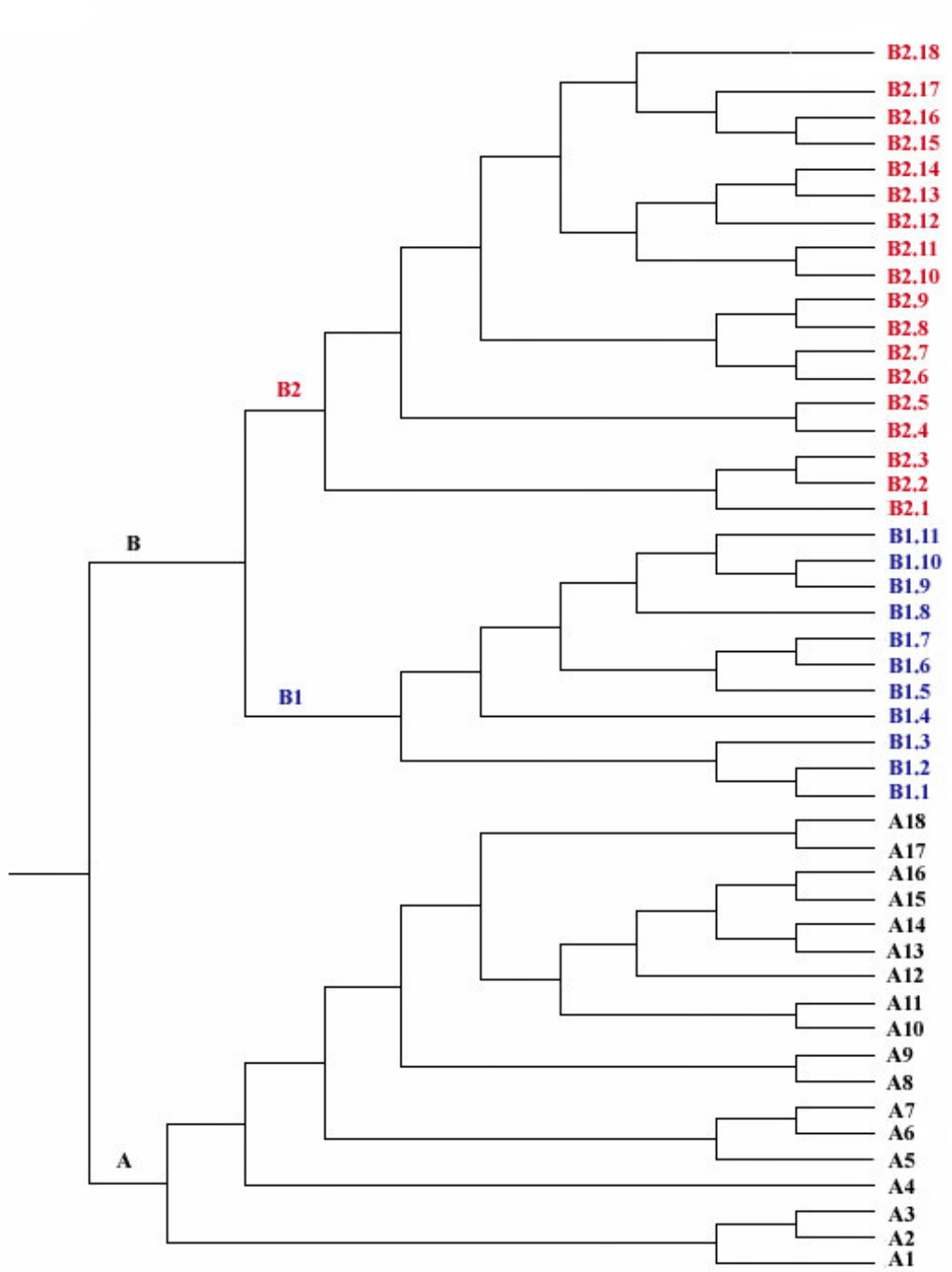
3.4. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (PAGE) ile Ayrıştırılması

Hae III ile kesilmiş aynı örnekler %6'lık poliakrilamid jelde tekrar yürütülmüştür. Şekil 3.6' da "D" ile gösterilen 95 °C' de 5 dakika denatüre edilmiş her gurubun ilk örneği renatüre olduğu için, analizlerde göz önünde bulundurulmamıştır.



