

**HAYVAN KAYNAKLI *LACTOBACILLUS* TÜRLERİNİN BAZI
PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Nur ŞAHİN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞUBAT 2012
ANKARA**

Nur ŞAHİN tarafından hazırlanan “HAYVAN KAYNAKLI *LACTOBACILLUS* TÜRLERİNİN BAZI PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI
Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ
Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

Yrd. Doç. Dr. Miraç YILMAZ
Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, H.Ü.

Tarih: .../.../2012

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Nur ŞAHİN

**HAYVAN KAYNAKLI *LACTOBACILLUS* TÜRLERİNİN BAZI
PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**
(Yüksek Lisans Tezi)

Nur ŞAHİN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2012

ÖZET

Bu çalışmada tavukların gastrointestinal sisteminden izole edilmiş 18 adet *Lactobacillus* türlerinin laktik asit, hidrojen peroksit üretimleri, antimikrobiyal aktiviteleri, antibiyotik duyarlılıkları, asitliğe karşı dirençlilikleri, safra tuzlarına karşı duyarlılıkları ve ekzopolisakkarit (EPS) üretimleri gibi bazı probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Suşların ürettiği yüzde asit miktarları % 0,42 - 0,90 arasında, hidrojen peroksit üretim miktarları 0,18–3,77 µg/mL arasında, EPS miktarları 10,60 –180,36 mg/L arasında olduğu belirlenmiştir. *Lactobacillus*'ların antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının incelenmesinde disk difüzyon metodu kullanılmış ve *Lactobacillus* suşlarının penisilin G (% 78 orta derecede ve % 22 duyarlı) ve ampisiline %100 duyarlılık, kanamisin ve gentamisine %100 dirençlilik göstermişlerdir. *Lactobacillus* spp. suşlarının tavuklarda hastalığa neden olan patojen bakterilerden *Shigella sonnei* Mu:57 suşuna karşı antimikrobiyal etkisinin %100, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşuna %94,5, *E. coli* O157:H7 suşuna %83,3, *Escherichia coli* ATCC 11229 suşuna %77,7, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 suşuna % 72,2, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşuna %66,6 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşuna %5,5 olduğu tespit edilmiştir. *Lactobacillus*'ların farklı pH değerlerine dirençliliklerinin zayıf olduğu belirlenmiştir. pH 1 gibi düşük bir pH' da gelişme oranı düşük olmasına rağmen suşların yine de canlı kalabildikleri belirlenmiştir. Ortamdaki asitlik oranı arttıkça, bakterilerin

yoğunluğu düşmüştür. *Lactobacillus* suşlarının safra toleransı derişime bağlı değişmektedir. Safra derişiminin %0,06'dan %0,30'a artmasıyla tüm suşların gelişimi düşmüştür. EPS üretimi yüksek olan 5 adet *Lactobacillus* suşların otoagregasyonu ve *E. coli* ATCC 11229 ile *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 suşlarıyla koagregasyon yetenekleri belirlenmiş ve en yüksek %otoagregasyon değeri *L. acidophilus* BAZ36 (%33,3) suşunda, *E. coli* ATCC 11229' un % koagregasyonu değerlendirildiğinde en yüksek % koagregasyon *L. acidophilus* BAZ36 (%28,3) suşunda, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076'ın % koagregasyonu değerlendirildiğinde ise en yüksek % koagregasyon *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32 (%25,0) suşunda tespit edilmiştir.

Bilim Kodu : 203.1.023

Anahtar Kelimeler : *Lactobacillus*, probiyotik, EPS üretimi, agregasyon, asit, safra

Sayfa Adedi : 84

Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ

**DETERMINATION OF SOME PROBIOTIC CHARACTERISTICS OF
LACTOBACILLUS SPECIES ORIGINATED FROM ANIMALS**

(M.Sc. Thesis)

Nur ŞAHİN

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

February 2012

ABSTRACT

In this study, 18 *Lactobacillus* spp. strains isolated from chicken *gastrointestinal system* studied probiotic characteristics such as lactic acid and hydrogen peroxide production, antimicrobial activity, antibiotic sensitivity, resistance against acidity, sensitivity against bile salts and exopolysaccharides (EPS) productions were investigated. Percentage of lactic acid produced by strains was found 0.42 to 0.90% and the amount of hydrogen peroxide production was determined between 0.18–3.77 µg/mL. In addition, EPS productions of strains were determined as a range of 10.60-180.36 mg/L. Disc diffusion method was used to examine antibiotic resistance among *Lactobacillus* spp. strains and strains were 100% sensitive to penicillin-G (78% moderate sensitive and 22% sensitive) and ampicillin, 100% resistant to gentamicin and kanamycin. The antimicrobial activities of *Lactobacillus* strains against seven different bacteria such as *Shigella sonnei* Mu:57, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* O157:H7, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 were found to be respectively, 100, 94.5, 83.3, 77.7, 72.2, 66.6 and 5.5%. *Lactobacillus* strains' resistance to different pH values were determined weak. Although the grow rate was low at low pH's such as pH 1, it was observed the strains can be still alive. Acidity ratio was increasing in the environment, the density of bacteria decreased. Bile tolerance of *Lactobacillus* strains changes

depending on the concentration. The development of all strains was decreased by the increase of bile concentration from 0,06 to 0,30%. Autoaggregation of 5 *Lactobacillus* strains that have high EPS production and coaggregation abilities of *E. coli* ATCC 11229 and *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 with that 5 strains were determined. The highest autoaggregation percentage value was 33,3% with *L. acidophilus* BAZ36. Considering the coaggregation percentage of *E. coli* ATCC 11229, *L. acidophilus* BAZ36 has the highest coaggregation percentage (28,3%), when the coaggregation percentage of *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 considered, the highest coaggregation percentage was 25,0% with *L. delbrueckii ssp. delbrueckii* BAZ32.

Science Code : 203.1.023

Key Words : *Lactobacillus*, probiotic bacteria, EPS, aggregation, acid, bile

Number of pages : 84

Thesis Adviser : Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca değerli ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım Sayın Hocam Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Kıymetli bilgilerinden faydalandığım, tez çalışmalarım boyunca desteğini, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen deneysel çalışmalarım esnasında deneyimlerinden ve yardımlarından faydalandığım Arş. Gör. Betül AYDIN'a, tüm Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanlarına,

manevi ve maddi destekleriyle hayatım boyunca yanımda olan annem ve babama, bana her zaman destek veren ağabeylerime, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, tüm sıkıntılarımı paylaşan nişanlıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER**Sayfa**

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Probiyotikler	3
2.1.1. Probiyotik mikroorganizmaların özellikleri.....	3
2.2. <i>Lactobacillus</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri.....	3
2.3. <i>Lactobacillus</i> 'ların Antimikrobiyal Özellikleri	5
2.3.1. Laktik asit üretimleri	6
2.3.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) üretimleri.....	7
2.4. <i>Lactobacillus</i> 'ların Antibiyotiklere Karşı Dirençlilikleri	8
2.5. <i>Lactobacillus</i> 'ların Ekzopolisakkarit Üretimi.....	9
2.6. <i>Lactobacillus</i> 'ların Asit ve Safra Dirençliliği.....	10
2.7. <i>Lactobacillus</i> 'ların Otoagregasyon ve Koagregasyon Yeteneği.....	12
2.8. Kanatlı Hayvan Beslenmesinde Probiyotik Kullanımı	13
3. MATERYAL ve METOD.....	20

Sayfa

3.1. Materyal	20
3.1.1. Araştırmada kullanılan test bakterileri	21
3.1.2. Araştırmada kullanılan besi ortamları	22
3.2. Metod	23
3.2.1. Bakterilerin muhafazası	23
3.2.2. Laktik asit üretimi	23
3.2.3. Hidrojen Peroksit üretimi	24
3.2.4. Antibiyotik duyarlılığı	26
3.2.5. Antimikrobiyal aktivite	26
3.2.6. Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi	27
3.2.7. Farklı pH değerlerine tolerans	28
3.2.8. Farklı safra konsantrasyonlarına tolerans	29
3.2.9. Otoagregasyon	29
3.2.10. Koagregasyon	30
3.2.11. İstatistiksel analizler	31
4. DENEYSEL BULGULAR	32
4.1. Laktik asit üretimi	32
4.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) üretimi	34
4.3. Antibiyotik duyarlılıkların belirlenmesi	36
4.4. Antimikrobiyal aktivite	40
4.5. Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi	44
4.6. Farklı pH değerlerine tolerans	46
4.7. Farklı safra konsantrasyonlarına tolerans	49

	Sayfa
4.8. Agregasyon	53
4.8.1. Otoagregasyon.....	53
4.8.2. Koagregasyon.....	54
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	56
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	84

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1 <i>Lactobacillus</i> spp. suşların kodları	20
Çizelge 3.2 Test bakterilerinin temin edildiği kaynaklar	21
Çizelge 4.1 <i>Lactobacillus</i> suşlarının laktik asit üretimleri.....	33
Çizelge 4.2 <i>Lactobacillus</i> suşlarının hidrojen peroksit üretimleri	35
Çizelge 4.3 CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi.....	37
Çizelge 4.4 <i>Lactobacillus</i> spp. suşlarının antibiyotiklere gösterdiği duyarlılık test sonuçları	38
Çizelge 4.5 Bakterilerin antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları.....	39
Çizelge 4.6 <i>Lactobacillus</i> spp. suşlarının patojen bakteriler üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun çap değerleri (mm)	41
Çizelge 4.7 <i>Lactobacillus</i> suşlarının EPS üretimleri.....	46
Çizelge 4.8 <i>Lactobacillus</i> suşlarının farklı pH değerlerine toleransı.....	47
Çizelge 4.9 <i>Lactobacillus</i> suşlarının farklı safra konsantrasyonlarına toleransı.....	51
Çizelge 4.10 <i>Lactobacillus</i> spp. suşlarının otoagregasyon sonuçları.....	53
Çizelge 4.11 <i>E. coli</i> ATCC 11229 ile <i>Lactobacillus</i> spp. suşlarının koagregasyon sonuçları	54
Çizelge 4.12 <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076 ile <i>Lactobacillus</i> spp. suşlarının koagregasyon sonuçları	55

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1 <i>Lactobacillus</i> spp. son kültür pH değerleri ve ürettikleri yüzde asit miktarlarının karşılaştırılması	34
Şekil 4.2 <i>Lactobacillus</i> spp. suşlarının H ₂ O ₂ üretim miktarları	36
Şekil 4.3 <i>Lactobacillus</i> spp. suşlarının ürettikleri EPS miktarları	45
Şekil 4.4 Farklı pH değerlerinin <i>Lactobacillus</i> 'lar üzerinde % inhibisyon etkisi	48
Şekil 4.5 Farklı safra tuzu konsantrasyonların <i>Lactobacillus</i> 'lar üzerinde % inhibisyon değerleri.....	52

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> 'un SEM görüntüsü	4
Resim 2.2 <i>Lactobacillus brevis</i> 'in elektron mikroskop görüntüsü (Dr. Carrascosa (Chapter 8:Lactic Acid Bacteria).....	5
Resim 4.1 <i>L. acidophilus</i> BAZ 61 suşunun antibiyotik duyarlılığı	39
Resim 4.2 <i>L. acidophilus</i> BAZ61 suşunun <i>E. coli</i> O157:H7 test bakterisine oluşturduğu inhibisyon zonu	42
Resim 4.3 <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> BAZ32 suşunun <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076 test bakterisine oluşturduğu inhibisyon zonu	43
Resim 4.4 <i>L. acidophilus</i> BAZ36'nın otoagregasyonun ışık mikroskobu görüntüsü.....	54
Resim 4.5 <i>L. acidophilus</i> BAZ36 suşunun <i>E. coli</i> suşu ile koagregasyonunun ışık mikroskop görüntüsü	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
cm	Santimetre
et al.	ve arkadaşları
g	Gram
L	Litre
mL	Mililitre
mg	Miligram
mm	Milimetre
nm	Nanometre
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
pH	Asitlik Bazlık Birimi
spp	Species
subsp	Subspecies (Alt Tür)
vd	Ve diğerleri
vs	Ve saire
%	Yüzde

Kısaltmalar**Açıklama****dak.**

Dakika

dev.

Devir

Eş.

Eşitlik

EPS

Ekzopolisakkarit

LAB

Laktik Asit Bakterileri

MRS

Man Rogosa Sharp besiyeri

OD

Optikal Dansite

PBS

Fosfat Tampon Çözeltisi

rpm

Dakikada Devir Sayısı

1. GİRİŞ

Probiyotikler; hayvanlarda ve insanlarda antibiyotik kullanımına alternatif olabilecek ve hayvanlardaki verimliliği hakkında oldukça fazla araştırma yapılan önemli bir konudur (Park ve ark., 2005; Na-Kyoung ve ark., 2008; Messaoudi ve ark., 2011). Canlı hayvan veya insanlara verilen mikroorganizmaların tek veya karışık kültürleri olan probiyotikler laktik asit, asetik asit, bakteriyosin, hidrojen peroksit, ekzopolisakkarit üretimi gibi bazı özellikleri bakımından etkilidirler. Probiyotiklerin bu özellikleri, bağırsaklarda antibiyotiğe bağlı oluşan ishal, laktoz intoleransı önleme veya azaltma, kolesterol düşürme, kolon kanserini önleme ve bağışıklık sistemi uyarma gibi etkileri açısından incelenmiştir (Sullivan ve ark., 2005; Park ve ark., 2007). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO: Food and Agriculture Organization of United Nations) ile Dünya Sağlık Örgütüne (WHO: World Health Organization) göre yeterli miktarda probiyotik kullanımı konak üzerinde sağlık açısından önemlidir. Ve en önemli özelliği hayvansal atık oluşturmaması ve antibiyotiklere ihtiyaç duyulmamasıdır. Probiyotikler kanatlı hayvanlarda büyümeyi teşvik edici ajanlar olarak kullanılmaktadır (Koenen ve ark., 2004; Mountzouris ve ark., 2007). Ayrıca kanatlılarda mikrobiyal dengeyi sağladığı, yumurta veriminde artışı ve gastrointestinal sistem hastalıklarını azalttığı belirlenmiştir (Nahashon ve ark., 1994).

Probiyotikler uzun yıllardan beri hayvan beslemede verim arttırmaya yönelik uygulamalar çerçevesinde de kullanılmaktadır. Kanatlıları enfeksiyonlardan koruma ve geliştirmeyi teşvik etmek amacıyla sindirim sistemi mikroflora üyelerinden oluşan preparatların kullanımı öncelik kazanmıştır. Özellikle *Lactobacillus* türlerinden oluşan bu preparatlar sindirim ve absorpsiyonu kolaylaştırarak gelişimi desteklemektedir. Ayrıca epitel yüzeylerde koloniler oluşturarak patojen mikroorganizmaların gelişimini önlemektedir (Karademir ve Karademir, 2003).

Laktik asit bakterileri (LAB), genel olarak güvenli (GRAS=Generally Recognized As Safe) olarak kabul edilen organizmalardır. Çoğu laktik asit bakterileri, organik asitler, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal maddeler üretirler.

Probiyotik olarak kullanılan türleri *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*'dir (Çağlar ve ark., 2005).

Bu tez çalışmasında, hayvan kaynaklı bazı *Lactobacillus* türlerinin bazı probiyotik özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Tezin amacı doğrultusunda, bakterilerin laktik asit ve hidrojen peroksit üretimleri, antimikrobiyal aktiviteleri, antibiyotik duyarlılıkları, asitliğe karşı dirençlilikleri, safra tuzlarına karşı duyarlılıkları ve ekzopolisakkarit (EPS) üretimleri ile agrege olma özellikleri belirlenmiştir.

Bütün bu çalışmalar sonucunda bazı probiyotik özellikler bakımından üstün nitelikli olan hayvan kaynaklı *Lactobacillus* spp. bakterisinin bulunması hedeflenmiştir. Dolayısıyla bu çalışma probiyotik özellikleri bakımından üstün hayvan kaynaklı suşların belirlenmesini ve bu konuda çalışanlar için farklı bakış açısı getirmeyi amaçlamaktadır.

2.KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Probiyotikler

Probiyotikler, canlı hücrelerde kararlı olan mikroorganizmaları veya metabolitleri içeren, hayvanlar ve insanların her ikisinde de kolonizasyonu ve bağırsak mikrobiyota bileşimini optimize etmek ve sindirim süreci ile konağın bağışıklık sistemini uyarıcı etkiye sahip biyopreparatlar olarak tanımlanmıştır (Wang ve ark., 2010a). Probiyotik mikroorganizmaların en önemli grubunu laktik asit bakterileri oluşturmaktadır. Bunların içerisinde *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* cinslerine ait türler en yaygın olarak kullanılan probiyotik mikroorganizmalardır ve bu bakterilerin suşları, normal yetişkin insanların gastrointestinal (Gİ) sisteminde çok fazla bulunurlar (Vinderola ve Reinheimer 2003). Ayrıca bazı bakteri cinsleri ile maya ve küf türlerinden de probiyotik ürünlerin hazırlanmasında yararlanılmaktadır (Vinderolam ve Reinheimer 2003, Billoo ve ark. 2006, Kim ve ark. 2006).

2.1.1.Probiyotik mikroorganizmaların özellikleri

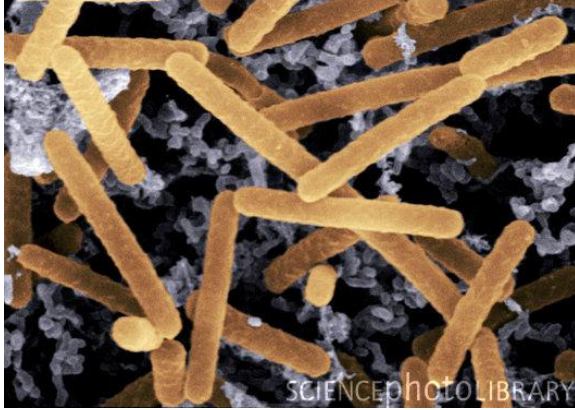
Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmalar; güvenilir olmalı, kullanıldığı insan ve hayvanlarda toksik madde oluşturmamalı, metabolik aktiviteleri ve antibiyotiklere dirençli olmalı, patojen ve karsinojenik olmamalı, genetik olarak stabil olmalı, hazırlama ve depolama süreçlerinde istenilen sürede canlılıklarını sürdürebilmeli, fajlara karşı dirençlilik göstermeli, büyük ölçülerde üretime elverişli olmalı, mide asidine, mide sıvısına ve safraya tolerans göstermeli, mukoza yüzeyine tutunabilmeli, bağışıklık sistemini iyi yönde etkilemeli, mide-bağırsak yolunda bulunan patojenlere karşı antagonistik aktivite gösterebilmeli, mutajen ve karsinojen maddelere karşı etkili olmalıdırlar (Morelli, 2007; Shah, 2007).

2.2. *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

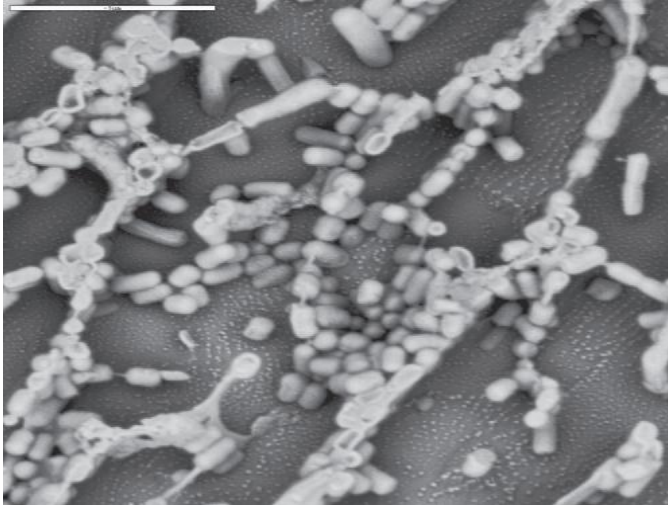
Lactobacillus cinsi bakteriler anaerobik, gram pozitif çubuk (Resim 2.1. ve Resim 2.2.) şekilli bakterilerdir (Makarova ve ark., 2006). Su ve toprakta hemen hemen hiç

rastlanmayan bu bakterilere, türe göre değişim göstererek süt ve süt ürünleri çalışma yerlerinde, bitki ve bitki atıklarında, insan ve diğer canlıların bağırsak sistemlerinde rastlanmaktadır. *Lactobacillus*'ların robioyotik türleri laktik asit, asetik asit ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler üreterek bağırsaklarda istenmeyen mikrofloranın çoğalma hızını kontrol ederler ve mikrofloranın dengede olmasını sağlarlar (Ljungh ve Wadström, 2009).

Bazı *Lactobacillus* cinsi bakterilerin anti-inflamatuar ve anti-kanser aktiviteleri gibi etkilere sahip olmalarının yanı sıra potansiyel tedavi edici özelliklerinin de olduğu belirlenmiştir. 2009 yılında Beth Israel Deaconess Tıp Merkezi ve Universty of California Los Angeles (UCLA) araştırmacıları tarafından yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus*'ların bazı suşlarının anti-tümör ve anti-kanser etkileri araştırılmış ve bu suşların koruyucu etkileri olduğu gözlenmiştir. Fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada kolon kanserini önleyici etkisi olduğu belirlenmiştir (Chen ve ark., 2009).



Resim 2.1 *Lactobacillus acidophilus*'un SEM görüntüsü
(<http://www.sciencephoto.com/media/113107/enlarge>)



Resim 2.2 *Lactobacillus brevis*'in elektron mikroskop görüntüsü (Carrascosa 2011, Chapter 8:Lactic Acid Bacteria)

2.3. *Lactobacillus*'ların Antimikrobiyal Özellikleri

Probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus* türleri, laktik asit, asetik asit, hidrojen peroksit, bakteriyosin ve yağ asitleri gibi çok sayıda antimikrobiyal bileşikler üretmektedirler. Başlıca üretilen organik asitlerden laktik asit ve asetik asit, mide-bağırsak yolunda pH' yı düşürerek patojenler üzerinde bakterisidal veya bakteriyostatik etki göstermektedirler. Laktik asit gram negatif patojen bakteriler üzerine etkili olduğu belirlenmiştir. LAB'lerinin ürettiği antimikrobiyal maddelerin intestinal enfeksiyonlarında koruyucu rol aldığı da tespit edilmiştir (Ammor ve ark., 2006; Vasiljevic ve Shah, 2008).

Lactobacillus türleri ürettikleri bakteriyosinler, laktik asit, hidrojen peroksit ve organik asitler ile gastrointestinal sistemde patojen olan mikroorganizmaların üremesini ve gelişimini engelleyerek antimikrobiyal aktivite göstermektedir. LAB'leri bu aktivitesi ile enterik patojenlere karşı bakterisidal veya bakteriyostatik özellik gösterirler (Taheri ve ark. 2009a).

Karimi ve ark., (2010) sağlıklı bir tavuğun sindirim sisteminden izole ettiği *L. fermentum* ve *L. rhamnosus* suşlarının *Escherichia coli* and *Salmonella* türü

patojenlere karşı antagonistik etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Menconi ve ark. (2011) yaptıkları bir çalışmada *Salmonella enterica*'nın civciv ve hindiler üzerindeki patojenitesini azaltmak için *Lactobacillus* suşlarını kullanılmışlar ve denemelerinde başarılı olmuşlardır.

2.3.1. Laktik asit üretimleri

Laktik asit; kozmetik, ilaç, gıda ve gıda dışı sanayileri, kimya sanayileri gibi çeşitli uygulamalar için önemli bir kimyasaldır (Calabia ve Tokiwa, 2007; Oshiro ve ark., 2009). Laktik asit bakterilerinin karbonhidratların fermantasyonu sonucunda ürettikleri son ürün laktik asittir. Laktik asidin 2 optik izomeri vardır. Bunlar; L-laktik asit ve D-laktik asittir. D(-) laktik asitin yüksek dozlarının insan vücudu için zararlı olması nedeniyle gıda ve ilaç endüstrilerinde L(+) laktik asitin kullanımı mevcuttur. Bu nedenle D(-) laktik asit üretimi ile ilgili yapılan çalışma sayısı azdır. Laktik asit üreten starter kültürler, fermente süt, et ve bitki ürünlerinin üretiminde kullanılıp ve fermantasyon sonucu oluşan laktik asit, raf ömrü, tadı, aroması, kıvamı ve kalitesi bakımından daha iyi ve gelişmiş bir ürünün oluşmasında etkili olmuştur (Hwanhlem ve ark., 2010). Buna ek olarak, laktik asit keskin asit tadının yoğurt lezzetini artırdığı belirlenmiştir (Erbaş ve ark., 2006). Laktik asit bakterilerinin ürettikleri laktik asidin neredeyse tamamını enerji kaynağına (şeker) dönüştürebileceği belirlenmiştir (Leroy ve De Vuyst, 2004).

