



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**TAVUK KÖKENLİ *ENTEROCOCCUS FAECIUM* VE
LACTOBACILLUS TÜRLERİNİN PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yağmur KOÇAK

**Samsun
Ocak-2017**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**TAVUK KÖKENLİ *ENTEROCOCCUS FAECIUM* VE
LACTOBACILLUS TÜRLERİNİN PROBİYOTİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yağmur KOÇAK

**Danışman
Doç. Dr. Alper ÇİFTÇİ**

**Samsun
Ocak-2017**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yağmur KOÇAK tarafından Doç. Dr. Alper ÇİFTÇİ Danışmanlığında hazırlanan “Tavuk kökenli *Enterococcus faecium* ve *Lactobacillus* türlerinin probiyotik özelliklerinin araştırılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 19/01/2017 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Murat YILDIRIM
Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi ABD

Üye : Doç. Dr. Timur GÜLHAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi ABD

Üye : Doç. Dr. Alper ÇİFTÇİ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi ABD

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimin ve tez çalışmalarım süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen, tez konusunun seçilmesinde ve çalışmaların yürütülmesinde büyük katkısını gördüğüm tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Alper ÇİFTCİ'ye, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Oktay GENÇ, Doç. Dr. Timur GÜLHAN, Doç.Dr. Arzu FINDIK, Doç. Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŐ'a ve bilgisine danıştığım, desteğini esirgemeyen tüm meslektaşlarıma ve aileme destekleri için teşekkür ederim.

Bu çalışma, PYO.VET11904.16.016 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

TAVUK KÖKENLİ *ENTEROCOCCUS FAECIUM* VE *LACTOBACILLUS* TÜRLERİNİN PROBİYOTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu çalışmada potansiyel probiyotik bakterilerden olan *Lactobacillus* spp. ve *Enterococcus faecium*'un sağlıklı tavuklardan izolasyonu ve izole edilen bakterilerin probiyotik olarak kullanılma potansiyellerinin araştırılması amaçlandı.

Materyal ve metot: Çalışmada Samsun'da bulunan ticari bir kanatlı hayvan mezbahasında kesim aşamasında olan 50 adet tavuğa ait bağırsak incelendi. Bağırsak mukozalarından alınan örneklerden *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* bakterilerinin izolasyonu amacıyla selektif besi yerlerine ekim yapıldı. Şüpheli kolonilerin identifikasyonu PCR ile yapıldı. İzole edilen bakterilerin % 0,5-1,0 safra konsantrasyonlarına direnci için Safra Tolerans Testi gerçekleştirildi. İzolatların pH 3 ve pH 5'e direnç durumları pH Tolerans Testi ile belirlendi. İzolatların hidrofobisitetleri %0,03 Kongo Kırmızılı agar kullanılarak incelendi. İzolatların antibiyotik dirençlilikleri dokuz farklı antibiyotik diski kullanılarak Kirby Bauer Disk Difüzyon Testi ile belirlendi. İzolatların patojen *Escherichia coli* izolatına karşı antagonistik etkilerinin araştırılmasında Radyal Difüzyon yöntemi kullanıldı.

Bulgular: Örneklerden 20 adet *E. faecium* ve 9'u *L. acidophilus* olmak üzere 21 adet *Lactobacillus* spp. izole edildi. İzolatların tümünün % 0,5-1,0 safra konsantrasyonlarına, pH 3-5'e dirençli oldukları saptandı. İzolatların tümünün hidrofobik karakterde olduğu, ancak hiçbirisinin *E.coli*'ye karşı antagonistik etki göstermediği belirlendi. *E.faecium* izolatlarının 8 tanesi 8 antibiyotiğe karşı dirençli olarak değerlendirildi. *Lactobacillus* spp. izolatlarının 1 tanesinin 5 antibiyotiğe ve *L. acidophilus* izolatlarından da 1 tanesinin 7 antibiyotiğe dirençli olduğu belirlendi ve çoklu dirence sahip suşlar olarak değerlendirildi.

Sonuç: Çalışma sonucunda tüm izolatların hidrofobik özellikte olduğu, safra ve düşük pH'ya dirençli olduğu fakat hiçbirisinin *E.coli*'ye karşı test edilen koşullarda etkili olmadığı belirlendi. Elde edilen sonuçlar, *E. faecium*, *L. acidophilus* ve *Lactobacillus* spp. izolatlarından çoklu antibiyotik direnci gösterenlerin probiyotik olarak kullanılabilir özellikte olduğunu ve *in vivo* koşullarda etkinlik denemeleri yapılması gerekliliğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: tavuk; *Enterococcus faecium*; *Lactobacillus*; probiyotik

Yağmur KOÇAK, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Ocak - 2017

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PROBIOTIC PROPERTIES OF CHICKEN ORIGINATED *ENTEROCOCCUS FAECIUM* AND *LACTOBACILLUS* SPECIES

Aim: In this study, the isolation of *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus faecium* and the investigation of the potential use of isolated bacteria as probiotic were aimed.

Material and methods: In a study, 50 chicken intestines, which were taken from a commercial chicken slaughter house in Samsun region, were investigated. The samples were taken from intestinal mucosae and inoculated to the selective mediums for the isolation of *Lactobacillus* spp. and *E. faecium*. Suspected colonies were identified by PCR. The isolated bacteria were investigated for bile (0.5-1%) and pH (3-5) resistance by Bile and pH Tolerance tests, respectively. The hydrophobicity's of the isolates were tested by using 0.03% Congo Red Agar. The antibiotic resistances of the isolates were determined by Kirby Bauer Disc Diffusion Test with using 9 antibiotic discs. The Radial Diffusion Method was used for determining the antagonistic effects of the isolates against *Escherichia coli*.

Results: Twenty *E.faecium*, 21 *Lactobacillus* spp. (9 of them were *L. acidophilus*) were isolated from samples. All the isolets were found as resistant to tested bile and pH conditions. All the isolates were hydrophobic, but none of them had an antagonistic effect against *Escherichia coli*. Eight of *E.faecium* isolates were found as resistant to 8 antibiotics. One *Lactobacillus* spp. (other than *L. acidophilus*) and 1 *L. acidophilus* isolate were resistant to 5 and 7 antibiotics, respectively. These isolates were evaluated as multi-antibiotic resistant strains.

Conclusion: In conclusion, we detected that all the isolates were hydrophobic, resistant to bile and low pH conditions; but none of them had an antagonistic effect against *Escherichia coli* in tested conditions. These results indicated that the multi-antibiotic resistant strains of *E.faecium*, *L.acidophilus* and *Lactobacillus* spp. isolates had a potential of using as a probiotic and further *in vivo* efficiency studies had to be essential for these strains.

Keywords: poultry; *Enterococcus faecium*; *Lactobacillus*; probiotics

SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromol
AMC	: Amoksisilin/klavulanik asit
AMP	: Ampisilin
AX	: Amoksisilin
BEA	: Bile Esculin Agar
BHI	: Brain Heart Infüzyon
bp	: Baz çifti
dk	: Dakika
E	: Eritromisin
<i>E. faecium</i>	: <i>Enterococcus faecium</i>
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EX	: Enrofloksasin
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
HCl	: Hidroklorik asit
I	: Orta derecede duyarlı
L	: Linkomisin
<i>L. acidophilus</i>	: <i>Lactobacillus acidophilus</i> :
mM	: Milimol
MRS	: De Man, Rogosa ve Sharpemrs
N	: Neomisin
OT	: Oksitetrasiklin
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
R	: Dirençli
S	: Duyarlı
sn	: Saniye
spp	: Türleri
SXT	: Trimetoprim/sulfametaksazol
TSA	: Triptik soy agar
TSB	: Triptik soy broth

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	1
2.1. Tarihçe	1
2.2. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar	2
2.3. Probiyotik Mikroorganizmalarda Aranılan Özellikler	4
2.4. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları	5
2.5. Probiyotiklerin Güvenilirlikleri	6
2.6. Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliğinde Probiyotikler	7
3. MATERYAL VE METOT	10
3.1. Hayvan Materyali	10
3.2. Bakteriyolojik İzolasyon	10
3.3. Genotipik İdentifikasyon	11
3.4. İzolatların Safra Toleranslarının Belirlenmesi	13
3.5. İzolatların pH Toleranslarının Belirlenmesi	14
3.6. İzolatların Hidrofobisitelerinin Belirlenmesi	14
3.7. İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi	15
3.8. İzolatların <i>E.coli</i> 'ye Karşı <i>in vitro</i> Antagonistik Etkilerinin Belirlenmesi	15
4. BULGULAR	17
4.1. Bakteriyolojik İzolasyon	17
4.2. Genotipik İdentifikasyon	18
4.3. İzolatların Safra Toleranslarının Belirlenmesi	19
4.4. İzolatların pH Toleranslarının Belirlenmesi	23
4.5. İzolatların Hidrofobisitelerinin Belirlenmesi	26
4.6. İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi	26
4.7. İzolatların <i>E.coli</i> 'ye Karşı <i>in vitro</i> Antagonistik Etkilerinin Belirlenmesi	30
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR	42



1. GİRİŞ

Probiyotik terimi “canlı için” (Latince “pro” ve “bios”) anlamına gelmektedir. Güncel araştırmalar ve kullanım alanlarına bağlı olarak probiyotikler, “kalitatif ya da kantitatif olarak bağırsak mikroflorasını etkileyen veya immun sistemin durumunu değiştirerek yararlı etkilerini tetikleyen, insan ve hayvanlar tarafından tüketilen canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (Fuller, 2004). Probiyotikler hakkındaki ilk çalışma 19. yūzyılın sonlarında Rus bilim adamı Elie Metchnikoff tarafından yapılmıştır. Metchnikoff fermente sūt tüketimi ile uzun ōmūr arasında ilişki kurmuş, sūtte laktik asit bakterilerinin varlığını tespit etmiş ve bu bakterilerin probiyotik ōzellikte olduğunu bildirmiştir.

Prebiyotik terimi “kolon bakterilerinden birinin veya az bir kısmının çoğalması ve/veya aktivitesini etkileyerek yararlı bir etki oluşturan sindirilmeyen gıda maddesi” olarak tanımlanmıştır (Gibson ve Roberfroid, 1995). Prebiyotikler, sindirilmeyen gıda içerikleri olup, insan ve hayvan sağlığını olumlu yōnde etkileyen kolon bakterilerinin gelişmesini teşvik eden karbonhidratlardır.

Sinbiyotik tanımı ise prebiyotik ve prebiyotiklerin sinerjik etkisinden yola çıkararak yapılmış olup, probiyotik ve prebiyotikleri içeren katkı maddeleri olarak tanımlanmıştır (Gibson ve Roberfroid, 1995; Douglas ve Sanders, 2008).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Kanatlı probiyotiklerin tarihçesi incelendiği zaman probiyotik çalışmalarının yapılmaya başlaması ile ōncelikle kūmes hayvanlarına odaklanılmıştır. Kanatlı endūstrisi daima gastrointestinal sistemde meydana gelen patolojiler ve maksimum performans/gelişme oranı elde etmek ve antimikrobiyal tedaviye alternatif yōntemler geliştirilmesi ōzerine yoğunlaşmıştır. 1920’li yıllarda yararlı bakterilerin kullanımı ile ilgili çalışmalar başlamıştır (Beach ve Davis, 1925). Bu alışmalar doğrultusunda 1950’lerde tavuk ve hindilerin normal florası hakkındaki bilgiler geçersiz hale gelmiş ve florada *laktobasil* tūrleri ve anaerobik kokoid bakterilerin varlığı bildirilmiştir (Harrison ve Hansen, 1950; Smith, 1965). 1960’lı yıllarda germ-free ve gnobiyotik civciv ve tavuk kullanımının yaygınlaşması ile beraber araştırmalar saf bakteri kūltürleri ve patojenik bakterilerin etkilerinin araştırılmasına yōnelmiřtir. Bu alışmalar sonucunda

bazı bakterilerin gno biyotik kuşlardaki normal bakteriler ile birlikte patojenlere karşı mücadeledeki etkileri ortaya konmuştur (Morishita ve ark., 1971). Nurmi ve Rantala (1973) yetişkin tavuklardan alınan bağırsak içeriği süspansiyonunun dozlanarak civcivlere verilmesiyle *Salmonella* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlardan korunulabildiğini bildirmiştir. Bu bildirim sonrasında araştırmacılar saf kültür olarak uygulanabilen ve kolonize olabilen probiyotiklerin geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapmıştır. 1970 yılında Fuller, kanatlı hayvanların kursak epiteline yapışık bulunan laktobasilluslar üzerine araştırmalar yapmış ve laktobasillus ile diğer yararlı bakterilerin kanatlılara verilmesi sonrasında değişken sonuçlar elde etmiştir (Fuller, 1973; Fuller ve Brooker, 1974). 1970'lerin sonlarına kadar pet kuşlarının normal florası incelenmeye devam edilmiş ve çeşitli Gram pozitif koklar ile lactobacillus türlerinin varlığı ortaya konulmuştur (Dorrestein ve ark., 1985; Bangert ve ark., 1988). Bu tarihten günümüze kadar probiyotikler ve kombinasyonları üzerine bir çok çalışma yapılmış ve başta kanatlı hayvanlar için olmak üzere ticari probiyotik preparatları geliştirilmiştir.

2.2. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar

Laktik asit bakterileri probiyotik olarak en çok kullanılan mikroorganizmalar olup 6 gruba ayrılırlar (Tannock, 1997). Bunlar; *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Bifidobacterium*'dur. *Bacillus*, *Saccharomyces* ve *Aspergillus* türleri de laktik asit bakterileri dışında probiyotik olarak kullanılan diğer mikroorganizmalar arasında sayılabilir (Tablo 1).

Tablo 1. İnsan beslenmesinde ve hayvan yemi üretiminde kullanılan probiyotik mikroorganizmalar (Yalçın ve ark., 1996).

Bakteriler	
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobacillus cellebinius</i>
<i>Bacillus lentus</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
<i>Bacillus lincheniformis</i>	<i>Lactobacillus delbruekii</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>
<i>Bacteroides amylophilus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Bacteroides capillous</i>	<i>Lactobacillus reuterii</i>
<i>Bacteroides ruminicola</i>	<i>Leucanostoc mesenteroides</i>
<i>Bacteroides suis</i>	<i>Pediococcus acidilacticii</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Bifidobacterium bitidum</i>	<i>Probionibacterium freudenreichii</i>
<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Probionibacterium shermannii</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>Colostridium butyricum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Streptococcus lactis</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	
Mantarlar	
<i>Aspergillus niger</i>	
<i>Aspergillus oryzae</i>	
Mayalar	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Candida torulopsis</i>	

Laktobasiller fakültatif anaerobik bakteriler olup, pH 3.0'e kadar tolerans göstermektedir. Böylece bu bakteriler düşük mide pH'sında canlılıklarını koruyarak, bağırsak kanalına geçip etkilerini burada gerçekleştirirler. Duodenumda safra tuzlarından etkilenmezler. Ayrıca, pek çok *Lactobacillus* suşu 45-48°C gibi yüksek ısı ve basınca nispeten dayanıklı olduğundan yem yapım işlemleri sırasında ısı ve basınçtan

etkilenmeyerek canlılıklarını koruyabilir (Shanani ve Ayebo, 1980; Gilliland, 1984). Laktobasillerin klasik sınıflandırmaları fermentatif özelliklerine göre yapılmaktadır.

Bunlar;

1. Obligat homofermentatif laktobasiller: Embden-Meyerhof Parnas metabolik yolunu kullanarak heksozları sadece laktik asite fermente ederler. Örneğin; *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*.

2. Fakültatif heterofermentatif laktobasiller: Embden-Meyerhof Parnas metabolik yolunu kullanarak heksozları sadece laktik asite fermente ederken, bazı türler ise glikoz sınırlamasında laktik, asetik, formik asit ve CO₂ üretmektedir. Pentozları da fosfoketolaz yolunu kullanarak laktik ve asetik asite fermente ederler. Örneğin; *L. casei*, *L. plantarum*, *L. sake*.

