



**TAVUK BAĞIRSAĞI KAYNAKLI YÜKSEK EKZOPOLİSAKKARİT  
ÜRETİCİSİ *Lactobacillus salivarius*'UN METABOLİK FİLTRAT VE  
EKZOPOLİSAKKARİTLERİNİN PREBİYOTİK ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**İlknur DİNÇER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2019**

İlknur DİNÇER tarafından hazırlanan “TAVUK BAĞIRSAĞI KAYNAKLI YÜKSEK EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİCİSİ *Lactobacillus salivarius*’UN METABOLİK FİLTRAT VE EKZOPOLİSAKKARİTLERİNİN PREBİYOTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. Belma ASLİM

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

**Başkan:** Prof. Dr. Münevver ARISOY

Temel Tıp Bilimleri Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

**Üye:** Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 28/06/2019

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İlknur DİNÇER

28/06/2019

TAVUK BAĞIRSAĞI KAYNAKLI YÜKSEK EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİCİSİ  
*Lactobacillus salivarius*'UN METABOLİK FİLTRAT VE  
 EKZOPOLİSAKKARİTLERİNİN PREBİYOTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI  
 (Yüksek Lisans Tezi)

İlknur DİNÇER

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
 FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2019

ÖZET

Tavuklarda sağlığın ve verimin iyileştirilmesinde bağırsak sisteminde bulunan mikrobiyota dengesi çok önemlidir. Bu nedenle çalışmada serbest gezen köy tavuklarının bağırsağından izole edilmiş *Lactobacillus salivarius* suşlarından elde edilen ekzopolisakkaritlerin (EPS) ve kültür filtratlarının *in vitro* denemeler sonucunda tavuklarda prebiyotik yem katkı maddesi olarak kullanımının etkileri araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada yüksek EPS üreticisi olarak seçilen *L. salivarius* suşlarının EPS üretiminde etkili olabilecek farklı azot kaynakları ve sükroz kullanılan besi ortamları denenmiştir. Suşların EPS üretim kapasiteleri fenol-sülfirik asit metoduna göre belirlenmiştir. *L. salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarından, saflaştırılarak elde edilen liyofilize EPS'ler ve kültür filtratlarının farklı konsantrasyonlarının (%2,5, %5, %10) laktobasil gelişim düzenleyici (LGD) etkisi belirlenmiştir. Tavuklarda antikoksidyal olarak kullanılan salinomycinin tavuk bağırsağında bulunan ve bağırsak dengesinde rolü olan laktobasiller üzerindeki etkisi ortaya konulmuştur. *L. salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarının kültür filtratları ve liyofilize EPS'lerinin laktobasilleri koruyucu etkisi yayma kültürel sayım yöntemi ile belirlenmiş ve ayrıca adezyon üzerindeki etkisi de *in vitro* olarak HT-29 hücre hattında araştırılmıştır. *L. salivarius* BİS722 suşu, glukoz yerine sükroz eklenmiş ve tripton ile zenginleştirilmiş besiyerinde en yüksek EPS üretimini göstermiştir (801 mg/mL). EPS ve filtrat uygulamaları LGD aktivitesi göstermiş, en yüksek aktivite Filtrat<sub>BİS722</sub>'li kültür ortamında *L. reuteri* BİS612 suşunun gelişiminde belirlenmiştir (8,8 log kob/mL). LGD aktivitesindeki bu artışın ticari prebiyotik inülin uygulamasının çok üstünde (7,4 log kob/mL) olduğu dikkat çekmiştir. Antikoksidyal salinomycinin tavuk bağırsağı kaynaklı laktobasilleri inhibe ettiği ve *L. salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarının filtrat ve EPS'lerinin bu inhibasyona karşı koruyuculuk gösterdiği belirlenmiştir. *L. salivarius* BİS722 suşunun HT-29 hücresine kuvvetli adezyon gösterdiği (%90) filtrat ile uygulandığında bu adezyonun arttığı (%95) tespit edilmiştir. Sonuçlara göre *L. salivarius*'un kültür filtratları ve EPS'lerinin tavuklarda prebiyotik yem katkı maddesi olarak kullanılabileceği öngörülmüştür.

Bilim Kodu : 20309  
 Anahtar Kelimeler : Tavuk, Yem, *Lactobacillus salivarius*, Ekzopolisakkarit, Laktobasil gelişimi düzenleyici aktivite, Salinomycin, Adezyon  
 Sayfa Adedi : 97  
 Danışman : Prof. Dr. Belma ASLIM

INVESTIGATING PREBIOTIC EFFECTS  
OF METABOLIC FILTRATE AND EXOPOLISACCHARIDES OF CHICKEN  
INTESTINE ORIGINATED HIGH EXOPOLISACCHARIDE PRODUCING

*Lactobacillus salivarius*

(M. Sc. Thesis)

İlknur DİNÇER

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2019

ABSTRACT

Equilibrium of intestinal microbiota is of utmost importance to improve health and efficiency of chicken. Therefore, it was aimed to investigate the *in vitro* effects of the use of exopolysaccharides (EPS) and culture filtrates obtained from *Lactobacillus salivarius* strains isolated from free-range village chickens intestine as feed additives for chickens. This study used nutrient media using different nitrogen sources and sucrose that may affect EPS production of *L. salivarius* selected as high-yield EPS producer. EPS production capacities of the strains were determined according to the phenol-sulphuric acid method. We determined the growth effect (LGS) of different concentrations (2.5%, 5%, 10%) of lyophilized EPSs and culture filtrates isolated from *L. salivarius* BIS312 and BIS722 strains on *Lactobacillus* stimulation. We revealed the effects of salinomycin, used as anticoccidial in chicken, on lactobacilli which are found in chicken intestines and have a role on intestinal equilibrium. The protective action of culture filtrates and lyophilized EPSs of *L. salivarius* BIS312 and BIS722 strains was determined using the smear cultural counting method, and its effect on adhesion was also studied in vitro on HT-29 cell line. *L. salivarius* BIS722 strain yielded its highest EPS production (801 mg/mL) in a nutrient medium added with sucrose instead of glucose and enriched with tripton. EPS and filtrate applications showed LGS activity, the highest of which (8.8 log kob/mL) was determined in the development of *L. reuteri* BIS612 strain in a culture medium with Filtrate<sub>BIS722</sub>. It is noteworthy that this increase in LGS activity was much higher (7.4 log kob/mL) than that occurring with commercial prebiotic inulin application. It was demonstrated that anticoccidial salinomycin inhibited lactobacilli of chicken of intestine origin; the filtrates and EPSs of *L. salivarius* BIS312 and BIS722 strains showed protective activity against this inhibition. It was also noted that *L. salivarius* BIS722 strain showed strong adhesion (90%) to HT-29 cell, which was further increased (95%) when used with the filtrate. These results suggest that the culture filtrates and EPSs of *L. salivarius* could be used as prebiotic forage additives for chicken.

Science Code : 20309  
Keywords : Chicken, Forage, *Lactobacillus salivarius*, Exopolisaccharide, Lactic acid growth stimulation activity, Salinomycin, Adhesion  
Page Number : 97  
Supervisor : Prof. Dr. Belma ASLIM

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tamamlanmasına kadar geçen süre içinde bana büyük bir sabır ve anlayış ile destek olan, yardımlarını esirgemeyen, her türlü araştırma olanağını sağlayan, bilgi ve deneyimleri ile çalışmama yön veren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Belma ASLİM'a en içten saygılarımı sunar ve teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimleri ile her türlü desteği sağlayan Sayın Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübesiyle yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Ümmügülsüm TÜKENMEZ EMRE'ye teşekkürlerimi sunarım. Beni bugünlere getiren, maddi ve manevi her türlü desteğiyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan ve emeklerini asla ödeyemeyeceğim, kendimi bana her zaman çok şanslı olduğumu hissettiren en büyük desteğim başta sevgili babam Mahmut DİNÇER olmak üzere sevgili aileme ve gerek tez çalışmalarımın yürütülmesi sırasında gerekse hayatta karşılaştığım her türlü zorlukta yanımda olan, dostluğunu ve desteğini esirgemeyen, yanımda olduğunu her zaman bana hissettiren sevgili dostum Seda BİKİRİÇ'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması TAGEM/15/AR-GE/40 projesi tarafından desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırma ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım. Bu projenin hazırlanması ve yürütülmesinde değerli bilgi ve deneyimleri ile katkı sağlayan Sayın Prof. Dr. Kadri Zafer KARAER'e ve proje süresince her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Mustafa ULUDAĞ'a ve proje çalışmalarına desteklerinden dolayı Bilyem Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                    | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET .....                                                                                         | iv    |
| ABSTRACT .....                                                                                     | v     |
| TEŞEKKÜR .....                                                                                     | vi    |
| İÇİNDEKİLER.....                                                                                   | vii   |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ .....                                                                         | x     |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....                                                                           | xi    |
| RESİMLERİN LİSTESİ.....                                                                            | xii   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                                                                      | xiii  |
| 1. GİRİŞ.....                                                                                      | 1     |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....                                                                         | 9     |
| 2.1. Probiyotikler ve Etki Mekanizmaları.....                                                      | 9     |
| 2.1.1. Hayvan beslenmesinde probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar .....                   | 10    |
| 2.1.2. Hayvan beslenmesinde probiyotiklerin yem katkı maddesi olarak kullanılması ve etkileri..... | 11    |
| 2.1.3. Tavuk mikrobiyotası ve mikrobiyotaya probiyotiklerin etkileri.....                          | 14    |
| 2.1.4. Tavuk yemlerinde kullanılan probiyotik katkı maddeleri.....                                 | 15    |
| 2.1.5. Tavuk probiyotik katkı maddelerinin performans ve sağlık üzerine etkileri .....             | 16    |
| 2.2. Prebiyotikler ve Etki Mekanizmaları .....                                                     | 18    |
| 2.2.1. Hayvan beslenmesinde prebiyotik olarak kullanılan katkıları.....                            | 19    |
| 2.2.2. Hayvan beslenmesinde prebiyotiklerin yem katkı maddesi olarak kullanılması ve etkileri..... | 19    |
| 2.2.3. Tavuk yemlerinde kullanılan prebiyotik katkı maddeleri .....                                | 21    |
| 2.2.4. Tavuk prebiyotik katkı maddelerinin performans ve sağlık üzerine etkileri .....             | 22    |



|                                                                                                                                                                                                                                       | <b>Sayfa</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 2.3. Sinbiyotikler.....                                                                                                                                                                                                               | 24           |
| 2.4. Ekzopolisakkaritler (EPS).....                                                                                                                                                                                                   | 25           |
| 2.4.1. EPS'nin prebiyotik olarak kullanımı .....                                                                                                                                                                                      | 27           |
| 2.4.2. EPS'lerin laktik asit bakterilerinin gelişimini düzenleyici (LGD) etkisi.....                                                                                                                                                  | 28           |
| 2.5. Filtratların Laktik Asit Bakterilerinin Gelişimini Düzenleyici (LGD) Etkisi...                                                                                                                                                   | 29           |
| 2.6. Tavuk Yemlerinde Kullanılan Antikoksidiyal Katkı Maddeleri .....                                                                                                                                                                 | 30           |
| 2.7. Tavuk Yemlerinde Antibiyotik Kullanımına Genel Bakış .....                                                                                                                                                                       | 32           |
| 3. MATERYAL VE METOT .....                                                                                                                                                                                                            | 35           |
| 3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler.....                                                                                                                                                                                             | 35           |
| 3.2. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı .....                                                                                                                                                                                           | 35           |
| 3.3. Çalışmada Kullanılan Besiyeri .....                                                                                                                                                                                              | 35           |
| 3.4. Çalışmada Kullanılan Laktobasillerin Geliştirilmesi ve Muhafazası .....                                                                                                                                                          | 36           |
| 3.5. Laktobasillerin Kültür Ortamında EPS Üretimlerinin Belirlenmesi.....                                                                                                                                                             | 37           |
| 3.6. EPS'lerin Kültür Ortamından Kısmi Saflaştırılması ve Lizofilizasyonu.....                                                                                                                                                        | 38           |
| 3.7. L-EPS'lerin Fenol Sülfirik Asidi Metodu İle EPS Miktar Tayini .....                                                                                                                                                              | 39           |
| 3.8. Kültür Ortamındaki EPS'ler İle L-EPS'lerin EPS Miktarları Karşılaştırılması .....                                                                                                                                                | 39           |
| 3.9. Farklı Azot Kaynakları ve Sükroz Kombinasyonlarının <i>L. salivarius</i> Suşlarında EPS Üretim Miktarı Üzerine Etkisi .....                                                                                                      | 40           |
| 3.10. <i>L. salivarius</i> BİS820 ve <i>L. reuteri</i> BİS612 Suşlarının Gelişim Eğrilerinin Belirlenmesi .....                                                                                                                       | 41           |
| 3.11. L-EPS'lerin Laktobasiller Tarafından Fermente Edilmesi .....                                                                                                                                                                    | 41           |
| 3.12. <i>L. salivarius</i> BİS312 ve BİS722 Suşlarının Kültür Filtratları ve L-EPS'lerinin <i>L. salivarius</i> BİS820 ve <i>L. reuteri</i> BİS612 Suşları Üzerinde Laktobasil Gelişim Düzenleyici (LGD) Etkisinin Belirlenmesi ..... | 42           |
| 3.13. Antikoksidiyal Yem Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Salinomycinin Laktobasiller Üzerine Etkisinin Belirlenmesi .....                                                                                                             | 43           |
| 3.14. Laktobasil ve Sinbiyotiklerin Adezyon Özelliklerinin Belirlenmesi.....                                                                                                                                                          | 44           |

|                                                                                                                                                                                                                    | <b>Sayfa</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.15. İstatistiksel Analizler .....                                                                                                                                                                                | 46           |
| <b>4. DENEYSEL BULGULAR.....</b>                                                                                                                                                                                   | <b>47</b>    |
| 4.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler.....                                                                                                                                                                          | 47           |
| 4.2. Bakteri Kültürlerinin ve Liyofilizelerinin EPS Miktarları.....                                                                                                                                                | 48           |
| 4.3. Farklı Azot Kaynaklarının ve Sükrozun <i>L. salivarius</i> Suşlarında EPS Üretimi Üzerine Etkisi .....                                                                                                        | 48           |
| 4.4. Tripton ve Sükroz Kombinasyonlu MRS Besi Ortamının <i>L. salivarius</i> Suşlarında EPS Üretimi Üzerine Etkisi .....                                                                                           | 50           |
| 4.5. <i>L. salivarius</i> BİS820 ve <i>L. reuteri</i> BİS612 Suşlarının Gelişim Eğrileri .....                                                                                                                     | 50           |
| 4.6. Prebiyotik Olarak Kullanılma Potansiyeli Kapsamında <i>L. salivarius</i> Suşlarından Elde Edilen EPS'lerin Tavuk Bağırsağında Dominant Olan Laktobasil Türleri Tarafından Fermente Edilebilme Kapasitesi..... | 51           |
| 4.7. <i>L. salivarius</i> Suşlarından Elde Edilen L-EPS <sub>BİS312</sub> ve L-EPS <sub>BİS722</sub> 'nin Laktobasil Gelişimini Düzenleyici (LGD) Etkisinin Belirlenmesi.....                                      | 52           |
| 4.8. <i>L. salivarius</i> Suşlarından Elde Edilen Filtrat <sub>BİS312</sub> ve Filtrat <sub>BİS722</sub> 'nin Laktobasil Gelişimini Düzenleyici (LGD) Etkisinin Belirlenmesi.....                                  | 54           |
| 4.9. Antikoksidiyal Salinomycinin Laktobasil ve Sinbiyotikler Üzerine Etkisinin Belirlenmesi .....                                                                                                                 | 55           |
| 4.10. Laktobasil ve Sinbiyotiklerin Adezyon Özellikleri .....                                                                                                                                                      | 58           |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>                                                                                                                                                                                            | <b>61</b>    |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>                                                                                                                                                                                   | <b>71</b>    |
| KAYNAKLAR.....                                                                                                                                                                                                     | 73           |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                                                                                                                                                      | 97           |

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge                                                                                                                                                                                                     | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 2.1. Probiyotiklerin tavuklarda performans ve sağlık üzerine etkileri.....                                                                                                                          | 17    |
| Çizelge 2.2. Tavuk prebiyotiklerinin performans ve sağlık üzerine etkileri.....                                                                                                                             | 22    |
| Çizelge 3.1. MRS broth besiyeri içeriği.....                                                                                                                                                                | 36    |
| Çizelge 3.2. MRS besiyerinin zenginleştirilmesinde kullanılan azot kaynakları çeşitleri ve oranları ile sükroz oranı.....                                                                                   | 40    |
| Çizelge 4.1. Suşların kültür ortamı ve liyofilizasyon sonrası EPS miktarları. ....                                                                                                                          | 48    |
| Çizelge 4.2. Farklı azot ve karbon kaynaklarının kültür ortamında laktobasillerde EPS üretimi (mg/L) üzerine etkisi .....                                                                                   | 49    |
| Çizelge 4.3. Farklı azot ve karbon kaynağı kombinasyonlarının kültür ortamında laktobasillerde EPS üretimi (mg/L) üzerine etkisi.....                                                                       | 50    |
| Çizelge 4.4. Laktobasillerin BİS312 ve BİS722 suşlarından elde edilen L-EPS'yi fermente edebilme kapasiteleri .....                                                                                         | 52    |
| Çizelge 4.5. L-EPS <sub>BİS312</sub> ve L-EPS <sub>BİS722</sub> 'nin <i>L. reuteri</i> BİS612 ve <i>L. salivarius</i> BİS820 suşları üzerine laktobasil gelişimi düzenleyici etkisi. ....                   | 53    |
| Çizelge 4.6. Laktobasillerden elde edilen kültür filtratlarının laktobasil gelişimi düzenleyici etkisi. ....                                                                                                | 55    |
| Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyonlarda salinomycinin <i>L. salivarius</i> BİS312 ve BİS722 suşlarının canlılığı üzerine etkisi .....                                                                        | 57    |
| Çizelge 4.8. <i>L.salivarius</i> BİS722 suşu ve sinbiyotik ( <i>L.salivarius</i> BİS722 suşu ve L-EPS <sub>BİS722</sub> ile Filtrat <sub>BİS722</sub> ) uygulamasının HT-29 hücresine adezyon yeteneği..... | 58    |

**ŞEKİLLERİN LİSTESİ**

| <b>Şekil</b>                                                                                                            | <b>Sayfa</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Şekil 3.1. Glukoz standart eğrisi .....                                                                                 | 38           |
| Şekil 4.1. <i>L. salivarius</i> BİS820 suşu (solda) ile <i>L. reuteri</i> BİS612 suşunun (sağda) gelişim eğrileri ..... | 51           |

## RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim                                                                                                                                                                                                                                           | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Resim 3.1. Boş vial görüntüsü (solda), liyofilizasyon sonrası vialde toz haline getirilen <i>L. salivarius</i> BİS722 suşunun L-EPS görüntüsü (sağda).....                                                                                      | 39    |
| Resim 3.2. Adezyon deneyinde kullanılan HT-29 hücre hattı.....                                                                                                                                                                                  | 45    |
| Resim 4.1. Çalışmadan kullanılan <i>L. salivarius</i> suşunun ışık mikroskopundaki görüntüsü (100X). ....                                                                                                                                       | 47    |
| Resim 4.2. <i>L. salivarius</i> BİS722 suşuna ait probiyotiğin (A), bu suşun L-EPS <sub>BİS722</sub> (B) ve Filtrat <sub>BİS722</sub> (C) ile kombinasyonunun HT-29 hücrelerine adezyon yeteneklerinin ışık mikroskobu görüntüleri (100X). .... | 59    |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Çalışmada kullanılan simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| <b>Simgeler</b> | <b>Açıklamalar</b>    |
|-----------------|-----------------------|
| %               | Yüzde                 |
| μL              | Mikrolitre            |
| μm              | Mikrometre            |
| °C              | Santigrat derece      |
| Da              | Dalton                |
| g               | Gram                  |
| kcal            | Kilokalori            |
| kg              | Kilogram              |
| L               | Litre                 |
| mg              | Miligram              |
| mL              | Mililitre             |
| pH              | Asitlik bazlık birimi |
| $\alpha$        | Alfa                  |
| $\beta$         | Beta                  |
| $\gamma$        | Gama                  |

| <b>Kısaltmalar</b> | <b>Açıklamalar</b>                                               |
|--------------------|------------------------------------------------------------------|
| ADI                | Adezyon İndeksi                                                  |
| AR-GE              | Araştırma-Geliştirme                                             |
| ATCC               | Amerikan Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)   |
| bkz                | Bakınız                                                          |
| cfu                | Koloni Oluşturan Birim (Colony forming unit)                     |
| CO <sub>2</sub>    | Karbondioksit                                                    |
| dk                 | Dakika                                                           |
| DMEM               | Dulbecco's Modified Eagle Medium                                 |
| EFSA               | Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority) |
| EPS                | Ekzopolisakkarit (Extracellular Polymeric Substance)             |

| <b>Kısaltmalar</b> | <b>Açıklamalar</b>                       |
|--------------------|------------------------------------------|
| <b>FAO</b>         | Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü |
| <b>FOS</b>         | Fruktooligosakkaritler                   |
| <b>GOS</b>         | Galaktooligosakkarit                     |
| <b>HePS</b>        | Heteropolisakkarit                       |
| <b>HoPS</b>        | Homopolisakkarit                         |
| <b>IgA</b>         | İmmünoglobulin A                         |
| <b>IgG</b>         | İmmünoglobulin G                         |
| <b>kob</b>         | Koloni Oluşturan Birim                   |
| <b>KZYA</b>        | Kısa Zincirli Yağ Asitleri               |
| <b>L-EPS</b>       | Liyofilize Ekzopolisakkarit              |
| <b>LGD</b>         | Laktobasil Gelişimi Düzenleyicisi        |
| <b>MOS</b>         | Mannanoligosakkarit                      |
| <b>MRS</b>         | De Man Rogosa and Sharp                  |
| <b>N</b>           | Azot                                     |
| <b>NK</b>          | Doğal Öldürücü (Natural killer)          |
| <b>OD</b>          | Optik Yoğunluk (Optical Density)         |
| <b>PBS</b>         | Tuzlu Fosfat Tamponu                     |
| <b>ppm</b>         | Milyonda bir (Parts per million)         |
| <b>rpm</b>         | Dakikada Devir Sayısı                    |
| <b>SD</b>          | Standart Sapma                           |
| <b>SF</b>          | Serum Fizyolojik                         |
| <b>sn</b>          | Saniye                                   |
| <b>sp</b>          | Tür                                      |
| <b>spp</b>         | Türler                                   |
| <b>subsp</b>       | Alttür                                   |
| <b>T</b>           | Timüs                                    |
| <b>TAGEM</b>       | Tarımsal Araştırma Genel Müdürlüğü       |
| <b>TCA</b>         | Trikloraasetik asit                      |
| <b>vb</b>          | Ve Benzeri                               |
| <b>WHO</b>         | Dünya Sağlık Örgütü                      |

## 1. GİRİŞ

Günümüzdeki modern tavukçuluk işletmelerinin birçoğu kanatlılar için sınırlı ve dar alanlardan oluşmaktadır. Tavuklar, çevre koşullarına karşı oldukça duyarlı olduklarından dolayı bu tür ortamlarda en küçük bir verim artışı dahi sürüler söz konusu olduğunda işletmeler için büyük ekonomik yararlar sağlayabilir. Bu nedenle işletmelerde tavuklardan yüksek verim elde etmek için, tavukların sağlık sistemlerini korumanın yanı sıra tavukların yemden yararlanma yeteneğinin de üst düzeye çıkarılması gerekmektedir. Bu yönde geliştirilen en önemli uygulamalardan biri yem katkı maddeleridir (Kılıç ve Şimşek, 2008; Kocabağlı ve Alp, 2015; Gao ve diğerleri, 2017).

Kanatlı sektöründe kullanılan yem katkı maddeleri ve karma yemin yapısı, bakteriyal gelişimin potansiyel substratları olduğu için kanatlı sindirim sistemi mikrobiyotasının en güçlü belirleyicisidir. Sindirim sistemi mikrobiyotasının, kanatlıların gelişimi ve sağlığı üzerine önemli bir etkiye sahip olduğu ve yem değişimleriyle bu mikrobiyotanın değiştirilebileceği kabul edilmektedir (Knarreborg, Simon, Engberg, Jensen ve Tannock, 2002; Rinttilä ve Apajalahti, 2013). Tavuk bağırsak sistemi çok çeşitli mikrobiyotaya sahiptir. Bu mikrobiyotada gıdaların parçalanmasına ve sindirilmesine yardımcı olan 900'den fazla bakteri türü bulunmaktadır (Apajalahti, Kettunen ve Graham 2004; Wei, Morrison ve Yu 2013). Tavuklarda büyüme ve sağlığın iyileştirilmesinde bağırsak sisteminde bulunan mikrobiyal popülasyon dengesinin önemi çok büyüktür. Tavuk bağırsak mikrobiyotasında bulunan patojen ve yararlı bakteriler potansiyel olarak konağın hem beslenmesini hem de sağlığını önemli ölçüde etkiler. Patojen bakteriler, konakçı sağlığının üzerinde toksik ve kanserojen maddeler üretmek, immün sistemi bozmak gibi zararlı etkilere neden olurlar. Yararlı bakterilerin ise, rekabetçi dışlama ile patojen mikroorganizmaların inhibisyonunu sağlamak, gıdaların sindirebilirliğini artırmak, immün sistemi güçlendirmek, antitümör ve antikanserojen etkiler göstermek gibi konakçı sağlığının üzerinde birçok yararlı etkileri vardır (Rastall ve diğerleri, 2005; Poorghasemi, Chamani, Mirhosseini, Sadeghi ve Seidavi, 2018).

Biyoteknoloji alanındaki hayvan beslenmesi gelişmelerine paralel olarak, yemden yararlanmayı ve buna bağlı olarak verimi artırmak amacıyla kanatlı karma yemlerinde çeşitli yem katkı maddeleri kullanılmaktadır. Uzun zamandan beri kanatlı sektöründe antibiyotikler, hayvanı infeksiyöz hastalıklara karşı korumak, büyümeyi teşvik ve yemden



yararlanmayı arttırmak amacıyla yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Karademir ve Karademir 2003; Hashemi ve Davoodi, 2010). Kanatlı karma yemlerinde kullanılan antibiyotiklerin, kanatlıların sindirim sistemindeki patojen bakterilerin yanı sıra yararlı bakterileri de öldürdüğü, uzun süre kullanılmaları durumunda birçok antibiyotiğe karşı dirençli bakteri suşlarının oluşmasına yol açtığı, bu direncin bir bakteriden diğerine taşınmasına ve buna bağlı olarak hastalıkların önlenmesinde kullanılan antibiyotiklere karşı çapraz direnç oluşmasına neden olduğu ayrıca hayvansal ürünlerde kalıntı yapmasından dolayı uzun vadede insan sağlığını da tehdit edebileceği gerekçeleri ile birçok ülkede yem katkı maddesi olarak kullanılması yasaklanmıştır. Bu nedenlerden dolayı kanatlı karma yemlerinde antibiyotik kullanımına getirilen kısıtlamalar ve yasaklar sonucunda, kanatlılarda sağlıklı bağırsak mikrobiyota gelişimine yönelik çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda araştırmacılar, verim arttırıcı antibiyotiklere alternatif kullanılabilecek koruyucu yem katkı maddeleri geliştirilmesi ve keşfine yönelik çalışmalara yoğunlaşmıştır. Bağırsak mikrobiyotasını olumlu yönde etkilemeleri, hayvanlarda yemden yararlanmayı arttırarak gelişmeyi teşvik etmeleri ve hayvan sağlığına zararlı olmamaları gibi özellikleri ile probiyotikler ve prebiyotikler gibi biyoteknolojik ürünler, antibiyotiklere karşı alternatif yem katkı maddeleri olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Darabighane ve Nahashon, 2014; Çağrı ve Bingöl, 2015; Tüzün ve Çiftçi, 2010; Thibodeau ve diğerleri, 2015; Gao ve diğerleri, 2017; Magnoli ve diğerleri, 2017; Aureli ve diğerleri, 2018).

Probiyotikler, konağın sağlığı üzerinde yararlı etkilerinden dolayı alternatif biyoteknolojik ürünlerdir. Bunlar, sindirim kanalında mikrobiyota dengesini düzenlemek, yerli mikrobiyotanın özelliklerini iyileştirmek, patojenlerin çoğalmasını önlemek, yemden yararlanmayı arttırmak ve gelişimi teşvik etmek amacıyla kanatlılarda yem katkı maddesi olarak kullanılan, yararlı bakteri kültürlerinden oluşmaktadır (Alp ve Kahraman 1996). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), güvenli kabul edilmelerinden dolayı 100'ün üzerinde mikroorganizmayı probiyotik olarak değerlendirmiş, yem ve gıda katkısı olarak kullanımına izin vermiştir (Kum ve Sekkin, 2012). Ticari yem katkı maddesi olarak kullanılan bu mikroorganizmaların başında *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*'lar gelmektedir. Laktik asit bakterilerinin patojen mikroorganizmaları inhibe etmek, bağışıklık sistemini güçlendirmek, antitümör, antikansorejen, antifungal, antimikrobiyal ve antioksidan etkiler göstermek gibi hayvan sağlığını iyileştirici birçok etkisi bulunmaktadır (Angmo, Kumari ve Bhalla, 2016; Üstündağ ve Özdoğan 2017; Bulut Albayrak, 2017; Del

Carmen ve diğerkleri, 2017). Hayvanlarda verim ve performanstaki olumlu etkisi belirlenen alternatif yem katkı maddelerinden probiyotiklerin (bakteri, mantar ve maya) kullanılabilirliğı üzerine birçok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Etlik piliçlerde probiyotik kullanımı üzerine yapılan çalışmalarda yemlerde probiyotik kullanımının yemden yararlanmayı arttırarak canlı ağırlığında artış sağladığı ve bağırsaklarda *Lactobacillus* grubu bakterilerin sayısını artırırken koliform grubu bakteri sayısını azalmasına neden olmak suretiyle bağırsak mikrobiyotasını iyileştirdiğı bildirilmiştir (Jin ve diğerkleri 1998; Stanley, Hughes ve Moore, 2014; Wang ve diğerkleri, 2018).

Probiyotik mikroorganizmaların hayvanlarda yem katkı maddesi olarak kullanılmasının bahsedilen tüm yararlı etkilerine rağmen karma yemlerde kullanılmasında pek çok aşamada dikkat edilmelidir. Probiyotikler, özellikle de *Lactobacillus* cinsine ait bakteriler ortam koşullarına oldukça duyarlı olmalarından dolayı probiyotiklerin yeme katılması ve saklanması esnasında uzun süre canlılıklarını koruyabilmelerinin sağlanması zor bir işlemdir. Probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarının korunabilmesi için saklama koşullarına, yem işleme tekniklerine, karma yeme katılan diğerk yem katkı maddeleri ile etkileşimine, kullanılan taşıyıcının özelliğine ve ortamın pH'sına dikkat edilmelidir. Ticari probiyotik preparatları toz, granül, pelet, sıvı süspansiyon, kapsül gibi değişik şekillerde hazırlanmaktadır. Probiyotik katkıların 22-25 °C'de ve kuru yerde saklanmaları gerekmektedir. Saklama sıcaklığı 30°C'nin üzerine çıktığında bakteriler canlılıklarını kaybetmektedirler ve bu da hayvanın yemden yararlanmasını olumsuz yönde etkileyerek ekonomik kayıplara neden olabilir. Ayrıca yaygın olarak kullanılan buharla peletleme ve ekstrüzyon işlemleri gibi yem işleme teknikleri esnasında probiyotikler canlılıklarını büyük oranda kaybetmektedirler. Probiyotik ve antibiyotiklerin karma yeme birlikte katılma durumunun olduğu zamanlarda beraber kullanılan bakterinin türüne ve birlikte verildiğı antibiyotiğe karşı dirençli olmasına dikkat edilse bile probiyotik bakterilerden özellikle laktik asit bakterilerinin taşıdığı direnç genlerini, patojenlere aktarabilme potansiyeli olduğundan hayvan sağlığı açısından tehdit oluşturabileceğı düşünülmektedir. Bütün bu durumlar dikkate alındığında yem katkı maddesi olarak probiyotik bakterilerin kullanılması her zaman stabil sonuçlar vermez. Bu nedenle hayvanlarda yem katkı maddesi olarak probiyotiklere alternatif, bilinen yan etkileri olmayan ve yüksek sıcaklıklar gibi ekstrem çevre koşullarına daha dayanıklı biyoteknolojik ürünler olan prebiyotiklerin kullanımının önemi artmaktadır (Markowiak ve Ślizewska, 2018; Gutiérrez, David,

Montoya ve Betancur, 2016; Kiczorowska, Samolińska, Al-Yasiry, Kiczorowski ve Winiarska-Mieczan, 2017).

Prebiyotikler, kolondaki bir veya sınırlı sayıdaki bakterinin aktivitesini ve/veya gelişimini seçici olarak uyaran ve bağırsakta enteropatojen olmayanların kolonizasyonunu kolaylaştırarak, konakçı sağlığını olumlu yönde etkileyen, fermente olabilen karbonhidratlardır (Gibson ve Roberfroid, 1995; Bindels, Delzenne, Cani ve Walter, 2015). Prebiyotikler bağırsaktaki *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi yararlı bakteriler tarafından seçici olarak kullanılırken, toksin üreten *Clostridium*'lar, proteolitik *Bacteriodes*'ler ve toksijenik *Escherichia coli* ile *Campylobacter jejuni* gibi potansiyel patojenlerin çoğalmasını engellemektedir. Prebiyotikler, probiyotiklerin alternatifi veya kofaktörleridir. Prebiyotiklerin, sindirim sistemindeki yararlı bakterilerin gelişimini teşvik etmesi ve çevre koşullarına daha dayanıklı olması gibi nedenlerden dolayı probiyotiklerden daha etkili olduğu söylenebilmektedir. Bu bağlamda prebiyotiklerin hayvanların bağırsak mikrobiyotasında kolonik ve sistemik sağlığı iyileştirdiği, hayvan verim ve performans özelliklerini arttırdığına yönelik birçok çalışma mevcut olduğundan prebiyotikler, son yıllarda yem katkı maddesi olarak kullanılan biyoteknolojik ürünlerin başında gelmektedir ve bu kapsamda yapılan çalışmalar her geçen gün artmaktadır (Saad, Delattre, Urdaci, Schmitter ve Bressollier, 2013; Świątkiewicz, Swiatkiewicz, Arczewska-Wlosek ve Jozefiak 2015; Sarangi ve diğerleri, 2016; Abdel-Hafeez, Saleh, Tawfeek, Youssef ve Abdel-Daim, 2017; Siwek ve diğerleri, 2018). Kanatlılarda hastalıklardan koruma ve büyümeyi teşvik amacıyla sindirim sistemi mikrobiyota üyelerinden oluşan yem katkı maddelerinin kullanımı güncellik kazanmıştır. Özellikle *Lactobacillus* türlerinden oluşan (*Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*) bu yem katkı maddeleri sindirim ve absorpsiyonu kolaylaştırarak büyümeyi teşvik ettiği ve ayrıca epitel yüzeylerde koloni oluşturarak patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Jahromi ve diğerleri, 2016; Shokryazdan ve diğerleri, 2017; Chen, Chen ve Wang, 2017). Bunların yanında laktik asit bakterilerinin EPS'sinin gastrointestinal sistemde, probiyotik mikroorganizmaların gelişimini ve aktivitesini arttırmak gibi doğrudan ya da dolaylı olarak prebiyotik rolü olduğu bildirilmektedir (Welman ve Maddox, 2003; Singh, Saini ve Kennedy, 2008). Tavuklarda prebiyotiklerin sağlık açısından yararları konusunda giderek artan kanıtlar bulunmasına rağmen, mikrobiyal kaynaklı ekzopolisakkaritlerden (EPS) prebiyotik olarak geliştirilen bir ürün olmadığı gibi tavuklarda da prebiyotik yem katkı maddesi olarak kullanımı ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bağırsak

mikrobiyotasının dengelenmesinde bir başka yaklaşım ise probiyotiklerin prebiyotikler ile birlikte kullanıldığı besin ya da katkı maddeleri olarak tanımlanan sinbiyotiklerin kullanılmasıdır. Sinbiyotiklerin, probiyotiklerin yerine kullanılmasının temel sebebi, probiyotiklerin tek başına prebiyotik bir besin olmaksızın sindirim sisteminde hayatta kalmalarının zor olmasıdır. Probiyotik mikroorganizmaların, prebiyotik besinler olmadan sindirim sistemindeki düşük pH, oksijen ve sıcaklığa karşı dayanıklılıkları büyük oranda azalmaktadır. Bunun yanında, yerine geçebilecek diğer bakterilerle de rekabet etme düzeyi düşmektedir. Yarattığı bu sinerjik etkiden dolayı sinbiyotik ürünler tek başına probiyotikten veya bir prebiyotikten daha iyi verim sağlamaktadırlar. Sinbiyotik kavramı, *in vitro* ve *in vivo* deneylerde probiyotiklerin canlı kalabilme özelliklerinin geliştirilmesi ve hayvan sindirim sistemindeki mikrobiyotanın modüle edilmesi amacıyla geniş ölçüde incelenmiştir. Probiyotik ve prebiyotiklerin birlikte kullanımı antikör üretimini artırarak hayvan sağlığını olumlu yönde etkileyebileceğine dair yapılmış çalışmalar mevcuttur. Etlik piliç yemlerinde probiyotik ve prebiyotiğin yalnız ve birlikte kullanıldığı bir çalışmada, bu katkıların, kontrol grubuna göre yemden yararlanmayı artırdığı bildirilmiştir (Savage, Cotter ve Zakrzewska, 1996; Liong ve Shah, 2005; Midilli ve diğerleri, 2008; Mohammed, Jacobs, Murugesan ve Cheng, 2018).