Laktik asit, hidrosikarbolikarboksilik asitin yapı taşıdır. Biyolojik olarak parçalanabilen bu plastik özellikle poli L-laktik asittir. Bu nedenle L-laktik asit üretimine olan talep sanayide sürekli artmaktadır. L-laktik asit üretiminde en çok *L. rhamnosus* suşları kullanılmaktadır (Wang, 2010).

Laktik asit fermantasyonu, sürecinde oluşan organik asitlerin miktarı ve türü (örneğin; laktik asit, formik asit, vb.) fermantasyon yapan LAB'lerin tür veya suşlarına, kültür içeriğine ve üreme şartlarına göre farklılık göstermektedir. *Lactobacillus* türleri kok gruplarına göre daha yavaş asit üretirler ama asitli ortamlara daha toleranslıdır. Bu yüzden fermantasyonun son aşamasında LAB arasında

baskın tür olarak bilinmektedirler (Hwanhlem ve ark., 2010). Bununla birlikte, fermente ettiği gıdalarda laktik asidin yanı sıra çok az miktarda asetik asit, formik asit, etanol, aromatik maddeler, bakteriyosinler ve ekzopolisakkarit üretirler (Shihata ve Shah, 2002). Bu maddelerin üretilmesi pH'nin düşmesine, gıdalardaki kirliliğin önlenerek raf ömrünün uzamasına ve mikrobiyal güvenliği artırarak bakterilerin inhibisyonuna neden olurlar (Leroy ve De Vuyst, 2004; Zhang ve ark., 2011)

2.3.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) üretimleri

Laktik asit bakterilerinin bazılarının oksijenli ortamda hidrojen peroksit (H₂O₂) ürettikleri bilinmektedir. Laktik asit bakterileri H₂O₂ ürettikleri çeşitli mekanizmaları vardır. En fazla NADH'ın oksidaz enzimi yolu ile üretirler. NADH oksijenli ortamda hidrojen peroksiti parçalayarak toksik maddeleri oluşturarak antimikrobiyal etki gösterir ve bu böylece gıdaların uzun süre saklanmasını sağlar ve patojen bakterilerin üremesini engellerler (Kot ve ark. 1996).

Hidrojen peroksitin uzun süre saklanabilmesi için ısı, ışık ve katalizörün olmaması gerekir. Hidrojen peroksit, ortamda yüksek derişimlere ulaştığı zaman, gerçek antibiyotik olmadığı halde psikotrofik ve patojen mikroorganizmaları örneğin *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Clostridium* gibi birçok bakterilerin gelişimini inhibe etmektedir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen hidrojen peroksit, patojen ve gıda bozucu bakterilerin üremesini engellediği için, daha uzun süreli saklanabilen gıdaların üretiminde etkili olabilmektedir (Jaroni ve Brashears 2000, Campos ve ark., 2006). Heravi ve ark., (2011) yaptıkları çalışmada tavuktan izole ettikleri *L. salivarius* ve *L. crispatus* türlerinde yüksek miktarlarda hidrojen peroksit ürettiklerini *L. reuteri* türünün hidrojen peroksit üretiminin ise düşük miktarda olduğunu gözlenmemişlerdir.

Yapılan çalışmalarda laktik asit bakterilerinden *Lactococcus lactis*, *L. garvieae* (Delbes-Paus ve ark., 2010), *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. ürettikleri bakteriyosin (Arques ve ark., 2005) ve hidrojen peroksit ile *S. auerus* gibi patojen

bakterileri kontrol altına alarak üremesini engellediği belirlenmiştir (Ocana ve ark., 1999; Otero ve Nader-Macias, 2006).

2.4. *Lactobacillus*'ların Antibiyotiklere Karşı Dirençlilikleri

Probiyotik tedavisinin, antibiyotik tedavisi yerine cazip bir alternatif olduğu düşünülmektedir (Dhanani ve ark., 2011). Son yıllarda biyolojik sistemlerden tıp, eczacılık, endüstri, tarım ve hayvancılıkta faydalanılmaktadır. Günümüzde hem daha güvenilir, hem de daha ekonomik olması nedeniyle her dalda biyoteknolojik çalışmalara ağırlık verilmiştir. Probiyotik bakterilerini doğal insan florasındaki olumlu etkileri düşünülerek probiyotik teknolojisinde, üstün özelliklere sahip bazı suşların kullanılarak, hastalıkların tedavisinde antibiyotiklere alternatif olması düşünülmektedir (Çakır, 2003). Probiyotiklerin yalnızca tedavi amaçlı olmayıp, tıpta koruyucu amaçlı da kullanılabilmesi, ancak bunun için seçilecek suşların antibiyotiklere ve antifungal ilaçlara dirençli olmasının önemli bir kriter olduğu bildirilmiştir. Bu konuda *L. rhamnosus* suşunda çalışılmış ve bu bakteri suşlarının akut ishal tedavisi ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarını önlediği belirlenmiştir (Doron ve ark., 2005).

Tavuk çiftliklerinde yem katkı maddesi olarak kullanılacak probiyotiklerinin antibiyotik duyarlılık testleri de önemlidir. Bu konuda *Lactobacillus crispatus* suşunda denemeler yapılmış olup, çalışılan bu şusun nalidiksik asit ve neomisin antibiyotiğine direnç gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşılık, ampisilin, basitrasin, kloramfenikol, doksisisiklin, eritromisin, furazolidon içeren gentamisin, kanamisin, lincomycin, oksitetrasiklin, penisilin, streptomisin, tetrasiklin ve vankomisine bu şusun duyarlı olduğu gözlenmiştir (Taheri ve ark., 2009a).

Lactobacillus'ların genel olarak sefoksitin, siprofloksasin, kanamisin, gentamisin, streptomisin, teikoplanin, kotrimoksazol ve vankomisine yüksek derecede dirençli oldukları gözlenmiştir (Danielsen ve Wind, 2003).

Delgado ve arkadaşları (2007) *Lactobacillus* türüne ait bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarını incelemişler ve efoksitin veya penisilin dirençli olduklarını belirlemişlerdir.

2.5. *Lactobacillus*'ların Ekzopolisakkarit Üretimi

Ekzopolisakkaritler (EPS), çok sayıda bakterilerin (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* gibi) yüzeyinde bulunan ekzoselüler polimerlerdir (Ruas-Madiedo ve ark., 2006). Mikroorganizmaların çevrelerine salgıladıkları EPS yüksek molekül ağırlıklı şeker polimerleridir (Wang ve ark., 2010b) ve üretildikleri mikroorganizmaya bağlı olarak ortama jel ya da yapışkan şekilde bırakılır (Tieking ve Ganzle, 2005). Laktik asit bakterilerinin EPS üretimleri iki farklı biyosentetik yöntemle yapılmaktadır. Tek tip monosakkaritten oluşan homopolisakkaritler ve çeşitli monosakkaritlerin tekrarlayan birimlerinden oluşan heteropolisakkaritler bilinen EPS çeşitleridir (De Vuyst ve ark., 2001).

Yapılan bir çalışmada *Lactobacillus* suşlarından en fazla EPS üreten türlerin *L. panis*, *L. acidophilus*, *L. frumenti*, *L. reuteri*, *L. pontise* olduğu belirlenmiştir (Tieking ve ark., 2003). EPS moleküllerinin, antibiyotiklere ve toksik maddelere karşı hücreleri kurumadan, fagositozdan ve faj etkisinden koruduğu, yüksek oksijen gerilimi sağladığı ve yüzey tutunmasında yapıştırıcı işleve sahip olduğu bilinmektedir (Cerning ve ark., 1992; Fukuda ve ark., 2010). Bu polimerlerin bir diğer dikkate değer özelliği de gıda sanayinde kıvam arttırıcı olmalarıdır. EPS'lerin immün sistemi desteklediği, antitümoral ve kolesterol düşürücü aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (Bouzar ve ark., 1996; Welman ve Maddox, 2003).

Ekzopolisakkarit üretimi probiyotiklerin bağırsak yüzeyine kolonize olup canlılığını devam ettirebilmesini sağlayan önemli bir özelliktir (Mozzi ve ark., 2006). Mikroorganizmaların oluşturduğu EPS, bağırsak epitel dokusu ile bağırsak florasında bulunan bakteriler arasında bir bağ meydana getirir. Dolayısıyla EPS üretebilen suşlar epitele yüksek kapasitede yapışma özelliğine sahiptirler (Böke, 2005).

Kolesterol düşürücü aktivitesinin yanında immün düzenleyiciliği EPS'nin sağlık için yararlı özelliklerinden birkaçıdır (Chabot ve ark., 2001, Makino ve ark., 2006).

Tavuklardan izole edilen *Lactobacillus* türlerinde EPS üretimine ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır.

2.6. *Lactobacillus*'ların Asit ve Safra Dirençliliği

Probiyotikler, özellikle *Lactobacillus* ve *Bifidobacteria* cinslerine ait suşlar, insan ve hayvan sağlığı açısından gittikçe önemi artan türler olmuş ve gıda sektöründe bu durum önem kazanmıştır (Del Piano ve ark., 2006; Jones ve Varady, 2008). Probiyotiklerin mideden geçerek ince bağırsağa ulaşana kadar kolonize bir şekilde hayatta kalmaları gerekir. İnce bağırsak sistemik dolaşımın gerçekleşeceği önemli bir alandır (Geboes ve ark., 2001; Reed ve Wickham, 2009). Probiyotiklerin ince bağırsakta etkili olabilmesi için, midenin asitli ortamını (pH 1,5-3,0) geçerken canlı kalması gerekmektedir (Stanton ve ark., 2001, Gbassi ve ark., 2011) ve bu nedenle probiyotik mikroorganizma seçiminde asitlik direnci önem kazanmıştır. Tavuklarda mide pH'sı 2,5-3,5 arasında değişmektedir. Mide patojen mikroorganizmalara karşı doğal bir bariyer görevi yaptığı için mide pH'ının, asitlere dayanıklı *Lactobacillus*'lar hariç diğer mikroorganizmaların ince bağırsağa geçişlerinin önlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Kum, 2006). Probiyotikler mideden geçerken canlı kalabilmeli ve sayıca azalmamaları gerekmektedir. Probiyotik olarak kullanılan suşların asit dirençliliklerinin yüksek olması, midenin asidik ortamında canlılıklarını kaybetmeden bağırsak sistemine ulaşması ve ince bağırsakta kolonize olabilmeleri gerekmektedir (Vasiljevic ve Shah, 2008).

Probiyotiklerin gastrointestinal sistem boyunca gastrik asit ve safra tuzlarının varlığı nedeniyle canlı sayısında azalma meydana gelmektedir (Sultana ve ark., 2000; Duc ve ark., 2004; Madureira ve ark., 2005) Yapılan bir çalışmada *Lactobacillus plantarum* türünün sağlıklı bir insanın gastrointestinal sistemi boyunca kolonize olan en belirgin bakteri olduğu tespit edilmiştir (De Vries ve ark., 2006). *L. plantarum*

türünün aynı zamanda da ince bağırsaktaki enterik patojenlere karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Mack ve ark., 1999; Mangell ve ark., 2002; De Vries ve ark., 2006).

Bakterilerin probiyotik suş olarak kullanılabilmesi için mide asitliğinin yanı sıra safra tuzlarına dirençli olmaları da önemli bir özelliktir (FAO/WHO 2002, Burns ve ark., 2008). Safra organik (safra tuzları, kolesterol, fosfolipitler, bilirubin) ve inorganik (su ve elektrolitler) bileşiklerin sulu bir karışımından oluşur. Safra, gerektiği zaman doğrudan safra kanalı yoluyla karaciğerden onikiparmak bağırsağına geçer veya sindirim için hemen gereksinim yoksa safra kesesinde depolanabilir (Pan ve ark., 2011). Mide 1,5 ile 3 arasında bir pH değerine sahiptir ve üst bağırsakta safra 3–5 g/l içerir. Günde 500-700 ml miktarında ince bağırsağa salgılanan safra, bakterilerin büyük oranda lipit ve yağ asidi içeren hücre membranına zarar vererek antimikrobiyal etki göstermektedir (Demain, 1999). Genellikle, probiyotiklerin seçimindeki safra toleransı çalışmalarında %0,15 ve %0,30 konsantrasyonlarında safranin kullanılması önerilmektedir (Huang ve Adams, 2004). Safra konsantrasyonunun insandaki değerine yakın bir değer olmasından dolayı safraya dirençli olan suşları belirlemek için özellikle %0,30' lük safra konsantrasyonunun önemli olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Erkkila ve Petaja, 2000).

Yapılan bir çalışmada farklı pH konsantrasyonlarına dirençliliği ile ilgili *L. fermentum* suşu üzerinde denemeler yapılmış, pH 3 ortamında inkübe edilmiş ve üremesi gerçekleşmiştir. Bu suşun hayatta kalmak için asitli ortamlara dayanıklı olduğu ortaya konulmuştur. Yine *L. fermentum* suşları farklı safra konsantrasyonlarında da test edilmiş ve 3 g/L safra tuzu ile inkübasyonu sonucunda safraya dirençli olduğu belirlenmiştir. *L. fermentum* suşunun pH ve safraya dirençli olduğu belirlenmiş ve bu nedenle probiyotik bakteri olarak kabul edilmiştir (Pan ve ark. 2011).

Strompfová ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan bir diğer çalışmada *L. fermentum* AD1 suşunun % 1 safra varlığında ürediği, Lin ve ark., (2007) tarafından yapılan bir çalışmada da tavuktan izole ettikleri *L. fermentum* SGM3 şusunu % 0,3 safra tuzu varlığında geliştiği belirtilmiştir.

2.7. *Lactobacillus*'ların Otoagregasyon ve Koagregasyon Yeteneği

Laktik asit bakterileri tarafından gastrointestinal sistemin patojen mikroorganizmalarla inhibisyonun engellenmesi insan sağlığı açısından çok önemlidir ve bu yüzden probiyotik bakterilerde aranılan diğer bir özellikte agregasyon yeteneğidir (Xie ve ark., 2012). Agregasyon toplanma veya kümelenerek bir araya gelmek demektir. Probiyotik bakterilerin olumlu etkilerinin ortaya çıkıp gözlenebilmesi için bu bakterilerin etkin bir biçimde sahip oldukları agregasyon yeteneği ile kümelenerek veya toplanarak oğalabilmelidirler. Bu bakterilerin gastrointestinal sistemde bağlı bulunmaları ve bağırsak epitelyumunda tutunmaları kolonizasyon ve enfeksiyon için önemlidir (Salminen ve ark., 2010). Agregasyon otoagregasyon ve koagregasyon olmak üzere iki ayrı konu olarak incelenir (Collado ve ark., 2007a). Aynı türe ait mikroorganizmaların birbirleri ile tutunarak oluşturdukları hücre kolonileri şeklinde tanımlanmakta olan otoagregasyon birçok mikroorganizma türünde gözlenmektedir (Nikolic ve ark., 2008).

Probiyotik bakterilerin agregasyon yeteneği ile bunların tutunma yeteneği arasında anlamlı bir ilişki olduğu (Collado ve ark., 2007b) ve yine koagregasyon yeteneği ile patojenlerle etkileşime girebilme yeteneği arasında bir korelasyon bulunduğu bildirilmektedir (Collado ve ark., 2008).

Koagregasyon iki farklı türe ait mikroorganizmaların birbirlerine tutunması şeklinde tanımlanabilir. Koagregasyonda probiyotik bakteriler gastorintestinal sisteme giren patojenlere yapışarak, patojen mikroorganizmaların gelişimlerini inhibe ederler. *Lactobacillus* türleri koagregasyon yetenekleri ile patojenlerin kolonizasyonunu önlemek için bir bariyer oluştururlar (Ocana ve ark., 2002, Schachtsiek ve ark., 2004).

Lactobacillus suşlarının bağırsak hücrelerine yapışmasında lipotekoik asitin etkili olduğu belirlenmiştir. *Lactobacillus* cinsi bakterilerinin farklı türler arasında farklı farklı yapışma özellikleri olduğu gözlenmiştir (Xu ve ark., 2009). Bazı araştırmacılar hidrokarbonların mikrobiyal yapışma arasında anlamlı bir ilişki olduğunu yani

yüzeğe yapışma yeteneği ve hidrofobiklik arasında korelasyon bulunduğunu düşünmektedirler (Ehrmann ve ark., 2002; Xu ve ark., 2009; Heravi ve ark., 2011).

Laktik asit bakterilerinin koagreasyon özellikleri nedeniyle bulunduğu ortamda diğer enterik bakterilerle rekabet haline girerek dominant bir şekilde kolonize olmaktadır ve bu özellik ile probiyotikler, kendi populasyonlarının devamlılıklarını sağlamış olurlar (Mastromarino ve ark., 2002).

2.8. Kanatlı Hayvan Beslenmesinde Probiyotik Kullanımı

Kanatlı hayvanlarda bağırsak mikroflorasının %90'lık kısmını; *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsleri gibi fakültatif laktik asit üreten bakteriler ile *Bacteroides*, *Fusobacterium* ve *Eubacterium* cinsleri gibi tam anaerob bakteriler oluşturmaktadır (Mitsuoka, 2002; Tejedor-Junco ve ark., 2005). Floranın geri kalan %10' unu ise; *E. coli* türü ile *Enterococ*'lar, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Blastomyces*, *Pseudomonas* ve *Proteus* cinsleri oluşturmaktadır. Bu orandaki değişikliğin sonucunda, performans düşmesi ve enfeksiyöz hastalıklar görülebilmektedir (Yurtalan ve Ateş, 1995). *Lactobacillus* cinsi bakteriler 2 haftalık genç tavuk bağırsaklarında ağırlıklı olarak bulunurlar (Amit-Romach ve ark., 2004). Asit toleransı yüksek olan *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinsi bakteriler, mide epitelinin histolojik bölmeleri arasında yoğun olarak bulunurlar. Bu bakteriler, kuluçkadan çıktıktan hemen sonra civcivlerde görülmeye başlar ve hemen ilk hafta mide duvarlarına kolonize olurlar (Nir ve Şenköylü, 2000).

Lactobacillus'lar, civcivler yumurtadan çıktıktan hemen sonra bağırsak sisteminin mikroflorasında hakim olmaya başlamakta ve bunların yaşam süresi boyunca bağırsak epitellerine bağlı olarak kalmaktadırlar. Konakçıları olan tavuklarla simbiyotik bir ilişkiye giren bu mikroorganizmalar bağırsak florasının bileşimini düzenlemeye yardımcı olmaktadır (Fuller, 1973; Şenköylü ve ark., 2002). Laktobasillerin bu özellikleri, öncelikle organik asit, bakteriyosin ve/veya bakteriyosin benzeri maddeleri üretme kabiliyetleri ile yakından ilgilidir (Fuller, 1973; Larsen ve ark., 1993). Diğer yandan laktobasiller, laktik asit başta olmak

üzere, ürettikleri organik asitler ve bakteriyosin ve benzeri metabolitlerle gastrointestinal sistemde meydana gelen enfeksiyonların önlenmesinde çok önemli rol oynamaktadırlar. Et tavuklarının bağırsak sisteminin doğal florasında bulunan laktobasiller, bu özellikleri nedeniyle öncelikle konakçı, dolaylı olarak da insan sağlığını etkilemektedir (Modler ve ark., 1990).

Kursakta oluşan yararlı mikroflora nişasta partikülleri üzerine yapışarak, organik asitlerin üretilmesini ve pH'nın 4,5' ten daha aşağı düzeylere çekilmesini sağlar. Kursak epitelyum hücrelerine tutunup, kolonize olabilme yeteneğindeki yararlı mikroflora *E. coli*' yi baskılar ve bazı maya türlerinin gelişmesini önler (Yıldırım, 2002).

Kanatlı hayvan endüstrisinde son on yıl içerisinde laktik asit bakterilerinin kullanımı hem gelişim üzerine hem de patojen mikroorganizmalar üzerine etkisi önemli bir konu olmuştur (Musikasang ve ark., 2009; Taheri ve ark., 2009b; Angelakis ve Raoult, 2010; Surachon ve ark., 2011). Kanatlılarda, büyüme ve sağlığın iyileştirilmesinde, gastrointestinal kanaldaki mikrobiyal popülasyon dengesinin önemi çok büyüktür. (Mountzouris ve ark., 2007; Rehman ve ark., 2007). Çünkü mikrobiyal popülasyonun aktivitesindeki küçük bir değişiklik bile kanatlılardaki üretkenlikte ve sağlıkta etkili olabilmektedir ve bu durum insan sağlığı için çok önemlidir (Dawson, 2001).

Yem katkısı probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar; *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosum*, *L. lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *S. lactis*, *Streptococcus thermophilus* ve *Saccharomyces cerevisia*'dır. Ayrıca kanatlı bağırsağında çok fazla bulunan *Lactobacillus* grubu bakteriler, diğer patojen bakterilere antagonistik etki yapan bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri maddeleri üretirler. Ayrıca *Lactobacillus*'lar mide pH' sına en dayanıklı olan ve sindirim kanalından geçiş esnasında canlılıklarını koruyabilen bakterilerdir (Erdoğan, 1999; Yıldırım, 2002).

Kanatlı karma yemlerine probiyotik ilavesinin hayvanların canlı ağırlık kazancını artırdığı, yemden yararlanma değerini iyileştirdiği, yumurta verimi ve civciv üretiminde artış sağladığı ve bağırsaklarda antibakteriyel bir etki göstererek gastrointestinal hastalıkları azalttığı yönünde araştırma bulguları olmasına rağmen etki mekanizmaları konusunda belirsizlikler bulunmaktadır. Yumurta tavuğu yemlerine *Lactobacillus* ilavesinin yumurta verimi, günlük yem tüketimi, yumurta ağırlığı ve iri yumurta oranını önemli düzeyde artırdığını, yemden yararlanma değerini iyileştirerek tavukların yaşama gücünü olumlu yönde etkilediğini bildirilmiştir (Nahashon ve ark., 1993). Yapılan başka bir çalışmada ise, yem içerisine *Lactobacillus* ilavesinin yumurta verimi, yumurta kitlesi ve yumurta ağırlığını azaltarak yemden yararlanma değerini olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir (Mohan ve ark., 1995). Benzer diğer çalışmalarda ise, yeme probiyotik (*Lactobacillus* spp.) ilavesinin yumurta verimini artırarak yemden yararlanma değerini iyileştirdiği bildirilmiştir (Kruger ve ark., 1977; Abdulrahim ve ark., 1996).

Yeo ve Kim (1997), broiler civcivlerinde probiyotik (*L. casei*) uygulamasının ince bağırsaklarda üreaz aktivitesini düşürdüğünü bunun da erken yaştaki broylerlerin sağlığı ve gelişimi için faydalı olabileceğini bildirmektedirler.

Kanatlılarda enfeksiyonlardan koruma ve gelişimi desteklemek amacıyla sindirim sistemi mikroflora üyelerinden oluşan preparatların kullanımı güncellik kazanmıştır Özellikle *Lactobacillus* cinslerinden oluşan bu preparatlar sindirim ve absorpsiyonu kolaylaştırarak gelişimi teşvik etmiştir. Ayrıca epitel yüzeylerde koloni oluşturarak patojen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmiştir (Karahan ve Çakmakçı, 2002).

Mikelsaar ve Zilmer (2009), kanatlı hayvanlarda probiyotik olan birden fazla *Lactobacillus* suşunun verilmesi ile birçok hastalığın önlenmesinde daha başarılı olunabileceğini belirtmişlerdir.

Probiyotikler hayvanlarda sindirim sistemi ile ilgili bazı hastalıkların korunmasında ve tedavisinde kullanılmaktadır (Roos ve Katan, 2000). Doğal olmaları, hayvana herhangi bir zarar vermemeleri, sindirim kanalından absorbe olmamaları gibi özelliklerinden dolayı antibiyotiklere alternatif olarak düşünülmektedir (Sarıca, 1999).

Lactobacillus grubu bakterileri, hızlı gelişen broylerlerin bağışıklık sisteminin gelişimi açısından önemi büyüktür. Özellikle bağırsaklarda çeşitli yangı reaksiyonlarına yol açan antijenlere karşı koruma sağlayan *Lactobacillus* grubu bakterilere gereksinim vardır. Bozkurt ve arkadaşları (2005) yeme prebiyotik, probiyotik ve organik asitlerin birlikte veya ayrı ilave edilmelerinin, broyler performans ve karkas karakteristikleri üzerine etkilerini araştırmışlar ve bu yem katkılarının büyütme faktörü olarak kullanılabileceği sonucunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca, deneme periyodu süresince prebiyotik ve probiyotiğin tek başlarına kullanımlarına oranla birlikte kullanımlarının daha yararlı etki gösterdiğini saptamışlardır.

