



## Determination of Bacteria Levels Contained in Some Probiotic Preparations Consumed and Confirmation by PCR

Özen Yurdakul<sup>1,a,\*</sup>, Elif Gizem Yılmaz<sup>2,b</sup>, Erdi Şen<sup>1,c</sup>, Soner Tutun<sup>3,d</sup>

<sup>1</sup>Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary, Food Hygiene and Technology Department, 15030, Burdur, Türkiye

<sup>2</sup>Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Institute of Health Science, Food Hygiene and Technology Department, 15030, Burdur, Türkiye

<sup>3</sup>Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, 58140 Sivas, Türkiye

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Research Article</p> <p>Received : 26.09.2023 Accepted : 26.12.2023</p> <p>Keywords: <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. Probiotic microorganisms Probiotic-prebiotic preparation PCR</p>	<p>This study aimed to investigate the viability and levels of bacteria as indicated on the label in probiotic preparations used as supplements. For this purpose, a total of 15 different preparations containing <i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i> species belonging to different brands were obtained. The samples were subjected to microbiological cultivation in terms of <i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i> species. As a result of the microbiological analysis, live bacteria were detected in 13 (%87) of the samples, while no growth was observed in 2 (%13) samples. <i>Lactobacillus</i> spp. average number of bacteria in probiotic preparations containing <math>5,9 \times 10^{10}</math> cfu/g; <i>Bifidobacterium</i> spp. on the other hand, in probiotic preparations containing bacteria, the average number of bacteria was <math>1,3 \times 10^9</math> cfu/g. Strains that underwent Gram staining, catalase test and carbohydrate fermentation test were confirmed by PCR analysis. As a result of PCR analysis, <i>Lactobacillus</i> strains and <i>Bifidobacterium</i> strains were confirmed in 13 samples. As a result, the presence, viability, and quantity of strains specified in ready-to-use probiotic preparations are very important. Our study showed that the accuracy of the information written on the label was 87%.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 12(1): 59-65, 2024

## Tüketilen Bazı Probiyotik Preparatların İçerdiği Bakteri Seviyelerinin Belirlenerek PZR ile Doğrulanması

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p>Araştırma Makalesi</p> <p>Geliş : 26.09.2023 Kabul : 26.12.2023</p> <p>Anahtar Kelimeler: <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. Probiyotik mikroorganizmalar Probiyotik-prebiyotik preparatlar PZR</p>	<p>Bu çalışma, takviye olarak kullanılan probiyotik preparatların etikette belirtildiği gibi içerdiği bakterilerin canlılık ve seviyelerinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla farklı markalara ait <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> türlerini içeren toplam 15 farklı preparat temin edildi. Örnekler <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> türlerini yönünden mikrobiyolojik ekime tabii tutuldu. Yapılan mikrobiyolojik analiz sonucunda örneklerin 13'ünde (%87) canlı bakteri saptanırken 2 örnekte (%13) üreme olmadığı gözlemlendi. <i>Lactobacillus</i> spp. içeren probiyotik preparatlarda bakteri sayısı ortalama <math>5,9 \times 10^{10}</math> kob/g; <i>Bifidobacterium</i> spp. içeren probiyotik preparatlarda ise bakteri sayısının ortalama <math>1,3 \times 10^9</math> kob/g olduğu görüldü. Gram boyama, katalaz test ve karbonhidrat fermentasyon testi yapılan suşların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) analizi ile doğrulamaları yapıldı. PZR analizi sonucunda, 13 örnekte <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> türleri tespit edildi. Sonuç olarak tüketime sunulan hazır probiyotik preparatlarda belirtilen suşların varlığı, canlılığı ve miktarı oldukça önemlidir. Etiket yazılan bilgilerin doğruluk payının %87 olduğu yaptığımız çalışmamızda görüldü.</p>

<sup>a</sup> [ozenkursun@mehmetakif.edu.tr](mailto:ozenkursun@mehmetakif.edu.tr)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7680-015X>

<sup>c</sup> [erdisen@mehmetakif.edu.tr](mailto:erdisen@mehmetakif.edu.tr)

<sup>d</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4882-1276>

<sup>e</sup> [egyilmaz0@gmail.com](mailto:egyilmaz0@gmail.com)

<sup>f</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6885-4422>

<sup>g</sup> [sonertutun@cumhuriyet.edu.tr](mailto:sonertutun@cumhuriyet.edu.tr)

<sup>h</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6208-476X>



## Giriş

Sağlık; bedensel, ruhsal ve sosyal bakımdan tam bir iyilik hali olarak tanımlanmıştır (WHO, 1995). Sağlık ile beslenme arasındaki ilişki son yıllarda oldukça önemli hale gelmiştir. Tüketicinin bilinçlenmesi ile metabolik gereksinimleri karşılayan fonksiyonel gıdalar tercih edilmektedir. Bu kavram ile sadece sağlıklı beslenme değil aynı zamanda bazı hastalıklara karşı alternatif tedavi ve korunma da sağlanabilmektedir. Fonksiyonel gıdalarda bu talepleri karşılama amacıyla özellikle probiyotikler ilk sıralarda yer almaktadır. Bunun nedeni ise probiyotiklerin sindirim sisteminde kolonize olarak sağlığımız üzerine olumlu etkilerinin olmasıdır (Joint, 2007; Sanders, 2008).