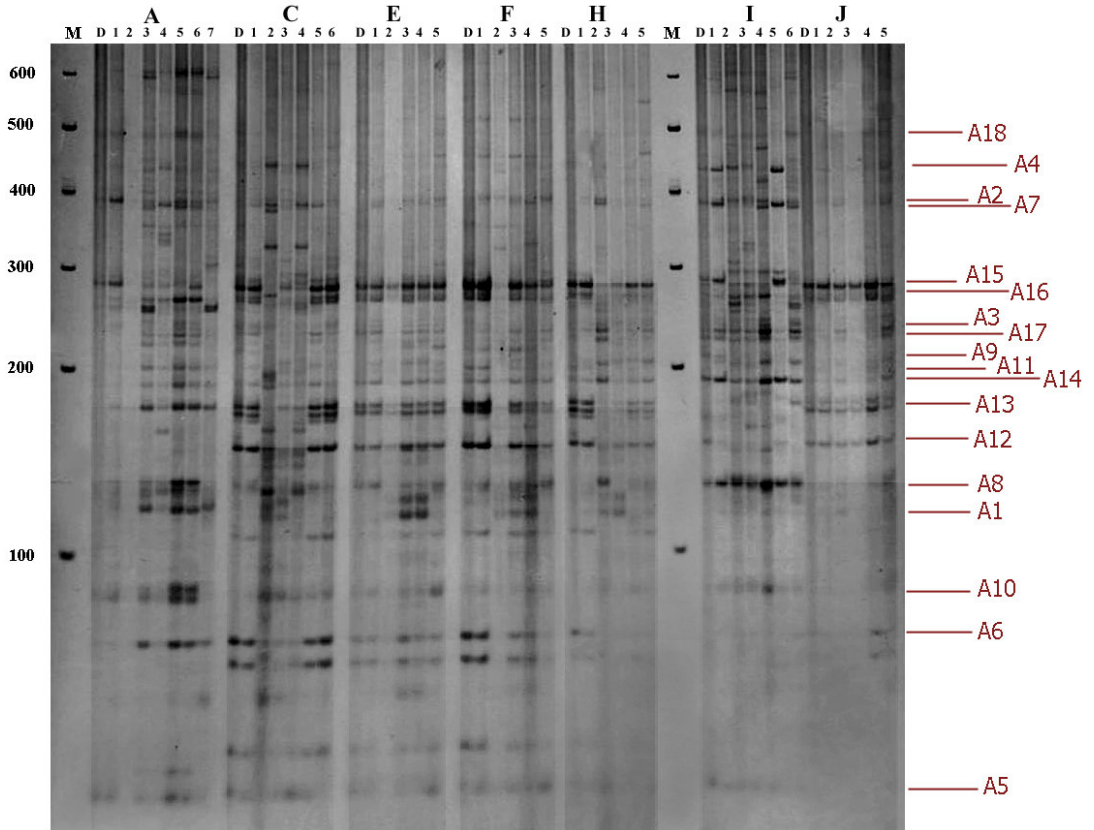
Şekil 3.6. *Hae III* kesim ürünlerinin %6'lık poliakrilamid jeldeki görüntüleri. M) 1kb Moleküler Ağırlık Belirteci. D) Denatüre edilerek yüklenmiş grubun ilk örneği. A) 1. AK1, 2. AK2, 3. AK3, 4. AK4, 5. AK5, 6. AK6, 7. AK7. C) 1. CK1, 2. CK2, 3. CK3, 4. CK4, 5. CK5, 6. CK6, E) 1. EK1, 2. EK2, 3. EK3, 4. EK4, 5. EK5. F) 1. FK1, 2. FK2, 3. FK3, 4. FK4, 5. FK5, 6. FK6. H) 1. HK1, 2. HK2, 3. HK3, 4. HK4, 5. HK5. I) 1. IK1, 2. IK2, 3. IK3, 4. IK4, 5. IK5, 6. IK6. J) 1. JK1, 2. JK2, 3. JK3, 4. JK4, 5. JK5

3.5. Analiz



Şekil 3.7. Bant varlığına göre kodlanmış veri matrisinin UPGMA dendrogramında görüntüsü. A) Kararlı bantlar, B1) Yarı kararlı bantlar, B2) Kararsız bantlar.