Probiyotiklerin kanatlı hayvanlarda kullanım etkileri aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Nir ve Senköylü, 2000; Yıldırım, 2002; Polat ve Özdüven, 2004):

- Hidrojen peroksit üreterek antibakteriyel etki meydana getirirler.
- Yemde bulunan çözünebilir şekerlerin veya uçucu yağ asitlerinin (laktik asit) doğrudan kullanımı ile *Lactobacillus* grubu bakteriler için besin ortamı oluşturabilirler.
- *Lactobacillus*'lar, *E. coli*' ye karşı antienterotoksin salgılayarak, *E. coli*' nin toksik amin sentezini engellerler.
- Safra tuzları ve yağ asitlerini enteropatojen mikroorganizmaların etkisinden koruyarak, bunların toksik veya zararlı ürünlere dönüşümünü önlerler.

•Probiyotikler bağırsakta asit ortam oluşmasıyla diğer bakteri türleri için düşman bir mikrokoloji oluşturur.

•Başta laktik asit olmak üzere, asetik asit ve formik asit gibi organik asitleri üreterek bağırsak pH'sını düşürmekte, nötr ve bazik ortamlarda yaşayabilen genelde zararlı etkisi olan gram negatif patojen mikroorganizmaların üremesini engelleyen bir ortam oluşturmaktadırlar.

•Yükseltgenme-indirgenme potansiyelini düşürerek aerobik mikroorganizmaların gelişmesini inhibe ederler. Hayvanın sindirim enzimleri ile simbiyotik olarak çalışan lipaz, proteaz, amilaz, betaglukanaz, ksilanaz ve selülaz gibi enzimleri üreten probiyotikler özellikle sindirim sistemi tam olarak gelişmemiş olan hayvanlarda yemlerin sindirimine katkıda bulunurlar. Ayrıca ince bağırsakta laktaz, sukraz ve maltaz enzimlerinin aktivitelerini arttırmırlar.

•Bakteriyel enzimatik aktivite; bu alanda yapılan çalışmaların çoğu aktif karsinojenlerin üretiminde etken olan enzimlerle ilişkilidir. Deneme hayvanı olan farelere veya insanlara, *Lactobacillus acidophilus* verilmesiyle yem veya yiyeceklerinde bulunan prokarsinojenlerden, aktif karsinojenlerin üretilmesinde etken olan nitroredüktaz, azoredüktaz ve glukoronidaz gibi enzimlerin aktivitesi düşmüştür. Glukoronidaz aktivitesinin düşmesi, içme sularına yoğurt ilave edilen civcivlerde de gözlenmiştir.

•Amonyak, indol, skatol, merkaptan, toksik aminler ve sülfidler gibi toksik maddeler üreten mikroorganizmaların çoğalmasını inhibe eden probiyotikler, bu tür zararlı bileşiklerin sindirim sisteminde birikimini ve emilimini azaltırlar.

•Probiyotikler, bağırsak duvarındaki villilere tutunarak hafifçe asidik bir ortam oluşturur ve patojen bakterilerin hastalık yapmasını önlerler. Faydalı bakteriler ayrıca, bazı önemli enzimleri üreterek nişasta olmayan polisakkaritleri (selüloz, hemiselüloz, pektin ve oligosakkaritler vs.) parçalayarak besin maddelerinin sindirim ve emilimini arttırmırlar. B kompleksi vitaminlerle K vitamininin sentezini sağlarlar.

•Bağışıklık sisteminin stimülasyonu; son yıllarda kanatlı üretiminde uygulanan hızlı büyüme yönündeki yoğun genetik seleksiyon, yemlerin etkin bir şekilde canlı ağırlığa dönüşmesine ve bu potansiyelin giderek artmasına yol açmıştır. Ancak canlı ağırlıkta ve yemden yararlanmada sağlanan bu gelişmelerin bedeli hayvanlarda bağışıklık sistemi dahil olmak üzere kimi biyolojik dengelerin bozulması oluşmuştur. Bu durumda günümüzdeki genetik materyalde bağışıklık sistemine gereken desteği vermek için bazı önlemlerin alınması gerekir. Hızlı gelişen etlik piliçlerde, *Lactobacillus* grubu bakterileri serum protein ve globulin seviyelerini yükselterek bağışıklık sisteminin gelişmesinde önemli roller üstlenebilirler. Özellikle bağırsaklarda yangı (enflamasyon) reaksiyonlarına yol açan antijenlere karşı koruma sağlayan *Lactobacillus* grubu bakterilere gereksinim vardır.

Probiyotikler kanatlılarda oldukça yaygın olan *Salmonella* etkenlerine karşı civcivlerde doğal bağırsak florasının gelişimini hızlandırmak suretiyle direnç gelişimi için başarıyla kullanılmaktadır. Bu amaçla ilk uygulama 1976 yılında, Finlandiya'da yapılmıştır (Çakır ve ark., 2002). Ayrıca probiyotikler *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Vibrio*, *Pseudomonas* gibi birçok patojen etkene karşı antagonist tepki göstererek bunların mukozalara yerleşip kolonize olmalarını ve tahribat oluşturmalarını önlerler (Rolfe, 2000). Probiyotiklerin, kanatlılarda humoral immün cevabı önemli derecede artırdığı bildirilmiştir (Koenen ve ark., 2004). Probiyotiklerin etlik piliç ince bağırsak ve sekumunda *E. coli* kolonizasyonunun azaltılmasında olumlu etkileri bulunduğu belirlenmiştir (Jones, 1991; Eren ve ark., 1999). Yapılan bir çalışmada erişkin broylerlerin bağırsak içeriklerinin bir günlük civcivlere oral yoldan verilmesiyle, *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı direnç artışı saptanmıştır (Bilal ve ark., 1999).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kanatlılarda enfeksiyonlara neden olan *Salmonella* sp. ve *Listeria monocytogenes*'e karşı *Lactobacillus* suşları kullanılmıştır (Pascual ve ark., 1999; Vicente ve ark., 2007). Yapılan başka bir çalışmada ise kanatlı hayvanlarda *Clostridium perfringens* nedeniyle oluşan nekrotik enteritis hastalığının, *L. johnsonii* FI9785 suşunun kullanılmasıyla birlikte azaldığı kanıtlanmıştır (Santini ve ark., 2010). *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. thermophilus* ve *E. faecium* içeren

probiyotik formülasyonu ile desteklenmiş standart bir diyet ile beslenen etlik piliçlerde *Camphylobacter jejuni* miktarında %70 oranında azalma görüldüğü rapor edilmiştir (Willis ve Reid, 2008).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırma Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan tavukların gastrointestinal sisteminden izole edilerek moleküler yöntemlerle (16 S rRNA) tanımlanan 18 adet *Lactobacillus* cinsi bakteri ile yürütülmüştür (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. *Lactobacillus* sp. suşların kodları

No	Bakteri	Kodu
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ22
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ29
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ36
4	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ43
5	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ51
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ54
7	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ59
8	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ61
9	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BAZ63
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ZYN13
11	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	BAZ32
12	<i>Lactobacillus salivarius</i>	ZYN9
13	<i>Lactobacillus salivarius</i>	ZYN15
14	<i>Lactobacillus salivarius</i>	ZYN23
15	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BAZ78
16	<i>Lactobacillus fermentum</i>	ZYN17
17	<i>Lactobacillus</i> sp.	ZYN31
18	<i>Lactobacillus</i> sp.	BAZ29

3.1.1. Araştırmada kullanılan test bakterileri

Araştırmada *Escherichia coli* ATCC 11229, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella sonnei* Mu:57 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 test bakterisi olarak kullanılmıştır. Test bakterilerinin temin edildiği kaynaklar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Test bakterilerinin temin edildiği kaynakları

BAKTERİ SUŞLARI	TEMİN EDİLDİĞİ KAYNAK
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Kültür Koleksiyonu
<i>E. coli</i> O157:H7	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Kültür Koleksiyonu
<i>Shigella sonnei</i> Mu:57	Muğla Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (Doç. Dr. Aysel UĞUR’ dan temin edilmiştir.)

3.1.2. Araştırmada kullanılan besi ortamları

Lactobacillus cinsine ait suşların geliştirilmesi, metabolik ürünlerin tespiti, antibiyotik duyarlılık, EPS, antimikrobiyal aktiviteleri, asit ve safra dirençlilikleri ile otoagregasyon ve koagregasyon yeteneklerinin incelenmesinde Man Rogosa ve Sharp (MRS) sıvı besiyeri kullanılmıştır (De Man ve ark., 1960).

MRS sıvı besiyeri

Pepton (Merck)	10,0 g
Beef Ekstrakt (Merck)	10,0 g
Yeast Ekstrakt (Merck)	5,0 g
Glukoz (Merck)	20,0 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	2,0 g
Na-Asetat. 3H ₂ O (Merck)	5,0 g
Tri Amonyum Sitrat (Merck)	2,0 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O (Merck)	0,2 g
MnSO ₄ . 4H ₂ O (Merck)	0,05 g
Tween 80 (Merck)	1 mL

Maddeler 1000 mL distile suyla tamamlanmıştır. Besi ortamının pH'sı 1 M HCl ve 1 M NaOH'le 6,2±0,2'ye ayarlanmıştır. Amaca uygun olacak şekilde besi ortamına %1,5 oranında agar (Merck) ilave edilip katı besi ortamı hazırlanmıştır. Besi ortamı 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir (Halkman, 2005).

Araştırmada kullanılan test bakterilerinin geliştirilmesi için Nutrient sıvı besiyeri kullanılmıştır.

Nutrient sıvı besiyeri

Beef Ekstrakt (Merck)	1 g
Yeast Ekstrakt (Merck)	2 g

Peptone (Merck)	5 g
Sodyum Klorit (Merck)	5 g

Maddeler tartılıp distile su ile 1000 mL' ye tamamlanmıştır. Besi ortamının pH'sı 1 M HCl ve 1 M NaOH'le $6,8 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Amaca uygun olacak şekilde besiyer ortamına %1,5 oranında agar (Merck) ilave edilip katı besiyeri hazırlanmıştır. Besi ortamı 121°C 'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir (Halkman, 2005).

3.2. Metot

3.2.1. Bakterilerin muhafazası

Suşların muhafazası için 1,5 mL'lik ağzı kapaklı tüplere 0,4 mL gliserol konularak, 121°C 'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir. Bakteriler uygun sıvı besiyer ortamında iki kez ardı ardına aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen kültürlerden 0,6 mL gliserol içeren steril ağzı kapaklı tüplere ilave edilerek, -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir (Çetin, 1983).

3.2.2. Laktik asit üretimi

Lactobacillus spp. aktif suşlarından 10 mL' lik MRS sıvı besiyerlerine %2 oranında inoküle edilerek 37°C ' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda cam erlenlere aktararak 90 mL distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Üzerine 2-3 damla fenol fitaleyn indikatörü damlatılarak, 0,1 M NaOH (Merck) çözeltisi ile titre edilmiştir. Bakterilerin ürettiği asit titre edilebilir yüzde asitlik olarak hesaplanmıştır (Demirci ve Gündüz, 1994).

$$\% \text{ Asitlik} = \frac{\text{Harcanan } 0,1 \text{ M NaOH (mL)} \times 0,9}{\text{mL örnek}} \quad (3.1)$$

Fenol fitaleyn indikatörü; 0,1 gram fenol fitaleyn (Merck) %60'lık etil alkolde (Merck) çözülerek hazırlanmıştır.

3.2.3. Hidrojen Peroksit üretimi

Lactobacillus spp. suşlarının hidrojen peroksit üretimi Gilliland (1969) 'ın metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Lactobacillus spp. aktif suşların dan 10 mL' lik MRS sıvı besiyeri %2 oranında inoküle edilerek 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerin pH' sı 1 M HCl ile $4,5 \pm 0,2$ ' ye ayarlanmıştır. 0,1 M Asetat tamponundan 2 mL eklenmiş ve 20 mL distile su ile seyreltilerek, karıştırılmıştır. Örnekler 5000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen örnekler Whatman 42 no' lu filtre kağıdı ile süzölmüş, süzölen sıvıdan 5 mL alınarak 1 mL distile su içeren tüpe konulmuştur ve 0,1 mL o-dianisidin ilave edilmiştir. Bir başka tüpe de süzölen sıvıdan 5 mL alınarak örnek tüpe 1 mL horseradish peroksidaz, 0,1 mL o-dianisidin solüsyonları konulmuştur. Tüpler iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında 0,2 mL 4 M HCl ile reaksiyon durdurularak renk sabitlenmiştir. HCl eklenmesinden 5 dakika sonra her bir örneğin 400 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Hitachi U-1800) ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlar standart eğri ile karşılaştırılarak, hidrojen peroksit miktarları $\mu\text{g/mL}$ olarak saptanmıştır.

Standartın hazırlanması;

1. 0,01 M asetat tamponun (pH 4,5) içinde mL' de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 mL H_2O_2 içeren 10 mL'lik standartlar hazırlanmıştır.

2. Analiz için her bir test tüpünde 1 mL horseradish peroksidaz, 0,1 mL o-dianisidin solüsyonu içeren tüplerde seyreltilen 5 mL standartlardan konulmuştur.

Körv olarak; 5 mL 0,01 M asetat tamponu, 1 mL horseradish peroksidaz, 0,1 mL o-dianisidin solüsyonları kullanılmıştır.

3. Tüpler iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir.

4. İnkübasyon sonrasında 0,2 mL 4 M HCl ile reaksiyon durdurularak renk sabitlenmiştir.

5. HCl eklenmesinden 5 dakika sonra her bir standardın 400 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

6. Hidrojen peroksit standart kurve çıkarılmıştır. Standart kurve den 1 µg/mL hidrojen peroksite tekabül eden hidrojen peroksit hesaplanmıştır.

Kullanılan Çözeltiler:

Horseradish Peroksidaz Solüsyonu

Distile Su 1 mL

Horseradish Peroksidaz 1 mg

Analizlerde 1: 100 oranında distile suda seyreltilerek kullanılmıştır.

O-dianisidin Solüsyonu

Distile su içinde 1: 100 seyreltilerek kullanılmıştır.

0,01 M Asetat Tamponu

Sodyum Asetat 1,36 g

Distile Su 1000 mL

3.2.4. Antibiyotik duyarlılığı

Çalışmada probiyotik bakteri kültürlerinin gelişimini olumsuz etkilediği düşünülen ve tavuk yemlerine sıklıkla katılan antibiyotikler kullanılmıştır. Suşların antibiyotik duyarlıklarının belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. *Lactobacillus*'ların hücre duvar sentezini inhibe eden penisilin G (10 unit) ve ampisilin (10 µg); protein sentezini inhibe eden streptomisin (10 µg), gentamisin (10 µg), kloramfenikol (30 µg) ve kanamisin (30 µg); nükleik asit sentezini inhibe eden rifampisin (5 µg) ile sitoplazmik zar sentezini inhibe eden vankomisin antibiyotikleri ile antibiyotiklerine duyarlılıkları test edilmiştir (Taheri ve ark., 2009b).

Lactobacillus suşları MRS sıvı besi ortamında $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 18-20 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerden MRS besi ortamına ikişer paralelli olarak ekim yapıp, $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' de 18-20 saat geliştirilmiştir. MRS katı besiyerinden petri plaklarına 20 mL aktarılıp, oda sıcaklığında donmaya bırakılmıştır. Aktif kültürlerin yoğunlukları 0,5 Mc Farland bulanıklığına eşdeğer olarak ayarlandıktan sonra 100 µL alınıp, sisteinli MRS (Merck) plaklarına aktarılmış ve homojen bir şekilde yayılması sağlanmıştır. Antibiyotik diskleri petri kutusunun kenarından 10 mm ve birbirinden 15 mm uzaklıkta olacak şekilde steril olarak besi ortamının üzerine yerleştirilmiştir. Petriler 37°C ' de 18-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde antibiyotik disk çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile milimetrik olarak ölçülmüştür (Taheri ve ark., 2009b). Sonuçlar CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterlerine göre değerlendirilmiştir (CLSI, 2011).

3.2.5. Antimikrobiyal aktivite

Çalışmada kullanılan *Lactobacillus* suşlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi Reinheimer ve arkadaşları' nın (1990) metoduna göre yapılmıştır (Reinheimer ve ark., 1990, Gonzalez ve ark., 2007).

Lactobacillus spp. suşları 37 °C’ de iki kez ard arda aktifleştirilmiştir. Aktif kültürler 5000 dev/dk.’ da 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan berrak kısım (süpernatant) steril şartlar altında 0,45 µm’ lik disposable filtre ile mikrofiltrasyon yolu ile sterilize edilmiştir.

İnhibisyon zonunun tespiti için test bakterileri olarak *Escherichia coli* ATCC 11229, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella sonnei* Mu:57, ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.

Test bakterileri Nutrient sıvı besi ortamında aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerden steril petri kabı üzerine 50 µL aktarılmıştır. Bu işlemde sonra daha önceden hazırlanıp 121 °C’ de 15 dakika otoklavda steril edilmiş olan ve yaklaşık olarak 50 °C’ ye kadar soğutulmuş olan Nutrient Katı besiyeriden her petri kabına 20 mL ilave edilip, besi ortamı ve petri kabı zeminine inoküle edilen test bakterilerinin homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Homojenlik sağlandıktan sonra petri kabı içerisindeki Nutrient Katı besiyerinin donması için 2 saat buzdolabında bekletilmiştir. Donan katı besiyeri üzerinde 6 mm çapındaki steril çubukla kuyular açılmıştır. Kuyuların tabanları steril agarla tekrar sıvanmıştır. Daha sonra bu kuyulara *Lactobacillus* spp. suşlarının süpernatantından 100 µL ilave edilmiş ve 37 °C’ de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyu çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile ölçülmüştür ve çap ölçümleri milimetrik olarak verilmiştir.

3.2.6. Ekzopolisakkarit (EPS) üretimi

Aktif suşların optik yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda $0,60 \pm 0,02$ ’ye ayarlanarak MRS sıvı besiyerlerine %2 oranında inoküle edilmiştir. 37 °C’de 24 saatlik inkübasyon sonunda kültürlerden 1’er mL ependorf tüplerine alınarak 100 °C’de 15 dakika kaynatılmıştır. Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra üzerine %17 oranında %85’lik trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi eklenerek

13,000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir (Frengova ve ark., 2000). Elde edilen süpernatantlar temiz bir ependorf tüpüne alınarak üzerine eşit hacimde etanol eklenmiştir. Örnekler 15 dakika 13,000 rpm'de santrifüj edilmiş ve EPS'nin çökmesi sağlanmıştır. Elde edilen örnekler 1 mL distile suda çözüldükten sonra üretilen EPS miktarının belirlenmesi için fenol sülfirik asit metodu uygulanmıştır (Dubois ve ark., 1956; Torino ve ark., 2001).

Fenol sülfirik asit metodu:

Örneklerin üzerine 0,5 mL fenol (Sigma) ve ardından hızlı bir biçimde 5 mL sülfirik asit (Merck) eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra iyice çalkalanmış ve 30°C'de 15-20 dakika bekletilmiştir. Örneklerin optik yoğunlukları 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Kültürlerin ürettiği EPS miktarlarını hesaplamak için 5-100 mg/L arasında değişen oranlarda glukoz çözeltisi kullanılarak standart çıkarılmıştır. Bu standarda göre üretilen EPS miktarı mg/L olarak belirlenmiştir (Torino ve ark. 2001).

3.2.7. Farklı pH değerlerine tolerans

Lactobacillus spp. suşlarının asit dirençlilikleri Chung ve ark. (1999)'nın metoduna göre belirlenmiştir. *Lactobacillus* spp. suşları 37°C' de iki kez ard arda MRS sıvı besi ortamında aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerin optikal yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm de 0,60±0,02'ye ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan bakterilerden %2 oranında, pH' sı 4 M HCl (Merck) ile 1, 2, 3 ve 6'ya ayarlanan MRS sıvı besiyerlerine inoküle edilerek 37°C' de inkübe edilmiştir. Hücre gelişimi 24 saat sonrasında spektrofotometrede 600 nm de ölçülmüştür. Elde edilen OD değerleri kontrol grubu (pH' sı 6,0 olan MRS sıvı besiyerinde gelişen kültürün yoğunluğu) ile karşılaştırılarak farklı pH değerlerinin suşlar üzerindeki yüzde inhibisyon değeri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_1} \times 100 \quad (3.2)$$

OD₁: Kontrol

OD₂: Suşların farklı pH ortamlarında gelişme oranı

3.2.8. Farklı safra konsantrasyonlarına tolerans

Lactobacillus suşlarının safra tuzu dirençlilikleri Chung ve ark. (1999)' nın metoduna göre tespit edilmiştir. *Lactobacillus* suşları 37°C' de iki kez ard arda MRS sıvı besi ortamında aktifleştirilmiştir. Aktif kültürlerin optikal yoğunlukları spektrofotometrede 600 nm de 0,60±0,02'ye ayarlanmıştır. OD değerleri ayarlanan bakterilerden %2 oranında, %0 (kontrol), % 0,06; 0,15 ve 0,30 oranlarında safra (Sigma) içeren MRS sıvı besiyerlerine inoküle edilerek 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Hücre gelişimi 24 saat sonrasında spektrofotometrede 600 nm de ölçülmüştür. Elde edilen OD değerleri kontrol grubu (%0 safra içeren MRS sıvı besiyerinde gelişen kültürün yoğunluğu) ile karşılaştırılarak farklı safra konsantrasyonlarının suşlar üzerindeki yüzde inhibisyon değeri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_1} \times 100 \quad (3.3)$$

OD₁: Kontrol

OD₂: Suşların farklı safra ortamlarında gelişme oranı

3.2.9. Otoagregasyon

Otoagregasyon değerleri EPS üretimleri yüksek olan BAZ 29, BAZ 36, BAZ 43 VE BAZ 63 kodlu *Lactobacillus* spp. suşlarında belirlenmiştir. Bakteriler MRS sıvı besiyeri besiyerinde 37 °C' de 18-20 saat aktifleştirilmiştir. Aktif kültürler 10000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet, iki defa fosfat tamponu (PBS = 8 g/L NaCl, 1,21 g/L K₂HPO₄, 0,34 g/L KH₂ PO₄; pH 6,2) ile yıkandıktan

sonra aynı tampon içinde tekrar çözülmüştür. Elde edilen çözelti oda sıcaklığında 4 saat bekletilmiştir. Kültürlerin bekletme öncesi ve sonrası OD'leri (600 nm) spektrofotometrede okunmuştur (Reniero ve ark., 1992; Collado ve ark., 2008). Aşağıda verilen formül kullanılarak otoagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Otoagregasyon} = \frac{\text{OD}_1 - \text{OD}_2}{\text{OD}_1} \times 100 \quad (3.4)$$

OD₁: İlk optikal dansite

OD₂: 4 saat sonraki optikal dansite.

Dört saatlik otoagregasyon süresi sonunda tüplerin alt kısımlarından 20 µL örnekler alınarak preparatlar hazırlanmıştır. Tespit edilen preparatlar gram boyama yöntemi ile boyanarak ışık mikroskobunda incelenmiştir.

3.2.10. Koagregasyon

EPS üretimleri yüksek olan BAZ 29, BAZ 36, BAZ 43 VE BAZ 63 kodlu *Lactobacillus* spp. suşları ile tavuklarda en çok hastalık yapan patojen *E. coli* ATCC 11229 ve *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 kültürlerinin koagregasyon özelliklerinin belirlenmesi, Jin ve ark. (1996)' in metoduna göre yapılmıştır.

Kullanılan *Lactobacillus* spp. suşlarının MRS sıvı besiyerinde, 37 °C'de 18-20 saatlik aktifleşmiş kültürleri kullanılmıştır. *E. coli* ATCC 11229 ile *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 suşları Nutrient sıvı besiyerinde 16-18 saat aktifleştirilmiş ve bu suşun 4x10⁸ lik hücre yoğunluğu çalışmada kullanılmıştır.

Aktif kültürler iki defa fosfat tampon (PBS; pH 6,2) ile yıkanmıştır. Elde edilen pelletler aynı tampon içinde tekrar çözülmüştür. Her bir örneğin yoğunluğu spektrofotometrede (600 nm) okunmuştur. Eşit miktarlardaki *Lactobacillus* spp., *E. coli* ATCC 11229 ile *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 örnekleri aynı tüp içinde karıştırılmıştır. Elde edilen karışımlar 10-15 sn vortekslendikten sonra oda

sıcaklığında 4 saat bekletilmiştir. Daha sonra karışımların üst kısmından alınan süpernatantların OD'leri spektrofotometrede okunmuştur. Elde edilen OD değerleri aşağıda verilen formül kullanılarak koagregasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Koagregasyon} = \frac{(\text{OD}_1 + \text{OD}_2) - 2(\text{OD}_3)}{(\text{OD}_1 + \text{OD}_2)} \times 100 \quad (3.5)$$

OD₁: *Lactobacillus* spp. suşlarının optikal yoğunluğu

OD₂: *E. coli* ATCC 11229 ve *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 in optikal yoğunluğu

OD₃: Karışımın 4 saat sonundaki optikal yoğunluğu

Dört saatlik koagregasyon süresi sonunda tüplerin alt kısımlarından 20 µL örnekler alınarak preparatlar hazırlanmıştır. Tespit edilen preparatlar gram boyama yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir.

