



**TAVUK BAĞIRSAĞI KAYNAKLI LAKTOBASİLLERDEN ELDE
EDİLEN EKZOPOLİSAKKARİTLERİN KARAKTERİZASYONU,
ANTİBİYOFİLM, ANTİ-QUARUM SENSİNG VE ADEZYON
ETKİLERİNİN BELİRLENEREK PREBİYOTİK
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Seda BİKRİÇ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2019

Seda BİKRIÇ tarafından hazırlanan “TAVUK BAĞIRSAĞI KAYNAKLI LAKTOBASİLLERDEN ELDE EDİLEN EKZOPOLİSAKKARİTLERİN KARAKTERİZASYONU, ANTİBİYOFİLM, ANTİ-QUARUM SENSİNG VE ADEZYON ETKİLERİNİN BELİRLENEREK PREBİYOTİK POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Belma ASLİM

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

Başkan: Prof. Dr. Münevver ARISOY

Temel Tıp Bilimleri Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

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

.....

Üye: Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

Tez Savunma Tarihi: 28/06/2019

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

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

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

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

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

Seda BİKRİÇ

28/06/2019

TAVUK BAĞIRSAĞI KAYNAKLI LAKTOBASİLLERDEN ELDE EDİLEN
EKZOPOLİSAKKARİTLERİN KARAKTERİZASYONU, ANTİBİYOFİLM,
ANTİ-QUARUM SENSİNG VE ADEZYON ETKİLERİNİN BELİRLENEREK
PREBİYOTİK POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Seda BİKİRİÇ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2019

ÖZET

Bu çalışmada tavuk bağırsağı kaynaklı laktobasillerden elde edilen ekzopolisakkaritlerin (EPS) ve kültür filtratlarının, tavuk bağırsak florasını düzenleyici bir prebiyotik olarak kullanım potansiyelinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Serbest gezen köy tavuklarının bağırsaklarından izole edilmiş laktobasillerden yüksek EPS üreticisi suşlar seçilerek, EPS üretiminde verimi artırıcı karbon/azot kaynakları ve kombinasyonları belirlenmiştir. EPS üretiminde öne çıkan *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen liyofilize EPS (L-EPS)'lerin karakterizasyonları, HPLC, NMR ve SEC analizleri ile ortaya konulmuştur. Yine bu suşların kültür filtratlarının ve L-EPS'lerinin antibiyofilm, antimikrobiyal ve anti-quarum sensing etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, *L. salivarius* BIS312 suşunun HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücre hattında adezyon yeteneği araştırılmış ve bu suşun L-EPS'sinin ve kültür filtratının da adezyon üzerine etkisi test edilmiştir. Kültür ortamında en yüksek EPS üretimi, *L. salivarius* BIS312 (532 mg/L) suşunda belirlenirken, bu suşun %2 laktoz ve %1 tripton ile zenginleştirilmiş besiyerinde daha yüksek oranda EPS ürettiği (702 mg/L) tespit edilmiştir. *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarının L-EPS'lerinin 10^4 - 10^6 aralığında molekül ağırlığına sahip olduğu ve yapısında 4 çeşit monomer bulunduğu belirlenmiştir. İki suşun tüm uygulamaları, test bakterileri üzerinde kuvvetli antibiyofilm etkisi göstermiştir. Antimikrobiyal aktivite çalışmasında L-EPS'lerin etkin olmadığı belirlenirken, *L. salivarius* BIS312 suşunun kültür filtratının diğer suşa göre yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Anti-quarum sensing çalışmasında ise kültür filtratlarının etkin olmadığı ancak, *L. salivarius* BIS722 suşunun L-EPS'sinin diğer suşa göre daha yüksek etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu farklılıkların, iki suşun L-EPS'sinin karakteristik yapılarından kaynaklandığı söylenebilir. L-EPS'lerin anti-quarum sensing mekanizmasıyla, kültür filtratlarının antimikrobiyal etkiyle antibiyofilmde etkin oldukları sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca, *L. salivarius* BIS312 suşunun L-EPS'si ve kültür filtratı, bu suşun HT-29 hücrelerine adezyon yeteneğini önemli ölçüde artırmıştır. Çalışmalar sonucunda, kanatlı yemlerinde probiyotik kaynaklı ve karakterize edilmiş L-EPS'lerin kullanımının yeni bir yaklaşım olabileceği sonucu elde edilmiştir.

Bilim Kodu	: 20309
Anahtar Kelimeler	: <i>Lactobacillus salivarius</i> , Ekzopolisakkarit, Antibiyofilm, Anti-quarum sensing, Adezyon, Prebiyotik
Sayfa Adedi	: 128
Danışman	: Prof. Dr. Belma ASLİM

INVESTIGATING THE PREBIOTIC POTENTIAL OF EXOPOLYSACCHARIDES
OBTAINED FROM CHICKEN INTESTINE ORIGINATED LACTOBACILLI
BY DETERMINING THEIR CHARACTERIZATION, ANTIBIOFILM,
ANTI-QUORUM SENSING, AND ADHESION EFFECTS

(M. Sc. Thesis)

Seda BİKRIÇ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2019

ABSTRACT

In the present study it was aimed to determine the potential use of exopolysaccharides (EPS), and culture filtrates obtained from lactobacilli isolated from chicken intestine as a prebiotic regulating chicken intestinal flora. By selecting high EPS-producing strains among lactobacilli obtained from intestines of freely moving village chickens, carbon/nitrogen sources and combinations promoting productivity in EPS production were determined. The characterization of lyophilized EPSs (L-EPSs) obtained from *L. salivarius* BIS312 and BIS722 strains which are considered as the prominent EPS producers were performed by HPLC, NMR, and SEC analyses. These strains' culture filtrates' and L-EPSs' antibiofilm, antimicrobial, and anti-quorum sensing effects were also studied. Additionally, the adhesive ability of *L. salivarius* BIS312 strain in an HT-29 colorectal adenocarcinoma cell line and the effects of the L-EPS, and culture filtrates of this strain on adhesion were also tested. The highest EPS yield in culture medium was observed with *L. salivarius* BIS312 (532 mg/L) strain that was determined to produce a higher amount of EPS (702 mg/L) in a culture medium enhanced with 2% lactose and 1% tryptone. *L. salivarius* BIS312 and BIS722 strains' L-EPSs were found to have a molecular weight of 10^4 - 10^6 and to contain 4 types of monomers in their structure. All applications of both strains showed a strong antibiofilm effect on test bacteria. While the antimicrobial activity studies demonstrated no efficacy of L-EPSs, *L. salivarius* BIS312 strain's culture filtrate exerted a more potent antimicrobial effect compared to that of the other strain. The anti-quorum sensing study revealed that the culture filtrates were not effective but *L. salivarius* BIS722 strain's L-EPS had a more potent effect than that of the other strain. These differences may be attributable to the characteristic structures of the L-EPSs of both strains. It was concluded that L-EPSs' achieved the antibiofilm effect by means of showing anti-quorum sensing effect, whereas culture filtrates achieved the antibiofilm effect by showing antimicrobial effect. Additionally, L-EPS, and culture filtrates of *L. salivarius* BIS312 strain significantly increased the adhesion ability of that strain to HT-29 cells. The studies suggested that the use of probiotic-originated and characterized L-EPSs in poultry feeds may be a novel approach.

Science Code : 20309
Key Words : *Lactobacillus salivarius*, Exopolisaccharide, Antibiofilm, Anti-quorum sensing, Adhesion, Prebiotic
Page number : 128
Supervisor : Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında ilgisini, sabır ve anlayışını hiçbir zaman esirgemedi engin bilgi ve deneyimleriyle bütün çalışmalarına ışık tutan, her türlü araştırma olanağını ve desteğini sağlayan, değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Belma ASLİM'a, çalışmalarımın her aşamasında kıymetli tecrübeleriyle yardım ve katkılarını esirgemedi bana rehberlik eden, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ'a, çalışmalarım süresince her zaman desteğini gördüğüm, değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ümmü Gülsüm TÜKENMEZ EMRE'ye, anti-quarum sensing çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen, Sayın Doç. Dr. Seyhan ULUSOY'a, tezimdiki kimyasal analizlerin yorumlanması konusunda çok yardımcı olan, Sayın Doç. Dr. Serkan YAVUZ'a, karşılaştığım tüm zorluklarda dostluğu ve destekleriyle her zaman yanımda olan, görev aldığımız projede birlikte çalışmaktan çok keyif duyduğum, sevgili dostum İlknur DİNÇER'e, çalışmalarım süresince her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen, her zorlukta beni yüreklendiren değerli arkadaşlarım Merve TUNCA ve Kübra ÇELİK'e, Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'nı paylaştığım tüm arkadaşlarıma ve hayatımın her anında bana kendimi şanslı hissettiren, aldığım bütün kararlarda özveri ve fedakarlıklarıyla beni destekleyen canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

TAGEM/15/AR-GE/40 projesi tarafından desteklenmiş olan tez çalışmamda kullandığım cihaz ve ekipmanlar konusunda maddi destek sağlayan, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırma ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım. Aynı zamanda bu projenin hazırlanması ve yürütülmesinde engin bilgi ve deneyimleriyle katkı sağlayan Sayın Prof. Dr. Kadri Zafer KARAER'e, proje süresince her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Mustafa ULUDAĞ'a ve projeye desteklerinden dolayı Bilyem Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti.'ye en içten teşekkürlerimi iletirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	7
2.1. Probiyotikler.....	7
2.1.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar	9
2.1.2. Hayvan beslemesinde yem katkı maddesi olarak kullanılan probiyotikler ve hayvanların performansı ve sağlığı üzerine etkileri	10
2.1.3. Tavuk mikrobiyotası ve mikrobiyotaya probiyotiklerin etkileri.....	11
2.1.4. Tavuk probiyotiklerinin kullanımı ve yararları.....	14
2.2. Prebiyotikler	16
2.2.1. Prebiyotiklerin etki mekanizması.....	17
2.2.2. Prebiyotiklerin hayvanların performansı ve sağlığı üzerine etkileri	19
2.2.3. Tavuk prebiyotiklerinin performans ve sağlığa etkisi.....	20
2.3. Sinbiyotikler	22
2.4. Ekzopolisakkaritler (EPS).....	23
2.4.1. Probiyotik bakterilerin EPS'lerinin önemi.....	25
2.4.2. EPS'nin prebiyotik olarak kullanımı.....	26
2.5. Biyofilm	27

	Sayfa
2.5.1. Probiyotiklerin biyofilm oluşumunu kontrolü ve engellemesi	28
2.6. Probiyotiklerin Antimikrobiyal Aktivite Etkileri	30
2.7. Quorum Sensing	32
3. MATERYAL METOT	35
3.1. Materyal	35
3.1.1. Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar.....	35
3.1.2. Çalışmada kullanılan bakteriler	35
3.1.3. Çalışmada kullanılan hücre hattı.....	37
3.1.4. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltiler	37
3.2. Metot	38
3.2.1. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları.....	38
3.2.2. Bakterilerin muhafazası	38
3.2.3. Bakterilerin sayımı.....	40
3.2.4. Laktik asit bakterilerinin kültür ortamında EPS üretimlerinin belirlenmesi.....	41
3.2.5. Besi ortamlarındaki farklı karbon kaynaklarının ve triptonun EPS üretimi üzerine etkisi	43
3.2.6. Laktik asit bakterilerinden EPS izolasyonu ve L-EPS eldesi	44
3.2.7. Kültür ortamından elde edilen EPS'ler ile L-EPS'lerin EPS miktarlarının karşılaştırılması	45
3.2.8. Liyofilize EPS'lerin karakterizasyonu	46
3.2.9. Bazı patojen bakteri suşlarının biyofilm yapma oranlarının belirlenmesi ve yüksek biyofilm yapma kapasitesine sahip suşların seçimi	47
3.2.10. <i>L. salivarius</i> suşlarından elde edilen kültür filtratlarının, L-EPS'lerin ve L-EPS'lerin kültür filtratları ile kombinasyonlarının antibiyofilm etkilerinin belirlenmesi.....	49
3.2.11. <i>L. salivarius</i> suşlarından elde edilen kültür filtratlarının, L-EPS'lerin ve L-EPS'lerin kültür filtratları ile kombinasyonlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi	50

	Sayfa
3.2.12. <i>L. salivarius</i> suşlarından elde edilen kültür filtratlarının ve L-EPS'lerinin anti-quorum sensing etkilerinin belirlenmesi.....	51
3.2.13. <i>L. salivarius</i> BIS312 suşunun kültür filtratı ve L-EPS'lerinin adezyondaki rolünün belirlenmesi	53
3.2.14. İstatistiksel analizler.....	55
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	57
4.1. Kültürlerin Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi Kapasiteleri.....	57
4.2. Farklı Karbon Kaynaklarının ve Triptonun EPS Üretimi Üzerine Etkisi	59
4.3. Kültür Ortamından Elde Edilen EPS'ler ile L-EPS'lerin EPS Miktarlarının Karşılaştırılması	61
4.4. <i>L. salivarius</i> Suşlarından Elde Edilen Liyofilize EPS'lerin Karakterizasyonu...	62
4.4.1. L-EPS'lerin monomer kompozisyonları	62
4.4.2. L- EPS'lerin molekül ağırlıkları	63
4.4.3. <i>L. salivarius</i> BIS312 suşundan elde edilen L-EPS'nin bağ yapısı.....	63
4.5. Bazı Patojen Bakteri Suşlarının Biyofilm Yapma Oranlarının Belirlenmesi ve Yüksek Biyofilm Yapma Kapasitesine Sahip Suşların Seçimi	68
4.6. <i>L. salivarius</i> Suşlarından Elde Edilen Kültür Filtratlarının, L-EPS'lerin ve L-EPS'lerin Kültür Filtratları ile Kombinasyonlarının Antibiyofilm Etkileri	69
4.7. <i>L. salivarius</i> Suşlarından Elde Edilen Kültür Filtratlarının, L-EPS'lerin ve L-EPS'lerin Kültür Filtratları ile Kombinasyonlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri	72
4.8. <i>L. salivarius</i> Suşlarından Elde Edilen Kültür Filtratlarının ve L-EPS'lerinin Anti-Quorum Sensing Etkileri.....	73
4.9. <i>L. salivarius</i> BIS312 Suşunun Kültür Filtratı ve L-EPS'lerinin Adezyondaki Rolü	76
5. TARTIŞMA	79
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	93
KAYNAKLAR	97
EKLER.....	119
EK-1. L-EPS'lerin HPLC analiz sonuçları	120

	Sayfa
EK-2. L-EPS'lerin SEC analiz sonuçları	123
EK-3. <i>L. salivarius</i> BIS312 suşundan izole edilen L-EPS'lerin NMR analiz sonuçları	125
ÖZGEÇMİŞ	128

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar	9
Çizelge 2.2. Hayvan yemlerinde kullanılan probiyotikler	11
Çizelge 2.3. İdeal prebiyotiklerin özellikleri ve hayvanlarda yararlı etkileri	20
Çizelge 2.4. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen heteropolisakkaritlerin ve homopolisakkaritlerin özellikleri	24
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan, yüksek EPS üretim kapasitesine göre seçilen <i>Lactobacillus</i> cinsine ait türler	36
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan diğer mikroorganizma türleri	36
Çizelge 3.3. De Man Rogosa Sharpe (MRS) içeriği	37
Çizelge 3.4. PBS tamponu içeriği	38
Çizelge 3.5. Yüksek EPS üreticisi suşların geliştirildiği besiyeri içerisine eklenen karbon kaynağı çeşitleri ve miktarları	44
Çizelge 3.6. <i>L. salivarius</i> BIS312 ve BIS722 suşlarının L-EPS eldesinde kullanılan besiyeri içerikleri	44
Çizelge 3.7. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde uygulama grupları ve kuyucuklara eklenen miktarları (µL).....	51
Çizelge 4.1. Yüksek EPS üretim kapasitesine sahip suşların kodları, moleküler tanımlama ile belirlenen tür adları ve kültür ortamında EPS üretim miktarları	58
Çizelge 4.2. Yüksek EPS üreticisi suşların geliştirildiği besiyeri içeriklerindeki farklı karbon kaynağı ve oranlarına bağlı olarak kültür ortamında EPS üretim kapasiteleri	60
Çizelge 4.3. Yüksek EPS üreticisi suşların geliştirildiği besiyeri içeriklerindeki farklı oranlarda karbon ve azot kaynaklarına bağlı olarak EPS üretimleri	61
Çizelge 4.4. Liyofilizasyon öncesi ve sonrasında <i>L. salivarius</i> 'un BIS312 ve BIS722 suşlarının EPS miktarları	62
Çizelge 4.5. <i>L. salivarius</i> 'un BIS312 ve BIS722 suşlarının L-EPS'lerinin HPLC analizi ile belirlenen monosakkarit kompozisyonları ve yüzde oranları	63
Çizelge 4.6. <i>L. salivarius</i> 'un BIS312 ve BIS722 suşlarının L-EPS'lerinin SEC analizi ile belirlenen molekül ağırlıkları	63

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.7. L-EPS _{BIS312} 'nin yapısında bulunan monosakkaritlerin ¹ H-NMR spektrumunda hidrojenlere ait piklerin kimyasal kayma değerleri (δ, ppm)	65
Çizelge 4.8. L-EPS _{BIS312} 'nin yapısında bulunan monosakkaritlerin H ₁ protonlarına ait kimyasal kayma değerleri	66
Çizelge 4.9. Bazı patojen bakterilerin Kongo Red yöntemi ile tespit edilen biyofilm yapma kapasiteleri	69
Çizelge 4.10. <i>L. salivarius</i> 'un BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen kültür filtratlarının, L-EPS'lerin, L-EPS'lerin kültür filtratları ile kombinasyonlarının ve inülinin belirtilen konsantrasyonlarda uygulanması ile oluşan yüzde (%) biyofilm inhibisyon sonuçları.....	71
Çizelge 4.11. <i>L. salivarius</i> 'un BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen kültür filtratları ve kültür filtratları ile birlikte L-EPS'lerin (0,5 ve 1 mg/mL) kombinasyonlarının patojen bakteriler üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun çap değerleri (mm)	73
Çizelge 4.12. <i>L. salivarius</i> 'un BIS312 ve BIS722 suşlarının kültür filtratlarının <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 bakterisi üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun çap değerleri	74
Çizelge 4.13. <i>L. salivarius</i> 'un BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen L-EPS örneklerinin <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 suşunun viyolasin üretimine etkisi	75
Çizelge 4.14. <i>L. salivarius</i> BIS312 suşunun ve sinbiyotik uygulamasının (suşun, L-EPS/kültür filtratı ile kombinasyon uygulaması) HT-29 hücrelerine adezyon yeteneği	77

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tavuğun gastrointestinal sistemindeki başlıca bakteriyel habitatlar ve konsantrasyonları.....	12
Şekil 2.2. Oligosakkaritlerin bağırsak bakterileri tarafından fermentasyonu sonucu ortaya çıkan kısa zincirli yağ asitleri ve bunların sağlık üzerindeki olumlu etkileri	18
Şekil 3.1. Glukoz standart eğrisi.....	43
Şekil 4.1. <i>Lactobacillus</i> cinsine ait izolatların EPS üretim miktarlarına göre sayıca dağılımı.....	57
Şekil 4.2. ¹ H-NMR spektrumunda, polisakkaritlerin yapısında bulunan hidrojenlere ait piklerin kimyasal kayma değerlerine ait bölgeler.....	64
Şekil 4.3. L-EPS _{BIS312} monomerlerinin açık formülleri ve bağ tipleri.....	67
Şekil 4.4. L-EPS _{BIS312} monomerlerinin bağlanma şekli.....	67
Şekil 4.5. 1, 2 ve 3 mg/ml'lik derişimlerde hazırlanan <i>L. salivarius</i> 'un BIS312 ve BIS722 suşlarının L-EPS örneklerinin <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 suşunun viyolasin üretimine etkisi	76

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Liyofilizasyonda kullanılan liyofilizatör cihazı (Christ alpha 2-4 LD plus) ve liyofilizasyon sonrası liyofilize bakteri kültürleri.....	39
Resim 3.2. Suda çözündürülen EPS'lerin üzerine fenol-sülfürik asit muamelesi ve spektrofotometrede okunmak için hazır hale getirilen mikroküvetler	42
Resim 3.3. Viallere alınarak liyofilize edilen EPS'ler	45
Resim 3.4. Kristal viyole boyaması sonrası mikropate okuyucu cihazında okunmaya hazır bir mikropak	49
Resim 3.5. HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücre hattının inverted mikroskop görüntüsü (10X).....	53
Resim 4.1. Çalışmada kullanılan bazı laktik asit bakteri türlerinin ışık mikroskobu görüntüleri (100X). A: <i>L. salivarius</i> BIS312, B: <i>L. agilis</i> BIS721, C: <i>L. saerimneri</i> BIS717.....	58
Resim 4.2. <i>S. aureus</i> EB-1 (A) ve <i>E. coli</i> ATCC 11229 (B) suşlarının Congo Red Agar'da oluşturdukları siyah koloni morfolojisi	68
Resim 4.3. <i>L. salivarius</i> BIS312 suşunun L-EPS'sinin <i>E. coli</i> ATCC 11229 suşuna (A), BIS312 suşunun kültür filtratı ve L-EPS (0,5 mg/mL) kombinasyonunun <i>S. aureus</i> EB-1 suşuna (B) ve BIS312 suşunun kültür filtratının <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşuna (C) uygulanması ve zon oluşumları.	72
Resim 4.4. <i>L. salivarius</i> BIS722 suşunun L-EPS'sinin (A) ve <i>L. salivarius</i> BIS722 ve BIS312 suşlarının kültür filtratlarının (B) <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 bakterisi üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları	74
Resim 4.5. <i>L. salivarius</i> BIS312 suşunun (A), bu suşun L-EPS (B) ve kültür filtratı (C) ile kombinasyonlarının, HT-29 hücrelerine adezyon yeteneklerinin ışık mikroskobu görüntüleri (100X).	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
Da	Dalton
g	Gram
kDa	Kilodalton
L	Litre
m	Metre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
pH	Asitlik bazlık birimi
α	Alfa
β	Beta
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklamalar
ADI	Adezyon İndeksi
API	Analitik Profil İndeks
AR-GE	Araştırma-Geliştirme
ATCC	Amerikan Kültür Koleksiyonu
cfu	Koloni Oluşturan Birim

Kısaltmalar**Açıklamalar**

dk.	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EPS	Ekzopolisakkarit
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FOS	Frukto-oligosakkarit
GİS	Gastrointestinal sistem
GOS	Galakto-oligosakkarit
HePS	Heteropolisakkarit
HoPS	Homopolisakkarit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LAB	Laktik asit bakterisi
LB	Luria-Bertani
L-EPS	Liyofilize Ekzopolisakkarit
L-EPS_{BIS312}	<i>Lactobacillus salivarius</i> BIS312 Suşundan Elde Edilen L-EPS
L-EPS_{BIS722}	<i>L. salivarius</i> BIS722 Suşundan Elde Edilen L-EPS
MOS	Mannan-oligosakkarit
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
OD	Optik Yoğunluk
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ppm	Milyonda Bir
QS	Quorum Sensing
rpm	Dakikada Devir Sayısı
SD	Standart Sapma
SEC	Boyut Eleme Kromatografisi
SF	Serum Fizyolojik
sn.	Saniye
sp.	Tür

Kısaltmalar**Açıklamalar****spp.**

Türler

subsp.

Alttür

TAGEM

Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü

TCA

Trikloroasetik asit

UNAM

Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi

WHO

Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Tavuk gastrointestinal sistemi (GİS), 100'den fazla bakteri cinsi ve 600'ün üzerinde farklı bakteri türü ile oldukça karmaşık bir mikrobiyotadan oluşmaktadır (Pourabedin ve Zhao, 2015). Bu karmaşık mikrobiyota, kanatlı endüstrisinde sağlık performansı açısından çok önemli rol oynamaktadır. GİS bakterileri, kabaca sınıflandırılacak olursa patojenik bakteriler ve sağlığı teşvik eden yararlı bakteriler olarak ikiye ayrılabilir. Patojen bakteriler, lokalize ve sistemik enfeksiyonlara, toksin oluşumuna, mutajenik ve kanserojen maddelerin üretilmesine neden olabilmekte ve bunlar da doğrudan konakçıya zarar verebilmektedir. Bunlara alternatif olarak laktobasil ve bifidobakteriler gibi yararlı mikroorganizmalar grubuna dahil edilen bakteriler, vitamin üretimi, bağışıklık sisteminin patojenik olmayan yollarla uyarılması, trigliserit azaltılması, rekabetçi dışlama gibi etkilerle konakçıya fayda sağlayabilmektedir (Yegani ve Korver, 2008; Jeurissen, Lewis, Mroz ve Rebel, 2002). Bağırsak sağlığı tehlikeye girdiğinde, sindirim ve besin emilimi etkilenmekte ve bu da yem tüketiminin zayıf olmasına ve hastalığa yatkınlığa neden olmaktadır (Baldwin, Hughes, Van, Moore ve Stanley, 2018).

Hayvancılık sektöründe patojenlerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırarak hayvan sağlığını korumak, büyüme ve yemden yararlanmayı artırmak, toksinleri engellemek, bazı hastalıklara karşı koruyucu etki oluşturmak, besin maddelerinin bağırsaklardan emilimini artırmak gibi amaçlarla, uzun yıllardan beri yem katkı maddesi olarak antibiyotikler kullanılmaktadır (Karademir ve Karademir, 2003; Ahmed, Vohra, Khan, Ahmed ve Khan, 2019; Kaiser ve diğerleri, 2000). Kanatlı hayvan endüstrisinde antibiyotiklerin aşırı kullanımı, mikroorganizmaların antimikrobiyal direnç geliştirmesine neden olmasının yanı sıra, tavukların sağlıklı mikrobiyotalarını da tahrip ederek tavukları diğer hastalıklara karşı savunmasız hale getirmektedir (Ahmed ve diğerleri, 2019; Pfaller, 2006). Bu gibi olumsuz durumların ortaya çıkaracağı riskler dikkate alınarak, birçok ülkede antibiyotiklerin yem katkı maddesi olarak kullanılması yasaklanmış ve böylece alternatif koruyucu yem katkı maddelerinin geliştirilmesi ve keşfine yönelik araştırmalara ilgi artmıştır. Subklinik enfeksiyonları önlemeleri, büyümeyi teşvik etmeleri ve insan sağlığına zararlı olmamaları gibi özellikleriyle probiyotikler, prebiyotikler, organik asitler, bitkisel ekstraktlar ve esans yağların, antibiyotiklere alternatif yem katkı maddeleri olarak yaygın bir şekilde kullanılmasına başlanmıştır (Jazi ve diğerleri, 2018; Peebles, 2018; Kutlu ve Şahin, 2017).