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 gösterilmiştir.

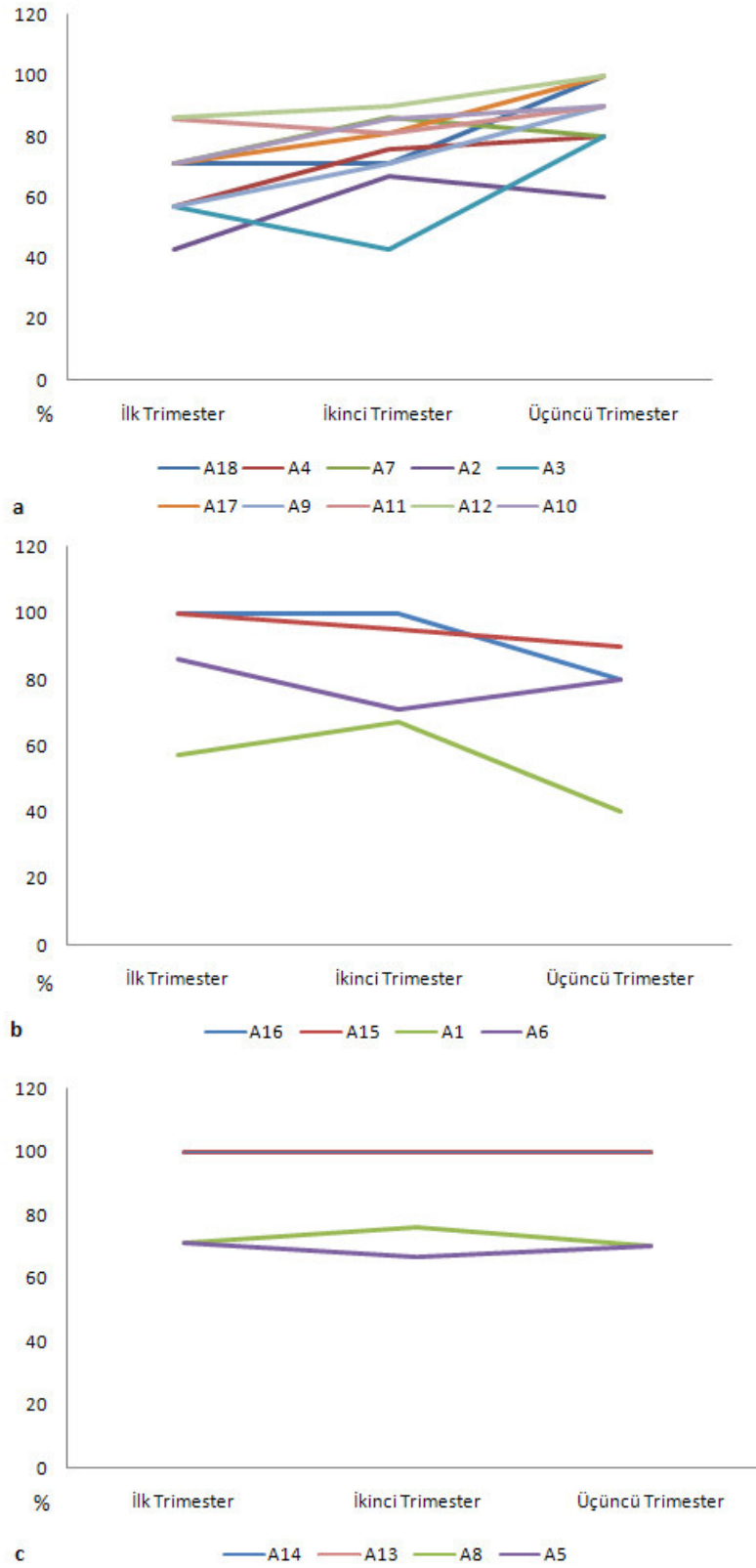


Şekil 3.8. Dendrogramda görülen A grubu (kararlı) bant profillerinin poliakrilamid jelde görüntüleri

A grubu bantların tüm anne adayları arasında gebeliğin ilk üç aylık (ilk trimester), ikinci üç aylık (ikinci trimester) ve üçüncü üç aylık (üçüncü trimester) periyotlarında ve toplam görülme sıklıkları yüzde olarak Tablo 3.1' de gösterilmiştir. Şekil 3.9' da ise A grubu bantların gebelik dönemlerine göre artış, azalış ve değişmezlikleri şematize edilmiştir.