3. Obligat heterofermentatif laktobasiller: Heksozları laktik, asetik asit, etanol ve CO₂'e, pentozları ise laktik ve asetik asite fermente ederler. Örneğin; *L. bifementas*, *L. brevis* ve *L. fermentum* (Kandler ve Weiss, 1986; Schleifer, 1987).

Enterokoklar, fakültatif anaerobik, 10°C ve 45°C'de, pH 9,6'da, % 6,5 NaCl'de % 40 safra tuzunda gelişebilen bakterilerdir. *E. faecium* ve *E. faecalis*, bağırsak hastalıklarındaki etkileri nedeniyle geçmişte probiyotik olarak kullanılmıştır. Bakteriyosin üretimi gibi özelliklere sahip olsalar da, patojenlere antimikrobiyel direnç aktarımına neden olabileceklerinden endişe duyulmaktadır. Bu bakterilerin ticari formları ilaç preparasyonları haline getirilmiştir (Mombelli ve Gismondo, 2000).

2.3. Probiyotik Mikroorganizmalarda Aranılan Özellikler

Probiyotiklerin bulunduğu konaktaki diğer mikroorganizmalara karşı güçlü etkileri olduğu ve konağa yararları olduğu kesin olarak kabul edilmiştir. Ancak probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmalarda bazı özelliklerin bulunması istenmektedir (Yıldırım ve Yıldırım, 2000; Yılsay ve Kurdal, 2000; Simmering ve Blaut, 2001; Ezema, 2013). Probiyotiklerde aranılan özelliklerden en önemlileri patojenik olmamaları, toksin üretmemeleri, güvenilir olmaları ve yan etki oluşturmamalarıdır. Ayrıca, stabil olmalıdırlar ve düşük pH ve safra tuzları gibi olumsuz çevre koşullarından etkilenmeden bağırsakta metabolize olmalıdırlar. Bağırsak hücrelerine tutunabilmeli ve kolonize olabilmelidirler. Karsinojenik olmamalı ve patojenik bakterilere antagonistik etki yapmalıdırlar. Konak spesifik olmalı ve konakta yararlı etkiler oluşturabilmelidirler. Antibiyotik kullanımına bağlı ortaya çıkabilen hastalıklarda

bağırsak florasını düzenlemek amacı ile antibiyotik kullanılabilirdiğinden antibiyotiklere dirençli olmaları tercih edilmektedir. Probiyotik üretiminde kullanılan suşlar aktarılabılır antibiyotik direnç genleri içermemelidirler. Canlı hücreler halinde ve tercihen fazla sayıda bulunmalı ve bağırsak ortamında canlı kalarak metabolize edilebilmelidirler. Ayrıca, üretim ve depolama şartlarına dirençli olmalı ve bu işlemler sırasında canlılığını ve aktivitesini koruyabilmelidir.

2.4. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları

Probiyotiklerin rasyona katılmaları sonucunda hayvanlarda canlı ağırlık kazanımlarında artış görüldüğü, yemden yararlanmanın iyileştiği, üretimin yükseldiği ve gastrointestinal hastalıkların azaldığı bildirilmiştir. Buna rağmen etki şekilleri konusunda halen tam bir fikir birliği sağlanamamıştır.

Probiyotik mikroorganizmalar *Escherichia coli* gibi bağırsak patojenleri için antagonistik etki oluştururlar. Probiyotik mikroorganizmaların çoğunluğu laktik, asetik ve formik asit gibi organik asitler üreterek bağırsak pH'sını düşürürler. Böylece Gram negatif patojen bakterilerin üremesini engelleyen bir ortam oluştururlar (Vanbelle ve ark., 1990). Ayrıca bu mikroorganizmalar ürettikleri hidrojen peroksit, organik asit, bakteriyosin gibi maddeler sayesinde antibakteriyel özellik gösterirler (Ouweland ve ark., 1999).

Probiyotikler, patojen bakterilerin çoğalmak için gereksinim duydukları besinleri tüketirler ve bu bakterilerin üremelerini inhibe ederler (kompetatif eksklüzyon). Probiyotik mikroorganizmalarda intestinal epitel hücrelere adezyonu sağlayan çeşitli yüzey determinantları bulunabilmektedir ve özellikle laktik asit bakterilerinin mikrobiyel adezyonu, pasif kuvvetler, elektrostatik ilişkiler, hidrofobik, sterik kuvvetlerle ve lipoteikoik asit, lektinlerle kaplı özgün yapılarla ilişkilidir (Servin ve Coconnier, 2003). Bu yapılar sayesinde probiyotiklerin patojen mikroorganizmalara karşı intestinal sistemde bir bariyer oluşturduğu ve patojenlerin epitel hücrelerine bağlanmasını azalttığı da bildirilmiştir (Castagliuolo ve ark., 1999; Rastall ve ark., 2005).

Probiyotiklerin son yıllarda bildirilmiş olan önemli etkilerinden birisi de immun sistem üzerindeki immunomodülatör ve immunostimulan etkileridir. Probiyotikler intestinal epitel hücreleri, lökositler, B- ve T- lenfositleri ile immun sistemin diğer yardımcı hücrelerini etkileyebilmektedirler. Probiyotikler bu

immunomodulator özelliklerini endotoksik lipopolisakkaritler, peptidoglikanlar ve lipoteikoik asitler sayesinde gerçekleştirmektedir. Lipoteikoik asitler ayrıca diğer antijenler için taşıyıcı rol de oynayabilmekte ve bu şekilde immun cevabı uyacakları hedef dokulara bağlayabilmektedir. Probiyotik mikroorganizmalar proinflatuar sitokinlerin ve kemokinlerin gelişiminde anahtar rol oynamaktadır (Saxelin ve ark., 2005).

Kanser hastalığı üzerinde yapılan araştırmalarda özellikle beslenme tarzının önemli bir etken olduğu bildirilmektedir (Williams ve Wynder, 1996). Probiyotiklerin antikarsinojenik etkisinin belirlenmesi için yapılan araştırmalarda probiyotik bakterileri içeren diyetlerin kanser riskini azaltabildiği bildirilmiştir (Hirayama ve Rafter, 1999). Araştırmalarda ayrıca, probiyotik bakterilerin bağırsak ve diğer organlarda mutajenik ve genotoksik etkileri engelleyebildiğini ve böylece antikarsinojenik etkileri olduğu ortaya konulmuştur (Sanders, 1999).

Probiyotik bakterilerin son yıllarda bildirilen etkilerinden birisi de antikolestrol etkisidir. Probiyotiklerin bu etkiyi, serum kolesterolünü ve safra tuzlarını serbest asitlere parçalamaları ve sonrasında intestinal sistemden hızlı bir şekilde uzaklaştırmak suretiyle gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Serbest safra tuzlarının vücuttan atılması nedeniyle kolesterolden yeni safra asitlerinin sentezi engellenmekte ve dolayısı ile vücut total kolesterol seviyesi düşmektedir.

Oral yolla alınan antibiyotikler patojen mikroorganizmalar ile beraber bağırsak florasında bulunan yararlı bakterilere de etki gösterirler. Bu etkiye bağlı olarak antibiyotiğe bağlı diyare oluşabilmektedir (Gönç ve Akalın, 1995). Probiyotik bakterileri içeren yemlerin kullanılması, intestinal sistemde antibiyotik kullanımına bağlı olarak oluşan diyarenin önlenmesinde ve/veya iyileştirilmesinde yardımcı olarak kullanılabilir (Marteu ve ark., 1997).

Probiyotik mikroorganizmaların besinlerin sindirimine yardımcı ürünler olarak kullanılabilirliği bildirilmektedir (Fuller, 1989; Kung, 1990). Probiyotik mikroorganizmalar lipaz, proteaz, amilaz ve beta-glukanaz gibi enzimler salgılayarak ve/veya B grubu vitaminler sentezleyerek sindirime önemli ölçüde katkıda bulunurlar.

2.5. Probiyotiklerin Güvenilirlikleri

Günümüzde ticari olarak satışa bulunan probiyotik ürünler güvenilirlikleri kanıtlandıktan sonra piyasaya sunulmaktadır. Probiyotik ürünlerin geliştirilmesinde ve

yeni cins ve türlerin probiyotik ürün oluşturmak amacıyla seçiminde Avrupa Birliği tarafından önerilen zorunlu güvenlik kriterlerinin sağlanması gerekmektedir. Probiyotik ürünlerin güvenilirliğinin belirlenmesinde üretilecek olan besin maddesinin özellikleri ile bu mikroorganizmaların besinlerde kullanımının geçmişi konusundaki bilgiler temel kriterler olarak değerlendirilmektedir (Zhou ve ark., 2000; Başyigit, 2004).

Avrupa Birliği ülkelerinde probiyotiklerin güvenilirliğinin ve özelliklerinin belirlenmesini içeren geniş kapsamlı iki proje (Nordic ve Prodemo projesi) gerçekleştirilmiştir. (Leroy ve deVuyst, 2004). Bu projelerin sonuçlarına göre güvenilir probiyotik kombinasyonlarının oluşturulmasında ve ticari ürün haline getirilmesinde bazı kriterler bildirilmiştir. Öncelikle üretici firma, tüketime sunduğu besin maddelerinden birinci derecede sorumlu olduğuna dikkat çekilmiş ve probiyotik içeren besin maddelerinin en az saf hali kadar güvenilir olması gerektiği vurgulanmıştır. Probiyotik mikroorganizmaların yeni bir ticari ürün olarak kullanılacakları zaman yasal olarak onaylanmış olmaları gerekmektedir. Uzun zamandır probiyotik olarak güvenilir bir şekilde kullanılan ve/veya hiçbir suşu patojen olarak belirlenmemiş bir mikroorganizma suşu ilk defa kullanılacak yeni suşlarla aynı işleme tabi tutulmayarak probiyotik üretiminde güvenilir kabul edilmekte ve yeni ürün üretiminde kullanımına izin verilmektedir. Bununla beraber, hiçbir suşu patojen olarak belirlenmemiş ama güvenilir bir kullanım geçmişi olmayan suşlar yeni ürün oluşumunda ilk defa izole edilen suşlarla aynı işlemi görmesi gerekmektedir. Benzer şekilde, patojenik suşları da olduğu bilinen fakat probiyotik potansiyeli de olan bir mikroorganizma suşu, yeni bir ürün geliştirilmesinde ancak çok iyi araştırıldıktan sonra kullanılmalıdır. Kullanılacak olan mikroorganizma suşunun antibiyotik direnç genleri araştırılmalı ve eğer bu geni taşıma ve aktarabilme potansiyeli var ise probiyotik olarak kullanılmamalıdır. Bu araştırmaların sonucunda bildirilen en önemli kriter, probiyotik mikroorganizma suşunun tam ve doğru olarak tanımlanmış olma gerekliliğidir. Taksonomik analizleri yapılmamış ve/veya “altın standart” olarak kabul edilen yöntemler kullanılarak identifikasyonları yapılmamış olan suşlar probiyotik olarak kesinlikle kullanılmamalı ve satışına izin verilmemelidir (Dunne ve ark., 1999; Zhou ve ark., 2000).

2.6. Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliğinde Probiyotikler

Kanatlı hayvanların büyümesi ve sağlıklı olarak yetiştirilmesi özellikle ince bağırsaklarda besinlerin emilim ve yararlanım kapasiteleri ile ilişkilidir. Söz konusu

emilim ve sindirimin oluşumu da bağırsak kanalındaki yararlı mikroorganizmaların varlığı ve oranı ile direkt olarak bağlantılıdır. Bağırsak mikroflorası hayvanların büyüme ve gelişme oranını etkilemektedir. Sabit ve dengeli bir bağırsak florası sindirimin iyi olmasını, yemden yararlanmanın artmasını ve enfeksiyonlara karşı direnci sağlamaktadır (Shahani ve Ayebo, 1980; Tournut ve ark., 1988; Fuller, 1989; Suzuki ve ark., 1989).

Normal koşullar altında, yumurtadan steril halde çıkan civcivler, 2-5 saat içerisinde çevrede var olan çeşitli mikroorganizmalara maruz kalmaktadır. Bu mikroorganizmaların alınması ile gastrointestinal sistemde mikroflora şekillenmeye başlamaktadır (Owings ve ark. 1960; Vanbelle ve ark., 1990).

Kanatlı hayvanlarda bağırsak mikroflorasının kaynağını kursak mikroflorası oluşturmaktadır (Watkins ve Miller, 1983; Jernigan ve ark., 1985; Fuller, 1989). Doğal koşullarda bağırsak florasının büyük bir bölümü, laktik asit bakterileri (*Lactobacillus* spp.) ile beraber anaerob bakteriler tarafından oluşturulmaktadır. Geriye kalan az bir kısım ise *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp. vb. tarafından meydana getirilmektedir (Montes ve Pugh, 1983; Fuller, 1989; Suzuki ve ark., 1989; Kung, 1990). Kanatlı hayvanlarda florayı oluşturan laktik asit bakterileri genellikle kursak epitelyum hücreleri üzerinde yerleşmekte ve nişasta partikülleri üzerine yapışarak organik asitlerin üretilmesi ve pH'nın 4.5 ya da daha aşağılara düşmesini sağlamak suretiyle sindirime yardımcı olmaktadır. Normal gastrointestinal mikroflora üzerine yapılan araştırmalarda bağırsaklarda 10^{14} kob mikroorganizma bulunmuş ve bu sayının 400 türden fazla mikroorganizma tarafından oluşturulduğu bildirilmiştir (Fuller, 1989; Vanbelle ve ark., 1990).

Sağlıklı bir kanatlı hayvanın gastrointestinal sisteminde denge halinde bulunan mikroorganizmalar, sindirim ve emilime yardımcı olmakta ve enfeksiyöz hastalıklara karşı vücut direncini artırmaktadırlar. Strese bağlı olarak ve/veya hastalık durumlarında ise bu denge bozulmaktadır. Bu dengenin bozulmasına neden olan koşullar olarak transport, beslenmede meydana gelen yetersizlikler, kalitesiz yem ile beslenme, hijyen koşullarının uygun olmaması, hastalıklar, uzun süreli ve yanlış antibiyotik tedavisi, kümes ortamındaki amonyak oranının artması, aşılama esnasındaki rahatsızlıklar, ortam sıcaklığının uygun olmaması gösterilmektedir (Suzuki ve ark., 1989). Bu gibi durumlarda bağırsak florasında değişiklikler meydana gelmekte ve dolayısı ile flora

dengesi bozulmaktadır. Florada bulunan laktik asit bakterilerinin sayısında azalma meydana gelmekte ve patojen bakteri sayısı artabilmektedir (Owings ve ark., 1960; Montes ve Pugh, 1983; Fox, 1988). Bunun sonucu olarak da yemden yararlanmada düşüş gözlenmekte, büyüme oranı düşmekte ve dolayısı ile hayvanların performansı olumsuz olarak etkilenmektedir (Owings ve ark., 1960; Montes ve Pugh, 1983; Fox, 1988; Lyons, 1988). Bu durumlarda hayvana probiyotik içeren ürünler verildiği zaman, bağırsakta bulunan laktik asit bakterilerinde artış, patojen sayısında ise azalma meydana gelmektedir. Bağırsakta mikroflora dengesi yeniden sağlanarak, performans artışı sağlanabilmektedir (Sogaard ve Jessen, 1990; Fukata ve ark., 1991; Sainsbury, 1991).

Probiyotik uygulamaları kanatlı hayvan sektöründe biyogüvenlik uygulamaları kapsamında son yıllarda güvenle uygulanan yöntemlerin başında yer almaktadır. Bu çalışma, potansiyel probiyotik bakterilerden olan *Lactobacillus* spp. ve *Enterococcus faecium*'un sağlıklı tavuklardan izolasyonunu ve izole edilen bakterilerin probiyotik olarak kullanılma potansiyellerini araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hayvan Materyali

Çalışmada *E.coli*'ye karşı antagonistik etki gösteren *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* bakterilerinin izolasyonu amacıyla Kavak/Samsun'da bulunan kanatlı hayvan mezbahasında kesim aşamasında olan 50 adet tavuğa ait bağırsak alındı. Mezbahaya 5 defa gidildi ve her seferinde duodenum ile kloaka arasını kapsayacak şekilde 10 adet bağırsak alındı. Bağırsaklar soğuk zincir koşulları altında 2-3 saat içerisinde Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na getirildi.