Tıp alanında insan tanımı, “kabaca %10 insan hücresi, %90’ı makroskopik konağa yerleşmiş mikrobiyal hücrelerden oluşan bir süper organizmadır” şeklinde değişikliğe uğramıştır. Bu değişimle birlikte artık mikrobiyotaya terimi ve sağlıklı uzun ömrün anahtarının gastrointestinal sistemde bulunan mikrofloranın olduğu kabul görmeye başlamıştır (Anuradha ve Rajeshwari, 2005).

Mikrobiyotaya, insan vücudunda bulunan mikroorganizmaların tümü için kullanılan bir terimdir. İnsanlarda bulunan mikroorganizmaların tamamına mikrobiyotaya, mikroorganizmaların genetik materyaline isemikrobiyotom denilmektedir. Zamanla yaşam koşullarının değişimine bağlı olarak hava kirliliği, radyasyon, stres, yanlış beslenme, bilinçsiz ilaç kullanımı mikrobiyotanın üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır (Altuntaş ve Batman, 2017). Mikrobiyotanın önemli bir kısmı gastrointestinal sistem içerisinde bağırsaklarda kolonize olduğu için mikrobiyotaya ile ilgili çalışmalar gastrointestinal sistem üzerinde yoğunlaşmıştır (Aslan ve Altundış, 2017).

Vücuttaki toplam bakterilerin büyük çoğunluğu kolonda bulunmaktadır. Kolondaki bakteriler, koruyucu bir mikrofloraya sahiptir. Fakat işlenmiş gıdalar, ilaçlar, değişen beslenme alışkanlıkları ve yaşam tarzı mikrobiyotadaki dengeyi bozduğundan faydalı bakteri türlerine olan ihtiyacımız her geçen gün artmaktadır (Anuradha ve Rajeshwari, 2005).

Probiyotik kelimesi anlam bakımından günümüze kadar birçok değişikliğe uğramıştır (Gomes ve Malcata, 1999). Probiyotik kavramı ilk kez 1965 yılında Lilly ve Stillwell tarafından bir organizmanın salgıladığı ve diğer faydalı organizmaların büyümesini uyaran maddeleri tanımlamak amacıyla ortaya atılmıştır. Parker ise 1974 yılında probiyotikleri bağırsak dengesine yardım eden organizmalar olarak tanımlamıştır. Daha sonra 1989

yılında Fuller, probiyotikleri “konakçının intestinal mikroflorasının gelişimini teşvik eden canlı mikrobiyal katkı maddeleri” olarak açıklamıştır (Fuller, 1992; Sullivan ve Nord, 2002; Kaur ve ark., 2002).

Probiyotik mikroorganizmaların sağlık üzerine pek çok faydası bulunduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Bu mikroorganizmalar bağırsaklara yerleşerek normal floranın tekrar oluşmasına katkı sağlayarak, özellikle gastrointestinal problemlerde, bazı hastalıkların önlenmesinde ve tedavi sürecinde takviye olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte probiyotik mikroorganizmalar immun sistemi de aktive etmekte önemli rol oynamaktadır (Liong ve Shah, 2006).

Bağırsak mikrobiyotasının korunması ve iyileştirilmesinde bir başka yaklaşım ise fermente gıdaların tüketimine alternatif olarak probiyotik preparatların kullanılmasıdır. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan probiyotik bakteriler, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* ve *Bifidobacterium* türleridir. Bunun yanında çeşitli faydalı etkilerinden dolayı birçok mikroorganizma kullanılarak çeşitli toz ve preparat kullanımı yaygınlaşmaktadır (Dunne, 2001).

Bu çalışmada, takviye olarak kullanılan bazı preparatların içerdiği bakterilerin canlılıklarına ve bakteri yüküne bakarak etikette belirtilenlerin doğru olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

### Materyal

*Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarını içeren farklı markalara ait 15 adet probiyotik-prebiyotik preparatlar tedarik edilerek soğuk zincir altında Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı laboratuvarına getirildi. Preparatlar Laboratuvarında bulunan 15 farklı ticari probiyotik preparat, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerini içeren gruplar şeklinde ayrılarak toplamda 21 farklı grup elde edildi. Çalışmada kullanılan preparatların içerikleri Çizelge 2.’de gösterilmiştir.

### Metot

#### Örnek Alma, Suşların Çoğaltılması ve Sayımı

Çalışma için öncelikle her bir örnekten 10 g alınarak 90 ml peptonlu su ile sulandırılarak homojenizatörde (IUL Instruments Masticator, Spain) homojenize edildi. Daha sonra 9 ml peptonlu sular ile desimal sulandırmaları yapıldı.