3.2.11. İstatistiksel analizler

Tüm çalışmalarda üç farklı paralelin ortalama sonuçları verilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (16.0 Versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Pearson korelasyonuna göre, suşların yüzde asit -EPS, yüzde asit-hidrojen peroksit, hidrojen peroksit-antimikrobiyal aktivite, asit-antimikrobiyal aktivite, EPS-antimikrobiyal aktivite, EPS-otoagregasyon, EPS-koagregasyon ile otoagregasyon-koagregasyon aktiviteleri arasında korelasyon olup olmadığı incelenmiştir. Tek yönlü varyans analizi ile farklı pH ve suş ortamlarında inhibisyon ortalamalarında fark olup olmadığı sınıanmıştır.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Laktik Asit Üretimi

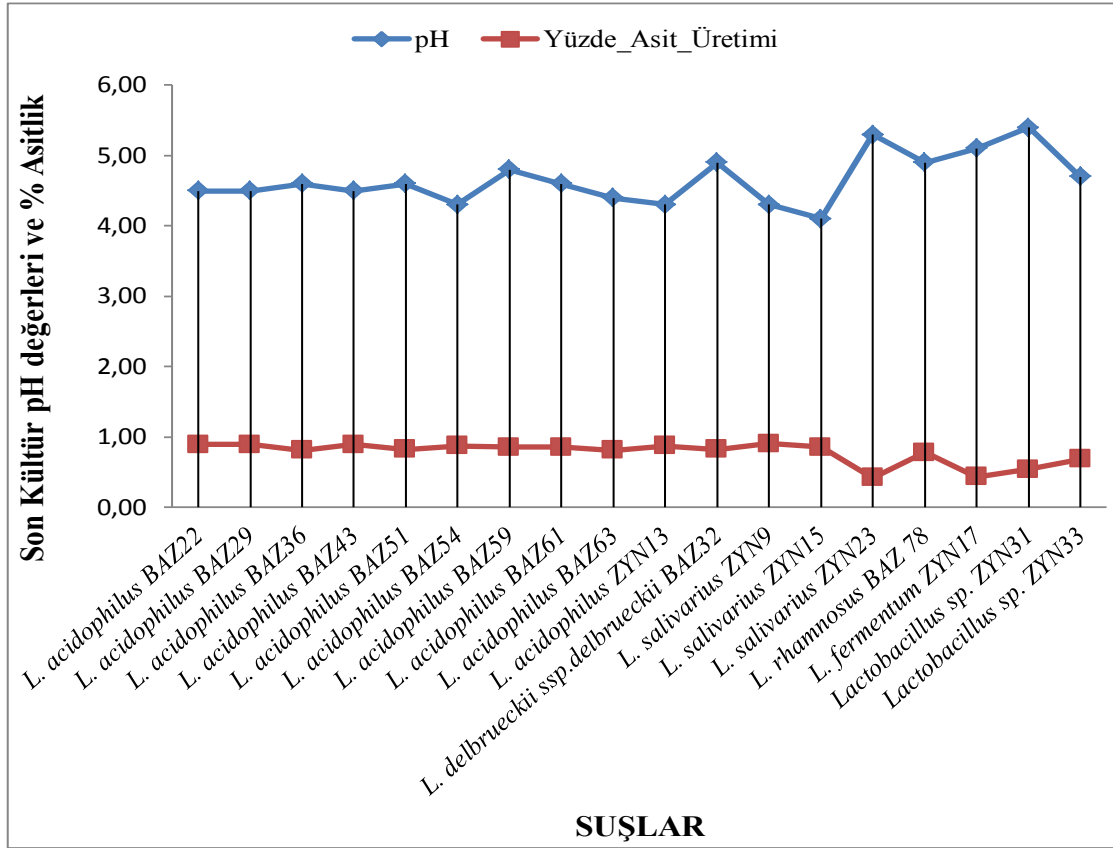
Lactobacillus spp. ürettikleri laktik asit miktarlarını belirlemek amacıyla kolorimetrik yöntem kullanılmıştır. 18 adet *Lactobacillus* spp. suşlarının laktik asit miktarları Çizelge 4.1’ de verilmiştir. *Lactobacillus* spp. suşlarının oluşturduğu laktik asit miktarı en düşük % 0,42±0,01 (*L. salivarius* ZYN23), en yüksek % 0,90±0,00 (*L. salivarius* ZYN9) suşlarında tespit edilmiştir. *L. acidophilus* BAZ22, *L. acidophilus* BAZ29 ve *L. acidophilus* BAZ43 (% 0,89±0,00) suşlarının diğer suşlara göre daha yüksek miktarda laktik asit ürettiği belirlenmiştir.

Asit üretimi türlere göre dikkate değer bir farklılık göstermemektedir. Asit üretimindeki farklılıkların suş farklılığı olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde sadece belirli türlerin asit üretiminin yüksek olduğu değil, aynı tür içindeki farklı suşların bazılarının yüksek bazılarının ise düşük asit ürettiği görülmektedir.

Yüksek oranda asit üreten suşların bulunduğu besiyeri pH’sının daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1). Yüzde asit üretimi arttıkça besiyerinin pH’sı düşmektedir. Bu durumu ispatlamak için istatistiksel analiz yapılmış, son kültür pH’sı ile yüzde asitlik arasında $r = -0,82$ olduğundan negatif yönde yüksek düzeyde anlamlı bir ilişki olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 4.1 *Lactobacillus* suşlarının yüzde laktik asit üretimleri

SUŞLAR	pH	% Asitlik
<i>L. acidophilus</i> BAZ22	4,5±0,4	0,89±0,00
<i>L. acidophilus</i> BAZ29	4,5±0,3	0,89±0,00
<i>L. acidophilus</i> BAZ36	4,6±0,6	0,81±0,00
<i>L. acidophilus</i> BAZ43	4,5±0,4	0,89±0,00
<i>L. acidophilus</i> BAZ51	4,6±0,1	0,82±0,00
<i>L. acidophilus</i> BAZ54	4,3±0,5	0,87±0,00
<i>L. acidophilus</i> BAZ59	4,8±0,2	0,85±0,01
<i>L. acidophilus</i> BAZ61	4,6±0,3	0,85±0,01
<i>L. acidophilus</i> BAZ63	4,4±0,2	0,81±0,00
<i>L. acidophilus</i> ZYN13	4,3±0,6	0,87±0,01
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> BAZ32	4,9±0,5	0,82±0,00
<i>L. salivarius</i> ZYN9	4,3±0,4	0,90±0,00
<i>L. salivarius</i> ZYN15	4,1±0,8	0,85±0,01
<i>L. salivarius</i> ZYN23	5,3±0,9	0,42±0,01
<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	4,9±0,7	0,78±0,01
<i>L. fermentum</i> ZYN17	5,1±0,0	0,43±0,00
<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN31	5,4±0,2	0,54±0,01
<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN33	4,7±0,8	0,68±0,01



Şekil 4.1 *Lactobacillus* spp. son kültür pH değerleri ve ürettikleri yüzde asit miktarlarının karşılaştırılması.

4.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Üretimi

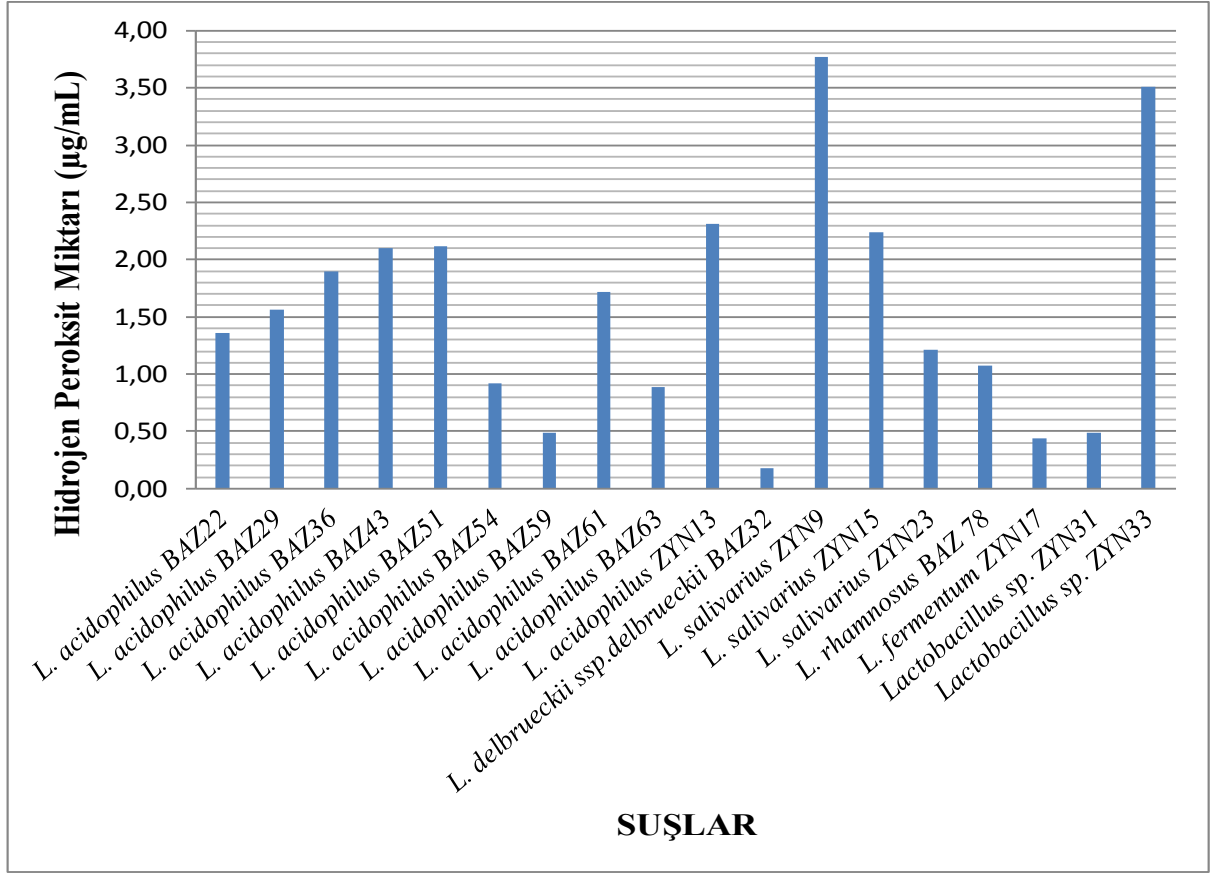
Spektrofotometrik olarak belirlenen *Lactobacillus* spp. suşlarının oluşturduğu hidrojen peroksit miktarları Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2' de verilmiştir.

Lactobacillus spp. suşlarının hidrojen peroksit üretim miktarları 0,18–3,77 µg/mL arasında değişmektedir. En yüksek hidrojen peroksit üreten suş *L. salivarius* ZYN9 (3,77 µg/mL)'dur. Daha sonra *Lactobacillus* sp. ZYN33 (3,51 µg/mL), *L. acidophilus* ZYN13 (2,31 µg/mL) ve *L. salivarius* ZYN15 (2,24 µg/mL) yüksek miktarda hidrojen peroksit üreten suşlar olarak belirlenmiştir. Hidrojen peroksit üretimi düşük olan suş *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32 (0,18 µg/mL) olarak tespit edilmiştir. *L. salivarius* ZYN9 suşunun en yüksek yüzde asit üretimine ve

hidrojen peroksit üretimine sahip olmasına rağmen yapılan istatistiksel analizde asit üretimi ile H₂O₂ üretimi arasında anlamlı bir korelasyon bulunduğu tespit edilememiştir.

Çizelge 4.2. *Lactobacillus* suşlarının hidrojen peroksit üretimleri

SUŞLAR	H ₂ O ₂ (µg/mL)
<i>L. acidophilus</i> BAZ22	1,36±0,02
<i>L. acidophilus</i> BAZ29	1,56±0,03
<i>L. acidophilus</i> BAZ36	1,90±0,00
<i>L. acidophilus</i> BAZ43	2,10±0,02
<i>L. acidophilus</i> BAZ51	2,12±0,01
<i>L. acidophilus</i> BAZ54	0,92±0,01
<i>L. acidophilus</i> BAZ59	0,49±0,00
<i>L. acidophilus</i> BAZ61	1,72±0,01
<i>L. acidophilus</i> BAZ63	0,89±0,01
<i>L. acidophilus</i> ZYN13	2,31±0,01
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> BAZ32	0,18±0,01
<i>L. salivarius</i> ZYN9	3,77±0,02
<i>L. salivarius</i> ZYN15	2,24±0,02
<i>L. salivarius</i> ZYN23	1,21±0,04
<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	1,07±0,04
<i>L. fermentum</i> ZYN17	0,44±0,03
<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN31	0,49±0,00
<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN33	3,51±0,01



Şekil 4.2 *Lactobacillus* suşlarının H₂O₂ üretim miktarları

4.3. Antibiyotik Duyarlılıkların Belirlenmesi

Lactobacillus spp. suşlarının penisilin G (10 unit), ampisilin (10 µg), streptomisin (10 µg), gentamisin (10 µg), kloramfenikol (30 µg), kanamisin (30 µg), rifampisin (5 µg) ve vankomisin (30 µg) antibiyotiklerine duyarlılıkları disk difüzyon yöntemine göre belirlenmiş ve CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterlerine (Çizelge 4.3) göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Antibiogram test sonuçlarına göre *Lactobacillus* spp. suşları; hücre duvar sentezini inhibe eden antibiyotiklerden penisilin G'ye %78 orta derecede duyarlı ve %22 oranında duyarlı ve ampisiline ise % 100 oranında duyarlılık gösterirken; sitoplazmik zar sentezini inhibe eden vankomisin antibiyotiğine %50 oranında duyarlılık %50 oranında dirençlilik gözlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.3 CLSI kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi

No	Etki Mekanizması	Antibiyotik	Dirençli	Orta derece duyarlı	Duyarlı
1	Hücre duvarı sentezi inhibitörü	Penisilin G	≤ 19	20 – 27	≥ 28
2	Hücre duvarı sentezi inhibitörü	Ampisilin	≤ 11	12–13	≥ 14
3	Hücre duvarı sentezi inhibitörü	Vankomisin	≤ 14	15 – 16	≥ 17
4	Protein sentezi inhibitörü	Streptomisin	≤ 11	12–14	≥ 15
5	Protein sentezi inhibitörü	Gentamisin	≤ 12	13–14	≥ 15
6	Protein sentezi inhibitörü	Kloramfenikol	≤ 12	13–17	≥ 18
7	Protein sentezi inhibitörü	Kanamisin	≤ 13	14–17	≥ 18
8	Nükleik asit sentezi inhibitörü	Rifampisin	≤ 15	-	≥ 16

Aktif kültürler protein sentezini inhibe eden antibiyotiklerden kanamisin ve gentamisine %100 dirençlilik gösterirken, kloramfenikol antibiyotiğine %17 oranında dirençlilik, %83 oranında duyarlı oldukları gözlenmiştir. Yine protein sentezini inhibe eden streptomisin antibiyotiğine ise %28 oranında duyarlılık % 72 oranında dirençlilik belirlenmiştir.

Lactobacillus türlerinin nükleik asit sentezini inhibe eden rifampisin antibiyotiğine de %5 oranında duyarlı %95 oranında dirençli oldukları bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4 *Lactobacillus* spp. suşlarının antibiyotiklere gösterdiği duyarlılık test sonuçları

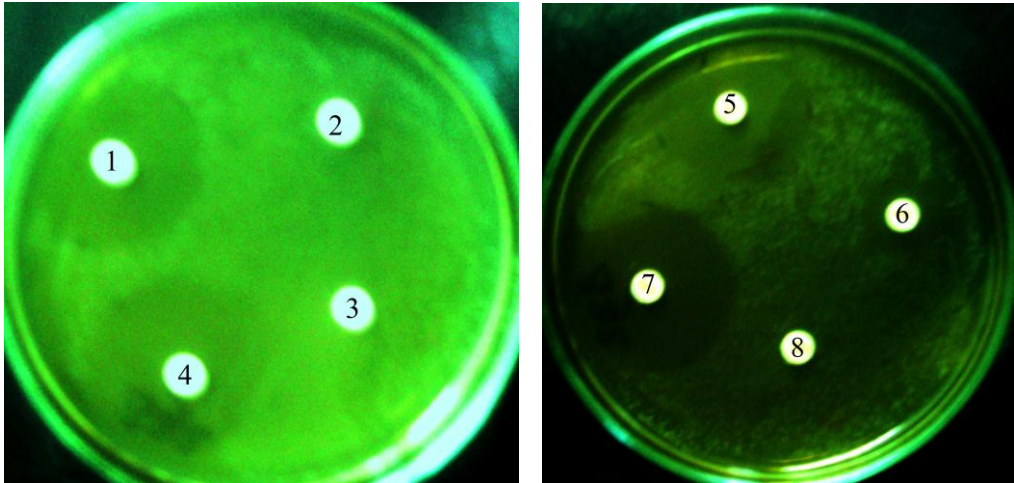
SUŞLAR	Penisilin G	Ampisilin	Streptomisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Vankomisin	Rifampisin	Kanamisin
<i>L. acidophilus</i> BAZ22	I	I	R	R	I	I	R	R
<i>L. acidophilus</i> BAZ29	I	I	R	R	I	I	R	R
<i>L. acidophilus</i> BAZ36	S	I	I	R	I	I	R	R
<i>L. acidophilus</i> BAZ43	I	I	R	R	I	R	R	R
<i>L. acidophilus</i> BAZ51	I	I	R	R	I	R	R	R
<i>L. acidophilus</i> BAZ54	I	I	I	R	I	R	R	R
<i>L. acidophilus</i> BAZ59	I	I	R	R	I	R	R	R
<i>L. acidophilus</i> BAZ61	S	I	I	R	I	R	R	R
<i>L. acidophilus</i> BAZ63	I	I	R	R	I	R	R	R
<i>L. acidophilus</i> ZYN13	I	I	I	R	I	R	R	R
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> BAZ32	I	I	I	R	I	I	R	R
<i>L. salivarius</i> ZYN9	I	I	R	R	I	R	R	R
<i>L. salivarius</i> ZYN15	I	I	R	R	I	I	R	R
<i>L. salivarius</i> ZYN23	S	I	R	R	R	I	R	R
<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	S	I	R	R	R	I	R	R
<i>L. fermentum</i> ZYN17	I	I	R	R	I	R	R	R
<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN31	I	I	R	R	R	I	R	R
<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN33	I	I	R	R	I	I	I	R

S: Duyarlı, I: Orta Derece Duyarlı, R: Dirençli

Çizelge 4.5 Bakterilerin antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları

ANTİBİYOTİKLER	Dirençli (-)	Orta derece duyarlı (+)	Duyarlı (++)
Penisilin G	0	78	22
Ampisilin	0	100	0
Vankomisin	50	50	0
Streptomisin	72	28	0
Gentamisin	100	0	0
Kloramfenikol	17	83	0
Kanamisin	100	0	0
Rifampisin	95	5	0

L. acidophilus BAZ 61 suşu Gentamisin, Vankomisin, Rifampisin ve Kanamisin'e dirençli iken; Ampisilin, Streptomisin ve Kloramfenikol'e orta derecede duyarlı; Penisilin G'ye ise duyarlı olarak tespit edilmiştir (Resim 4.1.).



Resim 4.1 *L. acidophilus* BAZ 61 suşunun antibiyotik duyarlılığı (1- Ampisilin, 2- Gentamisin, 3- Vankomisin, 4- Streptomisin, 5- Kloramfenikol, 6- Rifampisin, 7- Penisilin G, 8- Kanamisin)

4.4. Antimikrobiyal Aktivite

Lactobacillus spp. suşlarının tavuklarda hastalığa neden olan patojen bakterilerden (*Escherichia coli* ATCC 11229, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella sonnei* Mu:57, ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) üzerine inhibisyon etkileri agar difüzyon yöntemine göre belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Lactobacillus spp. suşlarından en yüksek inhibisyon etkisini 11,5 mm zon çapı oluşturan *L. acidophilus* BAZ61 suşunun *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 patojenine karşı gösterdiği belirlenmiştir.

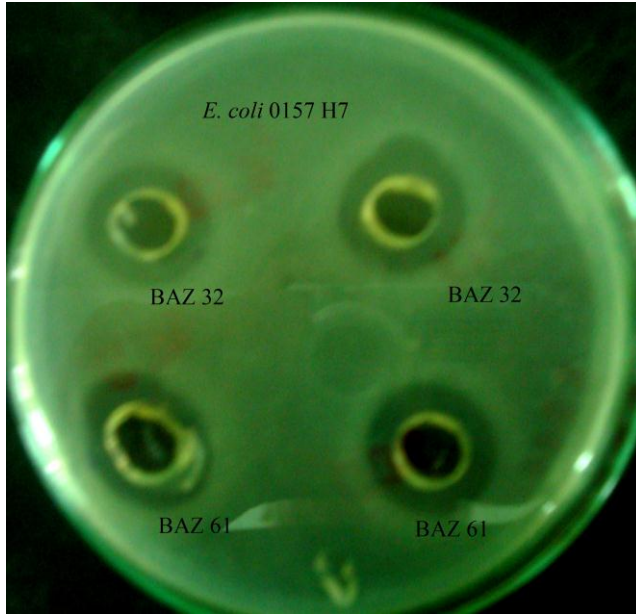
Escherichia coli ATCC 11229 üzerinde antimikrobiyal aktivitenin en yüksek olduğu suş *L. acidophilus* BAZ36 (6,1 mm); en düşük olduğu suşlar ise *L. acidophilus* ZYN13 (2,4 mm) ve *L. salivarius* ZYN15 (2,4 mm)'tir.