3.2. Bakteriyolojik İzolasyon

Bağırsaklar steril şartlar altında kesilip, duodenum mukozasından lam ile kazıntı alındı. Alınan örnekler steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile 1/10 (v/v) oranında homojenize edildi. Süspansiyonlardan 10^{-8} 'e kadar steril fizyolojik tuzlu su ile dilüsyonlar hazırlandı. Bu amaçla içerisinde 9 ml steril FTS olan tüpler hazırlandı. İlk tüpe hazırlanmış olan ve bağırsak içeriğini 1/10 (v/v) oranında içeren süspansiyondan 1 ml eklendi ve süspansiyon homojenize edildi. Bu şekilde 7 tüpe de bir önceki dilüsyondan 1 ml aktarılacak suretiyle \log_{10} tabanına göre dilüsyonlar hazırlandı. Hazırlanan dilüsyonlar *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* izolasyonu için kullanıldı.

Enterococcus faecium selektif izolasyonu için 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} 'lük dilüsyonlardan 0,1 ml alınarak 3 adet Bile Esculin Agar (BEA)'a yayma tarzında ekim yapıldı (Strompofova ve ark., 2004; Gülhan ve ark., 2015). Ekim yapılan besi yerleri 37°C 'de 24 saat süreyle aerobik koşullarda inkubasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 1-20 adet siyah renkli-eskülin pozitif bakteri kolonisi içeren besi yerleri değerlendirmeye alındı. Değerlendirme amacıyla her hayvana ait materyalden üretilmiş olan, farklı koloni morfolojisi gösteren 2-3 adet koloni seçildi ve bu kolonilere Gram boyama ve katalaz testi gerçekleştirildi. Test sonucunda Gram pozitif ve katalaz negatif kok morfolojisinde olan koloniler şüpheli olarak kabul edildi ve % 5 koyun kanlı agara ekilerek saflaştırıldı. İzole edilen suşlar identifikasyon testlerinde kullanılmak üzere % 20'lik gliserinli Brain Heart Infüzyon (BHI) broth içerisinde -20°C 'de saklandı.

Lactobacillus spp. selektif izolasyonu amacıyla 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} 'lük dilüsyonlardan 0,1 ml alınarak 3 adet De Man, Rogosa ve Sharpemrs (MRS) agar'a

ekim yapıldı. Anaerobik koşullarda (Anaerobic gas pack ile jar içerisinde) 48 saat 35°C’de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda 1-20 adet bakteri kolonisi içeren besi yerleri değerlendirmeye alındı. Değerlendirme amacıyla her hayvana ait materyalden üretilmiş olan, farklı koloni morfolojisi gösteren 1-3 adet koloni seçildi ve bu kolonilere Gram boyama ve katalaz testi yapıldı. Test sonucunda Gram pozitif çomak morfolojisinde ve katalaz negatif olan koloniler şüpheli olarak değerlendirildi (Sieladie ve ark., 2011). Bu kolonilerden MRS agara ekim yapılarak, saflaştırıldı. İzole edilen suşlar identifikasyon testlerinde kullanılmak üzere %20’lik gliserinli MRS broth’ta -20 °C’de saklandı.

3.3. Genotipik İdentifikasyon

Genotipik identifikasyon amacıyla *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* şüpheli izolatların DNA ekstraksiyonları gerçekleştirildi. Bunun için tüm şüpheli izolatlar Triptik Soy Agar (TSA)’da üretildi. Üreyen bakterilerden DNA ekstraksiyonu, prensibi spin kolon ile filtrasyon sistemine dayanan ticari DNA ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific, GeneJET Genomic DNA Purifikasyon Kiti) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi. Buna göre bir öze dolusu şüpheli koloni alındı ve 180 µl Gram-pozitif bakteri lizis tamponu içerisinde süspanse edildi. Süspansiyon 37°C’de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 200 µl lizis buffer ve 20 µl proteinaz K eklendi. Süspansiyon homojen hale gelinceye kadar vorteks ile karıştırıldı. Karışım 56°C’de 30 dk süre ile su banyosunda inkübe edildi. Üzerine 20 µl RNaseA eklendi ve vorteksleme sonrasında 10 dk süreyle oda ısısında bekletildi. İnkübasyon sonrasında 400 µl %50’lik etanol eklendi ve iyice karıştırıldı. Hazırlanmış olan lizat ekstraksiyon kolonuna aktarıldı ve 6000xg’de 1 dk süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki kolon atıldı ve yeni kolona konulan koleksiyon tüpüne 500 µl yıkama tamponu 1 eklendi. Kolon 8000xg’de 1 dk süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki kolon atıldı ve yeni kolona konulan koleksiyon tüpüne 500 µl yıkama tamponu 2 eklendi. Kolon 12000xg’de 3 dk süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki kolon atıldı ve DNase-RNase içermeyen mikrotüp üzerine konulan koleksiyon tüpüne 100 µl elüsyon tamponu eklendi. Kolon, 2 dk süre ile oda ısısında inkübe edildikten sonra 8000xg’de 1 dk süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen DNA’ların konsantrasyonları nanodrop spektrofotometre ile ölçüldü ve tüm DNA’lar konsantrasyonları 50 ng/µl

olacak şekilde ayarlandı. Ekstrakte edilen DNA'lar PCR'da hedef DNA olarak kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Enterococcus spp. ve *Lactobacillus* spp.'nin moleküler identifikasyonu cinse ve *E. faecium* ve *L. acidophilus* için ise türe özel primerler kullanılarak literatürde bildirilen yöntemle göre PCR ile gerçekleştirildi. Reaksiyonda kullanılan oligonükleotid primerler Tablo 2'de gösterildi.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primer dizileri.

Primer	Oligonükleotid dizisi (5'-3')	Bant boyutu	Referans
ENT1	TACTGACAAACCATTCATGATG	112	Ke ve ark. (1999)
ENT2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC		
FM1	GAAAAACAATAGAAGAATTAT	215	Jackson ve ark. (2004)
FM2	TGCTTTTTTGAATCCTCTTTA		
Lacto F	TGGAAACAGGTGCTAATACCG	230	Markiewicz ve Biedrzycka (2005)
Lacto R	CCATTGTGGAAGATTCCC		
LacidoF	CACTTCGGTGATGACGTTGG	575	Sul ve ark. (2007)
LacidoR	CGATGCAGTTCCTCGGTTAAGC		

Enterococcus spp.'nin PCR ile cins düzeyinde identifikasyonu için Ke ve ark. (1999)'nin kullandıkları protokol uygulandı. Toplam 20 µl PCR karışımına; 50 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR tamponu, 2.5 mM MgCl₂, 1 µM her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 0,5 U *Taq* polymeraz ilave edildi. Amplifikasyon koşulları 95°C'de 3 dk ilk denatürasyon, 35 siklus 95°C'de 30 sn, 55°C'de 30 sn, 72°C'de 1 dk amplifikasyon ve 72°C'de 7 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren %3'lük agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında 112 bp'lik bant görülmesi *Enterococcus* spp. için pozitif olarak değerlendirildi.

Enterococcus spp. pozitif olarak bulunan izolatlar *E. faecium* spesifik PCR ile identifiye edildi. PCR koşulları Jackson ve ark. (2004)'nin kullandıkları protokolün modifiye ve optimize edilmesi ile gerçekleştirildi. Toplam 25 µl PCR karışımına; 50 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR buffer, 3 mM MgCl₂, 16 µM her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 1 U *Taq* polymeraz ilave edildi. Amplifikasyon koşulları 95°C'de 4 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 95°C'de 30 sn, 55°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk amplifikasyon ve 72°C'de 7 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren %2'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV

transilluminatör ile görüntüledi. Görüntüleme sonrasında 215 bp'lik bant görülmesi *E. faecium* için pozitif olarak değerlendirildi.

Lactobacillus spp.'nin PCR ile cins düzeyinde identifikasyonu için Markiewicz ve Biedrzycka (2005)'nin kullandıkları protokol kullanıldı. Toplam 20 µl PCR karışımına; 50 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR tamponu, 1.5 mM MgCl₂, 1 µM her bir primer, 250 µM her bir dNTP, 0,4 U *Taq* polymerase ilave edildi. Amplifikasyon koşulları 94°C'de 1 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 94°C'de 30 sn, 52°C'de 30 sn, 72°C'de 30 sn amplifikasyon ve 72°C'de 5 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren %2'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüledi. Görüntüleme sonrasında 230 bp'lik bant görülmesi *Lactobacillus* spp. için pozitif olarak değerlendirildi.

Lactobacillus spp. pozitif olarak bulunan izolatlar *L. acidophilus* spesifik PCR ile identifiye edildi. PCR koşulları Sul ve ark. (2007)'nin kullandıkları protokol doğrultusunda gerçekleştirildi. Toplam 25µl PCR karışımına 50 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR tamponu, 2 mM MgCl₂, 1 µM her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 1 U *Taq* polymerase ilave edildi. Amplifikasyon koşulları 95°C'de 5 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 95°C'de 30 sn, 56°C'de 30 sn, 72°C'de 30 sn amplifikasyon ve 72°C'de 5 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren %1.5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüledi. Görüntüleme sonrasında 575 bp'lik bant görülmesi *L. acidophilus* için pozitif olarak değerlendirildi.

3.4. İzolatların Safra Toleranslarının Belirlenmesi

İzolatların safra toleransının belirlenmesi amacıyla steril PBS içerisinde 10⁷ kob/ml olacak şekilde süspansiyonları hazırlandı. Safra tolerans testi % 0,5 ve %1,0 safra konsantrasyonları için test edildi. Bu amaçla; her bir *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* izolatı için ayrı ayrı olmak üzere steril mikropleyt kuyucuklarına % 0,5 ve %1,0 oranında safra içeren 200 µl steril PBS konuldu. Kuyucuklara 10⁷ kob/ml olacak şekilde hazırlanmış olan test edilecek izolatlardan 20 µl inokule edildi. Her izolat için bir kuyucuk da kontrol olarak tasarlandı ve bu kuyucuğa safra içermeyen 200 µl bakteri süspansiyonu eklendi. *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* içeren mikropleytlar sırasıyla 35°C ve 37°C'de 1,5 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda her

kuyucuktaki süspansiyon 10^{-5} 'e kadar seyreltilerek 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} 'lük dilüsyonlardan *Lactobacillus* spp. için 3'er adet MRS agara, *E. faecium* için de 3'er adet BEA'ya 50 µl olmak üzere yayma tarzında ekim yapıldı. Besi yerleri *Lactobacillus* spp. için 35°C'de 48 saat (anaerobik koşullarda) ve *E. faecium* için 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda canlı bakteri sayımı yapılarak, izolatların safra toleransları belirlendi (Strompfova ve ark., 2004; Sahadeva ve ark., 2011; Hassanzadazar ve ark., 2012).

3.5. İzolatların pH Toleranslarının Belirlenmesi

İzolatların pH toleransının belirlenmesi amacıyla steril PBS içerisinde 10^7 kob/ml olacak şekilde süspansiyonları hazırlandı. pH tolerans testi pH 3 ve pH 5 için test edildi. Bu amaçla; her bir *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* izolatu için ayrı ayrı olmak üzere steril mikropleyt kuyucuklarına 5N'lık HCl ile pH 3 ve pH 5'e ayarlanan 200 µl steril PBS konuldu. Kuyucuklara 10^7 kob/ml olarak hazırlanmış olan test edilecek izolatlardan 20 µl inokule edildi. Her izolat için bir kuyucuk da kontrol olarak tasarlandı ve bu kuyucuklara pH 7'ye ayarlanmış olan 200 µl bakteri süspansiyonu eklendi. *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* içeren mikropleytlar sırasıyla 35°C ve 37°C'de 1.5 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda her kuyucuktaki süspansiyon 10^{-5} 'e kadar seyreltilerek 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} 'lük dilüsyonlardan *Lactobacillus* spp. için 3'er adet MRS agara, *E. faecium* için de 3'er adet BEA'ya 50 µl olmak üzere yayma tarzında ekim yapıldı. Besi yerleri *Lactobacillus* spp. için 35°C'de 48 saat (anaerobik koşullarda) ve *E. faecium* için 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda canlı bakteri sayımı yapılarak, izolatların pH toleransları belirlendi (Strompfova ve ark., 2004; Sahadeva ve ark., 2011; Hassanzadazar ve ark., 2012).

3.6. İzolatların Hidrofobisitelerinin Belirlenmesi

İzolatların hidrofobisitelerinin belirlenmesi için % 0,03 Kongo Kırmızısı karıştırılmış TSA ve MRS agar hazırlandı. İzolatlar *Lactobacillus* spp. için Kongo kırmızısı içeren MRS agara, *E. faecium* için de kongo kırmızısı içeren TSA'ya ekildi ve sırasıyla 35°C'de 48 saat (anaerobik koşullarda) ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda koloniler renklerine göre değerlendirildi. Kırmızı

koloniler pozitif (hidrofobik), beyaz veya renksiz koloniler ise negatif (non-hidrofobik) olarak kabul edildi (Sharma ve ark., 2006).

3.7. İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İzolatların antibiyotik dirençlilik/duyarlılık profilleri amoksisilin (25 µg), amoksisilin/klavulanik asit (20/10 µg), ampisilin (10 µg), enrofloksasin (5 µg), eritromisin (15 µg), linkomisin (2 µg), neomisin (30 µg), oksitetrasiklin (30 µg) ve trimetoprim/sulfametaksazol (1.25/23.75 µg) antibiyotik diskleri kullanılarak Kirby Bauer Disk Difüzyon testi ile belirlendi (CLSI, 2013). Bu amaçla izolatlar *Lactobacillus* spp. için MRS broth, *E. faecium* için de TSB içerisinde üretildi ve inkübasyon süresi sonunda yoğunlukları McFarland No:0,5'e ayarlandı. Sıvı kültürlerden 0,1 ml alınarak *Lactobacillus* spp. için MRS ve *E. faecium* için de Mueller Hinton Agara yayma tarzında inokule edildi. Antibiyotik disklerinin yerleştirilmesi sonrasında *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* için sırasıyla 35°C'de 48 saat (anaerobik koşullarda) ve 37°C'de 48 ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda inhibisyon çapları ölçüldü ve direnç profilleri antibiyotik diski üreticisi firmanın bildirmiş olduğu zon çaplarına göre değerlendirildi.

3.8. İzolatların *E.coli*'ye Karşı *in vitro* Antagonistik Etkilerinin Belirlenmesi

İshalli tavuklardan izole edilmiş olan ve kültür koleksiyonumuzda bulunan patojen *E.coli* izolatına karşı, tavukların bağırsak mikroflorasından izole edilen bakterilerin antagonistik etkilerinin araştırılmasında Radyal Difüzyon yöntemi kullanıldı (Hjelm ve ark., 2004; Hassanzadazar ve ark., 2012; Abdel-Daim ve ark., 2013).

Bu amaçla *E.coli* izolatının 0,5 Mc Farland konsantrasyonundaki sıvı kültüründen 100 µl alınarak, döküm sıcaklığına kadar soğutulmuş 500 ml TSA'ya 50 µl olmak üzere ilave edildi. Bakterinin besi yerinde homojen bir şekilde dağılımı için döküm öncesinde iyice karıştırıldı. Patojen *E.coli* izolatının ilave edildiği besi yerlerinin petrilere dökümü yapıldı ve 15 dk beklendikten sonra her bir besi yeri üzerine steril durhaym tüpleri kullanılarak yaklaşık 5 mm çapında 4 adet çukur açıldı. Besi yeri üzerinde açılan çukurlara, test edilecek izolatların 0,5 Mc Farland konsantrasyonundaki taze sıvı kültürlerinden 150 µl ilave edildi. Besi yerleri 37°C'de 24 saat süreyle

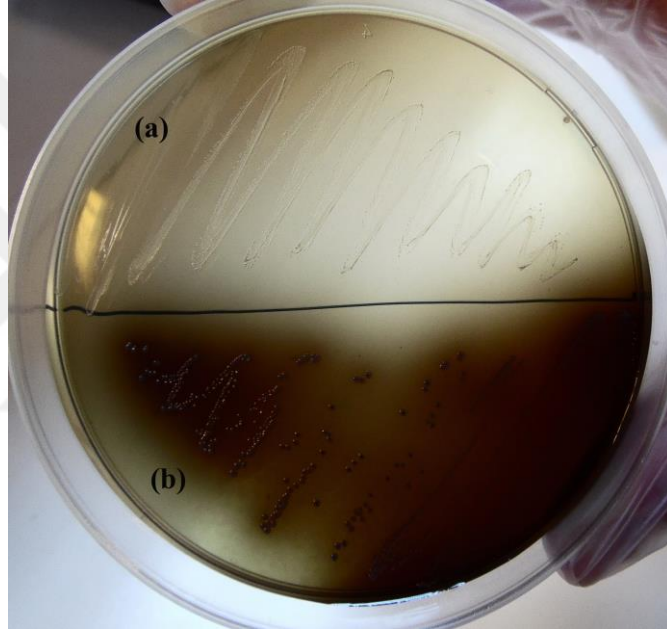
inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucukların etrafında oluşan şeffaf inhibisyon zonlarının ölçümü yapıldı.