Çizelge 1. Gıdalarda bulunan ve ilaç teknolojisinde kullanılan başlıca probiyotik türler (Young ve Huffman, 2003).

Table 1. Main probiotic species found in foods and used in pharmaceutical technology (Young and Huffman, 2003).

Mikroorganizmalar
• <i>Lactobacillus</i> spp.: <i>Lactobacillus cellobiosus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i>
• <i>Bifidobacterium</i> spp.: <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium thermophilus</i>
• <i>Bacillus</i> spp.: <i>Bacillus pumilis</i> , <i>Bacillus lentus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus coagulans</i>
• <i>Pediococcus</i> spp.: <i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>
• <i>Streptococcus</i> spp.: <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Streptococcus intermedius</i>
• <i>Bacteriodes</i> spp.: <i>Bacteriodes capillus</i> , <i>Bacteriodes suis</i> , <i>Bacteriodes ruminicola</i> , <i>Bacteriodes amylophilus</i>
• Maya ve Küfler: <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida rugulosa</i>

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan preparatların içerikleri.

Table 2. Contents of the preparations used in the study

Örnek	İçerdiği Suşlar	Canlı Mikroorganizma sayısı
1	<i>Lb.casei</i> <i>Lb. helveticus</i> R0052 <i>Bf.animalis spp lactis</i> B94 <i>Lb.acidophilus</i>	7,0×10 <sup>9</sup> kob/g
2	<i>Lb.rhamnosus</i> <i>Lb.casei</i>	5,0×10 <sup>9</sup> kob/g
3	<i>Bf.longum</i> <i>Lb.helveticus</i> <i>Bf.longum</i>	5,3×10 <sup>9</sup> kob/g
4	<i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb.acidophilu</i> <i>Lb.rhamnosus</i> <i>Lb.acidophilus</i>	1,0×10 <sup>10</sup> kob/g
5	<i>Lb.rhamnosus</i> <i>Lb.casei</i> <i>Bf.bifidum</i>	5,0×10 <sup>9</sup> kob/g
6	<i>Lb. Acidophilus</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb.casei</i>	5,0×10 <sup>9</sup> kob/g
7	<i>Lb. Rhamnosus</i> <i>Lb.plantarum</i> <i>Bf. Lactis</i>	2,0×10 <sup>9</sup> kob/g
8	<i>Bf.infantis</i>	1,0×10 <sup>9</sup> kob/g
9	<i>Bf.animalis spp lactis</i> B94	5,0×10 <sup>9</sup> kob/g
10	<i>Lb.reuteri</i>	1,0×10 <sup>8</sup> kob/g
11	<i>Lb.plantarum</i>	1,0×10 <sup>10</sup> kob/g
12	<i>Lb.rhamnosus</i>	6,0×10 <sup>9</sup> kob/g
13	<i>Lb.acidophilus</i> <i>Bf.lactis</i>	1,0×10 <sup>9</sup> kob/g
14	<i>Bf.animalis subsp.lactis</i>	1,0×10 <sup>9</sup> kob/g
15	<i>Lb.rhanosus</i> <i>Lb.reuteri</i>	1,0×10 <sup>10</sup> kob/g

*Lactobacillus spp. İzolasyonu*

*Lactobacillus spp.* içeren 12 örnek 121°C 15 dakika otoklavlanan MRS Agara (de Man Rogosa Sharpe Agar, Merck) damla plak yöntemiyle ekilerek anaerob ortamda (Anaerocoult A, Merck) 37°C'de 3 gün inkübe edildi. Daha sonra sayımları gerçekleştirilerek biyokimyasal testlere geçildi (Vinderola ve Reinheimer 1999).

*Bifidobacterium spp. İzolasyonu*

*Bifidobacterium spp.* içeren 9 örnek 118°C 15 dakika otoklavlanan MRS-NNLP Agara (de Man Rogosa Sharpe Agar-Neomycin sulfate, nalidixic acid, lithium chloride and paromomycin sulphate) damla plak yöntemiyle ekilerek anaerob ortamda (Anaerocoult A, Merck) 37°C'de 3 gün inkübe edildi. Daha sonra sayımları gerçekleştirilerek biyokimyasal testlere geçildi (Vinderola ve Reinheimer 1999).

*Gram Boyama*

Seçilen kültür temiz lam üzerine öze ile yayılarak alevde kurutuldu. Daha sonra Gram boyama işlemi yapılarak mikroskopik incelemeye alındı. Gram pozitif basil veya kokobasil şeklinde olanlar değerlendirildi (ISO 11737, 1998).

*Katalaz Testi*

Katalaz Testi için katı besiyerinde 24 saat 37 °C'de inkübe edilerek gelişimi sağlanan bakteri kolonilerin temiz bir lam üzerine steril öze yardımı ile yayılmış ve kolonilerin üzerine hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)(Merck, 107209) damlatılarak gaz çıkışının gerçekleşip

gerçekleşmediği gözlenmiştir. Gaz çıkışı görülen izolatlar katalaz-pozitif, gaz çıkışı görülmeyenler ise katalaz-negatif olarak değerlendirilmiştir. Katalaz negatif olan suşlar değerlendirmeye alındı (Arda ve ark 2006).