Probiyotikler, yararlı mikroorganizmaların büyümesini uyaran ve patojen miktarını azaltan, böylece konağın bağırsak mikrobiyal dengesini geliştiren ve mide-bağırsak hastalıkları riskini azaltan, sağlık üzerinde yararlı bir etkiye sahip canlı mikrobiyal gıda/yem bileşenleridir (Mahfuz ve diğerleri, 2017; Getachew, 2016). Probiyotiklerin kanatlı yemlerinde yem katkısı olarak kullanılması konusunda yapılan çalışmalar, yemden yararlanma oranının, vücut ağırlığının ve üretkenliğin artırılması, büyümenin teşvik edilmesi, bağırsak mikrobiyotasının modülasyonu ve patojen inhibisyonu, immünomodülasyon ve kanatlı hayvan etinin kalitesinin artırılması için beslenme aracı olarak başarıyla kullanılabileceğini ortaya koymaktadır (Hassanein ve Soliman, 2010; Mahfuz ve diğerleri, 2017). Aynı zamanda yumurta tavukları üzerinde yapılan çalışmalarda, probiyotiklerin yumurta üretiminde, yumurtanın kabuk kalınlığında ve ağırlığında artış, kolesterol düzeyinde ise azalma meydana getirerek yumurta kalitesini artırdığı rapor edilmiştir (Park, Jeong, Lee ve Kim, 2016; Tang ve diğerleri, 2015; Hassanein ve Soliman, 2010). Potansiyel probiyotikler olarak çok fazla türde mikroorganizma olmakla birlikte, gıda ve yem endüstrisinde ticari olarak en çok kullanılan bakteri cinsleri genel olarak güvenli (GRAS) kabul edilmelerinden dolayı *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*'lardır (Tripathi ve Giri, 2014; Jahromi ve diğerleri, 2016). LAB'lerinin bazı sağlığa yararlı etkileri, bağırsak mikrobiyotasını düzenlemek, bağışıklık sistemini uyarmak, serum kolesterolü seviyesini düşürmek, kanser riskini azaltmak veya engellemek, antibakteriyel ve antioksidan aktivite şeklinde özetlenebilir (Tang ve diğerleri, 2017; Trabelsi ve diğerleri, 2017). LAB'nin probiyotik yetenekleri, laktik asit ve diğer organik asitler, bakteriyosin, hidrojen peroksit ve diğer bileşikler ürete kapasitelerinden ileri gelmektedir (Jahromi ve diğerleri, 2016). *Lactobacillus* suşları, bağırsak epiteline bağlanma kabiliyetine sahip olduklarından yumurtadan çıktıktan sonraki bir gün içinde tavuk bağırsağına yerleşebilmektedir ve bu sebeplerle tavukların GİS'nin normal bakteri florası olarak kabul edilmektedirler (Shokryazdan ve diğerleri, 2017; Fuller, 1973). Hayvanlar için probiyotik olarak kullanılan bakteri suşları, daha spesifik bir uygulamaya sahip olmak için aynı hayvan türünün doğal GİS mikrobiyotasından izole edilmelidir (Shokryazdan ve diğerleri, 2017; Kizerwetter-Swida ve Binek, 2005). İyi karakterize edilmiş bir bakteriyosin üreticisi olan *Lactobacillus salivarius*, insan, domuz ve kanatlı sindirim sistemi kanallarından (GİS), insan sütünden ve diğer kaynaklardan sık sık izole edilmiş ve birçok suşu, bağırsak mikrobiyotasını modüle etme, antimikrobiyal maddeler üretme, bağışıklık sistemini uyarma gibi yetenekleriyle umut verici probiyotik olarak dikkat çekmiştir (Chaves, Brashears ve Nightingale, 2017; Messaoudi ve diğerleri, 2013).

Prebiyotikler, üst gastrointestinal sistemde hidrolize ve absorbe olmayan, organizmaların metabolizmasını teşvik ederek kolonda yararlı bakteriler tarafından selektif olarak fermente edilebilen, konakçıda luminal/sistemik etkiler yaratarak mikrobiyotayı daha sağlıklı bir kompozisyona doğru değiştirebilen gıda bileşenleridir (Kim, Keogh ve Clifton, 2018; Gibson ve Fuller, 2000). Probiyotiklere kıyasla prebiyotiklerin avantajı, konak organizma dahil her yerde bulunan ve tüm çevre koşullarında hayatta kalabilen yararlı bakterilerin büyümesini teşvik ederken, aynı zamanda patojenlerin de çoğalmasını kontrol altında tutabilmeleridir. Bu etkileri ile yem katkı maddesi olarak kullanımları her geçen gün artmakta ve hayvanın sağlık performansını iyileştirdiği yapılan çalışmalarla ortaya konmaktadır (Alloui, Szczurek ve Świątkiewicz, 2013; Kareem, Loh, Foo, Akit ve Samsudin, 2016). LAB, GRAS statüsünde bakteriler olduğundan, bu bakteriler tarafından üretilen EPS'ler de GRAS olarak kabul edilmektedir ve yapılan çalışmalarda, LAB EPS'sinin gastrointestinal sistemde, probiyotik mikroorganizmaların gelişimini ve aktivitesini artırmak konusunda doğrudan ya da dolaylı olarak prebiyotik rolünün olduğu bildirilmektedir (Schurr, 2013; Kleerebezem ve Hugenholtz, 2003; Welman ve Maddox, 2003). Ancak tavuklarda bu EPS'lerin prebiyotik olarak geliştirilmesi ve ürün haline getirilmesine yönelik bir çalışma mevcut değildir.

Probiyotik ve prebiyotikleri birlikte bulunduran kombinasyonlar için sinbiyotik terimi kullanılmaktadır. Sözcük sinerjiye işaret ettiği için, bu terim probiyotiğin prebiyotik bileşiği seçici olarak tercih ettiği ürünler için kullanılmaktadır (Schrezenmeir ve de Vrese, 2001; Rastall ve Maitin, 2002). Sinbiyotikler, sinerjik etkiye sahip olduklarından GİS'de mevcut yararlı bakteri suşlarının gelişimini teşvik etmekle birlikte, ortama yeni eklenen probiyotik suşların da hayatta kalma oranını artırarak, büyümelerinin teşvik edilmesinde rol oynamaktadır (Gallaher ve Khil, 1999).

Yukarıda belirtilen tüm yararlı etkilerine rağmen starter ve probiyotik özellikleri ile gıda sanayinde büyük öneme sahip olan laktik asit bakterilerinin, antibiyotik direnç genlerini barındırmaları söz konusudur. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç genlerini taşımaları ilk aşamada istenilen bir özellik gibi kabul edilmiş olsada, bu genlerin patojenlere aktarılabilirdiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Courvalin, 2006; Gevers, Huys ve Swings, 2003; Meral ve Korukluoğlu, 2014). Dolayısıyla laktik asit bakterilerinin kendileri patojen olmamasına karşın, direnç genlerini patojen bakterilere transfer edebilmelerinden dolayı, insan ve hayvanlarda sağlık sorunlarına neden olabileceği öngörülmektedir (Herrerros ve diğerleri, 2005, Meral ve Korukluoğlu, 2014). Bunların dışında probiyotik uygulamalarda

her zaman stabil sonuç alınamaması ve doz ayarlamasının yapılamaması gibi durumlar da değerlendirildiğinde, yem katkı maddesi olarak probiyotiklerin yerine, canlı olmayan ve probiyotiklerin gelişimini teşvik edecek ürün geliştirmek önemli bir hal almıştır. Bu bakımdan prebiyotiklerle ilgili yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunda, inulin, frukto-oligosakkaritler (FOS) ve galakto-oligosakkaritler (GOS) gibi ticari ürünler kullanılmaktadır. Ancak bu ticari ürünlerin piyasaya arzı yüksek miktarlarda üretimini gerektirdiği için transgenik bitkilerden elde edilmeleri söz konusudur. Literatürlerde, transgenik mısır, patates, şeker pancarı, buğday ve şeker kamışı mahsullerine farklı biyoteknolojik tekniklerle fruktan biyosentez yollarının kullanılarak prebiyotik üretiminin gerçekleştirebildiği bildirilmiştir (Benkeblia ve Wiley, 2017; Singla ve Chakkaravarthi, 2017). Transgenik bitkilerin, daha ucuz, daha verimli ürünlerin elde edilmesinde ve kimyasal kirliliğin azalmasında olumlu etkileri olsada, yaratabileceği riskler çoğu araştırmacı tarafından tartışılmaktadır. Transgenik bitkilerin genetik kirlilik yaratabildiği, faydalı organizmalara zarar verebildiği, toksik etki, alerji, kanser riski gibi ciddi tehditler oluşturabildiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Haspolat, 2012). Ayrıca, bu ticari prebiyotik ürünlerin temininde Türkiye yurt dışına bağımlı haldedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla, mikroorganizma kaynaklı prebiyotiklerin, antibiyotikli, probiyotikli yemlere ve bitkisel kaynaklı prebiyotik katkı maddelerine alternatif olabilecekleri bildirilmektedir. Ülkemizde, bağırsak düzenleyici olarak, probiyotik katkılı gıda ürünleri yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bu bakterilerin ekzopolisakkaritlerinin hayvan yemi ve gıda olarak kullanımı mevcut değildir. Genel olarak Türkiye ve dünyada yapılan çalışmalar ticari prebiyotiklerin kullanılması yönünde olup, mikrobiyal kaynaklı prebiyotik elde edilmesi üzerindeki çalışmalar çok sınırlı sayıdadır. Bu sebeplerle bu tez çalışmasında, tavuk bağırsağı kaynaklı LAB'lerinin EPS üretim kapasiteleri ile EPS'lerin monomer kompozisyonları, bağ yapısı ve molekül ağırlığı gibi karakteristik özelliklerinin, antibiyofilim, anti-quorum sensing aktivitesinde ve HT-29 hücrelerine adezyonunda nasıl etkili olabileceğinin belirlenmesi ve bu sonuçlar neticesinde bitkisel prebiyotiklerden daha etkin olabilecek, prebiyotik kullanımına alternatif probiyotik kaynaklı EPS'lerin yem katkı maddesi olarak kullanılabilirliklerinin *in vitro* koşullarda araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda;

1. Tavuk bağırsağı kaynaklı laktik asit bakterilerinin kültür ortamlarındaki EPS üretim kapasitelerinin belirlenmesi ve EPS üretim yeteneği ile öne çıkan bakteri suşlarının prebiyotik üretimi için seçilmesi,

2. *Lactobacillus* cinsine ait bakteriler arasından seçilen en iyi EPS üreticisi bakterilerin, EPS üretiminde yüksek verim elde edilebilecek karbon/azot kaynakları ile kombinasyonlarının ve oranlarının belirlenmesi,
3. EPS'lerin monomer kompozisyonu, bağ yapısı ve moleküler ağırlıklarına göre karakterizasyonunun yapılması, *in vitro* prebiyotik özellikleri ile ilişkisinin ortaya konulması,
4. Laktobasillerden elde edilen EPS'lerin veya EPS ve diğer metabolitleri içeren kültür filtratlarının, antibiyofilm, antimikrobiyal ve anti-quorum sensing gibi prebiyotik açıdan önemli olacak etkilerinin belirlenmesi ve hangisinin daha etkin olduğunun ortaya konulması,
5. Bağırsaktaki epitel hücrelerin yüzeyine tutunma kapasitesi yüksek bakteriler, bu ortamda daha avantajlı ve biyolojik etkinliklerinin daha fazla olabileceği öngörüsünden yola çıkılarak, yüksek EPS üreticisi probiyotiğin ve bu probiyotiğe L-EPS'sinin ve kültür filtratının eklenmesiyle oluşturulan sinbiyotiklerin, HT-29 hücre hattı ile oluşturulan deney modelinde uygulanması sonucunda, tutunma yeteneklerinin araştırılması ve L-EPS ile kültür filtratının, laktobasillerin bağırsak epiteline adezyon etkisinin ortaya konularak, bu durumun prebiyotik açıdan değerlendirilmesi,
6. Bu çalışmalar sonucunda probiyotik bakterilerden elde edilen L-EPS'ler ve kültür filtratlarından hangisinin prebiyotik olarak öne çıktığının belirlenmesi, belirlenen etkin prebiyotiğin antibiyofilm, anti-quorum sensing ve antimikrobiyal etkilerinin ortaya konularak bu alanda yeni bir bakış açısı getirilmesi ve alternatif yeni yem katkı maddelerinin geliştirilmesi,
7. Tavuklarda probiyotik bakterilerin (*Lactobacillus* cinsi bakteriler) yem katkısı olarak kullanımı her zaman stabil ve istenilen sonuçları vermediğinden, tavuk bağırsağından izole edilen ve probiyotik olarak öne çıkan *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerden elde edilecek ürünlerin probiyotik bakterilerde daha iyi sonuç verip vermeyeceğinin ortaya konulması ve elde edilen sonuçlar neticesinde bu ürünlerin son dönemde popüler probiyotik kullanımının yerini alması hedeflenmiştir.

Bu çalışma, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırma ve Politikalar Genel Müdürlüğü'nün TAGEM/15/AR-GE/40 projesi tarafından desteklenmiş olup, tavuk bağırsağından izole edilen *Lactobacillus* cinsi bakterilerden elde edilen EPS'nin, tavuk probiyotiği olarak geliştirilmesi bakımından yapılmış ilk çalışmadır. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen çıktıların biyoteknolojik olarak probiyotik, prebiyotik ve

sinbiyotik destekli yem sanayisinde kullanımına ilişkin yeni katkı maddelerinin kazandırılması ve serbest gezen köy tavuğu kaynaklı probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotiklerin araştırılan ve ortaya konulan özelliklerinin yapılabilecek yeni çalışmalara zemin oluşturması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Probiyotikler

Probiyotik kelimesi Latince “pro” ve “bios” kelimelerinden türetilmiştir ve “yaşam için” anlamına gelmektedir. Probiyotik terimi ilk olarak 1965 yılında Lilly ve Stillwell tarafından mikroorganizmaların büyümesine yardımcı olan maddeleri tanımlamak için kullanılmıştır (Anandharaj, Sivasankari ve Parveen Rani, 2014). Yıllar içerisinde çok farklı tanımlamalarının yapıldığı probiyotiklerin en çok kabul gören tanımlamalarından biri Roy Fuller tarafından 1989 yılında, “bireylerin intestinal mikrobiyal dengesini koruyarak veya geliştirerek tüketici sağlığına yararlı olan mikrobiyal yem ve gıda katkılarıdır” şeklinde yapılmıştır (Gürsoy, Özel, Özbaş ve Çon, 2011; Fuller, 1989). İmmün sistemin yaklaşık %70’inin gastrointestinal sistemde lokalize olması ve probiyotik mikroorganizmaların lokal ve sistemik seviyelerde immün sistemi aktive ettiğine dair önemli kanıtların olması nedeniyle söz konusu tanım Roy Fuller tarafından “bir probiyotik kalitatif ya da kantitatif olarak bağırsak mikrobiyotasını etkileyerek ve/veya immün sistemin durumunu modifiye ederek yararlı etkiler oluşturma hedefiyle, insanlar ya da hayvanlar tarafından tüketilen canlı mikroorganizma preparasyonu” şeklinde yeniden düzenlenmiştir (Gürsoy ve diğerleri, 2011; Fuller, 2004). Probiyotikler için bugün en yaygın ve geniş çapta kabul gören tanımlardan birisi de 2001 yılında Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’nün uzmanlar komisyonunca yapılmıştır. Komisyon, probiyotikleri "yeterli miktarda alındığında konukçuya sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlamıştır (FAO/WHO, 2001).

Probiyotik olarak kullanılacak bir ürünün ideal probiyotik olarak tanımlanabilmesi için bazı özellikleri barındırması gerekir. İdeal bir probiyotik, patojen olmamalı ve toksin üretmemeli, tüketici için sağlık riski oluşturmamalı, mide ve duodenumdan geçişi sırasında yüksek asitliğe toleranslı olmalı, ince bağırsağın üst kısmından geçişi sırasında safra tuzlarına karşı dirençli olmalı, bağırsak epitel hücrelerinde kısa sürede kolonize olup çoğalmalı, çeşitli organik asitleri üreterek patojen mikroorganizmaların sindirim sisteminde barınmalarını önlemeli, peletleme sırasında yüksek sıcaklığa toleranslı olup canlılığı sürdürmeli, yemlerde kullanılan antimikrobiyal maddelere dirençli olmalı, depolanma süresince canlılığını ve stabilitesini korumalı, konakçıya spesifik olmalı, antikor üretimini teşvik ederek bağışıklık

sistemini güçlendirmelidir (Dhama ve diğerleri, 2011; Aşan ve Özcan, 2006; Tuncer, 2000; Nousiainen, 1993).

Probiyotiklerin insan ve hayvan sağlığı üzerinde gösterdiği başlıca yararlar; gastrointestinal enfeksiyonları kontrol etmesi, antimikrobiyal etki göstermesi, böbrek rahatsızlıklarını gidermesi, β -galaktosidaz gibi önemli sindirim enzimlerinin üretimi ile birlikte vücutta laktoz kullanımını artırması, antimutajenik ve kolon kanserinin önlenmesi gibi bazı antikanserojenik aktiviteler göstermesi, bağışıklık sistemini düzenleyici özellikler sergilemesi, antialerjik fonksiyonlara sahip olması, besin öğelerinin biyolojik değerini ve vitamin üretimini artırması, mineral ve iz elementlerden yararlanımını artırması ve serum kolesterol seviyesini düşürmesi şeklinde sıralanabilir (Tuohy, Probert, Smejkal ve Gibson, 2003; Uymaz, 2010; Krasaekoopt, Bhandari ve Deeth, 2003; Shori, 2017).

Probiyotiklerin konakçı üzerinde olumlu etkilerini gerçekleştirdikleri kesin mekanizmalar tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte, olumlu etkilerinin çoğunu açıklayan birkaç kabul edilmiş mekanizma vardır (Khalighi, Behdani ve Kouhestani, 2016). Probiyotikler, mukus katmanı ve epitelyal hücrelerdeki sınırlı sayıdaki adezyon bölgeleri için patojen bakterilerle yarışır. Aynı zamanda, patojen bakterilerin üremeleri için gereksinim duydukları besin maddelerini tüketerek ve hidrojen peroksit, organik asit ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler üreterek, patojen bakterilerin üremelerini inhibe ederler. Kolonda yağ asidi profilini düzenleyerek, intestinal mikrobiyotayı değiştirebilirler. Bununla birlikte, bazı bifidobakteriler ve laktobasil suşları epitele yapışabilir ve patojenlerin mukozaya yapışmasını önleyerek “kolonizasyon bariyerleri” olarak hareket edebilirler (Khalighi ve diğerleri, 2016; Holzapfel, Haberer, Snel ve Schillinger, 1998). Dahası, immünolojik yanıtı modüle edebilir ve doku hasarını önleyen bağırsak duvarlarındaki inflamatuvar immün reaksiyonları baskılayabilirler (Ferreira ve diğerleri, 2011). Probiyotik ilavesinin diğer yararlı etkileri, bağırsaktaki enzimlerin salgılanması, amonyak ve fenol ürünlerinin azaltılması ve bağırsakta patojenik bakteri proliferasyonuna karşı direncin artırılması şeklinde sıralanabilir (Alloui ve diğerleri, 2013; Chen, 2003a). Probiyotiklerin bağırsak epitel hücrelerinde kolonize olarak çoğalabilmeleri için hedef bölgelere tutunma yeteneklerinin bulunması gerekir. Probiyotiklerin bağırsak epitel hücrelerine tutunma özelliklerinin belirlenmesi çalışmalarında en yaygın *in vitro* model olarak, Caco-2 ve HT-29 hücre hatları kullanılmaktadır (Ouwehand ve Salminen, 2003).

2.1.1. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar

Probiyotik olarak kullanılan bakteri, maya ve mantar türlerinin çoğu insan ve hayvanların sindirim kanalı mikrobiyotasında her zaman doğal olarak bulunmasının yanında, tahıl tanelerinde, tahıl yan ürünlerinde, silajlarda, çayır otlarında ve hatta su ve toprakta da mevcuttur (Güçlü ve Kara, 2009; Vanbelle, Teller ve Focant, 1990). Potansiyel probiyotikler olarak çok fazla türde mikroorganizma olmakla birlikte, gıda ve yemlerde ticari olarak en çok kullanılan bakteri cinsleri, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*'dur. Bu durumun birincil sebebi uzun bir kullanım geçmişine sahip olmaları ve genel olarak güvenli kabul edilmeleridir (GRAS). Bununla birlikte, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* ve *Propionibacterium* mayalarına ve filamentli mantarlara ait bazı türler de sağlık etkilerinden dolayı probiyotik olarak kullanılmaktadır (Tripathi ve Giri, 2014). Çizelge 2.1 'de probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların cins ve tür adları verilmiştir.

Çizelge 2.1. Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar (Tripathi ve Giri, 2014; Özener ve Kuru, 2015).

Cinsler	Türler
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. cellebiosis</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp.
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. thermophilum</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. coagulans</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. cremoris</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. diacetylactis</i> , <i>S. salivarius</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>B. capillus</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. ruminicola</i> , <i>B. amylophilus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. cerevisiae</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. shermanii</i> , <i>P. freudenreichii</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Candida</i>	<i>C. torulopsis</i>

2.1.2. Hayvan beslemesinde yem katkı maddesi olarak kullanılan probiyotikler ve hayvanların performansı ve sağlığı üzerine etkileri

Kalite özelliklerinin yanı sıra, son yıllarda tüketiciler tarafından hayvansal ürünlerin güvenliği konusuna ilgi artmıştır. Uzun yıllar boyunca farklı tipte antibiyotikler, hayvanın sağlığını korumak, çevre kirliliğinden kaynaklanan hastalıkları önlemek ve üretimi artırmak amacıyla hayvanlarda yem katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Antibiyotik kullanımının, bakteriyel dirence neden olabileceğine dair bazı kanıtlar göz önüne alındığında, 2006'dan bu yana Avrupa Birliği'nde hayvansal büyüme artırıcılar olarak antibiyotiklerin kullanımı yasaklanmıştır. Hayvansal performans kayıpları ve dolayısıyla üretimin sürdürülebilirliği ve kârlılığı ile ilgili kaygılar neticesinde, sağlıklı büyümeyi uyarmak için antibiyotikler yerine güvenli bir katkı maddesi geliştirmek zor ve önemli bir görev haline gelmiş ve bu konuda yapılan araştırmalar hızla artmıştır (Bai ve diğerleri, 2016; Alloui ve diğerleri, 2013).

Antibiyotiklerin verim artırıcı olarak kullanılmasının yasaklanmasıyla kullanımı gündeme gelen alternatif yem katkı maddelerinden olan probiyotikler, hayvanların bağırsaklarında implante olarak çoğalıp, patojen mikroorganizmalara karşı antagonistik etki göstererek hayvanın performansını iyileştirmektedir (Houshmand, Azhar, Zulkifli, Bejo ve Kamyab, 2012; Bai ve diğerleri, 2016; Güçlü ve Kara, 2009). Aynı zamanda probiyotik bakteriler, enzimler üreterek ya da enzimleri stimule ederek yemden yararlanmayı artırmakta, hayvanın immun sistemini stimule etmekte, laktik asit, asetik asit, formik asit gibi organik asitler ile hidrojen peroksit üretilen ortamın pH'sını düşürerek *Escherichia coli* ve *Salmonella* spp. gibi patojenler üzerine inhibitör etki göstermektedir (Güçlü ve Kara, 2009; Tunç, 2007, Sarıpınar ve Sulu, 2005).

Birçok ülkede büyüme faktörü olarak sığır, koyun, keçi, domuz, kanatlı, at ve küçük ev hayvanlarının rasyon veya diyetlerinde 1970'li yıllardan beri probiyotikler kullanılmaktadır (Vanbelle ve diğerleri, 1990). *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* ve *Saccharomyces* cinslerine ait mikroorganizmalar, çiftlik ve kümes hayvanlarında en çok kullanılan probiyotiklerdendir (Gaggia, Mattarelli ve Biavati, 2010). Hayvan yemlerinde probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalara ilişkin türler Çizelge 2.2'de sunulmuştur.

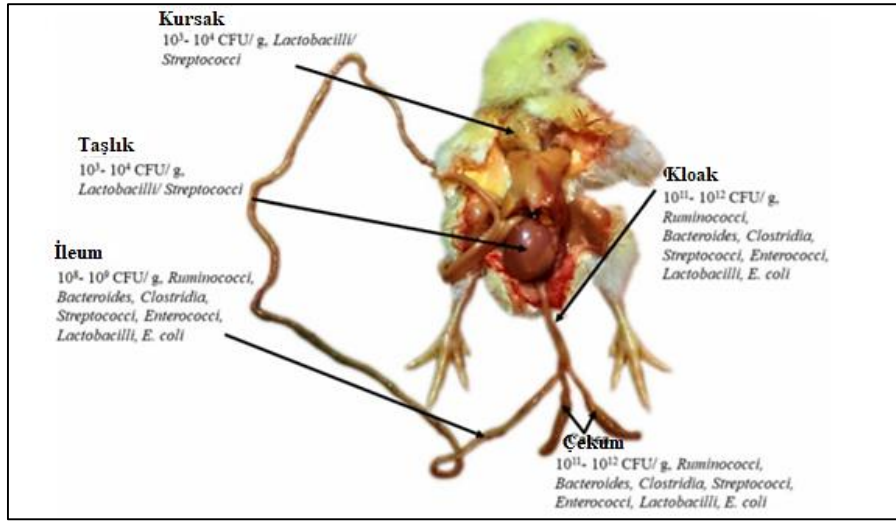
Çizelge 2.2. Hayvan yemlerinde kullanılan probiyotikler (Gaggia ve diğerleri, 2010)

Cins	Tür
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> , <i>B. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> , <i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> , <i>B. thermophilum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. farmicinis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. murinus</i> , <i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. amylovorus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. citreum</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. mesenteroides</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> subsp. <i>pentosaceus</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. freudenreichii</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. infantarius</i> , <i>S. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> , <i>S. thermophilus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pastorianus</i>
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. fragilis</i> , <i>K. marxianus</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>A. orizae</i> , <i>A. niger</i>

2.1.3. Tavuk mikrobiyotası ve mikrobiyotaya probiyotiklerin etkileri

Kanatlı hayvanlarda çevresel etkiye maruz kalan en geniş vücut yüzeyi olan GİS, yemek borusu, kursak, proventrikulus, taşlık, duodenum, jejunum, ileum, çekum, kolon ve kloaktan oluşur. Kanatlı GİS'i 100'den fazla bakteri cinsi ve 600'ün üzerinde farklı bakteri türü ile karmaşık ve oldukça çeşitli mikrobiyal topluluğu barındırmaktadır (Yadav ve Jha, 2019; Apajalahti, Kettunen ve Graham, 2004). Sağlıklı ve dengeli bir mikrobiyal toplulukta, çoğunlukla faydalı Gram pozitif bakteriler vardır (toplam bakterilerin en az %85'i). Geri kalan diğer bakterileri ise genç kuşlarda *Clostridium*, bağırsak rahatsızlığı olmayan yaşlı kuşlarda ise *Salmonella*, *Campylobacter* ve *E. coli* oluşturur (Choct, 2009). Kanatlı hayvanların GİS'lerinde yaygın olarak bulunan mikroorganizmaların bazıları, *Lactobacillus* sp., *Bacteroides* sp., *Eubacterium* sp., *Clostridium* sp., *E. coli*, *Streptococcus* sp., *Prevotella*

sp., *Fusobacterium* sp., *Selenomonas* sp. ve *Bifidobacterium* sp.'dir (Yadav ve Jha, 2019). Mikroorganizmalar kümes hayvanlarının GİS'lerine morfoloji, işlevsellik, metabolik etkileşimler ve mikro ortamdaki farklılıklar nedeniyle, GİS segmentleri boyunca heterojen bir şekilde farklı oranlarda dağılmışlardır (Yeoman ve diğerleri, 2012). Ayrıca bağırsak floralarındaki bakteriyel konsantrasyon, Şekil 2.1'de gösterildiği gibi bağırsak yolu boyunca kademeli olarak artmaktadır (Yadav ve Jha, 2019).