Tablo 3.1. A grubu bantların tüm anne adayları arasında gebeliğin ilk üç aylık (ilk trimester), ikinci üç aylık (ikinci trimester) ve üçüncü üç aylık (üçüncü trimester) periyotlarında ve toplam görülme yüzdeleri

Kararlı Bantlar	Anne Adayları Arasında Görülme Sıklıkları (%)			
	İlk Trimester	İkinci Trimester	Üçüncü Trimester	Toplam
A18	71	71	100	82
A4	57	76	80	74
A7	71	86	80	74
A2	43	67	60	61
A16	100	100	80	95
A15	100	95	90	95
A3	57	43	80	55
A17	71	81	100	79
A9	57	71	90	71
A11	86	81	90	84
A14	100	100	100	100
A13	100	100	100	100
A12	86	90	100	92
A8	71	76	70	79
A1	57	67	40	61
A10	71	86	90	84
A6	86	71	80	76
A5	71	67	70	71



Şekil 3.9. A grubu bantların gebelik dönemlerine göre artış, azalış ve değişmezlik grafikleri. a) artan bantlar; b) azalan bantlar c) sabit bantlar

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sağlıklı bir kalın bağırsak büyük oranda bifidobakteri ve laktobasil gibi yararlı bakterilerce donanmıştır. Bu bakterilerin konağın patojen bakterilere karşı direncini arttırmak, bağışıklık sistem fonksiyonlarını düzenlemek, çeşitli yararlı metabolitler sentezlemek gibi birçok yararı vardır.

Kuşkusuz bir bebeğin yaşamının ilk evrelerinde bağışıklık sisteminin gelişmesi, karşılaştığı patojen bakterilere karşı direnci, sağlıklı dışkılaması oldukça önemlidir. Fetüsün steril olduğu ve bağırsak kolonizasyonunun yenidoğanların doğum kanalından geçiş sırasında anneye ait fekal ve vajinal bakteriler ile kontaminasyonu ile başladığı fikri geniş ölçüde kabul görmüştür (Isolauri ve Ark., 2001; Mackie ve Ark., 1999). Ancak kalın bağırsak kolonizasyonunun doğumdan önce başlayabileceğine dair birtakım yeni bulgular mevcuttur (Schultz ve Ark., 2004, Jimenez ve Ark., 2005). Bu bulgulara göre hamilelik süresince plasentadan fetüse özellikle bazı laktik asit bakterileri taşınmaktadır. Bu durumda anne kalın bağırsak mikroflorası fetüsün bakterilerle tanışmasında ilk ve önemli faktörlerden biri olabilir.

Anne sütü bebek kalın bağırsak mikroflorasının gelişiminde en önemli faktördür. Sütte bulunan bakterilerin orijini henüz tartışılmakla birlikte, özellikle bazı türlerin (örneğin; probiyotik özellik gösteren laktik asit bakterileri) anne bağırsağından endojen yollar ile meme bezlerine geçerek kolonize olduğu öne sürülmektedir (Martín ve Ark., 2003).

Bu bulgular anne kalın bağırsak mikroflorasının modüle edilebileceği ve bunun da bebek sağlığı üzerinde doğrudan bir etkisinin olabileceğini göstermektedir. Bu durumda bakteriyoterapi ve probiyotikler konusunda yeni ufuklar açılabilir. Zira son zamanlarda genellikle taze ve doğal besin maddelerini kapsamayan diyet şekillerinden oluşan, yeni beslenme alışkanlıkları edinilmektedir. Bebek beslenmesinde ise çeşitli mama formülasyonları emzirmenin yerini almaktadır. Beslenme rejimindeki bu değişiklikleri

dengeleyebilecek çeşitli teknolojik ürünler geliştirilmelidir. Bu ürünlerin temel kaynağı yine sağlıklı insanda bulunan doğal endojen mikrofloradır.