*Karbonhidrat Fermentasyon Testleri*

Karbonhidrat fermentasyon testi için glukoz, mannoz, laktoz ve sükroz ile hazırlanan %5'lik şeker solüsyonları ile Phenol Red Broth Base (Merck, 110987) hazırlandı. Bu amaçla steril tüp içerisine 8 ml Phenol Red Base, 2 ml şeker çözeltisi ve durhaim tüpleri eklenerek 7-14 gün 37°C'de etüvlerde inkübasyona bırakıldı. Karbonhidrat fermentasyonu sonucunda oluşan renk değişimlerine göre değerlendirme yapıldı. Karbonhidrat fermentasyon testindeglukoz, mannoz, laktoz ve sükroz şekerlerinin test sonuçlarının pozitif olanları değerlendirildi (Durlu Özkaya, 2001).

*DNA İzolasyonu*

Genomic DNA Purification Kit'i (Thermo Scientific GeneJet, K0721) kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Genomic DNA izolasyonunda yapılan işlemler kit protokolüne göre yapıldı.

*PZR Analizi*

Çalışmada *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşları için kullanılan primerler ve sekansları Çizelge 3'te gösterilmiştir. Çalışmada Gene Max Tc-S-B PZR cihazı kullanıldı.

Çizelge 3. Çalışmada kullanılan PZR primerleri.

Table 3. PCR primers used in the study.

Hedef	Primer	Sekans	bp
<i>Bifidobacterium</i>	g-Bifid-F	CTCCTGGAAACGGGTGG	549-563
	g-Bifid-R	GGTGTTCCTCCCGATATCTACA	
<i>Lactobacillus</i>	LactoF	TGGAAACAGRTGCTAATACCG	231-233
	LactoR	GTCCATTGTGGAAGATTCCC	

PZR işlemi boş ve steril olan bir tüp içerisine her bir örnekten 3 µl DNA ile birlikte 12 µl ddH<sub>2</sub>O, 0.5 µl Forward primer, 0.5 µl Reverse primer, 4 µl 5x Firepol Master Mix eklenerek toplamda 20 µlmix oluşturuldu.

Amplifikasyon işleminde; *Lactobacillus* suşları için thermal cycler'da 94°C'de 5 dk ilk denatürasyon işleminin ardından, 40 siklus 94°C'de 20 sn denatürasyon, 55°C'de 20 sn bağlama ve 72°C'de 50 sn DNA uzatma ve son olarak 72°C'de 10 dk uzatma işlemleri yapıldı (Byun ve ark., 2004). *Bifidobacterium* suşları için thermal cycler'da 94°C'de 5 dk ilk denatürasyon işleminin ardından, 40 siklus 94°C'de 20 sn denatürasyon, 55°C'de 20 sn bağlama ve 72°C'de 50 sn DNA uzatma ve son olarak 72°C'de 10 dk uzatma basamakları uygulandı (Takahiro ve ark., 2004).

#### Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez işlemi için %1,5'lük agaroz jel hazırlandı. Soğutulan jele %5 oranında Etidyum Bromür (SNP Biyoteknoloji, 18S-00) eklenen jelin katılmasından sonra her bir PZR ürününden 4 µl olacak şekilde eklenerek elektroforez işlemi (Nyx Teknik Voltronix - V37, Taiwan) uygulandı. Elektroforez işlemi bittikten sonra UV transiluminatör (UV Transiluminator TI2621D, Pacific Image Electronics, Taiwan) cihazında görüntülendi.

## Bulgular

### Preparatlardaki Suşların Varlığı ve Biyokimyasal Testleri

Çalışmada kullanılan 15 farklı preparat, içerdikleri bakteri gruplarına göre incelemeye alındı. *Lactobacillus* türleri için MRS Agara, *Bifidobacterium* türleri için MRS-NNLP Agara ekimi yapılan örneklerin 2'sinde (%87) üreme görülmedi. Geriye kalan 13 preparatın tamamında (%87) üreme görüldü. Gram boyama, katalaz ve karbonhidrat fermentasyon testi sonrasında örneklerin DNA izolasyonu yapıldı.

### DNA İzolasyonu ve PZR Analizi

*Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarını doğrulamak için öncelikle preparatların DNA izolasyonu GeneJet Genomic DNA Purification Kit protokolüne uygun olarak yapıldı. PZR analizinde Çizelge 3'te belirtilen primer dizileri kullanıldı. PZR işleminden sonra %1,5'lik agaroz jelle elektroforez işlemi uygulandı ve UV transiluminatör cihazındaki görüntüleme gerçekleştirildi. Gram boyama ve karbonhidrat fermentasyon testi sonucunda *Lactobacillus* spp. olduğu düşünülen 12 farklı örneğin tamamının *Lactobacillus* spp. olduğu saptandı. *Bifidobacterium* spp. içeren 7 farklı örneğin *Bifidobacterium* spp. olarak tespit edildi. Şekil 1a'da *Lactobacillus* suşlarını içeren örneklerin ve 1b'de ise *Bifidobacterium* suşlarını içeren örneklerin PZR sonuçlarının görünümü verilmiştir.