E. coli O157:H7 üzerinde maksimum (8,0 mm) ve minimum (2,9 mm) antimikrobiyal aktivite gösteren suşlar sırasıyla *L. salivarius* ZYN15 ve *L. acidophilus* BAZ29 olarak belirlenmiştir. *L. acidophilus* BAZ61 suşunun *E. coli* O157:H7 üzerine antimikrobiyal etkisi Resim 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. *Lactobacillus* spp. suşlarının patojen bakteriler üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonuunun çap değerleri (mm)

	SUŞLAR	TEST BAKTERİLERİ									
		<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Shigella sonnei</i> Mu:57	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Salmonella</i> <i>enteritidis</i> ATCC 13076	<i>E. coli</i> ATCC 11229			
1	<i>L. acidophilus</i> BAZ22	6,5±0,0	-	6,0±0,0	6,4±0,00	6,8±0,0	4,9±0,0	3,9±0,0			
2	<i>L. acidophilus</i> BAZ29	2,9±0,0	-	5,0±0,0	4,0±0,0	6,7±0,0	1,4±0,0	4,3±0,0			
3	<i>L. acidophilus</i> BAZ36	5,6±0,0	2,0±0,0	7,2±0,0	8,0±0,0	4,1±0,0	6,4±0,0	6,1±0,0			
4	<i>L. acidophilus</i> BAZ43	3,6±0,0	-	4,2±0,0	0,4±0,0	0,8±0,0	3,0±0,0	4,4±0,0			
5	<i>L. acidophilus</i> BAZ51	4,1±0,0	-	7,1±0,0	5,3±0,0	6,6±0,0	3,8±0,0	5,5±0,0			
6	<i>L. acidophilus</i> BAZ54	7,6±0,0	-	5,5±0,0	10,0±0,0	-	6,0±0,0	5,5±0,0			
7	<i>L. acidophilus</i> BAZ59	6,0±0,0	-	5,1±0,0	6,8±0,0	5,2±0,0	5,2±0,0	6,0±0,0			
8	<i>L. acidophilus</i> BAZ61	6,8±0,0	-	7,8±0,0	11,5±0,0	2,4±0,0	4,4±0,0	5,2±0,0			
9	<i>L. acidophilus</i> BAZ63	3,1±0,0	-	3,8±0,0	6,8±0,0	8,1±0,0	6,0±0,0	4,4±0,0			
10	<i>L. acidophilus</i> ZYN13	4,2±0,0	-	4,5±0,0	5,8±0,0	5,4±0,0	3,8±0,0	2,4±0,0			
11	<i>L. delbrueckii</i> sp. <i>delbrueckii</i> BAZ32	6,8±0,0	-	3,0±0,0	5,5±0,0	8,2±0,0	4,7±0,0	5,3±0,0			
12	<i>L. salivarius</i> ZYN9	5,1±0,0	-	4,9±0,0	3,9±0,0	7,4±0,0	4,7±0,0	5,2±0,0			
13	<i>L. salivarius</i> ZYN15	8,0±0,0	-	5,8±0,0	5,0±0,0	5,2±0,0	4,4±0,0	2,4±0,0			
14	<i>L. salivarius</i> ZYN23	-	-	5,1±0,0	3,6±0,0	-	-	-			
15	<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	5,5±0,0	-	6,0±0,0	3,8±0,0	-	-	5,0±0,00			
16	<i>L. fermentum</i> ZYN17	3,4±0,0	-	5,5±0,0	1,9±0,0	-	-	-			
17	<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN31	-	-	4,2±0,0	3,3±0,0	-	-	-			
18	<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN33	-	-	3,7±0,0	-	-	-	-			

-: İnhibisyon yok

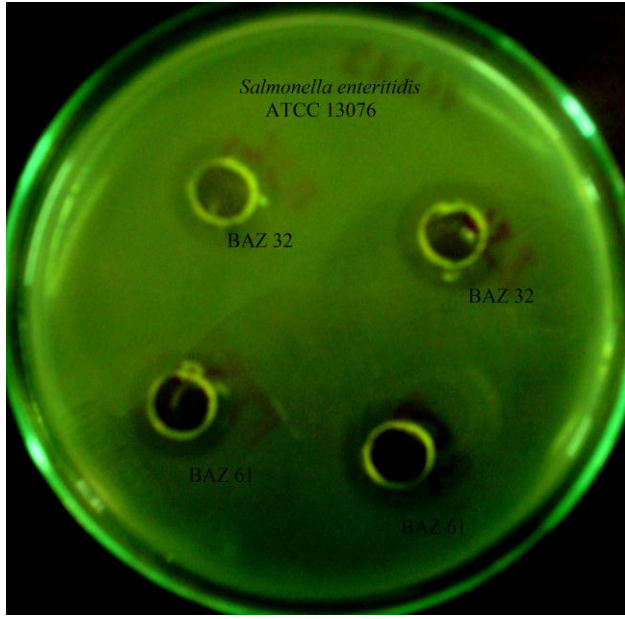


Resim 4.2 *L. acidophilus* BAZ61 suşunun *E. coli* O157:H7 test bakterisine oluşturduğu inhibisyon zonu.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 patojeni üzerinde ise 8,2 mm çapı ile en yüksek antimikrobiyal etki *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32 suşunda en düşük etki ise 0,8 mm ile *L. acidophilus* BAZ43 suşunda görülmüştür.

Sadece *L. acidophilus* BAZ36 suşunun *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 üzerinde inhibisyon zonu oluşturduğu (2,0 mm) diğer suşların ise bu test bakterisi üzerinde inhibisyon zonu oluşturmadığı gözlenmiştir.

Salmonella enteritidis ATCC 13076 patojeni üzerinde 5 suş (*L. rhamnosus* BAZ78, *L. fermentum* ZYN17, *L. salivarius* ZYN23, *Lactobacillus* sp. ZYN31, *Lactobacillus* sp. ZYN33) inhibisyon göstermezken diğer suşların inhibisyon çap değerleri 1,4 mm (*L. acidophilus* BAZ29) ile 6,4 mm (*L. acidophilus* BAZ36) arasında değişmektedir (Resim 4.3).



Resim 4.3 *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32 suşunun *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 test bakterisine oluşturduğu inhibisyon zonu

Lactobacillus suşlarının tümü *Shigella sonnei* Mu:57 üzerinde antimikrobiyal etki gösterirken, *L. acidophilus* BAZ61 maksimum (7,8 mm), *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32 minimum (3,0 mm) zon çapında etki göstermiştir.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 patojeni üzerinde *Lactobacillus* sp. ZYN33 suşu dışında diğer tüm suşlar antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir. En büyük zon çap değeri 11,5 mm ile *L. acidophilus* BAZ61 suşunda, en küçük zon çap değeri ise 0,4 mm ile *L. acidophilus* BAZ43 0,4 suşunda görülmüştür.

Aktif kültürlerin Gram negatif mikroorganizmalardan *Shigella sonnei* Mu:57 suşuna karşı antimikrobiyal etkisinin %100, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşuna %94,5, *E. coli* O157:H7 suşuna %83,3, *Escherichia coli* ATCC 11229 suşuna %77,7 ve *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 suşuna % 72,2 olduğu, Gram pozitif mikroorganizmalardan olan *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 suşuna karşı antimikrobiyal etkisinin %5,5 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşuna %66,6 olduğu tespit edilmiştir. Bu durum tavuk kaynaklı *Lactobacillus* bakterilerinin

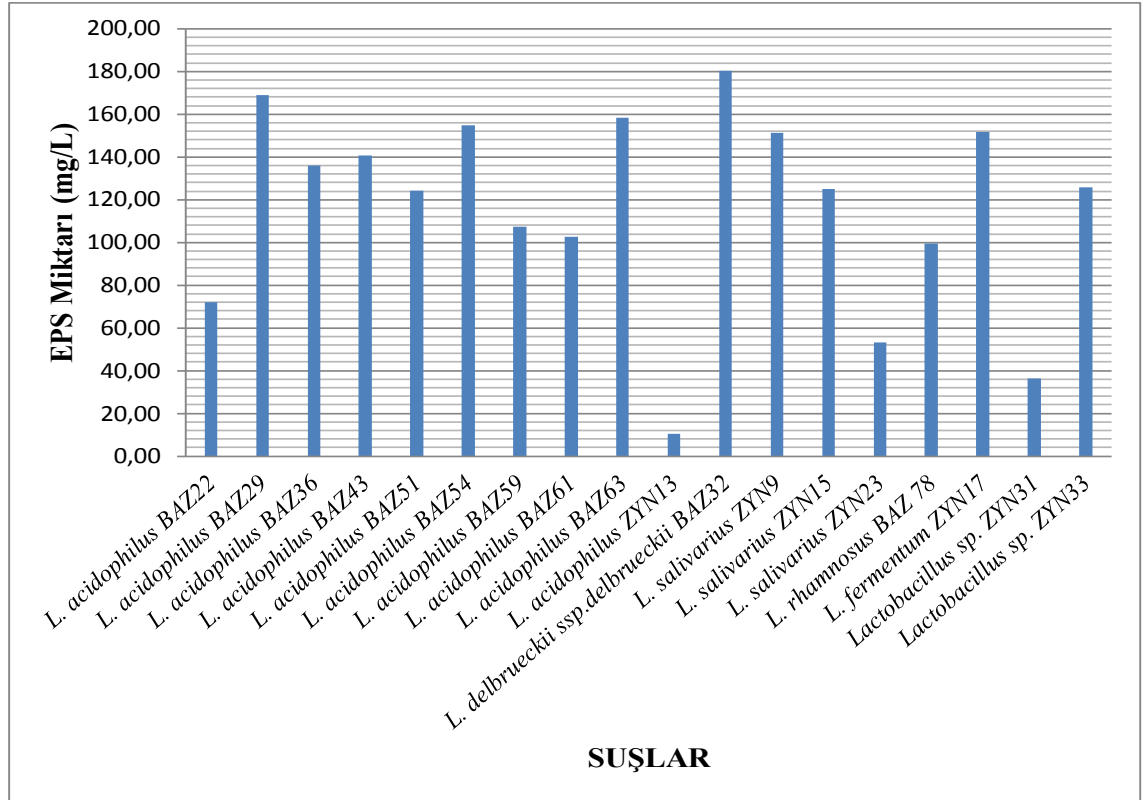
inhibisyon etkisinin Gram negatif bakterilere karşı daha etkili olduğunu göstermektedir.

Antimikrobiyal aktivite çalışma sonucunda elde edilen verilere göre kültürlerin antimikrobiyal etkinliği suşa göre değişkenlik göstermektedir. Suşların antimikrobiyal aktivitesi ile asit üretimi ve hidrojen peroksit üretimi arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak için korelasyon testi yapılmıştır. Bu analizler sonucunda antimikrobiyal aktivite, asit üretimi ve hidrojen peroksit üretimi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir.

4.5. Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi

Lactobacillus suşlarının EPS üretim miktarları, fenol sülfürik asit metodu ile spektrofotometrik olarak tespit edilmiş, buna göre tüm suşların EPS miktarları Şekil 4.3. ve Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Bu verilere göre suşların EPS üretim miktarları 10,60 mg/L–180,36 mg/L arasında değişiklik göstermiştir. EPS üretimi en yüksek suş *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32 (180,36 mg/L)'dir. Daha sonra yüksek miktarda EPS üretimi *L. acidophilus* BAZ29 (168,90 mg/L), *L. acidophilus* BAZ63 (158,42 mg/L) ve *L. acidophilus* BAZ54 (155,00 mg/L) suşlarında tespit edilmiştir. EPS üretimi en düşük suş ise *L. acidophilus* ZYN13 (10,60 mg/L) olarak belirlenmiştir. Suşların EPS üretimi ile asit üretimi arasında yapılan istatistiksel analizlerle anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir.



Şekil 4.3 *Lactobacillus* suşlarının ürettikleri EPS miktarları

Çizelge 4.7 *Lactobacillus* suşlarının EPS üretimleri

SUŞLAR	EPS (mg/L)
<i>L. acidophilus</i> BAZ22	72,10±0,02
<i>L. acidophilus</i> BAZ29	168,90±0,01
<i>L. acidophilus</i> BAZ36	135,98±0,01
<i>L. acidophilus</i> BAZ43	140,85±0,02
<i>L. acidophilus</i> BAZ51	124,27±0,00
<i>L. acidophilus</i> BAZ54	155,00±0,01
<i>L. acidophilus</i> BAZ59	107,19±0,01
<i>L. acidophilus</i> BAZ61	102,80±0,03
<i>L. acidophilus</i> BAZ63	158,42±0,02
<i>L. acidophilus</i> ZYN13	10,60±0,01
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> BAZ32	180,36±0,01
<i>L. salivarius</i> ZYN9	151,10±0,05
<i>L. salivarius</i> ZYN15	125,00±0,04
<i>L. salivarius</i> ZYN23	53,05±0,001
<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	99,63±0,00
<i>L. fermentum</i> ZYN17	151,70±0,01
<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN31	36,47±0,02
<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN33	125,85±0,01

4.6. Farklı pH Değerlerine Tolerans

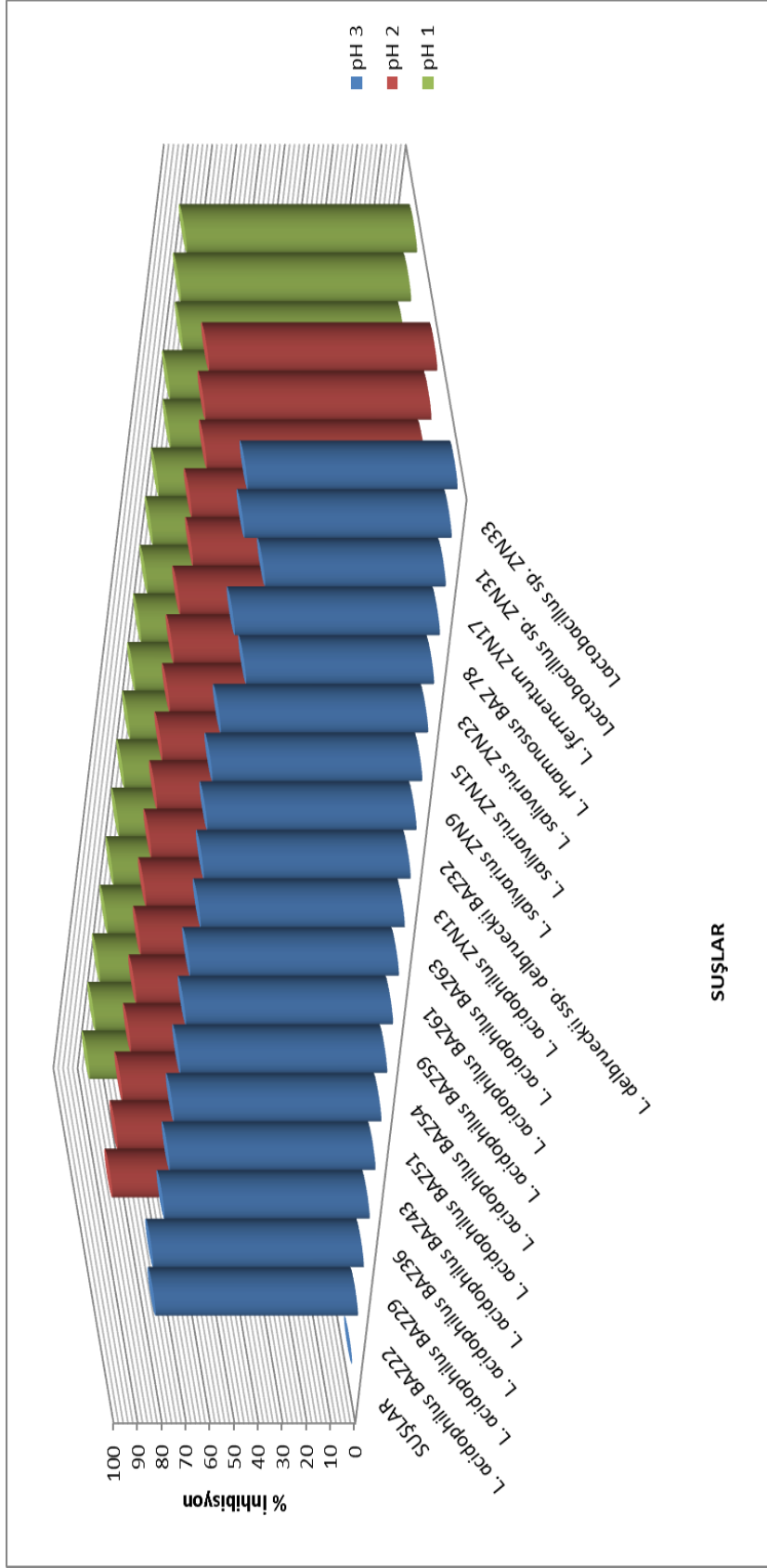
Lactobacillus suşlarının farklı pH değerlerine dirençliliğinin belirlenmesinde 600 nm de spektrofotometrede hücre yoğunlukları ölçülmüş ve kontrol grubunun (pH 6) hücre yoğunluğuna göre farklı pH' ların yüzde inhibisyonları hesaplanmıştır (Çizelge 4.8. -Şekil 4.4.). Tüm izolatlardan elde edilen verilere göre *Lactobacillus* suşlarının farklı pH değerlerine direnci oldukça zayıf bulunmuştur. Ortamdaki asitlik oranı arttıkça, bakterilerin yoğunluğunda düşme meydana gelmiştir.

Çizelge 4.8 *Lactobacillus* suslarının farklı pH değerlerine toleransı

SUŞLAR	pH 1			pH 2			pH 3			pH 6 (Kontrol)		
	OD ^a	% inhibisyon ^b	OD ^a	% inhibisyon ^b	OD ^a	% inhibisyon ^b	OD ^a	% inhibisyon ^b	OD ^a	% inhibisyon ^b	OD ^a	% inhibisyon ^b
<i>L. acidophilus</i> BAZ22	0,143±0,00	94,33	0,169±0,00	93,30	0,410±0,01	83,75	2,523±0,00					
<i>L. acidophilus</i> BAZ29	0,146±0,00	94,42	0,168±0,00	93,58	0,339±0,00	87,10	2,620±0,02					
<i>L. acidophilus</i> BAZ36	0,130±0,00	94,93	0,155±0,00	93,96	0,389±0,00	84,85	2,568±0,00					
<i>L. acidophilus</i> BAZ43	0,143±0,03	94,17	0,175±0,00	92,85	0,365±0,01	85,13	2,456±0,05					
<i>L. acidophilus</i> BAZ51	0,144±0,02	94,16	0,172±0,02	93,03	0,350±0,00	85,81	2,468±0,00					
<i>L. acidophilus</i> BAZ54	0,151±0,02	94,23	0,168±0,01	93,58	0,378±0,00	85,57	2,620±0,00					
<i>L. acidophilus</i> BAZ39	0,148±0,01	94,47	0,166±0,03	93,80	0,383±0,01	85,69	2,678±0,04					
<i>L. acidophilus</i> BAZ61	0,145±0,00	94,50	0,158±0,00	94,01	0,362±0,02	86,27	2,638±0,00					
<i>L. acidophilus</i> BAZ63	0,135±0,00	94,81	0,153±0,00	94,11	0,407±0,00	84,35	2,602±0,03					
<i>L. acidophilus</i> ZYN13	0,140±0,01	94,77	0,153±0,00	94,28	0,390±0,02	85,43	2,678±0,00					
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> BAZ32	0,141±0,01	94,50	0,164±0,01	93,61	0,349±0,02	86,40	2,568±0,01					
<i>L. salivarius</i> ZYN9	0,144±0,01	94,75	0,154±0,01	94,38	0,365±0,04	86,70	2,745±0,00					
<i>L. salivarius</i> ZYN15	0,142±0,00	94,65	0,156±0,00	94,13	0,380±0,00	85,70	2,658±0,00					
<i>L. salivarius</i> ZYN23	0,135±0,00	92,21	0,152±0,01	91,23	0,389±0,00	77,57	1,735±0,05					
<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	0,135±0,01	94,84	0,152±0,02	94,19	0,400±0,03	84,73	2,620±0,02					
<i>L. fermentum</i> ZYN17	0,119±0,02	91,94	0,149±0,00	90,34	0,375±0,01	74,61	1,477±0,10					
<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN31	0,127±0,01	95,15	0,175±0,03	93,32	0,380±0,01	85,49	2,620±0,04					
<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN33	0,133±0,01	95,12	0,158±0,00	94,21	0,365±0,02	86,63	2,731±0,00					

a: Spektro fotometrede 600 nm de okunan optik yoğunluklar

b: %Inhibisyon=OD₁-OD₂/OD₂X100; OD₁: Kontrol, OD₂: Farklı pH' lardaki optikal yoğunluklar



Şekil 4.4 Farklı pH değerlerinin *Lactobacillus* lar üzerinde % inhibisyon etkisi

Suşların genelinde pH 1' de yoğunluğun düştüğü ve yüzde inhibisyonun ise arttığı gözlenmiştir. pH 1 de suşların asit dirençliliği değerlendirildiğinde en düşük bakteri yoğunluğu *L. fermentum* ZYN17 (0,119 OD) suşunda en yüksek bakteri yoğunluğu ise *L. acidophilus* BAZ54 (0,151 OD)'de tespit edilmiştir.

pH 2' de yüzde inhibisyon %90,34 ile 94,28 arasında tespit edilirken, hücre yoğunluğunda en düşük *L. fermentum* ZYN17 (0,149 OD) suşunda, en yüksek ise *L. acidophilus* BAZ43 ve *Lactobacillus* sp. ZYN31 (0,175 OD) suşlarında belirlenmiştir. *L. fermentum* ZYN17 suşunun pH 1'e göre hücre yoğunluğunda bir artış olmasına rağmen diğer suşlar arasında pH 2'de de en düşük hücre yoğunluğuna sahip olduğu gözlenmiştir.

pH 3' de ortalama hücre yoğunluğu pH 1 ve 2' ye göre biraz daha artış göstermiştir. *L. acidophilus* BAZ22 (0,410 OD) ile *L. acidophilus* BAZ63 (0,407 OD) suşlarının en yüksek hücre yoğunluğuna sahip oldukları belirlenmiştir. Ayrıca EPS üretimi ile asit dirençliliği arasında anlamlı bir korelasyon olmadığı görülmüştür.

Yapılan varyans analizi ile farklı pH'larda yüzde inhibisyon değer ortalamalarının birbirine eşit olduğu hipotezi diğer bir deyişle farklı pH'larda inhibisyon değerinin değişmediği hipotezi 0,05 anlamlılık düzeyinde reddedilmiştir yani bu üç pH'da inhibisyon ortalamalarının birbirinden farklı olduğu söylenebilir. Ancak ikili ortalamaların birbirinden farklı olduğu hipotezlerinden ise pH 1 ile pH 2'de inhibisyonların eşit olduğu hipotezi 0,05 anlamlılık düzeyinde reddedilememiştir yani pH 1 deki inhibisyon ortalaması ile pH 2 deki inhibisyon ortalaması birbirine eşittir.

4.7. Farklı Safra Konsantrasyonlarına Tolerans

Tüm suşlardan elde edilen verilere göre bakterilerin safraya olan toleransı, safra oranına göre değişmekte olup, safranın % 0,06, % 0,15 ve % 0,30 artan konsantrasyona bağlı olarak tüm suşların gelişiminde düşme gözlenmiştir (Çizelge 4.9). *Lactobacillus*'lar ortamda bulunan safrayı belirli bir seviyeye kadar tolere

edebilmektedir. Ancak safra konsantrasyonu yükseldikçe ve özellikle %0,30 oranındaki safranın varlığında tüm suşların yoğunluğunda azalma tespit edilmiştir.

Lactobacillus'ların farklı safra konsantrasyonlarından etkilenecek yüzde inhibisyon değerleri incelendiğinde, %0,06 safra konsantrasyonunda % inhibisyon değerlerinin %0,28 ile %8,93 arasında olduğu tespit edilmiştir. %0,15 safra konsantrasyonunda % inhibisyon değerleri %1,32 ile %42,69 arasında ve %0,30 safra konsantrasyonunda % inhibisyon değerleri %9,62 ile %48,91 arasında bulunmuştur. En yüksek yüzde inhibisyon %0,30 safra konsantrasyonunda *L. acidophilus* BAZ 43 (%54,55) suşunda gözlenmiştir (Şekil 4.5).

%0,06 safra konsantrasyonunda *L. acidophilus* BAZ54 %8,93 oranında en yüksek inhibisyonu göstermiştir. %0,06 ve %0,15 safra konsantrasyonlarında suşların optikal yoğunluklarında kontrol grubuna göre çok fazla bir düşüş gözlenmezken %0,30 safra konsantrasyonunda bakterilerin üremelerinde diğer konsantrasyonlara göre azalma olduğu gözlenmiştir. *Lactobacillus*'lar arasında safraya karşı en dirençli suşlar olarak *L. fermentum* ZYN17 ve *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32 belirlenirken, en duyarlı suş olarak *L. acidophilus* BAZ59 olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9 *Lactobacillus* suşlarının farklı safra konsantrasyonlarına toleransı

SUŞLAR	%0,06 Safra			%0,15 Safra			%0,30 Safra		
	Kontrol OD ^a	OD ^b	% inhibisyon ^c	OD ^b	% inhibisyon ^c	OD ^b	% inhibisyon ^c	OD ^b	% inhibisyon ^c
<i>L. acidophilus</i> BAZ22	2,569±0,02	2,530±0,00	1,52	2,383±0,01	7,24	1,322±0,00	48,54		
<i>L. acidophilus</i> BAZ29	2,649±0,01	2,610±0,01	1,47	2,527±0,00	4,61	2,055±0,03	22,42		
<i>L. acidophilus</i> BAZ36	2,593±0,03	2,550±0,00	1,66	2,443±0,02	5,78	1,779±0,01	31,39		
<i>L. acidophilus</i> BAZ43	2,537±0,02	2,529±0,01	0,32	2,341±0,04	7,73	1,153±0,00	54,55		
<i>L. acidophilus</i> BAZ51	2,502±0,01	2,495±0,01	0,28	2,423±0,00	3,16	1,471±0,00	41,21		
<i>L. acidophilus</i> BAZ54	2,553±0,00	2,325±0,00	8,93	2,076±0,01	18,69	1,463±0,02	42,69		
<i>L. acidophilus</i> BAZ59	2,531±0,02	2,377±0,04	6,09	2,319±0,00	8,38	1,293±0,03	48,91		
<i>L. acidophilus</i> BAZ61	2,592±0,01	2,488±0,03	4,01	2,366±0,01	8,72	1,789±0,00	30,98		
<i>L. acidophilus</i> BAZ63	2,678±0,03	2,602±0,01	2,84	2,553±0,00	4,67	2,337±0,01	11,99		
<i>L. acidophilus</i> ZYN13	2,530±0,00	2,505±0,02	0,99	2,362±0,00	6,64	1,795±0,01	29,05		
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> BAZ32	2,553±0,00	2,523±0,00	1,18	2,498±0,03	2,15	2,293±0,00	10,42		
<i>L. salivarius</i> ZYN9	2,517±0,01	2,450±0,01	2,67	2,367±0,02	5,96	2,028±0,00	19,43		
<i>L. salivarius</i> ZYN15	2,602±0,02	2,553±0,04	1,89	2,495±0,01	4,11	1,598±0,00	38,59		
<i>L. salivarius</i> ZYN23	1,735±0,00	1,725±0,00	0,58	1,712±0,00	1,32	1,494±0,03	13,89		
<i>L. rhamnosus</i> BAZ78	2,516±0,01	2,495±0,00	0,83	2,425±0,00	3,62	1,958±0,03	22,18		
<i>L. fermentum</i> ZYN17	1,684±0,02	1,620±0,03	3,80	1,607±0,02	4,58	1,522±0,00	9,62		
<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN31	2,577±0,04	2,557±0,01	0,78	2,507±0,03	2,72	2,123±0,02	17,62		
<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN33	2,620±0,03	2,585±0,00	1,34	2,523±0,00	3,70	1,917±0,01	27,02		

a: Çalışmalarda kullanılan besiyerinde gelişme durumu (Safra içermektedir)

b: %Inhibisyon=OD₁-OD₂/OD₂X100; OD₁: Kontrol, OD₂: Farklı safra konsantrasyonlardaki optikal yoğunluklar

c: Spektrofotometrede 600 nm de okunan optik yoğunluklar

Yapılan varyans analizi ile farklı safra tuzu konsantrasyonlarında yüzde inhibisyon değeri ortalamalarının birbirine eşit olduğu hipotezi 0,05 anlamlılık düzeyinde reddedilmiştir. Ancak ikili ortalamaların birbirinden farklı olduğu hipotezlerinden ise %0,06 safra ile %0,15 safra ortamı inhibisyonların eşit olduğu hipotezi 0,05 anlamlılık düzeyinde reddedilememiştir.