Günümüzde bu amaca hizmet eden ürünler mevcuttur. Pazar payları oldukça büyük olan bu tip ürünlerin güvenilirliği tartışma konusudur. Bu durum bu alanda yapılacak çalışmalarını teşvik etmektedir.

Gelişmekte olan ülkelerde, özellikle kırsal kesimde, bebeklerin emzirme ile beslenmesi ve aynı zamanda fermente ürünlerin geleneksel yöntemlerle yapımı ve tüketimi oldukça yaygındır. Bu nedenle kırsal kesimde yaşayan nüfusun, kentlere ve gelişmiş ülkelere oranla, çok daha zengin, yararlı bir kalın bağırsak mikroflorasına sahip olduğunu varsaymak mümkündür. Böyle bir örnekleme grubundan hamilelik dönemi ve doğum sonrasını kapsayan süreçte anne-bebek bağırsak mikroflorası ilişkisinin ortaya çıkarılması dünya literatüründeki diğer çalışmalardan kuşkusuz farklı olacaktır. Ayrıca anne kalın bağırsak, süt ve bebek kalın bağırsak mikofloralarını birlikte ele alan kapsamlı bir çalışma henüz mevcut değildir. Böyle bir çalışma bu mikrofloralar arasındaki ilişkiyi aydınlatacak ve sağlıklı anne kalın bağırsak mikroflorasının bebek üzerindeki önemini vurgulayacaktır. Bu nedenle hamilelik sürecinde anne kalın bağırsak mikroflorasının tanımlanması, ilk basamağı teşkil etmektedir.

Kararlı mikroflora olarak belirlenen bant profilleri daha sonra süt ve bebek kalın bağırsak mikroflorası ile de karşılaştırılacaktır. Böylelikle her üç örnek grubunda da kararlı olan profillerin hangi bakteri suşlarına ait oldukları klonlama ve dizi analizi ile aydınlatılacaktır.

Kalın bağırsak 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 özütlenmesi ile bu sorunların aşılması amaçlanmıştır.

Fekal örnekler PCR verimini düşüren bileşikler (fenolik bileşenler ve demir gibi) içermektedir. Özellikle hamileliğin üçüncü ayından itibaren anne

adaylarının kullandığı demir ekleri DNA özütlenmesi sırasında birtakım sorunlar yaratmıştır. Bu nedenle yıkama daha büyük hacimde ve birkaç kez gerçekleştirilirken, fenol kloroform basamakları örnek kirliliğine bağlı olarak arttırılmıştır. Özütleme ilk olarak 1,5 ml' lik Eppendorf tüplerde gerçekleştirilmiş, ancak yeterince hücrenin parçalanmadığı görülmüştür. Bu nedenle hücrelerin 50 ml' lik falkon tüplerde daha büyük hacimde parçalanması uygun görülmüştür. Bu işlemden sonra elde edilen DNA miktarı ve kalitesinde artış görülmüştür.

DNA peletini çözmek için uygulanan 80 °C' de 20 dakika, -20 °C' de 20 dakika ardışık sıcak-soğuk şoku DNA' nın kısmen parçalanmasına neden olmuş (Şekil 3.1), ancak bu işlem 65 °C' de 5–10 dakika DNA çözülünceye kadar gerçekleştirildiğinde bu sorun büyük ölçüde aşılmıştır (Şekil 3.2).

Birçok moleküler metodoloji 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 çoğaltılmıştır (Şekil 3.3).

Taq I düşük G+C içeriğine sahip grupları tanımlamayı, *Hae* III yüksek G+C içeriğine sahip türlerin tanımlamayı kolaylaştırır. Örneğin; birçok enterokok türün tanımlanmasında *Hae* III enzimi (Bulut ve Ark., 2005), *Lactobacillus* türlerinin tanımlanmasında ise *Taq* I daha bilgi vericidir (Yavuz ve Ark., 2004).

Şekil 3.4' de görüldüğü gibi *Hae* III daha zengin bir bant profili ortaya çıkardığı için parmak izi analizinde bu enzimle kesilmiş örneklerin kullanılmasına karar verilmiştir. Her iki enzimle birden kesilmiş örneklerin daha bilgi verici bant profili sergileyebileceği düşünülmektedir.