## Tartışma

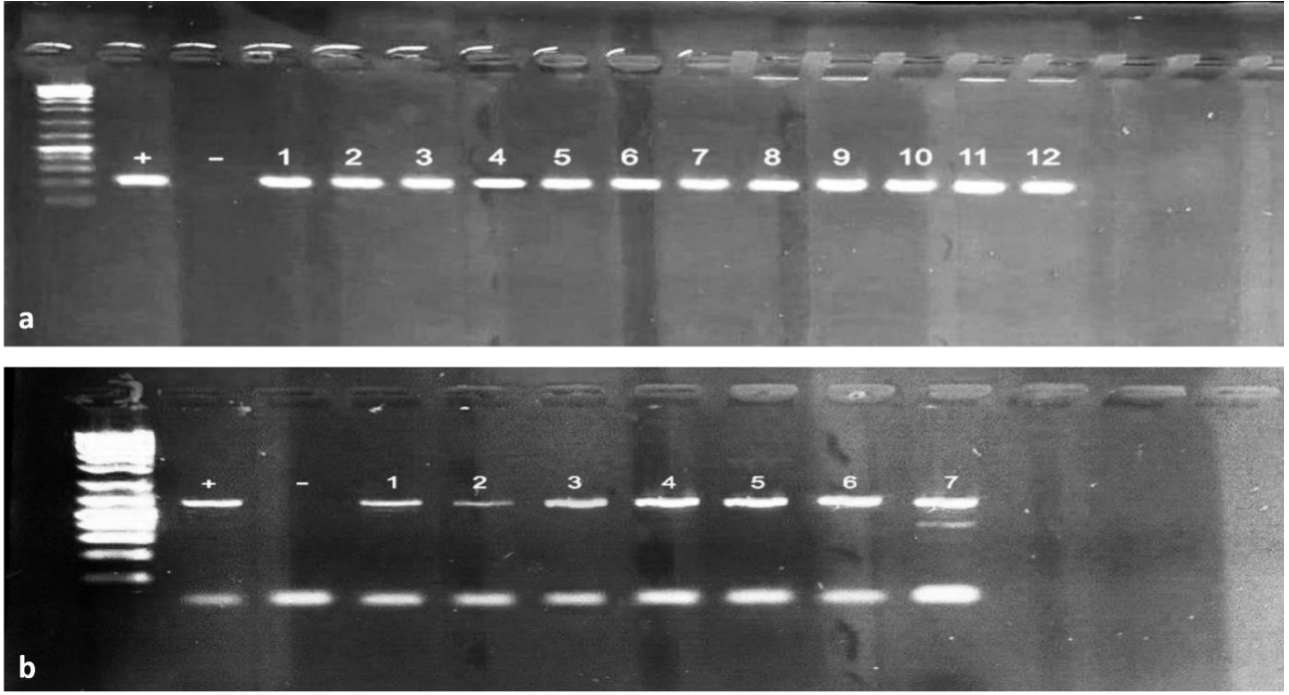
İnsanlarda bağırsak florasının şekillenme süreci doğumu takiben meydana gelmektedir. Zaman içerisinde flora kendisini geliştirmektedir. Ancak değişen yaşam şartları, stres, sık antibiyotik kullanımı, rafine ve şekerli besinlerin tüketiminin artması ile sağlıklı olan bağırsak florası değişime uğramaktadır. Sonuç olarak bireyin genel sağlık durumu da olumsuz olarak etkilenmektedir (Crook, 1992).

Günümüzde probiyotik takviyeler gıdaların yanında ayrıca hazır preparatlarla da alınmaktadır. Probiyotik bakterilerin kullanımı, kişilerin genel sağlık durumlarının iyileştirilmesi ve bazı kronik hastalıklarının tedavilerine destek olarak önerilmektedir. Bu durumun yaygınlaşması sonucunda sağlık endüstrisinde farklı miktarlarda ve farklı türde suş içeren probiyotik preparatların üretilmektedir. Son yıllarda yoğun talep sonucunda bu preparatların tüketimi artmıştır (Hill ve ark., 2014).

Probiyotik preparatların yeterli miktarda suş içermeleri ve içerdikleri suşun canlı kalması aranan en önemli özelliklerdendir. Bilinçli ya da bilinçsiz tüketilen bu preparatların yeterli ve canlı probiyotik bakterileri içerip içermediğini incelemek bu çalışmanın amacıdır. Bu amaçla temin edilen 15 farklı probiyotik preparat mikrobiyolojik yönden incelendi. Örneklerin 13'ünde (%87) probiyotik bakterilerin canlı olduğu görüldü. Ancak 2 örnekte etiket bilgisinde yazdığı gibi canlı probiyotik bakterilere rastlanılmadı.