4.8. Agregasyon

4.8.1. Otoagregasyon

Otoagregasyon denemelerinde EPS üretim kapasitesi yüksek olan *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32, *L. acidophilus* BAZ29, BAZ36, BAZ43 ve BAZ63 suşları kullanılmıştır. Suşların otoagregasyon görünüşleri ışık mikroskopunda da gözlenmiştir. Buna göre iyi bir şekilde otoagregasyon olan ve olmayan *Lactobacillus* suşlarının ayrımları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10 *Lactobacillus* suşlarının otoagregasyon sonuçları

Suşlar ve Kodları	EPS Miktarları (mg/L)	%Otoagregasyon	Işık Mikroskopunda Otoagregasyon
<i>L. acidophilus</i> BAZ29	168,90±0,01	8,3	(+)
<i>L. acidophilus</i> BAZ36	135,98±0,01	33,3	(++)
<i>L. acidophilus</i> BAZ43	140,85±0,02	0,0	(-)
<i>L. acidophilus</i> BAZ63	158,42±0,02	6,6	(+)
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> BAZ32	180,36±0,01	10,0	(+)

++: Yüksek otoagregasyon +: Düşük otoagregasyon -:Otoagregasyon yok

Suşların otoagregasyon sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek *L. acidophilus* BAZ36 (%33,3) (Resim 4.4) suşunda tespit edilirken *L. acidophilus* BAZ43 suşunda otoagregasyon tespit edilememiştir. Yapılan analizlerde EPS üretimi ile otoagregasyon arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.



Resim 4.4 *L. acidophilus* BAZ36'nin otoagregasyonun ışık mikroskobu görüntüsü

4.8.2. Koagregasyon

Lactobacillus suşları ile *E. coli* ATCC 11229' un % koagregasyonu değerlendirildiğinde en yüksek % koagregasyon *L. acidophilus* BAZ36 (%28,3) suşunda bulunmuş (Resim 4.5), en düşük koagregasyon ise *L. acidophilus* BAZ43 (%1,5) suşunda gözlenmiştir (Çizelge 4.11.).

Çizelge 4.11 *E. coli* ATCC 11229 ile *Lactobacillus* suşlarının koagregasyon sonuçları

Suşlar ve Kodları	%Koagregasyon	Işık Mikroskobunda Koagregasyon
<i>L. acidophilus</i> BAZ29	15	(+)
<i>L. acidophilus</i> BAZ36	28,3	(++)
<i>L. acidophilus</i> BAZ43	1,5	(+)
<i>L. acidophilus</i> BAZ63	16,6	(++)
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> BAZ32	6,6	(+)

++: Yüksek koagregasyon, +: Düşük koagregasyon



Resim 4.5 *L. acidophilus* BAZ36 suşunun *E.coli* suşu ile koagregasyonunun ışık mikroskop görüntüsü

Lactobacillus suşları ile *Salmonella enteritidis* ATCC 13076'ın % koagregasyonu değerlendirildiğinde ise en yüksek % koagregasyon *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32 (%25,0) suşunda bulunmuş olup, en düşük % koagregasyon *L. acidophilus* BAZ43 (%1,0) suşunda tespit edilmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12 *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 ile *Lactobacillus* spp. suşlarının koagregasyon sonuçları

Suşlar ve Kodları	%Koagregasyon	Işık Mikroskobunda Koagregasyon
<i>L. acidophilus</i> BAZ29	3,33	(+)
<i>L. acidophilus</i> BAZ36	0,16	(+)
<i>L. acidophilus</i> BAZ43	1,00	(+)
<i>L. acidophilus</i> BAZ63	2,50	(+)
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> BAZ32	25,00	(++)

++: Yüksek koagregasyon, +: Düşük koagregasyon

Yapılan istatistiksel analizlerde EPS üretimi ile koagregasyon arasında çok kuvvetli ($r = -0,99$) ve anlamlı ters yönlü bir ilişki olduğu ($p = 0,014$), ancak koagregasyon ile otoagregasyon arasında anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Uygun dozajlarda kullanıldığında konak üzerinde sağlığa yararlı etkileri olan bakteriler probiyotik bakteriler olarak tanımlanmaktadır (FAO/WHO, 2006). Probiyotiklerin çok önemli fonksiyonları vardır. Bunlar; yararlı bakteriler tarafından sağlıklı kılınan sağlıklı mikrobiyata ortamının gelişmesini sağlaması, enterik patojen kolonizasyonunun azaltılması, mukozal bağışıklığın iyileştirilmesi (FAO/WHO 2002), sindirim kapasitesinin artması ve düşük pH da yaşayabilmesi, bağırsak dokusunun olgunlaşması ve bütünlüğün sağlanmasıdır (Lan ve ark., 2005, Chambers ve Gong, 2011).

Tavuk sindirim sisteminde insanda da olduğu gibi birbirinden farklı birkaç yüz bakteri vardır ve bu mikroorganizmalar bağırsak mikrobiyotasını oluşturmaktadırlar (Gong ve ark., 2002a; Gong ve ark., 2002b; Zhu ve ark., 2002; Apajalahti ve ark., 2004; Gong ve ark., 2007). Cıvcıvlerin gastrointestinal sistemlerinden izole edilmiş ve moleküler yöntemlerle tanımlamaları yapılan çalışmada kanatlı hayvan sindirim sistemleri arasında en sağlıklı sindirim sistemine cıvcıvlerin sahip olduğu belirtilmiştir (Kizerwetter-S'wida ve Binek, 2008).

Tavuk sindirim sistemindeki mikrobiyal kolonizasyon hızlı bir şekilde artarken *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae* ve *Clostridium* türleri patojenlerin de sindirim sisteminde gelişebildiği belirlenmiştir (Lan ve ark., 2005). *Lactobacillus* türleri kullanılarak hazırlanan yemleri tüketen cıvcıvlerin bağırsak mikrobiyalarında 2 haftalık süreç sonunda bu probiyotik bakterilerin baskın hale geldiği ve patojenleri inhibe ettiği gözlenmiştir (Guan ve ark., 2003, Lan ve ark., 2005). Yapılan bir çalışmada *L. aviarius* ve *L. salivarius* türleri bağırsak mukozasında baskın bulunan probiyotik suşlar olarak kabul edilmiştir (Gong ve ark., 2007).

Özellikle tavukçuluk endüstrisinde 1973 yılında Nurmi ve Narmala'nın probiyotik bakteriler üzerindeki yaptıkları çalışmalardan sonra enterik bakteriyel patojenlerin olumsuz etkilerini yok etmede probiyotiklerin kullanılmasına başlanmıştır. (Chambers ve Gong, 2011).

Laktik asit bakterileri, fermente et, süt, sebze, meyve ve tahıl ürünlerinin üretim ve olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaları nedeni ile gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadır. Çeşitli gıdaların bu yöntemle muhafazası en eski gıda muhafaza metotlarından birisi olarak kabul edilmektedir. Günümüzde tüketicilerin doğal ve katkısız ürünlere gösterdikleri talep artışı, laktik asit bakterilerinin potansiyel gıda koruyucusu olarak öneminin arttırmıştır. Bu özelliklerinden dolayı, laktik asit bakterileri pek çok canlı organizmadan izole edilerek incelenmiştir. Ancak bu konu ile ilgili yapılan araştırmalar incelendiğinde, Türkiye’de tavuk orjinli çalışmalara çok fazla rastlanmamıştır.

Brezilya’ da yapılan bir çalışmada araştırmacılar, tavuklardan izole ettikleri *L. fermentum* izolatlarının probiyotik özelliklerini araştırmışlardır. Bu amaçla başta tavuk bağırsağı olmak üzere çeşitli organlardan izole ettikleri *L. fermentum* suşlarının asit, pH ve antimikrobiyal aktivitesini incelemişlerdir. Bu kriterlere dirençli olan izolatları tavuk yemlerine ilave ederek, tavuklardaki etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak bu yemlerin, antibiyotik gibi bir etki gösterdiğini belirlemişlerdir (Reque ve ark., 2000).

Çalışmada *Lactobacillus* spp.’lerin 24 saatlik gelişme süresi sonunda belirlenen son kültür pH’ sı 4,3-5,4 arasında değiştiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre 24 saatlik gelişme süresi sonunda laktik asit miktarları %0,42 (*L. salivarius* ZYN23) ile %0,90 (*L. salivarius* ZYN9) olarak tespit edilmiştir. Bütün şartların aynı olmasına rağmen asit üretiminin türlere göre dikkate değer bir farklılık göstermediği ve asit üretimindeki farklılıkların suş farklılığından kaynaklandığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar *Lactobacillus* bakterilerine ait sadece belirli türlerin asit üretiminin yüksek olduğunu değil, aynı tür içindeki farklı suşların bazılarının yüksek bazılarının ise düşük asit ürettiğini göstermektedir. Çalışmada yüksek miktarlarda laktik asit üretilmemesi fermentasyon sonucunda bakterilerin oksijene maruz kalmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

1997 yılında kefirde izole edilen *Lactobacillus* suşlarının 24 saatlik kültürlerinin titre edilebilir yüzde asitlik miktarı %0,17-1,14 arasında belirlenirken (Mumcu, 1997), 2001 yılında vajinal izolat olan 22 *Lactobacillus* türünde yapılmış bir çalışma

sonucunda da laktik asit düzeyleri 0,68-2,5 mg/ml olarak bulunmuştur (Aroutcheva ve ark., 2001). Kefirden ve vajinadan izole edilen *Lactobacillus* suşlarının yüzde asit üretimleri bizim sonuçlarımıza göre yüksek bulunmuştur. Bunun nedeninin de; *Lactobacillus* suşlarının asit üretimlerinin farklı kaynaklardan ve ortamlardan etkilenmesi olduğu düşüncesindeyiz.

Piwat ve ark., (2011) yılında anaokulu çocuklarından izole ettikleri *Lactobacillus* türlerinin laktik asit üretimlerini incelemiştir ve *Lactobacillus salivarius* ve *Lactobacillus plantarum* suşlarının asit üretimlerinin yüksek olduğunu, besiyeri pH'sında düşük olduğunu gözlemlemiştir. Yaptıkları istatistiksel analizle son kültür pH'sı ile asit üretimi arasında %86'lık ters yönlü bir korelasyon olduğunu belirlemiştir. Yapılan çalışmada da yüzde asit üretimi arttıkça besiyerinin pH'sının düştüğü gözlenmiştir. Bu durumu ispatlamak için istatistiksel analiz yapılmış, son kültür pH'sı ile yüzde asitlik arasında $r = - 0,82$ olduğundan negatif yönde yüksek düzeyde anlamlı bir ilişki olduğu anlaşılmıştır.

Lactobacillus bakterilerinin oluşturdukları hidrojen peroksit üretimi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Suşların hidrojen peroksit üretimleri 0,18–3,77 µg/mL arasında bulunmuştur. En yüksek hidrojen peroksit üreten suş *L. salivarius* ZYN9, en düşük üreten suş *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32 olarak belirlenmiştir. Türler arasında karşılaştırma yapıldığında *L. acidophilus* suşlarının hidrojen peroksit üretim miktarları 2,31 µg/mL ile 0,49 µg/mL arasında değişmektedir. En yüksek üretim *L. acidophilus* ZYN 31 (2,31 µg/mL) suşunda en düşük üretim ise *L. acidophilus* BAZ59 suşunda belirlenmiştir. *L. salivarius* suşlarında ise hidrojen peroksit üretim miktarları 3,77 µg/mL (ZYN9) ile 1,21 µg/mL (ZYN23) arasında belirlenmiştir.

Yüksekdağ ve ark., (2004) yılında kefirde izole ettikleri *Lactobacillus* spp. suşlarının hidrojen peroksit üretim miktarı olarak 0,04-0,19 µg/mL arasında belirlerken, Ocana ve ark., (1999) insan vajinasından izole ettikleri suşların üretim miktarlarını 0,68- 95 µg/mL arasında, Collins ve Aramaki (1980) ise 4-10 µg/mL arasında belirlemiştir. *Lactobacillus* spp. suşlarının H₂O₂ üretim miktarlarındaki farklılıkların sebebi olarak suşların hidrojen peroksit üretimleri sırasında, oksijen

oksidoredüktaz aktivitelerinin farklılığı olduğu bildirilmiştir. Bu enzimin aktivitesinin de bakterinin bulunduğu ortamdan etkilendiği bilinmektedir (Reinheimer ve ark., 1990). Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal aktivitelerinin özellikle hidrojen peroksit üretimlerinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Delbes-Paus ve ark., 2010)

Sönmez ve ark., (1999) tavuk bağırsaklarından izole ettikleri 3 adet *L. acidophilus*, 5 adet *L. agilis*, 2 adet *L. animalis*, 2 adet *L. brevis*, 2 adet *L. coryneformis* subsp. *torquens*, 9 adet *L. fermentum* ve 17 adet *L. plantarum* olmak üzere toplam 40 izolatanın antibiyotik dirençliliklerini incelemiştir. Çalışma sonucunda laktobasil suşlarının penisilin grubu antibiyotiklerden amoksisilin, ampisilin ve karbenisiline %100, penisiline %97,5, oksasiline %70, metisiline %35 oranında duyarlı olduklarını tespit etmişlerdir. Linkomisin, nistatin, spektinomisin ve peptid grubu antibiyotiklerden basitrasine dirençli suşların oranı ise %60-90 arasında değişmiştir. Yine peptid grubu antibiyotiklerden polimiksin B'ye karşı suşların %100'ü dirençli bulunmuştur.

Taheri ve ark., (2009a) yaptıkları bir çalışmada tavuktan izole ettiği *Lactobacillus crispatus* suşunun nalidiksik asit ve neomisin dirençli olduğunu ampisilin, basitrasin, kloramfenikol, doksisisiklin, eritromisin, furazolidon, gentamisin, kanamisin, lincomycin, oksitetrasiklin, penisilin, streptomisin, tetrasiklin ve vankomisin antibiyotiklerine duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Yine Taheri ve ark., 2009(b) yılında tavuk izolatından elde edilen *L. johnsonii* suşunun nalidiksik asit ve neomisin antibiyotiklerine dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Bu tez çalışmasında, *Lactobacillus* spp. suşlarının protein sentezini inhibe eden antibiyotiklerden kanamisin ve gentamisine karşı gösterdikleri direnç % 100 iken, kloramfenikole karşı dirençlilikleri %17; streptomisine karşı ise % 72 oranında dirençlilik göstermişlerdir. Hücre duvar sentezini önleyen antibiyotiklerden penisilin G'ye karşı % 78 (orta derecede) ve % 22 duyarlı oldukları, ampisiline karşı ise % 100 duyarlı oldukları belirlenmiştir. Aynı şekilde, sitoplazmik zar sentezini engelleyen vankomisin antibiyotiğine karşı gösterdikleri duyarlılığın % 50 olduğu

gözlenmiştir. Nükleik asit sentezini engelleyen rifampisine ise % 5 duyarlı ve % 95 dirençli oldukları belirlenmiştir.

Kanatlı endüstrisi streptomisin, tetrasiklin ve kloramfenikolları içine alan birçok ilacın kullanımını onaylamaktadır (FDA). Bu ilaçlar su ve yemlere katılarak kullanılmakta, dolayısıyla toplu olarak yetiştirilen kanatlıların doğal olarak birey başına aldıkları dozun belirlenmesi zorlaşmaktadır ve sonuç olarak dozun kullanım miktarı üzerine çıkması mümkündür. Bu yüzden aynı çiftlikte yetiştirilen kanatlılar, antimikrobiyal ajanlara farklı oranlarda dirençlilik gösterebilmektedirler (Olah ve ark., 2004). Yapılan çalışmada *L. salivarius* ZYN23, *L. rhamnosus* BAZ78 ve *Lactobacillus* sp. ZYN31 streptomisin ve kloramfenikol antibiyotiklerine dirençli suşlar olarak belirlenmiştir. Ürettikleri hidrojen peroksit (1,07; 1,21; 0,49) ve EPS (99,63; 53,05; 36,47) miktarları ile tavuklarda su ve yemlerine katılarak probiyotik suş olarak değerlendirilebilir.

Bakterilerde kontrolsüz antibiyotik kullanımına bağlı olarak artan antibiyotik dirençlilikleri, patojen bakterilerin gün geçtikçe etkisiz hale getirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle günümüzde, bakterilerin uzaklaştırılmasında kullanılan antibiyotikler yerine, daha çok doğal gıda koruyucusu olan probiyotiklerin kullanımı tercih edilmektedir. Bu çalışma ile de tavuklardan izole edilen *Lactobacillus*'ların üretebildikleri çeşitli inhibitör maddelerin etkisi ile tavuklarda enfeksiyonlara neden olabilen bazı patojen bakterileri, kontrollü bir şekilde ortamdaki uzaklaştırılabileceği düşünülmektedir.

Lactobacillus spp. suşlarının tavuklarda hastalığa yol açan patojen bakteriler (*Escherichia coli* ATCC 11229, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella sonnei* Mu:57, ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) üzerine inhibisyon etkileri agar difüzyon yöntemine göre belirlenmiştir. Buna göre, suşların %22,3'ü *Escherichia coli* ATCC 11229 üzerine antimikrobiyal aktivite gösterememişlerdir. Antimikrobiyal etkinin en yüksek olduğu suş *L. acidophilus* BAZ36 (6,1 mm) iken en düşük olduğu suşlar ise *L. acidophilus* ZYN13 ve *L. salivarius* ZYN15 (2,4 mm) olarak belirlenmiştir.

Lactobacillus spp. suşlarının %83,3'ü *E. coli* O157:H7 üzerinde antimikrobiyal etki göstermişlerdir. En yüksek (8,0 mm) ve en düşük (2,9 mm) antimikrobiyal aktivite gösteren suşlar ise sırasıyla *L. salivarius* ZYN15 ve *L. acidophilus* BAZ29 olarak tespit edilmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 patojeni üzerine, 8,2 mm'lik çapı ile en yüksek antimikrobiyal etkinin *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32 suşunda, en düşük etkinin ise 0,8 mm'lik çapı ile *L. acidophilus* BAZ43'te olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Suşların %66,6'sı *S. aureus* patojeni üzerine antimikrobiyal aktivite gösterirken %33,4 herhangi bir etki gösterememişlerdir. *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 üzerine ise sadece *L. acidophilus* BAZ36 suşunun inhibisyon zonu oluşturduğu (2,0 mm) gözlenmiştir. *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 patojeni üzerine 5 farklı suş (*L. rhamnosus* BAZ78, *L. fermentum* ZYN17, *L. salivarius* ZYN23, *Lactobacillus* sp. ZYN31, *Lactobacillus* sp. ZYN33) inhibisyon göstermezken diğer suşların inhibisyon çap değerleri 1,4 mm (*L. acidophilus* BAZ29) ile 6,4 mm (*L. acidophilus* BAZ36) arasında değişmektedir.

Lactobacillus suşlarının tümünün *Shigella sonnei* Mu:57 üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. *L. acidophilus* BAZ61 suşunun en yüksek (7,8 mm), *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32 suşunun ise en düşük (3,0 mm) zon çapında etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Son olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 patojeni üzerine *Lactobacillus* sp. ZYN33 suşu dışındaki tüm suşların antimikrobiyal etki gösterdikleri belirlenmiştir. En büyük zon çapı 11,5 mm ile *L. acidophilus* BAZ61 suşunda, en küçük zon çap değeri ise 0,4 mm ile *L. acidophilus* BAZ43 suşunda görülmüştür. Tavuk kaynaklı *Lactobacillus* bakterilerinin inhibisyon etkisinin Gram negatif bakterilere karşı daha etkili olduğu gözlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada son zamanlarda; *Lactobacillus* spp. suşlarının *Salmonella*'ya hatta özellikle *Salmonella enteritidis* türüne karşı etkili oldukları gözlenmiştir (Carter ve ark., 2009). Yapılan başka bir çalışmada seçilmiş *L. salivarius*'un tavuklarda hastalık yapan *Salmonella* ve *Campylobacter* türlerinin patojen etkisinin yok edilmesinde etkili olduğu belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2007a, 2007b).

Chaveerach ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada, tavuk bağırsağından izole edilen *L. fermentum*'un, *Campylobacter* gelişimini inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir.

Garriga ve arkadaşlarının (1998) yaptıkları çalışmada, tavuk bağırsağından izole ettikleri 296 adet laktik asit bakterisinin inhibitör aktivitesini incelemişlerdir. Bu izolatlardan 77' sinin *S. enteritidis* ve *E. coli*' ye karşı inhibisyon etkisi gösterdiğini belirlemişlerdir. Chaveerach ve arkadaşlarının (2004) tavuk bağırsağından izole edilen *Lactobacillus fermentum*'un, *Campylobacter* gelişimini inhibe ederken, *E. coli* ve *Enterococcus* ile *Campylobacter* gelişimini inhibe edemediğini bildirmişlerdir.

Laktik asit bakterilerinin ürettiği ekzopolisakkaritler immün sisteminin düzenleyici ve kolesterol düşürücü olarak sağlık alanında (Makino ve ark., 2006), jelleştirici, dengeleyici, kıvam artırıcı ve su bağlayıcı araçlar olarak ise gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında kullandığımız *Lactobacillus* spp. suşlarının EPS üretim miktarlarının 10,60–180,36 mg/L arasında değiştiği belirlenmiştir. EPS üretimi en fazla olan suşun *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32 (180,36 mg/L) olduğu tespit edilmiştir. EPS üretiminin fazla olduğu diğer suşlar ise sırasıyla, *L. acidophilus* BAZ29 (168,90 mg/L), *L. acidophilus* BAZ63 (158,42 mg/L) ve *L. acidophilus* BAZ54 (155,00 mg/L) suş olarak belirlenmiştir. *L. acidophilus* ZYN13'ün 10,60 mg/L'lık miktar ile en düşük EPS üreten suş olduğu gözlenmiştir.

Coşkun ve ark., (2010) ev yapımı Türk yoğurdundan izole ettikleri iki farklı *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının EPS üretim miktarları olarak 211 ve 27 mg/L olarak belirlemişlerdir. Mozzi ve arkadaşları (2006) 31 adet besin kaynaklı (yoğurt, peynir, fermente süt ve et) farklı laktik asit bakterilerinin EPS üretimlerini belirledikleri çalışmalarında, 10 adet *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşlarının 10-150 mg/L, *L. delbrueckii* ssp. *lactis* CRL564 suşunun 55 mg/L, *L. helveticus* CRL1176 suşunun 41 mg/L, 8 adet *S. thermophilus* suşlarının 10-166 mg/L, *L. casei* 14-25 mg/L, *L. paracasei* 10-26 mg/L ve *L. rhamnosus* CRL627 suşunun ise 10 mg/L arasında değişen miktarlarda EPS ürettiklerini bildirmişlerdir.