Bu bakımdan önemli hale gelen prebiyotikler ile yapılan çalışmalardan frukto-oligosakkaritler (FOS), mannanoligosakkarit (MOS), galaktooligosakkarit (GOS) ve inülin öne çıkmaktadır (Alataş, Gürbüz ve Balevi, 2010; Yalçınkaya, Güngör, Başalan ve Erdem, 2008; Üstündağ ve Özdoğan, 2017). Bu ürünleri yurt dışından ithal eden ülkemizde büyütme faktörlerinin yerine konabilecek güvenilir ve ekonomik alternatif yem katkı maddeleri ihtiyacı bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla hayvanlarda sağlık, verim ve performansı arttırmak için hayvansal ürünlerde kalıntı bırakma riski olmayan prebiyotiklerin yem katkı maddesi olarak kullanılabilmesi bildirilmektedir. Ülkemizde kanatlı yetiştiriciliğinde probiyotikler, bir süredir verim artırmada ve yem katkı maddesi olarak kullanılmakla birlikte bu mikroorganizmaların EPS ve kültür filtratı gibi metabolitlerinin yem katkı maddesi olarak kullanımı mevcut değildir. Genel olarak ülkemizde ve dünyada yapılan çalışmalarda prebiyotikler bitki, mantar ve maya kaynaklı olup bağırsak mikrobiyotasının doğal elamanları olan mikroorganizmalardan prebiyotik eldesine yönelik çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Bu nedenle tez çalışmasında tavuk bağırsağı kaynaklı yüksek EPS üreticisi *Lactobacillus* cinsi bakterilerinin L-EPS ve filtratlarının tavuk bağırsağında dominant olan *Lactobacillus* cinsine ait türlerin gelişimi üzerine ve HT-

29 hücrelerine adezyonunda etkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Ayrıca, EPS'nin prebiyotik olarak kullanılma durumu söz konusu olursa üretimde verimi artıracak uygun besi ortamlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca, tavuklarda antikoksidyal olarak kullanılan salinomycinin tavuk bağırsağında bulunan ve bağırsak dengesinde rolü olan laktobasiller üzerindeki etkisinin ortaya konulması ve *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin kültür filtratları ile L-EPS'lerinin laktobasilleri koruyucu etkisinin tespit edilmesi, bu çalışmalar sonucunda *Lactobacillus* cinsi bakterilerden tavukların beslenmesinde kullanılmak üzere bitkisel kaynaklı prebiyotiklerden daha etkin olabilecek yeni bir prebiyotik bulunması, elde edilen yeni prebiyotiklerin tavuk yemlerine alternatif yem katkı maddesi olarak önerilmesi amaçlanmaktadır. Bu kapsamda;

1. Tavuk bağırsağı kaynaklı EPS üretim yeteneği ile öne çıkan *Lactobacillus* cinsine ait bakteriler, prebiyotik yem katkı maddesi üretimi için seçilmiştir. Seçilen yüksek EPS üreticisi bakterilerinin prebiyotik olarak EPS üretiminde etkili olabilecek farklı azot kaynakları ve sükroz kullanılan besi ortamları ile oranların belirlenmesi,
2. Yüksek EPS üreticisi *L. salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarında elde edilen L-EPS'nin tavuk bağırsağı kaynaklı laktobasiller tarafından fermente edilip edilmediğinin ortaya konularak, bu EPS'nin yine tavuk bağırsağı kaynaklı laktobasiller üzerine, sadece L-EPS kullanımı ve laktobasillerin EPS ile birlikte diğer metabolitleri de ürettiği kültür filtratlarının LGD etkisinin belirlenmesi ve bu sonuçların ticari olarak kullanılan inülin prebiyotiği ile mukayese edilmesi,
3. Yüksek EPS üreticisi bakteriler ile bu bakterilerden elde edilen L-EPS ve kültür filtratı sinbiyotiklerinin tavuklarda antikoksidyoz olarak kullanılan salinomycine karşı tavuk mikrobiyotasında bulunan yararlı bakterileri koruyucu prebiyotik özelliklerinin belirlenmesi,
4. Bağırsak epitel yüzeyine tutunma kapasitesi yüksek olan bakteriler, bu ortamda biyolojik etkinliklerini daha iyi gösterebilecekleri düşüncesinden yola çıkarak yüksek EPS üreticisi probiyotiğin ve bu probiyotiğe L-EPS ve filtratın eklenmesiyle oluşturulan sinbiyotiklerin HT-29 hücre hattı ile oluşturulan deney modeline uygulanması sonucunda tutunma yeteneklerinin ortaya konulması planlanarak, EPS'lerin bağırsak epitel hücrelerine adezyon yeteneklerinin belirlenmesi,

5. Yapılan çalışmalarda yüksek EPS üreticisi *L. salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarından elde edilen kültür filtratları ve L-EPS'nin, tavuk bağırsağı kaynaklı aynı türe ait laktobasiller üzerindeki etkisinin suş düzeyinde ortaya konulması,
6. Bu çalışmalar sonucunda *L. salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarından elde edilen L-EPS'ler ve kültür filtratlarının hangisinin prebiyotik özellikleri bakımında öne çıktığının belirlenmesi, belirlenen etkin prebiyotiğin tavuk mikrobiyotasında laktobasil gelişim düzenleme ve antikoksidiyoz ilaçlara karşı koruyuculuk etkilerinin ortaya konularak bu alanda yeni bir biyoteknolojik ürün yem katkı maddesi geliştirilmesi,
7. Yem katkı maddesi olarak tavuklarda canlı probiyotik bakterilerinin kullanılması, bu bakterilerin ortam koşullarına oldukça duyarlı olmaları ve yem işleme teknikleri gibi nedenlerle canlılıklarını koruyabilmeleri oldukça zor olmasından dolayı her zaman istenilen stabil sonuçları veremediğinden, tavuk bağırsağından izole edilen doğal mikrobiyota elamanı, probiyotik bakteri olarak öne çıkan *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerden elde edilecek ürünlerin probiyotiklerden ve diğer bitki kaynaklı ticari prebiyotiklerden daha iyi sonuç verip vermeyeceğinin ortaya konulması neticesinde prebiyotiklerin bu ürünlerin yerini alması hedeflenmiştir. Böylelikle tavuklarda yem katkı maddesi olarak probiyotik ve transgenik bitkilerden elde edilen prebiyotiklerin kullanılmasının yerine, tavuk bağırsağında probiyotik özellik gösteren, bağırsak mikrobiyotasını dengeleyici ve tavuk sağlığı için önemli olan laktobasillerin gelişimi, bağırsağa adezyonu ve canlı kalabilmelerinin probiyotik bakteri metabolitleri ile desteklenmesinin, tavuk yem katkı maddelerinde probiyotik kaynaklı prebiyotik kullanımının yeni bir bakış açısı olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışma Tarımsal Araştırma ve Politikalar Genel Müdürlüğü'nün TAGEM/15/ARGE/40 projesi tarafından desteklenmiş olup, tavuk bağırsağından izole edilen *Lactobacillus* cinsi bakterilerden elde edilen kültür filtratları ve EPS'nin tavuk yem katkı maddelerinde prebiyotik olarak yeni bir biyoteknolojik ürün geliştirilmesi bakımından yapılan ilk çalışmadır. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen verilerin, kanatlı hayvan sektöründe, hayvan sağlığı ile performansını korumak ve geliştirmek için hayvan yemlerinde kullanılmak üzere probiyotik kaynaklı prebiyotik ilaveli yeni yem katkı maddelerinin kanatlı üretiminde transgenik bitkilerden elde edilen prebiyotiklerden daha etkin ve bu prebiyotiklere alternatif olarak daha güvenle kullanılabilmesi ile güvenli ve verimli gıda üretimine katkı sağlanması amaçlanmıştır.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Probiyotikler ve Etki Mekanizmaları

Probiyotik kelimesi bugün kullanıldığı anlamıyla ilk kez 1974 yılında Parker tarafından kullanılmıştır (Parker, 1974). 1994 yılında probiyotik "sağlığa koruyucu etki gösteren, sağlık üzerine olumlu etkileri olan, canlı, bir veya birkaç belli mikroorganizma tarafından oluşturulmuş kültürler" olarak tanımlanmıştır (Malago, Koninkx, Marinsek-Logar, 2011). “Pro” ve “biota” olmak üzere iki kısımdan oluşan probiyotik terimi “for life” (yaşam için) anlamını taşımakta olup, antibiyotik teriminin anlamca karşıtıdır. Probiyotik, günümüzde Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Yiyecek ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından yapılan tanımlamayla "yeterli ve uygun oranlarda alındıklarında konak sağlığına yararlı etki sağlayan canlı mikroorganizma içerikleri" şeklinde tanımlanmaktadır (Bergonzelli, Blum, Brussow ve Corthesy-Theulaz, 2005; Markowiak ve Śliżewska, 2018).

Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların belli kriterlere sahip olması beklenir. Bu kriterlerin başlıcaları; nonpatojenik ve nontoksijenik olma, intestinal mukozaya adezyon, adaptasyon ve iyi kolonize olabilme, patojen mikroorganizmalara karşı antogonistik etkiye sahip, asit ve safra tuzlarına dayanıklı olma, antimikrobiyal madde üretme ve antibiyotiklere dirençli olma, intestinal mikroflorasını stabilize edebilme, kullanım ve saklama sırasında özelliklerini koruyabilme ve konak sağlığına üzerinde olumlu etki gösterebilmeleridir (Desai, 2008; Poorghasemi, Chamani, Mirhosseini, Sadeghi ve Seidavi, 2018).

Hayvan sağlığı üzerinde, sindirim sisteminde bulunan mikrobiyotanın çok önemli bir rolü bulunmaktadır. Bağırsağın yararlı mikrobiyotasını güçlendirmek için probiyotik gibi gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. Probiyotik bakterilerin konağın sağlığı üzerinde, patojen mikroorganizmaların inhibisyonunu sağlamak, gıdaların sindirebilirliğini artırmak, immun sistemi güçlendirmek, antitümör ve antikansorejen etkiler göstermek gibi birçok yararlı etkileri vardır (Gürsoy ve Kınık, 2006; Sezen, 2013). Probiyotik bakteriler bazı bakteri toksinlerini nötralize edebilen metabolitler sentezleme yeteneğine de sahiptirler (Guerin-Danan, Chabenet, Pedone ve Po-pot, 1998).



Probiyotiklerin, konağı intestinal sistem bozukluklarına karşı nasıl koruduğunu açıklamaya çalışan birçok mekanizma bulunmaktadır. Muhtemel etki mekanizmaları; antimikrobiyel maddeler üreterek patojen bakterilerin inhibisyonu, tutunma bölgelerinin bloke edilmesi, besin maddeleri için rekabet, toksin reseptörlerinin yıkımı ve immün sistemin uyarılması, olarak tanımlanmaktadır (Rastall ve diğerleri, 2005; Karademir ve Karademir, 2003). Probiyotikler, bağırsak yüzeyini örten mukozal epitel hücrelere tutunarak patojen mikroorganizmalara karşı intestinal sistemde bir bariyer oluşturmakta ve bu sayede patojenlerin bağırsak epitel hücrelerine adezyonunu engellemektedir (Servin ve Coconnier, 2003; Koçak, Fındık ve Çiftçi, 2016). Tutunma özellikleri bakımından çok sayıda potansiyel probiyotik aday suşu taramak için bir *in vivo* analiz hazırlamanın zor olması nedeni ile probiyotik suşların adezyon özelliklerini değerlendirmek amacıyla özellikle HT-29, HT29-MTX ve Caco-2'yi içeren *in vitro* hücresel modeller yaygın olarak kullanılmaktadır (Gopal, Prasad, Smart ve Gill, 2001).

Probiyotikler alternatif biyoteknolojik ürünlerin başında gelmektedir (Sarıca, 1999; Karademir ve Karademir, 2003). Bu mikroorganizmaların kültürleri hayvan beslemede karma yemlere ve silaj materyali içine karıştırılarak geniş çapta kullanılmaktadır. Son yıllarda, probiyotiklerin kanatlı hayvan beslemede büyütme faktörü olarak kullanılmasına yönelik çok sayıda çalışma yapılmaktadır (Kocabağlı ve Alp 2015; Üstündağ ve Özdoğan, 2017; Kutlu ve Şahin, 2017).

### **2.1.1. Hayvan beslenmesinde probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar**

Probiyotik bakterilerin çoğunluğu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* cinslerine ait türler oluşturmaktadır. Konak intestinal mikroflorasını düzenleyerek, mukozal ve sistemik bağışıklığı güçlendiren, konak sağlığı üzerine yararlı etkiler sağlayan probiyotiklerin en önemli ve en yaygın grubunu laktik asit bakterileri oluşturmaktadır. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* dışındaki bütün laktik asit bakterileri bağırsak florası elemanlarıdır. *Bifidobacterium* türleri ise laktik asit bakterileriyle birlikte en yaygın olarak kullanılan probiyotik bakterilerdir. Probiyotik bakteriler mide asidine diğer bakterilere göre daha dayanıklı, safra tuzlarına ve lizozim enzimine daha dirençli bakterilerdir. *Lactobacillus* türleri, genellikle ince bağırsakta fazla sayıda bulunurken, *Bifidobacterium*'lar kalın

bağırsakta sayıca fazladır (Gültekin, 2004; Gürsoy, Kınık ve Gönen, 2005; Tripathi ve Giri, 2014).

Hayvanlarda yapılan çalışmalarda probiyotik mikroorganizma olarak etkinliği belirlenmiş belli türler üzerinde yoğunlaşmıştır. Hayvanlarda probiyotik olarak kullanılan başlıca mikroorganizmalar *Lactobacillus*, *Bacteriodes*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Bacillus* ve *Bifidobacterium* spp. bakterileri, *Clostridium butyricum* türü *Aspergillus* spp. mantarları ve *Saccharomyces cerevisiae* mayasıdır (Krehbiel, Rust, Zhang ve Gilliland, 2003; Öztürk, 2008b; Zhang ve diğerleri, 2016).

### **2.1.2. Hayvan beslemesinde probiyotiklerin yem katkı maddesi olarak kullanılması ve etkileri**

Hayvan beslemede, çapraz direncin oluşması ve hayvansal ürünlerde kalıntı bırakması gibi nedenler ile antibiyotiklerin kullanımının sınırlandırılması, tüketiciler tarafından organik ürünlerin daha fazla tercih edilmesine neden olmuş bunun sonucunda da araştırmacılar, alternatif yem katkı maddelerinin kullanımıyla ilgili çalışmalar yapmaya yönelmişlerdir. Probiyotikler verimi arttırmaya yönelik uygulamalarda uzun zamanlardan beri hayvan beslemede kullanılmakta olup, hayvan beslemesinde kullanılan alternatif yem katkı maddelerinin başında gelmektedir (Güçlü ve Kara 2009). Antibiyotiklerin verim artırıcı olarak kullanılmasının yasaklanmasıyla kullanımı gündeme gelen ve alternatif yem katkı maddesi olarak kullanılmaya başlanan probiyotikler bu kapsamda, “hayvanların bağırsaklarında adheze olarak çoğalan, sindirim kanalından absorbe olmayan, patojen mikroorganizmalara karşı antagonistik etki gösteren, hayvanlarda yemden yararlanmayı artıran, bir grup canlı bakteri veya bunların kültürlerini içeren biyolojik ürünler” olarak tanımlanabilmektedir (Sarica, 1999; Işık ve Ekimler, 2004; Antunovic ve diğerleri 2005; Diler, 2007). Tedavide ise antibiyotiklerin uzun süre kullanılmaları durumunda antibiyotiklere karşı patojen mikroorganizmaların direnç kazanmasından dolayı uzun süre kullanılmasının önerilmemesi, hayvansal ürünlerde kalıntı yapmasından dolayı insan sağlığını tehdit ettiği gerekçesiyle kullanımında da tereddütler bulunması ve virüsler üzerinde de etkilerinin olmaması gibi nedenler, probiyotiklerin önemini arttırmaktadır (Sarica, 1999; Karademir ve Karademir, 2003).

Bağırsak sindirimini olumlu yönde değiştirerek hayvan verimliliğini artırmak, hayvan sağlığını korumak ve hayvansal ürünlerin miktar ve kalitesini yükseltmek için hayvanlarda

sağlık, verim ve performanstaki olumlu etkisi belirlenen (Kurtoglu ve diğerleri, 2004; Yalçın, Kocaoğlu Güçlü, Karakaş, Oğuz ve Yalçın, 2002) probiyotik (bakteri, mantar ve maya) gibi alternatif yem katkı maddelerinin kullanılabilirliği üzerine çok sayıda çalışmalar yapılmıştır (Kantautaitė, Oberauskas, Sutkeviciene ve Sederevicius, 2006; Terre, Calvo, Adelantado, Kocher ve Bach, 2007; Jørgensen, Laguna, Millán, Casabuena ve Gracia, 2016).

Işık ve Ekimler (2004) ile Kantautaitė ve diğerlerinin (2006) yaptığı çalışmalarda buzağların tükettikleri süt, süt ikame yemi, kolostrum veya suya *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp. ilavesinin bağırsak florasındaki patojen bakterilerin gelişimini engelleyerek ishal vakalarını azaltıcı etki yaptığı ve yemden yararlanmayı arttırdığı bildirilmiştir. Probiyotikler ile ilgili yapılan bir başka çalışmalarda bu ürünlerin su ürünleri yetiştiriciliğinde yem katkı maddesi olarak kullanımlarının kültürü yapılan balıklarda tür ve yaş ayrımı olmaksızın yemden yararlanma, canlı ağırlık kazancı, yaşama oranı ve büyüme performansında artışa ve immün sistem üzerinde olumlu etkilere sebep olduğu bildirilmiştir (Panigrahi ve diğerleri, 2004; Salinas, Cuesta, Esteban ve Meseguer, 2005; El-Haroun, Goda ve Kabir Chowdhury, 2006; Kumar, Mukherjee, Prasad ve Pal, 2006; Bagheri, Hedayati, Yavari, Alizade ve Farzanfar, 2008; Alak ve Atamanalp, 2012). Enterotoksijenik *Escherichia coli* K88'in neden olduğu kolibasiloz ile mücadele edilen piliç tavuklarında yapılan bir çalışmada etlik tavuklarının yemlerine *Clostridium butyricum* probiyotiğinin ilavesinin büyüme performansı, bağışıklık tepkisi, bağırsak bariyer fonksiyonu ve sindirim enzimi aktivitesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Bunun için tavuklar rastgele üç gruba ayrılarak 28 gün farklı diyetlerle beslenmiştir. Birinci grubun yemlerine  $2 \times 10^7$  cfu/kg probiyotik *Clostridium butyricum* katılmıştır. İkinci grubun yemlerine ise 20 mg/kg kolisitin sülfat antibiyotiği konulmuştur. Üçüncü grubun yemlerine ise hiçbir yem katkı maddesi konulmamış ve bu grup kontrol grubu olarak adlandırılmıştır. Sonuç olarak *Clostridium butyricum* probiyotiğinin yem katkı maddesi olarak kullanımının etlik tavuklarda kontrol grubuna göre bağışıklığı arttırdığı, bağırsak bariyer fonksiyonunu geliştirdiği ve tavukların bağırsaklarında sindirim enzimlerini arttırdığı bildirilmiştir. Yemlerine ise 20 mg/kg kolisitin sülfat antibiyotiği konulan etlik tavuklarda da probiyotik ilave edilen grupta benzer etkiler görüldüğünden, probiyotik *Clostridium butyricum*'un antibiyotiklere alternatif yem katkı maddesi olarak kullanılabilceği önerilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2016). Yapılan bir başka çalışmada ise probiyotik *Bacillus subtilis* yem katkı maddesinin

broyler tavuklarının büyüme performansı, antioksidan kapasite ve et kalitesi üzerindeki tamamlayıcı etkileri araştırılmıştır. Toplam 240 günlük erkek broyler tavuklar rast gele dört gruba ayrılarak 42 gün boyunca farklı yem grupları ile beslenmişlerdir. Birinci grubun yemlerine  $2 \times 10^{10}$  cfu/kg, ikinci grubun yemlerine  $3 \times 10^{10}$  cfu/kg ve üçüncü grubun yemlerine ise  $4 \times 10^{10}$  cfu/kg probiyotik *Bacillus subtilis* yem katkı maddesi ilave edilmiştir. Kontrol grubu olan dördüncü grubun yemlerine ise hiçbir yem katkı maddesi konulmamıştır. Sonuç olarak  $3 \times 10^{10}$  cfu/kg probiyotik *Bacillus subtilis* yem katkı maddesi ile beslenen ikinci grupta kontrol grubuna göre 42 gün sonunda nihai vucüt ağırlığında önemli ölçüde artış tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra bu grupta kontrol grubuna göre kan serumunda bulunan IgA ve IgG konsatrasyonlarının ve serum ile karaciğerde de glutatyon, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz aktivitesinin önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir (Bai ve diğerleri, 2016).

Hayvan yemlerinde probiyotik katkı maddesi olarak oldukça sık kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* mayasının gelişimi sırasında nükleotid, amino asitler, vitaminler ve enzimler gibi hayvan sağlığı için yararlı maddeler açığa çıkmaktadır. Bundan dolayı *Saccharomyces cerevisiae* mayası bir besin maddesi kadar önemlidir (Chen, Chen ve Wang, 2017). Probiyotik olarak *Saccharomyces cerevisiae* kullanımının hayvanların sağlık ve verimine etkisi ile ilgili birçok araştırma mevcuttur. Shankar ve diğerlerinin (2017) 288 günlük 24 adet civciv üzerine yapmış olduğu bir çalışmada civcivlerin yemlerine %0,10, %0,15 ve %0,20 oranlarında *Saccharomyces cerevisiae* mayası ilave etmişlerdir. 42 gün süren bu deneyde civcivlerde haftalık vucüt ağırlığında değişimler izlenmiş ve en yüksek vucüt ağırlığına ulaşan grubun yemlerine %0,20 oranlarında *Saccharomyces cerevisiae* mayası konulan civcivler olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise 120 günlük 100 adet civcivin yemlerine %0,20 oranında *Saccharomyces cerevisiae* ilavesinin civcivlerde besinlerin sindirilebilirliğini artırarak büyüme performansını artırdığı ve bağışıklık sistemi güçlendirdiği bildirilmiştir (Nawaz, Irshad ve Ali 2016).

Hayvan yemlerine konulan probiyotiklerin temel etki mekanizmaları, patojen mikroorganizmaların rekabetçi dışlanması, bakteriyosinler, propiyonik asitler ve hidrojen peroksit gibi antibakteriyel maddelerin üretimi ve konağın immün sisteminin modülasyonu şeklindedir. Hayvan yemlerinde probiyotiklerin kullanılması durumunda bahsedilen bu etki şekilleri yem katkı maddesi olarak kullanılan probiyotik mikroorganizmaya veya suşuna, hayvan yemine katılan miktarına, hayvanın türüne ve hayvanda herhangi bir stres yaratan

durumun olup olmamasına göre değişmektedir (Chaucheyras-Durand ve Durand, 2010; Dhama ve diğerleri, 2011).

### 2.1.3. Tavuk mikrobiyotası ve mikrobiyotaya probiyotiklerin etkileri

Tavuk bağırsak sistemi; ince bağırsak (duodenum, jejunum, ileum) kalın ve kör bağırsak ile kloaktan oluşmaktadır (Larbier ve Leclercq, 1994; Kutlu 2015). Mikroorganizmaların hayatta kalması için uygun şartlara sahip olan bölgelerde, farklı grup ve türlere ait çok sayıda bakterinin yer aldığı bir mikrobiyota vardır (Gürsoy, Kınık ve Gönen 2005). Tavuk bağırsak sistemi çok çeşitli mikrobiyotaya sahiptir. Bu mikrobiyotada gıdaların parçalanmasına ve sindirilmesine yardımcı olan 900'den fazla bakteri türü bulunmaktadır (Apajalahti, Kettunen ve Graham 2004; Wei, Morrison ve Yu 2013). Tavuk sindirim sisteminde bulunan ince (duodenum, jejunum, ileum), kör ve kalın bağırsak ile kloakta, Laktobasiller %90 oranında dominat olarak bulunmaktadır. Laktobasillerden özellikle *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. aviarius*, *L. acidophilus* ve *L. johnsonii* türleri ön plana çıkmaktadır. Bu türlerden *L. salivarius*, *L. aviarius* ve *L. reuteri*, türleri dominant olarak ince bağırsağın jejunum bölgesinde bulunmaktadır. (Gong ve diğerleri, 2007; Feng ve diğerleri, 2010; Pourabedin ve Zhao, 2015). Bunun yanında ince bağırsakta *Clostridiaceae*, *Enterococcus* ve Koliform grubuna ait bakteriler, kör ve kalın bağırsakta *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Clostridiaceae*, *Enterococcus* ve Koliform grubuna ait bakteriler ve kloakta ise, *Clostridium*, *Bacterioides* ve *Bifidobacterium* grubuna ait bakteriler bulunmaktadır. (Salanitro, Fairchild ve Zgornicki, 1974; Gong ve diğerleri, 2002; Lu ve diğerleri, 2003; Konsak ve diğerleri, 2013; Stanley, Hughes ve Moore, 2014).

Bağırsak mikrobiyotası potansiyel olarak konağın hem beslenmesini hem de sağlığını etkiler. Tavuklarda büyüme ve sağlığın iyileştirilmesinde bağırsak sisteminde bulunan mikrobiyal popülasyon dengesinin önemi çok büyüktür. Araştırmacılara göre sağlıklı ve stressiz kümes hayvanlarının bağırsak sisteminde yararlı ve yararlı olmayan bakteriler arasında kararsız bir denge bulunmaktadır. Bu denge durumunda kanatlılar maksimum verimliliğine ulaşmaktadır. Ancak tavukların aşırı antibiyotik kullanımına veya strese maruz kaldığı durumlarda, hayvanın bağırsak mikrobiyotası değişebilir. Bunun sonucunda bağırsak mikrobiyota dengesinde bozukluk yani "dysbiosis" meydana gelir. Tavuklarda dysbiosis olduğu durumlarda faydalı mikrobiyotada özellikle laktobasil sayılarında azalma ve yararlı olmayan *Clostridium* sp. ve *Enterococcus* sp. gibi bakteri sayılarında da

aşırı bir artış ortaya çıkmaktadır. Bu olay ishale yatkınlık veya ishal ile bağırsak mikrobiyotasının bozulması ile birlikte büyüme, yemden yararlanma ve üretim parametrelerinde azalmaya neden olmaktadır. Bağırsak mikrobiyotası stabil durumlarda oldukça kararlı iken, beslenme ve hijyen, antibiyotik kullanımı ve stres gibi bazı çevresel faktörlerin değişmesi ile önemli derecede etkilenebilmektedir. Probiyotik bakterilerin konağın bağırsak mikrobiyota bileşenlerini modüle etmesinden dolayı dysbiosise karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Kabir 2009; Ülger, Beyzi, Kaliber ve Konca, 2015; Ducatelle, Eeckhaut, Haesebrouck ve Van Immerseel, 2015).

Tavukların normal bağırsak mikrobiyotası geniş bir bakteri popülasyonu ihtiva etmektedir ve bu bakteriler bağırsağa yerleşip çoğalmaktadırlar. Probiyotik bakterilerde bağırsak epitel hücrelerine tutunarak çoğalırlar ve sindirim kanalından absorbe olmazlar. Bu sayede bağırsakların doğal konakçısı olmayan, bağırsak epitel hücrelerine yapışarak kolonize olan ve atılmaya karşı direnç gösteren, hastalık yapan patojen bakterilerin bağırsak yüzeyine tutulmalarını ve çoğalmalarını engellemektedirler. Probiyotiklerin büyütme faktörü olarak bu etkilerini gösterebilmeleri için normal mide pH'sına karşı dayanıklı olmaları ve mideden bağırsağa geçişleri süresince canlı kalmaları gerekmektedir *Lactobacillus*'ların genellikle normal mide pH'sına dayanıklı oldukları bildirilmektedir (Bahadıroğlu, 1997, Oelschlaeger, 2010; Brown, 2011; Saint-Cyr ve diğerleri, 2017).

#### **2.1.4. Tavuk yemlerinde kullanılan probiyotik katkı maddeleri**

Probiyotikler kanatlı karma yemlerinde biyoteknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak, verimi artırmak amacı ile uzun zamandan bu yana yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Tavuklarda, yem katkı maddelerinde probiyotik kaynağı olarak kullanılan mikroorganizmalar genellikle *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Bacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. türleri ile *Saccharomyces cerevisiae* mayasıdır (Önol ve Yalçın 1996; Jin, Ho, Abdullah, Ali ve Jalaludin, 1998; Abdulrahim, Haddadin, Hasjlamoun ve Robinson, 1996; Ülger, Beyzi, Kaliber ve Konca, 2015). Çoğunlukla *Lactobacillus* türlerinden oluşan probiyotik ürünler tavuk bağırsak mikroflorasını yararlı mikroorganizmalar lehine değiştirmek suretiyle sindirim ve absorpsiyonu kolaylaştırarak gelişimi teşvik etmektedir. Ayrıca *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., ve *Bifidobacterium* spp., gibi probiyotik katkı maddeleri bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek, konakçıyı olumlu yönde etkileyen "canlı bir mikrobiyal yem takviyesi" olarak

tanımlanmış olup tavuklarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Alp ve Kahraman, 1996; Chen, Zhu ve Qiu, 2017).

#### 2.1.5. Tavuk probiyotik katkı maddelerinin performans ve sağlık üzerine etkileri

Probiyotikler, tavuk yem kakı maddelerinde bağırsak mikrobiyotasının düzenlemesi, yemlerin sindirimini ve yemden yararlanma düzeyini artırması, patojenlere karşı bağırsak sisteminin pH'ını düşürerek ve çeşitli antimikrobiyal maddeler üreterek koruyucu etki sağlaması ve bağışıklığı geliştirmesi gibi etkilerinden dolayı büyütme faktörü olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Tavuklarda herhangi bir stres faktörünün ya da patojen mikroorganizmaların varlığında, vücudun savunma mekanizması düşmektedir. Bu durumda tavuk bağırsak mikrobiyotasında bir dengesizlik eğilimi olması söz konusudur. Bağırsak doğal mikrobiyota dengesinin bozulmasına bağlı olarak bağırsakta patojen sayısında artış görülürken, bu durum tavuklarda ishal, iştahsızlık, yemlerin sindirim ve emiliminde düşüş gibi etkilere yol açmaktadır. Tavuklarda bağırsak mikrobiyota dengesinin bozulduğu durumlarda patojen mikroorganizmaların etkilerinin azaltılmasında probiyotik yem katkı maddelerinin etkilerinin araştırıldığı birçok araştırma mevcuttur. Bu araştırmalar sonucunda kanatlı yemlerine probiyotik ilavesinin *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Eimeria* sp. gibi birçok patojen üzerinde oldukça yüksek antibakteriyel etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Tavuk yemlerinde probiyotik kullanımı sonucunda hayvanlarda görülen etkiler arasında kümesler arasında fark olabileceği gibi bireyler arasında da farklılıklar olabileceği bildirilmiştir. Bu farklılıklar ortamın hijyen koşullarına, tavuklar üzerinde herhangi bir stres faktörünün olup olmamasına, kullanılan yemlerin içeriği ve bileşimi gibi işletmeye göre değişiklik gösterebilen faktörlere bunun yanında tavukların sağlık durumu ve sindirim sistemi mikroorganizma çeşitliliği gibi bireysel faktörlere de bağlı olarak oluşmaktadır. (Ergün, Yalçın ve Saçaklı, 2000; Abudabos, Al-Batshan ve Murshed, 2015; Idoui ve Karam, 2016; Ritzi, Abdelrahman, Mohnl ve Dalloul, 2014; Shen ve diğerleri, 2014; Li ve diğerleri, 2014; Agboola, Omidwura, Odu, Popoola ve Iyayi, 2015). Tavuk yemlerinde yaygın olarak kullanılan probiyotik katkı maddelerinin performans ve sağlık üzerine yararlı etkileri Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Probiyotiklerin tavuklarda performans ve sağlık üzerine etkileri (Idoui ve Karam, 2016; Shankar ve diğerleri, 2017; Biswas, Junaid, Kumawat, Qureshi ve Mandal, 2018; De Cesare ve diğerleri 2017; Bai ve diğerleri, 2016; Teng ve diğerleri, 2016; Slizewska, Cukrowska, Smulikowska ve Cielecka-Kuszyk, 2019; Shokryazdan ve diğerleri, 2017; Nakphaichit ve diğerleri, 2019)

| Probiyotik                       | Etki                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Yemden yararlanma ve büyüme performansında artış, kan biyokimyasal parametrelerin iyileştirilmesi, ileum ve kör bağırsakta Koliform grubu bakteri sayılarında azalış, bağırsak villuslarında artış.                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i>   | Yemden yararlanma, performans veriminde iyileşme, yumurta veriminde artış, kör bağırsakta Koliform grubu bakteri sayılarında azalış, aflotoksin B1 etkisine karşı koruyuculuk.                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <i>Lactobacillus salivarius</i>  | Yemden yararlanma ve büyüme performansında artış, bağırsakta <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> gibi yararlı bakterilerin sayısında artış, <i>Escherichia coli</i> gibi patojen sayısında azalış, aflotoksin B1 etkisine karşı koruyuculuk, $\beta$ -glukozidaz ve $\beta$ -glukuronidaz gibi patojen bakteri enzimlerinde azalış, bağışıklık sistemini güçlendirme, bağırsak morfolojisinde iyileşme, kan biyokimyasal parametrelerin iyileştirilmesi. |
| <i>Lactobacillus reuteri</i>     | Yemden yararlanma ve büyüme performansında artış, antimikrobiyal madde üreterek <i>Salmonella enteritidis</i> 'e karşı koruyucu etki, aflotoksin B1 etkisine karşı koruyuculuk                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i>   | Yemden yararlanma ve canlı ağırlık oranında artış, antikor üretimini artırarak bağışıklık sistemini güçlendirme, ileum ve kör bağırsakta Koliform grubu bakteri sayılarında azalış.                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <i>Bacillus subtilis</i>         | Yemden yararlanma, yumurta verimi ve yumurta kalitesinde artış, antioksidan etki, et kalitesinde iyileşme.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  | Yem tüketimi, canlı ağırlık artışı, yemden yararlanma ve besin maddelerinin sindiriminde artış, bağışıklık sistemini güçlendirme, aflotoksin B1 etkisine karşı koruyuculuk, dışkıda amonyak azaltılması, patojen sayısında azalış                                                                                                                                                                                                                                   |

Probiyotiklerin, Çizelge 2.1'de verilen sağlık üzerine yararlı etkilerinden dolayı uzun süreden bu yana tavuklarda yem katkı maddesi olarak kullanımına dayalı birçok çalışma mevcuttur. Yumurta tavuğu yemlerine probiyotik kullanımı ile çok sayıda çalışma yapılmış ve bu çalışmalarda genellikle antibiyotik kullanımının azaltılması ve yumurta kolesterolünün düşürülmesi amaçlanmıştır. Abdulrahim ve diğerlerinin (1996) yapmış olduğu bir araştırmada, yumurta tavuğu rasyonlarında probiyotik (*Lactobacillus acidophilus*) ve antibiyotiğin (Zinc Bacitracin) yalnız başına ve birlikte kullanılmalarının etkileri araştırılmış ve probiyotiğin tek başına kullanılmasının yumurta verimini ve yemden



yararlanmayı iyileştirdiği ancak Zinc Bacitracinin aynı etkiyi yapmadığı tespit edilmiştir. Yumurtacı tavuklar üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise yeme 100 ppm düzeyinde probiyotik ilave edilen grupta yumurta veriminin kontrole göre %5 iyileştiği saptanmıştır (Mohan, Kadirvel, Bhaskaran ve Natarajan, 1995). Yapılan diğer çalışmalarda da yumurta tavuğu rasyonlarına farklı oranlarda eklenen probiyotiklerin yumurta veriminde önemli artışlar sağladığı ortaya konulmuştur (Mountzouris ve diğerleri, 2007; Tüzün ve Çiftçi, 2010; Arpášová ve diğerleri, 2016).

Etlik piliçler üzerinde yapılan araştırmalarda probiyotik içeren yem verilen grupta kontrol gruplarına göre yemden yararlanma ve canlı ağırlığında belirgin bir düzeyde iyileşme elde etmişlerdir. Ayrıca *Lactobacillus* kültürünün tek veya karma olarak yeme ilavesi, etlik piliçlerde yemlenmeden sonraki 10. ve 20. günlerde kör bağırsaktaki koliform ve enterobakter sayısını da azalttığı da bildirilmiştir (Owings, Reynolds, Hasiak ve Ferket, 1960; Jin, Ho, Abdullah, Ali ve Jalaludin, 1998; Olnood, Beski, Choct, M ve Iji, 2015). Toplam 240 adet bir günlük erkek civciv kullanılarak yapılan bir çalışmada ise probiyotik ve farklı kaynaklı yağ ile beslemenin performans, karkas özellikleri, bağırsak morfolojisi, bağışıklık sistemi üzerine etkisi incelenmiştir. Deneysel diyetler; (1) bazal diyet (kontrol); (2) %3 donyağı kaynaklı hayvansal yağ içeren diyet; (3) %3 soya fasulyesi kaynaklı bitkisel yağ içeren diyet; (4) kontrol + probiyotik; (5) probiyotik + hayvansal yağ ve (6) probiyotik + bitkisel yağ şeklindedir. Elde edilen sonuçlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4., 5. ve 6. grubun bağışıklık sisteminde anlamlı artış belirlenmiştir. Sonuçlar genel olarak broyler tavukların diyetlerinde probiyotik kullanımının faydalı olduğunu göstermiştir (Poorghasemi, Chamani, Mirhosseini, Sadeghi ve Seidavi, 2018). Yapılan bir diğer çalışmada yemlerine ticari bir probiyotik *Lactobacillus acidophius* ilave edilen etlik piliçlerin bağırsaklarında yararlı bakteri popülasyonunda artış görülmüş ve bağırsak villusların artması ile birlikte emilim yüzeyinin genişlediği tespit edilmiştir. Sonuç olarak ticari bir probiyotik *Lactobacillus acidophius* katkılı yemlerle beslenen tavuklarda büyüme performansında artış ve bağırsak mikrobiyotası ile morfolojisinde iyileşme görülmüştür. (Forte ve diğerleri, 2017).