Probiyotik preparatlarda *Lactobacillus* spp. ortalama olarak  $5,9 \times 10^{10}$  kob/g, *Bifidobacterium* spp. ise  $1,3 \times 10^9$  kob/g seviyesinde oldukları saptandı. Gram boyama, katalaz testi ve karbonhidrat fermentasyon testleri yapılan suşlar daha sonra DNA izolasyonuna tabii tutuldu. Daha sonra *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. yönünden PZR analizi ile doğrulamaları yapıldı. Sonuç olarak 13 örnekte elde edilen suşların hepsinin *Lactobacillus* spp. ve/veya *Bifidobacterium* spp. türlerine ait olduğu doğrulandı.

Ullah ve ark. (2019) Çin'den temin ettikleri *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. içeren 17 farklı probiyotik preparatın canlılıkları ve etiket içeriği üzerine yaptıkları çalışmada 5 probiyotik ürünün (%29,41) kültür ortamında daha düşük ve cansız koloni oluşturduklarını, 4 probiyotik ürünün ise (%23,52) yanlış etiketlenmiş olduğunu bildirmişlerdir. Toscano ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada İtalya ve Avrupa'da satışa sunulan tıbbi probiyotik takviyelerde canlı bakteri sayımı ve etiket bilgisinin doğruluğu üzerine yaptıkları bir çalışma sonucunda 24 örneğin 14'ünün (%58) etikette yazılan bakteri miktarını ve türünü içermediğini, 10 örneğin ise (%42) etikette belirtilen canlı bakteri miktarını içermediğini belirtmişlerdir.



+: Pozitif Kontrol -: Negatif Kontrol

Şekil 1a. *Lactobacillus* suşlarını içeren örneklerin PZR sonuçları

Şekil 1b. *Bifidobacterium* suşlarını içeren örneklerin PCR sonuçları

Figure 1a. PCR results of samples containing *Lactobacillus* strains

Figure 1b. PCR results of samples containing *Bifidobacterium* strains

Bu çalışmalarda etiket bilgisinin doğruluğunun uyuşmadığı görülmekle birlikte, yaptığımız çalışmanın sonuçlarından yüksek oldukları görülmüştür.

Patro ve ark. (2016), Amerika Birleşik Devletleri'nde yürütülen bir araştırmada 10 adet probiyotik preparatın 9'unda (%90) etiket bilgisinde yazan *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp.'nin doğru olduğunu ancak preparatların sadece birinde farklı bir bakteri grubu olan *Enterococcus* spp. varlığına rastlandığını bildirmişlerdir. Goldstein ve ark. (2014) üç farklı yerden alınan *Lb. acidophilus*, *Bf. infantis*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus GG*, *Lb. helveticus*, *Saccharomyces boulardii* içeren 5 farklı preparat üzerinde koloni sayımı gerçekleştirmişlerdir. Canlı bakteri sayısının  $9,2 \times 10^9$ - $1,3 \times 10^{10}$  kob/g olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma yapılan çalışmayla canlı probiyotik bakteri oranına paralellik göstermektedir. Ancak yaptığımız çalışmada etiket bilgisinde *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri yazılan preparatlarda farklı bir bakteri grubuna rastlanılmamıştır.

Weeseve ve Martin (2011) yaptıkları çalışmada 15 probiyotik preparat için ürün etiketleri ve bakteri sayılarını listelemişlerdir. Etiket bilgisinde bakteri seviyesinin  $10^9$  kob/g olması beklenirken bu verilere sadece 4 üründe (%27) rastladıklarını belirtmişlerdir. Marinova ve ark. (2019) Bulgaristan'da tüketilen 26 probiyotik preparat üzerinde yaptıkları çalışmada istenen  $10^8$ - $10^{10}$  kob/g bakteri sayısının sadece 10 örnekte (%38,4) uygun olduğunu belirtmişlerdir. Preparatların %11,53'ünde canlı bakteri varlığına rastlanmazken, %7,69'unda ise minimum miktarda kabul edilen  $10^2$  kob/g üreme olduğunu belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışma sadece 15 örneğin 2'sinde (%13) üreme görülmemiştir. Kalan 13 örnekte ise *Lactobacillus* spp. içeren preparatlarda ortalama  $5,9 \times 10^{10}$

kob/g, *Bifidobacterium* spp. içeren preparatlarda ise ortalama  $1,3 \times 10^9$  kob/g bakteri olduğu görülmüştür.

Drago ve ark. (2010) ABD'de yaptıkları çalışmada 13 farklı preparatın etiket bilgilerinde belirtilen türlere ait olup olmadıklarını araştırmışlardır. Yaptıkları biyokimyasal test ve doğrulamalar sonucunda 9 örneğin (%69,2) uygun olmadığını, sadece 4 örneğin (%30,7) tür çeşidi ve canlı sayımının doğru olduğunu belirtmişlerdir. Morovic ve ark. (2016) PZR doğrulamasını yaptıkları 52 farklı probiyotik preparatın 22'sinde (%42) etiket bilgisi ile uyuşmadığı, eksik veya etiket üzerinde yazmayan türlere de rastlandığını belirtmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları bizim verilerimizden daha yüksek verilere sahiptir.