Benzer bir çalışmada, Cerning ve arkadaşları (1992), süttten izole ettikleri *L. bulgaricus* suşlarının 60-150 mg/L arasında değişen miktarlarda EPS ürettiklerini bildirmişlerdir. Yine Frengova ve arkadaşlarının (2000) yaptığı bir çalışmada *Lactobacillus* spp. suşlarının EPS üretim miktarlarını 400-540 mg/L arasında değişen miktarlarda tespit etmişlerdir. Bu çalışmada genel olarak tüm suşların EPS üretimi, daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen değerlere göre benzer veya daha az olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeninin de; EPS üretimlerinin türler ve hatta suşlar arasında farklı olmasının sebeplerinin, fermantasyon şartları (sıcaklık, inkübasyon, süre ve pH) ve besiyeri kompozisyonunun (karbon ve nitrojen kaynağı) etkili olduğunu düşünmekteyiz. Ekzopolisakkaritler; bakterinin yüzey tutunmasında yapıştırıcı (slime) işleve sahip olması ve bulunduğu ortama tutunma ve biyofilm oluşturmada etkilidirler. Bütün bu özellikler ekzopolisakkarit üreten bir bakteriye bulunduğu ortamda stabil olarak kalabilme ve baskın olarak büyüme özelliği kazandırmaktadır (Ding ve ark., 1995). Bu nedenlerden dolayı yüksek EPS üretimine sahip suşların probiyotik olarak kullanımı için uygun adaylar olduğu düşünülmektedir.

Mide asidi fizyolojik olarak bakterilerin karşılaştığı ilk savunma mekanizması olduğundan dolayı, ağız yoluyla alınan probiyotik bakterilerin düşük pH' lara dirençli olmaları en önemli özelliklerinden biridir. Mide sıvısından sonra ince bağırsak sıvısı ortamına probiyotik bakterilerin dirençlilik gösterebilmeleri gerekmektedir (Hwanhlem ve ark., 2010).

Çalışmada, *Lactobacillus*' ların farklı pH' larda gösterdikleri asit dirençliliği incelenmiştir. Bu amaçla, spektrofotometrik olarak hücre yoğunlukları ölçülmüş ve kontrol grubunun (pH 6) hücre yoğunluğuna göre düşüşler % inhibisyon olarak belirlenmiştir. Bakterilerin üreme ortamında asitlik oranının artışına bağlı olarak hücre yoğunluğunda azalma gözlenmiştir.

Lactobacillus suşlarının pH 3'teki ortalama hücre yoğunluğu düşük pH'lara göre daha fazladır. Genel olarak, pH 1' de suşların yoğunluklarının düştüğü ve % inhibisyonun ise arttığı gözlenmiştir. Yine aynı pH'da suşların asitlere karşı dirençlilikleri karşılaştırıldığında en düşük bakteri yoğunluğunun *L. fermentum*

ZYN17 (0,119 OD) suşunda, en yüksek bakteri yoğunluğunun ise *L. acidophilus* BAZ54 (0,151 OD) suşunda olduğu belirlenmiştir. pH=2' de ise % inhibisyon değerleri 90,34 ile 94,28 arasında değişirken, en düşük hücre yoğunluğunun *L. fermentum* ZYN17 (0,149 OD) suşunda, en yüksek hücre yoğunluğunun ise *L. acidophilus* BAZ43 ve *Lactobacillus* spp. ZYN31 (0,175 OD) suşlarında olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, *L. fermentum* ZYN17 suşunun hücre yoğunluğunun pH ile arttığı, ancak diğer suşların hücre yoğunluklarının pH ile azaldığı açıkça görülmektedir. Ayrıca, pH 3'te *L. acidophilus* BAZ22 (0,410 OD) ile *L. acidophilus* BAZ63 (0,407 OD) suşlarının en yüksek hücre yoğunluklarına sahip oldukları belirlenmiştir.

Heravi ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada tavuktan izole ettikleri *Lactobacillus* suşlarının pH 2, 3 ve 4'teki hücre yoğunlukları ölçülmüş ve asitlik oranı arttıkça buna bağlı olarak hücre yoğunluğunda da azalma belirlemişlerdir.

Van Coillie ve arkadaşları (2007) tavuk vajinasından izole ettikleri *Lactobacillus* türlerinin pH 2,5 ve pH 3 asitli ortamda dirençlilikleri çalışılmış ve pH 2,5'te inhibisyon oranının arttığını gözlemlemişlerdir.

Lin ve ark., (2007) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus* türleri arasında asit dirençliliği değişiklik göstermektedir. Asite dirençli tür olarak *L. fermentum* suşunu belirlemişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre hücre yoğunluğu en düşük tür olarak *L. fermentum* suşu olarak tespit edilmiştir. Bu da gösteriyor ki aynı tür içindeki farklı suşların aside yüksek bazılarının ise düşük tolerans gösterebileceğidir.

Safra toleransı probiyotik LAB' lerinin ince bağırsakta yaşama, gelişme ve etki gösterebilmeleri için gerekli ve önemli özelliklerinden sayılmaktadır (Minelli ve ark., 2004). Probiyotik bakterilerin mide-bağırsak yolunda canlılıklarını sürdürüp, ortamda kolonize olabilmeleri için midenin asidik pH' larına (2,5-3,5) ve bağırsağın safırlı ortamına tolerans gösterebilmeleri bu bakterilerin önemli özelliklerindendir (Hwanhlem ve ark., 2010).

%0,30 safra konsantrasyonunun insan safra suyu oranına yakın olması nedeniyle birçok bilimsel çalışmada bu oran tercih edilmiştir (Brashears ve ark., 2003, Lin ve ark., 2006). Lin ve ark., 2007 yılında yaptıkları çalışmada tavuktan izole ettikleri *Lactobacillus fermentum* türlerinin % 0,30 safra konsantrasyonunda dirençlilikleri çalışılmış ve bazı türlerde üreme yoğunluğunda azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada da *Lactobacillus crispatus* ile *Lactobacillus salivarius* suşlarının %0,30 safra konsantrasyonuna dirençliliği incelenmiş ve *L. crispatus* suşunun safraya dirençli olduğu ve gelişme gösterebildiği *L. salivarius*'un ise safrayı tolere edemediğini ve gelişemediğini tespit etmişlerdir (Heravi ve ark., 2011).

Bu çalışmada, *Lactobacillus* suşlarının %0,06, %0,15 ve %0,30' luk safra konsantrasyonlarında safra dirençlilikleri ve % inhibisyon değerleri belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlardan, *Lactobacillus* cinsi bakterilerin bağırsakta bulunan safraya olan toleransı, safra oranına göre değiştiği, safranın %0,06, %0,15 ve %0,30 konsantrasyonlarında, artan konsantrasyona bağlı olarak bakterilerin gelişiminde azalma gözlenmiştir. *Lactobacillus*' lar ortamda bulunan safrayı belirli bir seviyeye kadar tolere edebilmektedir. Ancak safra konsantrasyonu yükseldikçe ve özellikle %0,30 oranındaki safranın varlığında tüm suşların üreme yoğunluğunda azalma tespit edilmiştir. Aynı şekilde Taheri ve arkadaşları (2009a) tavuktan izole ettikleri *Lactobacillus* türlerinin safraya toleranslarını (%0,075; 0,15; 0,30) incelemişler ve safra yoğunluğu arttıkça bakteri yoğunluğunda azalma gözlemişlerdir.

Lactobacillus' ların farklı safra konsantrasyonlarından etkilenerek yüzde inhibisyon değerleri incelendiğinde, en yüksek yüzde inhibisyon %0,30 safra konsantrasyonunda gözlenmiştir. %0,06 safra konsantrasyonunda % inhibisyon değerlerinin %0,28 ile %8,93 olduğu; %0,15 safra konsantrasyonunda %1,32 ile %42,69 arasında ve %0,30 safra konsantrasyonunda ise %9,62 ile % 48,91 olduğu bulunmuştur. %0,06 safra konsantrasyonunda en yüksek inhibisyonu *L. acidophilus* BAZ54 (%8,93) suşunda gözlenmiştir. *Lactobacillus*'lar arasında safraya karşı en dirençli suşlar olarak *L. fermentum* ZYN17 ve *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32 belirlenirken, en duyarlı *L. acidophilus* BAZ59 suşu olduğu tespit edilmiştir. %0,06

ve %0,15 safra konsantrasyonlarında suşların optikal yoğunluklarında kontrol grubuna göre çok fazla bir düşüş gözlenmezken %0,30 safra konsantrasyonunda bakterilerin üremelerinde diğer konsantrasyonlara göre azalma olduğu gözlenmiştir.

Burns ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada, insan bağırsağından izole edilen *L. delbrueckii* ve *L. acidophilus* türlerinin artan safra derişimine karşı dirençlilikleri incelenmiştir. Bazı suşların safraya karşı dirençliliğinin iyi olmasına karşın bazılarının safrayı tolere edemedikleri sonucuna ulaşılmışlardır. Bu durum suşların izolasyon kaynaklarının farklı olmasının bir sonucu olarak yorumlanmışlardır. Yapılan çalışmalarda ve bu çalışma sonucunda kullanılan bakterilerin safraya farklı tolerans göstermeleri izolasyon kaynaklarının farklı olmasının bir sonucu olabilir.

Lactobacillus suşlarının otoagregasyon denemelerinde EPS üretim kapasitesi yüksek olan *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32, *L. acidophilus* BAZ29, *L. acidophilus* BAZ36, *L. acidophilus* BAZ43, *L. acidophilus* BAZ63 suşları kullanılmıştır. Suşların otoagregasyon sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek *L. acidophilus* BAZ36 (%33,3)) suşunda tespit edilirken, *L. acidophilus* BAZ43 suşunda otoagregasyon tespit edilememiştir. Sabır ve arkadaşları (2010) kefirde izole ettikleri *Lactobacillus* spp suşlarının otoagregasyon oranları % 29-88 oranında belirlenmiştir. Heravi ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada 31 adet *Lactobacillus* spp. suşunun otoagregasyon yetenekleri çalışılmış ve sadece 8 adet suşta otoagregasyon olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada tavuk intestinal sisteminden izole edilen *Lactobacillus fermentum* ve *Lactobacillus salivarius* suşlarının otoagregasyon yetenekleri incelenmiş, *L. salivarius* suşunun otoagregasyon yeteneğinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Hutari ve ark. 2011). Elde edilen sonuçlar agregasyon yeteneğinin türe ve suşa göre değişken olduğunu göstermektedir. Yine elde edilen sonuçlar suşların agregasyon yeteneğinde yüksek EPS üretiminin yanında başka faktörlerin de etkili olduğunu düşünülmektedir. Probiyotik bakterilerin sağlığa yararlı etkilerini gösterebilmeleri için agregasyon ile yeterli sayıya gelebilmeleri gerekmektedir.

Probiyotik bakterilerin koagregasyon yeteneği patojen bakterilerin kolonizasyonunu engelleyici bir bariyer görevi görmektedir. Aynı zamanda probiyotik bakteriler bu alanda yaşarken ürettikleri antimikrobiyal metabolitlerle patojen mikroorganizmaların gelişmesini engelleyerek bu etkiyi artırmaktadırlar. Yine EPS üretimi yüksek olan suşların *E. coli* ATCC 11229 ile *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 suşlarıyla koagregasyon denemeleri yapılmıştır. *Lactobacillus* suşları ile *E. coli* ATCC 11229' un % koagregasyonu değerlendirildiğinde en yüksek % koagregasyon *L. acidophilus* BAZ36 (%28,3) suşunda bulunmuş, en düşük koagregasyon ise *L. acidophilus* BAZ43 (%1,5) suşunda gözlenmiştir. *Salmonella enteritidis* ATCC 13076'm % koagregasyonu değerlendirildiğinde ise en yüksek % koagregasyon *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32 (%25,0) suşunda bulunmuş olup, en düşük % koagregasyon *L. acidophilus* BAZ43 (%1,0) suşunda tespit edilmiştir.

Hutari ve arkadaşlarının 2011 yılında tavuk intestinal sisteminden izole ettikleri *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* suşu ile *Salmonella* türleri arasında % 13,8 koagregasyon gözlenmiştir.

Koagregasyonda en önemli özellik hücre yüzeyinin hidrofobikliği ve intestinal mukoza hücrelerine yapışmasıdır (Handley ve ark., 1987). Van Coillie ve ark., (2007) *Lactobacillus crispatus* türünün hidrofobikliği yüksek olduğu için koagregasyon yeteneğinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Jin ve ark.,(1996), Ehrmann ve ark., (2002) ve Van Coillie ve ark., (2007) tavuk bağırsağından izole ettikleri *Lactobacillus* suşlarının *Salmonella* ve *E. coli* türleri ile koagregasyon yeteneklerinin olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde türe ve suşa göre koagregasyon yeteneği değişkenlik gösterebilmektedir.

Sabır ve arkadaşları (2010) yılında kefirde izole ettikleri *Lactobacillus* spp. suşlarının *E. coli* ATCC 11229 suşuyla koagregasyonu değerlendirildiğinde % 18-80 oranında tespit etmişlerdir. Bu çalışmada genel olarak çalışılan suşların *E. coli* ile koagregasyon oranı benzer yada daha az olarak bulunmuştur. Bunun nedeninin de, izolasyon kaynağının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışma sonucunda, *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* BAZ32 ve *L. acidophilus* BAZ29 suşlarının EPS üretim kapasiteleri, asit dirençlilikleri ve safra toleranslarının diğer suşlara göre yüksek olması nedeniyle mide-bağırsak yolunda canlılıklarını koruyarak, bağırsaklara ulaşacakları düşünülmektedir. Ayrıca, üretmiş oldukları EPS ve gösterdikleri otoagregasyon ve koagregasyon yetenekleri aracılığıyla epitel yüzeylere daha kolay kolonize olup, patojenler üzerindeki inhibisyon etkileri sayesinde, epitel yüzeyinde *E. coli* ve *Salmonella*' lar gibi patojen mikroorganizmalar için biyolojik bir bariyer oluşturabilecekleri düşünülmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, *Lactobacillus* suşlarının bazı Gram-pozitif ve Gram-negatif patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdikleri, yüksek oranda EPS ürettikleri, mide-bağırsak sistemindeki zor şartlara dayanıklılık gösterdikleri ve kolonize olabilmelerinden dolayı yeni potansiyel tavuklar için probiyotik suş olarak aday olabilecekleri düşünülmüştür.

Özellikle probiyotik olarak üstün niteliklere sahip suşların diğer bazı probiyotik özelliklerinin belirlenerek (hidrofobisite, epitelyum yüzeye yapışma, kolesterol giderimi gibi) sonra yapılacak çalışmalarla tavukların bu probiyotik suş ve/veya suşlarla beslenerek tavuk probiyotiklerine alternatif olup olamayacakları değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

Abdulrahim, S. M., Haddadin, M. S. Y., Hashlamoun, E. A. R., Robinson, R. K., “The influence of *Lactobacillus acidophilus* and bacitracin on layer performance of broiler chickens and cholesterol content of plasma and egg yolk”. *Brit. Poult. Sci.*, 37, 341–346 (1996).

Amit-Romach, E., Sklan, D., Uni, Z., “Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers”, *Poultry Science* 83, 1093–1098 (2004).

Ammor, S., Tauveron, G., Dofour, E., Chevallier, I., “Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1. Screening and characterization of the antibacterial compounds”, *Food Control*, 17: 454-461 (2006).

Angelakis, E., Raoult, D., “The increase of *Lactobacillus* species in the gut flora of newborn broiler chicks and ducks is associated with weight gain”, *PLoS One*, 5: 10463-10463 (2010).

Apajalahti, J., Kettunen, A., Graham, H., “Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken”, *World's Poultry Science Journal*, 60: 223–232 (2004).

Aroutcheva, A., Gariti, D., Simon, M., Shott, S., Faro, J., Simoes, J. A., Gurguis, A. and Faro, S., “Defense factors of vaginal *Lactobacilli*”, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 185: 375-379 (2001).

Arques, J. L., Rodriguez, E., Gaya, P., Medina, M., Guamis, B., Nunez, M., “Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of highpressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria”, *J. Appl. Microbiol.* 98: 254-260 (2005).

Bilal, T., Kutay, C., Özpınar, H., Eseceli, H., Abaş, İ., “Broylerlerde Broilact Kullanımının Besi Performansı Üzerine Etkileri”. s472-479. VİV. *Poultry Yutav'99 Uluslararası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı 3-6 Haziran Bildiriler Kitabı*, İstanbul (1999).

Billoo, A. G., Memon, M. A., Khaskheli, S. A., Murtaza, G., Iqbal, K., Shekhani, M. S. ve Siddiqi, A. Q., “Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhoea”, *World Journal of Gastroenterology*, 12: 4557-4560 (2006).

Bouzar, F., Cerning, J. ve Desmazeaud, M., “Exploysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants”, *J. Dairy Sci.*, 79: 205-211 (1996).

Bozkurt, M., Küçükyılmaz, K., Çatlı, A.U., Çınar, M., “The Effect Of Dietary Supplementation Of Prebiotic, Probiotic And Organic Acid, Either Alone Or

Combined, On Performance And Carcass Characteristics.” *WPSA 15th European Symp.on Poultry Nutrition*, Hungary 25-29 September, 288-290 (2005).

Böke, H., “*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* türüne ait susların bazı probiyotik özelliklerinin belirlenmesi ve tutuklamanın bu özellikler üzerine etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara*, 4-52 (2005).

Brashears, M. M., Jaroni, D., Trimble, J., “Isolation, selection, and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle”, *J Food Prot*; 66:355–63 (2003).

Burns, P., Vinderola, G., Binetti, A., Quiberoni, A., De Los Reyes-Gavila’n, C.G., Reinheimer, J., “Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli”, *International Dairy Journal*, 18: 377–385 (2008).

Calabia, B. P., Tokiwa, Y., “Production of D-lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice and sugar beet juice by *Lactobacillus delbrueckii*”. *Biotechnol Lett* 29: 1329–1332 (2007).

Campos, C. A., Rodriguez, O., Calo-Mata, P., Prado, M., Barros-Velazquez, J., “Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*)”, *Food Res. Int.*, 39: 356-364 (2006).

Carter, A. J., Adams, M. R., Woodward, M. J., La Ragione, R. M., “Control strategies for *Salmonella* colonization of poultry: the probiotic perspective”, *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 5: 103–115 (2009).

Cerning, J., Bouillanne, C., London, M. ve Desmazeaud, M., “Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria”, *J. Dairy Sci.*, 75: 692-699 (1992).

Chabot, S., Yu, H., de Léséleuc, L., Cloutier, D., van Calsteren, M.R., Lessard, M., Roy, D., Lacroix, M., Oth, D., “Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW- 9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-gamma in mouse splenocytes”, *Lait*, 81:683–697 (2001).

Chambers, J. R., Gong, J., “The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens”, *Food Research International*, 44: 3149–3159 (2011).

Chaveerach, P., Lipman L.J.A., Van Knapen, F., “Antagonistic activities of several bacteria on in vitro growth of 10 strains of *Campylobacter jejuni/coli*”, *International Journal of food Microbiology*, 90: 43-50 (2004).

Chen, X., Fruehauf, J., Goldsmith, J.D., Xu, H., Katchar, K.K., Koon, H.W., Zhao, D., Kokkotou, E.G. ve ark., “*Saccharomyces boulardii* Inhibits EGF Receptor

Signaling and Intestinal Tumor Growth in Apcmin Mice”, *Gastroenterology*, 137 (3) (2009).

Chung, H.S., Kim, Y.B., Chun, S.L., Ji, G.E., “Screening and selection of acid and bile resistant *Bifidobacteria*”, *Int. J. Food Microbiol.*, 47: 25-32 (1999).

Clinical and Laboratory Standards Institute, “Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21st Informational Supplement”, *CLSI*, S21 M100-S21, Vol. 31 No. 1 (2011).

Collado, M.C., Meriluoto, J., Salminen, S., “Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: in vitro evaluation of different methods”, *J. Microbiol Methods*, 71:71-74 (2007a).

Collado, M. C., Surono, I., Meriluoto, J., Salminen, S., “Indigenous lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens”, *J. Food Sci.*, 72:89–93 (2007b).

Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S., “Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains”, *Eur. Food Res. Technol.*, 226:1065–1073 (2008).

Collins, E. B., Aramaki, K., “Production of Hydrogen Peroxide by *Lactobacillus acidophilus*”, *J. Dairy Sci.*, 63, 353–357 (1980).

Coşkun, Ş., Aslım B., Yüksekdağ Z.N., “Effect of two strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on nitric oxide generation and antioxidant status of rat small intestine” *Med Chem Res.* 19:1082–1091 (2010).

Çağlar, E., Kargul B. and Tanboğa I., “Bacteriotherapy and probiotics role on oral health” *Oral Dis.*, 11: 131-137 (2005).

Çakır, İ., Karahan, A. G. ve Çakmakçı, M. L., “Probiyotikler ve etki mekanizmaları”. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 6 (12); 15-19 (2002).

Çakır, İ., “*Lactobacillus* ve *Bifidobacter*ler’de bazı probiyotik özelliklerin incelenmesi”, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 4-7 (2003).

Çetin, E.T., “Endüstriyel Mikrobiyoloji”, *İstanbul Tıp Fak. Vakfı- Bayda Yayını*, 1. Baskı (1983).

Danielsen, M., Wind A., “Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents” *Internat. J. Food Microbiol.* 82, 1–11 (2003).

Dawson, K. A., “Use Of Probiotics in Poultry Feed”, *Multi-State Poultry Feeding & Nutrition Conference. Alltech Biosciences Center.* 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, KY 40536, USA (2001).

- Delbes-Paus, C., Dorchies, G., Chaabna, Z., Callon, C., Montel, M., “Contribution of hydrogen peroxide to the inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus garvieae* in interaction with raw milk microbial community”, *Food Microbiology* 27: 924-932 (2010).
- Delgado, S., O’Sullivan, E., Fitzgerald G., Mayo B.: Subtractive screening for probiotic properties of *Lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. *J.Food Sci.* 72, 310–315 (2007).
- Del Piano, M., Morelli, L., Strozzi, G. P., Allesina, S., Barba, M., & Deida, F. “Probiotics: from research to consumer”. *Digestive and Liver Disease*, 38, 248-255 (2006).
- Demain, A. L., “Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 455-463 (1999).
- De Man, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E., “A medium for the cultivation of lactobacilli”, *J. Bacteriol.*, 23: 130 (1960).
- Demirci, M., Ve Gündüz, H., "Süt Teknolojisi El Kitabı", *Hasad Yayıncılık*, Ankara, 184 (1994).
- De Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. “*Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract”. *International Dairy Journal*, 16, 1018-1028 (2006).
- De Vuyst, L., De Vin, F., Vanigelgem, F., Degeest, B., “Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria”, *Int. Dairy J.*, 11:687–707 (2001).
- Dhanani A. S., Gaudana S. B., Bagch T., “The ability of *Lactobacillus adhesin* EF-Tu to interfere with pathogen adhesion” *Eur Food Res Technol* 232, 5:777–785 (2011).
- Ding, Y., Karie, O., Labbe, J., Palcic, M.M., Ernat, B. and Hindsgaul, O., „Synthesis and biological activity of oligosaccharide libraries“, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 376:261-269 (1995).
- Doron S, Snyderman DR, Gorbach SL *Lactobacillus* GG: bacteriology and clinical applications. *Gastroenterol Clin North Am.*, 34: 483–498, ix (2005).
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Peters, P.A., Smith, F., “Colorimetric method for determination of sugars and related substances”, *Anal. Chem.*, 28: 350-356 (1956).
- Duc, L. H., Hong, H. A., Barbosa, T. M., Henriques, A. O., & Cutting, S. M. “Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use”, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2161-2171 (2004).

Ehrmann M.A., Kurzak P., Bauer J., Vogel R.F., “Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry”. *J. Appl. Microbiol.*, 92: 966-975 (2002).

Erbaş, M., Uslu, M.K., Erbaş, M.O. & Certel, M., “Effects of fermentation and storage on the organic and fatty acid contents of tarhana, a Turkish fermented cereal food”. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 294–301 (2006).

Erdoğan Z., “Broyler Rasyonlarında Antibiyotik Ve Probiyotik Kullanılması.” *Lalahan Hay. Araştır. Derg.* 39 (2)57-69 (1999).

Eren, M., Deniz, G., Biricik, H., Gezen, Ş, Türkmen, İ., Yavuz, H. M., “Broyler yemlerine zinc, bacitracin, probiyotik ve mannan oligosakkaritleri katkısının besi performansı üzerine etkileri”. *Uludağ Üniv. Vet. Fak. Derg.* 18(3):73-84 (1999).

Erkkilä, S., Petaja, E., “Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use”, *Meat Sci.*, 55: 297-300 (2000).

FAO/WHO, “Probiotics in food” *FAO Food and Nutrition Paper* 85, Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada. (46) (30 Nisan – 1 Mayıs 2002).

FAO/WHO, “Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation”, *FAO Food Nutr. Pap.* (2006).