4. BULGULAR

4.1. Bakteriyolojik İzolasyon

Enterococcus faecium selektif izolasyonu için Bile Esculin Agar'a yapılan inokulasyon sonucunda 115 adet eskulin pozitif bakteri kolonisi şüpheli olarak değerlendirildi (Şekil 1). Gram boyama sonucunda tüm şüpheli izolatların Gram pozitif-kok morfolojisinde ve katalaz negatif olduğu belirlendi. Bu bakterilerin *Enterococcus* spp. ve *E.faecium* olarak genotipik identifikasyonunun yapılması amacıyla DNA ekstraksiyonları gerçekleştirildi.



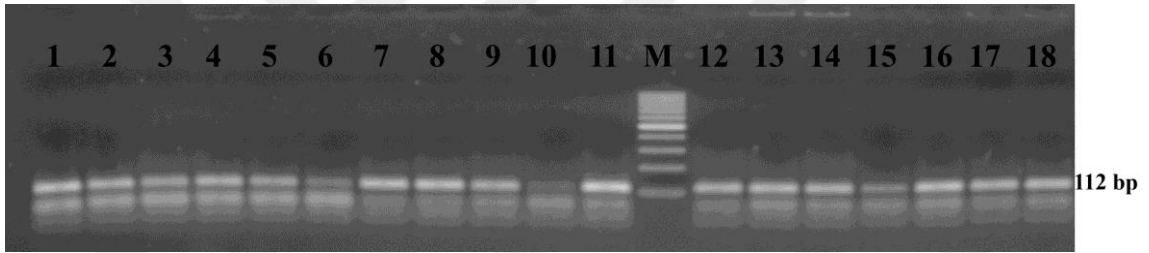
Şekil 1. *Enterococcus* spp. izolasyonu için BEA'ya yapılan ekim sonucu üreyen bakteriler (a) Eskülin negatif, (b) Eskülin pozitif

Lactobacillus spp. izolasyonu amacıyla MRS agara yapılmış olan ekimler sonucunda 67 adet şüpheli koloni belirlendi. Yapılmış olan Gram boyama sonucunda tüm şüpheli izolatların Gram pozitif-çomak morfolojisinde ve katalaz negatif olduğu saptandı. Bu bakterilerin *Lactobacillus* spp. ve *L.acidophilus* olarak genotipik identifikasyonunun yapılması amacıyla DNA ekstraksiyonları gerçekleştirildi.

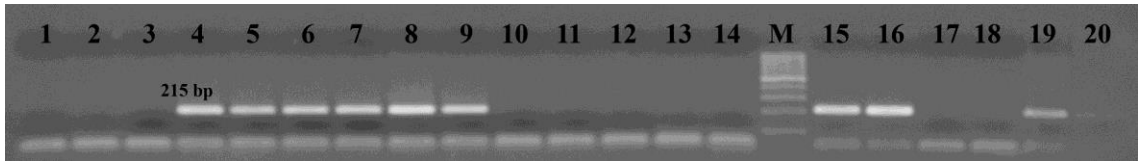
4.2. Genotipik İdentifikasyon

Genotipik identifikasyon amacıyla şüpheli izolatların DNA ekstraksiyonları gerçekleştirildi ve elde edilen DNA'ların konsantrasyonları 50 ng/μl olacak şekilde ayarlandı.

Enterococcus spp.'nin cins düzeyinde identifikasyonu için yapılan PCR sonucunda 112 bp'lik bant görülmesi *Enterococcus* spp. için pozitif olarak değerlendirildi. Test edilen 115 şüpheli izolatın tamamının *Enterococcus* spp. olduğu belirlendi (Şekil 2). *Enterococcus* spp. pozitif olarak bulunan izolatlar *E. faecium* spesifik PCR ile tanımlendi. Görüntüleme sonrasında 215 bp'lik bant görülmesi *E. faecium* için pozitif olarak değerlendirildi. İncelenen 115 *Enterococcus* spp. izolatının 20 adetinin pozitif bant verdiği saptandı ve *E. faecium* olarak tanımlendi (Şekil 3). Belirlenen 20 izolat diğer testlerde kullanılmak üzere seçildi.



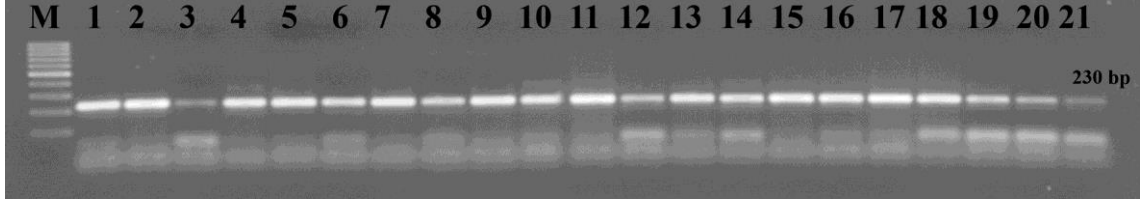
Şekil 2. Şüpheli izolatların *Enterococcus* spp. spesifik primer ile yapılan PCR sonucu **1-18**: *Enterococcus* spp. pozitif; **M**: marker (100-1000 bp)



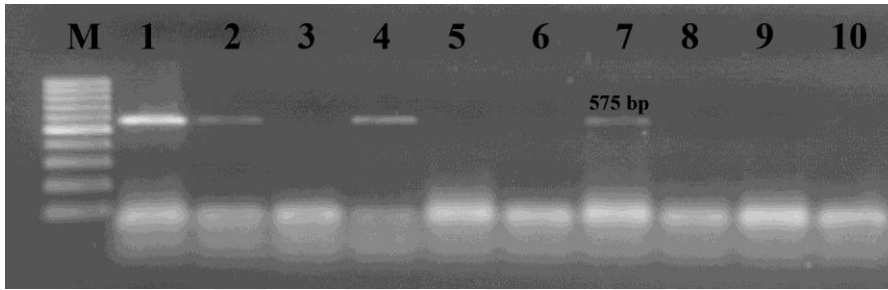
Şekil 3. *Enterococcus* spp. olarak tanımlendi izolatların *E. faecium* spesifik primer ile yapılan PCR sonucu **1-3, 10-14, 17, 18**: negatif; **4-9, 15, 16, 19, 20**: pozitif; **M**: marker (100-1000 bp)

Lactobacillus spp.'nin cins düzeyinde identifikasyonu için yapılan PCR sonucunda 230 bp'lik bant görülmesi *Lactobacillus* spp. için pozitif olarak değerlendirildi. Test edilen 67 şüpheli izolatın 21 adetinin *Lactobacillus* spp. olduğu belirlendi (Şekil 4). *Lactobacillus* spp. pozitif olarak bulunan izolatlar *L. acidophilus* spesifik PCR ile tür düzeyinde tanımlendi. Görüntüleme sonrasında 575 bp'lik bant görülmesi *L. acidophilus* için pozitif olarak değerlendirildi. İncelenen 21

Lactobacillus spp. izolatının 9 adetinin pozitif bant verdiği saptandı ve *L.acidophilus* olarak tanımlendi (Şekil 5). *Lactobacillus* spp. olarak tanımlendi 21 izolat diğer testlerde kullanılmak üzere seçildi.



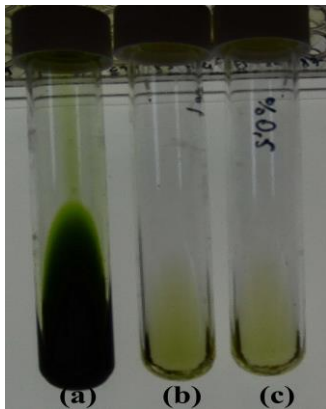
Şekil 4. Şüpheli izolatların *Lactobacillus* spp. spesifik primer ile yapılan PCR sonucu **1-21**: *Lactobacillus* spp. pozitif; **M**: marker (100-1000 bp)



Şekil 5. *Lactobacillus* spp. olarak tanımlendi edilen izolatların *L.acidophilus* spesifik primer ile yapılan PCR sonucu **1,2,4,7**: *L. acidophilus* pozitif; **3,5,6,8-10**: *L.acidophilus* negatif; **M**: marker (100-1000 bp)

4.3. İzolatların Safra Toleranslarının Belirlenmesi

İzolatların safra toleransları, %0,5 ve %1,0 safra konsantrasyonlarında canlılıklarını muhafaza etmelerinin tespiti ile belirlendi (Şekil 6).

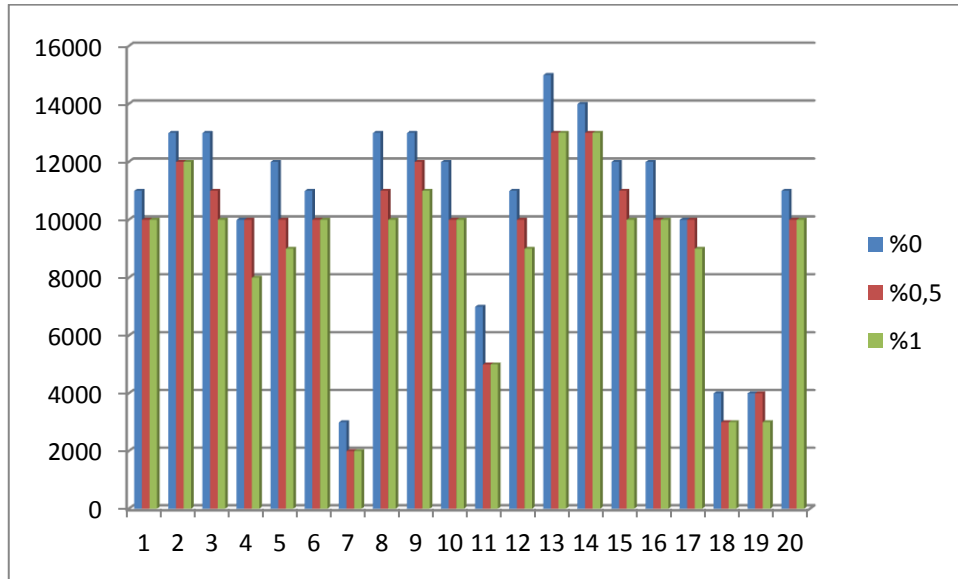


Şekil 6. Safra tolerans testi için kullanılan safra solüsyonları **(a)**: Saf safra; **(b)**: %1 oranında sulandırılmış safra; **(c)**: %0,5 oranında sulandırılmış safra

Bu amaçla; her bir *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* izolatu ayrı ayrı olmak üzere test edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 3 ve Tablo 4 ile Şekil 7 ve Şekil 8’de sunuldu.

Tablo 3. *E.faecium* izolatlarının safra tolerans testi sonuçları (log kob/ml)

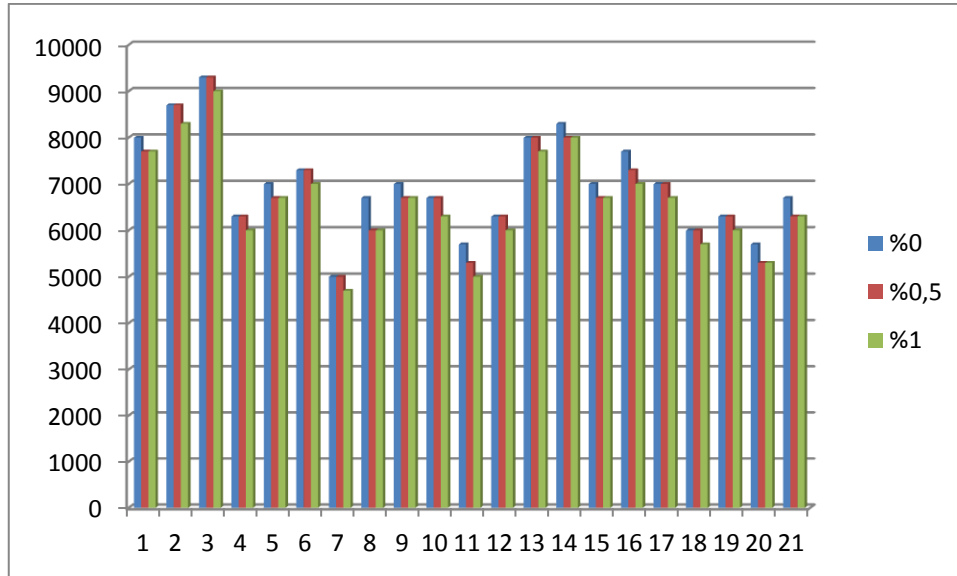
İzolat no	%1 safra	%0,5 safra	%0 safra
EFM01.1	4,00	4,00	4,04
EFM02.1	4,08	4,08	4,11
EFM05.2	4,00	4,04	4,11
EFM10.8	4,00	4,00	3,90
EFM16.1	3,95	4,00	4,08
EFM18.3	4,00	4,04	4,00
EFM20.2	3,30	3,48	3,30
EFM21.1	4,00	4,04	4,11
EFM24.1	4,04	4,11	4,08
EFM27.2	4,00	4,00	4,08
EFM32.1	3,70	3,70	3,85
EFM34.2	3,95	4,00	4,04
EFM36.1	4,11	4,18	4,11
EFM37.1	4,11	4,11	4,15
EFM38.2	4,00	4,04	4,08
EFM39.1	4,00	4,00	4,08
EFM40.1	3,95	4,00	4,00
EFM41.3	3,48	3,48	3,60
EFM46.1	3,48	3,60	3,60
EFM49.2	4,00	4,00	4,04



Şekil 7. *E.faecium* izolatlarının safra tolerans testi sonuçlarının karşılaştırmalı analizi (kob/ml)

Tablo 4. *Lactobacillus* spp. izolatlarının safra tolerans testi sonuçları (log kob/ml)

İzolat no	Bakteri ismi	%1 safra	%0.5 safra	%0 safra
LB02.1	<i>L. acidophilus</i>	3,89	3,89	3,90
LB05.2	<i>L. acidophilus</i>	3,92	3,94	3,94
LB14.3	<i>L. acidophilus</i>	3,95	3,97	3,97
LB16.3	<i>L. acidophilus</i>	3,78	3,80	3,80
LB20.2	<i>L. acidophilus</i>	3,83	3,83	3,85
LB26.1	<i>L. acidophilus</i>	3,85	3,86	3,86
LB35.1	<i>L. acidophilus</i>	3,67	3,70	3,70
LB46.1	<i>L. acidophilus</i>	3,78	3,78	3,83
LB49.3	<i>L. acidophilus</i>	3,83	3,83	3,85
LB03.2	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,80	3,83	3,83
LB04.1	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,70	3,72	3,76
LB11.1	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,78	3,80	3,80
LB13.1	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,89	3,90	3,90
LB15.3	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,90	3,90	3,92
LB21.1	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,83	3,83	3,85
LB23.2	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,85	3,86	3,89
LB30.1	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,83	3,85	3,85
LB32.2	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,76	3,78	3,78
LB37.1	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,78	3,80	3,80
LB45.1	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,72	3,72	3,76
LB50.1	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,80	3,80	3,83



Şekil 8. *Lactobacillus* spp. izolatlarının safra tolerans testi sonuçlarının karşılaştırmalı analizi (kob/ml)

Çalışmada incelenen izolatların safra tolerans testi sonrasında canlı kalma oranları hesaplandı. Test sonucunda canlı kalma oranları Tablo 5 ve Tablo 6'da sunuldu.