Şekil 2.1. Tavuğun gastrointestinal sistemindeki başlıca bakteriyel habitatlar ve konsantrasyonları (Yadav ve Jha, 2019)

Kursak, taşlık ve duodenumda *Lactobacillus* cinsi baskındır ve bu kısımlar bazı kuşlarda %99 gibi yüksek oranda benzer mikrobiyota sahiptir. Jejunumda en baskın olan türler *Lactobacillus salivarius* ve *Lactobacillus aviarius* olmak üzere bu kısım da *Lactobacillus* türleri tarafından domine edilir (Pourabedin ve Zhao, 2015; Gong ve diğerleri, 2007; Feng ve diğerleri, 2010). İleumun mikrobiyal bileşimi, duodenum ve jejunum ile karşılaştırıldığında daha çeşitli ve daha az karardır. İleumda *Lactobacillus*, *Candidatus*, *Arthromitus*, *Enterococcus*, *E. coli*, *Shigella* ve *Clostridium* cinsleri hakimdir (Shaafi, Sieo, Chong, Gan ve Ho, 2015; Pourabedin, Guan ve Zhao 2015). Tavuklar, her ikisi de benzer bakteri topluluklarını barındıran iki eşlenmiş çekuma sahiptir. Çekum, tavuklarda bugüne kadar en yoğun kolonileşmiş mikrobiyal habitatı ve en yüksek *Lactobacillus* çeşitliliği de çekumda görülmektedir. Çekum, sindirilmeyen karbonhidratın bakteri fermantasyonu için önemli bir bölge ve patojenler tarafından kolonizasyon için ana bir bölgedir (Pourabedin ve Zhao, 2015; Stanley, Geier, Chen, Hughes ve Moore, 2015). Tür düzeyinde incelenecek olursa *Bacteroides fragilis*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. salivarius* ve *L. reuteri*, çekal

mikrobiyotanın %40'ından fazlasını oluşturur (Stanley ve diğerleri, 2015). Lactobacillaceae, Peptostreptococcaceae, Streptococcaceae, Clostridiaceae ve Enterobacteriaceae familyaları, fekal mikrobiyotanın ortak familyaları olarak tanımlanmıştır (Videnska ve diğerleri, 2014). Herhangi bir stres faktörü ya da patojen mikroorganizmanın varlığı, vücut savunma mekanizmasını düşürerek bağırsak mikrobiyotasında bir dengesizlik yaratma eğilimindedir. Doğal mikrobiyota dengesinin bozulmasına bağlı olarak meydana gelen patojen mikroorganizma sayısındaki artış; hayvanlarda ishal, iştahsızlık, besin maddelerinin sindirim ve emiliminde düşüş gibi fizyolojik rahatsızlıklara neden olmaktadır. Kanatlılarda patojen mikroorganizmalar ve bunların etkilerinin azaltılmasında probiyotik kullanımının etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar sonucunda, kanatlı rasyonlarına probiyotik ilavesinin *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Eimeria* sp. ve *Actinomyces* sp. gibi birçok patojen üzerinde oldukça yüksek antibakteriyel etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Üstündağ ve Özdoğan, 2017; Abudabos, Al-Batshan ve Murshed, 2015). Kanatlı hayvan üretimindeki probiyotiklerin etki mekanizması, sağlıklı bağırsak mikrobiyotasının kurulması ve korunması, besin maddelerinin sindiriminin ve yararlanılabilirliğinin artırılması, pH'nın düşürülmesi ve çeşitli antimikrobiyal maddelerin üretilerek patojenlere karşı koruyucu etkilerin oluşturulması, toksinlerin nötralizasyonu, amonyak üretiminin azaltılması ve bağışıklık sisteminin uyarılması olarak sıralanabilir (Dhama ve diğerleri, 2011).

L. salivarius, iyi karakterize edilmiş bir bakteriyosin üreticisidir. İnsan, domuz ve kanatlı sindirim sistemi kanallarından (GİS), insan sütünden ve diğer kaynaklardan sık sık izole edilmiş ve birçok suşu, bağırsak mikrobiyotasını modüle etme, antimikrobiyal maddeler üretme, bağışıklık sistemini uyarma gibi yetenekleriyle umut verici probiyotikler olarak dikkat çekmiştir (Chaves ve diğerleri, 2017; Messaoudi ve diğerleri, 2013). Kanatlı hayvanlarda *L. salivarius* 15 yıldan uzun süredir probiyotik olarak kullanılmaktadır ve birçok çalışma, *L. salivarius*'un rekabetçi dışlama yeteneği ile *S. enteritidis*'in kolonizasyonunda azalma meydana getirdiğini bildirmiştir (Chaves ve diğerleri, 2017). Örneğin, Sornplang ve diğerlerinin (2015) yapmış oldukları çalışmada, 150 yeni doğan piliç beş gruba ayrılmıştır. 1. gruba (kontrol), sadece yem ve su; 2. gruba (pozitif kontrol), yem, su ve *S. enteritidis* patojeni; 3. gruba, yem, su, *S. enteritidis* patojeni ve *L. salivarius* L61 suşu; 4. gruba, yem, su, *S. enteritidis* patojeni ve *L. salivarius* L55 suşu; 5. gruba ise yem, su, *S. enteritidis* patojeni ve *L. salivarius* L61 ile L55 suşlarının kombinasyonları verilmiştir.

7 gün boyunca yapılan incelemeler sonucunda, *L. salivarius* L61 ve L55 suşlarının verildiği gruplarda bağışıklık sisteminin daha çok uyarıldığı, hayatta kalma oranının arttığı ve bu gruplardaki piliçlerin çekumlarında diğer gruplara göre oldukça düşük *S. enteriditis* varlığı tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda yazarlar, 2 günlük civcivlerin yemine optimal oranlarda *Lactobacillus* takviyesinin *S. enteriditis* enfeksiyonunu önlemek amacıyla kullanılabileceği sonucuna varmışlardır (Sornplang, Leelavatcharamas ve Soikum, 2015). Daha önce yapılan bazı *in vivo* çalışmalarda, probiyotiklerin *C. jejuni* patojenini azaltmada etkili bir rol oynadığını bildirilmiştir. Santini ve diğerleri (2010), *Bifidobacterium longum* PCB 133 probiyotik suşunun, Neal McKinney ve diğerleri (2012), *Lactobacillus crispatus* JCM5810 probiyotik suşunun tedavi edilmemiş gruplara göre *C. jejuni* sayısında önemli bir düşüşe yol açtığını göstermiştir.

2.1.4. Tavuk probiyotiklerinin kullanımı ve yararları

Kümes hayvanlarının diyetlerinde probiyotik kullanılmasının birçok faydası vardır. Bu faydalardan biri yiyeceklerin daha uzun geçiş süresi ile sindirim oranını artırmak ve besinlerin emilimini sağlamaktır. Probiyotik kullanımı ile ince bağırsakta yararlı bakteri popülasyonu artmaktadır. Probiyotiklerin diyetteki yağ miktarı ve türüne göre ince bağırsakta yağ emilimine etkisinin olduğu bildirilmiştir (Poorghasemi ve diğerleri, 2018). Probiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasını patojenlere karşı koruma, bağışıklık sistemini güçlendirme, serum kolesterol seviyesini ve kan basıncını düşürme, antikarsinogenik etki gösterme, besin maddelerinden faydalanma ve gıdaların besin değerinin artması gibi sağlık açısından pek çok faydası bulunmaktadır (Akan ve Kınık 2015; Zoumpopoulou, Pot, Tsakalidou ve Papadimitriou, 2017).

Probiyotiklerin kanatlıların performansı üzerine etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Yürütülen bu çalışmalar sonucunda, probiyotik ilavesi ile birlikte etlik piliçlerin, yumurtacı tavukların, ördeklerin, hindilerin, bıldırcınların ve deve kuşlarının büyüme performanslarında önemli artışlar gözlemlendiği bildirilmiştir (Karimi-Kivi, Dadashbeiki ve Seidavi, 2015; Agboola, Omidwura, Odu, Popoola ve Iyayi 2015; Idoui ve Karam, 2016). Ancak, probiyotik kullanımı sonucunda kanatlılarda gözlenecek olan etkiler bakımından kümesler arasında fark olabileceği gibi bireyler arasında da farklılıklar olabileceği rapor edilmiştir. Bu farklılıklar hijyen koşullarının değişkenlik göstermesi, stres koşullarının olup olmaması, kullanılan rasyonların yapısı ve bileşimi gibi işletmeye göre

değişiklik gösterebilen faktörler ile hayvanların sağlık durumu ve sindirim sistemi mikroorganizma çeşitliliği gibi bireysel faktörlere bağlı olarak oluşmaktadır (Üstündağ ve Özdoğan, 2017; Ergün, Yalcin ve Sacakli, 2000).

Probiyotiklerin tavuklarda yem katkısı olarak kullanılması sonucunda yemden yararlanma oranının, vücut ağırlığının ve üretkenliğin arttığı tespit edilmiştir (Mahfuz ve diğerleri, 2017). Aynı zamanda yumurta tavukları üzerinde yapılan çalışmalarda, probiyotiklerin yumurta üretiminde, yumurtanın kabuk kalınlığında ve ağırlığında artış, kolesterol düzeyinde ise azalma meydana getirerek yumurta kalitesini artırdığı rapor edilmiştir (Park ve diğerleri, 2016; Tang ve diğerleri, 2015; Hassanein ve Soliman, 2010). Yapılan çalışmalar, probiyotiklerin kanatlı yemlerinde büyümenin teşvik edilmesi, bağırsak mikrobiyotasının modülasyonu ve patojen inhibisyonu, immünomodülasyon ve kanatlı hayvan etinin kalitesinin artırılması için beslenme aracı olarak başarıyla kullanılabileceğini ortaya koymaktadır (Hassanein ve Soliman, 2010).

Yukarıda bahsedilen tüm yararlı etkilerine rağmen, mikroorganizma içeren fonksiyonel gıdaların geliştirilmesini ve üretimini kısıtlayan bazı engeller vardır ve dolayısıyla probiyotikler, yem katkısı olarak kullanıldığında pek çok aşamada dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu engeller, yüksek sıcaklık, kurutma, dondurma, yüksek basınç, asidik veya alkali ortam gibi gıdanın işlenmesinden kaynaklanan engeller, konakçı tarafından tüketiminden sonra sindirim sistemi enzimleri, yüksek asidik ortam ve safra tuzları gibi metabolizmadan kaynaklanan engeller ve mikroorganizmanın kendisinden kaynaklanan anaerobik gelişme koşulları, zengin besi ortamı gereksinimi, oksijen, sıcaklık, pH, inhibitörler ve rekabetçi mikroorganizmalardan kaynaklanan stres koşulları gibi engeller şeklinde özetlenebilmektedir (Ünal ve Erginkaya, 2010) Özellikle starter ve probiyotik özellikleri ile gıda ve yem sanayiye büyük öneme sahip olan *Lactobacillus* cinsine ait probiyotikler, ortam koşullarına yüksek oranda duyarlı olduklarından, yeme katılabilmeleri ve depolanabilmeleri oldukça zor bir işlemdir. Bunların yanı sıra laktik asit bakterilerinin, antibiyotik direnç genlerini barındırmaları söz konusudur ve direnç genlerini taşımaları ilk aşamada istenilen bir özellik gibi kabul edilmiş olsada, bu genlerin patojenlere aktarılabildiği literatürlerde belirtilmiştir (Courvalin, 2006; Gevers ve diğerleri, 2003; Meral ve Korukluoğlu, 2014). Dolayısıyla laktik asit bakterilerinin kendileri patojen olmamasına karşın, direnç genlerini patojen bakterilere transfer edebilmelerinden dolayı insan ve hayvanlarda sağlık sorunlarına neden olabileceği riski söz konusudur (Herrerros ve diğerleri,

2005, Meral ve Korukluoğlu, 2014). Bu durumlar değerlendirildiğinde yem katkı maddesi olarak probiyotiklerin yerine, canlı olmayan, ekstrem çevre koşullarına dayanıklı ve probiyotiklerin gelişimini teşvik edecek ürün geliştirmek tüm dünyada önemli bir çalışma konusu haline gelmiştir.

2.2. Prebiyotikler

Prebiyotikler, üst gastrointestinal kanaldan geçerken metabolize veya absorbe edilmeyen, kolonda bulunan *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* gibi bakteriler tarafından fermente edilen ve sindirim sistemindeki bir veya daha fazla potansiyel faydalı bakterinin büyümesini ve/veya aktivitesini seçici bir şekilde artırarak konağın sağlığını olumlu yönde etkileyebilen, gıda bileşenleri olarak tanımlanmaktadır (Kim ve diğerleri, 2018; Yoo ve Kim, 2016). Bir bileşiğin prebiyotik olup olmaması yararlı bakteriler tarafından metabolize edilmesine bağlıdır. Bu nedenle, her kolonik gıdanın prebiyotik olamayacağı bildirilmiştir (Roto, Rubinelli ve Ricke, 2015). Bir gıdanın prebiyotik olarak sınıflandırılması için; substratın mide ve ince bağırsakta hidrolize ve absorbe olmaması, organizmaların metabolizmasını teşvik ederek kolonda yararlı bakteriler tarafından selektif olarak fermente edilebilmesi ve mikrobiyotayı, konakçıda luminal/sistemik etkiler yaratarak daha sağlıklı bir kompozisyona doğru değiştirmesi gerekmektedir (Gibson ve Fuller, 2000; Guarner ve Malageld, 2003).

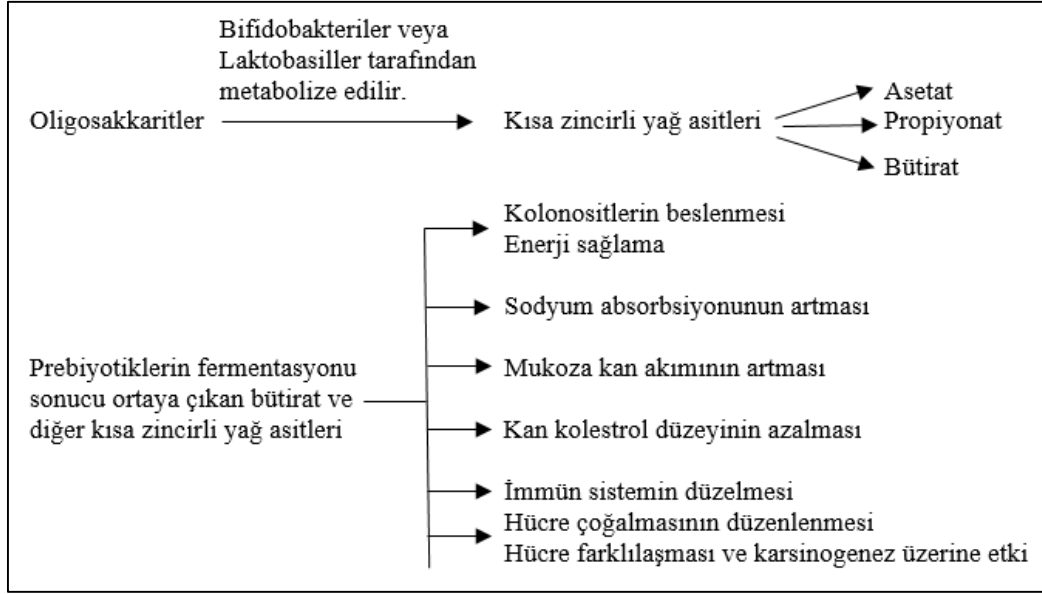
Bir dizi prebiyotik vardır ancak, çalışmalarda en fazla rapor edilmiş ve prebiyotiklerin etkileri için en tutarlı kanıtlar, çeşitli köken ve kimyasal özelliklerinden dolayı sindirilemeyen oligosakkaritler olmuştur (Alloui ve diğerleri, 2013). Prebiyotik olarak kullanılan oligosakkaritler; patojen mikroorganizmaların bağırsak yüzeyinde tutunmasını sağlayan fimbriyalara bağlanma yeteneğine sahiptir ve bu nedenle patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu engelleyerek, dışkı yoluyla atılmasına neden olur (Sezen, 2013). Birçok meyve ve sebze, frukto-oligosakkarit (FOS) gibi prebiyotik oligosakkaritler içerir. FOS'lar, üst gastrointestinal kanalda hidrolize ve absorbe edilmez, patojenik bakterileri rekabetçi bir şekilde dışlayan konakçı-yararlı bakteriler için bir besin kaynağı olarak işlev görür ve yararlı bakterilerin büyümesini seçici olarak teşvik eder (Alloui ve diğerleri, 2013). FOS'lar soğan, sarımsak, muz, kuşkonmaz, pırasa, Kudüs enginarı, hindiba gibi çeşitli yiyeceklerde bulunabilir. Prebiyotik olarak kullanılan oligosakkaritler, yaklaşık 2 ila 20 arasında monosakkarit birimlerinden oluşan kısa zincirli polisakkaritlerdir. Meyve ve sebzelerde doğal olarak meydana gelen ve ekstrakte edilebilir olanların yanı sıra,

polisakkaritlerin (örneğin, diyet lifleri, nişasta) hidroliziyle veya enzimatik yolla ticari olarak da üretilir. Aşağıda verilen oligomerlerin prebiyotik potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (Saad, Delattre, Urdaci, Schmitter ve Bressollier, 2013; Manning ve Gibson, 2004; Gibson, Ottaway ve Rastall, 2000).

- | | |
|--------------------------|-----------------------|
| – İnülin | – Laktuloz |
| – Gluko-oligosakkarit | – Laktosükroz |
| – Frukto-oligosakkarit | – Ksilo-oligosakkarit |
| – Galakto-oligosakkarit | – Soya-oligosakkarit |
| – İzomalto-oligosakkarit | – Platinoz |

2.2.1. Prebiyotiklerin etki mekanizması

Prebiyotiklerin konakçı üzerine çeşitli yararlı etkileri olmasına rağmen, en temel etki mekanizmaları *Bifidobacteria* ve *Lactobacillus* gibi probiyotik bakteriler için enerji ve karbon kaynağı olarak görev almaları ve böylece sindirim sistemi mikrobiyal dengesini iyileştirmeleridir. Prebiyotikler için buradaki en önemli unsur sindirim kanalında bir ya da sınırlı sayıda yararlı bakteriyi seçici şekilde zenginleştirmeleri ve bunların aktivitelerini yine canlının lehine değiştirmeleridir. Prebiyotikler, gastrointestinal sisteme adapte olmuş yararlı bakterilerin gelişimini teşvik ettiğinden, prebiyotiklerin probiyotiklerden daha etkili olduğu söylenebilmektedir (Üstündağ ve Özdoğan, 2017; Sugiharto, 2016). Kolona değişikliğe uğramadan ulaşan prebiyotikler, bakteriler tarafından hidrolize edilir. Hidroliz işlemi özellikle bifidobakteriler tarafından gerçekleştirilir ve bu işlem için betafruktofuranozidaz enzimine gereksinim vardır. Fermentasyon işlemi sonunda kısa zincirli yağ asitleri, organik asitler ve kısa zincirli karboksil asitler ortaya çıkar (Coşkun, 2006). Kısa zincirli yağ asitlerinin sağlığımız açısından çeşitli yararlı etkileri vardır. Bağırsak pH'sını düşürür, bu ortamda mineral, özellikle de kalsiyum emilimi daha iyi olur. Asidik ortamda yararlı mikroorganizmalar çoğalabilirken, patojen mikroorganizmalar çoğalamaz. Kısa zincirli yağ asitleri bağırsak epitel hücreleri için de enerji kaynağıdır. Ayrıca kısa zincirli yağ asitlerinden propiyonik asit, hepatik yağ asidi sentezini inhibe ederek serum LDL kolesterol düzeylerini düşürür (Coşkun, 2006; Gibson ve Roberfroid, 1995; Tokunaga, 2004) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Oligosakkaritlerin bağırsak bakterileri tarafından fermentasyonu sonucu ortaya çıkan kısa zincirli yağ asitleri ve bunların sağlık üzerindeki olumlu etkileri (Coşkun, 2006).

Prebiyotiklerin fermentasyonu sonucu meydana gelen laktik asidin aktivitesiyle ortamda *Salmonella*, *Clostridia* ve *E. coli* gibi patojen mikroorganizmaların koloni oluşturmaları engellenir ve böylelikle konakçı bağışıklık sistemi güçlenir (Çabuk, Bozkurt, Alçiçek, Çatlı ve Başer, 2006). Maltoz, laktoz, sakkaroz gibi oligosakkaritlerin yararlı bakteri sayısını artırarak laktik asit düzeyini yükselttiği, mannan-oligosakkaritlerin de intestinal mukozayı iyileştirdiği bildirilmiştir (Iji ve Tivey, 1999; Flickinger ve Fahey, 2002). *In vitro* olarak yapılan çalışmalarda prebiyotikler olarak kullanılan oligofruktoz ve inulin, kolondaki yararlı mikrobiyota (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* gibi) tarafından selektif olarak kullanılırken, toksin üreten *Clostridium*'lar, proteolitik *Bacteroides*'ler ve toksijenik *E. coli* gibi potansiyel patojen mikroorganizmaların gelişimini engellediği rapor edilmiştir (Gibson ve Roberfroid, 1995; Flickinger ve Fahey, 2002).

Prebiyotikler canlı değildir ve dolayısıyla canlılıklarını sürdürme gibi bir zorunlulukları da yoktur. Bu durum prebiyotikleri probiyotiklerden daha avantajlı bir duruma getirmektedir. Ayrıca, "sağlıklı bir bağırsak"ta bulunan birçok önemli bakterinin *in vitro* koşullarda üretilmesi her zaman mümkün olmamakta ve ticari probiyotik ürünler olarak kullanılamamaktadır. Bununla birlikte, prebiyotiklerin gıda ile verilmeleri sonucu kültür edilemeyen bakterileri stimüle ettikleri yapılan çalışmalar sonucu ortaya konmuştur (Rastall ve diğerleri, 2005).

2.2.2. Prebiyotiklerin hayvanların performansı ve sağlığı üzerine etkileri

Prebiyotikler hayvan sağlığı açısından güvenilir ve toksik bir yan etkisi olmayan maddeler olarak tanımlanmaktadır ve hayvanlarda prebiyotiklerin kullanımı uzun bir tarihe sahiptir. Son yıllarda prebiyotikler, yaygın olarak kümes hayvanları, sığır, domuz ve at gibi çiftlik hayvanlarının büyük bir çoğunluğunda yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bu sayede bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkileri, bağışıklığı düzenlemesi, enterikler üzerindeki baskılayıcı etkileri ve patojenler tarafından sistemik enfeksiyonları, besin sindirimi, performans indeksleri, hayvan orjinli ürünlerin kalitesi *in vivo* besleme yoluyla incelenmektedir (Di Gioia ve Biavati, 2018; Hamasalim, 2016; Charalampopoulos ve Rastall, 2009; Schmidt, Ilic, Poulev ve Raskin, 2007).

Prebiyotiklerin bir diğer avantajı yemlerin işlenmesi esnasında maruz kalınan ısı ve basınç karşısında dayanıklı olmalarıdır. Bunun dışında, birçok prebiyotik pahalı olmayan gıda işleme yan ürünlerinden elde edilmektedir. Bu da prebiyotiklere ekonomik açıdan avantaj sağlamaktadır (Crittenden ve Playne, 1996). Prebiyotiklerin hayvan beslemedeki olası etkileri 1980'lerin başında tanımlanmış ve prebiyotiklere ilginin artması ile birlikte hayvan besleme alanında birçok araştırma yapılmıştır (Verdonk, Shim, Van Leeuwen ve Verstegen, 2005).

Prebiyotiklerin hayvanlarda temel etkisi, konakçıda dirençli mikrobiyotayı teşvik etmek, patojen bakterileri baskılamak ve konağa sağlık açısından yararlar sağlamaktır (Alloui ve diğerleri, 2013). Kanatlı ve domuzların rasyonlarına oligosakkaritlerin ilavesi genellikle mikrobiyota çoğalmasını teşvik etmek için yapılmaktadır. Özellikle, domuzlarda, galakto-oligosakkaritler (GOS) hem *in vitro* hem de *in vivo* uygulamalarda bifidobakterilerin sayısını artırmak için kullanılmaktadır. Diyetlere frukto-oligosakkaritler (FOS) gibi prebiyotiklerin ilavesi *Salmonella* kolonizasyonunu azaltırken, bağırsak mikrobiyal popülasyonunda artışa neden olmaktadır (Gibson ve diğerleri, 2017; Charalampopoulos ve Rastall, 2009). Kanatlı hayvanlarda, patojen bakterilerin kontrolü ve baskılanmasında ksiloz, fruktoz, galaktoz, mannoz ve glukoz içeren prebiyotiklerin kullanılması umut vericidir (Alloui ve diğerleri, 2013). Çizelge 2.3'te prebiyotiklerin en önemli özellikleri ve hayvan organizmaları üzerindeki olumlu etkileri sunulmuştur.

Çizelge 2.3. İdeal prebiyotiklerin özellikleri ve hayvanlarda yararlı etkileri (Alloui ve diğerleri, 2013; Patterson ve Burkholder, 2003).

Özellikleri	Yararlı Etkileri
– Hidrolize ve absorbe edilmez.	– Daha yüksek SCFA üretimi.
– Bir veya sınırlı sayıda yararlı bakterinin gelişimini seçici olarak uyarır.	– Daha iyi biyokütle ve dışkı.
– Bağırsak mikrobiyota aktivitelerini yararlı bir şekilde değiştirir.	– Gelişmiş B vitamini sentezi.
– Konakçı savunma sistemini pozitif olarak modüle eder.	– Olumlu etkilenen mineral emilimi. – Kanseri önleme. – Kan kolesterol seviyesinde azalma. – Amonyak ve üre atılımında azalma. – Skatol, indol, fenol vb. maddelerce daha düşük dışkı içeriği.

Prebiyotiklerin hayvan yemlerine ilave edilmesinde, önemli birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler; rasyonun tipi (örneğin, sindirilemeyen oligosakkarit içeriği), katkının türü ve katılma düzeyi, hayvanın özellikleri (tür, yaş, üretim düzeyi) ve çiftliğin hijyen durumudur (Verdonk ve diğerleri, 2005). Bunlardan öncelikli olanlar prebiyotiğin türü ve katılma düzeyidir. Çünkü yapılan çalışmalar göstermiştir ki yüksek dozda prebiyotikler bağırsak sisteminde olumsuz etkiye neden olabilmektedir.