Kesim sonrası agaroz jelde çok sayıda yoğun bant profilleri görülmüştür. Bu profillerin birçok banttan meydana geldiği düşünülmüştür (Şekil 3.3–3.4). Bu nedenle *Hae* III ile kesilmiş aynı örnekler daha ayırıcı olan %6'lık poliakrilamid jelde tekrar yürütülmüştür. Yaklaşık 100–2000 bp çözünürlüğe sahipken, %6'lık

poliakrilamit jel yaklaşık 70–450 bç çözünürlüğe sahiptir (Sambrook and Russel, 2001). Agaroz jel (%1,8' lik) ile poliakrilamit jelde elde edilen bazı bant profillerinin molekül ağırlıkları uyuşmamıştır. Bu durumun bu iki jelin arasındaki çözme farkından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Poliakrilamit jelde yürümeden veya örnek miktarından kaynaklanan bazı seçilemeyen noktaların var olmasına karşın, genel olarak bant profillerine bakıldığında; i) bir ya da birkaç kez görünüp kaybolmuş, ne grupların kendi içinde ne de gruplar arasında rastlanan bantlar, ii) herhangi bir grubun kendi içerisinde kararlı ancak gruplar arasında pek rastlanmayan bantlar iii) genellikle bütün grupların bütün aylarında rastlanan bantlar mevcuttur. Dendrogramda bu kararsız bantlar B2 grubu altında toplanmıştır. Özellikle tüm gruplarda belirli bir ayda görünüp kaybolan bantlar hamilelik sürecine özgü çeşitli fizyolojik değişimler sonucu ortaya çıkan türleri işaret edebilir. Hamile olmayan birkaç kontrol örneğin kullanımı bu bant profillerinin hamileliğe özgü olup olmadığının anlaşılması açısından önemli olabilir. Bir ya da birkaç özgül, ancak devamlılık göstermeyen bantların kişiye özgül mikroflorayı işaret ettiği varsayılmıştır. Dendrogramda bu yarı kararlı bantlar B1 grubu altında toplanmıştır.

Burada üzerinde durulan profiller, tüm gruplarda devamlılık gösteren bant grupları olmuştur. Dendrogramda bu kararlı mikroflora A grubu altında toplanmıştır. Bu bantlardan herhangi ikisi veya daha fazlası bir mikroorganizma grubunun restriksiyon kesim ürünleri olabilmekle birlikte genel olarak değişmez mikroflora hakkında bilgi verebilir. Sağlıklı bir mikroflorada özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi sağaltıcı cinslerin ağırlıkta olduğunu düşünülürse, bu bant profillerinin bir yandan da yararlı mikrofloraya işaret ettiği ileri sürülebilir. Bu bilgi, aynı grupların süt ve bebek bağırsak mikrofloralarıyla karşılaştırıldığında endojen yollar ile mikroorganizma geçişinin anlaşılmasının mümkün olacağı umulmaktadır.

Tablo 3.1' de A grubu bantların tüm anne adayları arasında gebeliğin ilk ikinci ve üçüncü üç aylık dönemlerinde ve toplam görülme sıklıkları yüzde olarak gösterilmiştir. Bu oranlar Şekil 3.9' daki gibi şematize edildiğinde; toplam 18

bandın 10' u gebeliğin son dönemine doğru artış göstermiş, 4' ü sabit kalmış, 3' ü ise azalmıştır. Hamilelikte meydana gelen hormonal değişimler bu tablonun oluşmasını tetiklemiş olabilir.

Bu çalışma, gelecekte bu alanda yapılabilecek birçok çalışmayı cesaretlendirmelidir. Kalın bağırsak mikrobiyotasının biyoaktif bileşenlerin dönüşümündeki rolünün anlaşılması, metabolitlerin bağırsak epitelindeki veya emiliminden sonra sistemik etkilerinin çalışılması, sağaltıcı bakterilerin bağışıklık modülasyonuna moleküler açıdan yaklaşılması, sağlığa uygun fonksiyonel bileşenlerin geliştirilmesi, farklı hasta ve populasyon grupları için yeni tedavilerin geliştirilmesi ve tüketici beklentilerine yönelik fonksiyonel besin geliştirilmesi bunlar arasında sayılabilir.