Tablo 5. *E.faecium* izolatlarının safra tolerans testi sonucunda canlı kalma oranları (%)

İzolat no	%0,5 safra	%1safra
EFM01.1	90,91	90,91
EFM02.1	92,31	92,31
EFM05.2	84,62	76,92
EFM10.8	100,00	80,00
EFM16.1	83,33	75,00
EFM18.3	90,91	90,91
EFM20.2	66,67	66,67
EFM21.1	84,62	76,92
EFM24.1	92,31	84,62
EFM27.2	83,33	83,33
EFM32.1	71,43	71,43
EFM34.2	90,91	81,82
EFM36.1	86,67	86,67
EFM37.1	92,86	92,86
EFM38.2	91,67	83,33
EFM39.1	83,33	83,33
EFM40.1	100,00	90,00
EFM41.3	75,00	75,00
EFM46.1	100,00	75,00
EFM49.2	90,91	90,91

Tablo 6. *Lactobacillus* spp. izolatlarının safra tolerans testi sonucunda canlı kalma oranları (%)

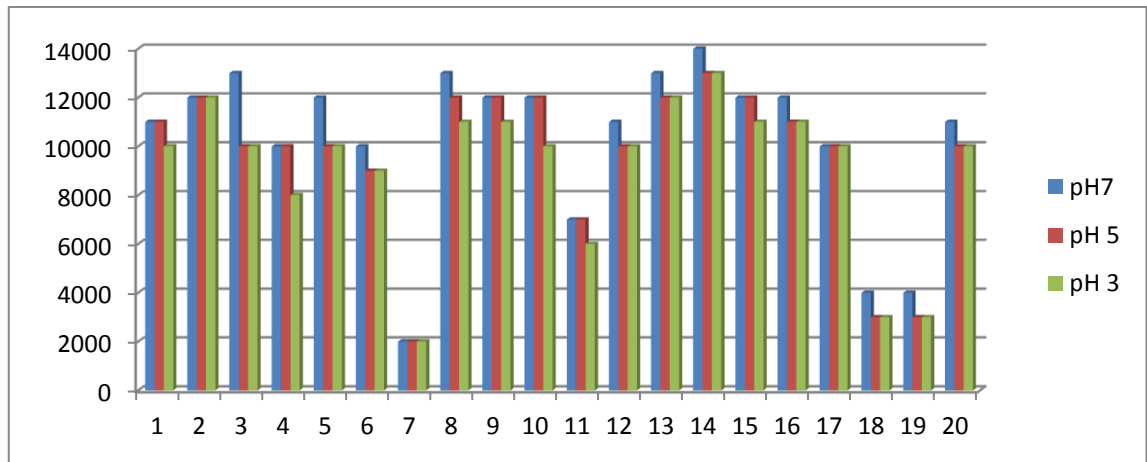
İzolat no	%0,5	%1
LB02.1	96,25	96,25
LB05.2	100,00	95,40
LB14.3	100,00	96,77
LB16.3	100,00	95,24
LB20.2	95,71	95,71
LB26.1	100,00	95,89
LB35.1	100,00	94,00
LB46.1	89,55	89,55
LB49.3	95,71	95,71
LB03.2	100,00	94,03
LB04.1	92,98	87,72
LB11.1	100,00	95,24
LB13.1	100,00	96,25
LB15.3	96,39	96,39
LB21.1	95,71	95,71
LB23.2	94,81	90,91
LB30.1	100,00	95,71
LB32.2	100,00	95,00
LB37.1	100,00	95,24
LB45.1	92,98	92,98
LB50.1	94,03	94,03

4.4. İzolatların pH Toleranslarının Belirlenmesi

İzolatların pH toleransının belirlenmesi pH 3 ve pH 5'te canlılıklarını muhafaza etme oranlarının belirlenmesi suretiyle incelendi. Test sonucunda canlı bakteri sayımı yapılarak, izolatların pH toleransları belirlendi. Test sonuçları Tablo 7 ve Tablo 8 ile Şekil 9 ve Şekil 10'da sunuldu.

Tablo 7. *E.faecium* izolatlarının pH tolerans testi sonuçları (log kob/ml)

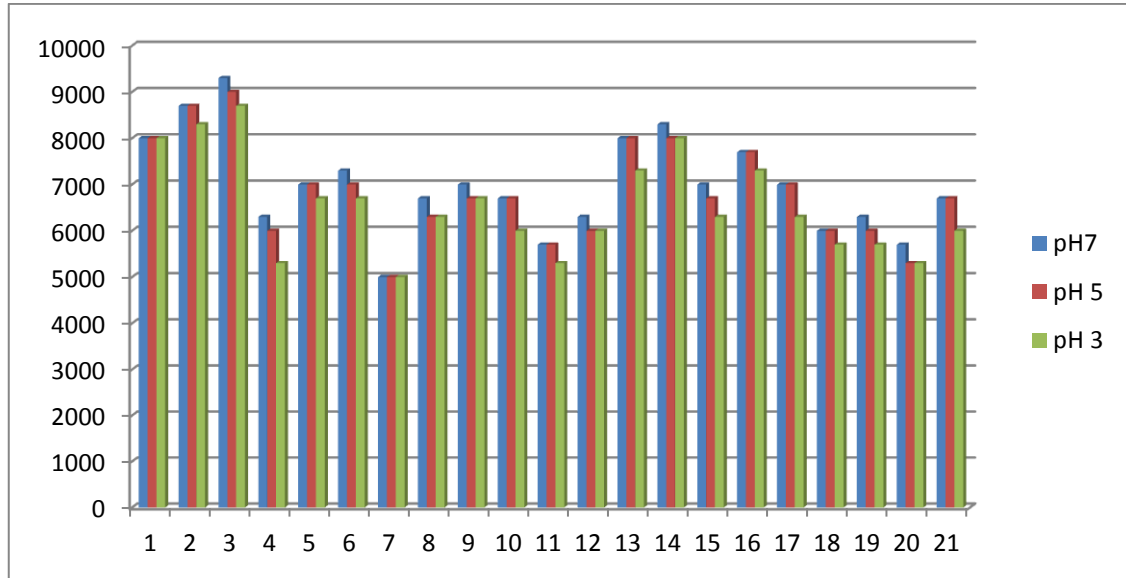
İzolat no	pH 3	pH 5	pH 7
EFM01.1	4,00	4,04	4,04
EFM02.1	4,08	4,08	4,08
EFM05.2	4,00	4,00	4,11
EFM10.8	4,00	4,00	3,90
EFM16.1	4,00	4,00	4,08
EFM18.3	3,95	3,95	4,00
EFM20.2	3,30	3,30	3,30
EFM21.1	4,04	4,08	4,11
EFM24.1	4,04	4,08	4,08
EFM27.2	4,00	4,08	4,08
EFM32.1	3,78	3,85	3,85
EFM34.2	4,00	4,00	4,04
EFM36.1	4,08	4,08	4,11
EFM37.1	4,11	4,11	4,15
EFM38.2	4,04	4,08	4,08
EFM39.1	4,04	4,04	4,08
EFM40.1	4,00	4,00	4,00
EFM41.3	3,48	3,48	3,60
EFM46.1	3,48	3,48	3,60
EFM49.2	4,00	4,00	4,04



Şekil 9. *E.faecium* izolatlarının pH tolerans testi sonuçlarının karşılaştırmalı analizi (kob/ml)

Tablo 8. *Lactobacillus* spp. izolatlarının pH tolerans testi sonuçları (log kob/ml)

İzolat no	Bakteri ismi	pH 3	pH 5	pH 7
LB02.1	<i>L. acidophilus</i>	3,90	3,90	3,90
LB05.2	<i>L. acidophilus</i>	3,92	3,94	3,94
LB14.3	<i>L. acidophilus</i>	3,94	3,95	3,97
LB16.3	<i>L. acidophilus</i>	3,72	3,78	3,80
LB20.2	<i>L. acidophilus</i>	3,83	3,85	3,85
LB26.1	<i>L. acidophilus</i>	3,83	3,85	3,86
LB35.1	<i>L. acidophilus</i>	3,70	3,70	3,70
LB46.1	<i>L. acidophilus</i>	3,80	3,80	3,83
LB49.3	<i>L. acidophilus</i>	3,83	3,83	3,85
LB03.2	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,78	3,83	3,83
LB04.1	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,72	3,76	3,76
LB11.1	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,78	3,78	3,80
LB13.1	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,86	3,90	3,90
LB15.3	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,90	3,90	3,92
LB21.1	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,80	3,83	3,85
LB23.2	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,86	3,89	3,89
LB30.1	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,80	3,85	3,85
LB32.2	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,76	3,78	3,78
LB37.1	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,76	3,78	3,80
LB45.1	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,72	3,72	3,76
LB50.1	<i>Lactobacillus</i> spp.	3,78	3,83	3,83



Şekil 10. *Lactobacillus* spp. izolatlarının pH tolerans testi sonuçlarının karşılaştırmalı analizi (kob/ml)

Çalışmada incelenen izolatların pH tolerans testi sonrasında canlı kalma oranları hesaplandı. Test sonucunda canlı kalma oranları Tablo 9 ve Tablo 10'da sunuldu.

Tablo 9. *E.faecium* izolatlarının pH tolerans testi sonucunda canlı kalma oranları (%)

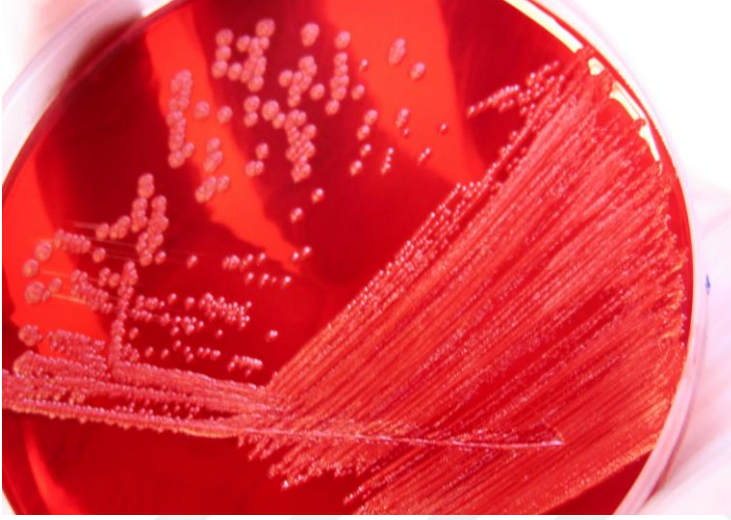
İzolat no	pH 5	pH 3
EFM01.1	100,00	90,91
EFM02.1	100,00	100,00
EFM05.2	76,92	76,92
EFM10.8	100,00	80,00
EFM16.1	83,33	83,33
EFM18.3	90,00	90,00
EFM20.2	100,00	100,00
EFM21.1	92,31	84,62
EFM24.1	100,00	91,67
EFM27.2	100,00	83,33
EFM32.1	100,00	85,71
EFM34.2	90,91	90,91
EFM36.1	92,31	92,31
EFM37.1	92,86	92,86
EFM38.2	100,00	91,67
EFM39.1	91,67	91,67
EFM40.1	100,00	100,00
EFM41.3	75,00	75,00
EFM46.1	75,00	75,00
EFM49.2	90,91	90,91

Tablo 10. *Lactobacillus* spp. izolatlarının pH tolerans testi sonucunda canlı kalma oranları (%)

İzolat no	pH 5	pH 3
LB02.1	100,00	100,00
LB05.2	100,00	95,40
LB14.3	96,77	93,55
LB16.3	95,24	84,13
LB20.2	100,00	95,71
LB26.1	95,89	91,78
LB35.1	100,00	100,00
LB46.1	94,03	94,03
LB49.3	95,71	95,71
LB03.2	100,00	89,55
LB04.1	100,00	92,98
LB11.1	95,24	95,24
LB13.1	100,00	91,25
LB15.3	96,39	96,39
LB21.1	95,71	90,00
LB23.2	100,00	94,81
LB30.1	100,00	90,00
LB32.2	100,00	95,00
LB37.1	95,24	90,48
LB45.1	92,98	92,98
LB50.1	100,00	89,55

4.5. İzolatların Hidrofobisitelerinin Belirlenmesi

İzolatların hidrofobisitelerinin belirlenmesi için % 0,03 Kongo Kırmızısı karıştırılmış katı besi yerlerine inokule edilen *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* izolatlarının tümünün inkübasyon süresi sonunda pembe-kırmızı koloniler oluşturduğu görüldü. Değerlendirme sonucunda tüm izolatlar pozitif olarak değerlendirildi. Bu sonuca göre izolatların hepsinin hidrofobik oldukları belirlendi (Şekil 11).



Şekil 11. İzolatların hidrofobisitelerinin belirlenmesi için yapılan Kongo Kırmızılı agarda pozitif sonuç

4.6. İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İzolatların antibiyotik dirençlilik/duyarlılık profilleri amoksisilin (25 µg), amoksisilin/klavulanik asit (20/10 µg), ampisilin (10 µg), enrofloksasin (5 µg), eritromisin (15 µg), linkomisin (2 µg), neomisin (30 µg), oksitetrasiklin (30 µg) ve trimetoprim/sulfametaksazol (1.25/23.75 µg) antibiyotik diskleri kullanılarak Kirby Bauer Disk Difüzyon testi ile belirlendi.

Lactobacillus spp. ve *E. faecium* izolatlarının incelenen antibiyotiklere karşı direnç profilleri Tablo 11-13'te gösterildi.

Tablo 11. *E.faecium* izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri

	AMP	N	AMC	OT	E	AX	EX	L	SXT
EFM01.1	R	R	R	S	I	S	I	R	S
EFM02.1	R	R	R	R	I	S	I	R	S
EFM05.2	R	R	R	R	R	I	I	R	S
EFM10.8	S	R	S	R	R	S	I	R	R
EFM16.1	R	R	R	R	R	I	R	R	S
EFM18.3	R	R	R	R	R	S	I	R	S
EFM20.2	R	R	R	R	R	I	I	R	R
EFM21.1	R	R	R	R	R	I	R	R	S
EFM24.1	R	R	R	R	R	I	R	R	R
EFM27.2	R	R	R	R	R	I	R	R	R
EFM32.1	R	R	R	R	R	I	R	R	R
EFM34.2	R	R	R	R	R	I	R	R	R
EFM36.1	R	R	S	S	R	I	I	R	S
EFM37.1	R	R	R	R	R	I	I	R	S
EFM38.2	R	R	R	R	R	I	I	R	I
EFM39.1	R	R	R	R	R	R	R	R	S
EFM40.1	R	R	R	R	R	R	R	R	I
EFM41.3	R	I	R	R	R	I	R	R	R
EFM46.1	R	R	R	R	R	S	R	R	R
EFM49.2	R	R	R	R	R	S	R	R	R

S: duyarlı; **I:** orta derecede duyarlı; **R:** dirençli; **AX:** amoksisilin; **AMC:** amoksisilin/klavulanik asit; **AMP:**ampisilin; **EX:** enrofloksasin; **E:** eritromisin; **L:** linkomisin; **N:** neomisin; **OT:** oksitetrasiklin; **SXT:** trimetoprim/sulfametaksazol.