## 2.2. Prebiyotikler ve Etki Mekanizmaları

Prebiyotikler, kolondaki bir veya sınırlı sayıdaki bakterinin aktivitesini ve/veya gelişimini seçici olarak uyararak, konakçı sağlığını olumlu yönde etkileyen, bağırsaktaki

mikroorganizmalar tarafından metabolize edilmesiyle, bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonunu ve/veya aktivitesini düzenleyen, böylece konakçı üzerinde yararlı fizyolojik etkiler sunan ve seçici olarak fermente edilen bileşiklerdir. Bir bileşenin prebiyotik olarak tanımlanabilmesi için; sindirim kanalının üst kısımlarında hidrolize olmamalı veya emilmemeli, sekum/kolondaki bir veya sınırlı sayıdaki bakterinin gelişmesini veya metabolik aktivitesini uyarmak için seçici bir substrat olmalı, bağırsak mikrobiyotasını daha sağlıklı bir kompozisyona değiştirebilmelidir (Bindels, Delzenne, Cani ve Walter, 2015).

### **2.2.1. Hayvan beslenmesinde prebiyotik olarak kullanılan katkılar**

Hayvanlarda kullanılan en yaygın olarak bilinen prebiyotik bileşikler oligosakkaritlerdir (Shin, Lee, Pestka ve Ustunol, 2000). Oligosakkaritler doğal olarak bulunmalarının yanı sıra ticari olarak polisakkaritlerin enzimatik hidrolizi ile veya monosakkarit ve/veya disakkaritlerden sentezlenerek üretilmektedir (Manning ve Gibson, 2004). Ticari olarak kullanılan prebiyotik katkılar, mannan-oligosakkaritler (MOS), frukto-oligosakkaritler (FOS), alfa-galakto-oligosakkaritler ( $\alpha$ -GOS), galaktosil-laktoz, inulin, enzimatik olarak hidrolize edilmiş inulin (oligofruktoz) ve sentetik fruktoz gibi bileşiklerdir (Aşan ve Özcan, 2006; Öztürk 2008a; Özyurt ve Ötleş, 2014).

### **2.2.2. Hayvan beslenmesinde prebiyotiklerin yem katkı maddesi olarak kullanılması ve etkileri**

Prebiyotiklerin hayvanların performans ve sağlığı üzerine kullanımında oligosakkaritlerin laktik asit düzeyini artırma, sindirim sistemi pH'sını düşürme, yararlı bakteri sayısında artışa sebep olma gibi özelliklerinden faydalanılmaktadır. Mannanoligosakkaritlerin hayvanların beslenmesinde kullanılması durumunda, intestinal mukozayı iyileştirdiği, bağırsak villuslarını arttırdığı, özellikle jejunumda maltaz, aminopeptidaz ve alkali fosfataz gibi enzimlerin aktivitesini arttırdığı da bildirilmiştir. Bunun yanında mannanoligosakkaritlerin hayvanın sindirim sistemi mikrobiyotasının dengesinin sağlanmasında, bağışıklık sisteminin uyarılmasında ve mikotoksinlerin bağlanması etkili olduğu da tespit edilmiştir (Flickinger ve Fahey, 2002; Tunç, 2007). Prebiyotiklerin fermentasyonu sonucu ortaya çıkan kısa zincirli yağ asitleri bağırsak pH'sını düşürerek, minerallerin çözünürlüğünü ve emilimini arttırırlar (Patel, Singh, Panaich ve Cardozo, 2014). Genel olarak prebiyotiklerin bağırsaklarda enterik enfeksiyonları baskılayarak

bağırsakların morfolojisini modifiye edebildiği ve bağırsaklarda absorpsiyon kapasitesini arttırmak suretiyle hayvanlarda sağlığı iyileştirmede ve bağırsak fonksiyonlarını düzenlemede katkı sağladığı bildirilmektedir (Keser ve Bilal, 2010; Hoseinifar, Ringø, Shenavar Masouleh ve Esteban, 2016).

Prebiyotiklerin sağlığa yararlı etkilerinden dolayı hayvan beslenmesinde kullanımı kapsamında yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Kumprecht ve arkadaşlarının (1997) yapmış olduğu bir çalışmada broyler rasyonlarına prebiyotik yem katkısının ilave edilmesiyle canlı ağırlık artışı ve yemden yararlanma oranında artış tespit edilmiştir. Bunun yanında hayvan yemlerine prebiyotik ilavesinin hayvanların yemden yararlanma oranını arttırdığını tespit eden başka çalışmalar da mevcuttur (Özcan ve Ayaşan, 2009). Yapılan bir çalışmada, FOS ve GOS'un bağırsak mikrobiyotası için yararlı bakterilerden *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 'nin gelişim performansı ve asitlik geliştirme özelliği üzerine etkisi *in vitro* olarak belirlenmiştir. Test edilen prebiyotiklerin tümünün bakteri gelişimini pH 4.02-5.06 arasında belirli düzeylerde teşvik ettiği tespit edilmiştir (Şener, Temiz, Toğay ve Bağcı, 2008). Zdunczyk ve arkadaşlarının (2004) hindilerde yapmış oldukları bir çalışmada, deneme gruplarına sırasıyla %1 MOS ve %1 inülin içeren prebiyotik katkılı rasyonlar verilmiştir. Dışkı parametrelerinden kuru madde ve amonyak miktarları bakımından gruplar arasında kontrol grubuna göre önemli bir farka rastlanmamış, fakat MOS ve inülin gibi prebiyotik katkılı yem verilen gruplarda dışkı pH değeri kontrol grubuna göre önemli derecede düşük bulunmuştur. Chen ve Chen (2004)'in yapmış oldukları bir başka çalışmada karma yemde prebiyotik kullanımının yumurta kabuk kalitesini iyileştirdiğini, hayvanların performansını olumlu yönde etkilediğini bildirmişlerdir. Chen ve arkadaşlarının (2005) yumurta tavukları üzerinde yapmış oldukları bir başka çalışmada deneme gruplarına %1 oligofruktoz içeren ticari bir prebiyotik ve %1 ticari prebiyotik inülin bulunan yem vermişlerdir. Her iki prebiyotik yem katkı maddesinin de kontrol grubuna göre ince ve kalın bağırsak uzunluğunda önemli bir artış yarattığını tespit etmişlerdir. Yılmaz ve arkadaşlarının (2007) yapmış oldukları bir çalışmada gökkuşağı alabalığında (*Onchorhynchus mykiss*) büyüme, vücut kompozisyonu ile ince bağırsak ve karaciğer histolojisi üzerine prebiyotik ilaveli yem ile beslemenin etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada ticari alabalık yemine 0, 1,5, 3 ve 4,5 g/kg oranında prebiyotik ilave edilmiştir. Sonuç olarak 1,5 g/kg prebiyotik ilaveli yemle beslenen grupta büyüme performansının genel olarak daha iyi olduğunu gözlemlenmiştir. Bağırsak villus

uzunlukları bakımından da prebiyotik yem ile beslenen grupların, kontrol gruplarına göre daha iyi olduğunu bildirilmiştir.

Kanatlı beslemesinde yaygın olarak kullanılan ticari MOS prebiyoğının kanatlı yemine ilave edildiğinde, canlı ağırlık kazancını yükselttiği gibi beslenmenin ilk yedi günlük evresinde bağırsaktaki villus boyunu arttırdığı, *Salmonella* sp. ve *Escherichia coli* gibi patojenlere karşı dayanıklılık sağladığı, yararlı bakteriler için de bir besin maddesi gibi gelişimlerini arttırıcı etkiler gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Bu prebiyotiğin bağırsak mikrobiyotasını yararlı bakteriler lehine çevirebilmesindeki etki mekanizmasının, MOS'un bağırsak epitellerinde bulunan karbohidratlardan daha zengin bir karbonhidrat yapısında olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir. MOS yaklaşık olarak %50 karbonhidrat türevidir. Bağırsakta bulunan patojen bakteriler, lektin adı verilen yüzey proteinleri ile bağırsak epitellerinde mevcut olan karbonhidratları bağlarlar. MOS hali hazırda bağırsak sistemindeki karbonhidrat yapısından daha zengin olduğu için, patojen bakteriler için bir tuzak görevi görerek lektinlere daha önce tutunup onları bloke etmektedir. Böylelikle patojen bakterilerin bağırsak epitellerine bağlanmasını engellemektedir. MOS'un kanatlıların bağırsak mikrobiyotasında gösterdiği bu yararlı etkiyi ekonomik önemi olan *Sparus aurata* ve *Dicentrarchus labrax* balık türleri üzerine de gösterdiği bildirilmiştir (Patterson ve Burkholder, 2003; Sarangi ve diğerleri, 2016; Carbone ve Faggio, 2016).

### 2.2.3. Tavuk yemlerinde kullanılan prebiyotik katkı maddeleri

Prebiyotikler yem tüketimini, yemden yararlanmayı ve verim performansını artırmak, ürün kalitesini iyileştirmek, bağırsak sağlığını korumak ve bağırsıklığı güçlendirmek amacıyla kanatlılarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Kum ve Sekkin, 2012). Kanatlılarda özellikle tavuklarda yaygın olarak kullanılan başlıca prebiyotikler fruktooligosakkarit (FOS), mannanoligosakkarit (MOS), galaktooligosakkarit (GOS) ve inülin gibi oligosakkaritler ve oligofruktanlardır (Yalçınkaya, Güngör, Başalan ve Erdem, 2008; Alataş, Gürbüz ve Balevi, 2010; Yalçınkaya ve Leblebiciler 2012; Nabizadeh, 2012; Kutlu ve Şahin, 2017; Üstündağ ve Özdoğan, 2017). Tavuklarda en yaygın olarak kullanılan prebiyotik bileşikler oligosakkaritlerdir. Oligosakkaritler, ince bağırsakta hidrolize veya absorbe edilemezken, kolon bölgesinde özellikle *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp. tarafından fermente edilebilmekte ve prebiyotik özellik göstermektedirler (Marx, Winkler ve Hartmeier, 2000; Sezen, 2013).

#### 2.2.4. Tavuk prebiyotik katkı maddelerinin performans ve sağlık üzerine etkileri

Tavuk yemlerinde kullanılan prebiyotik katkı maddeleri, bağırsaktaki *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi yararlı bakteriler tarafından metabolize edilir. Böylelikle bağırsak mikrobiyotası yararlı bakteriler lehine modifiye olur. Bu yararlı bakteriler prebiyotikleri kısa zincirli yağ asitlerine (KZYA) fermente ederler. KZYA, bağırsak pH'sını düşürür ve bağırsak epitel hücreleri için enerji kaynağını oluşturarak, iltihap modülatörleri ve metabolik düzenlemeler üzerine önemli etkilerde bulunur. İyi dengelenmiş bir bağırsak mikrobiyotası bağırsak mukozal yapısını geliştirir. Bağırsak mikrobiyotasında baskın hale gelen yararlı bakterilerden bazıları antibakteriyal bileşikler üretir veya dentrik hücrelere sinyaller göndererek bağışıklık sistemini uyarır. Prebiyotiklerin, özellikle oligosakkaritler ve monosakkaritlerin patojenlerin epitel hücre yüzeyine yapışması için kullanılan reseptör bölgeleri bloke ederek patojen kolonizasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Patterson ve Burkholder, 2003; Shalaei, Hosseini ve Zergani, 2014). Tavuk yemlerinde yaygın olarak kullanılan prebiyotik katkı maddelerinin performans ve sağlık üzerine yararlı etkileri Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Tavuk prebiyotiklerinin performans ve sağlık üzerine etkileri (Kareem, Loh, Foo, Akit ve Samsudin, 2016; Abdelqader, Irshaid ve Al-Fataftah, 2013; Abudabos, Al-Batshan ve Murshed, 2015; Shalaei, Hosseini ve Zergani, 2014; Adhikari ve diğerleri, 2018; Shang, Kumar, Thippareddi ve Kim, 2018)

| Prebiyotik | Tür             | Etki                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| İnülin     | Etlik piliç     | Yemden yararlanma ve canlı ağırlığında artış, ileum villus yüksekliğinde artış ve patojen bakterilerin sayısında azalış                                                                                                                                                       |
| İnülin     | Yumurtacı tavuk | Yemden yararlanma, yumurta ağırlığı ve kabuk kalınlığında artış, bağırsağın ileum bölgesindeki <i>Lactobacillus</i> ve <i>Bifidobacterium</i> grubu yararlı bakterilerin sayısında artış, ileumda <i>Clostridium</i> ve <i>Coliform</i> grubu patojenlerinin sayısında azalma |
| MOS        | Etlik piliç     | Yemden yararlanma ve canlı ağırlık oranında artış, antikor üretimini artırarak bağışıklık sistemini güçlendirme ve <i>Clostridium perfringens</i> patojen bakterisinin sayısında azalış                                                                                       |
| MOS        | Yumurtacı tavuk | Yemden yararlanma, yumurta verimi ve yumurta kalitesinde artış                                                                                                                                                                                                                |
| GOS        | Etlik piliç     | Yemden yararlanma ile büyüme performansında artış ve bağışıklığın düzenlenmesi                                                                                                                                                                                                |
| GOS        | Yumurtacı tavuk | Yumurta kabuk kalitesi ve yumurta veriminde artış                                                                                                                                                                                                                             |
| FOS        | Etlik piliç     | Yemden yararlanma ve büyüme performansında artış                                                                                                                                                                                                                              |
| FOS        | Yumurtacı tavuk | Yumurta kütlesi ve kabuk kalitesinde artış, dışkıda <i>Salmonella enteritidis</i> azalması                                                                                                                                                                                    |

Prebiyotikler, Çizelge 2.1’de verilen etki mekanizmalarından dolayı, tavuklarda yemden yararlanmayı artırarak canlı ağırlık artışı ile büyüme performansını arttırmak, yumurta kalitesini iyileştirmek ve bağırsak sağlığını korumak amaçları ile tavukların beslenmesinde yaygın olarak kullanıldıklarından bu konularda tavuklar üzerinde yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Kahraman ve arkadaşlarının (2009) yapmış olduğu bir çalışmada yumurta tavuğu rasyonlarında farklı düzeylerde (0, 0,5 ve 1,0 kg/ton karma) MOS kullanımının performans, yumurta kalitesi, organ ağırlıklarına etkileri araştırılmıştır. Araştırmada 55 haftalık damızlık yumurtacı tavukları kullanılmış ve deneme 12 hafta sürdürülmüştür. Tavuklara 2700 kcal/kg MOS ve %16 ham protein içeren izokalorik ve izonitrojenik rasyonlar verilmiştir. Kabuk kırılma mukavemeti bakımından yemlere prebiyotik ilavesi yapılan gruplarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli bir artış gözlenmiştir. Kabuk kalınlığı da 0,5 kg/ton prebiyotik ilaveli grupta önemli artış göstermiştir. Yumurtalarda ak yüksekliği ve Haugh birimi 1,0 kg/ ton düzeyinde prebiyotik ilavesiyle önemli düzeyde artmıştır. Yumurta sarı rengi, 1,0 kg/ ton düzeyinde prebiyotik ilaveli grupta diğerlerine oranla daha yüksek bulunmuştur. Organ ağırlıklarından kalp ağırlığı haricinde herhangi bir fark tespit edilmemiş; kalp ağırlığı 1,0 kg/ton düzeyinde prebiyotik ilaveli gruplarda daha yüksek bulunmuştur. Kalp oransal ağırlığı ise 0,5 ve 1,0 kg/ ton prebiyotik ilaveli gruplarda önemli oranda artmıştır. Sonuç olarak, yumurta tavuğu rasyonlarına 1,0 kg/ ton düzeyinde prebiyotik ilavesinin yumurta kalitesini yükselttiği tespit edilmiştir. Kim ve arkadaşlarının (2011) etlik piliçler üzerine yürütmüş oldukları bir çalışmada % 0,25 FOS ve %0,05 MOS’un yemlere ilavesi ile birlikte hayvanların canlı ağırlık artışlarında yükselme meydana geldiğini bildirmişlerdir. Prebiyotik yem katkısı olarak oligosakkaritlerin etlik civcivlerin büyüme performanslarına olan olumlu etkileri yanında bağışıklık düzenleyici, antioksidant, antimikrobiyal etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Światkiewicz, Swiatkiewicz, Arczewska-Wlosek ve Jozefiak 2015).

Tavuklarda prebiyotik yem katkı maddesi olarak kullanılan inülinin, spesifik ve seçici olarak bakteriyel gelişimi uyardığı tespit edilmiştir. İnülin sindirim kanalında *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* ve belli başlı bütirik asit üreten yararlı bakterilerin gelişmesini seçici olarak uyarırken, aynı zamanda *Clostridium perfringens* gibi patojenik bakterilerin çoğalmasını da durdurabildiği bildirilmiştir (Zentek, Marquart, Pietrzak, Ballevre ve Rochat, 2003). İnülinin tavuklarda sindirim sistemi morfolojisi ve dışkı parametreleri ile ilgili ilişkisini ortaya koyan çalışmalar da mevcuttur. Yusrizal ve Chen (2003)’in broyler üzerinde inülin ve oligofruktanın dışkı ve bağırsak mikroflorası üzerine

etkilerini araştırdıkları bir çalışmada deneme gruplarının yemlerine sırasıyla %1 inülin ve %1 oligofruktoz katmışlardır. Her iki deneme grubunda dördüncü haftada dışkıda total aerob ve *E. coli* sayısında önemli bir azalma görülmüştür. Dişi broylerlerde taşlık ve ince bağırsak içeriğindeki *Lactobacillus* sayısında artış görülürken, kalın bağırsak total *Campylobacter* sayısı her iki deneme grubunda önemli derecede düşük bulunmuştur. Ayrıca, dişi broylerlerde her iki deneme grubunda da dışkıda *Lactobacillus* sayısında artış görülmüştür. Bunun yanında ince bağırsakta erkek broylerlerde *Campylobacter* sayısı, dişi broylerlerde de *Salmonella* sayısı düşük bulunmuştur. Bunun yanında inülinin bağırsakta fermentasyonu ile açığa çıkan son ürün kısa zincirli yağ asitlerinin hücre proliferasyonunu uyarak bağırsak gelişimine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Blottieres, Champ, Hoebler, Michel ve Cherbut, 1999). Chen ve Chen (2003)'ün yapmış oldukları bir çalışmada yemlere katılan inülin ve oligofruktozun, etlik piliçlerde yemden yararlanma oranı, canlı ağırlık artışı, karkas ağırlığı ve bağırsak uzunluğunu arttırdığını bildirmişlerdir. İnülinin tavuklarda mineral emilimi üzerine yapılmış olan çalışmalar da mevcuttur. Rasyondaki minerallerin emilim düzeyi, minerallerden yararlanılabilme seviyesinin tespit edilmesinde kritik bir faktördür. Ortiz ve arkadaşlarının (2009) yapmış oldukları bir çalışmada broylerlerde rasyona inülini farklı düzeylerde (5, 10, 15 ve 20 g/kg) ilave etmişlerdir. Bu deneme 5 hafta sürmüştür ve sonuçta rasyonlarına inülin katılan broyler grupta kontrol grubuna göre kısmi kalsiyum, çinko ve bakır emiliminin daha fazla olduğu görülmüştür. Yumurta tavuklarında yapılan ve 4 hafta süren başka bir çalışmada ise rasyona %1 oligofruktoz ve %1 inülin ilavesi tibia kül, kalsiyum ve fosfor düzeylerini kontrol grubuna göre önemli düzeyde arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca yine bu çalışmada denemenin birinci haftasından sonra yumurta kabuğu ağırlığı ve dayanıklılığının da önemli derecede arttığı belirlenmiştir (Chen ve Chen, 2004).

### 2.3. Sinbiyotikler

Sinbiyotikler, probiyotikleri ve prebiyotikleri sinerjistik bir formda birleştiren besin takviyelerini ifade eder (Sekhon ve Jairath, 2010). Bu kombinasyon, sağlığı teşvik eden probiyotik organizmanın spesifik substratı fermentasyon için kullanabileceğinden, probiyotiğin bağırsakta yaşamını ve kalıcılığını artırabilir (Yang, Iji ve Choct, 2009). Sinbiyotik kullanmanın temel nedeni, prebiyotik substratı olmadan bir probiyotiğin sindirim sisteminde iyi hayatta kalamayacağı düşüncesidir. Probiyotik için gerekli besin

kaynağı verildiğinde, oksijen, düşük pH ve sıcaklık için daha önemli bir avantajı olacaktır (Sekhon ve Jairath, 2010).

Hayvansal üretimde büyüme promotörü olarak antibiyotiklerin kullanımını kısıtlama veya yasaklama girişimleri göz önüne alındığında, probiyotikler, prebiyotikler ve her ikisinin de kombinasyonlarından oluşan sinbiyotiklerin kullanımının antibiyotiklere karşı potansiyel alternatifler olduğu öne sürülmüştür. Abdel-Raheem ve diğerlerinin (2012) yaptıkları çalışmada broyler tavukların beslenmesinde sinbiyotiklerin kullanılmasının, probiyotik veya prebiyotiklerin tek başına kullanılmasına göre büyümeyi daha çok desteklediği görülmüştür. Bunun yanı sıra sinbiyotik takviyeli piliçlerin duodenum, jejunum, ileumda diğer tedavilere kıyasla anlamlı derecede yüksek villus yüksekliği tespit edilmiştir. Sinbiyotiklerin broyler performansına etkilerini göstermek için Awad ve diğerlerinin (2009) yapmış oldukları araştırmada, sinbiyotik bir ürünle diyet takviyesinin, kontrol gruplarına ve probiyotikle beslenen diğer gruplara göre vücut ağırlığını, günlük ortalama kazancı, yem verimini ve karkas verim yüzdesini önemli ölçüde iyileştirdiği belirlenmiştir. Broyler tavukların beslenmesinde sinbiyotiklerin kullanılmasının tavukların büyüme ve kör bağırsak mikrobiyotası üzerine etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada 11 adet *Lactobacillus* cinsi bakterilerin oluşturduğu probiyotik karışım, GOS ile birlikte sinbiyotik olarak 42 gün boyunca tavuklara verilmiştir. Sonuç olarak probiyotik veya prebiyotiklerin tek başına kullanılmasına göre sinbiyotik takviyeli piliçlerin kör bağırsaklarında *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* populasyonlarının önemli ölçüde arttığı ve büyümeyi performansını arttırdığı görülmüştür (Mookiah, Sieo, Ramasamy, Abdullah ve Ho, 2014).

#### 2.4. Ekzopolisakkaritler (EPS)

Ekzopolisakkaritler (EPS) glikozid bağları ile birbirine bağlı monosakkaritlerden oluşan, düz veya dallanmış yapıda, suda çözünebilen iyonik veya iyonik olmayan, geri dönüşebilen ve çevre dostu doğal polimerlerdir (Leigh ve Walker, 1994; Freitas, Alves ve Reis, 2011). Bakteriyel EPS'lerin çoğunluğu düzenli oligosakkaritlerin tekrarlanan birimlerinden oluşmuş heteropolisakkarit (HePS) yapıdadır. Bazı bakteriyel EPS'ler ise homopolisakkarit (HoPS) yapıda olup, tek tip şekerden meydana gelmiştir (Milci ve Yaygın 2005). HoPS'ler farklı bağ tipi ve dallanma dereceleri ile D-glukoz (glukanlar) veya D-fruktoz (fruktanlar) birimlerinden oluşmaktadır. HePS'ler ise oligosakkaritlerin çoklu kopyalarından oluşmakta ve genellikle glukoz, galaktoz, ksiloz, mannoz, arabinoz ve



ramnoz şekerlerini içermektedir. HoPS'lerin ortalama molekül ağırlıkları yaklaşık olarak  $10^7$  Da iken, HePS'lerin molekül ağırlıklarının  $10^4$ - $10^6$  Da olduğu bildirilmiştir (Kristo, Miao ve Corredig, 2011; Tükenmez ve Aslım, 2018).

EPS'ler birçok bakteri, maya, küf, fungus ve arke türleri tarafından sentezlenmektedir. Ancak özellikle *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus* ve *Azotobacter* gibi bakterilerin miktar ve çeşit bakımından en iyi EPS üreticileri oldukları belirlenmiştir. Mikrobiyal EPS'ler sayıca oldukça fazla olmalarına rağmen dekstran, ksantan, jellan, pullulan, kurdlan ve levan gibi EPS'ler endüstriyel açıdan önemli olanlara örnek verilebilir (Lee ve diğerleri, 1997; Roller ve Dea, 1992; Crescenzi, 1995; Donot, Fontana, Baccou ve Galindo, 2012). EPS üretimi bakteriyel üreme ile yakından ilgili olduğundan optimum koşullar altında üretim miktarı yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Bakteriyel gelişim ve EPS üretimi; besiyerindeki karbonhidrat ve azot kaynaklarından, vitamin, tuz gibi maddelerin ilavesinden, inkübasyon sıcaklığı ve süresinden, oksijen seviyesinden ve pH gibi etmenlerden etkilenmektedir (Soyuçok, Ekiz ve Kılıç, 2016).

EPS'ler, adezyon, hücreler arası iletişim, biyofilm oluşumu ve hücreleri ekstrem koşullara karşı korumak gibi birçok farklı biyolojik süreçte rol almaktadır. Laktik asit bakterilerinin oluşturdukları EPS, epitelyum doku ile bakteriler arasında (bağırsak florasında bulunan) gerçek bir bağ meydana getirir ve böylece EPS üretimine sahip suşların yüksek bir adezyon kapasitesine sahip olacağı bildirilmektedir. Bu özellikler EPS'nin probiyotik açıdan önemini artırır niteliktedir (De Vuyst ve Degeest 1999; Suresh Kumar, Mody ve Jha, 2007; Mann ve Wozniak, 2012).

EPS'nin endüstride kullanılması bu molekülün kapsüller veya salgılanır olması, bileşimi, büyüklüğü ve şeker içeriği gibi özelliklerine bağlıdır (Faber, Zoon, Kamerling ve Vliegenthart, 1998; Dabour, Kheadr, Fliss ve LaPointe, 2005). Sahip oldukları farklı fizikokimyasal ve reolojik özelliklerinden dolayı petrol, gıda, tekstil, detarjan, kozmetik, tarım ve atık su arıtımı gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Jelleştirme, kıvam arttırıcı ve biyofilm tabakası oluşturma özelliklerinin yanında, ekzopolisakkaritler ilaç sektöründe; anti-tümör, anti-viral ve anti-inflamatuar gibi fizyolojik aktivite ajanlarına yardımcı madde olarak da kullanılmaktadır Laktik asit bakterilerine ait EPS özel tadı olmayan fermente süt ürünlerinin kıvamlarını, yapılarını iyileştirmek amacıyla kullanılabilir. EPS aynı zamanda süt ürünlerinin raf ömrünü de arttıran bir bileşiktir

(Sutherland, 1998; Iyer, Mody ve Jha, 2006; Karaca, Dinçer ve Kıvanç, 2010; Freitas, Torres ve Reis, 2017).

#### 2.4.1. EPS'nin prebiyotik olarak kullanımı

Fermente olabilen karbonhidrat bileşenleri olan prebiyotikler, probiyotiklerin aktivitelerini ve/veya gelişimini seçici olarak stimule ederek, konakçı sağlığını desteklemektedir (Salazar, Gueimonde, de los Reyes-Gavilan ve Ruas-Madiedo, 2016). Laktik asit bakterilerinin EPS'sinin gastrointestinal sistemde, probiyotik mikroorganizmaların gelişimini ve aktivitesini arttırmak gibi doğrudan ya da dolaylı olarak prebiyotik rolü olduğu bildirilmektedir (Welman ve Maddox, 2003; Singh, Saini ve Kennedy, 2008). Söz konusu prebiyotik etkiyi probiyotiklerin EPS'leri parçalayabilen enzimlere sahip olması sağlamaktadır. Ayrıca EPS'lerin bağırsak mikrobiyotası için yararlı olan probiyotik bakterilerin, kolona yapışmasını teşvik ettiği ve bu bakterilerin kolonizasyonunu kolaylaştırdığı da bildirilmiştir (O'Connor ve diğerleri, 2005; Patel ve Prajapat, 2013).

Das ve diğerleri (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, *in vitro* ortamda hazırlanmış yapay mide suyuna *L. plantarum* DM5 suşu tarafından üretilen EPS ( $\alpha$ -D glukana tipi HoPS)'nin eklenmesi ile probiyotik bakterilerin iyi gelişme gösterdikleri, probiyotik olmayan *Enterobacteriaceae* gibi bakterilerin zayıf gelişme gösterdikleri rapor edilmiştir. Bu çalışma EPS'nin prebiyotik aktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır. Yapılan başka çalışmalarda *L. plantarum* TISTR 875'den elde edilen HePS'nin ve *L. lactis* suşu tarafından üretilen HoPS'nin kolonda bulunan bifidobakteriler ve laktobasiller gibi probiyotikler tarafından fermente edildiğini ve bu probiyotiklerin büyümesini seçici bir şekilde artırdığı bildirilmiştir (Hongpattarakere, Cherntong, Wichienchot, Kolida ve Rastall, 2012; Grosu-Tudor, Zamfir, Meulen, Falony ve Vuyst, 2013). Yapılan bazı *in vitro* çalışmalar bağırsak mikrobiyotası için yararlı olan laktobasilleri gibi türlerin bağırsak hücrelerine yapışmasında EPS'nin verimliliği arttırabileceği ortaya konulmuştur. Probiyotik *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin HT-29 hücrelerine adezyonunun sitometri analizi ile değerlendirildiği bir çalışmada, HT-29 hücrelerine adezyon gösteren laktobasillerin EPS ürettikleri bildirilmiştir. Bu çalışmada EPS'nin *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin HT-29 hücrelerine adezyonunda etkin bir rolü olduğu sonucuna varılmıştır (Kodaikkal, Prajapati ve Ljungh, 2012).

#### 2.4.2. EPS'lerin laktik asit bakterilerinin gelişimini düzenleyici (LGD) etkisi

Laktik asit bakterileri hayvan bağırsak sisteminin doğal mikroflorasının önemli bakteri grubunu oluşturmaktadırlar. Laktik asit bakterileri bakteriyosin sentezi, antibiyotiklere dirençlilik, ekzopolisakkarit üretimi, bakteriyofaj dirençlilik, bağışıklık sisteminin geliştirilmesi, kolesterolün düzenlenmesi, kansere neden olan maddelerin detoksikasyonu ve gıdaların sindirilebilirliğini arttırmak gibi probiyotik özellikleri bakımından sağlık açısından yararlı etkileri ile öne çıkmaktadır (Sağlam ve Karahan, 2017). Uygun miktarlarda alındıklarında konakçıya sağlık açısından önemli faydalar sağlayan probiyotiklerden yaklaşık olarak 30 *Lactobacillus* cinsi bakterilerin EPS ürettiği gözlemlenmiştir (Badel, Bernardi ve Michaud, 2011).

LGD etkisi bakımından EPS'lerin, gastrointestinal sistemde daha uzun süre kalarak probiyotik bakterilerin kolonizasyonunu artırmak gibi rollerinin olduğu bildirilmiştir (Welman ve Maddox, 2003). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin T-lenfositlerinin çoğalmasını, makrofaj aktivasyonunu ve sitokinlerin (interferon- $\gamma$ , interleukin-1 $\alpha$ ) üretimini sağlayarak immün sistemi güçlendirdiği böylece bağırsaktaki patojen kolonizasyonunu engelleyerek bağırsak mikroflorasını yararlı bakteriler lehine çevirmek suretiyle LGD etkisi gösterdiği rapor edilmiştir (Ruas-Madiedo, Hugenholtz ve Zoon, 2002). Yapılan başka bir çalışmada ise EPS'lerin bağırsakta bulunan ve konakçı sağlığı açısından yararlı olarak kabul edilen *Lactobacillus* grubu bakteriler tarafından fermente edilerek onlar için enerji kaynağı oluşturduğu ve bu şekilde *Lactobacillus* grubu bakterilerin seçici olarak çoğalmalarını sağladığı bildirilmiştir. Bu etkiyi ise, kolona gelen EPS'lerin bakteriler tarafından fermentasyonu sonucu oluşan kısa zincirli yağ asitlerinden dolayı kolon pH'sını düşürüp, ortamı aside dirençli olan yararlı bakteriler için (*Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, *Eubacteria* gibi) uygun hale getirerek gösterdiği rapor edilmiştir (Korakli, Ganzle ve Vogel, 2002). Yapılan bir diğer *in vitro* çalışmada *Lactobacillus plantarum* suşundan elde edilen EPS'lerin prebiyotik olarak, probiyotik özellik gösteren laktik asit bakteri tarafından fermente edilebildiği ve bu bakteriler üzerine LGD etkisi gösterdiği rapor edilmiştir (Tsuda ve Miyamoto, 2010). EPS'nin LGD etkisinin araştırıldığı diğer bir çalışmada *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin gelişiminde kullanılan uygun besiyerinin glukoz kaynağı çıkarılıp yerine aynı oranda *L. buchneri* GM3701 ve *L. plantarum* RB-3 suşlarından elde edilen EPS'ler eklenmiştir. 24 saat inkübasyon sonunda laktobasillerin gelişimi ölçülmüş ve EPS'nin laktik asit bakterileri tarafından fermente

edilebildiği bunun yanında EPS'nin laktik asit bakterilerinin gelişimini arttırdığı rapor edilmiştir (Tsuda, Okuda, Haraguchi ve Kodama, 2018).

## 2.5. Filtratların Laktik Asit Bakterilerinin Gelişimini Düzenleyici (LGD) Etkisi

Hayvanlarda sindirim sisteminin doğal mikroflorasını oluşturan yararlı mikroorganizmalar laktik asit, asetik asit, propiyonik asit gibi organik asitler üretirler. Bunların yem katkı maddesi olarak kullanımı ile sindirim kanalındaki mikroflora dengesi yararlı mikroorganizmalar lehine çevrilir ve böylece patojenik mikroorganizmaların üremeleri engellenir. Laktik asit bakterilerinden elde edilen kültür filtratlarının bağırsak mikrobiyotası için yararlı olan bifidobakterilerin gelişimi ve canlılığı üzerine yapılmış bir çalışmada test bakterisi olarak kullanılan tüm suşların kültür filtratlarının, bifidobakterilerin gelişimini düzenlediğini bildirilmiştir (Sarıkaya, Aslim ve Yuksekdağ, 2017). Ancak laktik asit bakterilerinden elde edilen laktik asit, fumarik asit, propiyonik asit, sitrik asit, asetik asit gibi organik asitlerden oluşan metabolitlerin hayvan beslemesinde geniş kullanım olanaklarına sahip olduğu bildirilmiştir. Organik asitler çoğunlukla yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır ve bunların etki mekanizmaları bağırsakta pH'sını düşürerek, bağırsak sisteminde asit ortamı yaratması şeklindedir. Oluşan asit ortamında patojen mikroorganizmaların gelişimi baskılanarak enzim aktivitesinin yükseldiği bildirilmiştir. Kolonda oluşan asit ortamına ve enzim aktivitesinin yükselmesine bağılı olarak özellikle Laktobasillerin gelişimi için gerekli olan demir, kalsiyum, fosfor, magnezyum, çinko gibi minerallerin bakteriler tarafından yararlılığı artmaktadır. Tüm bu özelliklerinden dolayı organik asitler hayvanlarda kolonda LGD etkisi gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca kümes hayvanlarında sık görülen *Salmonella* enfeksiyonunun kontrolü için laktik asit bakterilerinden elde edilen organik asitler hayvan beslemesinde kullanılmaktadır. (Kahraman ve diğerleri, 1999; Alp, Kahraman, Kocabağı, Abaş ve Aksu, 1999; Karademir ve Karademir 2003; Mani-López, García ve López-Malo, 2012). Yapılan bir çalışmada broylerlerin yemlerine organik asit katılmış ve bunun sonunca ilum mikroflorasında yararlı bakterilerin gelişimine bağılı olarak canlı ağırlığında artış, ileum pH'sında ve Enterobacteriaceae sayısında düşüş sağlandığını bildirilmiştir (Alp, Kocabağı, Kahraman ve Bostan, 1999). Yapılan bir diğer çalışmada broylerde organik asit içeren diyet takviyelerinin bağırsak histomorfolojisi ve serum biyokimyası üzerine olan etkilerine bakılmış ve fumarik asit, bütirik asit ve laktik asit diyet takviyelerinin tüm deneme gruplarında broyler performansları üzerinde bağırsak villus

yüksekliğini ve serumda kalsiyum ve fosfor konsantrasyonlarını arttırmak gibi olumlu etkilerde bulunduğu bildirilmiştir (Adil, Banday, Bhat, Mir ve Rehman, 2010).