2.2.3. Tavuk prebiyotiklerinin performans ve sağlığa etkisi

Prebiyotikler, sindirim sistemindeki yararlı bakterilerin artırılmasını sağlayarak patojen bakterilerin önlenmesi ve bağışıklığın uyarılması, özellikle jejunumda maltaz, aminopeptidaz ve alkali fosfataz enzimlerinin reaksiyonunu artırması gibi etkilerinden dolayı kanatlılarda yem tüketimini, yemden yararlanmayı ve verim performansını artırmak, ürün kalitesini iyileştirmek amacıyla yem katkı maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Yadav ve diğerleri, 2016; Üstündağ ve Özdoğan, 2017). Tavuklarda yaygın olarak kullanılan prebiyotikler frukto-oligosakkaritler (FOS), mannan-oligosakkaritler (MOS), glukoz-oligosakkaritler, (GOS), inülin ve oligofruktanlardır (Sugiharto, 2016; Saminathan, Sieo, Kalavathy, Abdullah ve Ho, 2011; Nabizadeh, 2012).

Etlik piliçlerle yürütülen çalışmalar sonunda çeşitli prebiyotik bileşenlerin kullanılması ile kanatlı performansında önemli gelişmeler gözlemlendiği bildirilmiştir. Kim ve diğerleri (2011) yaptıkları çalışmada, rasyonlara %0.25 FOS ve %0.05 MOS ilave ettiklerinde hayvanların

canlı ağırlık artışlarında yükselme meydana geldiğini bildirmişlerdir. Etlik piliçlerin yem tüketiminde ve yemden yararlanma oranında ise bir değişiklik gözlemlenmemişlerdir. MOS kullanımı ile birlikte genellikle etlik piliçlerin canlı ağırlıklarında ve yemden yararlanma oranlarında gelişme gözlenirken, yem tüketiminde herhangi bir değişiklik görülmemektedir (Üstündağ ve Özdoğan, 2017; Murshed ve Abudabos, 2015). Rada ve diğerleri (2001), yumurtacı tavuklarda inülinin sekai *Bifidobacteria* sayısı üzerine olan etkisini araştırdıkları bir çalışmalarında deneme grubunda %5 inülin içeren rasyon kullanmışlardır. Sonuç olarak sekai *Bifidobacteria* konsantrasyonu deneme grubunda üç kattan fazla artmıştır. Total *Bifidobacteria* sayısı içerisindeki inülin fermente edici *Bifidobacteria* oranı ise deneme grubunda kontrol grubuna göre iki kat daha yüksek bulunmuştur. Özellikle kanatlılarda inüline bağlı olarak performanstaki iyileşmenin, ince ve kalın bağırsak uzunluğu ile villus yüksekliğinin artması ve dolayısıyla mide-bağırsak kanalının absorpsiyon kapasitesinin artması sonucu meydana geldiği ileri sürülmüştür (Van Loo, 2007). Chen ve diğerlerinin (2005) yapmış oldukları bir çalışmada, yumurtacı tavukların yemlerine %1 oligofruktoz ve %1 inülin ilavesinin kontrol grubuna göre yumurta sarısındaki kolesterol seviyesini sırasıyla %18,64 ve %16,44 oranında düşürdüğü bildirilmiştir. Alataş ve diğerleri (2010), saha şartlarında yumurta tavuğu rasyonlarına ilave edilen FOS'un satılabilir yumurta ve yemden yararlanma oranını artırdığını ve hasarlı yumurta oranı ile günlük yem tüketimini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada MOS içeren yemle beslenen etlik piliçlerde bağırsak *Salmonella* yoğunluğunun katkısız yemle beslenenlere oranla %26 azaldığı bildirilmiştir (Gaggia ve diğerleri, 2010). Yalçınkaya ve diğerleri (2008), MOS'un etlik piliçlerde performans ve bazı kan parametreleri üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, deneme periyodu süresince kandaki ALT ve AST düzeylerinin önemli derecede azaldığını tespit etmişler ve ortalama kolesterol düzeyinin %0,05 MOS katılan grupta diğer gruplara göre önemli derecede azaldığını bildirilmişlerdir. Chen (2003b) tarafından broylerlerde yapılan bir denemede, rasyona %1 inülin ve %1 oligofruktoz ilavesinin dişilerde canlı ağırlık kazancını, yemden yararlanmayı, karkas ağırlığını ve karkas yüzdesini iyileştirdiği, erkeklerde ise önemli bir etki yaratmadığı bildirilmiştir. Spring ve diğerlerinin (2000) broyler üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, rasyona %0,4 seviyesinde ilave edilen prebiyotiklerin (MOS), *E. coli*, *Salmonella pullorum*, *S. enteritidis*, *Salmonella coleraesuis*, *S. Typhimurium* gibi patojen bakterilere karşı etkili olduğu ve patojen mikroorganizmaları bünyelerine bağlayarak, onların dışkıyla dışarı atılmalarını sağladıklarını bildirmişlerdir.

2.3. Sinbiyotikler

Sinbiyotik terimi, probiyotik ve prebiyotikleri birlikte bulunduran besin veya destek amaçlı kullanılan ürünleri tanımlamaktadır. Probiyotiklerle birlikte probiyotiğin tüketeceği prebiyotikler verildiğinde daha uzun süre canlı kalacakları varsayılmaktadır. Prebiyotik ve probiyotiklerin konakçı üzerindeki olumlu etkilerinin aynı yönde artacağı düşünülmektedir. Sözcük sinerjiye işaret ettiği için, bu terim probiyotiğin prebiyotik bileşiği seçici olarak tercih ettiği ürünler için kullanılmaktadır (Schrezenmeir ve de Vrese, 2001; Rastall ve Maitin, 2002). Sinbiyotiklere, frukto-oligosakkarit ve bifidobakteri, laktitol ve laktobasil, frukto-oligosakkarit ve laktobasil, inülin ve bifidobakteri ile inülin ve laktobasil kombinasyonları örnek verilebilir (Sharma ve diğerleri, 2018).

Yapılan bazı çalışmalar hem prebiyotiklerin hem de probiyotiklerin kullanımı sonucu sindirim sisteminde arzu edilen bakteri sayısının arttığını ve sonuç olarak sağlık üzerindeki olumlu etkilerini ve genç hayvanların daha iyi büyüme performansına ulaşmadaki etkinliğini göstermiştir. Sinbiyotiklerin bu gibi olumlu etkileri iki yolla elde edilir: (1) probiyotiklerin canlılığını geliştirerek ve (2) sağlık üzerinde belirli yararlar sağlayarak (Sekhon ve Jairath, 2010; Patterson ve Burkholder, 2003). Bir sinbiyotik alımı bağırsak biyoyapısının bakımıyla bağırsak metabolik aktivitelerinin düzenlenmesine yol açar. Özellikle SCFA, karbon disülfür, ketonlar ve metil asetatın önemli artışı, sinbiyotik yem takviyelerinin sağlığı teşvik edici etkilerini göstermiştir (Alloui ve diğerleri, 2013).

Hoseinifar ve diğerlerinin (2017) yapmış oldukları çalışma, *Pediococcus acidilactici* ve GOS'un kombine verilisinin gökkuşağı alabalığının büyüme performansına ve aynı zamanda bağırsak mikrobiyotasına yararlı etkilerini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, *P. acidilactici* ve GOS'un gökkuşağı alabalığı için uygun bir sinbiyotik olarak düşünülebileceğini ortaya çıkarmıştır. Broyler tavuklarda yapılan bazı çalışmalarda sinbiyotiklerin, broyler tavukların bağırsaklarında *E. coli* ve toplam koliform popülasyonlarını azalttığı görülmüştür. Diyetle önerilen seviyelerden daha yüksek verilen sinbiyotik konsantrasyonlarının, broyler tavuklarının bağırsaklarındaki laktik asit bakterisi popülasyonunu artırdığı belirlenmiştir (Hamasalim, 2016; Dibaji, Seidavi, Asadpour ve Moreira da Silva 2014). Awad ve diğerlerinin (2009) broyler tavuklar üzerinde yapmış oldukları çalışmada sinbiyotik olarak kullanılan ürünlerin, probiyotik *Lactobacillus* sp.'ye göre daha büyük bir büyüme destekleyici etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, diyet takviyeleri, piliçlerin bağırsak

mukozasının villus yüksekliğinde ve kript derinliğinde de bir artışa neden olmuştur. Mookiah ve diğerlerinin (2014) yaptıkları araştırmada, kümes hayvanlarının yemlerinde prebiyotik isomalto-oligosakkaritlerin (IMO), 11 probiyotik *Lactobacillus* suşunun ve bunlardan oluşturulan sinbiyotiklerin kullanılmasının, broyler tavuklarda ağırlık kazancını ve yem dönüşüm oranını kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. Dolayısıyla yapılan araştırmalarda probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotiklerin kümes hayvanlarında enterik hastalıkları azaltma potansiyeli dikkate alındığında, antibiyotikler yerine alternatif olarak kullanılabilecekleri bildirilmektedir (Frizzo, Zbrun, Soto ve Signorini, 2011; Kutlu ve Özen, 2009).

2.4. Ekzopolisakkaritler (EPS)

Ekzopolisakkaritler (EPS), dallanmış tekrarlı şeker birimlerini veya şeker türevlerini içeren uzun zincirli, yüksek moleküler ağırlıklı, suda çözünebilen polimerlerdir. EPS'ler laktik asit grubuna dahil olan birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedir. LAB, GRAS (genellikle güvenli kabul edilen) statüsünde bakteriler olup; bu bakteriler tarafından üretilen EPS'ler de GRAS olarak kabul edilmektedir. Farklı LAB suşları tarafından üretilen EPS'lerin kompozisyonları, üç boyutlu yapıları, sertlik, biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleri, şeker bağları, polimer uzunluğu, şeker içerikleri, polimer dallanmaları ve proteinlerle ilişkileri birbirinden farklıdır (Schurr, 2013; Kleerebezem ve Hugenholtz, 2003; Welman ve Maddox, 2003).

EPS'ler ana zincirin bileşimine ve biyosentez mekanizmalarına bağlı olarak homopolisakkaritler (HoPS) ve heteropolisakkaritler (HePS) olmak üzere ikiye ayrılır (Lynch, Zannini, Coffey ve Arendt, 2018). Genel olarak, heteropolisakkaritler birkaç farklı tipte monosakkaritten oluşur ve hücre içinde sentezlenir. Homopolisakkaritler ise sadece tek tip monosakkarit içerir ve harici olarak bakteri tarafından salgılanan bir enzim tarafından üretilir (Badel, Bernardi ve Michaud, 2011). Laktik asit bakterileri tarafından üretilen HoPS ve HePS'lerin özellikleri karşılaştırmalı olarak Çizelge 2.4'te sunulmuştur.

Çizelge 2.4. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen heteropolisakkaritlerin ve homopolisakkaritlerin özellikleri (Lynch ve diğerleri, 2018)

Heteropolisakkarit (HePS)	Homopolisakkarit (HoPS)
– Birden fazla tipte monosakkarit içerir.	– Tek tip monosakkarit içerir.
– Ana monosakkaritler: glukoz, galaktoz ve ramnoz	– Ana monosakkarit: glukoz veya fruktoz
– α ve β bağlantıları mevcuttur.	– α veya β bağlantıları mevcuttur.
– Dallanmış	– Genellikle doğrusal
– Molekül ağırlığı: 10^4 – 10^6 Da	– Molekül ağırlığı: $> 10^6$ Da
– Genel olarak <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> ve <i>Streptococcus</i> tarafından üretilir.	– Genelde <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> ve <i>Weissella</i> tarafından üretilir.
– Hücre içi ara maddelerden üretilir.	– Hücre dışı sükroz veya nişastadan üretilir.
– Nispeten düşük miktarlarda üretilir: litre başına miligram.	– Nispeten yüksek miktarlarda üretilir: litre başına gram.
– Karbonhidrat olmayan gruplar içerebilir.	– Karbonhidrat olmayan gruplar içermemektedir.

EPS'lerin yararlı etkilerinin, yapısında bulunan monosakkarit kompozisyonuna, bağların türüne, dallanma derecelerine ve molekül ağırlığına bağlı olarak değişiklik gösterebildiği rapor edilmiştir (Iliev, Ivanova ve Ignatova, 2006). Homopolisakkaritler genellikle tek tip bağ içeren, nötr glukanlar olup, heteropolisakkaritlerin çoğu üronik asit varlığına bağlı olarak polianyoniktir (Singh, Saini ve Kennedy, 2008). Farklı şeker kısımlarından oluşan heteropolisakkaritlerin yapısında, glukoz, galaktoz, rhamnoz, mannoz, N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktozamin ve glukuronik asit olduğu bildirilmiştir (Duboc ve Mollet, 2001). Genellikle farklı bağlanma tipleri ile dallanmışlardır (Laws, Gu ve Marshall, 2001). Polisakkaritlerin molekül ağırlığı da biyoaktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Düşük moleküler ağırlıklı polisakkaritler, çoklu hücre zarı bariyerlerinden kolayca geçebildiklerinden bu polisakkaritlerin daha iyi biyolojik aktivite sergileyebildikleri belirtilmiştir (Li ve diğerleri, 2016).

Çoğu literatür EPS miktarının, karbon ve azot kaynaklarının çeşitleri ve miktarlarına bağlı olduğunu doğrular. Bunun yanında sıcaklık, pH, oksijen oranı ve fiziko-kimyasal koşullar da EPS üretimini etkilemektedir. Süt türevleri (laktoz tabanlı besiyeri) ve MRS (glukoz tabanlı besiyeri) laktobasil EPS üretimi için en çok kullanılan besiyerleridir. Diğer karışık besiyerleri de vardır, lakin yüksek maliyetler anlamına geldiğinden endüstriyel anlamda kar

sağlamadığı için EPS üretiminde tercih edilmemektedir (Petry, Furlan, Crepeau, Cerning ve Desmazeaud, 2000; Czaczyk ve Myszk, 2007).

2.4.1. Probiyotik bakterilerin EPS'lerinin önemi

Mikroorganizmaların çevrelerine salgıladıkları EPS molekülleri, hücreleri kurumadan, fagositozdan ve faj etkisinden koruduğu, yüksek oksijen gerilimi sağladığı, antibiyotiklere ve toksik maddelere (toksik metal iyonları, sülfür dioksit, etanol gibi), ozmotik strese karşı hücreleri koruma ve yüzeylere tutunmasında yapıştırıcı işleve sahip olduğu bilinmektedir (Low ve Howell, 2018; Moriello ve diğerleri, 2003; Ophir ve Gutnick, 1994). Bu gibi etmenler sayesinde EPS'ler probiyotik mikroorganizmaların epitelyum hücrelere tutunmasını sağlar ve patojenlerden daha önce tutunan probiyotikler, patojenlerin epitelyum hücrelere bağlanmalarını önler. Yani dolaylı olarak EPS, patojen mikroorganizmaların epitelyum hücrelere bağlanmasını önleyerek, etkilerini azaltır ve bu özellikleri ile probiyotik olarak kullanılacak bakteriye mikrobiyotada daha fazla avantaj sağlamaktadır. Ayrıca birçok bakteri için karakteristik olan EPS üretimi bakterilere patojenite, sinbiyotik rekabet yeteneği kazandırmaktadır. Mikrobiyal yapışmanın ilk aşamasında yüzeyde koloni oluşturma ve biyofilmin olgunlaşmasında görev alır (Wallace, Rice, White ve Sayler, 1994). Yapılan bazı *in vitro* çalışmalar, EPS'nin laktik asit bakterilerinin gastrointestinal epitel tabakaya adezyon etkinliğini artırabileceği rapor edilmiştir (de Palencia ve diğerleri, 2009).

EPS üretimi biyoteknolojide geniş uygulama alanlarına sahiptir. Yeni bir biyomateryal olarak kabul edilen, hücre dışına salgılanan EPS'ler, farklı fizikokimyasal ve reolojik özelliklerinden dolayı petrol iyileştirilmeleri, gıda, yem, tekstil, deterjan, yapıştırıcı, ambalajlama, kozmetik, tıp, eczacılık, tarım, atık su arıtımı, dere yatağı temizlemeleri, mayalanma ve akarsu işleme süreci gibi değişik endüstrilerde birçok uygulama alanı edinmiştir. Jelleştirme, kıvam artırıcı ve biyofilm tabakası oluşturma gibi özelliklerinin yanında, ekzopolisakkaritler, ilaç sektöründe, anti-tümör, anti-viral ve anti-inflamatuar gibi fizyolojik aktivite ajanlarına yardımcı madde olarak da kullanılmaktadır (Ramana, Xavier ve Sharma, 2017; Popescu, Pelin, Butnaru, Fundueanu ve Suflet, 2013; Suresh Kumar, Mody ve Jha, 2007).

2.4.2. EPS'nin prebiyotik olarak kullanımı

Mevcut prebiyotiklerin birçoğunun (inulin hariç) molekül ağırlığı düşüktür. Uzun karbonhidrat zincirlerine sahip olan prebiyotikler, kısa zincire sahip olanlardan çok daha yavaş bir şekilde metabolize edilmektedir. Çeşitli araştırmalarda polisakkaritlerin (örneğin EPS), proksimal kolonda hızlı bir şekilde fermente olabilmeleri nedeniyle daha fazla prebiyotik etki gösterdiği bildirilmiştir (Tsuda, Hara ve Miyamoto, 2008; Baruah, Das ve Goyal, 2016). Literatürlerde EPS'lerin prebiyotik aktiviteleri ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. EPS'ler GİS'te uzun süre mevcut durumlarını koruyabilmektedir ve bu durum *Bifidobacteria* ve *Lactobacillus* gibi probiyotik bakterilerin kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır (de Roos ve Katan, 2000). Welman ve Maddox (2003), LAB EPS'sinin gastrointestinal sistemde, probiyotik mikroorganizmaların gelişimini ve aktivitesini artırmak konusunda doğrudan ya da dolaylı olarak prebiyotik rolünün olduğunu bildirmişlerdir. EPS'lerin bifidobakterilerin gelişimini artırıcı etkisi de yapılan birçok çalışma ile ortaya konulmuştur. Örneğin yapılan bir çalışmada, *L. plantarum*, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa* ve *Pediococcus pentosaceus*'tan elde edilen L-EPS'lerin *B. bifidum* DSM 20456 tarafından karbon kaynağı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Hongpattarakere, Cherntong, Wichienchot, Kolida ve Rastall, 2012). Korakli ve diğerleri (2002) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis* ve *B. adolescentis* türlerinin gelişiminde kullanılan uygun besiyerinden glukoz kaynağı çıkartılmış ve yerine *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.392 suşundan elde edilen EPS aynı oranda eklenmiştir. 48 saat inkübasyon sonrasında bifidobakteri gelişimi ve kültür pH'ları ölçülmüş ve EPS'nin bifidobakteriler tarafından fermente edilebildiği rapor edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, *L. sanfranciscensis*'den elde edilen EPS'nin insan fekal kültürlerinde bifidobakterilerin sayısını yaklaşık 100 kat artırdığı bildirilmiştir (Bello, Walter, Hertel ve Hammes, 2001). Looijesteijn ve diğerleri (2001) tarafından yapılan çalışmada, *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ-4010 suşunun ürettiği EPS'nin sindirim sisteminde bir değişikliğe uğramadığı bildirilmiştir. Deney insan sindirim sistemine benzer bir model oluşturularak, pepsin, pankreatik enzimlerin bir karışımı, kolik ve taurodeoxy asit içeren bir çözeltide 37°C'de *in vitro* olarak gerçekleştirilmiştir. Aynı yazarlar, *L. lactis* subsp. *cremoris* B-40 tarafından üretilen EPS'yi içeren rasyon ile 2 hafta beslenen sıçanları kullanarak, EPS'nin direncini *in vivo* olarak da test etmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda EPS'nin sindirime karşı neredeyse %100 oranında dirençli olduğunu tespit edilmiştir. Dolayısıyla EPS'lerin prebiyotik olarak kullanılabileceği birçok literatür çalışması ile desteklenir niteliktedir.

2.5. Biyofilm

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka (ekzopolisakkarit matriks) içine gömülü halde yaşayan birçok mikroorganizmanın oluşturduğu topluluktur (Garde, Welch, Ferkinghoff-Borg ve Sams, 2015; Hall-Stoodley ve Stoodley, 2009). Bu ekzopolisakkarit matriks bakteriyi, UV radyasyon, farklı pH koşulları, ozmotik basınç, su kaybı, antibiyotik gibi birçok faktöre karşı korur (Herasimenka, Cescutti, Impallomeni ve Rizzo, 2007). Dolayısıyla biyofilmler, planktonik hücrelere kıyasla olumsuz çevre koşullarına ve antimikrobiyalere daha dayanıklıdır (Simões, Simões ve Vieira, 2010).

Biyofilmler, kendisini oluşturan bakteri türlerini barındırma durumlarına göre, aynı türleri içeren homojen biyofilmler ve farklı türleri içeren heterojen biyofilmler olmak üzere ikiye ayrılır. Biyofilmleri meydana getiren bakterilerin gerçekleştirdiği her bir biyokimyasal tepkime, birden fazla bakteri türünün birlikte hareket etmesini gerektirdiğinden, doğada biyofilmler çoğunlukla heterojen formda bulunmaktadır (Flemming ve diğerleri, 2016). Biyofilm oluşumunda bakteriler, hücre-hücre ve hücre-yüzey bağlantılarına aracılık eden çeşitli biyopolimerleri üretirler. Bu üretilen polimerler, farklı türler veya aynı türün farklı suşları tarafından kullanılabilir. EPS, biyofilmlerin ana matriks malzemesi olarak değerlendirilir ve biyofilmdeki toplam organik karbonun %50 ila %90'ını oluşturur. Bu özellikleri ile biyofilmlerin mekanik stabilitesini ve yüzeylere yapışmasını sağlar (Flemming ve Wingender, 2010; Donlan, 2002). EPS esas olarak polisakkaritlerden oluşur, ancak EPS'de proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi diğer biyomoleküller de bulunmaktadır. Glikopeptitler, lipidler ve lipopolisakaritler gibi polimerler bir yapı iskelesi oluşturur ve biyofilmi bir arada tutar (Gupta, Sarkar, Das, Bhattacharjee ve Tribedi, 2016). EPS'yi sentezleyemeyen suşların genellikle düşük adezyon kapasitesi, düşük biyofilm oluşumu ve konukçu savunmalarına ve biyositlere karşı artan hassasiyet sergiledikleri rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, ekzopolisakkaritlerin biyofilmin bütünlüğünü korumada ve biyofilm yaşam tarzının patojenik potansiyeline aracılık etmedeki önemini vurgulamaktadır (Rendueles, Kaplan ve Ghigo, 2013).

Biyofilm oluşumu temelde 4 aşamada gerçekleşmektedir. Bu aşamalar, biyofilm tabakasının oluşması, planktonik mikroorganizmaların adezyonu, mikroorganizmaların polimerik matriks içinde kolonizasyonu ve mikroorganizmaların dağılması olarak adlandırılan ayrılma aşaması şeklinde özetlenebilir (O'Toole, Kaplan ve Kolter, 2000). Biyofilmler hem biyotik

hem de abiyotik yüzeylerde bulunabilmektedir (Gupta ve diğerleri, 2016). Bağırsak, mikroorganizmaların gastrointestinal kanalda en fazla kolonileştiği bölgedir. Mukus tabakası ile kaplı mukoza yüzeylerinde ve bağırsak lümeninde, yiyecek artıkları üzerinde yaşayan ve ölü bakteri karışımlarını içeren geniş bir biyofilm oluşumu meydana gelir. Yapılan çalışmalar sonucunda, biyofilm popülasyonlarının planktonik hücrelere göre, daha hızlı bir şekilde polisakkaritleri sindirdiği ve oligosakkaritleri de en hızlı şekilde parçalayabildiği belirlenmiştir (Macfarlane, 2008).

Biyofilm oluşumu ve bakterilerin yüzeylere bağlanma düzeyi, ortamın pH'sı ve sıcaklığı, bakteri türü, bakteri hücre duvarının yapısı (Gram pozitif veya Gram negatif), bakteri sayısı, bağlandığı yüzeyin özellikleri, hücre hareketliliği, ortamdaki besin maddeleri içeriği ve miktarı, iyon konsantrasyonu gibi birçok faktöre bağlı olarak değişebilmektedir. *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* ve *Bacillus* cinsine ait bakteriler biyofilm oluşturmak için yüksek eğilime sahip olmakla birlikte, besin maddelerinin çok olduğu birçok ekosistemde tüm yüzey tipleri üzerinde biyofilm oluşturabilmektedirler (Gün ve Ekinci, 2009).

Biyofilmleri yok etmek için antibiyotik veya diğer biyositlerin kullanılması etkili yöntemler değildir (Rendueles ve diğerleri, 2013; Hall-Stoodley ve Stoodley, 2009). Bu nedenle biyofilmler, endüstriyel korozyon ve biyo-kirlenmeden, kronik ve hastane enfeksiyonlarına kadar birçok alanda büyük problem oluşturmaktadır (Rendueles ve diğerleri, 2013; Francolini ve Donelli, 2010; López, Vlamakis ve Kolter, 2010).

2.5.1. Probiyotiklerin biyofilm oluşumunu kontrolü ve engellemesi

Günümüzde biyofilmlerde mikroorganizmaların büyümesinin antimikrobiyal maddelere karşı dirençlerini artırabildiği yaygın bir bilgidir. Bunun, antibiyotiklerin hücre içine girişlerinin azalması, biyofilm hücrelerinin büyüme hızının düşmesi ve/veya biyofilmlerdeki bakteriyel hücrelerin metabolizmalarının azalmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ek olarak, persister hücrelerin varlığının ve biyofilmlerdeki spesifik direnç genlerinin ekspresyonunun bu toleransa katkıda bulunabileceği rapor edilmiştir. Antimikrobiyal tedaviler, sıklıkla biyofilmleri enfeksiyon bölgesinden uzaklaştırmak için başarısız olmaktadır. Bu sebeplerle, yeni hedeflere ve etki tarzlarına sahip antibiyofilm

ajanların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Brackman ve Coenye, 2015; Fux, Costerton, Stewart ve Stoodley, 2005).

Bu konuda yapılan araştırmalarda, quorum sensing molekül blokörleri, antimikrobiyal ajanlar ve biyositler kullanılmış, ancak bu yöntemlerde istenilen başarı tam olarak elde edilememiştir. Özellikle biyofilm yapısının antibiyotik, biyosit ve mekanik strese karşı artan toleransı sebebiyle, olgun biyofilmi yok etmek tamamen zorlaşmıştır (Onbaşlı, Çelik ve Ökçesiz, 2017; Schachter, 2003). Bu nedenle, alternatif uygulamalara ve doğal yöntemlere olan ihtiyaç hızla artmıştır. Bu ihtiyacı karşılayabileceği düşüncesiyle probiyotik bakterilerden elde edilen ürünlerin antibiyofilm ajan olarak kullanılması çalışmalarına olan ilgi dünya genelinde hızla artmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, laktobasillerden elde edilen hücresiz kültür filtratlarının ve EPS'lerin iyi birer antibiyofilm ajan olduklarını göstermektedir (Riaz Rajoka ve diğerleri, 2018; Wang, Zhao, Yang, Zhao ve Yang, 2015b; Kaur, Kaur, Sharma, Singh ve Kalia, 2018). EPS'lerin ve kültür filtratlarının antibiyofilm etkisindeki mekanizmaları henüz tam anlamıyla ortaya konulamamış olmakla birlikte, literatür taramaları sonucunda yapılan çalışmalardan elde edilen veriler aşağıda sunulmuştur.