5. KAYNAKLAR

- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H.** (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59: 143–169.
- Arunachalam K.D.** (1999). Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutrition Research*, 19: 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: 51-56.
- 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., Olsen E.** (2000). Sequence variation of the 16S to 23S rRNA spacer region in *Salmonella enterica*. *Res. Microbiol.*, 151: 37–42.
- Coşkun T.** (2006). Pro-, pre- ve sinbiyotikler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 49: 128–148.
- Cross M.L.** (2002). Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *Immunology and Medical Microbiology*, 34: 245–253.
- Cummings J.H., Antoine J.M, Azpiroz F., Bourdet-Sicard R., Brandtzaeg P., Calder P. C., Gibson G.R., Guarner F., Isolauri E., Pannemans D., Shortt C., Tuijelaars S., Watzl B.** (2004). Gut health and immunity. *Eur. J. Nutr.*, 43: 118–173.
- Devriese L.A., Pot B.** (1995). “The genus *Enterococcus*” in *The Lactic Acid Bacteria, The Genera of Lactic Acid Bacteria, Volume 2*, edited by B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel (Blackie Academic& Professionals, Glasgow) 327–367.
- Donskey C.J., Hujer A.M., Das S.M., Pultz N.J., Bonomo R.A., Rice L.B.** (2003). Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients *Journal of Microbiological Methods*, 54: 249– 256.
- Egert M., de Graaf A.A., Smidt H., de Vos W.M., Venema K.** (2006). Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon. *Trends in Microbiology*, 14: 86–91.
- Fanaro S., Chierici R., Guerrini P., Vigi V.** (2003). Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta. Paediatr. Suppl.*, 441: 48–55.

- Furrie E.** (2006). A molecular revolution in the study of intestinal microflora. *Gut*, 55: 141-143.
- Goldin B.R., Gorbach S.L.** (1984). The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 39: 756–761.
- Gorbach S.** (2002). Probiotics in the third millennium. *Digest Liver*, 21: S2–7.
- Gramley W.A., Asghar A., Frierson H.F., Powell S.M.** (1999). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Fecal Samples from Infected Individuals. *Journal Of Clinical Microbiology*, 37: 2236–2240.
- Grönlund M.M., Arvilommi H., Kero P., Lehtonen O.P., Isolauri E.** (2000). Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0–6 months. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.*, 83: F186–F192.
- Hammes W.P., 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) 19–54.
- Hardie J.M., Whiley R.A.** (1995). “The genus *Streptococcus*” in *The Lactic Acid Bacteria, The Genera of Lactic Acid Bacteria, Volume 2*, edited by B.J.B. Wood and W.H. Holzapel (Blackie Academic& Professionals, Glasgow) 55-124.
- Huber T., Faulkner G., Hugenholtz P.** (2004). Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 20(14): 2317–2319
- Isolauri E.** (2001). Probiotics in human disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 1142S–6S.
- Isolauri E., Kirjavainen P.V., Salminen S.** (2002). Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut*, 50: iii54–iii59.
- Isolauri E., Salminen S., Ouwehand A.C.** (2004). Probiotics. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 18: 299–313.
- Jiménez E., Fernández L., Marín M., Martín Rocío, Odriozola J. M., Nueno-Palop C., Narbad A., Mónica Olivares, Xaus J., Rodríguez J.M.** (2005). Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current Microbiology*, 51: 270–274.
- Larsen B., Monif G.R.G.** (2001). Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clinical Infectious Diseases*, 32: e69–77.
- Leblond-Bourget N., Philippe H., Mangin I., 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: 102–111.