## 2.6. Tavuk Yemlerinde Kullanılan Antikoksidial Katkı Maddeleri

Kümes hayvanlarında çok yaygın ve maliyetli hastalıklardan biri olan koksidiyozis, *Eimeria* türü protozoonlar tarafından meydana getirilen ve kümes hayvancılığında ekonomik kayıplara yol açan bir protozoon enfeksiyonudur. *Eimeria* türlerinde bulaşma dışkı yolu ile olmaktadır. Dışkı ile atılan ve uygun koşullarda belli bir sürede spor haline geçen oocystler, enfekte gıdalar aracılığıyla oral olarak alınması ile bir kanatlıdan diğerine hızlı bir şekilde yayılabilmektedir. Enfekte tavuklarda oocyst atılımı, bireye göre de değişmekle birlikte kısa sürede çok yüksek rakamlara ulaşabilmektedir. Koksidiyozis, bağırsaklarda doku hasarına sebep olarak, hayvanın aldığı yemlerin sindirimi ve besin maddesi emilimine engel olup ağırlık kaybı ile birlikte kanlı dışkı ile sonlanır. Enfeksiyon hızla yayılarak birçok hayvanın ölümüne sebep olabilir. Tavuklarda direkt olarak ölüme veya yemden yararlanmada gerileme ile birlikte canlı ağırlık kaybına yol açan koksidiyozisin, dünyada ve ülkemizde kanatlıların en önemli hastalıklarından birisi olduğu kabul edilmektedir. Bu hastalığın dünyada ve ülkemizde büyük ekonomik kayıplara neden olduğu bilinmektedir. Ancak dünyada ve ülkemizde hastalığa neden olan *Eimeria* türleri üzerinde epidemiyolojik çalışmalar ve bu türlerin tavukların bağırsak mikrobiyotasında ne gibi etkilere sebep olduğunu araştıran çalışmaların yok denecek kadar az olması nedeni ile ortaya çıkan ekonomik kayıpların boyutları tam olarak bilinmemektedir (Williams, 1999; Tuncer, 2007; Sundar, Harikrishnan, Latha, Chandra ve Kumar, 2017).

Modern tavukçuluk işletmelerinin tavuklar için sınırlı ve dar alanları kullanması sebebi ile bulaşma için alınan hijyen önlemleri yeterli olmayıp, koksidiyozis yemle verilen antikoksidiallarla ve aşılarla kontrol edilmektedir. Tavukları koksidiyozisten korumak için en çok kullanılan ilaçlar sülfonamidler, nitrofuranlar ve iyonofor antibiyotiklerdir. Hayvanlara yemle birlikte verilen iyonofor antibiyotikler, monensin sodyum, lasalocid ve salinomycin sodyumu içermektedir. Piliçlerde koksidiyozisi kontrol amacı ile kullanılan iyonoforların kullanımı kanatlılarda sınırlandırılmamıştır. Kanatlıları etkileyen hastalıklarda antibiyotiklerin kullanımı ile uygulanan ilaçlara karşı direnç gelişimi, kanatlı sektöründe en büyük problemlerden birini oluşturmaktadır. Türkiye’de kullanılan başlıca antikoksidial etken maddeleri; monensin sodium, robenidine hydrochloride, halofuginone

hydrobromide, narasin, salinomycin sodium, maduramicin ammonium, diclazuril, nicarbazin ve semduramicin sodium dur (Ziggers, 2002; Paganini 2005; Tuncer, 2007; Sharman, Smith, Wallach ve Katrib, 2010).

Son yıllarda antikoksidial ilaçlara karşı *Eimeria* 'ların gösterdiği direnç problemi nedeni ile antikoksidial kullanılmayan tavuklara olan talep atmıştır. Bunun yanında *in vivo* koşullarda antikoksidial ilaçların *Eimeria* türü protozoonlara karşı gösterdiği etki ile bağırsak morfolojisi ve mikrobiyotası üzerindeki etkinlikleri arasında önemli ayrımlar bulunmaktadır. Bu nedenle antikoksidial ilaçların bağırsak sistemindeki etkinliğinin bilinmesi büyük önem taşımaya rağmen bu konuda ticari olarak kullanılan bu ürünlerle yapılan çalışmalar oldukça azdır. Yapılan bir çalışmada ticari olarak kullanılan antikoksidial bir ilacın (Amprolium+Ethopabate) tavuklarda bağırsak morfolojisi ve büyüme performansı üzerine olan etkileri araştırılmıştır. 308 adet Ross cinsi tavuklar üzerinde yapılan bu araştırma koksidiyozun kontrolü veya önlenmesi sırasında yem ile birlikte kullanılan antikoksidial ilacın bağırsak morfolojisini değiştirdiği özellikle bağırsaklardaki emici yüzeyler ve villus boyutlarında olumsuz etkiler gösterdiği bununla birlikte tavukların büyüme performansını da olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Bu çalışmada yalnızca antikoksidial ilacın bağırsak morfolojisindeki değişimlerine bakılmış bağırsak mikrobiyotasında ne gibi etkiler yarattığı araştırılmamıştır. Ancak tavuklarda görülen büyüme performansı geriliği nedeni ile antikoksidial ilacın bağırsak mikrobiyotasının da dengesini bozduğunu düşündürmektedir (Bahadoran, Hassanpour, Kheirabadi ve Shekarchian, 2014).

Antikoksidial ilaçların tavuklar için yukarıda belirtilen zararlı etkilerine karşı çeşitli diyet ve canlı mikrobiyal takviyelerin enterik hastalıklara karşı konakçı bağışıklığı etkileyebileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda etlik piliç yemlerine probiyotik ilavesi ile *Eimeria* etkenine karşı etkin bir bağışıklık ve dayanıklılık başarıları elde edilerek koksidiyozun önlenmesinde önemli bir ilerleme sağlanmıştır. Etlik piliçler üzerinde yapılan bir çalışmada *Pediococcus* tabanlı ticari bir probiyotığın tavuklarda büyüme performansı, oocyst atılımı ve bağışıklık sisteminde antikor tepkileri araştırılmıştır. Etlik piliçler iki gruba ayrılmış ve bir grup 10.000 *Eimeria acervulina* diğer grup ise 5.000 *Eimeria tenella* oocyst ile enfekte edilmiştir. Bu gruplarda kendi içlerinde ikiye ayrılarak bir grup probiyotik destekli diyet bir grup ise desteksiz diyet ile beslenmiştir. Enfekte edilmiş tüm etlik piliçlerde probiyotik diyetler beslenen grupta

kontrol grubuna göre oocyst atılımında düşüş ve kilo alımında iyileşme görülmüştür. Ayrıca *Eimeria tenella* ile enfekte edilen ve probiyotik diyetle beslenen piliçlerde, kontrol grubuna göre *Eimeria*'ya özgü antikor seviyesinde de artış görülmüştür. Etlik piliçler üzerinde yapılan benzer bir diğer çalışmada da *Pediococcus acidilactici* and *Saccharomyces boulardii* içeren ticari bir probiyotiğin benzer tavuklarda vücut ağırlığı artışı, dışkıda oocyst atılımı ve serum antikor seviyeleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu araştırmada da bir önceki çalışmadaki benzer sonuçlar elde edilerek probiyotik takviyeli yemlerin humoral bağışıklığı artırarak tavukların koksidiyozise karşı direncini arttırabileceği bildirilmiştir (Dalloul ve Lillehoj, 2006; Lee ve diğerleri, 2007, Lee, Lillehoj, Park, Hong ve Lin, 2007). Ticari olarak kullanılan antikoksidiyallerin doğrudan bağırsak mikrobiyotası üzerine olan etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu antikoksidiyallerin kullanımında sindirim sisteminde yararlı mikrobiyotanın yok olma riskinin de oldukça yüksek olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında antikoksidiyal kullanımlarında ilaçlara karşı zamanla tavuklarda direnç oluşabileceği gibi bu ilaç kalıntılarının zamanla insan sağlığında da tehlike yaratma durumunun söz konusu olduğu düşünülmektedir (Mansoor, Jamil, Khan, ul Haq ve Anwar, 2017).

## 2.7. Tavuk Yemlerinde Antibiyotik Kullanımına Genel Bakış

Ülkemizde, son 20 yılda kanatlı hayvan sektöründe büyük ilerleme kaydedilmiştir. Özellikle tavukçuluk, büyük bir büyüme ve gelişme göstererek, bambaşka bir sektör haline gelmiştir. Etlik piliç yetiştiriciliği, kırmızı et üretiminde yaşanan sorunlar ve kırmızı et fiyatlarında süregelen artışlar nedeni ile ülkemizde artan nüfus ile birlikte hayvansal protein açığının kapatılmasında stratejik olarak öne çıkarmaktadır. Nitekim tavukçuluk sektörü hayvansal proteinlerin, kısa sürede ve ucuz olarak üretilebilmesinde, kırmızı et sektörüne göre önemli avantajlara sahiptir. Günümüz tavukçuluk işletmelerinde oldukça stresli ortamlarda yaşayan kanatlılardan yüksek verim elde etmek için hayvan sağlığını korumanın yanında yemden yararlanma yeteneğinin de üst düzeye çıkarılması gerekmektedir. Yem katkı maddeleri bu amaçla kullanılan yöntemlerden birisidir. Karma yemlerde hammaddeler dışında hayvanların değişik ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla mineraller, vitaminler, antibiyotikler, koruyucular, vb. yem katkı maddeleri kullanılmaktadır (Demir ve Aydın, 2019). Kanatlılarda verimi arttırmak ve ekonomik faydalar sağlamak amacı ile antibiyotikler yemlerde uzun yıllar kullanılmıştır. Antibiyotik kullanımı ile yemden yararlanma ve büyümede gözlemlenen olumlu sonuçlar

antimikrobiyal etki ile açıklanmıştır. Ancak, antibiyotiklerin yoğun kullanımları sonucu kalıntı bırakarak hem hayvan hem de insan sağlığını tehdit etmekte ve uzun süre kullanılmaları durumunda dirençli bakterilerin gelişimine neden olmaktadır. Antibiyotiklerin yemlerde kullanılmasının insan tüketimine sunulan hayvansal gıdalarda sağlık açısından risk oluşturmalarının yanında, antibiyotik kullanımı hayvanın sindirim sistemindeki patojen mikroorganizmalarla beraber yararlı mikroorganizmaların da ölümüne neden olmaktadır. Antibiyotiklerin bu gibi dezavantajlarından dolayı 01.01.2006 tarihinden itibaren Avrupa Birliği'nde, 21.01.2006 tarihinden itibaren ise Türkiye'de kullanımları yasaklanmıştır. Antibiyotiklerin tavuk yemlerinde kullanımlarındaki yasaklamalar ve şüpheler biyoteknolojik alanda gelişmelere paralel olarak alternatif uygulamaların araştırılmasına yol açmıştır (Tuncer, 2007; Karademir ve Karademir, 2003; Resmi Gazete, 2006).

Kanatlı hayvanlarda antibiyotiklerin yasaklanmasından ortaya çıkan boşluğun doldurulması amacı ile mikrobiyotayı iyileştirmek ve besin maddelerinin sindirilebilirliğini artırmak amacıyla karma yemlere değişik katkı maddelerinin ilavesi devreye girmiştir. Bu doğal yem katkı maddeleri, farklı etki mekanizmalarıyla mikrobiyota içerisinde patojen mikroorganizmaların gelişmesini engellemektedirler. Bu kapsamda antibiyotiklere alternatif olabilecek enzimler, organik asitler, probiyotik ve prebiyotik gibi katkılar üzerinde çalışmalar hızlanmıştır. Tavuk yemlerinde kullanılan probiyotiklerin, patojenleri baskılayıp bağırsak mikrobiyotasını yararlı mikroorganizmalar lehine değiştirerek ve bağırsak villus boyunu artırarak yemden yararlanmayı arttırdığı ve de bağışıklığı desteklediği bildirilmiştir. Yeme katılan prebiyotik katkıların, tavuk bağırsağında bulunan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi yararlı mikroorganizmalar tarafından fermente edilirken patojenler tarafından kullanılamaması nedeni ile bağırsak mikrobiyotasını yararlı bakteriler lehine modifiye ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, bağırsaklarda mineral Emilimini arttırdığı ve bağışıklık sistemini güçlendirerek hayvan sağlığına olumlu katkılarda bulunduğu rapor edilmiştir (Tüzün ve Çiftçi, 2010; Kaushal ve diğerleri, 2018; Biswas, Mohan, Raza, Mir ve Mandal, 2019). Bahsedilen yem katkı maddelerinin temininde yurtdışına bağımlı olduğumuzdan hem ülkemizde hem de yurt dışında dolaşımını sağlayacak ticari patentli yeni yem katkı maddelerinin tavukçuluk sektörünün kullanımına sunulmasına dair çalışmalara ihtiyaç vardır.





### 3. MATERİYAL VE METOT

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Bu tez çalışmasında Tarımsal Araştırma ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenen, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı tarafından yürütülen TAGEM/15/AR-GE/40 kodlu projesi kapsamında serbest gezen köy tavuklarının bağırsaklarından izole edilmiş ve fizyolojik testleri yapılmış 50 *Lactobacillus* cinsine ait izolat kullanılmıştır. Bu izolatların tez çalışması kapsamında ekzopolisakkarit (EPS) üretim kapasiteleri belirlenmiş ve tez çalışmaları için en yüksek EPS üretim kapasitesine sahip, *Lactobacillus salivarius* BİS312, BİS722, BİS820 ve ZDM2132 suşları ile *Lactobacillus reuteri* BİS612 suşu olmak üzere beş adet izolat seçilmiştir. Bu beş izolatın biyokimyasal testleri (API 20A, 20E ve 50CH kitleri ile) ve 16S rDNA dizilerine göre moleküler tanımlamaları TAGEM/15/AR-GE/40 projesi kapsamında başka bir çalışma için yapıldığından dolayı sonuçlar tezde verilmemiştir.

#### 3.2. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı

Bu tez çalışmasında yüksek EPS üretim kapasitesine sahip *Lactobacillus salivarius* BİS722 suşunun hücreye adezyon yeteneklerinin belirlenmesinde HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücre hattı (ATCC® HTB-38™) kullanılmıştır.

#### 3.3. Çalışmada Kullanılan Besiyeri

Çalışmada kullanılan Laktik asit bakteri kültürlerinin geliştirilmesinde De Man Rogosa Sharpe (MRS) besiyeri kullanılmıştır. MRS broth ve MRS agar besi ortamları içeriği Çizelge 3.1.'de verilmiştir. MRS besiyeri için aşağıda belirtilen miktarlarda maddeler tartılıp, bir miktar distile su ile maddeler tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Maddeler tamamen çözüldükten sonra son hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmış ve pH  $6,20 \pm 0,02$ 'e ayarlanmıştır. MRS agar besiyeri için, MRS besi ortamına %1,5 oranında agar (Merck) eklenmiştir. Hazırlanan besiyerleri otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edilmiştir.

Çizelge 3.1. MRS broth besiyeri içeriği

| Maddeler                  | Miktar (g/L) |
|---------------------------|--------------|
| Pepton                    | 10,0         |
| Beef Ekstrakt             | 10,0         |
| Yeast Ekstrakt            | 5,00         |
| Glukoz                    | 20,0         |
| Sodyum Asetat             | 5,00         |
| Tri Amonyum Sitrat        | 2,00         |
| Magnezyum Sülfat          | 0,20         |
| Manganez Sülfat           | 0,05         |
| Di sodyum hidrojen fosfat | 2,00         |
| Tween 80                  | 1 mL         |

### 3.4. Çalışmada Kullanılan Laktobasillerin Geliştirilmesi ve Muhafazası

*Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin geliştirilmesinde MRS broth ve MRS agar besi ortamları kullanılmıştır. Her çalışma öncesinde saflık kontrolleri yapılan bakteriler, MRS broth içinde 37°C’de 18-20 saat inkübasyona bırakılmış ve en az iki kez aktifleştirildikten sonra, çalışmaya alınmıştır. Çalışmada kullanılan laktobasil kültür stokları MRS broth besi ortamında iki kez aktifleştirildikten sonra %2 oranında, içerisinde 400 µL gliserol bulunan kriyo tüplere (kriyo tüpler içlerinde gliserol ile birlikte önceden 121°C’de 15 dk. sterilize edilmiştir) 1:1 oranında aktararak, -20°C ve -80°C’de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Suşların uzun süre muhafazası için ise, literatürdeki metotlar modifiye edilerek elde edilen liyofilizasyon yöntemi kullanılmıştır (Castro, Teixeira ve Kirby, 1996). Aktif laktobasil kültürlerinden %2 oranında alınmış ve MRS agar besiyerlerine drigalski özesi ile yayma ekim yapılmıştır. Ekim yapılan tüm petriler 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası besiyerinde oluşan 50-60 koloni alınarak içerisinde 750 µL steril serum fizyolojik (SF) bulunan ependorflara aktarılmış ve pipetle karıştırılmıştır. SF %0,875 oranında sodyum klorür (NaCl)’ün tartılarak 100 mL saf su içerisinde çözündürülmesi ve otoklavda 121°C’ de 15 dk. steril edilmesi ile elde edilmiştir. Hazırlanan bu bakteri karışımından 250 µL alınarak içerisinde 750 µL steril Skimmed Milk Broth (LAB) bulunan vialler içerisine aktarılmıştır. Vialler -80°C’de derin dondurucuda bir gece bekletilmiş ve ertesi gün liyofilizatör cihazında (CHRIST, Alpha 2-4 LD plus) dondurulup, kurutularak toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen kültürler +4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

### 3.5. Laktobasillerin Kültür Ortamında EPS  retimlerinin Belirlenmesi

#### EPS'nin saflaştırılması

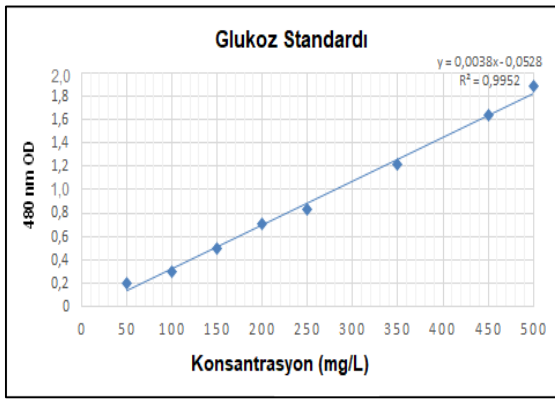
Bu  alışmada *L. salivarius* B S312, B S722, B S820 ve ZDM2132 suşları ile *L. reuteri* B S612 suşunun EPS  retim miktarlarının belirlenmesinde ilgili metot modifiye edilerek kullanılmıştır (Marshall ve Rawson, 1999). *Lactobacillus* cinsine ait bakteri kültürleri 37 C'de MRS broth besiyerinde en az iki kez aktifleştirildikten sonra çalışmaya alınmıştır. Aktifleştirilmiş bakteriler, Den-1 cihazında (Densitometer, bioSan) McFarland 7 bulanıklık değerine ( $\sim 7,3 \log \text{ kob/mL}$ ) ayarlanarak standart bir bulanıklık değeri oluşturulduktan sonra, MRS broth besi ortamlarına %2 oranında aşılanmış ve 37 C'de 18-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda örneklerden 1'er mL ependorf tüplerine alınarak, 95 C'de 10-15 dk. benmari usul  ısıtılmıştır. Örnekler oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulmuş ve 1 mL'lik örnekler üzerine %85'lik triklorasetikasit (TCA, Sigma) ilave edilerek 13000 rpm'de 25 dk. santrifüj (NF 400, Nüve) edilmiştir. Santrifüj sonucunda filtratlar yeni ependorf tüplerine alınarak, üzerlerine 1 (süpernatant)'e 3 (alkol) oranında soğuk saf %96'lık etanol (Sigma) eklenmiştir. Örnekler +4 C'de 13000 rpm'de 25 dk. santrifüj edilerek EPS'nin presipite olması sağlanmıştır. Presipite olan EPS'nin üzerindeki etanol uzaklaştırılmış ve üzerine 1 mL %96'lık etanol eklenmiş ve yeniden +4 C'de 13000 rpm'de 25 dk. santrifüj edilmiştir. Bu işlemin ardından presipite olan EPS'nin üzerindeki etanol yine uzaklaştırılmış ve pellet 1 mL distile suda  z ld kten sonra, fenol sülfürik asit metodu uygulanarak dalga boyu okuma (OD okuma mg/L) işlemi ile her bakteri suşu için EPS miktarı belirlenmiştir.

#### Fenol-sülfürik asit metodu ile EPS miktarının belirlenmesi

Fenol-sülfürik asit metodu yöntemi ile EPS miktarlarının belirlenmesinde ilgili metot modifiye edilerek uygulanmıştır (DuBois, Gilles, Hamilton, Rebers ve Smith, 1956). 1 mL distile suda üzülen pelletler ve 1 mL saf su (k rv olarak kullanılmıştır), cam tüpler içeresine alınarak  eker ocakta, üzerlerine 0,5 mL fenol (Sigma) ve 5 mL sülfürik asit (Merck) eklenerek, oda sıcaklığında 10 dk. bekletildikten sonra, vorteks yardımı ile iyice karıştırılmış ve 37 C'de 20 dk. bekletilmiştir. Sonrasında örneklerin optik yoğunlukları, 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak  l  lm ştir.

### Glukoz standardına göre EPS miktarının belirlenmesi

*Lactobacillus* cinsi bakterilerin ürettiği EPS miktarının mg/L olarak hesaplanabilmesi amacı ile 50-500 mg/L arasında değişen oranlarda hazırlanan glukoz çözeltilerinden yukarıda verilen fenol sülfirik asit metoduna göre glukoz standardı hazırlanmıştır. Ölçülen değerlere göre bir standart eğrisi (bk. Şekil 3.1) çıkarılarak elde edilen  $y=0,0038x-0,0528$  formülü, *Lactobacillus* cinsi bakterilerin ürettiği EPS miktarlarının mg/L olarak hesaplanmasında kullanılmıştır.

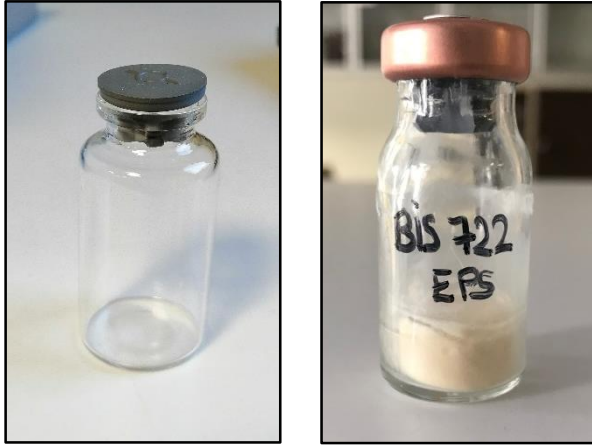


Şekil 3.1. Glukoz standart eğrisi

### **3.6. EPS'lerin Kültür Ortamından Kısmi Saflaştırılması ve Lizofilizasyonu**

Çalışmada kullanılan *L. salivarius* BİS312, BİS722, BİS820 ve ZDM2132 suşları ile *L. reuteri* BİS612 suşundan elde edilen EPS'nin liyofilizasyonu için ilgili metot modifiye edilerek kullanılmıştır (Kanmani, Yuvaraj, Paari, Pattukumar ve Arul, 2011). *Lactobacillus* kültürleri 37°C'de MRS broth besiyerinde en az iki kez aktifleştirildikten sonra çalışmaya alınmıştır. Aktifleştirilmiş bakteriler, 800 mL'lik büyük hacimli besiyeri içerisine %2 oranında ekilmiş ve EPS üretiminin gerçekleşmesi için 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kültürler 10 dk. 95°C'de sıcak su banyosunda (Hitachi) tutulmuştur. Bu işlemin ardından oda sıcaklığına gelene kadar soğutulan kültürlerle %4 oranında %80'lik TCA (Sigma) eklenerek, iki saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve 9.000 rpm'de 15 dk. santrifüj yapılarak proteinler çöktürülmüştür. Bu işlemde sonra süpernatant bir balonda toplanmış ve üzerine üç katı kadar soğuk %96'lık etanol (Sigma) eklenerek bir gece +4°C'de bekletilmiştir. Bekletme işleminin ardından örnekler 9.000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilerek, EPS çöktürülmüştür. Çökmüş olan EPS'lerin üzerindeki etanol

uzaklaştırılarak, EPS'ler 1 mL distile saf suda çözünmüş ve viallere 500 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Ardından bir gece  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda bekletilmiştir. Viallerde bulunan saflaştırılmış EPS'ler liyofilizatör cihazında dondurmak sureti ile kurutulup toz haline getirilerek liyofilize EPS (L-EPS) elde edilmiştir (bkz. Resim 3.1).



Resim 3.1. Boş vial görüntüsü (solda), liyofilizasyon sonrası vialde toz haline getirilen *L. salivarius* BİS722 suşunun L-EPS görüntüsü (sağda)

### 3.7. L-EPS'lerin Fenol Sülfirik Asidi Metodu İle EPS Miktar Tayini

İzole edilip, liyofilizasyon işlemi ile toz haline getirilen L-EPS'lerin miktarlarını ölçmek için, her bir vialde bulunan L-EPS'ler 1 mg/L oranında distile su içerisinde çözündürülmüştür. Elde edilen süspansiyondan 1 mL alınmış ve miktar ölçümü için Bölüm 3.5. başlığı altında anlatılan fenol-sülfirik asit metodu uygulanarak, L-EPS'lerin EPS miktarları belirlenmiştir.

### 3.8. Kültür Ortamındaki EPS'ler İle L-EPS'lerin EPS Miktarları Karşılaştırılması

Kültür ortamından elde edilen EPS'ler Bölüm 3.5 başlığı altında anlatılan EPS'nin saflaştırılması metoduna göre saflaştırıldıktan sonra 1 mg/mL oranında distile su içinde çözündürülmüştür. Bölüm 3.6 başlığında verilen metoda göre toz haline getirilen L-EPS'ler de 1 mg/L oranında distile su içerisinde çözündürülmüştür. Bu iki şekilde hazırlanan çözeltilerden 1'er mL cam tüpler içine alınarak EPS miktar tayini Bölüm 3.5 başlığı altında verilen fenol-sülfirik asit metodu uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.9. Farklı Azot Kaynakları ve Sükroz Kombinasyonlarının *L. salivarius* Suşlarında EPS Üretim Miktarı Üzerine Etkisi

Bu çalışmada kültür ortamında yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olan *L. salivarius* BIS312, BIS722 ve ZDM2132 suşlarının EPS üretim verimini artıracak azot kaynakları ve karbon kaynağı olarak sükroz kullanımı ile kombinasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır. Seçilen azot kaynakları ve karbon konusunda Cerning ve diğerleri (1994), Ismail ve Nampoothiri (2010) ile Khanh ve diğerlerinin (2016) yapmış oldukları çalışmalardan yararlanılmıştır. Suşlar, MRS besi ortamındaki bütün bileşenler sabit tutularak, Çizelge 3.2’de verilen oranlarda azot kaynakları ve sükroz konularak zenginleştirilmiş besi ortamında geliştirilmiştir. Kontrol besi ortamı olarak MRS (bkz. Çizelge 3.1) kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. MRS besiyerinin zenginleştirilmesinde kullanılan azot kaynakları çeşitleri ve oranları ile sükroz oranı

| Besiyeri İçeriği           | Azot Kaynakları ve Sükroz % Oranlar <sup>b</sup> |     |     |
|----------------------------|--------------------------------------------------|-----|-----|
|                            | 0,5                                              | 1,0 | 2,0 |
| Kontrol Grubu <sup>a</sup> | -                                                | -   | -   |
| <u>N Kaynakları</u>        |                                                  |     |     |
| Pepton                     | +P                                               | -   | -   |
| Beef Extract               | +BE                                              | -   | -   |
| Trypton                    | -                                                | +T  | -   |
| <u>C Kaynağı</u>           |                                                  |     |     |
| Sükroz                     | -                                                | -   | +S  |

<sup>a</sup> Çizelge 3.1.’de verilen MRS broth besiyeri ortamı (bkz. Bölüm 3.3)

<sup>b</sup> Çizelge 3.1.’de verilen MRS broth besiyeri içerisine ilave edilen azot kaynakları ve sükroz

Besi ortamı içindeki azot kaynakları çeşitleri ve oranları ile sükroz oranının, seçilen *L. salivarius* suşlarının EPS üretim kapasitelerine olan etkisi belirlenmiştir. Trypton ile sükrozun birlikte kullanımının EPS üretim kapasitesini artırıcı etkisi olup olmadığının tespit edilmesi için iki farklı kombinasyon hazırlanmıştır. Birinci kombinasyonda suşlar, MRS besi ortamındaki bütün bileşenler sabit tutularak, %1 tripton ve %2 sükroz konularak zenginleştirilmiş besi ortamında geliştirilmiştir. İkinci kombinasyonda ise MRS besi ortamındaki %2 glukoz çıkarılarak yerine %2 sükroz ilave edilmiş ve %1 tripton ile zenginleştirilmiş MRS besi ortamında geliştirilmiştir. Yine bu çalışmada da kontrol besi ortamı olarak MRS (bkz. Çizelge 3.1) kullanılmıştır. Suşların besi ortamlarında ürettikleri

EPS'lerin belirlenmesi Bölüm 3.5'de verilen yöntemle göre yapılmıştır. Tüm örnekler spektrofotometrede 490 nm optik yoğunluğunda (OD) ölçülmüş ve Şekil 3.1'de verilen glukoz standart eğrisi grafiğine göre EPS miktarları, mg/L olarak hesaplanmıştır.

### 3.10. *L. salivarius* BİS820 ve *L. reuteri* BİS612 Suşlarının Gelişim Eğrilerinin Belirlenmesi

Tavuk bağırsak mikrobiyotasında dominant olarak bulunan ve tavuk bağırsak mikrobiyota dengesi için önemli olan *L. salivarius* BİS820 ve *L. reuteri* BİS612 suşları, *L. salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin fermente edilebilme ve yine bu suşlardan elde edilen L-EPS ile filtratların laktik asit bakterisi gelişimi düzenleyici (LGD) etkilerinin belirlenmesi deneylerinde test bakterisi olarak kullanılmıştır. Bu amaçla bu suşların gelişim eğrileri çıkarılmış ve bu sonuçlardan elde edilen verilere göre deneylerde geliştirilmiştir. *L. salivarius* BİS820 ve *L. reuteri* BİS612 suşları McFarland standardına göre 7 bulanıklık değerine ayarlanmış ve her bir McFarland 7 bulanıklık değerine ayarlanan tüplerden MRS broth içerisinde %2'lik ekim yapılmıştır. *Lactobacillus* kültürleri 37°C'de MRS broth besiyerinde en az iki kez aktifleştirildikten sonra çalışmaya alınmıştır. Aktifleştirilen *Lactobacillus* kültürleri farklı sürelerde (18-24-36 ve 48 saat) 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Gelişim süreleri sonunda Gürgün ve Halkman (1990)'ın sayım yöntemine göre koloni sayımı yapılmıştır. Bakterilerden %2 oranında alınmış ve içerisinde 1 mL serum fizyolojik (SF) çözeltisi bulunan ependorfa aktararak  $10^{-1}$ 'den  $10^{-7}$ 'e kadar üç paralel olmak üzere seri dilüsyonlar yapılmıştır. Çalışmada kullanılan SF, %0,875 oranında sodyum klorür (NaCl)'ün tartılarak 100 mL saf su içerisinde çözündürülmesi ve otoklavda 121°C' de 15 dk. steril edilmesi ile elde edilmiştir.  $10^{-3}$ - $10^{-7}$  dilüsyonları arasından MRS agar besiyerlerine drigalski özesi ile yayma ekim yapılmıştır Ekim yapılan tüm petriler 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılmış ve  $1/0,1 \times \text{Ortalama Koloni Sayısı} \times \text{Seyreltme Faktörü}$  (Koloni Sayımı) formülüne göre toplam bakteri sayısı log kob/mL cinsinden hesaplanmıştır.

### 3.11. L-EPS'lerin Laktobasiller Tarafından Fermente Edilmesi

Laktobasillerin L-EPS'yi fermente edip edemediklerini araştırmak için, Tsuda ve diğerlerinin (2018) yapmış oldukları çalışmadan yararlanılmıştır. MRS broth besiyerinde %2 oranında bulunan glukoz tamamen çıkarılmış ve yerine aynı miktarda *L. salivarius*



BİS312 ve BİS722 suşlarından elde edilen L-EPS'ler 0,45 µm por çaplı disposable filtrelerden geçirilerek (L-EPS<sub>BİS312</sub> ve L-EPS<sub>BİS722</sub>) eklenmiştir. Kontrol gruplarında ise MRS broth besiyeri (bkz. Çizelge 3.1) kullanılmıştır. *L. salivarius* BİS820 ve *L. reuteri* BİS612 suşlarına ait aktif bakteri kültürleri McFarland 7 bulanıklık değerine ayarlanmış (~7,3 log kob/mL) ve aktif kültürler yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan besi yerlerine %2 oranında aşılanarak, 37°C'de sırası ile 24 ve 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürlerin pH değişimleri pH metre (Hanna) ile ölçülmüş ve canlılık değerleri Bölüm 3.10'da anlatılan Gürgün ve Halkman (1990)'ın sayım yöntemine göre seri dilüsyonlar yapılarak log kob/mL cinsinden hesaplanmıştır.

### **3.12. *L. salivarius* BİS312 ve BİS722 Suşlarının Kültür Filtratları ve L-EPS'lerinin *L. salivarius* BİS820 ve *L. reuteri* BİS612 Suşları Üzerinde Laktobasil Gelişim Düzenleyici (LGD) Etkisinin Belirlenmesi**

Kültür filtratları ve L-EPS'lerin LGD etkisinin belirlenebilmesi için, *L. salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarının, farklı konsantrasyonlardaki (%2,5, %5 ve %10) kültür filtratları (Filtrat<sub>BİS312</sub> ve Filtrat<sub>BİS722</sub>) ve L-EPS'leri (L-EPS<sub>BİS312</sub> ve L-EPS<sub>BİS722</sub>) *L. reuteri* BİS612 ve *L. salivarius* BİS820 suşları üzerinde denenmiştir. Test bakterisi olarak iki farklı suş kullanılmasının nedeni *L. salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarının, farklı konsantrasyonlardaki kültür filtratları ve L-EPS'lerinin farklı türler üzerinde gelişimi düzenleyici etkisinin ortaya konulmak istenmesidir.

Kültür filtratlarının LGD etkisinin belirlenmesinde, MRS besiyerine McFarland 7 bulanıklık değerine (~7,3 log kob/mL) ayarlanan aktif *L. salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarına ait bakteri kültürleri %2 oranında aşılanmıştır. 37°C'de 24 saat inkübasyon sonunda, kültürler 13000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Laktik asit bakterilerine ait filtratlar (Filtrat<sub>BİS312</sub> ve Filtrat<sub>BİS722</sub>) 0,45 µm por çaplı disposable filtrelerden geçirilerek, içerisinde glukozu tamamen çıkarılmış steril 5 mL MRS broth besiyerlerine %2,5, %5 ve %10 oranlarında ilave edilmiştir. Bu deney tüplerine *L. reuteri* BİS612 ve *L. salivarius* BİS820 suşlarına ait aktif bakteri kültürleri, McFarland 7 bulanıklık değerine (~7,3 log kob/mL) ayarlanarak %2 oranında aşılanmıştır. L-EPS'lerin LGD etkisinin belirlenmesinde Bölüm 3.6'da verilen yöntemle göre liyofilize edilen L-EPS'ler kullanılmıştır. *L. reuteri* BİS612 ve *L. salivarius* BİS820 suşlarına ait aktif bakteri kültürleri, McFarland 7 bulanıklık değerine ayarlanarak, içerisinde %2,5, %5 ve %10 oranlarında 0,45 µm por çaplı disposable filtrelerden geçirilmiş L-EPS<sub>BİS312</sub> ve L-EPS<sub>BİS722</sub>

bulunan ve glukozu tamamen çıkarılmış 5 mL steril MRS broth besiyerlerine, %2 oranında aşılanmıştır. Glukozu tamamen çıkarılmış 5 mL steril MRS broth besiyeri negatif kontrol grubu, MRS broth besiyeri (bkz. Çizelge 3.1) ise pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Kültür filtratları ve L-EPS'lerin LGD etkisini ticari olarak kullanılan inülin prebiyotiği ile karşılaştırmak için glukozu tamamen çıkarılmış 5 mL steril MRS broth besiyeri bulunan deney tüplerine Filtrat<sub>BİS312</sub>, Filtrat<sub>BİS722</sub>, L-EPS<sub>BİS312</sub> ve L-EPS<sub>BİS722</sub> yerine aynı oranlarda (%2,5, %5 ve %10) inulin eklenmiştir. Pozitif ve negatif kontrol grubu deney tüpleri ile inülin eklenen deney tüplerine *L. reuteri* BİS612 ve *L. salivarius* BİS820 suşlarına ait aktif bakteri kültürleri, McFarland 7 bulanıklık değerine ( $\sim 7,3 \log \text{ kob/mL}$ ) ayarlanarak, %2 oranında aşılanmıştır. *L. reuteri* BİS612 suşunun aşılandığı tüm deney tüpleri 37°C'de 18 saat, *L. salivarius* BİS820 suşunun aşılandığı tüm deney tüpleri ise 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda deney tüplerinden %2 oranında bakteri alınmış ve içerisinde 1mL SF çözeltisi (bkz. Bölüm 3.10) bulunan ependorfa aktararak  $10^{-1}$ 'den  $10^{-8}$ 'e kadar üç paralel olmak üzere seri dilüsyonlar yapılmıştır.  $10^{-1}$ - $10^{-8}$  dilüsyonları arasından MRS agar besiyerlerine drigalski özesi ile yayma ekim yapılmış ve 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılmış ve koloni sayım formülüne göre (bkz. Bölüm 3.10) toplam bakteri sayısı  $\log \text{ kob/mL}$  cinsinden hesaplanmıştır.