Frengova, G.I.; Simova, E.D.; Beshkova, D.M., Simov, Z.I., “Production and monomer composition of exopolysaccharides by yogurt starter cultures”, *Canadian J. Microbiol.*, 46:1123-1127 (2000).

Fukuda, K., Shi, T., Nagami, K., Leo, F., Nakamura, T., Yasuda, K., Senda, A., Motoshima, H., Urashima, T., “Effects of carbohydrate source on physicochemical properties of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* TDS030603 in a chemically defined medium”, *Carbohydrate Polymers*, 79: 1040–1045 (2010).

Fuller, R., “Ecological studies on the *Lactobacillus flora* associated with the crop epithelium on the fowl”. *J. Appl. Bacteriol.*, 36, 131-139 (1973).

Garriga, M., Pascual, M., Monford, J.M., Hugas, M., “Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts”, *Journal of Applied Microbiology*, 84: 125-132 (1998).

Gbassi, G.K., Vandamme, T., Yolou, F.S., Marchioni, E., “In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model”, *International Dairy Journal*, 21: 97-102 (2011).

Geboes, K., Geboes, K. P., & Maleux, G. “Vascular anatomy of the gastrointestinal Tract”. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 15, 1-14 (2001).

Gilliland, S. E., “Enzymatic determination of residual hydrogen peroxide in milk”, *J. Dairy. Sci.*, 52: 321-324 (1969).

Gong, J., Forster, R.J., Yu, H., Chambers, J.R., Sabour, P.M., Wheatcroft, R. ve ark. “Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen”, *FEMS Microbiology Letters*, 208: 1–7 (2002a).

Gong J., Forster R.J., Yu H., Chambers J.R., Wheatcroft R., Sabour P.M. “Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum”, *FEMS Microbiology Ecology*, 41: 171–179 (2002b).

Gong J., Si W., Forster R.J., Huang R., Yu H., Yin Y., “16S rDNA-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: From crops to ceca”, *FEMS Microbiology Ecology*, 59: 147–157 (2007).

Gonzalez L., Sandoval H., Sacristan N., Castro J.M., Fresno J.M., Tornadijo M.E., “Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity”, *Food Control*, 18: 716-722 (2007).

Guan, L.L., Hagen, K.E., Tannock, G.W., Korver, D.R., Fasenko, G.M., Allison, G.E. “Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis”, *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6750–6757 (2003).

Halkman, A.K., “Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları”, *Başak Matbaacılık Ltd. Şti.*, Ankara, 243-244, 246, 247, 250, 289, 261, 320 (2005).

Handley, P. S., D. W. S. Harty, J. E. Wyatt, C. R. Brown, J. P. Doran, and A. C. C. Gibbs. “A comparison of the adhesion, co-aggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*” *J. Gen. Microbiol.* 133:3207–3217 (1987).

Heravi R. M., Kermanshahi H., Sankian M., Nasirsi M. R., Moussavi A. H., Nasiraii L. R. and Varasteh A. R., “Screening of lactobacilli bacteria isolated from gastrointestinal tract of broiler chickens for their use as probiotic” *African Journal of Microbiology Research* 5(14), 1858-1868, 18 (2011).

<http://www.sciencephoto.com/media/113107/enlarge>

Huang, Y., Adams, M. C., “In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy *Propionibacteria*” , *Int. J. Food Microbiol.*, 91: 253-260 (2004).

Hutari A., Jaseem W. S., Hamid A. A., Yusoff W. M. W., “Screening of *Lactobacillus* Strains Against *Salmonella* Both Isolated from Malaysian Free-Range Chicken Intestine for Use as Probiotic” *Sains Malaysiana* 40(10) 1115–1122 (2011).

Hwanhlem, N., Watthanasakphuban, N., Riebroy, S., Benjakul, S., H-Kittikun, A., Maneerat, S., “Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria”, *Int. J. Food Sci. and Technol.*, 45: 594-601 (2010).

Jaroni, D., Brashears, M., “Production of Hydrogen Peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* as Influenced by Media Used for Propagation of Cells”, *Journal Of Food Science* Vol. 65, No. 6 (2000).

Jin, L. Z., Y. W. Ho, N. Abdullah, M. A. Ali, and S. Jalaludin., “Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken”, *Lett. Appl. Microbiol.* 23:67–71 (1996).

Jones, F. T., “Report on: Effect of Primalac on *Salmonella* counts in processed broilers”. *North Carolina State Univ. Department of Poultry Sci.*, Raleigh, North Carolina (1991).

Jones, P. J., & Varady, K. A. “Are functional foods redefining nutritional requirements” *Applied Physiology Nutrition and Metabolism*, 33, 118-123 (2008).

Karademir G., Karademir B., “Yem katkı maddesi olarak kullanılan biyoteknolojik ürünler”. *Lalahan Hay. Araşt Enst Derg*, 43(1): 61- 74 (2003).

Karahan, A., G.; Çakmakçı, M., L.,. “Probiyotikler ve Etki Mekanizmaları”. *Gıda Dergisi*, 6, 12, 15-19 (2002).

Karimi Torshizi, M.A., Moghaddam, A.R., Rahimi, Sh, Mojjani, N., “Assessing the effect of administering probiotics in water or as a feed supplement on broiler performance and immune response”, *Brit. Poult. Sci.*, 5:178-184 (2010).

Kim, H.S., Park, H., Cho, I.Y., Paik, H.D., Park, E. “Dietary supplementation of probiotic *Bacillus polyfermenticus*, Bispan strain, modulates natural killer cell and Tcell subset populations and immunoglobulin g levels in human subjects”, *Journal of Medicinal Food*, 9: 321-327 (2006).

Kizerwetter-S'wida, M., Binek, M., “Bacterial microflora of the chicken embryos and newly hatched chicken”, *Journal of Animal and Feed Sciences*, 17: 224–232 (2008).

Koenen, M.E., Karmer, J., van der Hulst, R., Heres, L., Jeurissen, S.H., Boersma, W.J., “Immunomodulation by probiotic *Lactobacilli* in layer and meat-type chickens”. *British Poultry Science* 45, 355–366 (2004).

Kot, E., Furmanov, S. ve Bezkorovainy, A. “H₂O₂ production and oxidation of ferrous iron by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.” *J. Dairy Science*. 79 (5), 758-766 (1996).

Krueger, W.F., Bradley, J.W., Patterson, R.H., “The interaction of gentian violet and *Lactobacillus* organisms in diet of leghorn hens”. *Poultry Sci.*, 56: 1729 (1977).

Kum E., “Yumurta tavuğu karma yemlerine organik asit ve humat katılmasının performans ve yumurta kalitesine etkisi” Yüksek Lisans Tezi *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kayseri* (2006).

Lan, Y., Verstegen, M.W.A., Tamminga, S., Williams, B.A., “The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens”, *World's Poultry Science Journal*, 61: 95–104 (2005).

Larsen, G.J., Rolow, A., Nelson, C., The effect of organic acids on *Salmonella* contamination originating from mouse fecal pellets. *Poultry Sci.*, 72, 1797-1799 (1993).

Leroy, F. & De Vuyst, L. “Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation and industry” *Trends in Food Science and Technology*, 15, 67–78 (2004).

Lin WH, Hwang CF, Chen LW, Tsen HY. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiol*; 23:74–81 (2006).

Lin W-H, Yu B, Jang S-H, Tsen H-Y. “Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry”. *Anaerobe* 13:10, 7-13 (2007).

Ljungh, A., Wadström, T., “*Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics”, *Caister Academic Press.*, ISBN 978-1-904455-41-7 (2009).

Mack, D. R., Michail, S., Wei, S., McDougall, L., & Hollingsworth, M. A. “Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression”. *American Journal of Physiology*, 276, 941-950 (1999).

Madureira, A. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. “Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract”. *International Dairy Journal*, 15, 921-927 (2005).

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., “Comparative genomics of the lactic acid bacteria”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103 (42): 15611–15616 (2006).

Makino, S., Ikegami, S., Kano, H., Sashihara, T., Sugano, H., Horiuchi, H., Saito, T., Oda, M., “Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1”, *J. Dairy Sci.*, 89:2873–2881 (2006).

Mangell, P., Nejdfor, P., Wang, M., Ahrne, S., Westrom, B., Thorlacius, H., "Lactobacillus plantarum 299v inhibits Escherichia coli induced intestinal permeability". *Digestive Diseases and Sciences*, 47, 511-516 (2002).

Mastromarino, P., Brigidi, P., Macchia, S., Maggi, L., Pirovano, F., Trinchieri, V., Conte, U., Matteuzzi, D., "Characterization and selection of vaginal Lactobacillus strains for the preparation of vaginal tablets", *J. Appl. Microbiol.*, 93: 884-893 (2002).

Menconi, A., Wolfenden, A.D., Shivaramaiah, S., Terraes, J.C., Urbano, T., Kuttel, J., Kremer, C., Hargis, B.M., Tellez, G., "Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of Salmonella enterica serovar Heidelberg in neonatal broiler chickens and turkey poults", *Poult. Sci.*, 90:561-565 (2011).

Messaoudi, S., Kergourlay, G., Rossero, A., Ferchichi, M., Prévost, H., Drider, D., Manai, M., Dousset, X., "Identification of lactobacilli residing in chicken ceca with antagonism against Campylobacter", *International Microbiology*, 14:103-110 (2011).

Mikelsaar, M., Zilmer, M., "Lactobacillus fermentum ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic". *Microbial Ecology in Health and Disease* 21, 1–27 (2009)

Minelli, E.B., Benini, A., Marzotto, M., Sbarbati, A., Ruzzenente, O., Ferrario, R., Hendriks, H. Ve ark., "Assessment of novel probiotic Lactobacillus casei strains for the production of functional dairy foods", *Int. Dairy J.*, 14: 723-736 (2004).

Mitsuoka, T., "Research in intestinal flora and functional foods", *Journal of International Microbiology* 15, 57–89 (2002).

Modler H. W., Mckellar R, Yaguchi, M., "Bifidobacteria and bifidogenic factors", *Can. Inst. Food Sci. Technol. Journal*, 23, 29-41 (1990).

Mohan, B., Kadirvel, R., Bhaskaran, M., Natarajan, A., "Effect of probiotic supplementation on serum/ yolk cholesterol and egg shell thickness in layers" *British Poultry Sci.*,36(5): 799-803 (1995).

Montzouris, K.C., Tsirtsikos, P., Kalamara, E., Nitsch, S., Schatzmayr, G., Fegeros, K., "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 (2007).

Morelli, L., "In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality", *Int. Dairy J.*, 17: 1278-1283 (2007).

Mozzi, F., Vaningelgem, F., Hebert, E., Van der Meulen, R., Foulquie Moreno, M.R., Font de Valdez, G., De Vuyst, L., "Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers", *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 4431-4435 (2006).

Mumcu, Z. N., “Kefirden izole edilen bazı laktik asit bakterilerinin metabolik, antimikrobiyal ve plamid DNA’ larının incelenmesi”. Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara (1997).

Muñoz R., Moreno-Arribas M. V., Rivas B. D., “Chapter 8:Lactic Acid Bacteria” **Molecular Wine Microbiology**, 191-226 (2011).

Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A., Maneerat, “Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract”, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 25: 1337-1345 (2009).

Nahashon, S.N., Nakaue, H.S., Mirosh, L.W., Effect Of Direct-Fed Microbials On Nutrient Retention And Parameters Of Single Comb White Leghorn Pullets. **Poultry Sci.**, 72 (2): 87 (1993).

Nahashon, S.N., Nakaue, H.S., Mirosh, L.W., “Production variables and nutrient retention in single comb white leghorn laying pullets fed diets supplemented with direct-fedmicrobials”. **Poultry Science** 73, 1699-1711 (1994).

Na-Kyoung, L., Yun,C., Kim,S., Chang, H., Kang, C., Paik, H., “Screening of Lactobacilli Derived from Chicken Feces and Partial Characterization of *Lactobacillus acidophilus* A12 as Animal Probiotics”, **J. Microbiol. Biotechnol.** 18(2): 338–342 (2008).

Nikolic, M., Terzic-Vidojevic, A., Jovcic, B., Begovic, J., Golic, N., Topisirovic, L., “Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese”, **Int. J. Food Microbiol.**, 122: 162-170 (2008).

Nir, I., ve Şenkoylü, N., “Kanatlılar için Sindirimi Destekleyen Yem Katkı Maddeleri”. **ISBN 975-93691-0-9**. Tekirdağ (2000).

Ocana, V.S., de Ruiz Holgado, A.A., Nader-Macias, M.E., “Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina”, **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 23: 87-92 (1999).

Ocana, V.S., Nader-Macias, M.E., “Vaginal lactobacilli: selfand co-aggregation ability”, **Br. J. Biomed. Sci.**, 59:183–190 (2002).

Olah , P.A., Sherwood, J.S., Elijah, L.M., Dockter, M.R., Doetkott, C., Miller, Z., Loggue, C.M., “Comparison of antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Campylobacter* isolated from Turkeys in the Midwest USA”, **Food Microbiol.**, 21: 779-789 (2004).

Oshiro M, Shinto H, Tashiro Y, Miwa N, Sekiguchi T, Okamoto M, Ishizaki A, Sonomoto K (2009) Kinetic modeling and sensitivity analysis of xylose metabolism in *Lactococcus lactis* IO-1. **J. Biosci Bioeng** 108:376–384 (2009).

Otero, M., Nader-Macias, M.E., "Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle", ***Anim. Reprod. Sci.*** 96: 35-46 (2006).

Pan, D., Zeng, X., Yan, T., "Characterization of *Lactobacillus fermentum* SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects.", ***Journal of the Science of Food and Agriculture*** 91, 3: 512-518 (2011).

Park, J.-H., Y. Lee, E. Moon, S.-H. Seok, M.-W. Baek, H.-Y. Lee, D.-J. Kim, C.-H. Kim, and J.-H. Park.. "Safety assessment of *Lactobacillus fermentum* PL9005, a potential probiotic lactic acid bacterium, in mice". ***J. Microbiol. Biotechnol.*** 15: 603-608 (2005).

Park, S.C., Hwang M.H., Kim Y.H., Kim J.C., Song J.C., Lee K.W., Jeong K.S., Rhee M.H., Kim K.S. and Kim T.W., "Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources" ***World Journal of Microbiology & Biotechnology*** 22:35-37 (2006).

Park, Y. H., J. G. Kim, Y. W. Shin, and S. H. Kim., "Effects of dietary inclusion of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats", ***J. Microbiol. Biotechnol.*** 17: 655-662 (2007).

Pascual, M., Hugas, M., Badiola, J.I., Monfort, J.M., Garriga, M., "*Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens", ***Applied and Environmental Microbiology***, 65: 4981–4986 (1999).

Piwat S., Teanpaisan R., Dahle'n G., Thitasomakul S., William Ian Douglas C., "Acid production and growth by oral *Lactobacillus* species in vitro", ***Journal of Investigative and Clinical Dentistry*** 2, 1–6 (2011).

Polat, C., Özdüven, M.L. Karma Yem Sanayi. T.Ü. ***Tekirdag Ziraat Fakültesi Ders Kitabı***, 101 Tekirdağ (2004).

Reed, K. K., & Wickham, R. "Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro", ***Seminars in Oncology Nursing***, 25, 314 (2009).

Rehman, H., Rosenkranz, C., Böhm, J., Zentek, J. "Dietary inulin affects the morphology but not the sodium dependent glucose and glutamine transport in the jejunum of broilers", ***Poultry Science***, 86, 118–122 (2007).

Reinheimer, J.A., Demkow, M.R., Condioti, M.C., "Inhibition of Coliform bacteria by lactic cultures", ***The Aust. J. Dairy Technol.***, 5-9 (1990).

Reniero, R., Coconcelli, P., Bottazzi, V., Morelli, L., "High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor", ***J Gen Microbiol.***, 138:763–768 (1992).

Reque, F.E., Pandey, A., Franco, G.S., Soccol, R.C., “Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* LBP for use as probiotic in chickens”, *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 303-307 (2000).

Rolfe RD: “The role of Probiotic Cultures in The Control of Gastrointestinal helth”, *J.Nutrition*, 130: 396-402 (2000).

Roos, N. M., Katan M. B., “Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis a review of papers published between 1988 and 1998”. *Am J Clin Nutr.* 71: 405 (2000).

Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., Reyes-Gavilan, C.G. ve Salminen, S., “Exsopolisaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to Human intestinal Mucus”, *J. Food. Protect.*, 69(8): 2011-2015 (2006).

Sabır, F., Beyatlı Y., Çökmüş C., Darılmaz-Önal D., “Assessment of Potential Probiotic Properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. Strains Isolated from Kefir” *Journal of Food Science*, Vol. 75, No: 9 (2010).

Salminen, S., Nybom, S., Meriluoto, J., Collado, M.C., Vesterlund, S., ve El-Nezami, H., “Interaction of probiotics and pathogens - benefits to human health?”, *Current Opinion in Biotechnology*, 21:157–167 (2010).

Santini, C., Baffoni L, Gaggia F., Granata M., Gasbarri R., Gioia D. D., Biavati B. “Characterization of probiotic strains: An application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*”, *International Journal of Food Microbiology* 141 98–S108 (2010).

Sarıca, Ş. “Kanatlı Hayvan Beslemede Probiyotik Kullanımı” *Hayvansal Üretim* 39-40: 105-112 (1999).

Schachtsiek, M., Hammes, W.P., Hertel, C., “Characterization of *Lactobacillus cornyformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:7078–7085 (2004).

Shah, N. P., “Functional cultures and health benefits. In Scientific and technological challenges in fermented milk”, book of abstracts, Sirmione, *Dairy Sci. Technol.*, 35-36 (2007).

Shihata, A. & Shah, N.P. “Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria”. *International Dairy Journal*, 12, 765–772 (2002).

Sönmez, N., Çakmakçı, M.L., Karahan, A.G., “Probiyotik Kullanımı ve Ülke Şartlarında Geliştirilmesi”, *Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Müdürlüğü*, Araştırma Projesi (yayınlanmamış), Ankara (1999).

Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch P. B., Ross, R. P., “Market potential for probiotics”. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 476-483 (2001).

Strompfová, V., Marcinčáková, M., Simonová, M., Gancarcčíková, S., Jonecová, Z., Sciranková, L., Koščová, J., Buleca, V., Čobanová, K., Lauková, A., *Enterococcus faecium* EK13 – an enterocin A-producing strain with probiotic character and its effect in piglets”, *Anaerobe* 12, 242–248 (2006).

Sullivan, Å. and C. E. Nord. “Probiotics and gastrointestinal disease”. *J. Intern. Med.* 257: 78-92 (2005).

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K., “Encapsulation of probiotic bacteria with alginate starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt”. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 47-55 (2000).

Surachon, P., Sukon, P., Chaveerach, P., Waewdee, P., Soikum, C., “Screening of lactic acid bacteria isolated from chicken ceca for in vitro growth inhibition of *Salmonella enteritica*, Serovar enteridis”, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10 (8): 939-944, ISSN: 1680-5593 (2011).

Şenköylü N., Arıcı M., Akyürek H., Koç F., “Probiyotiklerin farklı kaynaklardan üretimi ve broyler yemlerinde antibiyotik yerine kullanım olanakları”, *TÜBİTAK Projesi* (2002).

Taheri, H.R., Moravej, H., Tabandeh, F., Zaghari, M., Shivazad, M., “Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic”, *Poult. Sci.*, 88: 1586-1593 (2009a).

Taheri, H., Tabandeh, F., Moravej, H., Zaghari, M., Shivazad, M., Shariati, P., “Potential probiotic of *Lactobacillus johnsonii* LT171 for chicken nutrition”, *African Journal of Biotechnology*, 8: 21, 5833-5837 (2009b).

Tejedor-Junco, M.T., Afonso-Rodríguez, O., Martín-Barrasa, J.L., Gonzáles-Martín, M., “Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecium* isolated from poultry faeces”, *Research in Veterinary Science* 78, 33–38 (2005).

Tieking, M., Kaditzky, S., Ganzle, M.G., Vogel, R.F., “Biodiversity and potential for baking applications of glycosyltransferases in lactobacilli for use in sourdough fermentation”, 58–59. In L. de Vuyst (ed.), *Sourdough, from fundamentals to applications*. *Vrije Universiteit Brussel*, Brussels, Belgium (2003).

Tieking, M., ve Ganzle, M.G., “Exopolysaccharides from cereal-associated Lactobacilli”, *Trends Food Sci. Technol.*, 16:79–84, (2005).

Torino, M. I.; Taranto, M. P.; Sesma, F. and Font de Valdez, G., “Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* 15807 in response to environmental pH”, *J. Appl. Microbiol.*, 91:846-852 (2001).

Van Coillie, E., Goris, J., Cleenwerck, I., Grijspeerdt, K., Botteldoorn, N., Van Immerseel, F., De Buck, J., Vancanneyt, M., Swings, J., Herman, L., Heyndrickx, M., “Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella enteritidis*”, *Journal of Applied Microbiology*, 102: 1095–1106 (2007).

Vasiljevic, T., Shah, N.P., “Probiotics-from Metchnikoff to bioactives”, *Int. Dairy J.*, 18: 714-728 (2008).

Vicente, J., Wolfenden, A., Torres-Rodriguez, A., Higgins, S., Tellez, G., Hargis, B., “Effect of a *Lactobacillus* species-based probiotic and dietary lactose prebiotic on turkey poult performance with or without *Salmonella enteritidis* challenge”, *Journal of Applied Poultry Research*, 16: 361–364 (2007).

Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A., “Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative ‘in vitro’ study of probiotic characteristics and biological barrier resistance”, *Food Research International*, 36: 895-904 (2003).

Wang, L., “Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*”, *Bioresour. Technol.* 101: 7895–7901 (2010).

Wang, C., Lin, P., Ng, C., Shyu, Y., “Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage”, *Anaerobe* 16, 6: 578-585 (2010a).

Wang, Y., Ganzle, M.G., Schwab, C., “Exopolysaccharide synthesized by *Lactobacillus reuteri* decreases the ability of enterotoxigenic *Escherichia coli* to bind to porcine erythrocytes”, *Applied And Environmental Microbiology*, 76, 14: 4863–4866 (2010b).

Welman, A.D., Maddox, S., “Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges”, *Trends Biotechnol.*, 21: 269-274 (2003).

Willis, W.L., Reid, L., “Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence”, *Poultry Science*, 87: 606–611 (2008).

Yeo, J., Kim, K., “Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic, or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks”. *Poultry Sci.* 76: 381-385 (1997).

Yıldırım, A., Karma Yemlere Probiyotik, Prebiyotik Ve Organik Asit ilavesinin Etlik Piliçlerin Performans, İnce Barsak Ve Mikrobiyolojik Özelliklerine Etkileri. Doktora Tezi. *Zootekni Anabilimdalı*, Samsun (2002).

Yurtalan, S., Ates, M., “Probiyotikler”. *Hayvancılık Aras. Derg.*, 5(1-2):99-106. (1995).

Yüksekdağ Z.N., Beyatlı Y., Aslım B., “Metabolic activities of *Lactobacillus* spp. strains isolated from kefir” *Nahrung/Food* 48:3, 218– 220 (2004).

Xie, N., Zhou, T., Li, B., “Kefir yeasts enhance probiotic potentials of *Lactobacillus paracasei* H9: The positive effects of coaggregation between the two strains”, ***Food Research International*** 45,1: 394-401 (2012).

Xu, H., Jeong, H.S., Lee, H.Y., Ahn, J., “Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains”, ***Lett. Appl. Microbiol.***, 49:434–442 (2009).

Zhang, G., Ma, L. ve Doyle, M. P., “Potential competitive exclusion bacteria from poultry inhibitory to *Campylobacter jejuni* and *Salmonella*”, ***Journal of Food Protection***, 70: 867–873 (2007a).

Zhang, G., Ma, L., Doyle, M.P. “*Salmonellae* reduction in poultry by competitive exclusion bacteria *Lactobacillus salivarius* and *Streptococcus cristatus*”, ***Journal of Food Protection***, 70: 874–878 (2007b).

Zhang, Q., Ren, J., Zhao, H., Zhao, M., Xu, J., Zhao, Q., “Influence of casein hydrolysates on the growth and lactic acid production of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*”, ***International Journal of Food Science and Technology***, 46: 1014–1020 (2011).

Zhu, X.Y., Zhong, T., Pandya, Y., Joerger, R.D., “16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens”, ***Applied and Environmental Microbiology***, 68: 124–137 (2002).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı- Adı : ŞAHİN Nur
Uyruğu : T.C.
Doğum yeri- tarihi : Çamlıdere- 1981
Medeni hali : Bekar
Tel : 0 (533) 367 41 75
E-mail : nursahin06@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	2005
Lise	Şentepe Lisesi	1999

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2007	İçişleri Bakanlığı	Memur

Yabancı Dil

İngilizce