Quorum sensing (QS) inhibitörlerinin uygulanmasıyla, hücre-hücre haberleşmesinin mekanizmasına yapılan müdahale sonucunda, QS ve biyofilm oluşumunun önlenmesi çalışmalarına ilgi artmış ve popüler bir konu haline gelmiştir. *S. aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* virulanslarının genel olarak biyofilm oluşturma yetenekleri, QS mekanizması ile ilişkilendirilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, adezyon ve biyofilm oluşumunun QS inhibitörlerinden olan RNAIII inhibe edici peptit (RIP) aracılığıyla hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarla önlenebileceği rapor edilmiştir (Onbaşlı, Çelik ve Ökçesiz, 2017; Balaban ve diğerleri, 2003). Laktik asit bakterilerinden elde edilen EPS'lerin hücre yüzey modifikasyonlarını veya hücre hücre etkileşimlerini azaltarak, bakteriyel hücrelerin başlangıçtaki otomatik bağlanmasını engellediği ve hücre bağlanmasını inhibe ederek güçlü antibiyofilm etki oluşturdıkları yapılan bazı çalışmalarda belirtilmiştir (Riaz Rajoka ve diğerleri, 2018; Kanmani ve diğerleri, 2013; Kim, Oh ve Kim, 2009). Örneğin, Kim ve diğerlerinin (2009)'da yapmış oldukları çalışmada, *L. acidophilus* A4 suşunun kültür süpernatantından izole edilen EPS'nin, *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *L. monocytogenes* ve *Bacillus cereus* suşları üzerinde biyofilm inhibisyon etkisi araştırılmış ve bu suşlar üzerinde antibiyofilm etki gösterdiği tespit edilmiştir. *L. acidophilus* A4 suşundan elde edilen EPS'nin biyofilm gelişimini, EHEC

O157:H7'in ilk bağlanma ve otoagregasyonunu inhibe ederek, bakteriyel yüzey özelliklerini etkilediği ve bu şekilde biyofilm oluşumunu engellediği bildirilmiştir. Benzer şekilde Kanmani ve diğerleri (2011), *Streptococcus phocae* PI80 suşunun kültür süpernatantlarından elde ettikleri EPS'nin, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* ve *S. aureus* tarafından polistren mikropalaklarda biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Yapılan araştırmalar biyofilm oluşumunun *Candida* sp. için en önemli virülans faktörlerden biri olduğunu göstermiştir. *Candida* sp., antifungal ajanların matris içerisine nüfuz etmelerini bloke etmekte ve hücreleri konakçı immün tepkilerinden koruyarak direnç sağlamaktadır. *Candida* sp. sadece konak dokularında değil, aynı zamanda tıbbi cihazlarda da biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir ve LAB süpernatantlarının bu mikroorganizmaların yapışma özelliğini önleyebilen veya azaltabilen biyoaktif antagonistik bileşenler içerdiği rapor edilmiştir (Ramage, Saville, Thomas ve Lopez-Ribot, 2005; Rodrigues, Van der Mei, Teixeira ve Oliveira, 2004). Aarti ve diğerleri (2018), yapmış oldukları çalışmada *Lactobacillus pentosus* LAP1 suşundan elde edilen kültür süpernatantlarının *Candida* sp. üzerinde antifungal ve antibiyofilm etkilerini araştırmışlardır. Deneylerden elde edilen sonuçlar neticesinde, kültür süpernatantlarının umut verici anti-*Candida* ve antibiyofilm özellikleri ile *L. pentosus* LAP1 suşunu güçlü bir probiyotik aday olarak tanımlamışlardır. Ayrıca LAB tarafından üretilen asitler, hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriyosinler gibi çeşitli biyoaktif bileşenlerin umut verici antifungal ajanlar olduğu rapor edilmiştir. Kaur ve diğerleri (2018) yapmış oldukları çalışmada sağlıklı çocukların dışkı örneklerinden izole ettikleri laktobasillerin hücre içermeyen kültür süpernatantlarının antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerini, güçlü biyofilm oluşturan *Vibrio cholerae* ve *Vibrio parahaemolyticus* türleri üzerinde incelemişlerdir. Çalışmada kullanılan 7 laktobasil izolatlarının tümünün geniş spektrumlu antimikrobiyal ve biyofilm inhibe edici aktivitelere sahip olduğu ve enfeksiyöz hastalıkları inhibe etmek için iyi profilaktik özelliklere sahip olabileceğini rapor etmişlerdir.

2.6. Probiyotiklerin Antimikrobiyal Aktivite Etkileri

Kanatlı sektöründe, patojenlerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için antimikrobiyal büyüme promotörlerinden özellikle antibiyotikler uzun yıllar boyunca kanatlı yemlerinde sağlığı koruyucu ve iyileştirici faktörler olarak kullanılmıştır. Antibiyotiklerin sürekli

kullanılmasına bağılı olarak antibiyotiklere karşı mikroorganizma direnci oluşmakta ve bu da antibiyotikleri de bu konuda pasif hale getirmektedir (Pfaller, 2006; Kaiser ve diğeri, 2000). Artan antibiyotik direnci hayvan ve insan sağığı açısından tedirgin edici boyutlara vardığından, çoğı ülkede yem katkı maddesi olarak kullanımı yasaklanmış ve alternatif koruyucu yem katkı maddelerinin geliştirilmesi ve keşfine yönelik araştırmalara ilgi artmıştır.

Laktobasillerin ve bifidobakterilerin antimikrobiyal aktivite mekanizmalarına ilişkin birçok fikir öne sürülmüştür. Laktobasil ve bifidobakterilerin, rekabetçi dışlama ile patojenlerin epitelyal ve mukozal yapışmasını engelleyerek, patojenlerin epitelyal istilasını inhibe ettiği ve buna ek olarak, antimikrobiyal maddeler üretmeleri ve/veya mukozal immüneyi uyarmaları sonucunda antimikrobiyal aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir (Servin, 2004). Laktobasiller, organik asitler (laktik asit, asetik asit ve propiyonik asit), diasetil, bakteriyosin ve hidrojen peroksit gibi antimikrobiyal metabolitleri serbest bırakarak patojenik bakterilerle savaşımaya yarayan kommensal flora olarak kabul edilmektedir ve probiyotik olarak seçilmelerindeki en belirleyici unsurlardan biri de budur (Aarti ve diğeri, 2018; Šušćović ve diğeri 2010; Servin, 2004). Organik asitlerin, özellikle asetat, butirat ve propiyonatın, patojenik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve büyüme sırasında broyler tavuklarının çekumundaki patojen sayısındaki azalmadan sorumlu olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Jahromi ve diğeri, 2016; van der Wielen ve diğeri, 2000; Neal-McKinney ve diğeri, 2012). Özellikle laktik asit bakterilerinden elde edilen bakteriyosinlerin kullanılma potansiyeli, antibiyotik dirençli problemlerin de ortadan kaldırılmasında alternatif bir strateji sunmaktadır (Šušćović ve diğeri, 2010). Yapılan çalışmalar, laktik asit salgılayarak bağırsak pH'sını düşüren ve patojen kontrolü için uygun bir aday olan *Lactobacillus* suşlarının, *Salmonella* spp., *E. coli*, *Enterococcus* spp., *C. perfringens* ve *Campylobacter* spp.'nin baskılanması veya dışlanmasıdaki etkinliğini göstermiştir (Baldwin, Hughes, Van, Moore ve Stanley, 2018; Gusils, Oppezzo, Pizarro ve Gonzalez, 2003; Lee, Yu ve Heo, 2003).

Ahmed ve diğeri (2019) yapmış oldukları çalışmada, tavuktan izole edilen *Lactobacillus* suşlarından elde edilen kültür filtratlarının agar kuyu difüzyon yöntemi ile *S. aureus* NCTC-6571, *S. Typhimurium* ATCC-14028 ve *E. coli* ATCC-25922 bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, *L. salivarius* ZA67C, ZA68C1 ve ZA74C1 suşlarından elde edilen kültür filtratlarının, *S. aureus* NCTC-6571

suşuna karşı 18-21 mm aralığında, *S. Typhimurium* ATCC-14028 suşuna karşı 10-13 mm aralığında, *E. coli* ATCC-25922 suşuna karşı ise 12-14 mm aralığında zon çapı oluşumu ile antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Khan ve diğerlerinin (2019) yapmış oldukları çalışmada, piliç bağırsağında *C. jejuni* kolonizasyonunu önleyebilecek probiyotik suşların izole edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada izole edilen *Lactobacillus gallinarum* PL53 suşunun *in vivo* denemelerde birincil üretim seviyesinde *C. jejuni* mikrobiyal yükünü önemli ölçüde düşürdüğü, potansiyel gıda kaynaklı patojenlere karşı rekabetçi dışlama sergileyerek çoğalmalarını önlediği ve genel bağırsak mikrobiyotasının sağlığını koruyan etkili bir probiyotik olduğu sonucuna varılmıştır. *L. gallinarum* PL 53 suşu, birincil üretim seviyesinde *C. jejuni* kolonizasyonunu önlemiştir. Dec ve diğerlerinin (2016), tavuk kaynaklı bazı *Lactobacillus* izolatlarının antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için yapmış oldukları çalışmada, tüm laktobasil izolatları, *Salmonella enterica*, *E. coli* ve *C. perfringens* türlerine karşı antimikrobiyal aktivite taramasından geçirilmiştir. Araştırma sonuçları, *Lactobacillus* izolatlarının, katı ortam üzerinde aktif bileşikler üretebildiğini, hemen hemen hepsinin H₂O₂ üretme kabiliyeti sergilediğini ve bu patojenlere karşı antagonistik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle *Lactobacillus salivarius* suşlarının tüm indikatör bakterilere karşı güçlü bir antimikrobiyal aktivite sergilediği ortaya konulmuştur. Çalışma sonunda *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin hayvan patojenlerine karşı sergiledikleri bu antimikrobiyal etkinin, ürettikleri antimikrobiyal maddelerin yapısına ve patojenin tipine bağlı olarak değişebildiği rapor edilmiştir.

2.7. Quorum Sensing

Biyofilm oluşumu, bakterilerin bir araya gelerek belirli bir yüzeye tutunduktan sonra yapışması ve o yüzeyde diğer türlerle birlikte yaşamaya devam etmesi şeklinde gerçekleşen rastgele bir olay değildir. Bir biyofilm oluşturmak için bakteriler gen ekspresyonlarını senkronize etmek zorundadır ve bazıları bunu elde etmek için “quorum sensing (QS)” olarak adlandırılan mekanizmayı kullanır. QS ile bakteriler ürettikleri sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte, çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını hissedebilmekte ve bu verilerin de diğerlerine iletilmesine olanak sağlamaktadır (Gün ve Ekinci, 2009; Cámara, 2006; Lyon ve Muir, 2003). Bakteriyel popülasyonlar, “otoindüktörler” olarak adlandırılan çeşitli hücre içi ve hücreler arası sinyaller üreterek ve bunlara cevap vererek gen ekspresyonlarını koordine etmektedirler (Camilli ve Bassler, 2006). Bir yüzeye tutunan her bakteri, ortama resmen “ben buradayım” mesajı veren bir

molekül salgılar ve bu sayede bakteriler QS mekanizması ile çevrelerindeki bakteriyel popülasyon yoğunluğunu belirlemektedir. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artar ve bu artışla birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Kısacası biyofilm içerisinde yer alan bakteriler, hücreler arası düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla haberleşmektedir (Gün ve Ekinci, 2009; Arnold ve Silvers, 2000). QS bu sayede biyoluminesans, virülans faktörlerinin salgılanması, biyofilm oluşumu, antibiyotik direnci gibi çeşitli fizyolojik süreçleri kontrol etmektedir (Rabin ve diğerleri, 2015; Irie ve Parsek, 2008).

QS mekanizması, sinyal moleküllerinin sentezlenmesi, besi ortamına salgılanması ve diğer bakteriler tarafından algılanması olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır (de Kievit ve Iglewski, 2000). Öncelikle her bakteri kendine özgü genlerini kullanarak eksponansiyel fazın sonuna doğru giderek artan şekilde sinyal moleküllerini üretir ve bu moleküller sitoplazmada modifiye edilerek, hücre zarından ortama salgılanır. Son aşama olan sinyal moleküllerinin algılanması ise sinyal moleküllerinin hücre içine alınması veya hücre içine alınmadan hücre zarında bulunan bir reseptör ile etkileşimi sonucunda gerçekleşir (Schauder ve Bassler, 2001). Örneğin, açıl-homoserin laktonları (AHL'ler) Gram-negatif bakterilerde QS'ye aracılık eder. Açıl yan zincirinin uzunluğuna ve işlevselliğine bağlı olarak birkaç AHL tipi vardır. Küçük peptitler, Gram-pozitif bakterilerdeki QS aracılı gen ekspresyonunu düzenler ve AI-2, hem Gram-pozitif hem Gram-negatif bakterilerde QS'ye aracılık eder, ancak hücre sinyalindeki rolü hala tartışmalıdır (Rabin ve diğerleri, 2015; Rezzonico ve Duffy, 2008). Düşük hücre yoğunluklarında, hücre dışı ortamda tespit edilemeyecek kadar az miktarda otoindüktör mevcuttur. Hücre yoğunluğu arttıkça, oto indükleyici konsantrasyonu bir eşiğe ulaşır ve bu noktada oto indükleyici/düzenleyici protein (reseptör) kompleksi, hedef genlerin ekspresyonunu indüklemek veya bastırmak için etki eder (Rabin ve diğerleri, 2015; Miller ve Bassler, 2001).

Daha önceki konularda da bahsedildiği gibi laktik asit bakterilerinin patojen mikroorganizmaları inhibe ederek konakçının sağlığı üzerinde olumlu etki gösterdiği pek çok çalışmada belirtilmiştir. Probiyotik mikroorganizmalar antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra, patojenlerin sinyal moleküllerinin oluşmasını engelleyen düşük molekül ağırlıklı biyoaktif bileşenleri de üretmektedir. Bu biyoaktif bileşenler arasında kısa zincirli yağ asitleri, hidrojen peroksit, bakteriyosin benzeri bileşikler, organik asitler, nitrik oksit ve sinyal molekülleri sayılabilmekte ve bu moleküller patojenler tarafından oluşturulan

toksinleri, zararlı metabolitleri ve sinyal moleküllerini etkisiz hale getirerek veya üretimlerini baskılayarak patojenlerin aktivitelerini engellemektedir (Yılmaz-Yıldıran, Karahan ve Başıy it-Kılıç, 2015; Shenderov, 2011).

3. MATERİYAL METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar

Çalışma süresince Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda bulunan cihazlar kullanılmıştır. Bunlar: Hassas Terazî (0,1-10 Mg), Manyetik Karıştırıcı (Velp), Otoklav (Tomy-Sx 700E), Çeker Ocak (Vortice), Santrifüj (Nüve), Soğutmalı Santrifüj (Sigma 2-16KC), Mini Santrifüj (Selecta), Etüv (Raypa/Incuberm/Dıgıt), CO₂'li etüv (Sanyo), Pasteur Fırını (Nüve Fn 055), Su Banyosu (GFL), Vorteks (Dragonlab), pH Metre (Jenco 6173), Buzdolabı (Beko), -80 ve -30°C Derin Dondurucu, Işık Mikroskobu (Leica), Spektrofotometre (Hitachi), Distile Su Cihazı (Mes/MES06), Otomatik Pipetler (Ependorf), McFarland Densitometre (Biosan Den-1), Liyofilizatör (Christ alpha 2-4 LD plus), Mikroplate Okuyucu (Epoch, BioTek), Laminer Flow (Telstar), Inverted Mikroskop (Leica)'tur.

3.1.2. Çalışmada kullanılan bakteriler

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'nın yürütmekte olduğu Tarımsal Araştırma ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenen, TAGEM/15/AR-GE/40 kodlu proje kapsamında serbest gezen köy tavuklarının bağırsaklarından izole edilen ve proje kapsamında fizyolojik testleri yapılmış 50 *Lactobacillus* cinsine ait izolat kullanılmıştır. Bu tez kapsamında *Lactobacillus* cinsine ait 50 izolatın ekzopolisakkarit (EPS) üretim kapasiteleri belirlenmiş ve tez çalışması için en yüksek EPS üretim kapasitesine sahip, 11 izolat seçilmiştir. Yüksek EPS üretim kapasitesine sahip bu 11 izolatın biyokimyasal testleri (API 20A, 20E ve 50CH kitleri ile) ve 16S rDNA dizilerine göre moleküler tanımlamaları TAGEM/15/AR-GE/40 Projesi'nde başka bir çalışma kapsamında yapıldığından dolayı sonuçlar tezde verilmemiştir. Tez çalışmasında kullanılan *Lactobacillus* cinsine ait türler ve suş kodları Çizelge 3.1'de sunulmuştur. Çalışmalarda kullanılan diğer test bakterileri ise Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Kültür Koleksiyonu'ndan alınmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan, yüksek EPS üretim kapasitesine göre seçilen *Lactobacillus* cinsine ait türler

Tür İsmi	Suş Kodu
<i>Lactobacillus salivarius</i>	ZDM2132
<i>Lactobacillus salivarius</i>	BIS312
<i>Lactobacillus salivarius</i>	BIS412
<i>Lactobacillus salivarius</i>	BIS713
<i>Lactobacillus salivarius</i>	BIS722
<i>Lactobacillus salivarius</i>	BIS820
<i>Lactobacillus reuteri</i>	BIS612
<i>Lactobacillus reuteri</i>	BIS731
<i>Lactobacillus saerimneri</i>	BIS717
<i>Lactobacillus agilis</i>	BIS721
<i>Lactobacillus agilis</i>	BIS911

Açıklama: İzolat kaynağı tavuk bağırsağıdır. Hiçbir tavukta antibiyotik kullanımı yoktur.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan diğer mikroorganizma türleri

Tür İsmi	Suş Kodu	Kullanıldığı Çalışmalar
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Biyofilm, Antibiyofilm ve Antimikrobiyal Aktivite
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11229	Biyofilm, Antibiyofilm ve Antimikrobiyal Aktivite
<i>Staphylococcus aureus</i>	EB-1	Biyofilm, Antibiyofilm ve Antimikrobiyal Aktivite
<i>Escherichia coli</i>	ATCC-35218	Biyofilm
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	Biyofilm
<i>Streptococcus mutans</i>	CNCT 8177	Biyofilm
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644	Biyofilm
<i>Bacillus cereus</i>	RSKK 863	Biyofilm
<i>Salmonella Typhimurium</i>	CCM 5445	Biyofilm
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Biyofilm
<i>Staphylococcus aureus</i>	EB18	Biyofilm
<i>Salmonella Typhimurium</i>	MU80	Biyofilm
<i>Chromobacterium violaceum</i>	ATCC 12472	Anti-Quorum Sensing

Çalışmada kullanılan bakterilerin çalışma boyunca Gram boyama ile mikroskopik olarak ve çizgi ekim ile koloni morfolojilerine bakılarak saflık kontrolleri yapılmıştır (Harrigan ve McCance, 1976).

3.1.3. Çalışmada kullanılan hücre hattı

Bu tez çalışmasında seçilen *Lactobacillus* suşunun hücreye adezyon kapasitesinin belirlenmesinde, HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücre hattı (ATCC® HTB-38™) kullanılmıştır.

3.1.4. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

Laktik asit bakteri kültürlerinin geliştirilmesinde De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içeriği Çizelge 3.3'te verilmiştir. Çizelgedeki maddeler belirtilen miktarlarda tartılıp, bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda homojen hale gelinceye kadar karıştırılmış ve son hacim 1000 mL olmak üzere pH $6,2 \pm 0,02$ 'ye ayarlanmıştır. Besiyeri otoklavda 121°C 'de 15 dk. steril edilerek hazırlanmıştır. MRS Agar besiyeri hazırlamak için ise pH ayarı yapıldıktan sonra 1000 mL besiyeri içerisinde 15 g Agar (Merck) olacak şekilde tartılmış ve otoklavda 121°C 'de 15 dk. steril edilmiştir. Oda koşullarında sıcaklık yaklaşık 50°C 'ye düştüğünde petri kaplarına aktarılmıştır.

Çizelge 3.3. De Man Rogosa Sharpe (MRS) içeriği

Maddeler	Miktar (g/L)	Maddeler	Miktar (g/L)
Pepton	10	Sodyum asetat	5
Yeast extract	5	Magnezyum sülfat	0,2
Beef extract	10	Amonyum sitrat	2
Glukoz	20	Mangenez sülfat	0,05
Dipotasyum fosfat	2	Tween 80	1,08 mL

Araştırmada kullanılan patojen mikroorganizmaların geliştirilmesinde Nutrient Broth (NB; 10 g pepton, 10 g et özütü, 5 g NaCl, 1000 mL distile su, pH: $7 \pm 0,02$) ve Nutrient Agar (NA; 10 g pepton, 10 g et özütü, 5 g NaCl, 15 g agar, 1000 mL distile su, pH: $7 \pm 0,02$) besiyerleri kullanılmıştır. *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 suşunun geliştirilmesinde ise Luria-Bertani Broth (LB Broth; 10 g tripton, 5 g NaCl, 5 g yeast ekstrakt, 1000 mL distile su, pH: $7,2 \pm 0,02$) ve Luria-Bertani Agar (LB Agar; 10 g tripton, 10 g NaCl, 5 g yeast ekstrakt, 15 g agar, 1000 mL distile su, pH: $7,2 \pm 0,02$) besiyerleri kullanılmıştır. Besiyerleri otoklavda 121°C 'de 15 dk. steril edilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan tuzlu fosfat tamponu (phosphate buffered saline, PBS), Çizelge 3.4'te verilen maddelerin belirtilen miktarlarda tartılıp, bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda homojen hale gelinceye kadar karıştırılması ve son hacmin 1000 mL olacak şekilde pH'ın $7,2 \pm 0,02$ 'ye ayarlanması ile elde edilmiştir. pH ayarı yapıldıktan sonra PBS, 121°C'de 15 dk. steril edilmiştir.

Çizelge 3.4. PBS tamponu içeriği

Maddeler	Miktar (g/L)
Sodyum klorür (NaCl)	8,0
Di potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	5,2
Di sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	7,1
Potasyum klorür (KCl)	2,0

Çalışmalarda kullanılan serum fizyolojik (SF) çözeltisi ise %0,875 oranında sodyum klorür (NaCl)'ün tartılarak saf su içerisinde çözündürülmesi ve otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edilmesi ile elde edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları

Lactobacillus cinsine ait bakterilerin geliştirilmesinde MRS Broth ve MRS Agar besi ortamları kullanılmıştır. MRS Broth içerisinde %2 olacak şekilde bakteri ekimi yapılmış ve 37°C'de 16-18 saat geliştirilen kültürler, en az iki kez aktifleştirildikten sonra çalışmaya alınmıştır. Antimikrobiyal aktivite, biyofilm ve antibiyofilm çalışmalarında kullanılan patojen mikroorganizmaların ise Nutrient Broth besiyeri içerisinde %2 olacak şekilde bakteri ekimleri yapılarak 37°C'de 24 saat geliştirilmiştir. L-EPS'lerin viyolasin üretimine etkisinin belirlenmesi çalışmasında kullanılan *C. violaceum* ATCC 12472 suşu, LB Broth içinde 35°C'de 120 rpm'de 24 saat inkübe edilerek geliştirilmiştir. Yapılan tüm çalışmalarda iki kez aktifleştirilmiş kültürler kullanılmıştır.

3.2.2. Bakterilerin muhafazası

Bu tez çalışmasında kullanılan bakterilerin kültür stokları gliserol içinde -80°C'de derin dondurucuda, bakterilere ait ana stoklar ise liyofilize edilerek +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Bu iki muhafaza yöntemine ilişkin metotlar aşağıda verilmiştir. İki yöntemde de muhafazaya alınacak bakteri kültürleri uygun besi ortamında iki kez aktifleştirilmiştir.

Gliserol içerisinde muhafaza

1,2 mL'lik ağzı kapaklı cryo tüplere 400 µL gliserol konularak, otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edilmiştir. Gliserol içeren steril cryo tüplere aktifleştirilen kültürlerden 400 µL ilave edilerek, bakteri suşları -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar üç ayda bir yenilenmiştir (Strasser, Neureiter, Geppl, Braun ve Danner, 2009).

Liyofilizasyon yöntemi ile muhafaza

Bakterilerin liyofilizasyon yöntemi ile muhafazası literatürdeki metotlar modifiye edilerek uygulanmıştır (de Valdez, de Giori, de Ruiz Holgado ve Oliver, 1985; Cody ve diğerleri, 2008). Aktifleştirilen kültürlerden katı besi ortamına ekim yapılmış ve petriler 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan koloniler, içerisinde 750 µL steril serum fizyolojik bulunan ependorflara aktararak (yaklaşık 50-60 koloni), pipetle homojenize edilmiştir. İçinde 750 µL steril Skimmed Milk Broth (LAB) bulunan vialler içerisine, bakteri süspansiyonundan 250 µL aktarılmıştır. Vialler -80°C'ye alınarak, 1 gece bekletilmiş ve ertesi gün liyofilizatör cihazında liyofilize işlemine geçilmiştir (Resim 3.1). Liyofilize bakteri kültürleri +4°C'de muhafaza edilmiştir.



Resim 3.1. Liyofilizasyonda kullanılan liyofilizatör cihazı (Christ alpha 2-4 LD plus) ve liyofilizasyon sonrası liyofilize bakteri kültürleri

3.2.3. Bakterilerin sayımı

Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların standart şekilde gerçekleştirilebilmesi amacıyla, çalışmada kullanılan bakterilerin 10^8 cfu/mL canlılık oranını verdiği optik yoğunluklar belirlenmiştir. Öncelikle bakteriler MCFarland densitometre cihazında ya da spektrofotometre cihazında farklı optik yoğunluklara ayarlanmış ve sonrasında uygun katı besiyerlerine alınarak canlılık sayımları yapılmıştır. Her bakteri için 10^8 cfu/mL canlılık oranını veren optik yoğunluklar bu şekilde belirlenmiş ve bu çalışmada uygulanan yöntem de çalışmamızda belirlenen standart değerler üzerinden açıklanarak aşağıda sunulmuştur.

Bakterilerin optik yoğunluklarının ayarlanması

Çalışmada kullanılan bakteri suşları 5 ml besiyerinde 2 kez aktifleştirilmiştir. Sonrasında 3000 rpm’de santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve pellet 5 ml steril SF ile çözülerek tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılmış ve bu sayede aktif bakteri kültürünün besiyerinden arındırılması sağlanmıştır. Bu şekilde SF ile yıkama işlemi 2 kez gerçekleştirilmiş ve bakteri pelleti elde edilmiştir. Optik yoğunluğun ayarlanmasında *Lactobacillus* cinsi bakteriler için MCFarland densitometre cihazı kullanılmıştır ve santrifüj ile çöktürülmüş bakteri pelleti steril SF içine alınarak bakteri yoğunluğu 7’ye ayarlanmıştır. Çalışmalarda kullanılan patojen bakterilerin ise optik yoğunlukları spektrofotometrik olarak, 620 nm dalga boyunda yine steril SF kullanılarak 0,5’e ayarlanmıştır. Bu şekilde optik yoğunlukları ayarlanan bakteriler canlı hücre sayımının yapılabilmesi için aşağıda detaylı olarak anlatıldığı gibi katı besi ortamlarına ekilmiştir.