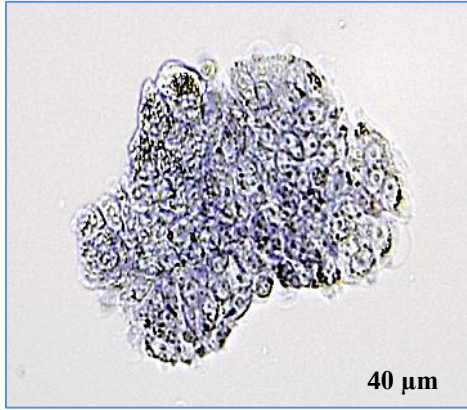
### 3.13. Antikoksidial Yem Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Salinomycinin Laktobasiller Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Bu çalışmada tavuklarda antikoksidial yem katkı maddesi olarak kullanılan ticari salinomycinin tavuk mikrobiyotası ve özellikle faydalı mikrobiyotayı temsil eden laktobasillere ne düzeyde etkisinin olduğunun ortaya konulması amaçlanmıştır. Salinomycinin 0,250 mg/L, 0,275 mg/L, 0,300 mg/L ve 0,350 mg/L konsantrasyonlarının tavuk bağırsağında dominant olan *L. salivarius* Bİ312 ve BİS722 suşlarının canlılığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Konsantrasyonların belirlenmesinde, "*Yem Katkıları ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı ve Kullanımı Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ*" den yararlanılmıştır. 26511 sayılı Resmi Gazete (2007)'de yayımlanan Tebliğ'e göre, salinomycinin piliç yemlerindeki aktif miktarın en az 50 mg/kg, en çok 70 mg/kg olacak şekilde kullanılmasına izin verilmiştir. *In vitro* deney ortamında salinomycine karşı koruyuculuğunu test edeceğimiz bakteriler 5 mL MRS broth

besiyerinde geliştirildiğinden hesaplamalar buna göre doğru orantı kurularak yapılmıştır. 5 mL'lik ortamda kullanılabilecek salinomycin miktarı en az 0,250 mg/L, en çok ise 0,350 mg/L'dir. Deney için üç farklı grup besiyeri hazırlanmıştır. Birinci grup besiyeri salinomycinin 0,45 µm por çaplı disposable filtrelerden geçirilerek steril ortamda 5 mL MRS broth besiyerlerine 0,250 mg/L, 0,275 mg/L, 0,300 mg/L ve 0,350 mg/L oranlarında ilave edilmesi ile hazırlanmıştır. İkinci grup besiyeri 5 mL MRS broth besiyerlerine 0,45 µm por çaplı disposable filtrelerden geçirilerek hazırlanan, %10 oranında L-EPS<sub>BIS312</sub>, L-EPS<sub>BIS722</sub>, Filtrat<sub>BIS312</sub> ve Filtrat<sub>BIS722</sub> ilave edilmiş deney tüplerine, 0,45 µm por çaplı disposable filtrelerden geçirilerek steril ortamda 0,250 mg/L, 0,275 mg/L, 0,300 mg/L ve 0,350 mg/L, salinomycin eklenmesi ile hazırlanmıştır. Üçüncü grup besi ortamında sadece 5 mL MRS broth besiyeri (bkz. Çizelge 3.1) kullanılmıştır. Aktif bakteri kültürleri McFarland 7 bulanıklık değerine (~7,3 log kob/mL) ayarlanmış ve %3 oranında aşılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kültür ortamından %3 oranında alınan bakteri, içerisinde 1 mL SF çözeltisi (bkz. Bölüm 3.11) bulunan ependorfa aktararak 10<sup>-1</sup>'den 10<sup>-8</sup>'e kadar üç paralel olmak üzere seri dilüsyonlar yapılmıştır. Dilüsyonlar arasından MRS agar besiyerlerine drigalski özesi ile yayma ekim yapılmış ve 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerinde oluşan tüm koloniler sayılmış ve koloni sayım formülüne göre (bkz. Bölüm 3.10) toplam bakteri sayısı log kob/mL cinsinden hesaplanmıştır.

### 3.14. Laktobasil ve Sinbiyotiklerin Adezyon Özelliklerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, en yüksek LGD aktivitesi gösteren ve aynı zamanda yüksek EPS üreticisi olan *L. salivarius* BIS722 suşu kullanılmıştır. *L. salivarius* BIS722 suşu (probiyotik uygulama) ve bu suş ile bu suştan elde edilen L-EPS ve filtrat kombinasyonlarının (sinbiyotik uygulama) HT-29 hücre hattında (bkz. Resim 3.2) tutunma yeteneği ilgili adezyon deneyi metodu modifiye edilerek çalışılmıştır (Jacobsen ve diğerleri, 1999).



Resim 3.2. Adezyon deneyinde kullanılan HT-29 hücre hattı

Hücrelere uygulanan *L. salivarius* BİS722 suşu McFarland 10 yoğunluğuna ( $\sim 9$  log kob/mL) ayarlanmıştır. Bunun yanında hücrelere uygulanan filtratlar ise, McFarland 7 bulanıklık değerine ( $\sim 7,3$  log kob/mL) ayarlanan aktif *L. salivarius* BİS722 suşuna ait bakteri kültürünün MRS besiyerine %2 oranında aşılınması ve  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyon sonunda kültürlerin 13000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilerek, *L. salivarius* BİS722 suşuna ait filtratın  $0,45\ \mu\text{m}$  por çaplı disposable filtreden geçirilmesi ile hazırlanmıştır. Hücrelere uygulanan L-EPS'lerde ise Bölüm 3.6'da verilen yöntemle göre liyofilize edilen L-EPS'ler kullanılmıştır. HT-29 hücreleri 4 mL DMEM besiyeri ile birlikte  $1 \times 10^5$  hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyulu mikropatlara aktarılmış ve besiyeri gün aşırı değiştirilmiştir. %80 yoğunluğa ulaşan hücreler, çalışmaya alınmıştır. Adezyon deneyinden 24 saat önce, hücrenin geliştiği DMEM besiyeri atılarak antibiyotik içermeyen 4 mL DMEM besiyeri ilave edilmiştir. 24 saat sonunda hücreler 2 kez 3 mL tuzlu fosfat tamponu PBS (pH 7,4) ile yıkanmıştır. Burada kullanılan PBS, 8,0 g NaCl, 5,2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 7,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 2,0 g KCl tartılarak bir miktar distile suda çözülmüş ve son hacmi distile su ile 1000 mL'ye tamamlanarak manyetik karıştırıcıda tüm maddeler homojen hale gelinceye kadar karıştırılıp,  $\text{pH } 7,20 \pm 0,02$ 'ye ayarlanması ile elde edilmiştir. Daha sonra hücrelere serum ve antibiyotik içermeyen 2 mL DMEM besiyeri eklenmiş ve hücreler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra McFarland 10 yoğunluğuna ( $\sim 9$  log kob/mL) ayarlanan aktif *L. salivarius* BİS722 suşu ve diğer sinbiyotiklerden (*L. salivarius* BİS722 suşu ile birlikte L-EPS<sub>BİS722</sub> ve Filtrat<sub>BİS722</sub>) 1 mL alınmış ve serum ile antibiyotik içermeyen 1 mL DMEM besiyeri ile hücrelere uygulanmıştır. Uygulamanın ardından hücreler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$ 'li etüvde 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, hücreler 5 kez PBS ile yıkanmıştır. Yıkamadan sonra her bir kuyucuğa hücrelerin tespit edilmesi için 3 mL metanol eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dk.

inkübasyona bırakılmıştır. Sonra, metanol uzaklaştırılmış ve sabitlenen hücreler %40'lık Giemsa boyası ile boyanarak oda sıcaklığında 20 dk. bekletilmiştir. Boyamadan sonra kuyular %96'lık etanol (Sigma) ile yıkanmış ve böylelikle fazla boya uzaklaştırılmıştır. Sonra hazırlanan preparatlar immersiyon yağı ile mikroskopta (Leica, Germany) incelenerek, bakteri ve hücrelerin sayımı yapılmıştır. Deney sonucunda adezyon yüzdesi (%AD) bakteri tutunmuş epitel hücre sayısı/toplam hücre sayısı x 100 (Otero ve Nader-Macias 2007), Adezyon indeksi (ADI) ise, bakteri sayısı/100 hücre formülü kullanılarak hesaplanmıştır. ADI'nin değerlendirilmesi; ADI >2500 ise güçlü adezyon, ADI; 2500 ile 500 arasında ise iyi adezyon, ADI; 500 ile 100 arasında ise zayıf adezyon ve ADI<100 ise adezyon yok şeklinde yapılmıştır (Guglielmetti ve diğerleri, 2010; Santagati, Scillato, Patané, Aiello ve Stefani, 2012).

### 3.15. İstatistiksel Analizler

Tüm mikrobiyolojik çalışmalar üç paralelli ve iki tekrarlı olarak yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar ve bu tekrarların ortalaması  $\pm$  standart sapma (SD) şeklinde verilmiştir.

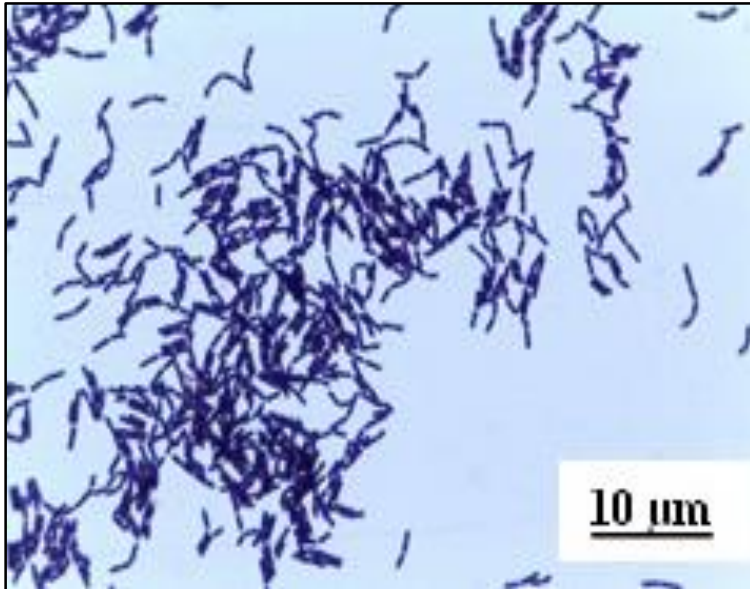
İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (16.0 Versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan laktik asit bakterilerinin EPS üretim miktarları arasındaki farklılığın ve farklı azot kaynakları ile sükrozun EPS üretimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi çalışmalarında, besi ortamı ve suşlar arasındaki EPS miktarı farklılığının anlamlı olup olmadığı LSD ve Tukey ( $p<0,05$ ) testleri ile analiz edilmiştir. *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen EPS'ler ile L-EPS'lerin miktarları arasındaki farklar ile besi ortamında kullanılan azot kaynaklarına (tripton, pepton, beef extract) göre EPS ve L-EPS miktarları arasındaki farklar t-Testi ( $p<0,05$ ) ile analiz edilmiştir. LGD aktivitesinin belirlenmesinde kontrol olarak kullanılan ticari prebiyotik inülinin, L-EPS ve kültür filtratlarının laktobasil gelişimi düzenleyici aktiviteleri arasındaki farklar LSD ve Tukey ( $p<0,05$ ) testleri ile analiz edilmiştir. Antikoksidiyal salinomycinin laktobasil ve sinbiyotikler üzerine etkisinin belirlendiği çalışmalarda probiyotik suş ve laktobasil kaynaklı L-EPS ile filtratların koruyucu etkisi arasındaki farklılıklarının analizinde t-Testi, LSD ve Tukey ( $p<0,05$ ) testleri kullanılmıştır. Adezyon çalışmasında ise probiyotik ve sinbiyotik uygulamalarının adezyon indekslerinin arasındaki farklılığın anlamlı olup olmadığı t-Testi ( $p<0,05$ ) analizleri ile belirlenmiştir.

## 4. DENEYSEL BULGULAR

### 4.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Bu çalışma kapsamında kullanılan *Lactobacillus* cinsine ait izolatlar, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan, TAGEM/15/AR-GE/40 kodlu “Probiyotik Kaynaklı Ekzopolisakkaritlerin (EPS) Kanatlı Yemlerinde Prebiyotik Katkı Olarak Kullanılmasının Araştırılması” projesi kapsamında serbest gezen sağlıklı köy tavuklarının bağırsağından izole edilmiş ve tanımlamaları yapılmış 50 izolat arasından yüksek EPS üretim kapasitelerine göre seçilmiştir. Suşların fizyolojik ve biyokimyasal testleri ile moleküler düzeyde tanımlamaları proje kapsamında farklı bir çalışmada yapılmış olduğundan sonuçlar bu tez kapsamında verilmemiştir.

Çalışma kapsamında kullanılan *L. salivarius* BİS312, BİS722, BİS820 ve ZDM2132 suşları ile *L. reuteri* BİS612 suşlarının saflık kontrolleri her çalışmada çizgi ekim ve mikroskopik inceleme ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılan, laktik asit bakterilerine ait iki farklı *Lactobacillus* cinsine ait türün Gram boyama sonucunda ışık mikroskopundaki (Leica, Germany) görüntüleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Resim 4.1. Çalışmadan kullanılan *L. salivarius* suşunun ışık mikroskopundaki görüntüsü (100X)

#### 4.2. Bakteri Kültürlerinin ve Liyofilizelerinin EPS Miktarları

Çalışmada kullanılan beş farklı laktobasil suşunun kültür ortamında ürettikleri EPS miktarları Bölüm 3.4’de anlatıldığı gibi fenol-sülfirik asit metoduna göre belirlenmiştir. Tüm suşların kültür ortamında ürettikleri EPS miktarları 358-440 mg/L olarak değişirken, L-EPS’ler 450-550 mg/L olarak belirlenmiştir. Suşların kültür ortamında ürettikleri EPS ile L-EPS’ler birbirini doğrulamıştır. Sonuçlar Çizelge 4.1’de üç deneyin ortalaması alınarak,  $\pm$  SD şeklinde verilmiştir. Liyofilizasyon sonrası en yüksek L-EPS miktarı, *L. salivarius*’un BİS312 (550 mg/L) ve BİS722 (510 mg/L) suşlarında belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Suşların kültür ortamı ve liyofilizasyon sonrası EPS miktarları

| Suşlar                       | EPS <sup>a</sup><br>(mg/L) | EPS <sup>b</sup><br>(mg/L) |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <i>L. salivarius</i> BİS312  | 440 $\pm$ 2                | 550 $\pm$ 3                |
| <i>L. salivarius</i> BİS722  | 415 $\pm$ 3                | 510 $\pm$ 2                |
| <i>L. salivarius</i> ZDM2132 | 365 $\pm$ 2                | 460 $\pm$ 4                |
| <i>L. salivarius</i> BİS820  | 360 $\pm$ 2                | 454 $\pm$ 3                |
| <i>L. reuteri</i> BİS612     | 358 $\pm$ 3                | 450 $\pm$ 3                |

a; 48 saat inkübasyon sonunda kültür ortamındaki EPS miktarları

b; Kültür ortamından saflaştırılan L-EPS miktarları

#### 4.3. Farklı Azot Kaynaklarının ve Sükrozun *L. salivarius* Suşlarında EPS Üretimi Üzerine Etkisi

Bu çalışma için, tavuk bağırsağı kaynaklı yüksek EPS üreticisi *L. salivarius* türüne ait BİS312, BİS722 ve ZDM2132 suşları seçilmiştir. Çalışmada, prebiyotik olarak kullanılması düşünülen EPS’nin, probiyotik bakterilerde EPS üretim kapasitesini arttırmak için farklı azot kaynakları ve sükrozla zenginleştirilmiş besiyeri ortamlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. N kaynakları her üç suşunda EPS üretimini arttırmıştır. Test edilen üç suşda da en iyi EPS üretimi %1 tripton ve %0,5 pepton ilavesi ile zenginleştirilmiş MRS besiyeri ortamında belirlenmiştir. %1 tripton içeren besi ortamında, BİS312, BİS722 ve ZDM2132 suşlarının EPS üretim kapasiteleri sırası ile %11, %25 ve %42 artış göstermiştir. %0,5 pepton içeren besi ortamında ise, BİS312, BİS722 ve ZDM2132 suşlarının EPS üretim kapasiteleri sırası ile %5, %15 ve %31 artış göstermiştir. Azot kaynağı ile zenginleştirilmiş besi ortamlarında tüm suşlarda EPS üretimi artmış ve bu artış düşük EPS üreticisi suşlarda

daha yüksek oranda belirlenmiştir. Tüm uygulamalarda en iyi sonuç %1 triptonla zenginleştirilmiş besi ortamında alınmıştır ve yine tüm uygulamalarda en yüksek EPS üreten suşun da BİS722 olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.2’de üç deneyin ortalaması alınarak  $\pm$  SD şeklinde verilmiştir.

İstatiksel olarak farklı N kaynakları ilave edilmiş MRS besi ortamında kontrole göre anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). %2 sükroz ilave edilmiş besi ortamında ise her üç suşun EPS üretiminde kontrol besi ortamına göre bir miktar artış olduğu görülmekle birlikte bu artış, dikkate değer bulunmamıştır.

Çizelge 4.2. Farklı azot ve karbon kaynaklarının kültür ortamında laktobasillerde EPS üretimi (mg/L) üzerine etkisi

| Bakteri Suşları              | Besiyeri İçeriği <sup>a</sup> | pH  | Bakteri Yoğunluğu (OD <sub>620</sub> ) | EPS Miktarı (mg/L) |
|------------------------------|-------------------------------|-----|----------------------------------------|--------------------|
| <i>L. salivarius</i> BİS312  | Kontrol <sup>b</sup>          | 3,7 | 2,6                                    | 430 $\pm$ 5        |
|                              | Azot Kaynakları               |     |                                        |                    |
|                              | %1 T <sup>c</sup>             | 3,7 | 2,6                                    | 475 $\pm$ 3        |
|                              | %0,5 P <sup>d</sup>           | 3,7 | 2,6                                    | 452 $\pm$ 3        |
|                              | %0,5 B <sup>e</sup>           | 3,7 | 2,6                                    | 431 $\pm$ 2        |
|                              | Karbon Kaynağı <sup>f</sup>   |     |                                        |                    |
| <i>L. salivarius</i> BİS722  | %2 S                          | 3,7 | 2,6                                    | 450 $\pm$ 6        |
|                              | Kontrol <sup>b</sup>          | 3,7 | 2,6                                    | 400 $\pm$ 3        |
|                              | Azot Kaynakları               |     |                                        |                    |
|                              | %1 T <sup>c</sup>             | 3,7 | 2,4                                    | 500 $\pm$ 2        |
|                              | %0,5 P <sup>d</sup>           | 3,7 | 2,6                                    | 460 $\pm$ 2        |
|                              | %0,5 B <sup>e</sup>           | 3,7 | 2,6                                    | 409 $\pm$ 3        |
| <i>L. salivarius</i> ZDM2132 | Karbon Kaynağı <sup>f</sup>   |     |                                        |                    |
|                              | %2 S                          | 3,6 | 2,7                                    | 420 $\pm$ 5        |
|                              | Kontrol <sup>b</sup>          | 3,7 | 2,6                                    | 339 $\pm$ 3        |
|                              | Azot Kaynakları               |     |                                        |                    |
|                              | %1 T <sup>c</sup>             | 3,7 | 2,5                                    | 480 $\pm$ 2        |
|                              | %0,5 P <sup>d</sup>           | 3,7 | 2,6                                    | 444 $\pm$ 3        |
| <i>L. salivarius</i> ZDM2132 | %0,5 B <sup>e</sup>           | 3,7 | 2,7                                    | 349 $\pm$ 3        |
|                              | Karbon Kaynağı <sup>f</sup>   |     |                                        |                    |
|                              | %2 S                          | 3,6 | 2,7                                    | 341 $\pm$ 4        |

a; Azot ve karbon kaynakları ve oranlarına göre besi ortamları

b; MRS besiyeri

c; %1 tripton ilave edilerek zenginleştirilmiş MRS besi ortamı

d; %0,5 pepton ilave edilerek zenginleştirilmiş MRS besi ortamı

e; %0,5 beef extract ilave edilerek zenginleştirilmiş MRS besi ortamı

f; Glukoz içermeyen MRS besiyerine glukoz yerine %2 sükroz ilavesi ile hazırlanmıştır.



#### 4.4. Tripton ve Sükroz Kombinasyonlu MRS Besi Ortamının *L. salivarius* Suşlarında EPS Üretimi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada, her üç suş içinde (*L. salivarius* BİS312, BİS722 ve ZDM2132) en iyi EPS üretiminin belirlendiği azot kaynağı triptonun yanına sükrozun ilave edildiği, ayrıca aynı kombinasyonun glukozu çıkarılmış MRS besi ortamlarında *L. salivarius* suşlarının EPS üretim kapasitesini ne yönde etkilediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Azot ve karbon kaynağı ile zenginleştirilmiş MRS besi ortamında kontrole göre her üç suşda da EPS üretiminin önemli bir şekilde arttığı gözlenmiştir. En yüksek artış, her üç suş için de glukozu çıkarılmış MRS'ye %2 sükroz ilavesi ve %1 tripton ile zenginleştirilmiş MRS besi ortamında belirlenmiştir. Tüm kombinasyonlarda en iyi EPS üretimi ise BİS722 suşunda görülmüştür (MRS<sub>T+S</sub>'de 780 mg/L, Gluk-MRS<sub>T+S</sub>'de 801 mg/L). Sonuçlar Çizelge 4.3'de üç deneyin ortalaması alınarak,  $\pm$  SD şeklinde verilmiştir.

İstatiksel olarak tripton ve sükroz kombinasyonlu tüm MRS besi ortamlarında kontrole göre anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ).

Çizelge 4.3. Farklı azot ve karbon kaynağı kombinasyonlarının kültür ortamında laktobasillerde EPS üretimi (mg/L) üzerine etkisi

| Bakteri Suşları              | Besiyeri İçeriği*                    | pH  | Bakteri Yoğunluğu (OD <sub>620</sub> ) | EPS Miktarı (mg/L) |
|------------------------------|--------------------------------------|-----|----------------------------------------|--------------------|
| <i>L. salivarius</i> BİS312  | Kontrol <sup>a</sup>                 | 3,6 | 2,3                                    | 418 $\pm$ 5        |
|                              | MRS <sub>T+S</sub> <sup>b</sup>      | 3,4 | 2,3                                    | 573 $\pm$ 1        |
|                              | Gluk-MRS <sub>T+S</sub> <sup>c</sup> | 3,4 | 2,4                                    | 580 $\pm$ 2        |
| <i>L. salivarius</i> BİS722  | Kontrol <sup>a</sup>                 | 3,6 | 2,3                                    | 413 $\pm$ 6        |
|                              | MRS <sub>T+S</sub> <sup>b</sup>      | 3,3 | 2,4                                    | 780 $\pm$ 14       |
|                              | Gluk-MRS <sub>T+S</sub> <sup>c</sup> | 3,3 | 2,4                                    | 801 $\pm$ 10       |
| <i>L. salivarius</i> ZDM2132 | Kontrol <sup>a</sup>                 | 3,6 | 2,3                                    | 362 $\pm$ 8        |
|                              | MRS <sub>T+S</sub> <sup>b</sup>      | 3,5 | 2,3                                    | 515 $\pm$ 5        |
|                              | Gluk-MRS <sub>T+S</sub> <sup>c</sup> | 3,5 | 2,3                                    | 516 $\pm$ 6        |

\*Besi ortamı içerisindeki karbon ve azot kaynakları kombinasyonu

a; MRS besiyeri

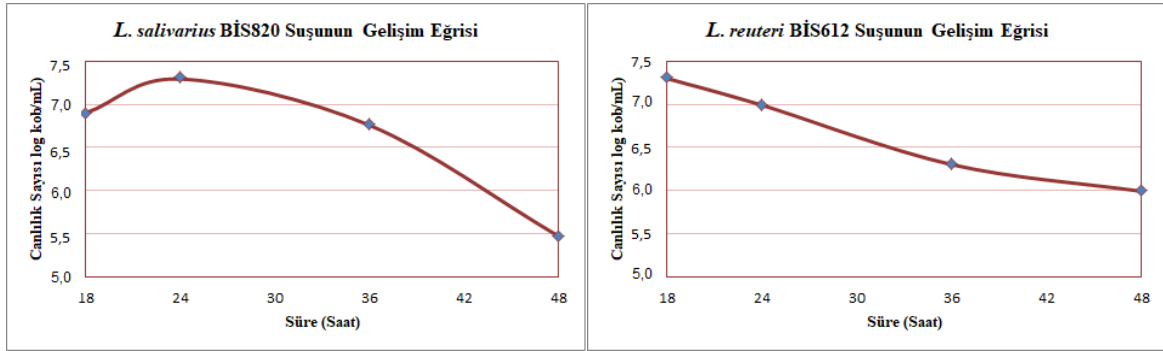
b; %1 tripton + %2 sükroz ilave edilerek zenginleştirilmiş MRS besi ortamı

c; Glukozu çıkarılarak yerine %2 sükroz ilave edilmiş ve %1 tripton ile zenginleştirilmiş MRS besi ortamı

#### 4.5. *L. salivarius* BİS820 ve *L. reuteri* BİS612 Suşlarının Gelişim Eğrileri

Tavuk bağırsağında dominant olarak bulunan *L. salivarius* BİS820 ve *L. reuteri* BİS612 suşları, *L. salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin fermente

edilebilme ve yine bu suşlardan elde edilen L-EPS ile filtratların laktobasil gelişimi düzenleyici (LGD) etkilerinin belirlenmesi deneylerinde test bakterisi olarak kullanılmıştır. Bu amaçla bu suşların gelişim eğrileri çıkarılmış ve bu sonuçlardan elde edilen verilere göre suşlar deneylerde kullanılmıştır. Şekil 4.2’de verilen bakteri gelişim eğrilerine göre *L. salivarius* BİS820 suşunun en iyi geliştiği süre 24 saat (7,3 log kob/mL), *L. reuteri* BİS612 suşunun ise 18 saat (7,3 log kob/mL) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1. *L. salivarius* BİS820 suşu (solda) ile *L. reuteri* BİS612 suşunun (sağda) gelişim eğrileri

#### 4.6. Prebiyotik Olarak Kullanılma Potansiyeli Kapsamında *L. salivarius* Suşlarından Elde Edilen EPS’lerin Tavuk Bağırsağında Dominant Olan Laktobasil Türleri Tarafından Fermente Edilebilme Kapasitesi

Bu çalışmada tavuk bağırsağında dominant olan *L. salivarius* BİS820 ve *L. reuteri* BİS612 suşları seçilmiş ve bu suşların L-EPS<sub>BİS312</sub> ve L-EPS<sub>BİS722</sub>’yi fermente edebilme kapasitesi araştırılmıştır. Bu denemede laktobasillerin EPS’yi fermente edebilme kapasitesi belirlenmesi durumunda L-EPS’lerin laktobasil gelişimini düzenleyici etkisinin çalışılması planlanmıştır. Denenen her iki *Lactobacillus* bakterisinde de glukozu çıkarılmış MRS besi ortamında kontrol MRS besi ortamına göre canlılığın düştüğü ve dolayısı ile laktobasil gelişiminin önemli ölçüde düştüğü görülmüştür. Bunun yanında glukoz çıkarılıp, yerine aynı oranda (%2) L-EPS<sub>BİS312</sub> ve L-EPS<sub>BİS722</sub>’nin eklendiği MRS besi ortamında her iki *Lactobacillus* bakterisinin kontrol MRS besi ortamındaki canlılığa yakın bir artışın olduğu ve laktobasillerin L-EPS’yi glukoz gibi fermente ederek gelişebildikleri belirlenmiştir. L-EPS’nin fermentasyonuna bağlı olarak her iki *Lactobacillus* bakterisinin geliştiği besi ortamında pH’da da düşüş gözlenmiş ve glukoz içeren MRS besi ortamındaki pH ile aynı pH elde edilmiştir. Bu da L-EPS’nin laktobasiller tarafından fermente edilebildiğinin bir kanıtı olmuştur.

*L. reuteri* BİS612'nin L-EPS'yi daha iyi fermente ettiği (7,3 log kob/mL) tespit edilmiştir. Her iki *Lactobacillus* bakterisinde de L-EPS<sub>BİS312</sub> ve L-EPS<sub>BİS722</sub>'yi fermente edebilme kapasiteleri mukayese edildiğinde suşlar arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Sonuçlar Çizelge 4.4'de üç deneyin ortalaması alınarak  $\pm$  SD şeklinde verilmiştir.

İstatiksel olarak her iki *Lactobacillus* bakterisinde L-EPS<sub>BİS312</sub> ve L-EPS<sub>BİS722</sub>'nin ilave edildiği besi ortamındaki canlılık sayısı arasındaki farkın kontrole göre anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ).

Çizelge 4.4. Laktobasillerin BİS312 ve BİS722 suşlarından elde edilen L-EPS'yi fermente edebilme kapasiteleri

| Bakteri Suşları                        | Besiyeri İçeriği                     | Canlılık sayısı<br>(log kob/mL) | pH  |
|----------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-----|
| <i>Lactobacillus salivarius</i> BİS820 | MRS <sup>a</sup>                     | 7,3 $\pm$ 1,2                   | 6,2 |
|                                        | C-MRS <sup>b</sup>                   | 6,3 $\pm$ 1,1                   | 6,5 |
|                                        | L-EPS <sub>BİS312</sub> <sup>c</sup> | 7,1 $\pm$ 1,1                   | 6,2 |
|                                        | L-EPS <sub>BİS722</sub> <sup>c</sup> | 7,1 $\pm$ 1,2                   | 6,2 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> BİS612    | MRS <sup>a</sup>                     | 7,3 $\pm$ 1,2                   | 6,2 |
|                                        | C-MRS <sup>b</sup>                   | 6,2 $\pm$ 1,1                   | 6,5 |
|                                        | L-EPS <sub>BİS312</sub> <sup>c</sup> | 7,3 $\pm$ 1,1                   | 6,2 |
|                                        | L-EPS <sub>BİS722</sub> <sup>c</sup> | 7,3 $\pm$ 1,1                   | 6,1 |

a; MRS besiyeri ortamı.

b; Glukozu çıkarılmış MRS besiyeri ortamı.

c; Glukozu çıkarılmış MRS besiyerine %2 oranında L-EPS ilavesi ile hazırlanmıştır.

#### 4.7. *L. salivarius* Suşlarından Elde Edilen L-EPS<sub>BİS312</sub> ve L-EPS<sub>BİS722</sub>'nin Laktobasil Gelişimini Düzenleyici (LGD) Etkisinin Belirlenmesi

Bu çalışmada L-EPS<sub>BİS312</sub> ve L-EPS<sub>BİS722</sub>'nin *L. salivarius* BİS820 ve *L. reuteri* BİS612 suşlarına gösterdikleri LGD etkisi Bölüm 3.9'da verilen yönteme göre araştırılmıştır. Probiyotik bakterilerden elde edilen EPS'lerin prebiyotik olarak kullanılabilmesi için öncelikle tavuk bağırsağındaki faydalı bakterilerin (özellikle laktobasillerin) gelişimini düzenlemesi gerekmektedir. Bu çalışmada EPS'lerin tavuk bağırsağında dominant olan laktobasillerin gelişimini ne düzeyde düzenlediğini ortaya konulmaya çalışılmıştır. Kültür ortamına glukoz yerine, L-EPS<sub>BİS312</sub> ve L-EPS<sub>BİS722</sub> %2,5, %5 ve %10 oranında olacak şekilde ilave edilmiştir. Artan konsantrasyonlara göre L-EPS'ler laktobasil gelişimini kontrol besi ortamına (MRS) göre önemli ölçüde arttırmıştır. En yüksek LGD aktivitesi L-EPS<sub>BİS722</sub>'li kültür ortamında *L. reuteri* BİS612 suşunda görülmüştür. L-EPS oranına bağlı olarak kontrol besi yerine göre en yüksek LGD etkisi %10 L-EPS<sub>BİS722</sub> içeren

besi ortamı olduğu tespit edilmiştir. L-EPS<sub>BİS722</sub> kültür ortamına %10 oranında ilave edildiğinde BİS612 suşunun MRS besi ortamındaki canlılığı 7,3 log kob/mL'den 8,3 log kob/mL'ye yükselmiştir. Benzer şekilde L-EPS<sub>BİS722</sub> kültür ortamına %10 oranında ilave edildiğinde BİS820 suşunun MRS besi ortamındaki canlılığı 7,3 log kob/mL'den 8,1 log kob/mL'ye yükselmiştir. Laktik asit bakterilerinin iki suşundan da elde edilen L-EPS'ler ticari prebiyotik inülinde daha yüksek LGD etkisi göstermiştir. Denenen iki L-EPS'den, L-EPS<sub>BİS722</sub> LGD etkisi bakımından öne çıkmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.5'de üç deneyin ortalaması alınarak  $\pm$  SD şeklinde verilmiştir.

İstatiksel olarak olarak her iki *Lactobacillus* bakterisinde %10 oranında L-EPS<sub>BİS312</sub> ve L-EPS<sub>BİS722</sub>'nin ilave edildiği besi ortamındaki canlılık sayısında kontrol besi ortamına (MRS) göre anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Bunun yanında her iki *Lactobacillus* bakterisinde denenen tüm konsantrasyonlarda (%2,5, %5 ve %10) L-EPS<sub>BİS312</sub> ve L-EPS<sub>BİS722</sub>'nin ilave edildiği besi ortamındaki canlılık sayısında ticari prebiyotik inülin içeren besi ortamına göre anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ).

Sonuçlar, L-EPS<sub>BİS312</sub> ve L-EPS<sub>BİS722</sub>'nin ticari olarak kullanılan inülin prebiyotiğine alternatif olacak şekilde tavuk prebiyotiği olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Çizelge 4.5. L-EPS<sub>BİS312</sub> ve L-EPS<sub>BİS722</sub>'nin *L. reuteri* BİS612 ve *L. salivarius* BİS820 suşları üzerine laktobasil gelişimi düzenleyici etkisi

|                                          | BİS612<br>(log kob/mL) | BİS820<br>(log kob/mL) |
|------------------------------------------|------------------------|------------------------|
| Kontrol <sup>a</sup>                     | 7,3 $\pm$ 1,1          | 7,3 $\pm$ 1,1          |
| C-MRS <sup>b</sup>                       | 6,4 $\pm$ 1,2          | 6,4 $\pm$ 1,2          |
| L-EPS <sub>BİS722</sub> (%) <sup>c</sup> |                        |                        |
| 2,5                                      | 7,0 $\pm$ 1,0          | 6,9 $\pm$ 1,2          |
| 5                                        | 7,3 $\pm$ 1,1          | 7,3 $\pm$ 1,4          |
| 10                                       | 8,3 $\pm$ 1,0          | 8,1 $\pm$ 1,5          |
| L-EPS <sub>BİS312</sub> (%) <sup>c</sup> |                        |                        |
| 2,5                                      | 7,3 $\pm$ 1,4          | 7,4 $\pm$ 1,1          |
| 5                                        | 7,7 $\pm$ 1,6          | 7,5 $\pm$ 1,2          |
| 10                                       | 8,2 $\pm$ 1,0          | 7,6 $\pm$ 1,2          |
| İnülin (%) <sup>d</sup>                  |                        |                        |
| 2,5                                      | 6,4 $\pm$ 1,2          | 6,4 $\pm$ 1,2          |
| 5                                        | 7,3 $\pm$ 1,3          | 7,3 $\pm$ 1,3          |
| 10                                       | 7,4 $\pm$ 1,4          | 7,4 $\pm$ 1,4          |

a; MRS besi ortamı.

b; %2 glukozu çıkarılmış MRS besi ortamı

c; %2 glukozu çıkarılmış MRS besi ortamına farklı oranlarda L-EPS ilave edilmiş besi ortamı.

d; %2 glukozu çıkarılmış MRS besi ortamına farklı oranlarda inülin ilave edilmiş besi ortamı.

#### 4.8. *L. salivarius* Suşlarından Elde Edilen Filtrat<sub>BİS312</sub> ve Filtrat<sub>BİS722</sub>'nin Laktobasil Gelişimini Düzenleyici (LGD) Etkisinin Belirlenmesi

Bu çalışmada Filtrat<sub>BİS312</sub> ve Filtrat<sub>BİS722</sub>'nin *L. salivarius* BİS820 ve *L. reuteri* BİS612 suşlarına gösterdikleri LGD etkisi Bölüm 3.10'da verilen yönteme göre araştırılmıştır. Bölüm 4.7'de verilen benzer amaçla, bu çalışmada da kullanılan laktobasil suşlarının kültür ortamından elde edilen filtratlarında suşların ürettikleri EPS ile birlikte küçük protein molekülleri ve sekonder metabolitlerin de olduğu dikkate alınarak, EPS'nin yanı sıra protein moleküllerinin ve metabolitlerin laktobasil gelişimini düzenlemedeki rolünün ortaya konulması ve tek başına EPS uygulaması ile mukayese edilmesi amaçlanmıştır.