Aureli ve ark. (2010) İtalya'da topladıkları 41 farklı preparatın 19'unun (%46) etiket bilgisi ile uyuşmadığı, etiket üzerinde yazan bazı türleri içermediğini bildirmişlerdir. Özellikle preparatların üzerinde *Bf. bifidum* olduğu yazılsa da yapılan biyokimyasal test ve tür belirleme sonucunda 25 preparatta (%60,9) *Bf. bifidum*'un çok düşük seviyede veya tamamen cansız olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışma ile paralellik göstermemekle birlikte çalışmamızda 15 preparatın 2'sinde (%13) canlı bakteriye rastlanılmamıştır. Kalan 13 preparattan (%87) elde ettiğimiz suşlar ise etiket bilgisinde yazan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarına ait olduğu saptanmıştır.

Bunešová ve ark. (2014) ticari olarak satılan *Bifidobacterium* suşlarını içeren 12 farklı probiyotik preparat üzerinde yaptıkları çalışmada, PZR yöntemi ile *Bifidobacterium* suşlarının etiket ile uyumlu (%100) olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmanın daha yüksek doğruluk payına sahip olduğu görülmüştür.

## Sonuç

Günümüzde “bağırsaklar ikinci beynimizdir” ifadesi popülerliğini giderek artırmaktadır. Sağlık konseptinde bağırsak sağlığı düzenli yaşamaya, sağlıklı beslenmeye bağlı olduğundan dolayı gıdaların yanında tıbbi ve destek tedavilere de yönelim artmıştır. Son yıllarda yapılan birçok çalışmada probiyotik tüketiminin başta diyare ve konstipasyon gibi sindirim zorlukları olmak üzere bazı önemli metabolik hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde oldukça faydalı etkilerinin olduğu görülmüştür. Bu bağlamda;

- Probiyotik besinlerin, yeterli ve dengeli tüketildiği bir diyet ile aktif bir yaşam tarzı bağırsak mikrobiyotasındaki yararlı bakterilerin sayısını artırmaya ve sağlığı desteklemeye yardımcı olabilir.
- Sağlıklı mikrobiyota ve sağlıklı yaşam için öncelikle bireyler beslenmelerine dikkat etmeli, zararlı alışkanlıklardan, gereksiz antibiyotik kullanımından ve stresten uzak durmalıdırlar.
- Bozulmuş bağırsak florası için uzman kişilerce önerilen ve kişiye özel olarak planlanan probiyotik takviyeleri içeren preparatların kullanımı oldukça önemlidir.
- Probiyotiklerin tüm bu faydalı etkilerine karşın takviye olarak kullanılacak preparatların gastrointestinal sistem içerisindeki canlılıkları ve güvenilirlikleri konusunda daha fazla bilgi ve çalışmaya ihtiyaç vardır.

## Finansman

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0625-YL-20 proje numarası ile desteklenmiştir

## Kaynaklar

- Altuntaş, Y., & Batman, A. (2017). Mikrobiyota ve metabolik sendrom. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*, 45(3). doi: 10.5543/tkda.2016.72461
- ANSI/AAMI/ISO. (1998). Sterilization of Health Care Products Microbiological methods-Part 2: Tests of sterility performed in the validation of a sterilization process, 11737-2.
- Anuradha, S., & Rajeshwari, K. (2005). Probiotics in health and disease. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*, 6(1), 67-72.
- Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Akay, Ö., Ilgaz, A., & Diker K. S. (2006). Özel Mikrobiyoloji. *Medisan Yayinevi*. Ankara, 5-9.
- Aslan, F. G., & ALTINDIŞ, M. (2017). İnsan mikrobiyom projesi, mikrobiyotanın geleceği ve kişiye özel tıp uygulamaları. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 1, 1-6.
- Aureli, P., Fiore, A., Scalfaro, C., Casale, M., & Franciosa, G. (2010). National survey outcomes on commercial probiotic food supplements in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), 265-273. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.016
- Bunešová, V., Vlková, E., Rada, V., Hovorková, P., Ročková, Š., & Kmet', V. (2014). Direct identification of bifidobacteria from probiotic supplements. *Czech Journal of Food Sciences*, 32(2), 132. DOI: 10.17221/291/2013-CJFS