Canlı hücre sayımı ve hesaplaması

Yukarıda anlatıldığı şekilde optik yoğunlukları ayarlanmış olan bakteriler, seri dilüsyon yöntemiyle dilüe edilmiştir. Elde edilen 6 farklı dilüsyonun her birinden 100 µL alınarak, Bölüm 3.1.4’te belirtilen uygun katı besi ortamlarına drigalski ile yayma ekim yapılmıştır. Çalışmalar 3 paralelli olacak şekilde yürütülmüştür. 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılan petri kutularında oluşan koloniler sayılarak örneklerde canlı mikroorganizma sayıları belirlenmiştir (Gürgün ve Halkman, 1990: 7-20). Her bakteri için 10^8 cfu/mL canlı yoğunluğunu veren dalga boyu bu şekilde belirlenmiş olup, tez süresince yapılan

çalışmalarda *Lactobacillus* suşları MCFarland densitometre cihazında 7'ye, patojen bakteriler ise spektrofotometre cihazında 620 nm dalga boyunda 0,5'e ayarlanmıştır.

3.2.4. Laktik asit bakterilerinin kültür ortamında EPS retimlerinin belirlenmesi

EPS eldesi

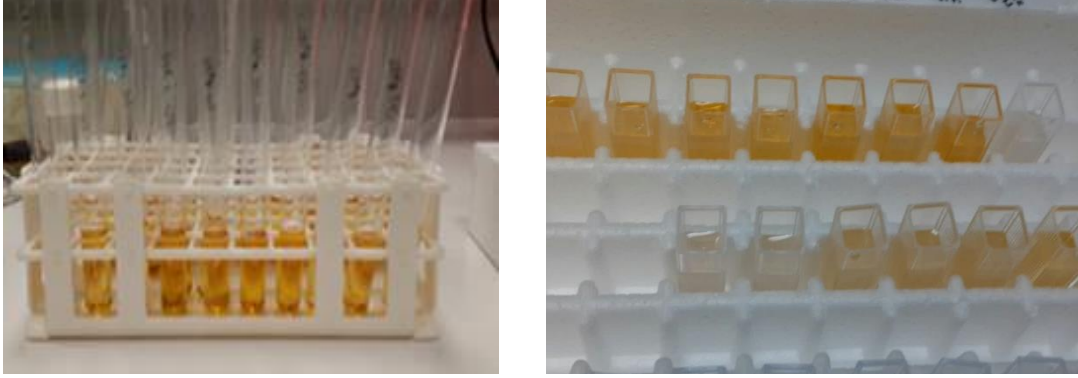
EPS miktar tayini çalışmasına ilişkin metot, ilgili literatürler derlenerek oluşturulmuş ve bu çalışmada kullanılan modifiye edilmiş metot aşağıda sunulmuştur (Marshall ve Rawson 1999; Yi, Huang ve Ge, 2008).

Aktif kültürlerin optik yoğunlukları McFarland densitometre cihazında 7'ye ayarlanarak, MRS besi ortamına %2 oranında aşılanmıştır. Aşılanmış tüpler ve kontrol amaçlı boş besiyeri içeren tüp 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda kültürlerden ve kontrol tüpünden 1'er mL endorf tüplerine alınarak 95°C'de sıcak su banyosunda benmari usul 10 dk. ısıtılmıştır. Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra üzerlerine %85'lik trikloroasetik asit (TCA, Sigma) zeltisinden 1,7 µL eklenerek, yarım saat bekletilmıştir. Sonrasında +4°C'de 13000 rpm'de 25 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda endorfaların dibinde pellet oluşturan protein kısmı atılmış, süpernatant (sıvı kısım) ise yeni endorf tüplerine alınmıştır. Süpernatantların zerine 1(süpernatant):3(alkol) oranında soğuk saf %96'lık etanol eklenmiştir. Örnekler +4°C'de 13000 rpm'de 25 dk. santrifüj edilmiş ve EPS' nin presipite olması sağlanmıştır. Çöken EPS'nin üzerindeki etanol pipet yardımıyla uzaklaştırılarak pelletin üzerine 1 mL %96'lık etanol eklenmiş ve tekrar +4°C'de 13000 rpm'de 25 dk. santrifüj edilmiştir. Presipite olan örneklerin üzerindeki etanol uzaklaştırılmış ve pellet 1 mL distile suda zldkten sonra, fenol sülfürik asit metoduna göre 490 nm dalga boyunda okuma (OD okumayı mg/L) işlemi ile EPS miktarı belirlenmiştir.

EPS miktarının fenol-sülfürik asit metodu ile belirlenmesi

Fenol-sülfürik asit metodu, ilgili literatürlerden derlenerek uygulanmıştır (Marshall ve Rawson, 1999; DuBois, Gilles, Hamilton, Rebers ve Smith, 1956). 1 mL distile suda çözülen örnekler ve krv olarak kullanılacak olan 1 mL saf su, cam tüpler içeresine alınarak üzerlerine eker ocağın içerisinde 0,5 mL fenol (Sigma) ve 5 mL sülfürik asit (Merck) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk. bekletildikten sonra, vorteks yardımıyla iyice

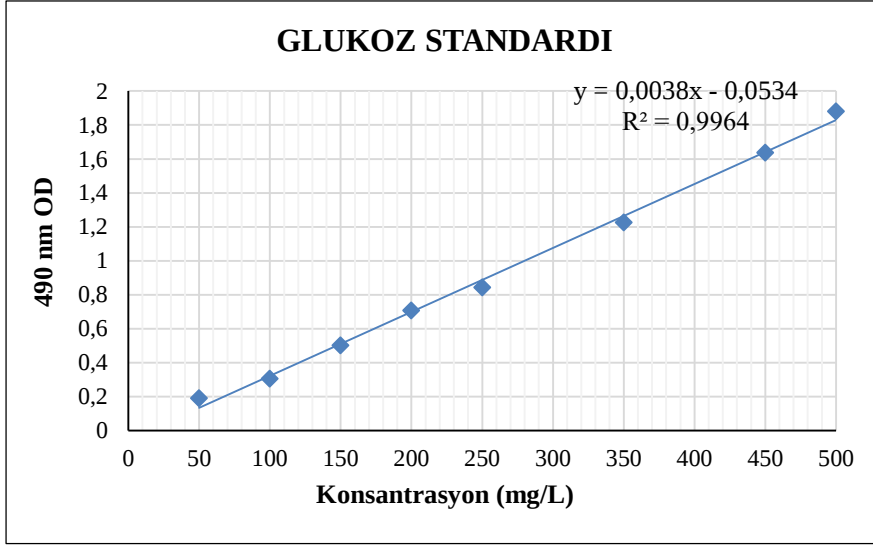
karıştırılmış ve 37°C'lik etüv içerisinde 20 dk. bekletilmiştir. Örneklerin optik yoğunlukları 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Resim 3.2).



Resim 3.2. Suda çözündürülen EPS'lerin üzerine fenol-sülfürik asit muamelesi ve spektrofotometrede okunmak için hazır hale getirilen mikroküvetler

Glukoz standardının hazırlanması ve standarda göre EPS miktarının belirlenmesi

EPS miktarının hesaplanabilmesi amacıyla glukoz standardı hazırlanmıştır. Bu standardın hazırlanmasında 50-500 mg/L arasında değişen oranlarda glukoz çözeltileri kullanılmış ve glukoz çözeltilerinin bulunduğu tüplere de fenol-sülfürik asit metodu uygulanmıştır. Fenol-sülfürik asit muamelesi uygulanan tüpler oda sıcaklığında 10 dk. bekletildikten sonra, vorteks yardımıyla iyice karıştırılmış ve 37°C'lik etüv içerisinde 20 dk. bekletilmiştir. Sonrasında mikroküvetlere alınarak spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüş ve bu değerlere göre grafik oluşturularak formül elde edilmiştir (Şekil 3.1). Elde edilen formül ($y = 0,0038x - 0,0534$) kullanılarak *Lactobacillus* cinsine ait bakteriler tarafından üretilen EPS miktarları mg/L cinsinden hesaplanmıştır.



Şekil 3.1. Glukoz standart eğrisi

3.2.5. Besi ortamlarındaki farklı karbon kaynaklarının ve triptonun EPS üretimi üzerine etkisi

EPS miktar tayini yöntemi sonucunda yüksek EPS üretimine sahip olan suşlar belirlenmiş ve yine bunların arasında da öne çıkan *L. salivarius* türünün 3 farklı suşu (*L. salivarius* BIS312, BIS722 ve ZDM2132) seçilerek, bu çalışmada kullanılmıştır. *L. salivarius* BIS312, BIS722 ve ZDM2132 suşlarının geliştirildikleri besiy ortamları içerisindeki karbon çeşidinin ve miktarının EPS üretim kapasitelerine olan etkisini belirlemek amacıyla, Bölüm 3.1.4'te verilen MRS besiy ortamındaki glukoz haricindeki bütün bileşenler sabit tutularak, karbon çeşidi ve miktarlarında değişiklik yapılmıştır. Seçilen karbon kaynakları konusunda Bounaix ve diğerlerinin (2009) yaptığı çalışma ile Kanmani ve diğerlerinin (2011) yapmış olduğu çalışmalardan yararlanılmıştır. Karbon kaynağı olarak glukozun yanı sıra laktoz ve sükröz şekerlerinin farklı konsantrasyonları denenmiştir. Bu çalışmada kullanılan karbon kaynağı parametreleri Çizelge 3.5'te gösterilmiştir. Kontrol besiy ortamı olarak %2 glukoz içeren MRS besiyeri kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. Yüksek EPS üreticisi suşların geliştirildiği besiyeri içerisine eklenen karbon kaynağı çeşitleri ve miktarları

Tekli Şeker Grupları	Şeker Kombinasyonları
%2 Glukoz*	%2 Glukoz + %1 Laktoz
%3 Glukoz	%2 Glukoz + %2 Laktoz
%2 Laktoz	%1 Glukoz + %1 Laktoz
	%2 Glukoz + %1 Sükroz
	%2 Glukoz + %2 Sükroz
	%1 Glukoz + %1 Sükroz

*Kontrol grubu olarak kullanılan besi ortamı (MRS) içerisindeki karbon kaynağı.

Besi ortamı içindeki karbon çeşitlerinin ve miktarlarının, seçilen *L. salivarius* suşlarının EPS üretim kapasitelerine olan etkisi belirlenmiş ve karbon kaynağı olarak %2 laktoz içeren besi ortamına azot kaynağı olarak %1 tripton ilave edilmiş ve triptonun EPS üretim kapasitesini artırıcı etkisi olup olmadığı da bu şekilde tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada da kontrol besi ortamı olarak %2 glukoz içeren MRS kullanılmıştır. Ekzopolisakkarit tayini, Bölüm 3.2.4'te verilen metot uygulanarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar spektrofotometrede 490 nm'de ölçülmüştür.

3.2.6. Laktik asit bakterilerinden EPS izolasyonu ve L-EPS eldesi

Karbon ve azot miktarına bağlı olarak yapılan standardizasyon deneylerinden elde edilen sonuçlara göre, *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşları seçilmiş, besiyeri içeriğinde yer alacak karbon konsantrasyonları belirlenmiş ve seçilen iki suşun L-EPS'leri belirlenen parametrelere göre elde edilmiştir. L-EPS eldesinde kullanılan besiyeri içerikleri aşağıda verilen Çizelge 3.6'ya göre hazırlanarak 4 farklı parametreye göre EPS izolasyonu yapılmıştır.

Çizelge 3.6. *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarının L-EPS eldesinde kullanılan besiyeri içerikleri

Bakteri Suşları	Besiyeri İçeriği (C)
<i>L. salivarius</i> BIS312	Kontrol ^a
<i>L. salivarius</i> BIS312	Gluk-MRS _L ^b
<i>L. salivarius</i> BIS722	Kontrol ^a
<i>L. salivarius</i> BIS722	Gluk-MRS _L ^b

^a: Kontrol: İçeriğinde karbon kaynağı olarak %2 glukoz bulunan MRS besi ortamı.

^b: Gluk-MRS_L: Glukozu çıkarılmış MRS besiyerine %2 laktoz eklenerek hazırlanan besi ortamı.

EPS izolasyonu ile L-EPS elde edilmesine ilişkin metot, ilgili literatürler derlenerek oluşturulmuş ve bu çalışmada kullanılan modifiye edilmiş metot aşağıda sunulmuştur (Yi ve diğerleri, 2008; Kanmani, Yuvaraj, Paari, Pattukumar ve Arul, 2011; Bunkoed ve Thaniyavarn, 2014).

Çizelge 3.6'da verilen içeriklere göre hazırlanan besiyerleri içerisinde 37°C'de 16-18 saat geliştirilen kültürler, en az iki kez aktifleştirildikten sonra aynı içeriğe sahip olan 800 mL besi ortamına %2 oranında aşılانmıştır. 37°C'lik etüvde 48 saat inkübasyondan sonra, sıcak su banyosunda 95°C'de 10 dk. boyunca ısıtılmıştır. Oda sıcaklığına kadar soğuduktan sonra %4 oranında %80' lik TCA eklenerek, 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışım, +4°C'de 9000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen filtratlar toplanmış ve toplanan filtratın üzerine hacmin üç katı kadar soğuk %96'lık etanol eklenerek, 24 saat +4°C'de bekletilmiştir. Sonrasında 9000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş ve EPS'nin presipite olması sağlanmıştır. Çöken EPS'nin üzerindeki etanol uzaklaştırılarak, elde edilen EPS'ler 1 mL steril distile suda çözündükten sonra, liyofilizasyon tüplerine (vial) alınıp, bir gece -80°C'de bekletilmiştir. Saflaştırılmış EPS'ler liyofilizatör cihazında, dondurulup kurutularak toz haline getirilmiş ve +4°C'de muhafazaya alınmıştır (Resim 3.3).



Resim 3.3. Viallere alınarak liyofilize edilen EPS'ler

3.2.7. Kültür ortamından elde edilen EPS'ler ile L-EPS'lerin EPS miktarlarının karşılaştırılması

İzole edilip, liyofilizasyon işlemi ile toz haline getirilen EPS (L-EPS)'lerin miktarlarını ölçmek için, her bir vialde bulunan L-EPS'ler 1 mg/mL oranında distile su içerisinde çözündürülmüştür. Yine aynı şekilde kültür ortamından elde edilen EPS'ler de etüvde kurutulup elde edildikten sonra 1 mg/mL oranında distile su içinde çözündürülmüş ve bu iki

şekilde hazırlanan çözeltilerden 1'er mL, cam tüpler içine alınmıştır. EPS miktar ölçümü Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi fenol-sülfürik asit metodu uygulanarak gerçekleştirilmiş ve bu şekilde kültür ortamından elde edilen EPS'ler ile L-EPS'lerin miktarlarının kıyaslaması yapılmıştır.

3.2.8. Liyofilize EPS'lerin karakterizasyonu

L. salivarius BIS312 ve BIS722 suşlarının MRS besiyerinde geliştirildikten sonra 3.2.6'da verilen metoda göre izole edilen L-EPS'lerin sahip oldukları monomer profilinin prebiyotik özelliklerine etkisini ortaya koyabilmek amacıyla HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) ve SEC (büyüklükçe ayırma kromatografisi) analizleri hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. Bunların dışında en yüksek EPS üretimine sahip *L. salivarius* BIS312 suşundan elde edilen L-EPS'nin bağ yapısının ortaya konulabilmesi amacıyla, NMR (nükleer manyetik rezonans) analizi hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır.

HPLC ile EPS'lerin monomer kompozisyonunun araştırılması

L-EPS'lerin monomer kompozisyonu HPLC ile ODTÜ Merkez Laboratuvarına (analiz edilen şekerler: glukoz, galaktoz, ramnoz, mannoz, arabinoz ve fruktoz) hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. L-EPS'ler analize gönderilmeden önce asit ile hidroliz edilmiştir. Asit hidrolizi için L-EPS'ler (10 mg/mL), 1 M H₂SO₄ ile 90°C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 1 M NaOH ile nötralizasyon işlemi yapılmış ve mikrofiltrasyon (Whatman 0,45 µm) yolu ile sterilize edilmiştir (Ledezma ve diğerleri, 2016). Bu şekilde hazırlanan numuneler analize gönderilmiştir. Analiz edilen monomerlerin tespiti, üzerinde Refraktif İndeks Dedektör taşıyan AGILENT 1260 serisi HPLC cihazı kullanılarak yapılmıştır. Ayırım için Metacarp 67C (300 mm x 6,5 mm) kolonu ve Microsorb-Mv-100-5 Amino kolonu kullanılmıştır. Mobil faz olarak ACN: H₂O kullanılmıştır. Akış hızı 0,5 mL/dk., enjeksiyon hacmi 25 µL olacak şekilde çalışılmış ve sıcaklık ise 90°C'ye ayarlanmıştır.

SEC ile EPS'lerin molekül ağırlıklarının araştırılması

L-EPS'lerin molekül ağırlığının belirlenmesi SEC analizi ile Bilkent Üniversitesi UNAM'a hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. SEC analizi için numuneler L-EPS'lerin 1 mg/mL olacak şekilde ultra distile saf su içinde çözündürülmesi ve mikrofiltrasyon (Whatman 0,45

μm) yolu ile sterilize edilmesi sonucunda hazırlanmıştır. SEC analizinde PL aqua-OH miksed (7,5 x 300 mm) kolonu ve mobil faz olarak da su kullanılmıştır (Agilent Teknoloji).

NMR ile EPS'lerin bağ yapılarının araştırılması

L. salivarius BIS312 suşundan elde edilen L-EPS'nin moleküler bağ yapılarının belirlenmesi, ^1H -NMR, NOESY, COSY, HMQC ve ^{13}C -APT NMR analizleri ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Araştırma Merkezi NMR Laboratuvarı'na hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. Analiz edilen monomerlerin bağ yapılarının tespitinde, Agilent marka 600 MHz'lik frekansta, 14.1 Tesla alan gücüne sahip Premium Compact NMR cihazı kullanılmıştır. 12 Autosampler'a sahiptir. Çözücü olarak D_2O kullanılmıştır.

3.2.9. Bazı patojen bakteri suşlarının biyofilm yapma oranlarının belirlenmesi ve yüksek biyofilm yapma kapasitesine sahip suşların seçimi

Bölüm 3.1.2'de verilen 12 patojen bakteri suşunun biyofilm yapma yetenekleri önce Kongo Red yöntemi ile fenotipik olarak değerlendirilmiştir. Bu yöntemle göre biyofilm oranı yüksek olarak belirlenen 3 patojen bakteri suşunun mikropalak yöntemine göre spektrofotometrik ölçüm ile biyofilm yapma oranları tespit edilmiştir.

Kongo Red yöntemi

Patojen bakterilerin biyofilm yapma yetenekleri fenotipik olarak Kongo Red yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bakterilerin yüzeye tutunmasını sağlayan, glikokaliks yapılı yapışkan tabaka "slime (biyofilm)" olarak adlandırılır (Demir, 2014). Bu yöntemde, kullanılan Kongo Red boyası bu yapışkan tabaka ile doğrudan etkileşime girerek, renkli kompleksler oluşturur. Bu çalışmada, 52 g Brain Heart Infusion Agar (Merck) besiyerine, 36 g sakkaroz ve 0,8 g Kongo Red ilave edilmiş ve hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlanarak, 121°C 'de 15 dk. steril edilmiştir. Patojen bakterilerin aktif kültürleriyle, Kongo Red Agar üzerine çizgi ekim yapılmış ve petriler 37°C 'de 24-48 saat aerobik ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, Kongo Red Agar üzerinde siyah koloni oluşturan bakteriler güçlü (+++), hem siyah hem de kırmızı koloni oluşturan bakteriler orta (++) , sadece kırmızı koloni oluşturan bakteriler ise zayıf (+) derecede biyofilm oluşturanlar olarak değerlendirilmiştir (Arciola ve diğerleri 2002; Freeman, Falkiner ve Keane,1989).

Mikroplak yöntemi

Kongo Red yöntemine göre biyofilm oluşumları fenotipik olarak değerlendirilen bakterilerden en iyi biyofilm oluşumu gösteren 3 bakteri (*S. aureus* EB-1, *E. faecalis* ATCC-29212 ve *E. coli* ATCC-11229) seçilmiştir. Seçilen bu bakterilerin biyofilm oluşumları mikroplak yöntemine göre spektrofotometrik ölçüm ile belirlenmiştir. Mikroplak yöntemine ilişkin metot, ilgili literatürler derlenerek oluşturulmuş ve bu çalışmada kullanılan modifiye edilmiş metot aşağıda sunulmuştur (Jagani, Chelikani ve Kim, 2009; Stepanović, Vuković, Dakić, Savić ve Švabić-Vlahović, 2000).

Patojen bakteri kültürlerinin optik yoğunlukları spektrofotometrik olarak, 620 nm dalga boyunda 0,5'e ayarlanmıştır. Kontrol grubu olarak steril boş Nutrient Broth (NB) kullanılmıştır. 96 kuyulu plakların kuyucukları içerisine kontrol grupları ve 200 µL bakteri kültürü aktarılarak, plaklar 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Biyofilm oluşumunu tespit edebilmek için, inkübasyon sonrasında kuyucuklardaki sıvı faz uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklarda kalan kültür artıklarını temizlemek amacıyla kuyular steril serum fizyolojik (SF) ile 3 kez yıkanmıştır. Kuyular 200 µL %95'lik metanol ile 15 dk. fikse edilmiştir. Sonrasında metanol kuyulardan uzaklaştırılmış ve plak oda sıcaklığında 45 dk. süre ile kurumaya bırakılmıştır. Plak kuruduktan sonra her bir kuyuya 200 µL %1'lik kristal viyole solüsyonu eklenmiş ve 45 dk. boyunca boyanması sağlanmıştır. Boyama sonrasında, boya kuyulardan uzaklaştırılmış ve kuyular hiç boya artığı kalmayacak şekilde 5 kez distile su ile yıkanmıştır. Sonrasında plak havada kurumaya bırakılmıştır. Plak kuruduktan sonra, kuyuların boyayı bırakması için, kuyulara 200 µL %33'lük glasiyal asetik asit eklenmiş ve kristal viyolenin çözünmesi için 15 dk. bekletilmiştir. Bu süre sonunda, plaklar mikroplak okuyucuda (Epoch, Biotek) 570 nm'de okutulmuştur. Altı paralelli şekilde hazırlanan örneklerin bulunduğu kuyulara ait absorbans değerleri ile kontrol grubunun (yalnızca besiyeri içeren) bulunduğu kuyulara ait absorbans değerlerinin kendi içlerinde ortalamaları alınmış ve bu iki değer birbirinden çıkartılarak biyofilm oluşumu belirlenmiştir. Bakterilerin biyofilm yetenekleri kendi aralarında kuvvetli ve zayıf biyofilm oluşturanlar olarak gruplandırılmıştır. Resim 3.4'te mikroplak okuyucuda okunmaya hazır bir mikro plak gösterilmiştir. Bu plakta, biyofilm oluşumuna bağlı olarak gözlenen renk değişimleri görülmektedir. Sağ alt bölümdeki kuyucuklarda koyu mavi tonları ve sağ ortada menekşe tonları yüksek ve orta düzeyde biyofilm oluşumundan, üst kısımlardaki açık mavi-şeffaf renkler ise zayıf biyofilm oluşumundan kaynaklanmaktadır.



Resim 3.4. Kristal viyole boyaması sonrası mikropate okuyucu cihazında okunmaya hazır bir mikropalak

3.2.10. *L. salivarius* suşlarından elde edilen kültür filtratlarının, L-EPS'lerin ve L-EPS'lerin kültür filtratları ile kombinasyonlarının antibiyofilm etkilerinin belirlenmesi

Antibiyofilm madde olarak en yüksek EPS üretimine sahip olan *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarının kültür filtratları, L-EPS'leri ve bunların kombinasyonları kullanılmıştır. Bunların dışında ticari bir prebiyotik olan inülin (Sigma), pozitif kontrol olarak kullanılmış ve sonuçlar diğer parametrelerle karşılaştırılmıştır. Patojen bakteri suşu olarak, biyofilm yapma oranları belirlenen suşlar içinde en iyi biyofilm yapma yeteneğine sahip *S. aureus* EB-1, *E. faecalis* ATCC-29212 ve *E. coli* ATCC-11229 suşları kullanılmıştır. Bu çalışmada uygulanan modifiye edilmiş metot aşağıda sunulmuştur (Sandasi, Leonard ve Viljoen, 2010; Chaieb, Kouidhi, Jrah, Mahdouani ve Bakhrouf, 2011).

Laktik asit bakterilerinden izole edilen L-EPS'ler steril distile suda çözündürüldükten sonra 0,45 µm'lik disposable filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve 96 kuyulu plaklara nihai konsantrasyon 1 mg/mL ve 0,5 mg/mL oranlarında olmak koşuluyla 20 µL aktarılmıştır. Bunların üzerlerine aktifleştirilmiş olan patojen bakteri kültürlerinin optik yoğunlukları 620 nm dalga boyunda 0,5'e ayarlanan patojen kültürlerinden 180 µL aktarılmıştır. Kontrol gruplarında 20 µl steril distile su kullanılmıştır. Kültür filtratlarını hazırlamak için *L. salivarius* (BIS312, BIS722) suşlarının aktif kültürlerinin optik yoğunlukları McFarland densitometre cihazında 7'ye ayarlanarak, MRS besi ortamına %2 oranında aşılanmıştır. Aşılanmış tüpler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında 5000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan berrak kısım (süpernatant) steril şartlar altında 0,45 µm'lik disposable filtreden geçirilerek steril hale getirilmiş ve filtrat elde edilmiştir. Bu

şekilde hazırlanan laktik asit bakterilerinin kültür filtratları 96 kuyulu plaklara 20 µl olacak şekilde aktarılmıştır. Bunların üzerlerine aktiveleştirilmiş olan patojen bakteri kültürlerinin optik yoğunlukları 620 nm dalga boyunda 0,5'e ayarlanan kültürlerinden 180 µL aktarılmıştır. Kontrol gruplarında 20 µL steril MRS besiyeri kullanılmıştır. Diğer deney grubunda kültür filtratları ile L-EPS'nin kombinasyonu kullanılmıştır. *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen kültür filtratları içine bu suşların kendi L-EPS'leri eklenmiştir. 20 µL kültür filtratlarının içinde nihai konsantrasyonda 1 ve 0,5 mg/mL oranında L-EPS olacak şekilde iki ayrı çözelti hazırlanarak 96 kuyulu plaklara 20 µL aktarılmıştır. Yine bunların üzerlerine de aktiveleştirilmiş olan patojen bakteri kültürlerinin optik yoğunlukları 620 nm dalga boyunda 0,5'e ayarlanan kültürlerinden 180 µL aktarılmıştır. Kontrol gruplarında 20 µL steril MRS besiyeri kullanılmıştır. EPS ile kıyaslamak amacıyla çalışmada kullanılan inülin de kuyucuklara EPS ile aynı oranlarda (nihai konsantrasyon 1 mg/mL ve 0,5 mg/mL) 20 µL olacak şekilde aktarılmış ve üzerlerine patojen bakteri kültürlerinin optik yoğunlukları 620 nm dalga boyunda 0,5'e ayarlanan kültürlerinden 180 µL ilave edilmiştir. Kontrol gruplarında 20 µL steril distile su kullanılmıştır. Yapılan tüm çalışmalar 4 paralelli olacak şekilde yürütülmüştür. Bu şekilde hazırlanan deney ve kontrol grupları 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır ve Bölüm 3.2.9'da anlatılan mikropalak yöntemi uygulanarak 570 nm'de kuyucuklardaki absorbans değerleri belirlenmiştir. Biyofilm inhibisyonunun yüzde oranını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\% \text{Biyofilm İnhibisyonu} = [(OD_{\text{Kontrol}} - OD_{\text{Örnek}}) / OD_{\text{Kontrol}}] \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.11. *L. salivarius* suşlarından elde edilen kültür filtratlarının, L-EPS'lerin ve L-EPS'lerin kültür filtratları ile kombinasyonlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite deneylerinde en yüksek EPS üretimine sahip olan *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarının kültür filtratları, L-EPS'leri ve bunların kombinasyonları kullanılmıştır. Bunların dışında ticari bir prebiyotik olan inülin (Sigma) de bu çalışmada kullanılmış olup bu şekilde sonuçlar diğer parametreler ile karşılaştırılmıştır. Patojen bakteri suşu olarak, antibiyofilm çalışmasında kullanılan *S. aureus* EB-1, *E. faecalis* ATCC-29212 ve *E. coli* ATCC-11229 suşları kullanılmıştır. Bu çalışmada uygulanan modifiye edilmiş metot aşağıda sunulmuştur (Reinheimer, Demkow ve Candiotti, 1990).