Tablo 12. *Lactobacillus* spp. izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri

	AMP	N	AMC	OT	E	AX	EX	L	SXT
LB02.1	S	R	S	S	R	S	R	R	R
LB05.2	S	R	S	R	R	S	R	R	R
LB14.3	R	R	S	S	S	S	S	R	I
LB16.3	S	R	S	R	S	S	S	R	R
LB20.2	R	R	S	R	S	S	S	R	R
LB26.1	S	R	S	S	R	S	R	R	R
LB35.1	R	R	S	S	S	S	S	S	S
LB46.1	R	R	S	R	R	S	R	R	R
LB49.3	S	R	S	S	S	S	S	S	R
LB03.2	S	R	S	S	S	S	S	R	R
LB04.1	S	R	S	S	S	S	I	R	S
LB11.1	S	R	S	S	S	S	I	R	R
LB13.1	S	R	S	S	S	S	I	R	R
LB15.3	R	S	S	S	S	S	S	R	R
LB21.1	S	R	S	R	S	S	S	S	R
LB23.2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
LB30.1	S	R	S	R	S	S	S	R	I
LB32.2	S	R	S	S	S	S	S	R	I
LB37.1	S	R	S	R	S	S	R	R	I
LB45.1	S	R	S	S	S	S	R	R	R
LB50.1	S	R	S	S	R	S	R	R	R

S: duyarlı; **I:** orta derecede duyarlı; **R:** dirençli; **AX:** amoksisilin; **AMC:** amoksisilin/klavulanik asit; **AMP:**ampisilin; **EX:** enrofloksasin; **E:** eritromisin; **L:** linkomisin; **N:** neomisin; **OT:** oksitetrasiklin; **SXT:** trimetoprim/sulfametaksazol.

Tablo 13. Çalışma kapsamında izole edilen bakterilerin antibiyotik direnç profilleri

		AMP	N	AMC	OT	E	AX	EX	L	SXT
<i>E.faecium</i> (n=20)	S	1 (%5)	0 (%0)	2 (%10)	2 (%10)	0 (%0)	6 (%30)	0 (%0)	0 (%0)	9 (%45)
	I	0 (%0)	1 (%5)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%10)	12 (%60)	9 (%45)	0 (%0)	2 (%10)
	R	19 (%95)	19 (%95)	18 (%90)	18 (%90)	18 (%90)	2 (%10)	11 (%55)	20 (%80)	9 (%45)
<i>Lactobacillus</i> spp. (n=12)	S	11 (%91,7)	2 (%16,7)	12 (%100)	9 (%75)	11 (%91,7)	12 (%100)	6 (%50)	2 (%16,7)	2 (%16,7)
	I	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	3 (%25)	0 (%0)	3 (%25)
	R	1 (%8,3)	10 (%83,3)	0 (%0)	3 (%25)	1 (%8,3)	0 (%0)	3 (%8,3)	10 (%83,3)	7 (%58,3)
<i>L.acidophilus</i> (n=9)	S	5 (%55,6)	0 (%0)	9 (%100)	5 (%55,6)	5 (%55,6)	9 (%100)	5 (%55,6)	2 (%22,2)	1 (%11,1)
	I	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%11,1)
	R	4 (%44,4)	9 (%100)	0 (%0)	4 (%44,4)	4 (%44,4)	0 (%0)	4 (%44,4)	7 (%77,8)	7 (%77,8)

S: duyarlı; **I:** orta derecede duyarlı; **R:** dirençli; **AX:** amoksisilin; **AMC:** amoksisilin/klavulanik asit; **AMP:**ampisilin; **EX:** enrofloksasin; **E:** eritromisin; **L:** linkomisin; **N:** neomisin; **OT:** oksitetrasiklin; **SXT:** trimetoprim/sulfametaksazol.

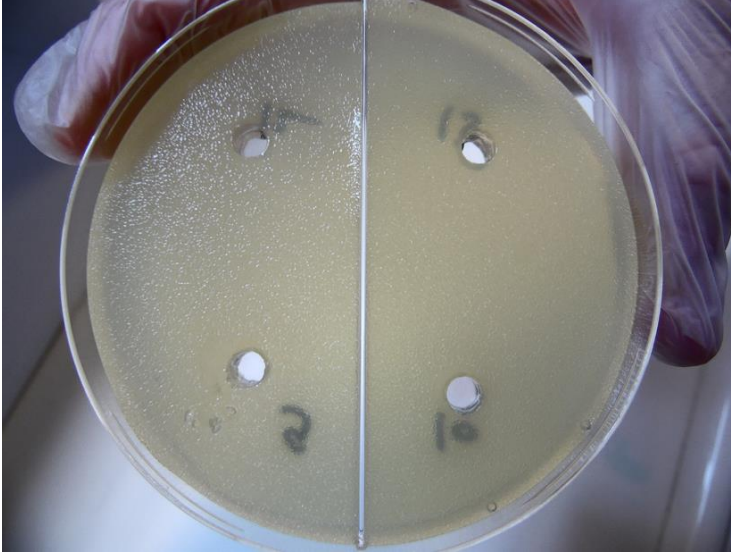
İzolatlar çoklu antibiyotik dirençliliklerine göre de değerlendirildi. İzolatların çoklu antibiyotik direnç profilleri Tablo 14’te sunuldu.

Tablo 14. İzolatların çoklu antibiyotik direnç profilleri

Dirençli bulunan antibiyotik (n)	<i>E.faecium</i> (n=20)	<i>L.acidophilus</i> (n=9)	<i>Lactobacillus</i> spp. (n=21)
0	—	—	1
1	—	—	—
2	—	2	4
3	—	1	7
4	2	1	3
5	2	3	4
6	4	1	1
7	4	1	1
8	8	—	—
9	—	—	—

4.7. İzolatların *E.coli*'ye Karşı *in vitro* Antagonistik Etkilerinin Belirlenmesi

İshalli tavuklardan izole edilmiş olan ve kültür koleksiyonumuzda bulunan patojen *E.coli* izolatına karşı, tavukların bağırsak mikroflorasından izole edilen bakterilerin antagonistik etkilerinin araştırılmasında Radyal Difüzyon yöntemi kullanıldı. Değerlendirme kuyucukların etrafında oluşan şeffaf inhibisyon zonlarının ölçümü ile gerçekleştirildi. Değerlendirme sonucunda izolatların bulunduğu kuyucuklar etrafında inhibisyon zonları görülmedi ve izolatların hiçbirisinin *E.coli*'ye karşı *in vitro* antagonistik etki göstermediği belirlendi (Şekil 12).



Şekil 12. *in vitro* antagonistik etkinin belirlenmesi için yapılan Radyal Difüzyon Testi sonucu.

5. TARTIŞMA

İnsan ve hayvanların bağırsaklarında patojen mikroorganizmalara karşı antagonistik etki gösteren, bağırsak mikroflorası üzerine yararlı etkiler oluşturan, patojen olmayan, Gram pozitif ve fakültatif anaerob, laktik asit üreten canlı doğal bağırsak bakterileri, maya kültürleri ve hücreleri ile mantarlar “probiyotikler” olarak tanımlanmaktadır. Probiyotik bakteriler, probiyotik canlı mikrobiyal kültürler ve mikroorganizmaların fermente ürünleri olarak 2 grup halinde incelenmektedir. Bu türler mide-bağırsak florasının önemli popülasyonunu oluşturmaktadır. Probiyotik bakterilerden olarak en yaygın kullanılanları laktik asit bakterileridir ve bunlar *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. ve *Bifidobacterium* spp.’dir. Laktik asit bakterileri dışında probiyotik olarak kullanılan diğer mikroorganizmalar ise *Bacillus* spp., *Saccharomyces* spp. ve *Aspergillus* spp.’dir (Tannock, 1997). Laktik asit bakterileri Gram-pozitif, genellikle hareketsiz, sporsuz, laktozdan fermentasyon sonucu laktik asit oluşturan ve genellikle katalaz ile oksidaz negatif bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Ringo ve Gatesoupe, 1998). Laktik asit bakterileri farklı ve olumsuz çevre koşullarına adapte olmuşlardır. Doğada yaygın olarak bulunurlar. Laktik asit bakterileri sıcakkanlı hayvanların bağırsak boşluğunda, süt ve süt ürünlerinde, deniz ürünleri ve bazı bitki yüzeylerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanım potansiyelinde oldukları bildirilmektedir. Bu bakteriler hayvanların gelişimini arttırabilirler, patojen bakterilerle rekabete girebilirler ve vücudun doğal bağışıklık mekanizmasını güçlendirebilirler (Vandenberg, 1993; Villamil ve ark., 2002).

Laktik asit bakterileri içerisinde yer alan laktobasiller; Gram pozitif, sporsuz, hareketsiz, katalaz negatif, fakültatif anaerob, çomak veya kokobasil şeklinde bakterilerdir (Gomes ve Malcata, 1999). Laktobasiller pH 3.0’e kadar tolerans gösterirler ve böylece düşük mide pH’sında canlılıklarını koruyarak, bağırsak kanalına geçip etkilerini burada gerçekleştirirler. Duodenumda safra tuzlarından etkilenmemektedirler. Wattkins ve Miller (1983)’ın germ-free broyler civcivlerde *L. acidophilus*’un sindirim sisteminde kolonize olduğu yerler ile ilgili yaptıkları bir çalışmada etkeni kursak, proventrikülüs ve duodenum epitelinde elektron mikroskop altında tespit etmişlerdir. Ayrıca, pek çok *Lactobacillus* suşu 45-48°C gibi yüksek ısı ve basınca nispeten dayanıklı olduğundan dolayı yem yapım işlemleri sırasında ısı ve

basınçtan etkilenmeyerek canlılıklarını koruyabilmektedirler (Hamdan, 1973; Shahani ve Ayebo, 1980; Gilliland, 1984). Bu çalışmada *Lactobacillus* spp. izolasyonu için selektif besi yerlerine yapılan ekim sonucunda 67 adet şüpheli bakteri izole edildi. Şüpheli bulunan bakterilerin identifikasyonu için yapılan PCR sonucunda şüpheli izolatlardan 21 adetinin *Lactobacillus* spp. olarak belirlendi. *Lactobacillus* spp. pozitif bulunan izolatların 9'u tür spesifik PCR ile *L.acidophilus* olarak identifiye edildi. *Lactobacillus* spp. olarak identifiye edilen 21 izolat probiyotik özelliklerinin araştırılması amacıyla seçildi.

Enterokoklar, sporsuz, Gram pozitif, katalaz negatif, fakültatif anaerob, 10°C ve 45°C'de, pH 9,6'da, %6,5 NaCl' de %40 safra tuzunda gelişebilen, kok şeklinde mikroorganizmalardır. *E. faecium* ve *E. faecalis*, bağırsak hastalıklarındaki etkileri nedeniyle geçmişte probiyotik olarak kullanılmıştır. Bakteriyosin üretimi gibi probiyotik olarak istenen mikrobiyolojik özelliklere sahip olsalar da, patojenlere antimikrobiyal direnç aktarımı gibi özelliklerinden dolayı kullanımları konusunda şüpheler bulunmaktadır. Bu bakterilerin hali hazırda kullanımda olan ticari formları bulunmaktadır (Mombelli ve Gismondo, 2000). Bu çalışmada *E. faecium* selektif izolasyonu için BEA'ya yapılan inokulasyon sonucunda 115 *Enterococcus* spp. şüpheli izolat belirlendi. İdentifikasyon için yapılan PCR sonucunda 20 adeti *E. faecium* olarak identifiye edildi. Belirlenen 20 izolat probiyotik özelliklerinin araştırılması için yapılan testlerde kullanılmak üzere seçildi.

Oral yol ile vücuda alınan mikroorganizmalar gastrointestinal sistemden geçişleri sırasında canlılıklarını korumalarını engelleyen bir takım faktörlere maruz kalırlar. Laktik asit bakterilerinin gastrointestinal sistemde canlılıklarını korumaları ince bağırsakta safra tuzuna ve düşük pH'ya dayanımlarına bağlıdır (Marteau ve ark., 1997). Bakteriler bağırsağa belli bir sayının üzerinde ve canlılıklarını korumuş olarak ulaşmalıdırlar. Probiyotiklerde aranan özelliklerden birisi de bu şekilde stabil olmaları, düşük pH ve safra tuzları gibi olumsuz çevre koşullarından etkilenmeden bağırsakta metabolize olmalarıdır. Probiyotik suş seçiminde dikkate alınması gereken safra konsantrasyonları konusunda araştırmacılar arasında farklı görüşler bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar % 10 gibi yüksek safra konsantrasyonunun test edilmesini savunurken, bazıları ise %0,5'e kadar toleransın olmasının yeterli olduğu görüşünü savunmaktadırlar (Nikoskelainen ve ark., 2001; Pérez-Sánchez ve ark., 2011a). Balıklarda yapılan bir

çalışmada, *Lactobacillus* suşlarının % 1 safra koşullarında 3 saat inkübasyonu takiben sayılarının değişmediğini belirlenmiştir (Pérez-Sánchez ve ark., 2011b). Benzer bir çalışmada, antagonistik etkili olduğu bilinen *Lactobacillus* suşları 1,5 saat süreyle % 2,5-10 konsantrasyonunda safraya maruz bırakılmış ve suşların hayatta kalabildikleri bildirilmiştir (Balcazar ve ark., 2008). Sabir ve ark. (2010) laktobasil suşlarının %0,3 konsantrasyonundaki safrayı % 72–92 arasında değişen oranlarda tolere ettiklerini saptamışlardır. Jin ve ark. (1998) tavuk bağırsağından elde ettikleri 12 *Lactobacillus* suşunun % 0,3'lük tavuk safrasına toleransını belirlemek için yaptıkları çalışmada, tolerans oranını belirtmeden suşlardan bazılarının safradan hafif etkilendiğini, büyük bir kısmının ise etkilenmediğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar çalışmada inceledikleri tüm suşların tavuk bağırsak ortamını tolere edebileceğini bildirmişlerdir. Shin ve ark. (2008) tavuk intestinal kanalından izole ettikleri *E. faecium*'un % 5'lik safra konsantrasyonuna toleranslı olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada izolatların safra toleransları, %0,5 ve %1,0'lik safra konsantrasyonlarında canlılıklarını muhafaza etmelerinin tespiti ile belirlenmiştir. Bu amaçla; her bir *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* izolatı ayrı ayrı olmak üzere test edilmiş ve tüm izolatların %0,5 ve %1,0'lık safra konsantrasyonlarında canlılıklarını korudukları ve test edilen safra konsantrasyonlarına dirençli oldukları belirlenmiştir.

Probiyotik olarak kullanımları düşünülen bakterilerin düşük pH değerlerine toleranslı olmaları, mideden geçişleri esnasında hayatta kalmalarını sağlamaktadır. Jin ve ark. (1998) tavuk bağırsağından elde ettikleri 12 *Lactobacillus* suşu için yaptıkları pH tolerans testinde çoğu suşun asit pH'ya toleranslı olduğunu bulmuşlar fakat oran bildirmemişlerdir. Araştırmacılar inceledikleri suşların pH 0,5-1,2'de düşük, pH 3'te orta ve pH 4-5'te yüksek oranda canlılıklarını sürdürdüklerini bildirmişlerdir. Shin ve ark. (2008) tavuk intestinal kanalından izole ettikleri *E. faecium* ile diğer aday probiyotik bakterilerin pH 3'te canlılıklarını sürdürme oranlarını incelemişler ve *E. faecium*'un pH 3'e diğer bakterilere göre daha dayanıklı olduğunu rapor etmişlerdir. Sabir ve ark. (2010) pH 3,5 gibi asidik bir ortamda laktik asit bakterilerinin canlılıklarını %85-96'lık bir oranda koruduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada izolatların pH toleransının belirlenmesi pH 3 ve pH 5'te test edilmiştir. Test sonucunda canlı bakteri sayımı yapılarak, izolatların pH toleransları belirlenmiştir. Tüm izolatların

pH 3 ve pH 5'te canlılıklarını korudukları ve test edilen pH koşullarına dirençli oldukları belirlenmiştir.