Kültür ortamına glukoz yerine, Filtrat<sub>BİS312</sub> ve Filtrat<sub>BİS722</sub> %2,5, %5 ve %10 oranında olacak şekilde ilave edilmiştir. Artan konsantrasyonlara göre kültür filtratları laktobasil gelişimini kontrol besi ortamına (MRS) göre önemli ölçüde arttırmıştır. En yüksek LGD aktivitesi Filtrat<sub>BİS722</sub>'li kültür ortamında *L. reuteri* BİS612 suşunda görülmüştür. Kültür filtratı oranına bağlı olarak kontrol besi yerine göre en yüksek LGD etkisi %10 Filtrat<sub>BİS722</sub> içeren besi ortamı olduğu tespit edilmiştir. Filtrat<sub>BİS722</sub> kültür ortamına %10 oranında ilave edildiğinde BİS612 suşunun MRS besi ortamındaki canlılığı 7,3 log kob/mL'den 8,8 log kob/mL'ye yükselmiştir. Benzer şekilde Filtrat<sub>BİS722</sub> kültür ortamına %10 oranında ilave edildiğinde de BİS820 suşunun MRS besi ortamındaki canlılığı 7,3 log kob/mL'den 8,3 log kob/mL'ye yükselmiştir. Laktik asit bakterilerinin iki suşundan da elde edilen kültür filtratları inülinde daha yüksek LGD etkisi göstermiştir. Denenen iki kültür filtratından, Filtrat<sub>BİS722</sub> LGD etkisi bakımından öne çıkmıştır. Sonuçlar, Çizelge 4.6'da üç deneyin ortalaması alınarak,  $\pm$  SD şeklinde verilmiştir.

İstatiksel olarak olarak her iki *Lactobacillus* cinsi bakteride denenen tüm konsantrasyonlarda (%2,5, %5 ve %10) Filtrat<sub>BİS312</sub> ve Filtrat<sub>BİS722</sub>'nin ilave edildiği besi ortamındaki canlılık sayısında kontrol besi ortamı (MRS) ve inülin içeren besi ortamına göre anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). EPS ve filtrat karşılaştırıldığında, her iki uygulamanın sonuçlarının benzer olduğu ancak filtrat uygulamasının EPS uygulamalarına göre LGD aktivitesinin daha öne çıktığı dikkat çekmiştir. Sonuçta, denenen her iki kültür filtratının da LGD etkisinin olduğu ve bu etkinin ticari olarak kullanılan inülin prebiyotikinden daha iyi olduğu belirlenmiştir. Bu da prebiyotik kullanımı yerine tavuk bağırsağını düzenleyici prebiyotiklerden elde edilen filtratlardan tavuk prebiyotik katkısı geliştirmenin mümkün olabileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.6. Laktobasillerden elde edilen kültür filtratlarının laktobasil gelişimi düzenleyici etkisi

|                                                 | BİS612<br>(log kob/mL) | BİS820<br>(log kob/mL) |
|-------------------------------------------------|------------------------|------------------------|
| Kontrol <sup>a</sup>                            | 7,3±1,1                | 7,3±1,5                |
| C-MRS <sup>b</sup>                              | 6,4±1,2                | 6,4±1,1                |
| <u>Filtrat<sub>BİS722</sub> (%)<sup>c</sup></u> |                        |                        |
| 2,5                                             | 8,5±1,0                | 7,6±1,2                |
| 5                                               | 8,6±1,1                | 7,6±1,4                |
| 10                                              | 8,8±1,1                | 8,3±1,4                |
| <u>Filtrat<sub>BİS312</sub> (%)<sup>c</sup></u> |                        |                        |
| 2,5                                             | 8,6±1,4                | 7,6±1,1                |
| 5                                               | 8,6±1,4                | 7,7±1,2                |
| 10                                              | 8,7±1,5                | 8,3±1,2                |
| <u>İnülin (%)<sup>d</sup></u>                   |                        |                        |
| 2,5                                             | 6,4±1,2                | 6,4±1,2                |
| 5                                               | 7,3±1,3                | 7,3±1,3                |
| 10                                              | 7,4±1,4                | 7,4±1,4                |

a; MRS besi ortamı.

b; %2 Glukozu çıkarılmış MRS besi ortamı

c; %2 Glukozu çıkarılmış MRS besi ortamına farklı oranlarda kültür filtratı ilave edilmiş besi ortamı.

d; %2 Glukozu çıkarılmış MRS besi ortamına farklı oranlarda inülin ilave edilmiş besi ortamı.

#### 4.9. Antikoksidiyal Salinomycinin Laktobasil ve Sinbiyotikler Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmada tavuklarda antikoksidiyal olarak yaygın kullanılan salinomycinin tavuk bağırsak mikrobiyotasında yaygın olan ve biyotanın dengesi dolayısı ile tavukların sağlık ve veriminde rol oynayan laktobasiller üzerindeki etkinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Aynı zamanda tavuk bağırsağında dominant olan laktobasillerin canlılığı üzerinde laktobasil kaynaklı L-EPS ve filtratların koruyucu etkisinin araştırılarak ortaya konulması amaçlanmıştır. Çalışma için, tavuk bağırsağı kaynaklı yüksek EPS üreticisi *L. salivarius* türüne ait BIS312 ve BIS722 suşları üzerine salinomycinin 0,250 mg/L, 0,275 mg/L, 0,300 mg/L ve 0,350 mg/L konsantrasyonları denenmiştir. Bu suşların salinomycine karşı dirençleri araştırılmış ve ayrıca bu suşlardan elde edilen filtrat ve L-EPS'lerin yine aynı suşlarda salinomycine karşı koruyucu etkileri test edilmiştir. Daha önceki çalışmalardan en

iyi sonuç alınan %10 konsantrasyonlu filtrat ve L-EPS salinomycin uygulamalarında kullanılmıştır.

Probiyotik uygulamalarda salinomycinin tüm konsantrasyonlarında BIS312 ve BIS722 suşlarının kontrol grubuna göre canlılığında önemli ölçüde düşüş gözlenmiştir. En fazla düşüş BIS722 suşunda (0,275 mg/mL salinomisinli ortamda, 0,2 log kob/mL), belirlenmiştir. BIS312 suşu, BIS722 suşuna göre canlılığını daha iyi koruyabilmiştir (0,275 mg/mL salinomycinli ortamda, 2,4 log kob/mL).

Sinbiyotik uygulamalarda salinomycinin artan konsantrasyonlarında her iki suşta da probiyotik olarak yalnızca bakterinin uygulandığı ortama göre canlılığın korunduğu dikkat çekmiştir. Filtratın sinbiyotik uygulamasının, L-EPS'nin sinbiyotik uygulamasına göre daha fazla öne çıktığı görülmüştür. Filtratda en iyi sonucu *L. salivarius* BIS312 ve Filtrat<sub>BIS312</sub> sinbiyotiği gösterirken (0,350 mg/mL salinomisinli ortamda, 0,3 log kob/mL), L-EPS sinbiyotiğinde de benzer şekilde yine aynı suşta L-EPS<sub>BIS312</sub> öne çıkmıştır (0,350 mg/mL salinomisinli ortamda, 0,2 log kob/mL). Sonuçlar, Çizelge 4.7'de üç deneyin ortalaması alınarak,  $\pm$  SD şeklinde verilmiştir.

İstatiksel olarak olarak her iki filtratın sinbiyotik uygulamasının canlılık sayısında probiyotik olarak yalnızca bakterinin uygulandığı besi ortamına göre anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Bu sonuçlar tüm suşlarda sinbiyotik uygulama olarak en iyi canlılık değerinin kültür filtratı eklenen ortam olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte tüm suşların ortama sinbiyotik uygulama olarak L-EPS eklendiğinde salinomisine karşı canlılık sayısını iyi derece koruyabildiği gözlemlenmiştir. Tavuk bağırsağını düzenleyici probiyotiklerden elde edilen filtratların ve L-EPS'lerin sağladığı bu koruyuculuk tavuklarda yem katkı maddesi kapsamında prebiyotik olarak kullanımının önemli olabileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyonlarda salinomycinin *L. salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarının canlılığı üzerine etkisi

| Uygulamalar                                               | Besiyeri                         | Bakteri Yoğunluğu (OD <sub>620</sub> ) | Canlılık Sayısı (log kob/mL) |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|------------------------------|
| <u>Probiyotik Suşlar</u>                                  |                                  |                                        |                              |
| <i>L. salivarius</i> BİS312                               | Kontrol <sup>a</sup>             | 4,25                                   | 7,3±1,3                      |
|                                                           | Salinomycin (mg/mL) <sup>b</sup> |                                        |                              |
|                                                           | 0,250                            | 4,15                                   | 2,4±1,0                      |
|                                                           | 0,275                            | 3,58                                   | 1,8±0,5                      |
|                                                           | 0,300                            | 3,52                                   | 0,2±0,1                      |
|                                                           | 0,350                            | 2,75                                   | -                            |
| <i>L. salivarius</i> BİS722                               | Kontrol <sup>a</sup>             | 4,28                                   | 7,2±1,4                      |
|                                                           | Salinomycin (mg/mL) <sup>b</sup> |                                        |                              |
|                                                           | 0,250                            | 4,17                                   | 1,4±0,9                      |
|                                                           | 0,275                            | 3,50                                   | 0,2±0,1                      |
|                                                           | 0,300                            | 2,76                                   | -                            |
|                                                           | 0,350                            | 2,75                                   | -                            |
| <u>Sinbiyotik (Probiyotik Suş ve EPS Uygulaması)</u>      |                                  |                                        |                              |
| <i>L. salivarius</i> BİS312+%10 L-EPS <sub>BİS312</sub>   | Kontrol <sup>a</sup>             | 4,25                                   | 7,3±1,3                      |
|                                                           | Salinomycin (mg/mL) <sup>b</sup> |                                        |                              |
|                                                           | 0,250                            | 4,20                                   | 3,4±1,1                      |
|                                                           | 0,275                            | 4,15                                   | 2,5±1,0                      |
|                                                           | 0,300                            | 3,50                                   | 1,8±0,5                      |
|                                                           | 0,350                            | 3,50                                   | 0,2±0,1                      |
| <i>L. salivarius</i> BİS722+%10 L-EPS <sub>BİS722</sub>   | Kontrol <sup>a</sup>             | 4,28                                   | 7,2±1,4                      |
|                                                           | Salinomycin (mg/mL) <sup>b</sup> |                                        |                              |
|                                                           | 0,250                            | 4,27                                   | 2,4±0,9                      |
|                                                           | 0,275                            | 3,50                                   | 1,2±0,1                      |
|                                                           | 0,300                            | 2,74                                   | -                            |
|                                                           | 0,350                            | 2,74                                   | -                            |
| <u>Sinbiyotik (Probiyotik Suş ve Filtrat Uygulaması)</u>  |                                  |                                        |                              |
| <i>L. salivarius</i> BİS312+%10 Filtrat <sub>BİS312</sub> | Kontrol <sup>a</sup>             | 4,25                                   | 7,3±1,3                      |
|                                                           | Salinomycin (mg/mL) <sup>b</sup> |                                        |                              |
|                                                           | 0,250                            | 4,30                                   | 4,5±1,1                      |
|                                                           | 0,275                            | 4,18                                   | 3,5±1,0                      |
|                                                           | 0,300                            | 3,70                                   | 2,0±0,5                      |
|                                                           | 0,350                            | 3,60                                   | 0,3±1,0                      |
| <i>L. salivarius</i> BİS722+%10 Filtrat <sub>BİS722</sub> | Kontrol <sup>a</sup>             | 4,28                                   | 7,2±1,4                      |
|                                                           | Salinomycin (mg/mL) <sup>b</sup> |                                        |                              |
|                                                           | 0,250                            | 4,29                                   | 3,0±0,9                      |
|                                                           | 0,275                            | 3,50                                   | 1,9±0,1                      |
|                                                           | 0,300                            | 3,10                                   | 0,2±0,5                      |
|                                                           | 0,350                            | 2,72                                   | -                            |

a; MRS besi ortamında geliştirilen mikroorganizma.

b; MRS besi yerine salinomisin ilave edilen ortamda geliştirilen mikroorganizma.



#### 4.10. Laktobasil ve Sinbiyotiklerin Adezyon Özellikleri

Prebiyotik olabilme potansiyeli araştırılan laktobasil kaynaklı filtrat ve EPS'lerin aynı zamanda tavuk bağırsağında dominant ve faydalı laktobasillerin adezyonunda etkisi önemlidir. Adezyon etkisi kuvvetli olan laktobasiller bağırsakta daha etkin olabilmektedirler. Bu nedenle prebiyotiklerin faydalı bakterilerin gelişimini stimule etmesinin yanında adezyonunu da artırıyor olması bitkisel kaynaklı prebiyotiklere göre önemli bir artı olacaktır. Bu sebeple tavuk bağırsağından izole edilen laktobasil kaynaklı EPS ve filtratların tavuk bağırsağında dominant olan laktobasillerin adezyonundaki rolünün ortaya konularak filtrat ve EPS'nin bu özellikleri bakımından mukayese edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada HT-29 adlı kolorektal adenokarsinoma hücre hattı (ATCC® HTB-38™) kullanılmıştır. LGD aktivitesi en yüksek olan *L. salivarius* BİS722 suşunun ve sinbiyotiklerin (bakteri ile L-EPS ve bakteri ile filtrat uygulaması) HT-29 hücresi adezyon özellikleri, adezyon yüzdesi (%) ve adezyon indeksi (ADI) olarak belirlenmiştir. İncelenen probiyotik suşun yüksek oranda (%90) HT-29 hücresine adezyon gösterdiği tespit edilmiştir. Probiyotik suşun filtrat ile uygulandığında bu adezyonun arttığı (%95) tespit edilmiştir. Sonuçlar, Çizelge 4.8'de üç deneyin ortalaması alınarak,  $\pm$  SD şeklinde verilmiştir. İstatiksel olarak olarak EPS ve kültür filtratının sinbiyotik uygulamasında, probiyotik olarak yalnızca bakterinin uygulamasına göre adezyon indekslerinde anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ).

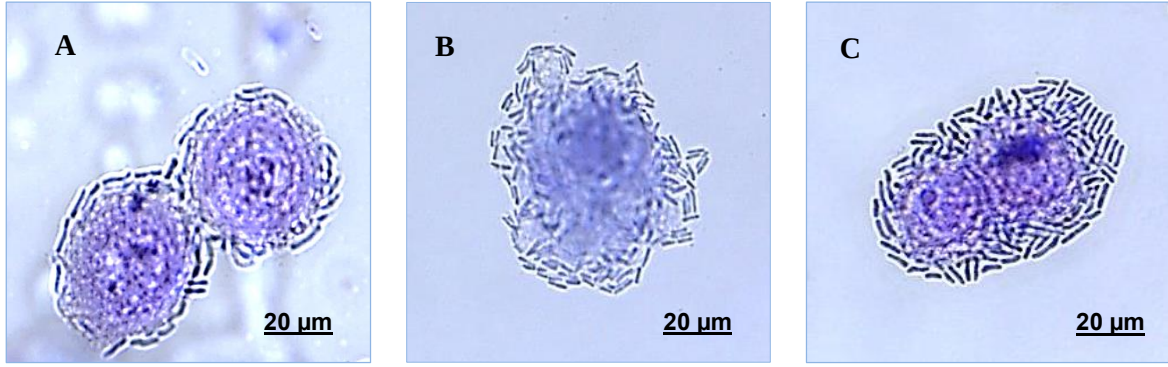
Çizelge 4.8. *L.salivarius* BİS722 suşu ve sinbiyotik (*L.salivarius* BİS722 suşu ve L-EPS<sub>BİS722</sub> ile Filtrat<sub>BİS722</sub>) uygulamasının HT-29 hücresine adezyon yeteneği

| Uygulamalar                                           | Adezyon (%) <sup>a</sup> | ADI <sup>b</sup> |
|-------------------------------------------------------|--------------------------|------------------|
| Probiyotik:<br><i>L. salivarius</i> BİS722            | 90 $\pm$ 3               | 1800             |
| Sinbiyotikler:                                        |                          |                  |
| <i>L. salivarius</i> BİS722+L-EPS <sub>BİS722</sub>   | 92 $\pm$ 3               | 1990             |
| <i>L. salivarius</i> BİS722+Filtrat <sub>BİS722</sub> | 95 $\pm$ 2               | 2200             |

a; Bakteri tutunan hücre sayısı

b; 100 hücreye tutunan bakteri sayısı

Çalışmaya ilişkin ışık mikroskopunda (Leica) çekilen görüntüler aşağıda verilmiştir (bkz. Resim 4.1 ve Resim 4.2).



Resim 4.2. *L. salivarius* BİS722 suşuna ait probiyotiğin (A), bu suşun L-EPS<sub>BİS722</sub> (B) ve Filtrat<sub>BİS722</sub> (C) ile kombinasyonunun HT-29 hücrelerine adezyon yeteneklerinin ışık mikroskobu görüntüleri (100X)



## 5. TARTIŞMA

Tavuk sindirim sistemi çok çeşitli mikrobiyotaya sahiptir. Bu mikrobiyotada gıdaların parçalanmasına ve sindirilmesine yardımcı olan 900'den fazla bakteri türü bulunmaktadır (Apajalahti, Kettunen ve Graham 2004; Wei, Morrison ve Yu 2013). Bakteriyel topluluklar tavukların sindirim sistemi boyunca yer alan bölgelere göre büyük ölçüde değişiklik göstermektedirler. Yapılan araştırmalarda Laktobasillerin %90 oranında dominat olarak tavukların sindirim sisteminde bulunduğu bildirilmiştir. Tavuklarda dominant olarak bulunan Laktobasil türlerinden *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. aviarius*, *L. acidophilus* ve *L. johnsonii* türleri ön plana çıkmaktadır. *L. salivarius* türü tavukların ince bağırsağın jejunum bölgesinde yüksek oranda bulunmaktadır (Yeoman ve diğerleri, 2012; Gong ve diğerleri, 2007; Feng ve diğerleri, 2010; Pourabedin ve Zhao, 2015). Laktik asit bakterileri, probiyotik olarak sıklıkla kullanılmaktadır. *L. salivarius*, probiyotik özellikleri bakımından tavuklar için yararlı özellikleri ile öne çıkan bir türdür. *Lactobacillus* cinslerinden *L. salivarius* türü tavuk bağırsak epitel hücrelerinde baskın olup, kuluçkadan sonraki bir gün içerisinde tavuk bağırsak epitel hücrelerine yerleşerek yerel mikrobiyotadaki yerini alır. *L. salivarius*'un probiyotik olarak, tavuklarda bağırsak mikrobiyotasını yararlı mikroorganizmalar lehine değiştirmek suretiyle sindirim ve absorpsiyonu kolaylaştırarak laktobasil ve bifidobakteriler gibi faydalı bakteri popülasyonlarını arttırmak, bağırsakların doğal konakçısı olmayan, bağırsak epitel hücrelerine yapışarak kolonize olan ve atılmaya karşı direnç gösteren, hastalık yapan patojen bakterilerin bağırsak yüzeyine tutunmalarını ve çoğalmalarını engellemek, patojen bakterilerin ürettikleri  $\beta$ -glukozidaz ve  $\beta$ -glukuronidaz enzim sentezini engellemek, yemden yararlanmayı artırarak canlı ağırlığında artış gibi birçok sağlığa yararlı etkileri bildirilmiştir (Kizerwetter-Swida ve Binek, 2005; Shokryazdan ve diğerleri, 2017; Chaves, Brashears ve Nightingale, 2017; Chen, Zhu ve Qiu, 2017). *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilen EPS'lerin bağırsakta bulunan ve konakçı sağlığı açısından yararlı olarak kabul edilen *Lactobacillus* grubu bakteriler tarafından fermente edilerek onlar için enerji kaynağı oluşturduğu ve bu şekilde *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* grubu bakterilerinin seçici olarak çoğalmalarını sağladığı bildirilmiştir (Blatchford ve diğerleri, 2013). Yani prebiyotikler bağırsaklarda bulunan patojen türler için karbon kaynağı olarak kullanılamazken, *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türlerinin oranını arttırmaktadır (Korakli, Ganzle ve Vogel, 2002). Bu tez çalışmasında tavuk mikrobiyotasında baskın ve mikrobiyotaya yararlı özellikleri bildirilen *Lactobacillus* türlerinin EPS üretim yeteneklerine bakılmıştır. Çalışmada en yüksek EPS

miktarı *L. salivarius* BİS312 (440 mg/L) ve *L. salivarius* BİS722 (415 mg/L) suşlarında görülmüştür. Benzer şekilde kısmi olarak saflaştırılarak liyofilize haline getirilen EPS'lerde de aynı suşlarda yüksek bulunmuştur (sırasıyla 550 mg/L ve 510 mg/L). Daha önceden *Lactobacillus* cinsi bakteriler üzerinde yapılan çalışmalarda bu çalışmada kullanılan fenol sülfirik asit metoduna göre kültür ortamında EPS üretiminin yaklaşık olarak 58-350 mg/L arasında değiştiği görülmüştür (Cerning, 1990; Aslım, Yüksekdağ, Beyatlı ve Mercan, 2005; Wang, Zhao, Tian, Yang ve Yang, 2015; Seo, Bajpai, Rather ve Park, 2015). Tavuk bağırsağı kaynaklı laktobasillerin fenol sülfirik asit metoduna göre kültür ortamında EPS üretimlerinin araştırıldığı çalışmalarda ise, *Lactobacillus* cinsi bakterilerde EPS üretiminin yaklaşık olarak 11-180 mg/L arasında değiştiği görülmüştür (Yüksekdağ, Sahin ve Aslım, 2014; Rajoka ve diğerleri, 2018). Bu çalışmada *Lactobacillus* cinsi bakterilerde kültür ortamında EPS üretimi 358-440 mg/L arasında olup literatürde belirlenen aralıkların üzerinde bulunmuştur. Kültür ortamında yüksek EPS üreticisi olan *L. salivarius* BİS312 ve *L. salivarius* BİS722 suşlarının L-EPS miktarları da yüksek bulunmuştur. L-EPS miktarlarının kültür ortamında tespit edilen EPS miktarlarından daha yüksek bulunmasının sebebi L-EPS'nin saflaştırılması ve kurutma işleminde yoğunlaştığından kaynaklandığı düşünülmektedir. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin EPS'lerinin gastrointestinal sistemde, probiyotik mikroorganizmaların gelişimini ve aktivitesini arttırmak gibi doğrudan ya da dolaylı olarak prebiyotik rolü olduğu bildirildiğinden (Badel, Bernardi ve Michaud, 2011; Ksonzeková ve diğerleri, 2016), tavukların doğal mikrobiyotasında bulunan yüksek EPS üreticisi *Lactobacillus* cinsi bakterilerin kanatlı endüstrisinde yem katkı maddesi olarak potansiyel prebiyotik kaynağı olabileceği düşünülmektedir.

Yüksek EPS üreticisi suşların EPS üretimini arttırıcı düzeyde uygun gelişme ortamlarının belirlenmesi, yüksek verimde EPS elde edilmesinde önemlidir. Bakteriyel gelişim ve EPS üretimini etkileyen önemli parametrelerin başında, besiyerinde kullanılan karbon ve azot kaynaklarının konsantrasyonu gelmektedir (Grosu-Tudor ve Zamfir, 2014). Farklı azot ve karbon kaynakları kullanımının EPS sentezi üzerindeki etkileri laktobasillerin farklı türlerinde rapor edilmiştir (Yüksekdağ ve Aslım, 2008; Kanmani, Yuvaraj, Paari, Pattukumar ve Arul, 2011; Lynch ve diğerleri, 2014; Khanh, Bich Thuy ve Thanh Thao, 2016). Laktik asit bakterilerinin farklı türlerinde farklı azot kaynaklarının EPS üretim üzerine olan etkisinin araştırıldığı çalışmalara bakıldığında denenen pepton, beef extract ve triptonun EPS üretimini arttırdığı bulunmuştur. Bu artışın farklı türlerin azot kaynaklarını

kullanabilme özelliklerinin de farklı olmasından kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Iliev, Radoilska, Ivanova ve Enikova, 2001; Kanmani, Yuvaraj, Paari, Pattukumar ve Arul, 2011; Khanh, Bich Thuy ve Thanh Thao, 2016). *Lactobacillus* cinsi bakterilerin EPS üretimleri üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisinin araştırıldığı çalışmalarda ise, besiyerinde glukoz yerine sükroz kullanımının EPS üretimini önemli ölçüde arttırdığı rapor edilmiştir (Hussein, Ghaly, Osman, Al Shimaa ve Helal, 2015; Seesuriyachan, Kuntiya, Hanmoungjai ve Techapun, 2011). Sükroz kullanımının *Lactobacillus sanfranciscensis* türünde EPS üretiminde önemli ölçüde artışa neden olduğunun tespit edildiği bir çalışmada bu bakterinin fruktosiltransferaz enzimine sahip olması nedeni ile sükrozu iyi metabolize edebildiği bildirilmiştir (Korakli, Pavlovic, Gänzle ve Vogel, 2003). EPS'nin ilerleyen dönemlerde kanatlı sektöründe prebiyotik yem katkı maddesi olarak kullanılma potansiyeli olduğu düşünüldüğünden, bu tez çalışmasında optimum koşullarda maksimum EPS üretiminin sağlanması için en yüksek EPS verimi sağlayan ortamın bileşeni ve miktarını belirlemek amacıyla farklı azot kaynakları ve sükrozla oluşan besi ortamları denenmiştir. Çalışmalarda farklı azot kaynakları olarak pepton, beef extract ve tripton ile farklı bir karbon kaynağı sükrozla oluşan besi ortamlarının *Lactobacillus* cinsine ait bakteriler üzerine EPS üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Tüm denemelerde EPS üretim artışı suşlar arasında farklılık göstermekle birlikte test edilen üç suşda da en iyi EPS üretimi glukoz içeren MRS'ye %1 tripton ve %2 sükroz ilavesi ile zenginleştirilmiş MRS besi ortamı (780 mg/L) ile glukozu çıkarılmış MRS'ye %1 tripton ile zenginleştirilmiş ve %2 sükroz ilavesi ile hazırlanmış MRS besi ortamında belirlenmiştir (801 mg/L). Bu sonuçlardan yola çıkarak tripton ile sükrozun sinerjik etki yaratarak bakterilerde EPS üretimini arttırdığı düşünülmektedir. Glukoz içeren MRS'ye %1 tripton ve %2 sükroz ilavesi ile zenginleştirilmiş MRS besi ortamındaki EPS üretiminin, glukozu çıkarılmış MRS'ye %1 tripton ile zenginleştirilmiş ve %2 sükroz ilavesi ile hazırlanmış MRS besi ortamında belirlenen EPS üretiminden kısmen daha düşük bulunmuştur. Bunun nedeninin, karbon kaynağı olarak sükrozun yanında, glukoz içeren MRS besi ortamındaki yüksek şekerin bakterilerde EPS verimi ve biyokütle üretimini etkileyen ozmotik strese yol açmasından dolayı olduğu düşünülmektedir. Su aktivitesi 0,80'nin altına düştüğünde ozmotik stresten dolayı bakterilerin gelişim gösteremediği bildirilmiştir. Ayrıca besiyerinde yüksek şeker oranı bakterileri üremeye teşvik etmiş olabilir (Beales; 2004; Seesuriyachan, Kuntiya, Hanmoungjai ve Techapun, 2011). Günümüzde biyoteknolojik gelişmeler, hayvan yetiştiriciliğinde en önemli amaç olan verimin miktar ve kalitesini, dolayısıyla kazancı artırma çabalarına büyük katkıda bulunmaktadır. Üretim maliyetinin

azaltılması amacıyla bakterilerin en iyi üretim gerçekleştirdiği besi ortamı içeriklerinin doğru olarak tespit edilmesi, endüstriyel ölçekli üretimlerde yol gösterici olacaktır. Endüstriyel ölçekli EPS üretimlerinde yüksek EPS verimi için glukozu çıkarılmış MRS'ye %1 tripton ile zenginleştirilmiş ve %2 sükroz ilavesi ile hazırlanmış MRS besi ortamlarının kullanılması önerilmektedir.

Prebiyotikler, bağırsaktaki yararlı mikrobiyotanın gelişimini teşvik ederek sindirimin düzenli ve sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi için olumlu etkide bulunur, bağırsakta mineral emilimini artırır ve bağışıklık sistemini güçlendirerek hayvan sağlığına fayda sağlar (Dankowiakowska, Kozłowska ve Bednarczyk, 2013; Yadav ve diğerleri, 2016; Sugiharto, 2016). Tavuk yemlerinde kullanılan prebiyotik katkı maddeleri, bağırsaktaki yararlı bakteriler tarafından metabolize edilir. Böylelikle prebiyotikler bağırsaktaki yararlı bakterilerin artışına sebep olarak bağırsak mikrobiyotası iyileştirir. Tavuk yemlerinde kullanılan prebiyotiklerin, bağırsak mikrobiyotasını dengeleyerek bağırsakta villus artışı gibi olumlu etkilerde bulunduğu, patojen bakterilerin bağırsak yüzeyine yapışması için gerekli olan reseptör bölgeleri bloke ederek patojenlerin kolonizasyonunu azalttığı ve bağışıklık sistemini güçlendirdiği bildirilmiştir. Prebiyotiklerin, tavuklarda yemden yararlanmayı artırarak canlı ağırlığında, yumurta kalitesinde ve büyüme performansında artışa sebep olduğu rapor edilmiştir (Kareem, Loh, Foo, Akit ve Samsudin, 2016; Adhikari ve diğerleri, 2018; Shang, Kumar, Thippareddi ve Kim, 2018). Bir besinsel bileşenin prebiyotik olarak kullanılabilmesi için hayvanın sindirim sisteminin üst bölgelerinde hidrolize uğramadan kolona ulaşması ve kolondaki bir ya da sınırlı sayıdaki yararlı bakteriler için enerji kaynağı olarak kullanılarak, yararlı bakterileri seçici bir şekilde zenginleştirmesi gerekmektedir (Vegas ve diğerleri, 2006; DiGioia ve Biavati, 2018). EPS'lerin bağırsakta bulunan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi konakçı sağlığı açısından yararlı olarak kabul edilen bakteriler tarafından fermente edilerek onlar için enerji kaynağı oluşturduğu ve bu şekilde yararlı bakterilerin seçici olarak çoğalmalarını sağladığı bildirilmiştir. EPS bağırsak mikrobiyotası için yararlı bakteriler tarafından fermente edilmesi ile prebiyotik etki göstermektedir (Korakli, Ganzle ve Vogel, 2002; Badel, Bernardi ve Michaud, 2011). Bu tez çalışmasında daha önceki çalışmalarda EPS üretim kapasitesi bakımından öne çıkan *L. salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin, yine tavuk bağırsağından izole edilmiş *L. salivarius* BİS820 ve *L. reuteri* BİS612 suşları tarafından fermente edilebilme özelliği araştırılmıştır. *L. salivarius* BİS820 ve *L. reuteri* BİS612 suşları karbon kaynağı çıkarılmış MRS besi ortamında hem

L-EPS<sub>BİS312</sub> hem de L-EPS<sub>BİS722</sub>'yi kullanarak gelişimlerini karbon kaynağı içeren besiyeri ile aynı oranda sürdürmüşlerdir ( $\sim 7,3$  log kob/mL). *L. reuteri* BİS612 karbon kaynağı olarak EPS'yi diğer suşa göre daha iyi kullanmış ve kültür ortamının pH'sını daha fazla düşürerek (pH 6,1) her iki L-EPS'yi de daha iyi fermente edebildiğini göstermiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak L-EPS'nin, tavukçuluk sektöründe prebiyotik yem katkı maddesi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Prebiyotiklerin hayvan sağlığına katkıda bulunmasındaki en temel etki mekanizmaları sindirim sistemi mikrobiyal dengesini sağlamalarıdır. Bağırsaktaki yararlı bakterilerin prebiyotikleri kullanması ile birlikte, prebiyotiklerden kısa zincirli yağ asitleri oluşumu da artış göstermektedir. Kısa zincirli yağ asitleri, bağırsak çevre pH'sını düşürüp müsin üretimini artırarak, bağırsakla ilişkili lenfoid dokularda yer alan immun hücreler üzerindeki özel reseptörlere kısa zincirli yağ asitlerinin bağlanmasını artırır ve böylece IgA, T hücreleri ve NK (naturel killer) hücrelerinin sayısına artışa neden olarak *Salmonella*, *Camphylobacter*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* gibi patojen bakterilerin gelişmesini engellemektedir (Kim, Seo, Kim ve Paik, 2011; Alloui, Szczurek ve Świątkiewicz, 2013; Samal ve Behura, 2015). EPS'nin laktik asit bakterileri tarafından enerji kaynağı olarak kullanıldığı ve bunun yanında EPS'nin bağırsak mikrobiyotasında bulunan yararlı bakterilerinin gelişimini arttırdığı rapor edilmiştir (Tsuda, Okuda, Haraguchi ve Kodama, 2018). Laktik asit bakterilerinden elde edilen kültür filtratlarının da EPS'de görüldüğü gibi bağırsak mikrobiyotası için yararlı olan bifidobakterilerin gelişimi ve canlılığı üzerine bifidobakterilerin gelişimini düzenlediğini bildirilmiştir (Sarıkaya, Aslim ve Yuksekdağ, 2017). Hayvanların mikrobiyota dengesi ile bağırsak sağlığını korumak ve potansiyel patojen mikroorganizmaların çoğalmasını kontrol ederek hastalıkları önlemek modern kanatlı beslemenin ana konularından biri olduğundan tavuklarda prebiyotik yem katkı maddesi olarak oligosakkaritler ve oligofruktanlardır yaygın olarak kullanılmaktadır. Tavuklarda prebiyotik yem katkı maddesi olarak oligosakkaritlerin içerisinde en yaygın olarak inülin kullanılmaktadır. İnülinin, tavuklarda sindirim sistemi morfolojisi ve dışkı parametreleri ile ilgili ilişkisini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (Aşan ve Özcan, 2006; Keser ve Bilal, 2010; Kocabağlı ve Alp, 2015; Wang ve diğerleri, 2018; Tarabees ve diğerleri, 2018). Bu tez çalışmasında daha önceki çalışmalarda EPS üretim kapasitesi bakımından öne çıkan *L. salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarından elde edilen L-EPS ve kültür filtratlarının *L. salivarius* BİS820 ve *L. reuteri* BİS612 suşları üzerinde gelişimi düzenleyici etkisi araştırılmıştır. Hem iki adet



*Lactobacillus* cinsi bakterilerden elde edilen L-EPS'lerin hem de kültür filtratlarının besi ortamına eklenmesi artan konsantrasyonlara göre test bakterisi olarak kullanılan *L. reuteri* BİS612 ve *L. salivarius* BİS820 gelişimini önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. Bu artışın suşlar arasında farklılık gösterdiği tespit edilmek ile birlikte en yüksek artışın *L. reuteri* BİS612'de (8,8 log kob/mL) olduğu görülmüştür. *L. reuteri*'nin mikrobiyotada yararlı bakterilerin gelişimini teşvik etmek, oluşturdukları reuterin maddesinin genellikle tavuklarda bulunan *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* ve *Trypanosoma* cinsleri ve *Brachyspira pilosicoli* türü gibi enterik patojenlerin yol açtığı enfeksiyonlara karşı koruma sağlaması ve bu yolla bağışıklık sistemini güçlendirmesi gibi tavuk sağlığına yararlı etkileri rapor edilmiştir (Evren, Albayram ve Apan, 2006; Nakphaichit ve diğerleri, 2011; Mapple ve diğerleri, 2013). Tavuk mikrobiyotası için bu kadar önemli faydalı etkileri olduğu daha önceden yapılan çalışmalarda bildirilen *L. reuteri* bakteri türünün L-EPS ve kültür filtratları ile gelişimini arttırması prebiyotik açıdan L-EPS ve kültür filtratlarını önemli kılmaktadır. EPS'nin laktobasil gelişimi düzenleyici etkisinde suşlar arasında farklılık görülmesinin nedeninin suşların fizyolojik ve biyokimyasal farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. *Lactobacillus* cinsi bakteriler üzerinde yapılan bir çalışmada EPS'nin laktobasiller üzerinde gelişmeyi düzenleyici etkisinde suşlar arasında farklılıklar gözlenmiştir. Suşlar arasında, EPS'nin en yüksek gelişimi düzenleyici etkisini *Lactobacillus farciminis* suşu üzerinde gösterdiğini tespit edilmiş ve bunun nedeninin de bu suşun EPS'yi bozan enzimlere sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bozulmuş karbonhidrat zincirlerinin hücre dışı bir sinyal molekülü gibi çalışarak büyümeyi teşvik edebileceği bildirilmiştir (Tsuda, Okuda, Haraguchi ve Kodama, 2018). L-EPS ve kültür filtratlarının laktobasil gelişimini düzenleyici etkisi üzerine elde edilen tüm sonuçlar ticari olarak kullanılan inülin prebiyotiği ile mukayese edildiğinde L-EPS ve kültür filtratlarının kullanıldığı besi ortamlarında test edilen her iki suşta da inülin prebiyotiğinden daha yüksek verim elde edildiği görülmüştür. İnülinin tavuklarda yaygın bir şekilde yem katkı maddesi olarak kullanılmasına rağmen yapılan bazı *in vitro* çalışmalarda laktik asit bakteri için düşük prebiyotik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Gopal, Prasad, Smart ve Gill, 2001; Huebner, Wehling ve Hutkins, 2007; Tsuda ve Miyamoto, 2010). Bunun yanında tavuklarda yem katkı maddesi olarak kullanılan inülin, doğada birçok bitkide bulunmasına karşın çalışmalarda genellikle ticari olarak hindiba bitkisinden elde edilmektedir. Ancak inülinin transgenik bitkilerden de elde edildiğine dair çalışmalar mevcuttur. Bu durumun mikrobiyal üretime göre birçok dezavantajı olduğu bilinmektedir. Transgenik bitkilerin ileride insan sağlığı üzerine ne gibi etkiler göstereceği

tam olarak bilinmemekle birlikte, toksik etkiler, antibiyotik direnci, kanser riski ve alerji gibi sağlık üzerine olumsuz etkilere yol açabileceği bildirilmiştir (Haspolat, 2012 ve Singla ve Chakkaravarthi, 2017). Bunların yanında bitkisel üretim, coğrafik veya mevsimsel koşullardan oldukça fazla etkilenmektedir. Mikrobiyal üretim için ise, güneş enerjisine ihtiyaç yoktur ve mikroorganizmalar çok çeşitli organik kaynakları fermentasyon kaynağı olarak kullanabilirler. Mikroorganizmalardan birkaç gün içinde üretim sağlanırken bitkilerde bu süreç üç veya altı ay arasında sürebilir (Donot, Fontana, Baccou ve Galindo, 2012; ner, 2013).