Aktif patojen bakteri kültürlerinin optik yoğunlukları 620 nm dalga boyunda 0,5'e ayarlanmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonundan steril 90x10 mm ebatlarındaki tek kullanımlık plastik petriler içerisine 100 µL aktarılmıştır. Daha öncesinde 121 °C'de 15 dk. otoklavda steril edilmiş ve yaklaşık olarak 50 °C' ye kadar soğutulmuş olan Nutrient Agar besiyerinden her petri kabına 20 mL ilave edilip, besi ortamı ve petri kabı zeminine inoküle edilen test bakterilerinin homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Katılaştıran besi ortamlarına 7 mm çapında steril çubukla kuyucuklar açılmıştır. Kuyucukların içerisine LAB kültür filtratları, L-EPS'leri ve bunların kombinasyonları ile inülin pipet yardımıyla Çizelge 3.7'de belirtilen miktarlarda aktarılmıştır.

Çizelge 3.7. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde uygulama grupları ve kuyucuklara eklenen miktarları (µL)

Uygulama Grupları	µL
Kültür Filtratları	200
L-EPS ^a	200
Kültür Filtratları ve L-EPS ^b	200
İnülin ^c	200

^{a, c}: 0,5 ve 1 mg/mL oranlarında hazırlanarak farklı kuyucuklara belirtilen miktarlarda aktarılmıştır.

^b: 200 µL kültür filtratı içinde 0,5 ve 1 mg/mL oranlarında L-EPS olacak şekilde iki ayrı çözelti hazırlanarak farklı kuyucuklara belirtilen miktarlarda aktarılmıştır.

Uygulama gruplarından kültür filtratları, L-EPS ve inülin çözeltileri 3.2.10'da verilen metot ile aynı şekilde hazırlanmış ve Çizelge 3.7'de verilen oranlara göre petride açılan kuyucuklara eklenmiştir. Sonrasında petriler 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyu çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile ölçülmüş ve çap ölçümleri milimetrik olarak kaydedilmiştir. Çalışmalar 3 paralelli olacak şekilde yürütülmüştür.

3.2.12. *L. salivarius* suşlarından elde edilen kültür filtratlarının ve L-EPS'lerinin anti-quorum sensing etkilerinin belirlenmesi

Bu çalışmada da yüksek EPS üretimine sahip olan *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarının MRS besiyerinde geliştirilerek elde edilen L-EPS'leri ve kültür filtratları kullanılmıştır. L-EPS'lerin ve kültür filtratlarının anti-quorum sensing etkilerinin belirlenmesi amacıyla, *C. violaceum* ATCC 12472 suşunda viyolasin üretimine etkisi kuyucuk difüzyon yöntemi ve spektrofotometrik yöntem ile incelenmiştir.

Kuyucuk difüzyon yöntemi

Kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılarak *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin ve kültür filtratlarının *C. violaceum* ATCC 12472 suşunda viyolasin üretimine etkisinin belirlenmesinde kullanılan metot, modifiye edilerek uygulanmıştır (McClellan ve diğerleri, 1997). LB Agar hazırlanarak petrilere dökülmüş ve katılaşması beklenmiştir. Katılaşan agar üzerine ikinci kat olarak %0,5 agar içeren LB Agar içine *C. violaceum* kültüründen 100 µL eklenerek dökülmüş ve pastör pipetiyle kuyucuklar açılmıştır. Pastör pipeti ile açılan kuyucuklara 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL ve 0,25 mg/mL olacak şekilde saf steril suda çözülen ve 0,45 µm'lik disposable filtreden geçirilerek sterilize edilmiş EPS örneklerinden ve ayrıca 3.2.10'da anlatıldığı şekilde hazırlanan kültür filtratlarından 3 ayrı derişimde (direkt, ½ ve ¼ seyreltme) olmak üzere 70 µL yüklenmiştir. 35°C'de 1 gece inkübasyonun sonunda kuyucuk etrafındaki mor zemin üzerine beyaz zon (mor pigment olmayan ve berrak olmayan) çapı ölçülerek değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmada pozitif kontrol grubu olarak antibiyotik disk (Kanamisin 5 µg/Tobramisin 10 µg), negatif kontrol grubu olarak ise LB Broth kullanılmıştır. Mor pigment içermeyen beyaz zon oluşumu viyolasin üretiminin inhibisyonu olarak, şeffaf zon oluşumu ise antibakteriyel etki olarak değerlendirilmiştir.

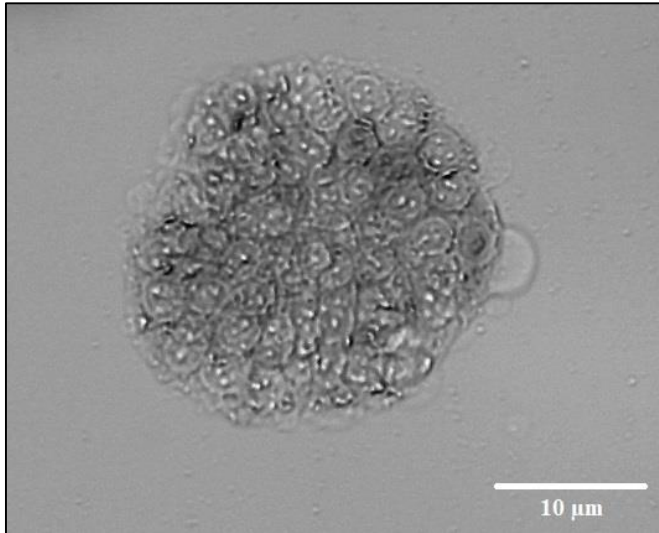
Spektrofotometrik yöntem

Spektrofotometrik yöntem kullanılarak L-EPS'lerin ve kültür filtratlarının *C. violaceum* ATCC 12472 suşunda viyolasin üretimine etkisinin belirlenmesinde kullanılan metot, modifiye edilerek uygulanmıştır (Choo, Rukayadi ve Hwan, 2006). *C. violaceum* ATCC 12472 suşu, 5 mL LB Broth içine inoküle edilerek, 35°C'de 120 rpm'de 24 saat inkübe edilmiştir. 5 mL LB Broth içeren scott şişelere *C. violaceum* ATCC 12472 kültüründen 200'er µL eklenmiş ve son derişimi 1, 2 ve 3 mg/mL olacak şekilde EPS örnekleri ilave edilerek 120 rpm'de 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Yine aynı şekilde 5 mL LB Broth içeren scott şişelere *C. violaceum* ATCC 12472 kültüründen 200'er µL eklenmiş ve 3.2.10'da anlatıldığı şekilde hazırlanan *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarının kültür filtratlarından da 200'er µL olmak üzere üç derişim halinde (direkt, ½ ve ¼ seyreltme) ilave edilerek, 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneklerin spektrofotometrede 600 nm'deki absorbans değerleri ölçülerek kaydedilmiştir. Daha sonra örnekler 14500 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek viyolasin çöktürülmüş ve üst faz atılmıştır.

Alt kısımda kalan pellet üzerine 1 mL dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiş ve tamamen çözülerek, absorbansı 585 nm de ölçülmüştür. Sonuçlar EPS eklenmemiş örneklerin viyolasin miktarıyla karşılaştırılarak, yüzde inhibisyon değerleri hesaplanmıştır.

3.2.13. *L. salivarius* BIS312 suşunun kültür filtratı ve L-EPS'lerinin adezyondaki rolünün belirlenmesi

Bu çalışmada, *L. salivarius* BIS312 suşu (probiyotik uygulama) ve bu suş ile bu suştan elde edilen L-EPS ve kültür filtratlarının kombinasyonları (sinbiyotik uygulama) kullanılarak, HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücre hattında adezyon yeteneklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan HT-29 hücre hattının laboratuvarında inverted mikroskopta (Leica) çekilen fotoğrafı Resim 3.5'te verilmiştir.



Resim 3.5. HT-29 kolorektal adenokarsinoma hücre hattının inverted mikroskop görüntüsü (10X)

Bu çalışmaya ilişkin metot modifiye edilerek uygulanmıştır (Jacobsen ve diğerleri 1999). Hücreler, DMEM (Invitrogen) içerisine %10 fetal bovin serumu, %1 L-Glutamin, %1 antibiyotik (penisilin/streptomisin) ve %40 MCDB-201 katılarak hazırlanmış besi ortamı içeren flasklarda, 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde geliştirilmiştir. Hücre besi ortamı gün aşırı değiştirilerek gelişimi takip edilmiştir. Flasklarda %80-90 yayılma gösteren hücreler Tripsin/EDTA ile kaldırılarak sayılmıştır (Hadiakhoondi ve diğerleri, 2013). Bu şekilde belirtilen besi ortamında geliştirilen HT-29 hücreleri, DMEM besiyeri ile birlikte 4 mL olmak üzere 1×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyulu mikropatlara aktarılmıştır. Besiyeri gün aşırı değiştirilmiş ve hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında çalışmaya alınmıştır. Adezyon deneyinden 24 saat önce,

kuyulardan hücre besiyeri atılarak yerine, antibiyotik içermeyen 4 mL DMEM besiyeri eklenmiştir. 24 saat sonunda hücreler 2 kez 3 mL soğuk PBS (pH 7,4) ile yıkanmıştır. Sonrasında hücrelere serum ve antibiyotik içermeyen 2 mL DMEM besiyeri eklenerek 37°C’de 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, McFarland cihazında optik yoğunluğu 10’a ayarlanmış *L. salivarius* BIS312 suşundan 1 mL (probiyotik uygulama) alınmış ve serum ve antibiyotik içermeyen DMEM besiyeri (1 mL) ile birlikte hücrelere uygulanmıştır. L-EPS’nin sinbiyotik uygulamasında, McFarland cihazında optik yoğunluğu 10’a ayarlanmış *L. salivarius* BIS312 suşundan 1 mL alınarak, üzerine bu suştan elde edilen L-EPS, son konsantrasyon 1 mg/mL olacak şekilde çözülerek eklenmiş ve serum ve antibiyotik içermeyen DMEM besiyeri (1 mL) ile birlikte hücrelere uygulanmıştır. Kültür filtratının sinbiyotik uygulamasında ise McFarland cihazında optik yoğunluğu 10’a ayarlanmış *L. salivarius* BIS312 suşu ve bu suştan elde edilen kültür filtratı Bölüm 3.2.10’da anlatıldığı şekilde hazırlanarak kullanılmıştır. Optik yoğunluğu ayarlanan bakteri süspansiyonundan 1 mL alınarak, 3000 rpm’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant atılmış ve dibe çöken pellet üzerine 1 mL kültür filtratı eklenerek pipetaj tekniği ile karışması sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan bakteri ve kültür filtratı karışımı (1 mL), serum ve antibiyotik içermeyen DMEM besiyeri (1 mL) ile birlikte hücrelere uygulanmıştır. Probiyotik ve sinbiyotik uygulamalar sonrasında kuyucuklarda 3 mL DMEM besiyeri ve 1 mL hazırlanan süspansiyonlar olmak üzere toplam hacim 4 mL olacak şekilde ayarlanarak 37°C’de %5 CO₂’li etüvde 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, soğuk PBS ile 3 kez yıkama yapılmıştır. Yıkamadan sonra her bir kuyucuğa 3 mL metanol eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, metanol uzaklaştırılmış ve sabitlenen hücreler üzerine 3 mL %40’lık Giemsa boyası eklenerek, oda sıcaklığında 20 dk. bekletilerek boyanmıştır. Boyamadan sonra kuyular %96’lık etanol ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırılmış ve mikroskopta (Leica, Germany) incelenerek, bakteri ve hücrelerin sayımı yapılmıştır. Deney sonucu, adezyon indeksi ve adezyon yüzdesi olarak aşağıdaki formüller kullanılarak belirlenmiştir.

Adezyon Yüzdesi; (bakteri tutunmuş epitel hücre sayısı/toplam hücre sayısı) x 100 (Otero ve Nader-Macias 2007)

Adezyon indeksi (ADI); 100 hücreye tutunan bakteri sayısı olarak hesaplanmıştır. “ADI>2500 ise güçlü adezyon, ADI; 2500 ile 500 arasında ise iyi adezyon, ADI; 500 ile 100

arasında ise zayıf adezyon ve $ADI < 100$ ise adezyon yok” şeklinde değerlendirilmiştir (Santagati, Scillato, Patané, Aiello ve Stefani, 2012; Guglielmetti ve diğerleri, 2010).

3.2.14. İstatistiksel analizler

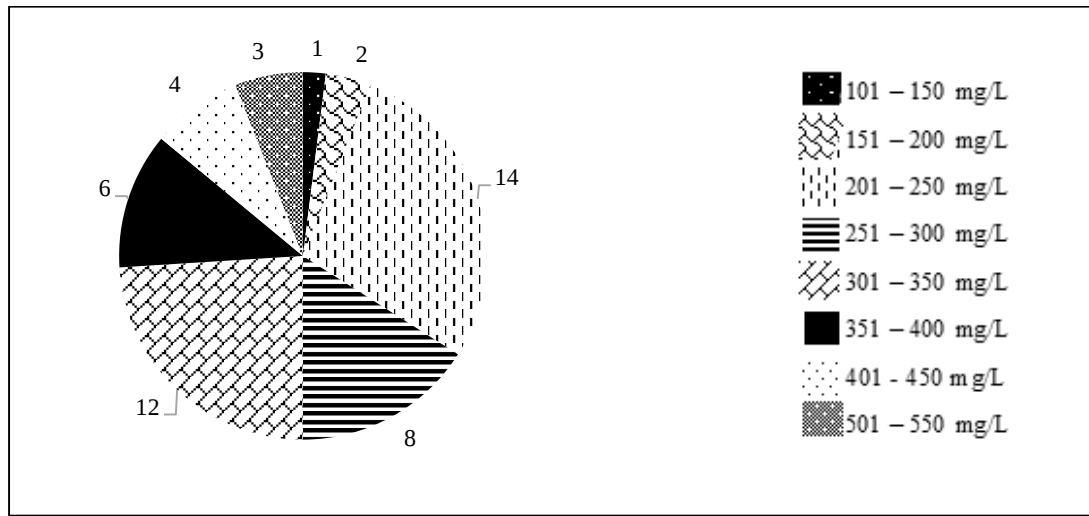
Tüm mikrobiyolojik çalışmalar, her çalışma için paralel sayısı değişmekle birlikte genel olarak üç paralelli ve iki tekerrürlü olacak şekilde yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler bu tekrarların ortalaması $\pm$ standart sapma (SD) şeklinde verilmiştir.

Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan istatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (16.0 Versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Laktik asit bakterilerinin EPS üretim miktarları arasındaki farklılığın anlamlı olup olmadığı LSD ve Tukey ($p < 0,05$) testleri ile analiz edilmiştir. *L. salivarius* BIS312, BIS722 ve ZDM2132 suşlarında farklı karbon ve azot kaynaklarının EPS üretimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde, besi ortamı ve suşların arasındaki EPS miktarı farklılığının anlamlı olup olmadığı LSD ve Tukey ($p < 0,05$) testleri ile analiz edilmiştir. *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarının kültür ortamından elde edilen EPS’lerinin ve L-EPS’lerinin miktarları arasındaki farklar ile besi ortamında kullanılan karbon kaynaklarına (glukoz ve laktoz) göre EPS ve L-EPS miktarları arasındaki farklar t-Testi ($p < 0,05$) ile analiz edilmiştir. Antibiyofilm etkinin belirlenmesi deneylerinde kontrol olarak kullanılan inülinin, kültür filtratlarının, L-EPS’lerin ve L-EPS içeren kültür filtratlarının oluşturduğu biyofilm inhibisyonları arasındaki farklar LSD ve Tukey ($p < 0,05$) testleri ile analiz edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kültür filtratları ve L-EPS içeren kültür filtratlarının patojenler üzerinde oluşturduğu zon çapları arasındaki farklılığın ve patojen bakterilerin kendi içlerinde zon çapları arasındaki farklılığın anlamlı olup olmadığı LSD ve Tukey ($p < 0,05$) testleri ile analiz edilmiştir. Anti-quorum sensing çalışmalarında filtrat derişimlerinin ve filtrat çeşitlerinin antibakteriyel zon çapları arasındaki farklılıkları ile L-EPS konsantrasyonlarının ve L-EPS çeşitlerinin viyolasin inhibisyonu üzerindeki farklılıklarının analizinde t-testi, LSD ve Tukey ($p < 0,05$) testleri kullanılmıştır. Son olarak adezyon çalışmasında ise probiyotik ve sinbiyotik uygulamasının arasındaki farklılığın anlamlı olup olmadığı t-Testi ($p < 0,05$) ile analiz edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

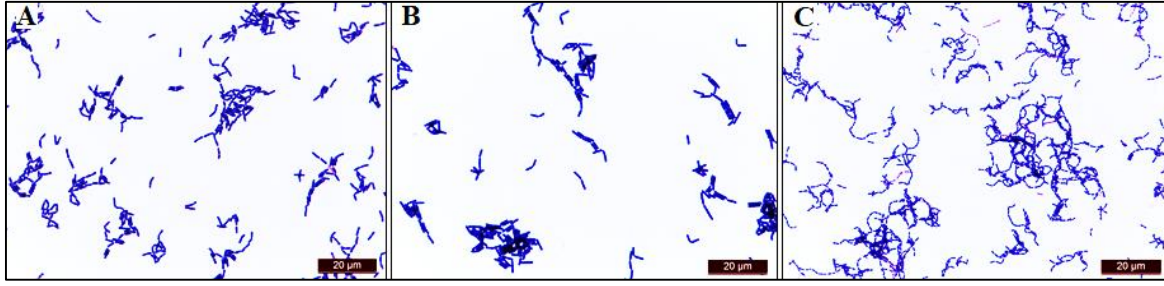
4.1. Kültürlerin Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimi Kapasiteleri

TAGEM/15/AR-GE/40 projesi kapsamında serbest gezen köy tavuklarının bağırsaklarından izole edilen *Lactobacillus* cinsine ait izolatların (50 adet), 48 saat inkübasyon sonunda kültür ortamındaki EPS üretim miktarları, Bölüm 3.2.4'te anlatılan metoda göre belirlenmiştir. İzolatların EPS üretim miktarlarına göre dağılım grafiği, Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *Lactobacillus* cinsine ait izolatların EPS üretim miktarlarına göre sayıca dağılımı

Yukarıdaki grafikte de görüldüğü gibi, 50 izolatın çoğunlukla 201-250 mg/L (14 adet) ve 351-400 mg/L (12 adet) aralıklarında EPS üretim kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Tüm değerler karşılaştırılarak yüksek EPS üretim kapasitesine sahip 11 izolat seçilmiştir (532-358 mg/L). Seçilen bu izolatların moleküler tanımlamaları TAGEM/15/AR-GE/40 Projesi'nde başka bir çalışma kapsamında yapıldığından dolayı sonuçlar tezde verilmemiştir. EPS üretimi yüksek 11 suşun moleküler tanımlamasına göre EPS üreticisi dominant türün *L. salivarius* olduğu dikkat çekmiş ve diğer yüksek EPS üreticisi türlerin ise, *L. reuteri*, *L. agilis* ve *L. saerimneri* olarak sıralandığı görülmüştür. Çalışmada kullanılan farklı türlere ait bazı laktik asit bakterilerinin, Gram boyama yapıldıktan sonra ışık mikroskopundan (Leica) alınan görüntüleri aşağıda sunulmuştur (Resim 4.1).



Resim 4.1. Çalışmada kullanılan bazı laktik asit bakteri türlerinin ışık mikroskobu görüntüleri (100X). A: *L. salivarius* BIS312, B: *L. agilis* BIS721, C: *L. saerimneri* BIS717.

EPS üretimi açısından öne çıkan 11 suş içinde, en yüksek EPS üretimi, *L. salivarius*'un BIS312 (532 ± 5 mg/L), BIS722 (507 ± 4 mg/L) ve ZDM2132 (502 ± 8 mg/L) suşlarında belirlenmiştir. Seçilen 11 suşun EPS üretimine ilişkin sonuçları, n: 3 ortalamasının hesaplanmasıyla $\pm$ SD olarak Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Kültür ortamında en yüksek EPS üreten *L. salivarius* BIS312 suşu ile diğer suşlar arasında $p < 0,05$ düzeyinde farklılık bulunduğu, *L. salivarius* BIS722 ve ZDM2132 suşlarının EPS üretimleri arasındaki farklılığın ise anlamlı olmadığı ($p > 0,05$) tespit edilmiştir. Yüksek EPS üreticisi *L. salivarius* BIS312, BIS722 ve ZDM2132 suşlarının, diğer *L. salivarius* suşlarına ve *L. reuteri*, *L. agilis* ve *L. saerimneri* türlerine göre EPS üretim miktarları arasındaki farklılığın $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışma bu üç suş kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 4.1. Yüksek EPS üretim kapasitesine sahip suşların kodları, moleküler tanımlama ile belirlenen tür adları ve kültür ortamında EPS üretim miktarları

Suş Kodları	Tür Adı	EPS Miktarı (mg/L)
ZDM2132*	<i>Lactobacillus salivarius</i>	502 ± 8
BIS312*	<i>Lactobacillus salivarius</i>	532 ± 5
BIS412	<i>Lactobacillus salivarius</i>	368 ± 2
BIS713	<i>Lactobacillus salivarius</i>	411 ± 4
BIS722*	<i>Lactobacillus salivarius</i>	507 ± 4
BIS820	<i>Lactobacillus salivarius</i>	415 ± 3
BIS612	<i>Lactobacillus reuteri</i>	358 ± 3
BIS731	<i>Lactobacillus reuteri</i>	433 ± 2
BIS721	<i>Lactobacillus agilis</i>	368 ± 4
BIS911	<i>Lactobacillus agilis</i>	434 ± 3
BIS717	<i>Lactobacillus saerimneri</i>	361 ± 5

*En yüksek EPS üretim kapasitesine sahip bakteri suşları

Çizelge 4.1’de de görüldüğü gibi aynı türe ait farklı suşların EPS üretimleri farklılık gösterebilmektedir. Dolayısıyla bu durum bizlere EPS üretimi yüksek olan bakterilere karar verebilmek için türlerin yanı sıra suşların da değerlendirilmesinin önemli olabildiğini ve seçimin de bu unsurların gözetilerek yapılması durumunda daha sağlıklı sonuçlar elde edilebileceğini göstermektedir.

4.2. Farklı Karbon Kaynaklarının ve Triptonun EPS Üretimi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada, farklı tavuk bağırsaklarından izole edilmiş ve EPS miktar tayini yöntemi ile en yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olduğu belirlenmiş, *L. salivarius* türüne ait BIS312, BIS722 ve ZDM2132 suşları kullanılmıştır. MRS besi ortamındaki glukoz çıkarılarak yerine Bölüm 3.2.5’te anlatıldığı gibi karbon kaynaklarının farklı miktarlarda eklenerek oluşturulduğu besi ortamlarında, seçilen suşların EPS üretim kapasiteleri belirlenmiştir. EPS’nin prebiyotik olarak kullanımı söz konusu olduğundan en yüksek verimde üretimin sağlanacağı besi ortamı içeriğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada farklı karbon kaynağı ve oranlarındaki besi ortamlarında geliştirilen *L. salivarius* türüne ait üç suşun içinde, *L. salivarius* BIS312 suşunun tüm farklı besi ortamlarında da en iyi EPS üretimini gösterdiği belirlenmiştir. Farklı şeker kombinasyonlarının eklenmesiyle oluşturulan besi ortamında geliştirilen *L. salivarius* BIS312, BIS722 ve ZDM2132 suşlarının kontrol besi ortamına (%2 glukoz içeren MRS ortamı) göre en verimli EPS üretimini, %2 glukoz ve %2 sükroz içeren besi ortamında gösterdiği ve bu EPS artış oranının da her üç suş için ortalama %33 olduğu tespit edilmiştir. Bu değeri takip eden diğer besi ortamındaki karbon içeriğinin ise %2 laktoz olduğu ve bu besi ortamında geliştirilen üç suşun EPS üretiminin ise ortalama %27 artış gösterdiği belirlenmiştir. Tüm denemelerde kültür ortamının pH ve optik yoğunluğunun birbirine yakın değerlerde olduğu ve önemli bir farklılık göstermediği dikkat çekmiştir. Çalışmaya ait sonuçlar, n: 3 ortalamasının hesaplanmasıyla $\pm$ SD olarak, Çizelge 4.2’de sunulmuştur. Karbon kaynağı olarak %2 laktoz ve %2 glukoz + %2 sükroz içeren besi ortamlarında geliştirilen suşların ürettikleri EPS ile kontrol bileşiminde geliştirilen suşların ürettiği EPS miktarları kıyaslandığında, $p < 0,05$ düzeyinde farklılık bulunduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Yüksek EPS üreticisi suşların geliştirildiği besiyeri içeriklerindeki farklı karbon kaynağı ve oranlarına bağlı olarak kültür ortamında EPS üretim kapasiteleri

Bakteri Suşları	Besi Ortamı İçindeki Karbon Kaynakları ^b ve Kombinasyonları ^c	pH	Bakteri Yoğunluğu (OD ₆₂₀)	EPS Miktarı (mg/L)
<i>L. salivarius</i> BIS312	Kontrol ^a	3,78	2,62	530±5
	%3 G	3,73	2,64	512±4
	%2 L	3,75	2,42	685±6
	%1 G + %1 L	3,79	2,49	675±9
	%2 G + %1 L	3,77	2,69	493±9
	%2 G + %2 L	3,78	2,49	660±5
	%1 G + %1 S	3,63	2,66	376 ± 1
	%2 G + %1 S	3,68	2,61	540 ± 2
	%2 G + %2 S	3,67	2,57	696 ± 6
<i>L. salivarius</i> BIS722	Kontrol ^a	3,75	2,62	507±4
	%3 G	3,70	2,70	507±7
	%2 L	3,73	2,58	642±3
	%1 G + %1 L	3,76	2,58	614±5
	%2 G + %1 L	3,74	2,67	490±9
	%2 G + %2 L	3,72	2,42	506±4
	%1 G + %1 S	3,70	2,69	334 ± 5
	%2 G + %1 S	3,67	2,69	528 ± 1
	%2 G + %2 S	3,66	2,69	675 ± 4
<i>L. salivarius</i> ZDM2132	Kontrol ^a	3,76	2,61	496±8
	%3 G	3,72	2,57	429±5
	%2 L	3,75	2,38	659±7
	%1 G + %1 L	3,78	2,48	503±3
	%2 G + %1 L	3,75	2,58	459±5
	%2 G + %2 L	3,73	2,43	597±6
	%1 G + %1 S	3,66	2,58	349 ± 4
	%2 G + %1 S	3,58	2,69	489 ± 4
	%2 G + %2 S	3,59	2,65	672 ± 3

^a: Kontrol: İçeriğinde karbon kaynağı olarak %2 glukoz bulunan MRS besi ortamı.