Bakterilerin bağırsaktaki epitel yüzeylere adezyonu ve kolonizasyonu, immün sistem aktivasyon ve patojenlere karşı antagonistik aktivitenin ön şartı olarak gösterilmektedir. Bu nedenle adezyon, probiyotik seçiminin asıl kriteri olarak kabul edilmektedir. Probiyotik bakterilerin bağırsağa ulaşması sonrasında, bağırsaktaki peristaltik hareketler ile bağırsaktan atılmaması için bağırsak epitel hücrelerine tutunması gerekmektedir. Probiyotik bakterilerin adezyonu aynı zamanda gastrointestinal sistemi etkileyen enfeksiyonların önlenmesi için de önemlidir. Probiyotiklerin patojen mikroorganizmalara karşı intestinal sistemde bir bariyer oluşturarak, epitel hücrelerin bu mikroorganizmalarla bağlanma derecesini azalttığı düşünülmektedir. Bu nedenle de bağırsak epitelyum hücrelerine adezyon yeteneği, potansiyel probiyotik suşlar için önemli bir özelliktir. Laktik asit bakterileri sahip oldukları çeşitli yüzey determinantları sayesinde intestinal epitel hücrelere adeze olabilmektedir. Laktik asit bakterilerinin adezyonunun pasif kuvvetler, elektrostatik ilişkiler, hidrofobisite, sterik kuvvetler, lipoteikoik asit ve lektinlerle kaplı özgün yapılarla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Servin ve Coconnier, 2003). *L. acidophilus* suşlarının adezyonunda proteaza dirençli ve bakteri yüzeyi ile bağlantılı bakteriyel bileşik görev almaktadır (Greene ve Klaenhammer, 1994). Hidrofobisitenin bakterilere kazandırdığı en önemli özellik mikroorganizmaların epitel yüzeylere tutunmasını sağlamasıdır. Bakterilerin hidrofobik özellikte olmaları, bağırsak epitel hücrelerine tutunma kabiliyetlerinin olduğunu göstermektedir (An ve Friedman, 2000; Rinkinen ve ark., 2004). Pan ve ark. (2006) inceledikleri laktik asit bakterilerinin bağırsak epitel hücrelerine tutunma yeteneklerinin olduğunu ve hidrofobik suşların güçlü bir tutunma kabiliyeti gösterdiğini bildirmişlerdir. Pérez-Sánchez ve ark. (2011a), inceledikleri balık izolatu laktobasil suşlarının tamamının hidrofobik özellikte olduklarını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada bakterilerin intestinal mukozaya tutunma yetenekleri, hidrofobisite özelliklerinin incelenmesi ile belirlenmiştir. İzolatların hidrofobisite özelliklerinin belirlenmesi için % 0,03 Kongo Kırmızısı karıştırılmış besi yerlerine inokule edilen *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* izolatlarının tümünün inkübasyon süresi sonunda pembe-kırmızı koloniler oluşturduğu görülmüştür. Değerlendirme sonucunda tüm izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiş ve hidrofobik oldukları belirlenmiştir. Bu sonuç da

incelediğimiz izolatların tamamının intestinal mukozaya tutunma özelliğinde olduğunu göstermiştir.

Probiyotik olarak kullanılacak bakterilerde aranan özelliklerden birisi de antibiyotiklere dirençli olmalarıdır. Diyare gibi antibiyotik kullanımına bağlı olarak ortaya çıkabilen hastalıklarda bağırsak florasını düzenlemek amacı ile probiyotikler kullanılmaktadır. Dolayısı ile uygulanacak probiyotik bakterilerinin bağırsaktaki antibiyotiklerden etkilenmemeleri gerekmektedir. Aynı şekilde hasta hayvanların bağırsaklarında antibiyotik metabolitleri de bulunabilmektedir. Bu nedenle sadece antibiyotiğe dirençli olan probiyotik bakteri suşları bağırsaklarda kolonize olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda laktik asit bakterilerinin bağırsak sisteminde antibiyotiğe dirençli patojenlerin plazmidlerini parçaladıkları belirlenmiştir (Tannock, 1997). Laktik asit bakterileri antimikrobiyel dirençlilikler sayesinde bağırsaklarda istenmeyen bakterilerin çoğalma hızını kontrol ederek mikrofloranın dengede olmasını sağlarlar. Bu çalışmada izole edilen bakterilerin amoksisilin, amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin, enrofloksasin, eritromisin, linkomisin, neomisin, oksitetrasiklin ve trimetoprim/sulfametaksazol antibiyotiklerine karşı direnç durumları incelenmiştir. *E. faecium* izolatlarının %95'i ampisilin ve neomisine, %90'ı eritromisin, amoksisilin/klavulanik asit ve oksitetrasikline, %80'i linkomisine, %55'i enrofloksasine, %45'i de trimetoprim/sulfametaksazola ve %10'u amoksisiline karşı dirençli bulundu. Aarestrup ve ark. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada broyler tavuklarından izole edilen *E.faecium* izolatlarında avilamisin (%35), glikopeptit (%10), vankomisin (%17), eritromisin (%74), tetrasiklin (%32), kanamisin (%1) ve streptomisin (%3)'e direnç saptanmıştır. Dilik ve İstanbulluoğlu (2010) tarafından gerçekleştirilen çalışmada entansif broyler işletmeleri ile kırsal tavukçuluk işletmelerinde 400 örnek incelenmiş ve izole edilen suşların penisiline % 5,6, tetrasikline % 72, eritromisine % 59,3, enrofloksasine ,% 8,7, rifampine % 10,9, vankomisine % 0,4, yüksek düzey streptomisin ve gentamisine % 6,5 ve % 23,1 oranında dirençli oldukları saptanmıştır. Suşların % 100'ünün ise linezolid ve teikoplanin antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bu araştırmada izolatlar çoklu antibiyotik dirençliliklerine göre de değerlendirilmiştir. Buna göre 20 adet *E. faecium* izolatının 2 tanesi 4 antibiyotiğe, 2 tanesi 5 antibiyotiğe, 4 tanesi 6 antibiyotiğe, 4 tanesi 7 antibiyotiğe ve 8 tanesi 8 antibiyotiğe karşı dirençli olarak bulundu. Bu

sonuçlar çalışmada izole edilen *E. faecium* izolatlarından çoklu antibiyotik direnci gösterenlerin probiyotik olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğunu gösterdi.

Bu çalışmada izole edilen *Lactobacillus* spp. izolatlarının %83,3' linkomisin ve neomisine, %58,3' de trimetoprim/sulfametaksazola, %25'i oksitetrasikline ve %8,3' ampisilin, enrofloksasin ve eritromisine karşı dirençli bulunmuşlardır. İzolatların tamamının amoksisilin ve amoksisilin/klavulanik asite duyarlı olduğu belirlendi. *L. acidophilus* izolatlarının ise %44,4' ampisiline, %44,4' enrofloksasin, oksitetrasiklin ve eritromisine, %77,8'i linkomisine, %100' neomisine ve %77,8'i de trimetoprim/sulfametaksazola karşı dirençli bulundu. İzolatların tümünün amoksisilin ve amoksisilin/klavulanik asite karşı ise duyarlı olduğu tespit edildi. Turhan ve Erginkaya (2016) tarafından ticari probiyotik örneklerinden *Lactobacillus* spp. ve *L. acidophilus* suşlarının antibiyotik direnç durumlarını belirlemek için yaptıkları araştırmada *Lactobacillus* spp. izolatlarında vankomisin (%20), tetrasiklin (%20), ampisilin (%20), gentamisin (%20) ve siprofloksasine (%80) karşı direnç saptamışlardır. Suşların eritromisin, kloramfenikol ve nitrofurantoine ise %100 oranında duyarlı oldukları belirlenmiştir. *L. acidophilus* izolatlarında ise gentamisin (%25) ve siprofloksasine (%75) karşı dirençli saptanırken, tüm *L. acidophilus* izolatlarının vankomisin, eritromisin, tetrasiklin, ampisilin, kloramfenikol, ripamfislin ve nitrofurantoin'e duyarlı oldukları bildirilmiştir. Lonkar ve ark. (2005) tavuklardan izole ettikleri *Lactobacillus* suşlarında yaptıkları antibiyogram sonucunda ampisiline %96,49, amoksisiline % 98,24, kloramfenikole %94,74, siprofloksasine %3,5, seftriaksona %45,61, sefaleksine %75,44, kloksasilin'e %63,16, furazolidona %10,53, gentamisine % 38,59, metronidazola % 38,59, neomisine % 3,5, norfloksasine % 3,5, penisilin-G'ye % 98,24, pefloksasine % 3,5, streptomisine %17,54, sulphamethaksazola %1, tetrasikline %8,77, trimethoprime %14,04 oranında duyarlılık saptamışlardır. İzolatların tümünün nalidiksik asite dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Karahan ve akmakı (1995), civciv kr bağırsaklarından izole edilen 40 *actobacillus* spp.'nin 20 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıklarını incelemişler ve suşların tamamının amoksisilin, ampisilin ve karbenisiline, büyük bir kısmı ise penisilin, kloramfenikol, eritromisin, novobiyosin, rifampisin ve tetrasikline duyarlı bulmuşlardır. Buna karşılık suşların tamamında polimiksin B'ye direnç saptamışlardır. Basitrasin, gentamisin, kanamisin, nistatin, spektinomisin'e karşı ise %75-92,5 arasında direnç bildirilmiştir. Bu çalışmada

izolatlar çoklu antibiyotik dirençliliklerine göre de değerlendirildi. *Lactobacillus* spp. izolatlarının (n=12) 1 tanesinde incelenen antibiyotiklerden hiçbirisine direnç saptanmamışken, 2 tanesi 2 antibiyotiğe, 6 tanesi 3 antibiyotiğe, 2 tanesi 4 antibiyotiğe ve 1 tanesi 5 antibiyotiğe dirençli olarak değerlendirildi. *L.acidophilus* izolatlarının (n=9) 2 tanesi 2 antibiyotiğe, 1 tanesi 3 antibiyotiğe, 1 tanesi 4 antibiyotiğe, 3 tanesi 5 antibiyotiğe, 1 tanesi 6 antibiyotiğe ve 1 tanesi 7 antibiyotiğe karşı dirençli bulunmuşlardır. Probiyotik olarak kullanım potansiyeli açısından değerlendirildiği zaman bu sonuçlar çalışmamızda izole edilen *Lactobacillus* spp. izolatlarından çoklu antibiyotik direnci belirlenmiştir. Çoklu antibiyotik direnci gösteren izolatların probiyotik olarak kullanılabilme potansiyeli olduğu kanısına varılmıştır.

Potansiyel probiyotiklerin belirlenmesi için gerçekleştirilen çalışmaların çoğu laboratuvar ortamında inhibitör aktivitenin test edilmesini kapsamaktadır. Bu amaçla gerçekleştirilen tüm metotlar, bir bakterinin ürettiği hücre dışı maddenin kendisine ve diğer bakterilere karşı oluşturduğu inhibitör etkinin araştırılması prensibine dayanmaktadır. İnhibitör aktivitenin *in vitro* koşullarda test edilmesi katı besi yerinde indikatör bakterilerin gelişiminin engellenme durumunun belirlenmesi esasına dayanan *in vitro* antagonizm testidir (Kesarcodi ve ark., 2008). Bu testte patojenler, aday probiyotiklere ya da onların sıvı ya da katı ortamdaki hücre dışı ürünlerine maruz bırakılmaktadır. Bu metot ile bir çok probiyotik bakteri belirlenmiş olmasına rağmen, bu metodun ticari amaç için kullanımını sınırlayan iki faktör bulunmaktadır. Bunlardan ilki, probiyotiklerin etki mekanizmalarının diğer şekillerinin laboratuvarda agar kullanımı ile incelenememesidir. Diğer dezavantaj ise, laboratuvarda pozitif olarak alınan sonuçların canlı üzerinde etkilerinin belirlenmesi konusunda yaşanan başarısızlıklardır. Probiyotik bakteriler *in vitro* koşullarda antagonistik etkiye sahip olarak bulunmasına rağmen, *in vivo* koşullarda koruyucu bir etki göstermeyebilir. Bunun tam tersi de söz konusudur. Bazı bakteriler *in vitro* olarak etkili bulunmamasına rağmen, *in vivo* koşullarda koruyucu bir etki gösterdiği bildirilmiştir (Kesarcodi ve ark., 2008).

Geçmişte probiyotik organizmaların patojen organizmaları inhibe etmesi için tek yolun bağlanma alanları için yarış (kompetatif eksklüzyon) olduğu düşünülmekteydi. Başlangıçta araştırmacılar laktik asit bakterileri tarafından üretilen laktik asitten dolayı bağırsak içeriğindeki düşük pH'ın inhibisyona neden olduğunu

düşünmekteydiler fakat daha sonra laktik asit pH'sının tek başına benzer inhibitör etkiye sahip olmadığı ortaya çıkmış ve diğer inhibitör metabolitlerin de etkili olduğu bildirilmiştir (Garriga ve ark., 1998). Probiyotik mikroorganizmalar, ürettikleri bakterisidal ya da bakteriostatik etki gösteren kimyasal maddelerle patojenik bakterilere karşı etki gösterirler. Laktik asit bakterileri organik asitler, hidrojen peroksit, karbondioksit, asetaldehit, bakteriyosin gibi bir çok antimikrobiyal bileşen üretmektedir. Bu bileşenler de bağırsaklarda istenmeyen bakterilerin çoğalma hızını kontrol ederler ve mikrofloranın dengede kalmasına olanak sağlarlar (Kuleaşan ve Çakmakçı, 2002). Bazı laktobasillerin hidrojen peroksit üreterek, *E. coli* O157:H7'nin üremesini engellediği bildirilmiştir (Ogawa ve ark., 2001). Laktobasillerin oksidasyon redüksiyon potansiyelini düşürmek sureti ile patojenlere karşı inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmektedir (Montes ve Pugh, 1983; Sogaard ve Jessen, 1990; Mulder, 1991). Son yıllarda araştırmacılar *L. acidophilus* tarafından üretilen ve *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* gibi patojenlere ve fungal etkenlere karşı antibakteriyel etki gösteren bileşiklerin var olduğunu rapor etmişlerdir (Shahani ve Ayebo, 1980; Fox, 1988; Kim ve ark., 1988). Ayrıca araştırmacılar tarafından asidofilin, laktolin, asidolin gibi bileşiklerin *Shigella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio* türlerine karşı *in vitro* inhibitör etkileri olduğu saptanmıştır (Montes ve Pugh, 1983; Dicks, 1993). Enterokoklar tarafından da nisin ve diplokokkin adlı antimikrobiyel maddelerin üretildiği bildirilmiştir (Owings ve ark., 1960; Mulder, 1991). Laktobasillerin *E.coli*'ye karşı anti-enterotoksin salgıladıkları ve *E.coli*'nin üremesini önledikleri belirlenmiştir (Sandine, 1979). Tavuklarda yapılan bir çalışmada intestinal kanaldan izole edilen 296 farklı laktik asit bakterisinin *E.coli* ve *S. enteriditis*'e karşı inhibisyonu *in vitro* koşullarda test edilmiştir. Bu laktik asit bakterilerininin 77 tanesinin en az birisine karşı inhibitör metabolit salgıladığı ve 35'inin de her iki patojene karşı da güçlü inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir (Garriga ve ark., 1998). Bu çalışmada ishalleri tavuklardan izole edilmiş olan ve kültür koleksiyonumuzda bulunan patojen *E.coli* izolatına karşı, tavukların barsak mikroflorasından izole edilen bakterilerin antagonistik etkileri Radyal Difüzyon yöntemi ile araştırıldı. İzolatlardan hiçbirisinin *E.coli*'ye karşı *in vitro* antagonistik etki göstermediği belirlendi. Literatür bilgilerinde bildirildiği üzere probiyotik bakteriler *in vitro* olarak etkili bulunmamasına rağmen, *in vivo* koşullarda koruyucu bir etki

gösterebilmektedirler. Dolayısı ile her ne kadar izolatlar *E.coli*'ye *in vitro* antagonistik etki göstermese de, *in vivo* olarak ta etkisinin araştırılması gerekliliği kanısına varılmıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımının oluşturduğu, başta antibiyotik dirençli bakteri popülasyonlarının artması gibi, önemli sorunlar nedeniyle son yıllarda biyogüvenlik uygulamaları kapsamında güvenle uygulanan yöntemlerin başında probiyotik uygulamaları yer almaktadır. Probiyotiklerin akut bir hastalığın tedavisinde antibiyotiklerin yerini alması düşünülmesi de koruyucu tedavide ve hayvanlarda büyümenin teşvik edilmesinde antibiyotiklere alternatif olarak kullanımı mümkün görülmektedir. Bu çalışmada potansiyel probiyotik bakterilerden olan *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium*'un sağlıklı tavuklardan izolasyonu ve izole edilen bakterilerin probiyotik olarak kullanılma potansiyelleri araştırıldı. Çalışma sonucunda tüm izolatların hidrofobik özellikte olduğu, safra (%0,5-1) ve düşük pH (3 ve 5)'ya dirençli olduğu fakat hiçbirisinin *E.coli*'ye karşı test edilen koşullarda etkili olmadığı belirlendi. *E.faecium* izolatlarından 8 tanesi 8 antibiyotiğe, *L.acidophilus* izolatlarından 1 tanesi 7 antibiyotiğe ve *L.acidophilus* haricindeki *Lactobacillus* spp. izolatlarından da 1 tanesinin 5 antibiyotiğe dirençli olduğu saptandı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda 8 *E.faecium*, 1 *L.acidophilus* ve 1 *L.acidophilus* haricindeki *Lactobacillus* spp. izolatının probiyotik olarak kullanılabilir özellikte olduğu düşünüldü.