Laktobasillerden elde edilen hem filtrat hem de L-EPS'lerin tavuk bağırsağında faydalı bakterilerin gelişimini önemli ölçüde artırmış olması, her ikisinin de probiyotik kaynaklı prebiyotik yem katkı maddesi olarak kullanımını mümkün kılabilir. Laktobasillerden elde edilen L-EPS ve kültür filtratlarının, insan sağlığına herhangi bir zararlı etkisinin bildirilmemesi, enerji verimi, alan ihtiyacının daha az olması, endüstriyel atıkların değerlendirilebilirliği, kısa sürede yüksek hacimde ürün elde edilebilmesi gibi birçok avantajlara sahip olmakla birlikte ticari olarak kullanılan inlinden daha yüksek prebiyotik etki göstermişlerdir. Aynı zamanda tavuk mikrobiyotasının dengede tutulması tavuklarda probiyotik kullanımı ortadan kaldıracaktır. Probiyotiklerin yem katkı maddesi olarak kullanılmasının, yem işleme teknikleri esnasında canlılıklarını büyük oranda kaybetmeleri, yeme antibiyotikler ile birlikte katıldığında antibiyotik direnç genlerini teşvik etmeleri, her zaman stabil sonuç vermemeleri ve uzun süre canlılıklarını koruyamamaları gibi birçok dezavantajları bulunmaktadır (Gutiérrez, David, Montoya ve Betancur, 2016; Kiczorowska, Samolińska, Al-Yasiry, Kiczorowski ve Winiarska-Mieczan, 2017; Markowiak ve şlizewska, 2018). Laktobasillerden elde edilen L-EPS ve kültür filtratlarının tavuklarda prebiyotik yem katkı maddesi olarak kullanılmasının, tavuk bağırsak mikrobiyotasındaki faydalı bakterilerin gelişimini stimule ederek hem bitkisel prebiyotik hem de probiyotik takviyesine gerek kalmadan tavuk bağırsak mikrobiyotasını dengede tutarak tavuk sağlığı ve gelişimi üzerinde olumlu etkiler yaratacağı düşünülmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar probiyotik kullanımını azaltacak daha etkin bir yeni kanatlı yem katkı maddelerinin, probiyotiğe alternatif olarak kullanımı ilgili alana yeni bir bakış açısı getirecektir.

Tavuklarda çok yaygın ve maliyetli hastalıklardan biri olan koksidiyozis, *Eimeria* türü protozoanlar tarafından oluşturulan bulaşıcı paraziter bir hastalık olup hayvan sağlığı ve

verimleri üzerinde önemli ekonomik kayıplar oluşturmaktadır. Bir kanatlıdan diğerine dışkı ile bulaşan koksidiyozis, bağırsaklarda yarattığı hasardan dolayı yemlerin sindirimi ve besin maddesi emilimine engel olarak ağırlık kaybı ve kanlı dışkı ile sonlanır. Ülkemizde koksidiyozis yemle verilen antikoksidiyallerle kontrol edilmektedir (Tuncer, 2007, Kocabağlı ve Alp, 2015). Salinomycin, Türkiye’de tavuklarda yaygın olarak kullanılan antikoksidiyallerden birisidir. Salinomycinin canlı hayvan performansı üzerinde yapılmış çalışmalarda nekrotik enteritis oluşumuna bağlı ölümleri azalttığı bildirilmesine rağmen, (Dinçer, Kıvanç ve Karaca, 2010) koksidiyozun kontrolü veya önlenmesi sırasında yem ile birlikte kullanılan antikoksidiyal ilacın bağırsak morfolojisini değiştirdiği özellikle bağırsaklardaki emici yüzeyler ve villus boyutlarında olumsuz etkiler gösterdiği bununla birlikte tavukların büyüme performansını da olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Literatürde salinomycinin bağırsak morfolojisini olumsuz yönde etkilediğinin bildirildiği çalışmalar mevcut olmasına rağmen sağlıklı tavuk bağırsak mikrobiyotasında ve bu biyotayı temsil eden faydalı mikroorganizmalar üzerine ne gibi etkilere sebep olduğu yönünde yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak salinomycin kullanımına bağlı olarak tavuklarda görülen büyüme performansı geriliği nedeni ile antikoksidiyal ilacın bağırsak mikrobiyotasının da dengesini bozduğunu düşündürmektedir (Bahadoran, Hassanpour, Kheirabadi ve Shekarchian, 2014). Tavuklarda antikoksidiyal kullanımına bağlı olarak bağırsak mikrobiyotasında bulunan yararlı mikrobiyotanın azaltma riskinin yüksek olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle probiyotik suş (*L. salivarius* BİS722 ve *L. salivarius* BİS312) ve sinbiyotiklerinin (probiyotik suş+L-EPS<sub>BİS312</sub>, probiyotik suş+L-EPS<sub>BİS722</sub>, probiyotik suş+Filtrat<sub>BİS312</sub>, probiyotik suş+Filtrat<sub>BİS722</sub>) prebiyotik etkisi bakımından salinomycine karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. Sinbiyotik uygulamalarda her iki suşta da salinomycin tarafından yaratılan antimikrobiyal etkiye karşı canlılığın daha arttığı dikkat çekmiştir. Probiyotik suş+Filtrat<sub>BİS312</sub> sinbiyotik uygulamasının, probiyotik suş+L-EPS<sub>BİS312</sub> sinbiyotik uygulamasına göre koruyucu etkisinin daha fazla öne çıktığı görülmüştür. Kültür filtratları, EPS’nin yanında organik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosinler ve çeşitli protein bileşikler gibi metabolitleri de içermektedir. Laktik asit bakterilerinin metabolitlerinin patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki gösterdikleri çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Šušaković ve diğerleri, 2010; Liu ve diğerleri, 2017; Rajoka ve diğerleri, 2018). Bu çalışmada da probiyotik suş+Filtrat<sub>BİS312</sub> sinbiyotik uygulamasının diğer uygulamalara göre öne çıkması literatürde de bildirilen kültür filtratlarının içerisinde yer alan birçok metabolitin kombine etki dolayısı ile salinomycine karşı daha yüksek koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir.

Prebiyotik etkinlik bakımından, probiyotik bakterilerden elde edilen hem L-EPS hem de kültür filtratlarının sinbiyotik kullanımı tavuk bağırsağı üzerindeki koruyucu etkisini olumlu yönde artıracaktır. Bu da mevcut ticari prebiyotiklerden farklı pozitif bir yön olarak değerlendirilebilir.

Probiyotik bakterilerin, intestinal sistemin epitel ve mukozal yüzeylerine yapışarak kolonizasyonlarını ve uzun süre sistemde kalabilmeyi sağlaması, rekabetçi dışlama ve enteropatojenlere karşı antimikrobiyal aktivite göstererek enteropatojenlerin kolonizasyonunu azaltması ile konak immün sistemini güçlendirmesi hayvan sağlığı üzerinde önemli olduğu belirtilmektedir (Ouweland ve Salminen, 2003; Wang, Ahmed, Feng, Li ve Song, 2008). Probiyotik bakterilerin bağırsak epitel hücrelerine yapışıp kolonizasyonunu artırması ile birlikte sağlık üzerinde yararlı etkilerini gösterebildiğinden probiyotik bakterilerin seçiminde bağırsak epitel hücrelerine yapışma özelliği en önemli kriterlerden biridir (Collado, Meriluoto ve Salminen, 2008). Adezyon etkisi kuvvetli olan laktobasiller bağırsakta daha etkin olabilmektedirler (Beganović ve diğerleri, 2011). Probiyotik bakterilerinden elde edilen EPS'lerin, bağırsak mikrobiyotası için faydalı olan bakterilerin bağırsakta kolonizasyonunu destekleyerek konağın immün sistemini güçlendirebildiği bildirilmiştir (Górska ve diğerleri, 2010). Bu tez çalışmasında yüksek EPS üreticisi *L. salivarius* BİS722 suşunun ve sinbiyotiklerinin (bakteri ile L-EPS ve bakteri ile filtrat uygulaması) HT-29 hücresi adezyon özellikleri, adezyon yüzdesi (%) ve adezyon indeksi (ADI) olarak belirlenmiştir. İncelenen probiyotik suşun yüksek oranda (%90) HT-29 hücresine adezyon gösterdiği tespit edilmiştir. Burada yüksek EPS üreticisi *L. salivarius* BİS722 suşunun tek başına kullanımında bile yüksek adezyon yeteneği gösterdiği dikkat çekmiştir. Bu bağlamda EPS, probiyotik suşun adezyon yeteneğinin önemli ölçüde yüksek olmasına neden olmuştur. Bu sonucumuzu bazı literatürlerde desteklemiştir. Yapılan çalışmalarda probiyotik bakterilerin epitel hücrelere yapışması ile hücre yüzey hidrofobisitesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu ve bu bakterilerin epitel hücrelere yapışması için hidrofobisitenin gerekli olduğu belirtilmiştir. EPS'nin hidrofobisite gibi bakteri ve hücre yüzey etkileşimleri sonucunda bağırsak mikrobiyotası için yararlı olan laktik asit bakterinin bağırsak mukozasına adezyon yeteneklerini arttırdığı bildirilmiştir (Kos ve diğerleri, 2003; De Palencia, 2009; Duany, Rajput, Batish ve Grover, 2011; Jara, Sánchez, Vera, Cofré ve Castro, 2011; Kodaikkal, Prajapati ve Ljungh, 2012; Patel ve Prajapat, 2013). Probiyotik suş ile birlikte L-EPS'nin ve filtratın sinbiyotik uygulamalarının adezyonu arttırdığı (sırası ile %92 ve %95) gözlenmiş, bu artışın filtrat

uygulamasında daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Probiyotik suş ile birlikte filtrat sinbiyotik uygulamasının diğer uygulamalara göre adezyon yetenekleri bakımından ön plana çıkması kültür filtratının içerisinde EPS'nin yanında bakteriler tarafından sentezlenen ve epitel hücrelere yapışmada rol oynayan büyük yüzey proteinleri gibi diğer metabolitlerinin de etkisinin olduğu düşünülmektedir. Bazı *Lactobacillus* cinsi bakterilerin epitel hücreye yapışmayı sağlayan mukus bağlayıcı proteinler sentezlediği bildirilmiştir. Bu proteinlerin yapısı tam olarak bilinmemesine rağmen, etkisini bağırsak epitel hücrelerinde mevcut olan karbonhidratlara (oligosakkaritlere) yapışarak gösterdiği bildirilmiştir (Roos ve Jonsson, 2002; Van Tassell ve Miller, 2011). Ayrıca, probiyotik bakterilerinin ürettiği ekstraselüler bağlayıcı proteinlerin, bakterinin bağırsak epitel hücrelerine bağlanmasında köprü işlevi gördüğünü rapor eden çalışmalar mevcuttur (Bernet, Brassart, Neeser ve Servin, 1993; Önal, Beyatlı ve Aslım, 2005; Dlamini, Langa, Aiyegoro ve Okoh, 2019).

Bu çalışmada *Lactobacillus salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarından elde edilen L-EPS ve kültür filtratlarının bağırsak mikrobiyotasında bulunan ve mikrobiyotaya yararlı etkileri olan bakterilerin gelişimi önemli ölçüde arttırdığı ve bu gelişimin tavuk yemlerinde yaygın olarak kullanılan inülin prebiyotiğinden daha fazla olduğunun tespit edilmesi dikkat çekmektedir. Bu sonuçlar, L-EPS ve kültür filtratlarının bağırsaktaki yararlı mikroorganizmalar tarafından inülin prebiyotiğine göre daha iyi metabolize edildiğini göstermektedir. Bu bağlamda L-EPS ve kültür filtratlarının prebiyotiklerin en önemli özelliklerinden biri olan bağırsak mikrobiyotasını yararlı bakteriler lehine daha sağlıklı bir kompozisyona değiştirebileceğini mümkün kılmaktadır. İyi dengelenmiş bir bağırsak mikrobiyotası bağırsak mukozal yapısını geliştirir ve bağışıklık sisteminin güçlenmesine neden olarak konakçı sağlığına olumlu etkilerde bulunur. Ayrıca, L-EPS ve kültür filtratlarının bağırsak mikrobiyotasında yaygın olan ve biyotanın dengesi dolayısı ile tavukların sağlık ve veriminde rol oynayan laktobasiller üzerinde koruyucu etki yarattığı tespit edilmiştir. Prebiyotik olabilme potansiyeli bakımından laktobasil kaynaklı filtrat ve EPS'lerin bağırsakta faydalı bakterilerin gelişimini stimule etmesinin yanında faydalı bakterilerin bağırsağa adezyonunu da artırıyor olmasının tespit edilmesi, bağırsakta etkinliklerini uzun süre göstermesi bakımından mevcutta ticari olarak kullanılan bitkisel prebiyotiklere göre önemli bir artı olarak değerlendirilebilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında yapılan çalışmaların sonuçlarından elde edilen veriler doğrultusunda aşağıdaki çıkarımlarda bulunulmuştur.

1. Serbest gezen köy tavuklarının bağırsaklarından izole edilen *L. salivarius* türü en yüksek EPS üreticisi tür olarak belirlenmiştir.
2. Tavuklarda *L. salivarius* suşlarından elde edilen EPS'nin prebiyotik yem katkı maddesi olarak kullanılması durumunda %2 glukoz yerine %2 sükroz ilave edilmiş ve %1 tripton ile zenginleştirilmiş MRS besi yerlerinin EPS'nin yüksek verimle elde edilmesinde kullanılabileceği belirlenmiştir.
3. Tavuk bağırsağında yaygın bulunan faydalı laktobasil türleri tarafından EPS'nin ticari prebiyotik inülininden daha iyi fermente edilebildiği tespit edilmiştir.
4. *Lactobacillus salivarius* BİS312 ve BİS722 suşlarından elde edilen EPS ve kültür filtratlarının tavuk bağırsak mikrobiyotasının dengede olmasında önemli yeri olan ve mikrobiyotada dominant olarak bulunan laktobasillerin gelişimini arttırdığı, bu gelişimde ise EPS'ye göre kültür filtratlarının öne çıktığı görülmüştür. Bunun yanında EPS ve kültür filtratlarının ticari olarak kullanılan inülin prebiyotiğinden daha başarılı olduğu belirlenmiştir.
5. Antikoksidial salinomycinin tavuk bağırsak mikrobiyota dengesinde önemli laktobasilleri inhibe ettiği ve dolayısı ile kullanımı ile tavuk bağırsak mikrobiyotasının bozulabileceği görülmüştür. Salinomycinin bağırsak mikrobiyotası üzerinde olabilecek olumsuz etkilerine karşı laktobasillerin EPS ve kültür filtratlarının koruyucu etki gösterdiği, bu koruyucu etkide EPS ve kültür filtratlarının benzer sonuçlar göstermesine rağmen kültür filtratlarının EPS'den kısmi olarak öne çıktığı belirlenmiştir.
6. Tavuk bağırsağında dominant olan faydalı laktobasillerin tavuk bağırsağına adezyonunda yüksek EPS üreticisi *L. salivarius* BİS722 suşunun HT-29 hücrelerine kuvvetli adezyon gösterdiği belirlenmiş ve *L. salivarius* BİS722 suşunun EPS ve kültür filtratlarının adezyonda etkili olduğu tespit edilmek ile birlikte EPS'ye göre kültür filtratlarının daha öne çıktığı görülmüştür.
7. Bu çalışmada kullanılan laktobasillerin aynı türünün (*L.salivarius*) iki farklı suşu denenmiştir. Tüm uygulamalarda aynı tür olmasına rağmen suş bazında sonuçlar farklılık göstermiş ve *L.salivarius* BİS722 suşunun EPS ve kültür filtratı daha fazla öne

çıkıştır. Bu durumun, suş bazında üretilen EPS ve metabolit farklılığından kaynaklı olabileceği sonuçlarına varılmıştır.

Tez kapsamında yapılan çalışmaların sonuçlarından elde edilen veriler doğrultusunda aşağıdaki önerilerde bulunulmuştur.

1. Tavuklarda yem katkı maddesi olarak probiyotik kullanılmasının yerine, tavuk bağırsağında probiyotik özellikte olan, bağırsak mikrobiyotasını dengeleyici ve tavuk sağlığı ile verimi üzerinde ekili laktobasillerin gelişimi, bağırsağa adezyonu ve canlı kalabilmelerinin probiyotik bakteri metabolitleri ile desteklenmesinin, tavuk yem katkı maddelerinde probiyotik kaynaklı prebiyotik kullanımının yeni bir bakış açısı olarak araştırılması önerilmektedir. Bu bağlamda tavuk bağırsağı kaynaklı laktobasillerden elde edilen EPS ve kültür filtratlarından tavuk yeminde kullanılmak üzere prebiyotik maddeler geliştirilebileceği düşünülerek yemde daha etkin ve stabil sonuçlar vermesi için arge çalışmalarının ileri düzeyde yapılarak devam ettirilmesi önerilmektedir.
2. Probiyotik kaynaklı geliştirilen prebiyotiklerden diğer hayvan yem katkılarının da geliştirilmesi ve etkilerinin yapılan çalışmalarla ortaya konularak hayvan denemeleri ile desteklenmesi önerilmektedir.
3. Tavuk bağırsağı kaynaklı laktobasillerden elde edilen EPS ve kültür filtratlarından geliştirilmiş yem katkı maddelerinin tavuk gelişimi ve mikrobiyotası üzerine etkilerinin ileride daha detaylı bir şekilde araştırılması önerilmektedir. Bu alandaki ilerleme, bağırsak mikrobiyotasının kanatlı sağlığına ve verimliliğine nasıl katkıda bulunduğunu daha iyi anlamamıza yardımcı olacak ve yem katkı maddelerinde kullanılan probiyotiklere alternatif olarak, EPS ve kültür filtratlarının kullanıldığı yeni prebiyotik ürünlerin geliştirilmesini destekleyecektir.
4. Tavuk yemi işleme tekniklerinin, tavuk bağırsağı kaynaklı laktobasillerden elde edilen hem EPS hem de kültür filtratları üzerinde ne gibi etkilere yol açtığı, bu tekniklere karşı EPS ve kültür filtratlarının sahip olduğu mevcut özelliklerini koruyup korumadığının araştırılacağı ve yanında etkinliğinin daha da arttırılabileceği devam çalışmalarının yapılması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abdel-Hafeez, H. M., Saleh, E. S., Tawfeek, S. S., Youssef, I. M., and Abdel-Daim, A.S. (2017). Effects of probiotic, prebiotic, and synbiotic with and without feed restriction on performance, hematological indices and carcass characteristics of broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30(5), 672.
- Abdelqader, A., Irshaid, R., and Al-Fataftah, A. R. (2013). Effects of dietary probiotic inclusion on performance, eggshell quality, cecal microflora composition, and tibia traits of laying hens in the late phase of production. *Tropical Animal Health and Production*, 45(4), 1017-1024.
- Abdel-Raheem, S. M., Abd-Allah, S. M., and Hassanein, K. M. (2012). The effects of prebiotic, probiotic and synbiotic supplementation on intestinal microbial ecology and histomorphology of broiler chickens. *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences*, 6(4), 277-289.
- Abdulrahim, S. M., Haddadin, M. S. Y., Hasjlamoun, E. A. R., and Robinson, R. K. (1996). The influence of *Lactobacillus acidophilus* and zinc bacitracin on layer performance of chickens and cholesterol content of plasma and egg yolk. *British Poultry Science*, 37, 341-346.
- Abudabos, A. M., Al-Batshan, H. A., and Murshed, M. A. (2015). Effects of prebiotics and probiotics on the performance and bacterial colonization of broiler chickens. *South African Journal of Animal Science*, 45(4), 419-428.
- Adhikari, P., Cosby, D. E., Cox, N. A., Franca, M. S., Williams, S. M., Gogal Jr, R. M., Ritz, C. V., and Kim, W. K. (2018). Effect of dietary fructooligosaccharide supplementation on internal organs *Salmonella* colonization, immune response, ileal morphology, and ileal immunohistochemistry in laying hens challenged with *Salmonella enteritidis*. *Poultry Science*, 97(7), 2525-2533.
- Adil, S., Banday, T., Bhat, G. A., Mir, M. S., and Rehman, M. (2010). Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. *Veterinary Medicine International*, 1-7.
- Agboola, A. F., Omidwura, B. R. O., Odu, O., Popoola, I. O., and Iyayi, E. A. (2015). Effects of organic acid and probiotic on performance and gut morphology in broiler chickens. *South African Journal of Animal Science*, 45(5), 494-501.
- Alak, G. ve Atamanalp, M. (2012). Su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik ve prebiyotik kullanımı. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 22(1), 62-68.
- Alataş, M., Gürbüz, E. ve Balevi, T. (2010). Yumurta tavuklarında frukto-oligosakkaritin verim performansı üzerine etkisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 5(3), 121-127.
- Alloui, M. N., Szczurek, W., and Świątkiewicz, S. (2013). The usefulness of prebiotics and probiotics in modern poultry nutrition: A review. *Annals of Animal Science*, 13(1), 17-32.



- Alp, M. ve Kahraman, R. (1996). Probiyotiklerin hayvan beslemede kullanılması. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22(1), 1-8.
- Alp, M., Kahraman, R., Kocabağlı, N., Abaş, İ. ve Aksu H. (1999). Buğday ve arpa ağırlıklı rasyona katılan farklı enzim karmalarının broyler performansına ve ileum pH'sına etkisi, *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences*, 23(Eksayı 3), 617-622.
- Alp, M., Kocabağlı, N., Kahraman, R., and Bostan, K. (1999). Effects of dietary supplementation with organic acids and zinc bacitracin on ileal microflora, pH and performance in broilers. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences*, 23, 451-455.
- Al-Sultan, S. I., Abdel-Raheem, S. M., El-Ghareeb, W. R., and Mohamed, M. H. (2016). Comparative effects of using prebiotic, probiotic, synbiotic and acidifier on growth performance, intestinal microbiology and histomorphology of broiler chicks. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 64(2), 187-195.
- Angmo, K., Kumari, A., and Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-food Science and Technology*, 66, 428-435.
- Antunovic, Z., Speranda, M., Liker, B., Seric, V., Steiner, Z., and Domacinovic, M. (2005). Influence of feeding the probiotic pioneer to growing lambs on performances and blood composition. *Acta Veterinaria*, 55(4), 287-300
- Apajalahti, J., Kettunen, A., and Graham, H. (2004). Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poultry Science Journal*, 60, 223-232.
- Arpášová, H., Kačániová, M., Pistová, V., Gálik, B., Fik, M., and Hleba, L. (2016). Effect of probiotics and humic acid on egg production and quality parameters of laying hens eggs. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 49(2), 1-9.
- Aslim, B., Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y., and Mercan, N. (2005). Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 673-677.
- Aşan, M. ve Özcan, N. (2006). Kanatlı beslemede inulinin prebiyotik olarak önemi. *Hayvansal Üretim*, 47(2), 48-53.
- Aureli, R., La-Marta, J., Grossi, A. B., Della Pia, E. A., Esteve-Garcia, E., Wulf-Andersen, L., and Thorsen, M. (2018). A novel glucuronoxylan hydrolase produced by fermentation is safe as feed additive: toxicology and tolerance in broiler chickens. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 99, 213-224.
- Awad, W. A., Ghareeb, K., Abdel-Raheem, S., and Böhm, J. (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*, 88(1), 49-56.

- Badel, S., Bernardi, T., and Michaud, P. (2011). New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29(1), 54-66.
- Bagheri, T., Hedayati, S. A., Yavari, V., Alizade, M., and Farzanfar, A. (2008). Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8, 43-48.
- Bahadıroğlu, E. (1997). Aviguard (Doğal Sindirim Sistemi Florası). *Hayvancılık Yem Sanayi ve Veteriner Hekimliği Dergisi*, 17(1), 5-8.
- Bahadoran, S., Hassanpour, H., Kheirabadi, K. P., and Shekarchian, S. (2014). Effect of clopidol and amprolium/ethopabate on performance and intestinal morphology of chickens with experimental coccidiosis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(4), 571-576.
- Bai, K., Huang, Q., Zhang, J., He, J., Zhang, L., and Wang, T. (2016). Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of broiler chickens. *Poultry Science*, 96(1), 74-82.
- Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 1-20.
- Beganović, J., Frece, J., Kos, B., Pavunc, A. L., Habjanič, K., and Šušković, J. (2011). Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100(1), 43-53.
- Bergonzelli, G. E., Blum, S., Brussow, H., and Cortesy-Theulaz, I. (2005). Probiotics as a treatment strategy for gastrointestinal diseases? *Digestion*, 72, 57-68.
- Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R., and Servin, A. L. (1993). Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(12), 4121-4128.
- Bindels, L. B., Delzenne, N. M., Cani, P. D., and Walter, J. (2015). Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*, 12, 303-10.
- Biswas, A., Junaid, N., Kumawat, M., Qureshi, S., and Mandal, A. B. (2018). Influence of dietary supplementation of probiotics on intestinal histo-morphometry, blood chemistry and gut health status of broiler chickens. *South African Journal of Animal Science*, 48(5), 968-976.
- Biswas, A., Mohan, N., Raza, M., Mir, N. A., and Mandal, A. (2019). Production performance, immune response and blood biochemical parameters in broiler chickens fed diet incorporated with prebiotics. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(2), 493-500.

- Blatchford, P., Ansell, J., Godoy, M. R. C., Fahey, G., Garcia-Mazcorro, J. F., Gibson, G. R., Goh, Y. J., Hotchkiss, A. T., Lacroix, C., Rastall, R. A., Reimer, R. A., Schotherman, M., Van Sinderen, D., Venema, K., and Whelan, K. (2013). Prebiotic mechanisms, functions and applications-A review. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 8(4), 109-132.
- Blottieres, H. M., Champ, M., Hoebler, C., Michel, C., and Cherbut, C. (1999). Production and digestive effects of short chain fatty acids. *Sciences des Aliments*, 19, 269-290.
- Brown, M. (2011). Modes of action of probiotics: recent developments. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(14), 1895-1900.
- Bulut Albayrak, Ç. (2017). Antifungal aktivite üreten laktik asit bakterileri. *Journal of Adnan Menderes University*, 14(1), 79-85.
- Cağrı, K. ve Bingöl, N. T. (2015). Beta-glukanın hayvan beslemedeki rolü. *Van Veterinary Journal*, 26(1), 43-47.
- Callaway, T. R., Edrington, T. S., Harvey, R. B., Anderson, R. C., and Nisbet, D. J. (2012). Prebiotics in food animals, a potential to reduce foodborne pathogens and disease. *Romanian Biotechnological Letters*, 17(6), 7808-16.
- Carbone, D., and Faggio, C. (2016). Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish and Shellfish Immunology*, 54, 172-178.
- Castro, H. P., Teixeira, P. M., and Kirby, R. (1996). Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnology Letters*, 18(1), 99-104.
- Cerning, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 7(1-2), 113-130.
- Cerning, J. C. M. C., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., and Topisirovic, L. (1994). Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(11), 3914-3919.
- Ceyhan, N. ve Alıç, A. (2012). Bağırsak mikrobiyotası ve probiyotikler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (1), 107-113.
- Chaucheyras-Durand, F., and Durand, H. (2010). Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes*, 1(1), 3-9.
- Chaves, B. D., Brashears, M. M., and Nightingale, K. K. (2017). Applications and safety considerations of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in animal and human health. *Journal of Applied Microbiology*, 123(1), 18-28.

- Chen, C. Y., Chen, S. W., and Wang, H. T. (2017). Effect of supplementation of yeast with bacteriocin and *Lactobacillus* culture on growth performance, cecal fermentation, microbiota composition, and blood characteristics in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30(2), 211.
- Chen, F., Zhu, L., and Qiu, H. (2017). Isolation and probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* and *Pediococcus pentosaceus* in specific pathogen free chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 19(2), 325-332.
- Chen, Y. C., and Chen, T. C. (2003). Effect of adding chicory fructans in feed on broiler growth performance, serum cholesterol and intestinal length. *International Journal of Poultry Science*, 2(3), 214-219.
- Chen, Y. C., and Chen, T. C. (2004). Mineral utilization in layers as influenced by dietary oligofructose and inulin. *International Journal of Poultry Science*, 3(7), 442-445.
- Chen, Y. C., Nakthong, C., and Chen, T. C. (2005). Improvement of Laying Hen Performance by Dietary Prebiotic Chicory Oligofructose and Inulin. *International Journal of Poultry Science*, 4(2), 103-108.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., and Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226 (5), 1065-1073
- Crescenzi, V. (1995). Microbial polysaccharides of applied interest: ongoing research activities in Europe. *Biotechnology Progress*, 11(3), 251-259.
- Dabour, N., Kheadr, E. E., Fliss, I., and LaPointe, G. (2005). Impact of rropy and capsular exopolysaccharide-producing strains of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on reduced-fat Cheddar cheese production and whey composition. *International Dairy Journal*, 15(5), 459-471.
- Dalloul, R. A., and Lillehoj, H. S. (2006). Poultry coccidiosis: Recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 5, 143-163.
- Dankowiakowska, A., Kozłowska, I., and Bednarczyk, M. (2013). Probiotics, prebiotics and synbiotics in poultry mode of action, limitation, and achievements. *Journal of Central European Agriculture*, 14(1), 467-78.
- Darabighane, B., and Nahashon, S. N. (2014). A review on effects of Aloe vera as a feed additive in broiler chicken diets. *Annals of Animal Science*, 14(3), 491-500.
- Das, D., Baruah, R., and Goyal, A. (2014). A food additive with prebiotic properties of an  $\alpha$ -d-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 20-26.
- De Cesare, A., Sirri, F., Manfreda, G., Moniaci, P., Giardini, A., Zampiga, M., and Meluzzi, A. (2017). Effect of dietary supplementation with *Lactobacillus acidophilus* D2/CSL (CECT 4529) on caecum microbioma and productive performance in broiler chickens. *PloS one*, 12(5), 1-21.

- De Palencia, P. F., Werning, M. L., Sierra-Filardi, E., Dueñas, M. T., Irastorza, A., Corbí, A. L., and López, P. (2009). Probiotic properties of the 2-substituted (1, 3)- $\beta$ -D-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14), 4887-4891.
- De Vuyst, L., and Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 153-77.
- Del Carmen, S., de LeBlanc, A. D. M., Levit, R., Azevedo, V., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L. G., and LeBlanc, J. G. (2017). Anti-cancer effect of lactic acid bacteria expressing antioxidant enzymes or IL-10 in a colorectal cancer mouse model. *International Immunopharmacology*, 42, 122-129.
- Demir, P. ve Aydın, E. (2019). Hormon ve Antibiyotik Kullanımına İlişkin Çıkan Olumsuz Haberlerin Tüketicilerin Tavuk Eti Tüketim Alışkanlıklarına Etkisi (Kars İli Örneği). *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 3(1), 55-63.
- Desai, A. (2008). *Strain Identification, viability and probiotics properties of Lactobacillus casei*, PhD Thesis, Victoria University, Australia, 21-69.
- Dhama, K., Verma, V., Sawant, P. M., Tiwari, R., Vaid, R. K., and Chauhan, R. S. (2011). Applications of probiotics in poultry: Enhancing immunity and beneficial effects on production performances and health-A review. *Journal of Immunology and Immunopathology*, 13(1), 1-19.
- Di Gioia, D., and Biavati, B. (2018). Probiotics and prebiotics in animal health and food safety: conclusive remarks and future perspectives. *In Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety*, 4(11), 269-273.
- Diler, A. (2007). *Probiyotik + enzim kombinasyonunun esmer ırkı buzağılarda yemden yararlanma ve büyüme performansı üzerine etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Programı, Erzurum, 10-54.
- Dinçer, E., Kıvanç, M. ve Karaca, H. (2010). Biyokoruyucu olarak laktik asit bakterileri. *Gıda*, 35(1), 1-8.
- Dlamini, Z. C., Langa, R. L., Aiyegoro, O. A., and Okoh, A. I. (2019). Safety evaluation and colonisation abilities of four lactic acid bacteria as future probiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2), 397-402.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., and Galindo, S. S. (2012). Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87, 951-962.
- Duary, R. K., Rajput, Y. S., Batish, V. K., and Grover, S. (2011). Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *The Indian Journal of Medical Research*, 134(5), 664.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.

- Ducatelle, R., Eeckhaut, V., Haesebrouck, F., and Van Immerseel, F. (2015). A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: present status and future perspectives. *Animal*, 9(1), 43-48.
- El-Haroun, E. R., God, A. S., and Kabir Chowdhury, A. M. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 37, 1473-1480.
- Ergün, A., Yalçın, S. ve Saçaklı, P. (2000). Broyler rasyonlarında probiyotik ve zinc bacitracin kullanımı. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 47, 271-280.
- Evren, M., Albayram, C. ve Apan, M. (2006). *Laktik asit bakterilerinin oluşturduğu antimikrobiyel maddeler*. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Türkiye, 24-26.
- Faber, E. J., Zoon, P., Kamerling, J. P., and Vliegenthart, J. F. (1998). The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohydrate Research*, 310(4), 269-276.
- Feng, Y., Gong, J., Yu, H., Jin, Y., Zhu, J., and Han, Y. (2010). Identification of changes in the composition of ileal bacterial microbiota of broiler chickens infected with *Clostridium perfringens*. *Veterinary Microbiology*, 140, 116-21.
- Flickinger, E. A., and Fahey, G. C. (2002). Pet food and feed applications of inulin, oligofructose and other oligosaccharides. *British Journal of Nutrition*, 87(2), 297-300.
- Forte, C., Manuali, E., Abbate, Y., Papa, P., Vieceli, L., Tentellini, Trabalza-Marinucci, M., and Moscati, L. (2017). Dietary *Lactobacillus acidophilus* positively influences growth performance, gut morphology, and gut microbiology in rurally reared chickens. *Poultry Science*, 97(3), 930-936.
- Freitas, F., Alves, V. D., and Reis, M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to Biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29, 388-398.
- Freitas, F., Torres, C. A., and Reis, M. A. (2017). Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. *Bioresource Technology*, 245, 1674-1683.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378.
- Gao, P., Ma, C., Sun, Z., Wang, L., Huang, S., Su, X., and Zhang, H. (2017). Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken. *Microbiome*, 5(1), 91.
- Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412.

- Gong, J., Forster, R. J., Yu, H., Chambers, J. R., Wheatcroft, R., Sabour, P. M., and Chen, S. (2002). Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. *FEMS Microbiology Ecology*, 41, 171-179.
- Gong, J., Si, W., Forster, R. J., Huang, R., Yu, H., Yin, Y., and Han, Y. (2007). 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts from crops to ceca. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 147-57.
- Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., and Gill, H. S. (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 67(3), 207-216.
- Górska, S., Jachymek, W., Rybka, J., Strus, M., Heczko, P. B., and Gamian, A. (2010). Structural and immunochemical studies of neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus johnsonii* 142. *Carbohydrate Research*, 345(1), 108-114.
- Grosu-Tudor, S. S., and Zamfir, M. (2014). Exopolysaccharide production by selected lactic acid bacteria isolated from fermented vegetables. *Scientific Bulletin Series F. Biotechnologies*, 18, 2285-1364.
- Grosu-Tudor, S. S., Zamfir, M., Meulen, R., Falony, G., and Vuyst, L. D. (2013). Prebiotic potential of some exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(5), 8666-8676.
- Guerin-Danan, C., Chabenet, C., Pedone, C., and Po-pot, F. (1998). Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk influence on intestinal microflora in healthy infants. *Journal Clinical Nutrition*, 67, 111-117.
- Guglielmetti, S., Taverniti, V., Minuzzo, M., Arioli, S., Stuknyte, M., Karp, M., and Mora, D. (2010). Oral bacteria as potential probiotics for the pharyngeal mucosa. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 3948-3958.
- Gutiérrez, R., David, R., Montoya, C., and Betancur, G. (2016). Effect of dietary inclusion of microencapsulated probiotics on some zootechnical parameters in red tilapia fingerlings (*Oreochromis* sp.). *Revista de Salud Animal*, 38(2), 112-119.
- Güçlü, B. K. ve Kara, K. (2009). Ruminant beslemede alternatif yem katkı maddelerinin kullanımı: 1. Probiyotik, Prebiyotik ve Enzim. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 65-75.
- Gültekin, M. (2004). Probiyotikler, *ANKEM Dergisi*, 18(Ek2):87-89.
- Gürgün, V. ve Halkman, A.K. (1990). *Mikrobiyolojide sayım yöntemleri* (2. Baskı). Türkiye: Gıda Teknolojisi Derneği, 7-20.
- Gürsoy, O. ve Kınık, Ö. (2006). Probiyotik Bakterilerin Klinik Uygulamalarında Yeni Gelişmeler-II. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 43(1), 189-196.