- Mack D.R., Ahrne S., Hyde L., Wei S., Hollingsworth M.A.** (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*, 52: 827–833
- Mackie R. I., Sghir A., Gaskinsvitro H.R.** (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69: 1035S–45S.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J.** (2003). Brock Biology of Microorganisms, 10th edition (Prentice Hall) 407–408.
- Malinen E.** (2002). Molecular methods for detection of probiotics and intestinalmicrobiota, and evaluation of *Lactobacillus brevis* as a potentialprobiotic dietary adjunct. *Academic Dissertation*.
- Manning T. S., Gibson G. R.** (2004). Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.*, 18: 287–298.
- Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín M.L., Olivares M., Boza J., Jiménez J., Fernández L., Xaus J., Rodríguez M.J.** (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.*, 143: 754–8.
- Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín M.L., Olivares M., Boza J., Jiménez J., Fernández L., Xaus J., Rodríguez M.J.** (2004). The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 15: 12–27.
- McCartney A.L., Wenzhi W., Tannock G.W.** (1996). Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. *Applied And Environmental Microbiology*, 62: 4608–4613.
- Nassif X., Bourdoulous S., Euge'ne E., Couraud P. O.** (2002). How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier? *Trends in Microbiology* 10: 227–232.
- O'Hara A.M., Shanahan F.** (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7: 688–693.
- O'Sullivan D.J.** (2000). Methods for analysis of the intestinal microflora. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 1(2): 39–50.
- Qu L., Li X., Wu G.** (2005). Efficient and sensitive method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 26: 99–101.
- Raghavan S., Nyström J., Fredikson M., Holmgren J., Harandi A. M.** (2003). Orally administered CpG oligodeoxynucleotide induces production of CXC and CC chemokines in the gastric mucosa and suppresses bacterial

colonization in a mouse model of *Helicobacter pylori* infection. *Infection and Immunity*, 71: 7014–7022.

- Saarela M., Mogensen G., Fonde´n R., Mättö J., Mattila-Sandholm T.** (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84: 197–215.
- Sambrook J., Russell D. W.** (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Third Edition* (Cold Spring Harbour Laboratory Pres, New York).
- Saxelin M., Tynkkynen S., Mattila-Sandholm T. de Vos W. M.** (2005). Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 204–211.
- Schrezenmeir J., de Vrese M.** (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 361–364.
- Schultz M., Göttl C., Young R.J., Iwen P., Vanderhoof J.A.** (2004). Administration of oral probiotic bacteria to pregnant women causes temporary infantile colonization. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 38: 293–297.
- Sears C.L.** (2005). A dynamic partnership: Celebrating our gut flora. *Anaerobe* 11: 247–251.
- Sgorbati B., Biavati B., 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) 279–306.
- Stiles M.E., Holzapfel W.H.** (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36: 1–29.
- Sudo N.** (2006). Stress and gut microbiota: Does postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response? *International Congress Series*, 1287: 350–354.
- Tannock G.W.** (1999). Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 265–278.
- Tannock G.W.** (2001). Molecular assessment of intestinal microflora. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 410S–4S.
- Teuber M.** (1995). “The genus *Lactococcus*” 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) 173–234.
- Varaala O.** (2003). Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli. *Clin. Exp. Allergy*, 33: 1634–1640.
- Vaughan E.E., Heilig H.G.H.J., Zoetendal E.G., Satokari R., Collins J.K., Akkermans A.D.L., de Vos W.M.** (1999). Molecular approaches to

study probiotic bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 400–404.

- Vaughan E.E., Schut F., Heilig H.G.H.J., Zoetendal E.G., de Vos W.M., Akkermans A.D.L.** (2000). A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 1: 1-12.
- Veckman V., Miettinen M, Matikainen S, Lande R., Giacomini E., Coccia E.M., Julkunen I.** (2003). Lactobacilli and streptococci induce inflammatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis. *Journal of Leukocyte Biology*, 74: 395–402.
- Wang R-F., Cao W-W., Cerniglia C.E.** (1996). PCR Detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Applied And Environmental Microbiology*, 62: 1242–1247.
- Ward P., Roy D.** (2005). Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Lait*, 85: 23–32.
- 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.
- Zoetendal E.G., de Vos W.M., Akkermans A.D.L.** (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied And Environmental Microbiology*, 64: 3854–3859.

6. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Sivas'ta doğdu. Lise eğitimini Antalya'da tamamladı. 2000 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı ve 2004 yılında mezun oldu. 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

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. Karıştırarak 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 Çözeltisi (% 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 hidrosikinolin 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. Özütlemeye 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-merkaptolanol eklendi.

11. Kloroform İzoamil Alkol (19:1)

Kloroform (95 ml) 5 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 ml 1 M Tris, 1ml 5 M NaCl, 1 ml 0,5 M EDTA distile suyla 100 ml' ye tamamlandı.

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

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

16. DNA Moleküler Ağırlık Markörü Dilüsyonu

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

17. TBE Jel Yürütme Tamponu (6x)

Altı ml 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.

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

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

19. Silan Çözeltilisi

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