Probiyotiklerin kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde koruyucu, tedavi edici, gelişimi arttırıcı olarak etkin bir şekilde kullanılabilmesi için, probiyotiklerin üretiminden karma yemde kullanımına kadar olan her aşamada pek çok unsura dikkat edilmelidir. Probiyotiklerin yeme katılması ve depolanması esnasında uzun süre canlılıklarını koruyabilmelerinin sağlanması ve diğer yem katkı maddeleri ile birlikte kullanılma olanaklarının araştırılması ve bu araştırma sonuçlarının da pratiğe aktarılması gerekmektedir.

Kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde kullanılmakta olan karma yemlerde probiyotik kullanımıyla çeşitli çalışmalar bulunmaktadır fakat yapılan çalışmalarda kullanılan bakteriler standart bakterilerdir. Tüm dünyada kullanılmakta olan bu bakteriler yerine, yerel ya da ulusal suşlarla çalışmalar yapılması ile etkinliğin artacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada elde edilen ulusal düzeydeki bakteriler ile etkinliğin *in vivo* ortamda da araştırılması gerekmektedir. Hedef hayvan üzerinde bu bakterilerin bağırsaktaki mukozal yüzeylere kolonizasyonu, çeşitli patojenlere karşı antogonistik aktivitenin ve

immün sistemin aktivasyonundaki rolünün belirlenmesi üzerine yapılacak daha ileri çalışmalar, izolatların probiyotik olarak kullanım potansiyelini ortaya çıkaracaktır.



KAYNAKLAR

- Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;37(2):127–137.
- Abdel-Daim A, Hassouna N, Hafez M, Ashor MS, Aboulwafa MM. Antagonistic activity of *Lactobacillus* isolates against *Salmonella typhi* *in vitro*. *Biomed Res Int* 2013;680605:12 pages.
- An Y, Friedman RJ. *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2000.
- Balcazar JL, Vendrell D, De Blas I, Ruiz-Zaruela I, Mu'zquiz JL, Girone's O. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 2008;278:188–191.
- Bangert RL, Cho BR, Widders PR. A survey of aerobic bacteria and fungi in the feces of healthy psittacine birds. *Avian Dis* 1988;32(1):46–52.
- Başığit G. Bazı laktik asit bakterilerinin probiyotik olarak kullanılma özellikleri, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. 2004, 96s, Isparta.
- Beach JR, Davis DE. The effect of feeding cultures of *Bacillus acidophilus*, lactose, dry skim-milk or whole milk on the hydrogen ion concentration of the ceca of chickens. *Hilgardia* 1925;1(8):145–166.
- Castagliuolo LM, Riegler MF, Valenick I, La Mont JT, Pathoulakis C. *Saccharomyces boulardii*; protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect Immun* 1999;67:302–307.
- CLSI. M02-A11 and M100-S23 Package - Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eleventh Edition&Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 2013; Twenty-Third Informational Supplement.
- Dicks LMT. Lactic acid bacteria: Understanding the microorganism. The keys to successful use in maximising anti-coliform and anti-*Salmonella* activity. In: *Biotechnology in the Feed Industry*. Proceeding of Alltech's Ninth Annual Symposium. 1993;151–168.
- Dilik Z, İstanbulluoğlu E. Studies on phenotyping and genotyping characterization of *Enterococcus* spp. isolated from extensive broiler farms and rural poultry establishments. *Bornova Vet Kont Araş Enst Derg* 2010;32(46):37–46.

- Dorrestein GM, Buitelaar MN, van der Hage MH, Zwart P. Evaluation of a bacteriological and mycological examination of psittacine birds. *Avian Dis* 1985;29(4):951–962.
- Douglas LC, Sanders ME. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. *J Am Dietetic Assoc* 2008;108:510–521.
- Dunne C, Murphy L, Flynn S, O’Mahony L, O’Halloran S, Feeney M, Morrissey D, Thornton G, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, Quigley EMM, O’ Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK. Probiotics: From myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999;76:279–292.
- Ezema C. Probiotics in animal production: A review. *J Vet Med Anim Health* 2013;5(11):308–316.
- Fox SM. Probiotics: intestinal inoculants for production animals. *Vet Med* 1988; 83:806–830.
- Fukata T, Hadare Y, Babo E, Arakawa A. Influence of bacteria on *Clostridium perfringens* infections in young chickens. *Avian Dis* 1991;35:224–227.
- Fuller R. Ecological studies on the lactobacillus flora associated with the crop epithelium of the fowl. *J Appl Bacteriol* 1973;36(1):131–139.
- Fuller R. A review. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989;66:365–378.
- Fuller R. Reasons for the apparent variation in the probiotic response. *Biologist* 2004; 51(4):232.
- Fuller R, Brooker BE. Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl. *Am J Clin Nutr* 1974;27(11):1305–1312.
- Garriga M, Pascual M, Monfort JM, Hugas M. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *J Appl Microbiol* 1998;84(1):125–132.
- Gibson GR, Roberfroid M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125:1401–1412.
- Gilliand SE. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary. *J Dairy Sci* 1984;67:3045–3051.
- Gomes MP, Malcata FX. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic. *Trend Food Sci Technol* 1999;10:139–157.
- Gönç S, Akalın A. Yoğurtta canlı olarak bulunan *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus bifidus*’un organizma ve sağlık üzerine etkisi. İzmir. 1995; Proje

No: VHAG-1168.

- Grene JD, Klaenhammer TR. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:4487–4494.
- Gülhan T, Boynukara B, Çiftci A, Söğüt MÜ, Fındık A. Characterization of *Enterococcus faecalis* isolates originating from different sources for their virulence factors and genes, antibiotic resistance patterns, genotypes and biofilm production. *Iranian J Vet Res* 2015;16(3):261–266.
- Hamdan IY. Growth, viability, and antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci* 1973;56:638.
- Harrison AP, Hansen PA. *Lactobacilli* from turkeys. *J Bacteriol* 1950;60(5):543–555.
- Hassanzadazar H, Ali E, Karim M, Javad H. Investigation of antibacterial, acid and bile tolerance properties of lactobacilli isolated from Koozeh cheese. *Vet Rese Forum* 2012;3(3):181–185.
- Hirayama K, Rafter J. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention: mechanistic considerations. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999;76:391–394.
- Hjelm M, Bergh O, Riaza A, Nielsen J, Melcheiørsen J, Jensen S, Duncan H, Ahrens P, Birkbeck H, Gram L. Selection and identification of autochthonous candidate probiotic bacteria from Turbot Larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units system. *Appl Microbiol* 2004;27:360-371.
- Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol* 2004;42(8):3558–3565.
- Jernigan MA, Miles RD, Araja AS. Probiotics in poultry nutrition. A review. *J World's Poult Sci* 1985;41:99–107.
- Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Lett Appl Microbiol* 1998;27(3):183–185.
- Kandler O, Weiss N. Genus *Lactobacillus* Beijerinck. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ed. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M. E. And Holt, J.G. Vol.2, 1986, pp.1209–1234.
- Karahan AG, Çakmakçı ML. Civciv körbağırsağından izole edilen bazı laktobasil suşlarının çeşitli antibiyotiklere dirençleri. *Tarım Bil Derg* 1995;1(1):7–12.
- Ke D, Picard FOJ, Martineau F, Me'nard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Development of a PCR Assay for Rapid Detection of Enterococci *J Clin Microbiol* 1999;37(11):3497–3503.

- Kesarcodi WA, Kaspar H, Lategan MLJ, Gibson L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanism of action and screening processes. *Aquaculture* 2008;274:1–14.
- Kim CJ, Namkung H, An MS, Paik IK. Supplementation of probiotics to the broiler diets containing moldy corn. *Korean J Anim Sci* 1988;30:542–548.
- Kuleaşan H, akmakçı ML. Laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinlerin tanımlanması, sınıflandırılması ve bunların bazı gıda kaynaklı patojenler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Doktora Tezi, 2002a, 79s, Ankara.
- Kung L. Microbes and enzymes. *Feed Int* 1990;11(8):10–16.
- Leroy F, deVuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trend Food Sci Technol* 2004;15:67–78.
- Lonkar P, Harne SD, Kalorey DR, Kurkure NV. Isolation, *in vitro* antibacterial activity, bacterial sensitivity and plasmid profile of Lactobacilli. *Asian-australasian J Anim Sci* 2005;18(9):1336–1342.
- Lyons TP. Probiotics: An alternative to antibiotics. *Bovine Pract* 1988;23:65–69.
- Markiewicz L, Biedrzycka E. Identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species with PCR applied to quality control of fermented dairy beverages. *Polish J Food Nutr Sci* 2005; 55(4):359–365.
- Marteau P, Minekus M, Havenoer R, Veld JHJ. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: Validation and the effects of bile. *J Dairy Sci* 1997;80:1031–1037.
- Mombelli B, Gismondo MR. The use of probiotics in medical practise. *Antimicrob Agent* 2000;16:531–536.
- Montes AJ, Pugh DG. The use of probiotics in food-animal practice. *Vet Med* 1983;88:282–288.
- Morishita Y, Mitsuoka T, Kaneuchi C. Specific establishment of lactobacilli in the digestive tract of germ-free chickens. *Jpn J Microbiol* 1971;15(6):531–538.
- Mulder RAW. Probiotics as a tool against *Salmonella* contamination. *Misset-World Poult* 1991;7(3):36–37
- Nikoskelainen S, Salminen S, Bylund G, Ouwehand A. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:2430–2435.

- Nurmi E, Rantala M. New aspects of Salmonella infection in broiler production. *Nature* 1973;241(5386):210–211.
- Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K. Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *Int J Food Microbiol* 2001;68:135–140.
- Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int Dairy J* 1999;9:43–52.
- Owings WS, Reynolds DL, Hasiak RS, Ferket PR. Influence of dietary supplementation with *Streptococcus faecium* M-74 on broiler body weight, feed conversion, carcass characteristics, and intestinal microbial colonization. *Poult Sci* 1960;69:1257–1264.
- Pan WH, Li PL, Liu Z. The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians faeces. *Food Microbiol* 2006;12:148–152.
- Perez-Sanchez T, Balcazar JL, Garcia Y, Halaihel N, Vendrell D, DeBlas I, Merrifield DL, Ruiz-Zarzuola I. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *J Fish Dis* 2011a;34:499–507.
- Perez-Sanchez T, Balcazar JL, Merrifield DL, Carnevali O, Gioacchini G, DeBlas I, Ruiz-Zarzuola I. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish Shellfish Immunol* 2011b;31(2):196–201.
- Rastall RA, Gibson GR, Gill HS. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiol Ecol* 2005;52:145–152.
- Ringo E, Gatesoupe FJ. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 1998;160:177–203.
- Rinkinen ML, Koort JMK, Ouwehand AC, Westermarck E, Björkroth KJ. *Streptococcus alactolyticus* is the dominating culturable lactic acid bacterium species in canine jejunum and feces of four fistulated dogs. *FEMS Microbiol Lett* 2004;230:35–39.
- Sabir F, Beyatli Y, Cokmus C, Onal-Darilmaz D. Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. strains isolated from kefir. *J Food Sci* 2010;75:568–573.
- Sahadeva RPK, Leong SF, Chua KH, Tan CH, Chan HY, Tong EV, Wong SYW, Chan, HK. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *Int Food Res J*

- 2011;18(4):1515–1522.
- Sainsbury DBW. Protecting against stress. *World Poult* 1991;8(10):47–49.
- Sanders ME. Probiotics. *Food Technol* 1999;53:67–77.
- Sandine WE. Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. *J Food Prot* 1979;42:259–262.
- Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opin Biotechnol* 2005;16:204–211.
- Schleifer KH. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 1987;46:201–203.
- Servin AL, Coconnier MH. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17(5):741–754.
- Shahani KM, Ayebo AD. Role of dietary *Lactobacilli* in gastrointestinal microecology. *Am J Clin Nutr* 1980;33:2448–2457.
- Sharma KK, Soni SS, Meharchandani S. Congo red dye agar test as an indicator test for detection of invasive bovine *Escherichia coli*. *Veterinarski Arhiv* 2006;76:363–366.
- Shin MS, Han SK, Ji AR, Kim KS, Lee WK. Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use. *J Applied Microbiol* 2008;105(6):2203–2212.
- Sieladie DJ, Zambou NF, Kaktcham PM, Cresci A, Fonteh F. Probiotic properties of *Lactobacilli* strains isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon. *Innov Romanian Food Biotechnol* 2011;9:12-28.
- Simmering R, Blaut M. Pro- and prebiotics—the tasty guardian angels? *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;55(1):19–28.
- Smith WH. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *J Pathol Bacteriol* 1965;90(2):495–513.
- Sogaard H, Jessen TS. Beyond lactic acid bacteria. *Feed Int* 1990;11(4):32–38.
- Strompfová V, Lauková A, Ouwehand AC. Selection of enterococci for potential canine probiotic additives *Vet Microbiol* 2004;100:107–114.
- Sul SY, Hyun-Joong K, Tae-Woon K, Hae-Yeong K. Rapid identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in probiotic products using Multiplex PCR. *J Microbiol Biotechnol* 2007;17(3):490–495.

- Suzuki K, Kodama Y, Mitsuoka T. Stress and intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora* 1989;8:23–38.
- Tannock GW. Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental. *R&D Tibtech* 1997;15:270–274.
- Tournut J, Anadon A, Raynaud JP. Prevention of enteritis in calves with probiotics/microbial bioregulators. Rationale and Targets. In: Tamo I. 15 th world Buiatnes Congress.II-14 de Octobre 1988. Palma de Mollorca Espana, 390–396.
- Turhan EÜ, Erginkaya Z. Determination of antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolates of probiotic foods. *Pamukkale Univ Muh Bilim Derg* 2016;22(7):620–624.
- Vanbelle N, Teller E, Focant M. Probiotics in animal nutrition: a review. *Arch Anim Nutr* 1990;40:543–567.
- Vandenbergh P. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol Rev* 1993;12:221–238.
- Villamil L, Tafalla C, Figueras A, Novoa B. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1318–1323.
- Watkins BA, Miller BF. Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. *Poult Sci* 1983;62:1772–1779.
- Williams GM, Wynder EL. Diet and cancer: A synopsis of causes and prevention stratagies. In ‘Nutrition and Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1996.
- Yalçın S, Çiftçi İ, Önal AG, Yılmaz A. Tuyem, 3. Uluslararası Yem Kongresi Ve Yem Sergisi, Ankara, 1996;30–33.
- Yıldırım Z, Yıldırım M. Probiyotik özellik gösteren bifidobakteriler. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Ed. M. Demirci), Tekirdağ, 2000; 266–271.
- Yılsay TÖ, Kurdal E. Probiyotik süt ürünlerinin beslenme ve sağlık üzerindeki etkisi. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Ed. M. Demirci), Tekirdağ, 2000; 279–286.
- Zhou JS, Shu Q, Rutherford KJ, Prasad J, Birtles MJ, Gopal PK, Gill HS. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/ c mice. *Int J Food Microbiol* 2000;56:87–96.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Yağmur KOÇAK

Doğum Yeri: Osmangazi/Bursa

Doğum Tarihi: 27.06.1990

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Başaran İlköğretim Okulu (1997-1999)

Kuleli İlköğretim Okulu (1999-2004)

Yenibosna Lisesi (2004-2008)

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2009-2015)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: -

E-posta: ygmrkck@gmail.com