- Gürsoy, O., Kınık, Ö. ve Gönen İ. (2005). Probiyotikler ve gastrointestinal sağlığa etkileri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 35, 136-148.
- Hajati, H., and Rezaei, M. (2010). The application of prebiotics in poultry production. *International Journal of Poultry Science*, (3), 298-304.
- Hashemi, S. R., and Davoodi, H. (2010). Phytogenics as new class of feed additive in poultry industry. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(17), 2295-2304.
- Haspolat, I. (2012). Genetiği değiştirilmiş organizmalar ve biyogüvenlik. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 59, 75-80.
- Hongpattarakere, T., Cherntong, N., Wichienchot, S., Kolida, S., and Rastall, R. A. (2012). *In vitro* prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 846-852.
- Hoseinifar, S. H., Ringø, E., Shenavar Masouleh, A., and Esteban, M. Á. (2016). Probiotic, prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 8(1), 89-102.
- Huebner, J., Wehling, R. L., and Hutkins, R. W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, (17), 770-775
- Hussein, M. D. M., Ghaly, M. F., Osman, M. Y., Al Shimaa, G. S., and Helal, M. M. (2015). Production and prebiotic activity of exopolysaccharides derived from some probiotics. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 14(1), 1.
- Idoui, T., and Karam, N. E. (2014). Effects of autochthonous probiotic feeding on performances, carcass traits, serum composition and faecal microflora of broiler chickens. *Sains Malaysiana*, 45(3), 347-53.
- Iliev, I., Radoilska, E., Ivanova, I., and Enikova, R. (2001). Biosynthesis of exopolysaccharides by two strains of *Lactobacillus bulgaricus* in whey-based media. *Mededelingen Rijksuniversiteit te Gent Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen*, 66(3b), 511-516.
- Ismail, B., and Nampoothiri, K. M. (2010). Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Archives of microbiology*, 192(12), 1049-1057.
- Işık, M. ve Ekimler, F. (2004). Probiyotik kullanmanın buzağı büyüme performansı ve sağlığı üzerine etkileri. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(1), 63-69.
- Iyer, A., Mody, K., and Jha, B. (2006). Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 220-222.
- Jacobsen, C. N., Nielsen, V. R., Hayford, A. E., Møller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., Sandström, B., Tvede, M., and Jakobsen, M. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4949-4956.



- Jahromi, M. F., Altaher, Y. W., Shokryazdan, P., Ebrahimi, R., Ebrahimi, M., Idrus, Z., and Liang, J. B. (2016). Dietary supplementation of a mixture of *Lactobacillus* strains enhances performance of broiler chickens raised under heat stress conditions. *International Journal of Biometeorology*, 60(7), 1099-1110.
- Jara, S., Sánchez, M., Vera, R., Cofré, J., and Castro, E. (2011). The inhibitory activity of *Lactobacillus* spp. isolated from breast milk on gastrointestinal pathogenic bacteria of nosocomial origin. *Anaerobe*, 17(6), 474-477.
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Ali, M. A., and Jalaludin, S. (1998). Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight og organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 70, 197-209.
- Jørgensen, J. N., Laguna, J. S., Millán, C., Casabuena, O., and Gracia, M. I. (2016). Effects of a *Bacillus*-based probiotic and dietary energy content on the performance and nutrient digestibility of wean to finish pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 221, 54-61.
- Kabir, S. M. (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 3531-3546.
- Kahraman, R., Abaş, İ., Bostan, K., Tanör, M. A., Kocabağlı, N. ve Alp, M. (1999). *Organik asit ve mayaların broylerlerin performansı, ileum pH'ı ile Enterobacteriaceae popülasyonuna etkisi*, İstanbul: VİV. Poultry Yutav'99 Uluslararası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı 3-6 Haziran Bildiriler Kitabı, 515-522.
- Kahraman, Z., Mızrak, C., Yenice, E., Atik, Z. ve Tunca, M. (2009). Yumurta tavuğu rasyonlarında prebiyotik (mannan oligosakkarit) kullanımının performans, kalite kriterleri, organ ağırlıkları, bağırsak pH'sı ve kuluçka sonuçları üzerine etkileri. *Tavukçuluk Araştırma Dergisi*, 8(1), 10-14.
- Kanmani, P., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., and Arul, V. (2011). Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity *in vitro*. *Bioresource Technology*, 102(7), 4827-4833.
- Kantautaitė, J., Oberauskas, V., Sutkeviciene, R., and Sederevicius, A. (2006). The effect of probiotic strains of *Lactobacillus* on the microbiological parameters in the faeces of neonate calves. *Veterinarija ir Zootechnika*, 36, 58.
- Karaca, H., Dinçer, E., and Kıvanç, M. (2010). Lactic acid bacteria in metabolic engineering. *Akademik Gıda*, 8(1), 32-38.
- Karademir, G. ve Karademir, B. (2003). Yem katkı maddesi olarak kullanılan biyoteknolojik ürünler (Derleme). *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 43(1), 61-74.
- Kareem, K. Y., Loh, T. C., Foo, H. L., Akit, H., and Samsudin, A. A. (2016). Effects of dietary postbiotic and inulin on growth performance, IGF1 and GHR mRNA expression, faecal microbiota and volatile fatty acids in broilers. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 163.

- Kaushal, S., Sharma, R. K., Singh, D. V., Shukla, S. K., Kumar, S., Palod, J., and Singh, M. K. (2018). Effects of Dietary Inclusion of Enzymes and Probiotic on Organ Weights and Intestinal Morphology of Broiler Chickens. *Journal of Animal Research*, 8(6), 1035-1039.
- Keser, O. ve Bilal, T. (2010). İnülinin kanatlı beslemede kullanılması. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 16(4), 685-695.
- Khanh, T. B., Bich Thuy, D. B., and Thanh Thao, D. T. (2016). Optimal conditions for exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* T10. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 54(4A), 40.
- Kılıç, İ. ve Şimşek, E. (2008). Derin tabanlı bir yumurta tavuğu kümesinde iç ortam çevre koşullarının yeterliliğinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22(1), 17-29.
- Kiczorowska, B., Samolińska, W., Al-Yasiry, A. R. M., Kiczorowski, P., and Winiarska-Mieczan, A. (2017). The natural feed additives as immunostimulants in monogastric animal nutrition-a review. *Annals of Animal Science*, 17(3), 605-625.
- Kim, G. B., Seo, Y. M., Kim, C. H., and Paik, I. K. (2011). Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poultry Science*, 90, 75-82.
- Kizerwetter-Swida, M., and Binek, M. (2005). Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. *Polish Journal of Microbiology*, 54, 287-294.
- Knarreborg, A., Simon, M. A., Engberg, R. M., Jensen, B. B., and Tannock, G. W. (2002). Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5918-5924.
- Kocabağlı, N. ve Alp, M. (2015). Kanatlı beslemede kullanılan yem katkı maddeleri. *Türkiye Klinikleri Animal Nutrition and Nutritional Diseases-Special Topics*, 1(2), 17-24.
- Koçak, Y., Fındık, A. ve Çiftçi, A. (2016). Probiyotikler: genel özellikleri ve güvenilirlikleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 27(2), 118-122.
- Kodaikkal, V., Prajapati, J. B., and Ljungh, A. (2012). Evaluation of adhesion of *Lactobacillus* strains to HT-29 cells by a flow cytometric assay. *International Journal of Animal Science*, 1, 1-7.
- Konsak, B., Stanley, D., Haring, V. R., Geier, M. S., Hughes, R. J., Howarth, G. S., Crowley, T. M., and Moore, R. J. (2013). Identification of differential duodenal gene expression levels and microbiota abundance correlated with differences in energy utilisation in chickens. *Animal Production Science*, 53(12), 1269-1275.

- Korakli, M., Ganzle, M. G., and Vogel, R. F. (2002) Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 958-965.
- Korakli, M., Pavlovic, M., Gänzle, M. G., and Vogel, R. F. (2003). Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Applied Environmental Microbiology*, 69(4), 2073-2079.
- Kos, B., Susković, J., Vuković, S., Simpraga, M., Frece, J., Matosić, S. (2003). Adhesion and Aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 981–987.
- Krehbiel, C. R., Rust, S. R., Zhang, G., and Gilliland, S. E. (2003). Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: performance response and mode of action. *Journal of Animal Science*, 81(14), 120-132.
- Kristo, E., Miao, Z., and Corredig, M. (2011). The role of exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in structure formation and recovery of acid milk gels. *International Dairy Journal*, 21(9), 656-662.
- Ksonzeková, P., Bystrický, P., Vlcková, S., Pätoprst'ýb, V., Pulzová, L., Mudroňová, D., Kubasková, T., Csanka, T., and Tkáčiková, L. (2016). Exopolysaccharides of *Lactobacillus reuteri*: their influence on adherence of *E. coli* to epithelial cells and inflammatory response. *Carbohydrate Polymers*, 141, 10-19.
- Kum, C. ve Sekkin, S. (2012). Alternative approaches to antibiotics. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 3(3), 84-116.
- Kumar, R., Mukherjee, S. C., Prasad, K. P., and Pal, A. K. (2006). Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). *Aquaculture Research*, 37, 1215-1221.
- Kumprecht, I., Zobac, P., Siske, V., Sefton, A. E., and Spring, P. (1997). Effects of dietary mannanoligosaccharide level on performance and nutrient utilization of broilers. *Poultry Science*, 76(Suppl 1), 132.
- Kurtoglu, V., Kurtoglu, F., Seker, E., Coskun, B., Balevi, T., and Polat, E. S. (2004). Effect of probiotic supplementation on laying hen diets on yield performance and serum and egg yolk cholesterol. *Food Additives and Contaminants*, 21(9), 817-823.
- Kutlu, H. R. (2015). *Kanatlı Hayvan Besleme Ders Notu*. (1. Baskı). Adana: Çukurova Üniversitesi Yayınları, 1-5.
- Kutlu, H. R. ve Şahin, A. (2017). Kanatlı beslemede güncel çalışmalar ve gelecek için öneriler. *Hayvansal Üretim*, 58(2), 58-65.
- Larbier, M., and Leclercq, B. (1994). *Nutrition and feeding of poultry*. Nottingham (UK): Nottingham University Press, 120-125.

- Lee, I. Y., Seo, W. T., Kim, G. J., Kim, M. K., Ahn, S. G., Kwon, G. S., and Park, Y. H. (1997). Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 16 (2), 71-75.
- Lee, S., Lillehoj, H. S., Park, D. W., Hong, Y. H., and Lin, J. J. (2007). Effects of *Pediococcus*-and *Saccharomyces*-based probiotic (MitoMax®) on coccidiosis in broiler chickens. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 30(4), 261-268.
- Lee, S. H., Lillehoj, H. S., Dalloul, R. A., Park, D. W., Hong, Y.H., and Lin, J.J. (2007). Influence of *Pediococcus*-based probiotic on coccidiosis in broiler chickens. *Poultry Science*, 86(1), 63-66.
- Leigh, J. A., and Walker, G. C. (1994). Exopolysaccharides of rhizobium: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends in Genetics*, 10(2), 63-67.
- Li, Y. B., Xu, Q. Q., Yang, C. J., Yang, X., Lv, L., Yin, C. H., Liu, X. L., and Yan, H. (2014). Effects of probiotics on the growth performance and intestinal micro flora of broiler chickens. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, 713-717.
- Liong, M. T., and Shah, N. P. (2005). Optimization of cholesterol removal by probiotics in the presence prebiotics by using a response surface method. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1745-1753.
- Liu, N., Ding, K., Wang, J. Q., Jia, S. C., Wang, J. P., and Xu, T. S. (2017). Detoxification, metabolism, and glutathione pathway activity of aflatoxin B1 by dietary lactic acid bacteria in broiler chickens. *Journal of Animal Science*, 95(10), 4399-4406.
- Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J. J., and Lee, M. D. (2003). Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 6816-6824.
- Lynch, K. M., McSweeney, P. L., Arendt, E. K., Uniacke-Lowe, T., Galle, S., and Coffey, A. (2014). Isolation and characterisation of exopolysaccharide-producing *Weissella* and *Lactobacillus* and their application as adjunct cultures in Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 34(1), 125-134.
- Magnoli, A. P., Rodriguez, M. C., Pereyra, M. G., Poloni, V. L., Peralta, M. F., Nilson, A. J., and Cavaglieri, L. R. (2017). Use of yeast (*Pichia kudriavzevii*) as a novel feed additive to ameliorate the effects of aflatoxin B1 on broiler chicken performance. *Mycotoxin Research*, 33(4), 273-283.
- Malago, J. J., Koninkx, J. F. J. G., and Marinsek-Logar, R. (2011). Probiotic bacteria and enteric infections. *Springer*, 1-9.
- Mani-López, E., García, H. S., and López-Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, 45(2), 713-721.
- Mann, E. E., and Wozniak, D. J. (2012). *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 893-916.

- Manning, T. S., and Gibson, G. R. (2004). Prebiotics. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 18, 287-298.
- Mansoor, M., Jamil, M., Khan, A., ul Haq, R., and Anwar, F. (2017). Control of Avian Coccidiosis: Present and Future Strategies for Natural Alternatives of Therapeutics. *Biological Sciences- Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 60(1), 49-62.
- Mappley, L. J., Tchórzewska, M. A., Nunez, A., Woodward, M. J., Bramley, P. M., and La Ragione, R. M. (2013). Oral treatment of chickens with *Lactobacillus reuteri* LM1 reduces *Brachyspira pilosicoli*-induced pathology. *Journal of Medical Microbiology*, 62(2), 287-296.
- Markowiak, P., and Śliżewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*, 10(1), 1-21.
- Marshall, V. M., and Rawson, H. L. (1999). Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 34(2), 137-143.
- Marx, S. P., Winkler, S., and Hartmeier, W. (2000). Metabolization of b-(2,6)-linked fructoseoligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 182, 163-169.
- Midilli, M., Alp, M., Kocabağlı, N., Muğlalı, O.H., Turan, N., Yilmaz, H., and Cakir, S. (2008). Effects of dietary probiotic and prebiotic supplementation on growth performance and serum IgG concentration of broilers. *South African Journal Of Animal Science*, 38(1), 21-27.
- Milci, S. ve Yaygın, H. (2005). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler ve süt ürünlerindeki fonksiyonları. *Gıda/The Journal of Food*, 30(2), 123-129.
- Mohammed, A. A., Jacobs, J. A., Murugesan, G. R., and Cheng, H. W. (2018). Effect of dietary synbiotic supplement on behavioral patterns and growth performance of broiler chickens reared under heat stress. *Poultry Science*, 97(4), 1101-1108.
- Mohan, B., Kadirvel, R., Bhaskaran, M., and Natarajan, A. (1995). Effect of probiotic supplementation on serum/yolk cholesterol and on egg shell thickness in layers. *British Poultry Science*, 36(5), 799-803.
- Mookiah, S., Sieo, C. C., Ramasamy, K., Abdullah, N., and Ho, Y. W. (2014). Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(2), 341-348.
- Mountzouris, K. C., Tsirtsikos, P., Kalamara, E., Nitsch, S., Schatzmayr, G., and Fegeros, K. (2007). Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poultry Science*, 86, 309-317.

- Nabizadeh, A. (2012). The effect of inulin on broiler chicken intestinal microflora, gut morphology, and performance. *Journal of Animal Feed Science and Technology*, 21(4), 725-734.
- Nakphaichit, M., Sobanbua, S., Siemuang, S., Vongsangnak, W., Nakayama, J., and Nitisinprasert, S. (2019). Protective effect of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 against *Salmonella enteritidis* challenge in chickens. *Beneficial Microbes*, 10(1), 43-54.
- Nakphaichit, M., Thanomwongwattana, S., Phraephaisarn, C., Sakamoto, N., Keawsompong, S., Nakayama, J., and Nitisinprasert, S. (2011). The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. *Poultry Science*, 90(12), 2753-2765.
- Nawaz, H., Irshad, M. A., and Ali, M. (2016). Effect of probiotics on growth performance, nutrient digestibility and carcass characteristics in broilers. *JAPS: Journal of Animal and Plant Sciences*, 26(3), 599-604.
- O'Connor, E. B., Barrett, E., Fitzgerald, G., Hill, C., Stanton, C., and Ross, R. P. (2005). Production of vitamins, exopolysaccharides and bacteriocins by probiotic bacteria. *Probiotic Dairy Products*, 167-194.
- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions—a review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 57-62.
- Ohimain, E. I., and Ofongo, R. T. S. (2012). The effect of probiotic and prebiotic feed supplementation on chicken health and gut microflora: a review. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4(2), 135-43.
- Olnood, C. G., Beski, S. S., Choct, M., and Iji, P. A. (2015). Novel probiotics: Their effects on growth performance, gut development, microbial community and activity of broiler chickens. *Animal Nutrition*, 1(3), 184-191.
- Ortiz, L. T., Rodriguez, M. L., Alzueta, C., Rebole, A., and Trevino, J. (2009). Effect of inulin on growth performance, intestinal tract sizes, mineral retention and tibial bone mineralisation in broiler chickens. *British Poultry Science*, 50 (3), 325-332.
- Otero, M. C., and Nader-Macías, M. E. (2007). *Lactobacillus* adhesion to epithelial cells from bovine vagina. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 749-757.
- Ouwehand, A. C., and Salminen, S. (2003). In vitro adhesion assays for probiotics and their in vivo relevance: a review. *Microbial Ecology in Health And Disease*, 15(4), 175-184.
- Owings, W. S., Reynolds, D. L., Hasiak, R. S., and Ferket, P. R. (1960). Influence of Dietary Supplementation with *Streptococcus faecium* M-74 on Broiler Body Weight, Feed Conversion, Carcass Characteristics, and Intestinal Microbial Colonization. *Poultry Science*, 69, 1257-1264.
- Önal, D., Beyatlı, Y., and Aslım, B. (2005). Probiyotik bakterilerin epitel yüzeylere yapışması. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(9), 1-10.

- Öner, E. T. (2013). Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass, pretreatment techniques for biofuels and biorefineries. *Green Energy and Technology*, 35-56.
- Öno1, A. G. ve Yalçın, S. (1996). Ekmek mayasının yumurta tavuğu rasyonlarında kullanılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 42, 161-167.
- Özcan, B. D. ve Ayaşan, T. (2009). Hayvan Beslemede Biyoteknoloji Uygulamaları. *Tavukçuluk Araştırma Dergisi*, 8(1), 58-63.
- Öztürk, H. (2008a). Effects of inulin on rumen metabolism in vitro. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 55, 79-82.
- Öztürk, H. (2008b). Ruminant beslemesinde probiyotik mayalar. *Veteriner Hekimleri Derneği Dergisi*, 79(3), 37-42.
- Özyurt, V. H. ve Ötleş, S. (2014). Prebiyotikler: metabolizma için önemli bir gıda bileşeni. *Akademik Gıda*, 12(1), 115-123.
- Paganini, F. (2005). Controlling coccidiosis in drug-free production. Facing the challenge of Drug-free production. *World Poultry*, 12(21), 25.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S., and Sugita, H. (2004). Immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102, 379-388.
- Parker, R. B. (1974). The other half of antioibotic story. *Animal Nutrition Health*, 29, 4-8.
- Patel, A., and Prajapat, J. B. (2013). Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advances in Dairy Research*, 1(2), 1-8.
- Patel, P. J., Singh, S. K., Panaich, S., and Cardozo, L. (2014). The aging gut and the role of prebiotics, probiotics, and synbiotics: A review. *Journal of Clinical Gerontology and Geriatrics*, 5, 3-6.
- Patterson, J. A., and Burkholder, K. M. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, 82(4), 627-631.
- Poorghasemi, M., Chamani, M., Mirhosseini, S. Z., Sadeghi, A. A., and Seidavi, A. (2018). Effect of probiotic and different sources of fat on performance, carcass characteristics, intestinal morphology and ghrelin gene expression on broiler chickens. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(2), 169-178.
- Porres, J. M., Etcheverry, P., Miller, D. D., and Lei, X. G. (2001). Phytase and citric acid supplementation in whole-wheat bread improves phytate-phosphorus release and iron dialyzability. *Journal of Food Science*, 66(4), 614-619.
- Pourabedin, M., and Zhao, X. (2015). Prebiotics and gut microbiota in chickens. *FEMS Microbiology Letters*, 362(15), 122.

- Rajoka, M. S. R., Hayat, H. F., Sarwar, S., Mehwish, H. M., Ahmad, F., Hussain, N., Shahb, S. Z. H., Khurshid M., Siddiqu, M., and Shi, J. (2018). Isolation and evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from poultry intestine. *Microbiology*, 87(1), 116-126.
- Rastall, R., Gibson, G. R., Gill, H. S., Guarner, F., Klaenhammer, T. R., Pot, B., Reid, G., Rowland, I. R., and Sanders, M. E. (2005). Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiology Ecology*, (52), 145-152.
- Resmi Gazete. Yem Katkıları ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı ve Kullanımı Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ. 21 Ocak 2006. *Tarım ve Köyişleri Bakanlığından*, 26056.
- Resmi Gazete. Yem Katkıları ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı ve Kullanımı Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ. 3 Mayıs 2007. *Tarım ve Köyişleri Bakanlığından*, 26511.
- Rinttilä, T., and Apajalahti, J. (2013). Intestinal microbiota and metabolites—Implications for broiler chicken health and performance<sup>1</sup>. *Journal of Applied Poultry Research*, 22(3), 647-658.
- Ritzi, M. M., Abdelrahman, W., Mohnl, M., and Dalloul, R. A. (2014). Effects of probiotics and application methods on performance and response of broiler chickens to an *Eimeria* challenge. *Poultry Science*, 93(11), 2772-2778.
- Roberts, T., Wilson, J., Guthrie, A., Cookson, K., Vancraeynest, D., Schaeffer, J., Moody, R., and Clarket, S. (2015). New issues and science in broiler chicken intestinal health Emerging technology and alternative interventions. *The Journal of Applied Poultry Research*, 24, 257-66.
- Roller, S., and Dea, I. C. M. (1992). Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12(3), 261-277.
- Roos, S., and Jonsson, H. (2002). A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology*, 148(2), 433-442.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., and Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12, 163-171.
- Saad, N, Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., and Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT. Food Science and Technology*, 50(1), 1-16.
- Sağdıç, O., Küçüköner, E. ve Özçelik, S. (2004). Probiyotik ve prebiyotiklerin fonksiyonel özellikleri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35, 3-4.
- Sağlam, H. ve Karahan, A. G. (2017). Laktik asit bakterilerinin plazmidleri ve bunların özellikleri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2), 252-285.



- Saint-Cyr, M. J., Haddad, N., Taminiau, B., Poezevara, T., Quesne, S., Amelot, M., Daube, G., Chemaly, M., Dousset, X., and Guyard-Nicodème, M. (2017). Use of the potential probiotic strain *Lactobacillus salivarius* SMXD51 to control *Campylobacter jejuni* in broilers. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 9-17.
- Salanitro, J. P., Fairchilds, I. G., and Zgornicki, Y. D. (1974.) Isolation, culture characteristics, and identification of anaerobic bacteria from the chicken cecum. *Journal of Applied Microbiology*, 27, 678-687.
- Salazar, N., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilan, C. G., and Ruas-Madiedo, P. (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria as fermentable substrates by the intestinal microbiota. *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, 56(9), 1440-1453.
- Salinas, I., Cuesta, A., Esteban, M. A., and Meseguer J. (2005). Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish Shelfish Immunology*, 19, 67-77.
- Samal, L., and Behura, N. C. (2015). Prebiotics: An emerging nutritional approach for improving gut health of livestock and poultry. *Asian Journal of Animal Veterinary Addves*, 10(11), 724-39.
- Santagati, M., Scillato, M., Patanè, F., Aiello, C., and Stefani, S. (2012). Bacteriocin-producing oral *Streptococci* and inhibition of respiratory pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 65(1), 23-31.
- Sarangi, N. R., Babu, L. K., Kumar, A., Pradhan, C. R., Pati, P. K., and Mishra, J. P. (2016). Effect of dietary supplementation of prebiotic, probiotic, and synbiotic on growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Veterinary World*, 9(3), 313.
- Sarıca, Ş. (1999). Kanatlı hayvan beslemede probiyotik kullanımı. *Hayvansal Üretim*, 39, 105-112.
- Sarikaya, H., Aslim, B., and Yuksekdağ, Z. N. (2017). Assessment of anti-biofilm activity and bifidogenic growth stimulator (BGS) effect of lyophilized exopolysaccharides (L-EPSs) from *Lactobacilli* strains. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 362-371.
- Savage, T. F., Cotter, P. F., and Zakrzewska, E. I. (1996). The effect of feeding mannanoligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA of Wrolstad MW male turkeys. *Poultry Science*, 75, 143.
- Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Hanmoungjai, P., and Techapun, C. (2011). Exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as an alternative carbon source: the effect of peptone, yeast extract and beef extract. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 33(4), 379-387.
- Sekhon, B. S., and Jairath, S. (2010). Prebiotics, probiotics and synbiotics: an overview. *Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 1(2), 13.

- Seo, B. J., Bajpai, V. K., Rather, I. A., and Park, Y. H. (2015). Partially purified exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* YML009 with total phenolic content, antioxidant and free radical scavenging efficacy. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 49(4), 282-292.
- Servin, A. L., and Coconnier, M. H. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 741-754.
- Sezen, A. G. (2013). Prebiyotik, probiyotik ve sinbiyotiklerin insan ve hayvan sağlığı üzerine etkileri. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 8(3), 248-258.
- Shalaei, M., Hosseini, S. M., and Zergani, E. (2014). Effect of different supplements on eggshell quality, some characteristics of gastrointestinal tract and performance of laying hens. *In Veterinary Research Forum*, 5(4), 277.
- Shang, Y., Kumar, S., Thippareddi, H., and Kim, W. K. (2018). Effect of dietary fructooligosaccharide (FOS) supplementation on ileal microbiota in broiler chickens. *Poultry Science*, 97(10), 3622-3634.
- Shankar, P. A., Premavalli, K., Omprakash, A. V., Kirubakaran, J. J., and Hudson, G. H. (2017). Effect of dietary yeast supplementation on the production performance of broilers. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 7, 222-228.
- Sharman, P. A., Smith, N. C., Wallach, M. G., and Katrib, M. (2010). Chasing the golden egg: vaccination against poultry coccidiosis. *Parasite Immunology*, 32(8), 590-598.
- Shen, X., Yi, D., Ni, X., Zeng, D., Jing, B., Lei, M., and Xin, J. (2014). Effects of *Lactobacillus plantarum* on production performance, immune characteristics, antioxidant status, and intestinal microflora of bursin-immunized broilers. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(4), 193-202.
- Shin, H. S., Lee, H., Pestka, J. J., and Ustunol, Z. (2000). Growth and viability of commercial Bifidobacterium spp. in skim milk containing oligosaccharides and inulin. *Journal of Food Science*, 65, 884-887.
- Shokryazdan, P., Jahromi, M.F., Liang, J.B., Ramasamy, K., Sieo, C.C., and Ho, Y.W. (2017). Effects of a *Lactobacillus salivarius* mixture on performance, intestinal health and serum lipids of broiler chickens. *PloS One*, 12(5), 1-20.
- Singh, R .S., Saini, G. K., and Kennedy, J. F. (2008). Pullulan: microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73(4), 515-531.
- Singla, V., and Chakkaravarthi, S. (2017). Applications of prebiotics in food industry: A review. *Food Science and Technology International*, 23(8), 649-667.
- Siwek, M., Slawinska, A., Stadnicka, K., Bogucka, J., Dunislawska, A., and Bednarczyk, M. (2018). Prebiotics and synbiotics—in ovo delivery for improved lifespan condition in chicken. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 402.

- Slizewska, K., Cukrowska, B., Smulikowska, S., and Cielecka-Kuszyk, J. (2019). The Effect of Probiotic Supplementation on Performance and the Histopathological Changes in Liver and Kidneys in Broiler Chickens Fed Diets with Aflatoxin B1. *Toxins*, 11(2), 1-15.
- Soyuçok, A., Ekiz T. ve Kılıç, G. B. (2016). Ekzopolisakkaritlerin özellikleri ve gıda sanayindeki önemi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5, 332-344.
- Stanley, D., Hughes, R. J., and Moore, R. J. (2014). Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(10), 4301-4310.
- Sugiharto, S. (2016). Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(2), 99-111.
- Sundar, S. B., Harikrishnan, T. J., Latha, B. R., Chandra, G. S., and Kumar, T. M. S. A. (2017). Anticoccidial drug resistance in chicken coccidiosis and promising solutions: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5, 1526-1529.
- Suresh Kumar, A., Mody, K., and Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides—a perception. *Journal of Basic Microbiology*, 47(2), 103-117.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A.L., Habjanič, K., and Matošić, S. (2010). Antimicrobial Activity--The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 296-307.
- Sutherland, I. W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology*, 16(1), 41-46.
- Świątkiewicz, S., Świątkiewicz, M., Arczewska-Wlosek, A., and Jozefiak, D. (2015). Chitosan and its oligosaccharide derivatives (chito-oligosaccharides) as feed supplements in poultry and swine nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99, 1-12.
- Şener, A., Temiz, A., Toğay, S. Ö. ve Bağcı, U. (2008). Çeşitli prebiyotiklerin *Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bb-12*'nin gelişimi ve asitlik geliştirme özelliği üzerine *in vitro* etkileri. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, 889-892.
- Tarabees, R., Gafar, K. M., EL-Sayed, M. S., Shehata, A. A., and Ahmed, M. (2018). Effects of dietary supplementation of probiotic mix and prebiotic on growth performance, cecal microbiota composition, and protection against *Escherichia coli* o78 in broiler chickens. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10, 1-9.
- Teng, P. Y., Chung, C. H., Chao, Y. P., Chiang, C. J., Chang, S. C., Yu, B., and Lee, T. T. (2016). Administration of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* as direct-fed microbials improves intestinal microflora and morphology in broiler chickens. *The Journal of Poultry Science*, 54(2), 134-141.
- Terre, M., Calvo, M. A., Adelantado, C., Kocher, A., and Bach, A. (2007). Effects of mannan oligosaccharides on performance and microorganism fecal counts of calves

- following an enhanced-growth feeding program. *Animal Feed Science and Technology*, 137(1-2), 115-125.
- Terzaghi, B. E., and Sandine, W. E. (1975). Improved medium for lactic *Streptococci* and their bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 29(6), 807-813.
- Thibodeau, A., Fravallo, P., Yergeau, É., Arsenault, J., Lahaye, L., and Letellier, A. (2015). Chicken caecal microbiome modifications induced by *Campylobacter jejuni* colonization and by a non-antibiotic feed additive. *PLoS One*, 10(7), 1-15.
- Tripathi, M. K., and Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225-241.
- Tsuda, H., and Miyamoto, T. (2010). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic activity of the exopolysaccharide. *Food Science and Technology Research*, 16(1), 87-92.
- Tsuda, H., Okuda, S., Haraguchi, T., and Kodama, K. (2018). Influence of exopolysaccharide on the growth of lactic acid bacteria. *Italian Journal of Food Science*, 31(2), 10-17.
- Tuncer, H. İ. (2007). Karma Yemlerde Kullanımı Yasaklanan Hormon, Antibiyotik, Antikoksidiyal ve İlaçlar (Derleme). *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 47(1), 1-9.
- Tunç, M. A. (2007). *Humatların koyunlarda rumen parametreleri ve bazı kan değerleri üzerine etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi. Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Erzurum, 18-52.
- Tükenmez, Ü. ve Aslım, B. (2018). Probiyotik kaynaklı, muhtemel prebiyotik özelliğe sahip ekzopolisakkarit (EPS)'lerin biyolojik ve fonksiyonel özellikleri. *Medical Journal of Suleyman Demirel University*, 25(4), 487-497.
- Tüzün, C. G. ve Çiftçi, İ. (2010). Kanatlılarda sağlıklı bağırsak mikroflorası gelişimi üzerine beslemenin etkileri. *Tavukçuluk Araştırma Dergisi*, 9(1), 48-55.
- Ülger, İ., Beyzi, S. B., Kaliber, M. ve Konca, Y. (2015). Kanatlı Sektöründe Probiyotiklerin Etkinliği ve Geleceği. *Tavukçuluk Araştırma Dergisi*, 12(2), 7-12.
- Üstündağ, A. Ö. ve Özdoğan, M. (2017). Kanatlı beslemede alterbiyotik kullanımı: probiyotikler, prebiyotikler, organik asitler ve bakteriyosinler. *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri-Farmakoloji ve Toksikoloji Özel Dergisi*, 3(3), 1-16.
- Van Tassell, M. L., and Miller, M. J. (2011). *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients*, 3(5), 613-636.
- Vegas, R., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J. C., Álvarez, J. R., and Luque, S. (2006). Purification of oligosaccharides from rice husk autohydrolysis liquors by ultra-and nano-filtration. *Desalination*, 199(1-3), 541-543.

- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., and Yang, Z. (2015). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 125, 16-25.
- Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C., and Song, S. (2008). Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(3), 283-288.
- Wang, Y., Dong, Z., Song, D., Zhou, H., Wang, W., Miao, H., and Li, A. (2018). Effects of microencapsulated probiotics and prebiotics on growth performance, antioxidative abilities, immune functions, and caecal microflora in broiler chickens. *Food and Agricultural Immunology*, 29(1), 859-869.
- Wei, S., Morrison, M., and Yu, Z. (2013). Bacterial census of poultry intestinal microbiome. *Poultry Science*, 92, 671-683.
- Welman, A. D., and Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21(6), 269-274.
- Williams, R. B. (1999). A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *International Journal for Parasitology*, 29(8), 1209-1229.
- Yadav, A. S., Kolluri, G., Gopi, M., Kumaragurubaran, K., Malik, S. Y., and Dhama K. (2016). Exploring alternatives to antibiotics as health promoting agents in poultry- a review. *Journal Of Experimental Biology and Agriculture Sciences*, 4(3S), 368-83.
- Yalçın, S., Kocaoğlu Güçlü, B., Karakaş, Oğuz, F. ve Yalçın S. (2002). Yumurta tavuğu rasyonlarında enzim, probiyotik ve antibiyotik kullanılması, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 49, 135-141.
- Yalçınkaya, İ. ve Leblebiciler, Ö. D. Y. (2012). Prebiyotik olarak kullanılan sindirilmeyen oligosakkaritlerin kanatlı beslemedeki önemi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 5(1), 29-35.
- Yalçınkaya, İ., Güngör, T., Başalan, M. ve Erdem, E. (2008). Manan Oligosaccharides (MOS) from *Saccharomyces cerevisiae* in Broilers: Effects on Performance and Blood Chemistry. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences*, 32(1), 43-48.
- Yang, Y., Iji, P. A., and Choct, M. (2009). Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *World's Poultry Science Journal*, 65(1), 97-114.
- Yeoman, C. J., Chia, N., Jeraldo, P., Sipos, M., Goldenfeld, N. D., and White, B. A. (2012). The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Animal Health Research Reviews*, 13(1), 89-99.
- Yılmaz, E., Genc, M. A., and Genc, E. (2007). Effects of dietary mannan oligosaccharides (MOS) on growth, body composition, intestine and liver histology of rainbow trout, *Onchoryncus mykiss* (Walbaum). *Israel Journal of Aquaculture*, 59(3), 183-189.

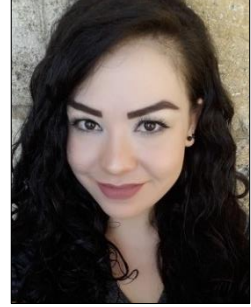
- Yuksekdag, Z. N., and Aslim, B. (2008). Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). *Brazilian archives of Biology and Technology*, 51(3), 581-585.
- Yuksekdag, Z. N., Sahin, N., and Aslim, B. (2014). *In vitro* evaluation of the suitability potential probiotic of lactobacilli isolates from the gastrointestinal tract of chicken. *European Food Research and Technology*, 239(2), 313-320.
- Yusrizal, Y., and Chen, T. C. (2003). Effect of adding chicory fructans in feed on fecal and intestinal microflora and excreta volatile ammonia. *International Journal of Poultry Science*, 2 (3), 188-194.
- Zdunczyk, Z., Jankowski, J., Juskiewicz, J., Stanczuk, J., and Wroblewska, M. (2004). Response of young turkeys to diets containing flavomycin, manan-oligosaccharide or inulin. *Veterinarija ir Zootechnika*, 25 (47), 94-96.
- Zentek, J., Marquart B., Pietrzak T., Ballevre O., and Rochat F. (2003). Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 87(11-12), 397-407.
- Zhang, L., Zhang, L., Zeng, X., Zhou, L., Cao, G., and Yang, C. (2016). Effects of dietary supplementation of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune response, intestinal barrier function, and digestive enzyme activity in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(1), 3.
- Ziggers, D. (2002). Growth promoting antibiotics finished in the EU. *Feed Technology*, 6(3), 8-9.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DİNÇER, İlknur  
 Uyuğu : T.C.  
 Doğum tarihi ve yeri : 11.10.1986, Ankara  
 Medeni hali : Bekar  
 e-mail : ilknurdincer1@gmail.com



### Eğitim

| Derece        | Eğitim Birimi                                                          | Mezuniyet Tarihi |
|---------------|------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Yüksek Lisans | Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı | Devam Ediyor     |
| Lisans        | Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü                       | 2012             |
| Lise          | Tarsus Mustafa Kemal Anadolu Lisesi                                    | 2004             |

### İş Deneyimleri

| Yıl        | Yer                                        | Görev            |
|------------|--------------------------------------------|------------------|
| 2017-Halen | Dokay-Çed Çevre Mühendisliği Ltd. Şti.     | Proje Yöneticisi |
| 2013-2017  | Eko-Zon Halk Sağlığı ve Çevre Danışmanlığı | Proje Müdürü     |

### Yabancı Dil

İngilizce

### Yayınlar

Dincer, I., Aslim, B., Bikric, S., Yuksekdog, Z.N. (2017, October 11-13). *Influence of Different Growth Conditions Due to Nitrogen Sources on Exopolysaccharide Production by 3 Lactobacillus salivarius Strains*, 2nd International Gazi Pharma Symposium, Faculty of Pharmacy, Gazi University, Ankara, 410.

Bikric, S., Aslim, B., Dincer, I., Yuksekdog, Z.N. (2017, October 11-13). *Effect of Carbon Sources on Exopolysaccharide Production by Lactobacillus salivarius BIS312, BIS722, and ZDM2132 Strains*, 2nd International Gazi Pharma Symposium, Faculty of Pharmacy, Gazi University, Ankara, 410.

### Hobiler

Fotoğrafçılık, Resim, Doğa Yürüyüşleri





*GAZİ GELECEKTİR..*