- Byun, R., Nadkarni, M. A., Chhour, K. L., Martin, F. E., Jacques, N. A., & Hunter, N. (2004). Quantitative analysis of diverse Lactobacillus species present in advanced dental caries. *Journal of clinical microbiology*, 42(7), 3128-3136. DOI: 10.1128/JCM.42.7.3128-3136.2004
- Crook, W. (1992). Cronic Fatigue Syndrome and the Yeast Connection. Jackson, TN: Professional Books Future Healt.
- Drago L, Rodighiero V, Celeste T, Rovetto L, De Vecchi E. 2010. Microbiological evaluation of commercial probiotic products available in the USA in 2009. *Journal of Chemotherapy*, 22(6): 373-377. <https://doi.org/10.1179/joc.2010.22.6.373>
- Dunne, C. (2001). Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. *Inflammatory Bowel Diseases*, 7(2), 136-145. DOI: 10.1097/00054725-200105000-00010
- Durlu Özkaya, F. (2001). Salamura beyaz peynirden izole edilen bazı laktokok, enterekok ve laktobasil suşlarının proteolitik aktivite, bakteriyosin etkenliği ve biyogen amin oluşumu açısından karşılaştırılması.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401-1412. DOI: 10.1093/jn/125.6.1401
- Goldstein, E. J., Citron, D. M., Claros, M. C., & Tyrrell, K. L. (2014). Bacterial counts from five over-the-counter probiotics: are you getting what you paid for?. *Anaerobe*, 25, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.10.005>
- Gomes, A. M., & Malcata, F. X. (1999). Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in food science & technology*, 10(4-5), 139-157. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00033-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00033-3)
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H., & Salminen, S. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11: 506. DOI: 10.1038/nrgastro.2014.66
- Ichim, T. E., Patel, A. N., & Shafer, K. A. (2016). Experimental support for the effects of a probiotic/digestive enzyme supplement on serum cholesterol concentrations and the intestinal microbiome. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 1-9. DOI: 10.1186/s12967-016-0945-2
- Joint, F. (2007). Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo- controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(4): 1019-1021. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.12.608
- Kaur, I. P., Chopra, K., & Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 1-9. DOI: 10.1016/s0928-0987(01)00209-3
- Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147(3659), 747-748. DOI: 10.1126/science.147.3659.747
- Liong, M. T., & Shah, N. P. (2006). Effects of a Lactobacillus casei synbiotic on serum lipoprotein, intestinal microflora, and organic acids in rats. *Journal of dairy science*, 89(5), 1390-1399. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72207-X
- Manning, T. S., & Gibson, G. R. (2004). Prebiotics. *Best practice & research clinical gastroenterology*, 18(2), 287-298. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2003.10.008>
- Marinova, V. Y., Rasheva, I. K., Kizheva, Y. K., Dermenzhieva, Y. D., & Hristova, P. K. (2019). Microbiological quality of probiotic dietary supplements. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 834-841. doi/full/10.1080/13102818.2019.1621208

- Morovic, W., Hibberd, A. A., Zabel, B., Barrangou, R., & Stahl, B. (2016). Genotyping by PCR and high-throughput sequencing of commercial probiotic products reveals composition biases. *Frontiers in microbiology*, 7, 1747. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01747>
- Patro, J. N., Ramachandran, P., Barnaba, T., Mammel, M. K., Lewis, J. L., & Elkins, C. A. (2016). Culture-independent metagenomic surveillance of commercially available probiotics with high-throughput next-generation sequencing. *MSphere*, 1(2), 10-1128. DOI: <https://doi.org/10.1128/msphere.00057-16>
- R Fuller. 1992. Probiotics. The scientific basis. Home; Book. Probiotics. Authors: Roy Fuller. Roy Fuller. Intestinal Microecology Consultant, Reading, UK.
- Rastall, R. A., & Maitin, V. (2002). Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(5), 490-496. doi: 10.1016/s0958-1669(02)00365-8
- Sanders, M. E. (2008). Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical infectious diseases*, 46(2), 58-61. DOI: 10.1086/523341
- Sullivan, Å., & Nord, C. E. (2002). The place of probiotics in human intestinal infections. *International journal of antimicrobial agents*, 20(5), 313-319. DOI: 10.1016/s0924-8579(02)00199-1
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K., & Tanaka, R. (2004). Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 70(1), 167-173. doi: 10.1128/AEM.70.1.167-173.2004
- Toscano, M., Vecchi, E. D., Rodighiero, V., & Drago, L. (2013). Microbiological and genetic identification of some probiotics proposed for medical use in 2011. *Journal of Chemotherapy*, 25(3), 156-161. DOI: 10.1179/1973947812Y.0000000068
- Ullah, M., Raza, A., Ye, L., & Yu, Z. (2019). Viability and composition validation of commercial probiotic products by selective culturing combined with next-generation sequencing. *Microorganisms*, 7(7), 188. DOI: 10.3390/microorganisms7070188
- Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (1999). Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International dairy journal*, 9(8), 497-505. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00120-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00120-X)
- Weese, J. S., & Martin, H. (2011). Assessment of commercial probiotic bacterial contents and label accuracy. *The Canadian veterinary journal*, 52(1), 43.
- World Health Organization. (1995). Constitution of the world health organization. Erişim Adresi: <https://apps.who.int/gb/bd/PDF/bd47/EN/constitution-en.pdf>, [Erişim Tarihi: 26.09.2023].
- Young, R. J., & Huffman, S. (2003). Probiotic use in children. *Journal of Pediatric Health Care*, 17(6), 277-283. DOI: 10.1016/s0891-5245(03)00070-1