^b: Glukozu çıkarılmış MRS besiyerine, tabloda verilen oranlarda Glukoz (G) ve Laktoz (L) ilave edilerek hazırlanan besi ortamı.

^c: Glukozu çıkarılmış MRS besiyerine tabloda verilen oranlarda Glukoz (G) + Laktoz (L) ve Glukoz (G) + Sükroz (S) kombinasyonlarının ilave edilmesi ile hazırlanan besi ortamı.

Yukarıda denenen karbon kaynağı parametrelerine göre tekli şeker gruplarından en yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olan besi ortamındaki karbon içeriği %2 laktozdu. Bölüm 3.2.5'te de anlatıldığı gibi MRS besiyerine ilave edilen %2 laktoz ve %1 tripton ile zenginleştirilen besi ortamı ve MRS'den glukozun çıkarılarak yerine %2 laktoz ve %1 triptonun eklenmesiyle hazırlanan besi ortamlarında, *L. salivarius* türüne ait üç suşun EPS üretim kapasiteleri kontrol besi ortamından (MRS Broth) elde edilen değerler ile mukayese edilmiştir. Laktoz ve tripton ile zenginleştirilmiş besi ortamlarında kontrol MRS besi ortamına göre her üç suşun da daha yüksek miktarda EPS ürettiği ve bu üç suş içinden *L. salivarius* BIS312 suşunun tüm denemelerde EPS üretim kapasitesi açısından öne çıktığı dikkat çekmiştir. Tüm suşlarda MRS besi ortamına laktoz ve tripton ilave edilmiş besi

ortamında EPS üretimi en iyi bulunmuş, *L. salivarius* BIS312 suşunda bu üretimin 702 mg/L olduğu belirlenmiştir. MRS'den glukozun çıkarılarak laktoz ve tripton ilave edildiği besi ortamında tüm suşlarda kontrol besiyerine göre EPS üretiminde önemli oranda bir artış tespit edilmemiştir. Çalışmalara ilişkin sonuçlar, n: 3 ortalamasının hesaplanmasıyla $\pm$ SD olarak, Çizelge 4.3'te verilmiştir. İstatistiksel olarak %2 laktoz ve %1 tripton ile zenginleştirilmiş besi ortamında geliştirilen suşların ürettikleri EPS ile kontrol bileşiminde geliştirilen suşların ürettikleri EPS miktarları kıyaslandığında, $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılık bulunduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. Yüksek EPS üreticisi suşların geliştirildiği besiyeri içeriklerindeki farklı oranlarda karbon ve azot kaynaklarına bağlı olarak EPS üretimleri

Bakteri Suşları	Besiyeri İçeriği	pH	Bakteri Yoğunluğu (620 nm OD)	EPS Miktarı (mg/L)
<i>L. salivarius</i> BIS312	Kontrol ^a	3,63	2,39	418 $\pm$ 5
	Gluk-MRS _{T+L} ^b	3,75	2,33	457 $\pm$ 10
	MRS _{T+L} ^c	3,65	2,26	702 $\pm$ 8
<i>L. salivarius</i> BIS722	Kontrol ^a	3,65	2,34	413 $\pm$ 6
	Gluk-MRS _{T+L} ^b	3,74	2,40	416 $\pm$ 10
	MRS _{T+L} ^c	3,69	2,36	650 $\pm$ 7
<i>L. salivarius</i> ZDM2132	Kontrol ^a	3,66	2,38	385 $\pm$ 8
	Gluk-MRS _{T+L} ^b	3,72	2,46	402 $\pm$ 11
	MRS _{T+L} ^c	3,68	2,32	497 $\pm$ 7

^a: Kontrol: MRS besi ortamı (İçeriğinde azot kaynağı olarak %1 pepton, %0,5 yeast ekstrakt, %1 beef ekstrakt bulunan, karbon kaynağı olarak ise %2 glukoz bulunan besi ortamı).

^b: Gluk-MRS_{T+L}: Glukozu çıkarılmış MRS besiyerine %1 Tripton ve %2 Laktoz eklenerek hazırlanan besi ortamı.

^c: MRS_{T+L}: MRS besiyerine %1 Tripton ve %2 Laktoz ilave edilerek zenginleştirilmiş besi ortamı.

4.3. Kültür Ortamından Elde Edilen EPS'ler ile L-EPS'lerin EPS Miktarlarının Karşılaştırılması

L. salivarius BIS312 ve BIS722 suşlarının 48 saat inkübasyon sonunda kültür ortamında oluşturduğu EPS ve aynı koşullarda geliştirildikten sonra liyofilizasyon cihazında kısmi saflaştırma ile elde edilen L-EPS'lerin miktarları fenol-sülfürik asit metoduna göre belirlenmiştir (bkz. Bölüm 3.2.7). Suşlardan elde edilen L-EPS miktarlarının, kültür ortamından elde edilen EPS miktarlarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca her iki suşun da glukozun çıkarılarak %2 laktozun ilave edilmesi ile hazırlanan MRS besi ortamında ürettikleri EPS miktarlarının daha yüksek olduğu görülmüştür. *L. salivarius* BIS312 suşu kültür ortamında da L-EPS'lerde de en iyi EPS üreticisi olarak öne çıkmıştır. Sonuçlar, n: 3 ortalamasının hesaplanmasıyla $\pm$ SD olarak, Çizelge 4.4'te sunulmuştur. Her

iki suş için de istatistiksel olarak kültür ortamından elde edilen EPS miktarları ile L-EPS miktarları kıyaslandığında, $p<0,05$ düzeyinde farklılık olduğu tespit edilmiştir. Yine aynı şekilde glukozun çıkarılarak %2 laktozun ilave edildiği besi ortamlarında geliştirilen suşların ürettikleri EPS ile kontrol bileşiminde geliştirilen suşların ürettiği EPS miktarları arasındaki farkın da anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu durum Bölüm 4.2'deki sonuçları da destekler niteliktedir.

Çizelge 4.4. Liyofilizasyon öncesi ve sonrasında *L. salivarius*'un BIS312 ve BIS722 suşlarının EPS miktarları

Bakteri Suşları	Besiyeri İçeriği (C)	EPS ¹ (mg/L)	EPS ² (mg/L)
<i>L. salivarius</i> BIS312	Kontrol ^a	386±7	402 ± 5
	Gluk-MRS _L ^b	498±3	516 ± 7
<i>L. salivarius</i> BIS722	Kontrol ^a	356±2	378 ± 2
	Gluk-MRS _L ^b	397±6	414 ± 3

^a: Kontrol: İçeriğinde karbon kaynağı olarak %2 glukoz bulunan MRS besi ortamı.

^b: Gluk-MRS_L: Glukozu çıkarılmış MRS besiyerine %2 laktoz eklenerek hazırlanan besi ortamı.

¹: Kültürlerin inkübasyon sonrası EPS üretim miktarı

²: L-EPS'nin miktarı

4.4. *L. salivarius* Suşlarından Elde Edilen Liyofilize EPS'lerin Karakterizasyonu

Bu çalışmada, EPS üretim kapasitesi açısından öne çıkan *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin sahip oldukları monomer profilinin prebiyotik özelliklerine etkisini ortaya koyabilmek amacıyla, HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) analizi ile monomer kompozisyonları ve SEC (büyükölçek ayırma kromatografisi) analizi ile molekül ağırlıkları tespit edilmiştir. Bunların dışında en yüksek EPS üretimine sahip *L. salivarius* BIS312 suşundan elde edilen L-EPS'nin bağ yapısı da NMR (nükleer manyetik rezonans) analizi ile ortaya konulmuştur.

4.4.1. L-EPS'lerin monomer kompozisyonları

HPLC analizi ile her iki bakteri suşunun L-EPS'lerinde glukoz, mannoz, ramnoz ve galaktoz monomerleri tespit edilirken, fruktoz ve arabinoz monomerlerine rastlanmamıştır. L-EPS'lerde glukozun ana monomer olduğu, oranlarının ise %35,3 ve %34,5 olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, her iki suşun L-EPS'lerinin monomer

kompozisyonlarının benzerlik gösterdiği, ancak monomer oranlarının sınırlı bir farklılık gösterdiği dikkat çekmiştir. Sonuçlar, Çizelge 4.5'te sunulmuştur.

Çizelge 4.5. *L. salivarius*'un BIS312 ve BIS722 suşlarının L-EPS'lerinin HPLC analizi ile belirlenen monosakkarit kompozisyonları ve yüzde oranları

L-EPS'ler	Monosakkarit Bileşimi (%)					
	Glukoz	Fruktoz	Arabinoz	Mannoz	Ramnoz	Galaktoz
L-EPS ₃₁₂ ^a	34,5	t.e.	t.e.	26,4	13,6	25,5
L-EPS ₇₂₂ ^b	35,3	t.e.	t.e.	27,6	11,3	25,8

^a *L. salivarius* BIS312 suşundan elde edilen L-EPS

^b *L. salivarius* BIS722 suşundan elde edilen L-EPS

t.e.: tespit edilmedi.

4.4.2. L- EPS'lerin molekül ağırlıkları

SEC analizi ile *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin ortalama mol kütleleri (M_w) belirlenmiştir. Her iki suş için de L-EPS'lerin farklı molekül ağırlığında dört anlamlı fraksiyon oluşturduğu tespit edilmiştir. *L. salivarius* BIS312 suşuna ait L-EPS'lerin fraksiyonlarının molekül ağırlığı $0,9 \times 10^4$ ila $6,8 \times 10^6$ Da arasında değişirken, *L. salivarius* BIS722 suşuna ait L-EPS'lerin fraksiyonlarının molekül ağırlığının $1,3 \times 10^4$ ila $6,9 \times 10^6$ Da arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Bu sonuçlara göre her bir fraksiyon molekül ağırlığı bakımından kıyaslandığında *L. salivarius* BIS722 suşunun daha büyük fraksiyonlara sahip olduğu dikkat çekmiştir.

Çizelge 4.6. *L. salivarius*'un BIS312 ve BIS722 suşlarının L-EPS'lerinin SEC analizi ile belirlenen molekül ağırlıkları

L-EPS'ler	Fraksiyonlar (Da)			
	1	2	3	4
L-EPS ₃₁₂ ^a	$0,9 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$7,2 \times 10^5$	$6,8 \times 10^6$
L-EPS ₇₂₂ ^b	$1,3 \times 10^4$	$5,4 \times 10^4$	$8,9 \times 10^5$	$6,9 \times 10^6$

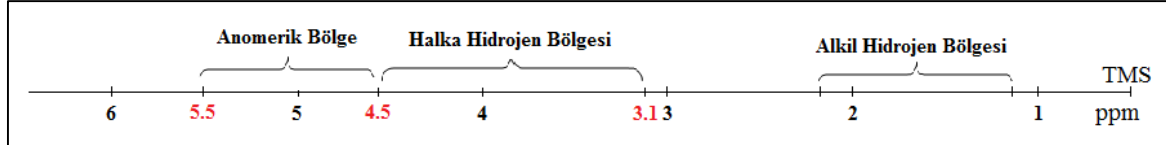
^a *L. salivarius* BIS312 suşundan elde edilen L-EPS

^b *L. salivarius* BIS722 suşundan elde edilen L-EPS

4.4.3. *L. salivarius* BIS312 suşundan elde edilen L-EPS'nin bağ yapısı

Bu çalışmada *L. salivarius* BIS312 suşundan elde edilen L-EPS'nin bağ yapılarını belirleyebilmek amacıyla bir ve iki boyutlu NMR yöntemleri kullanılmıştır. ¹H-NMR,

COSY, NOESY ve HMQC, ^{13}C -APT NMR analizleri yapılmıştır. Çalışılan L-EPS'lerin HPLC analizleri ile uyumlu olarak polisakkarit yapısında bulunan glukoz, galaktoz, mannoz ve ramnoz miktarları ^1H -NMR spektrumlarında anlamlı pikler verecek oranlarda bulunmuştur. ^1H -NMR spektrumunda, polisakkaritlerin yapısında bulunan hidrojenlere ait piklerin kimyasal kayma değerleri genellikle üç bölgeye ayrılmaktadır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. ^1H -NMR spektrumunda, polisakkaritlerin yapısında bulunan hidrojenlere ait piklerin kimyasal kayma değerlerine ait bölgeler

L. salivarius BIS312 suşundan elde edilen L-EPS (L-EPS_{BIS312})'nin yapısında bulunan monomerlerin hidrojenlerine ait piklerin kimyasal kayma değerleri, literatürlerdeki kimyasal kayma değerleriyle uyumludur ve monomerlerin kimyasal kayma değerleri Çizelge 4.7'de gösterilmiştir. Kimyasal kayma değerlerinden faydalanarak, L-EPS monomerlerinin arasında bulunan bağ tipleri ve bağlanmaların stereokimyaları belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. L-EPS_{BIS312}'nin yapısında bulunan monosakkaritlerin ¹H-NMR spektrumunda hidrojenlere ait piklerin kimyasal kayma değerleri (δ, ppm)

α-D-Galaktopiranoz	α-D-Glukopiranoz	α-D-Mannopiranoz	α-L-Ramnopiranoz	β-D-Glukopiranoz
H1-5,17	H1-4,98	H1-4,92	H1-5,32	H1-4,47
H2-3,97	H2-4,00	H2-3,97	H2-3,98	H2-3,36
H3-4,04	H3-3,98	H3-3,80	H3-3,21	H3-3,53
H4-3,87	H4-3,62	H4-3,65	H4-3,80	H4-3,54
H5-3,92	H5-3,85	H5-3,86	H5-4,28	H5-3,71
H6-3,86	H6-3,21	H6-4,01	H6-1,86	H6-4,05

L-EPS_{BIS312}'nin ¹H-NMR spektrumunda, β-D-Glukopiranoz, α-D-Mannopiranoz, α-D-Glukopiranoz, α-D-Galaktopiranoz ve α-L-Ramnopiranoz monosakkaritlerinin anomerik H₁ protonlarına ait pikler sırasıyla 4,47; 4,92; 4,98; 5,17 ve 5,32 ppm civarında görülmektedir (Çizelge 4.8). Tüm polisakkarit örneklerinde benzer durum söz konusudur. L-EPS_{BIS312}'nin ¹H-NMR analizinde, anomerik bölgede hidrojenlere ait 5 farklı kimyasal kayma değerlerine sahip pik görüldüğü için L-EPS_{BIS312}'nin yapısının genel olarak 5 farklı monomerden oluştuğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. L-EPS_{BIS312}'nin yapısında bulunan monosakkaritlerin H₁ protonlarına ait kimyasal kayma değerleri

Monomer	Kimyasal kayma değerleri (ppm)
β-D-Glukopiranoz	4,47
α-D-Mannopiranoz	4,92
α-D-Glukopiranoz	4,98
α-D-Galaktopiranoz	5,17
α-L-Ramnopiranoz	5,32

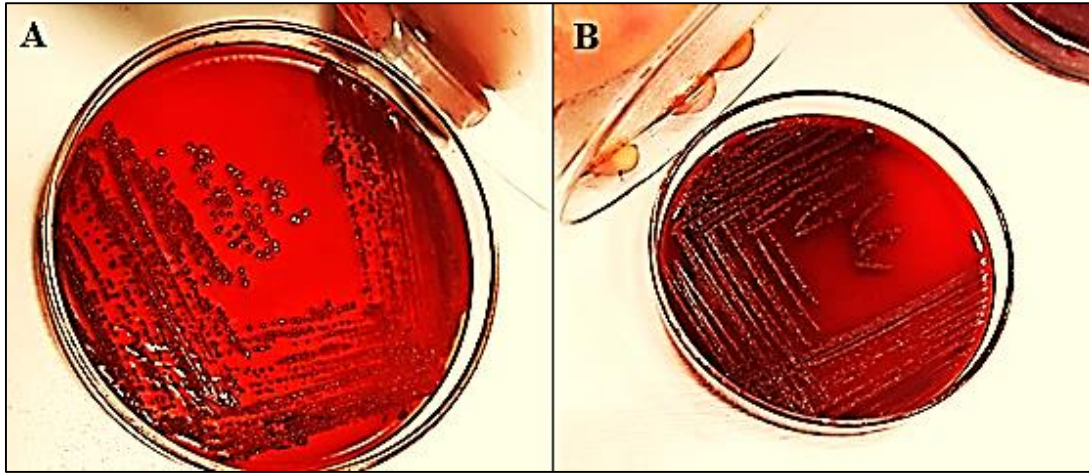
NOESY spektrumunda aynı uzayı paylaşan (birbirinin elektron yoğunluğunu etkileyen) protonlara (H) ait cross pikler gözlenir. NOESY spektrumunda yer alan cross pikler yardımıyla monomerlerin hangi sırayla bağlandığı ve bu bağlanmaların stereokimyaları belirlenmiştir. Bu kapsamda L-EPS_{BIS312}'nin NOESY spektrumunda yer alan anlamlı etkileşimleri aşağıda sunulmuştur.

α-D-Galaktopiranoz [H1-5,17 ppm] ile α-D-Glukopiranoz [H4-(3,62 ppm)]: (1,4)
 α-D-Glukopiranoz [H1-4,98 ppm] ile α-D-Mannopiranoz [H4-3,65 ppm]: (1,4)
 α-D-Mannopiranoz [H1-4,92 ppm] ile α-D-Galaktopiranoz [H2-3,97 ppm]: (1,2)
 α-D-Galaktopiranoz [H4-3,87 ppm] ile β-D-Glukopiranoz [H3- 3,53 ppm]: (4,3)
 β-D-Glukopiranoz [H1-4,47 ppm] ile α-D-Glukopiranoz [H3- 3,98 ppm]: (1,3)
 α-D-Glukopiranoz [H1- 4,98 ppm] ile α-D-Mannopiranoz [H4-3,65 ppm]: (1,4)
 α-D-Mannopiranoz [H1- 4,92 ppm] ile α-D-Galaktopiranoz [H2-3,97 ppm] : (1,2)
 α-D-Mannopiranoz [H3- 3,80 ppm] ile : α-L-Ramnopiranoz [H4-3,80 ppm]: (3,4)

Yukarıdaki bilgilere dayanarak monomerlerin açık formülleri ve bağlanma şekilleri aşağıda şematize edilmiştir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

4.5. Bazı Patojen Bakteri Suşlarının Biyofilm Yapma Oranlarının Belirlenmesi ve Yüksek Biyofilm Yapma Kapasitesine Sahip Suşların Seçimi

Etkin biyofilm yapabilen patojen suşları seçerek antibiyofilm çalışmasında kullanabilmek amacıyla, Bölüm 3.2.9’da anlatıldığı gibi 12 patojen bakteri suşunun biyofilm yapma oranları önce Kongo Red yöntemi ile fenotipik olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, Kongo Red Agar üzerinde siyah koloni oluşturan bakteriler güçlü (+++), hem siyah hem de kırmızı koloni oluşturan bakteriler orta (++), sadece kırmızı koloni oluşturan bakteriler ise zayıf (+) derecede biyofilm oluşturanlar olarak değerlendirilmiştir. Resim 4.2’de Kongo Red ilave edilmiş, Brain Heart besi ortamındaki bazı patojenlere ait koloni morfolojileri gösterilmiştir.



Resim 4.2. *S. aureus* EB-1 (A) ve *E. coli* ATCC 11229 (B) suşlarının Congo Red Agar’da oluşturdukları siyah koloni morfolojisi

S. aureus EB-1 suşunda güçlü biyofilm oluşumu, *E. coli* ATCC 11229 ve *E. faecalis* ATCC 29212 suşlarında orta düzeyde biyofilm oluşumu görülürken, *E. coli* ATCC 35218, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. enteritidis* ATCC 13076 ve *Streptococcus mutans* CNCT 8177 suşlarında ise zayıf biyofilm oluşumu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9). Bu çalışma sonucunda biyofilm oranı yüksek olan üç suş seçilmiş ve bu suşların mikroplak yöntemine göre spektrofotometrik ölçüm ile biyofilm yapma kapasiteleri belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. Bazı patojen bakterilerin Kongo Red yöntemi ile tespit edilen biyofilm yapma kapasiteleri

Suşlar	Biyofilm	Sonuç	Suşlar	Biyofilm	Sonuç
<i>S. aureus</i> EB-1	Güçlü	+++	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	Zayıf	+
<i>E. coli</i> ATCC 11229	Orta	++	<i>B. cereus</i> RSKK 863	Zayıf	+
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Orta	++	<i>S. Typhimurium</i> CCM 5445	Zayıf	+
<i>E. coli</i> ATCC-35218	Zayıf	+	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Zayıf	+
<i>S. enteridis</i> ATCC 13076	Zayıf	+	<i>S. aureus</i> EB18	Zayıf	+
<i>S. mutans</i> CNCT 8177	Zayıf	+	<i>S. Typhimurium</i> MU80	Zayıf	+

Mikroplak yönteminin prensibi, spektrofotometrik olarak yoğunluğun ölçülmesine dayanır. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen verilerle bakterilere ait OD değerlerinden kontrol grubunun OD değeri çıkartılarak, biyofilm oluşumu belirlenmiştir. Bakterilerin biyofilm yetenekleri kendi aralarında kuvvetli, orta düzeyde ve zayıf biyofilm oluşturanlar olarak gruplandırılmıştır. Mikroplak yönteminden elde edilen sonuçlara göre, tüm suşlarda çok yüksek olmayan düzeyde biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir. Çalışılan 3 suşun kendi aralarında biyofilm oluşturma kapasiteleri kıyaslandığında; *E. faecalis* ATCC 29212 > *S. aureus* EB-1 > *E. coli* ATCC 11229 ilişkisi elde edilmiştir.

4.6. *L. salivarius* Suşlarından Elde Edilen Kültür Filtratlarının, L-EPS'lerin ve L-EPS'lerin Kültür Filtratları ile Kombinasyonlarının Antibiyofilm Etkileri

Antibiyofilm etkinin belirlenmesi çalışmasında Bölüm 3.2.10'da anlatıldığı üzere mikroplak yöntemi esas alınmıştır. Bu çalışmada yüksek ve orta düzeyde biyofilm kapasitesi gösteren 3 suş (*S. aureus* EB-1, *E. fecalis* ATCC-29212 ve *E. coli* ATCC-11229) test bakterisi olarak kullanılmıştır. Antibiyofilm madde olarak, EPS üretim kapasitesi yüksek olan 2 suştan (*L. salivarius* BIS312 ve BIS722) elde edilen kültür filtratları, bu kültürlerden izole edilen L-EPS'lerin 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonları (nihai konsantrasyon) ve L-EPS'lerin (0,5 ve 1 mg/mL nihai konsantrasyonları) kültür filtratları ile kombinasyonları kullanılmıştır. Ayrıca muhtemel prebiyotik uygulamalar ile mukayese edebilmek amacıyla ticari bir prebiyotik olan inülin de çalışmada nihai konsantrasyon 0,5 ve 1 mg/mL olacak şekilde denenmiştir. Biyofilm inhibisyonu, Bölüm 3.2.10'da verilen metotta anlatıldığı gibi yüzde olarak hesaplanmıştır. Sonuçlara göre biyofilm oluşumunu, kültür filtratları %77-89, L-EPS'ler %55-75, kültür filtratları ve L-EPS karışımları ise %78-91 oranları arasında engellemiştir.

Suşların kültür filtratları ve L-EPS karışımlarının, tek başına kültür filtratları ve L-EPS'lerin kullanıldığı deney gruplarına göre daha yüksek antibiyofilm etkisi gösterdiği belirlenmiştir. İlave edilen L-EPS'ler, biyofilm inhibisyonunda 1 mg/mL konsantrasyonunda, 0,5 mg/mL konsantrasyonuna göre daha etkili olmuştur. Her iki suşun L-EPS'lerinin ve kültür filtratlarının tüm uygulamalarında da antibiyofilm etkisi gözlenirken, *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarının antibiyofilm etkileri mukayese edildiğinde anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Bakteri suşlarının kültür filtratları ve L-EPS'leri, inülin ile mukayese edildiğinde, hem kültür filtratlarının hem de L-EPS'lerin antibiyofilm etkilerinin inlinden daha yüksek olduğu grlmştir. Bu sonuçlar, suşlardan elde edilen L-EPS'lerin ve EPS içeren kültür filtratlarının prebiyotik etki gösterebileceğini kanıtlamıştır. Kültür filtratlarının, L-EPS'lerin, kültür filtratlarının L-EPS ile kombinasyonlarının ve inülinin kullanılarak oluşturulduğu deney gruplarına ait sonuçlar, n: 3 ortalamasının hesaplanmasıyla $\pm$ SD olarak izelge 4.10'da verilmiştir. *S. aureus* EB-1, *E. fecalis* ATCC-29212 ve *E. coli* ATCC-11229 suşlarında yapılan denemelerde inülin ile L-EPS'nin etkileri kıyaslandığında anlamlı bir farklılık olmadığı ($p>0,05$), ancak inülin ile filtrat ve L-EPS içeren filtrat uygulamalarındaki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Tüm patojen suşlarda filtrat ve L-EPS (1 mg/mL) kombinasyonları ile diğer tüm parametrelerin etkileri değerlendirildiğinde $p<0,05$ düzeyinde farklılık olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. *L. salivarius*'un BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen kültür filtratların, L-EPS'lerin, L-EPS'lerin kültür filtratları ile kombinasyonlarının ve inülinin belirtilen konsantrasyonlarda uygulanması ile oluşan yüzde (%) biyofilm inhibisyon sonuçları

Test Edilen Suşlar	KF ^a		L-EPS ^b				KF + L-EPS ^c				İnülin ^d	
	BIS312	BIS722	BIS312		BIS722		BIS312		BIS722		0,5	1
			0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1		
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	78 ± 4	77 ± 1	55 ± 1	70 ± 2	57 ± 3	71 ± 4	79±1	85±2	78±5	83±5	52 ± 3	65 ± 2
<i>E. coli</i> ATCC 11229	89 ± 3	87 ± 3	62 ± 3	75 ± 5	65 ± 1	75 ± 3	88±2	91±5	87±1	89±2	56 ± 2	72 ± 1
<i>S. aureus</i> EB-1	83 ± 4	80 ± 6	58 ± 3	72 ± 4	59 ± 2	74 ± 2	84±2	89±6	82±1	84±1	54 ± 1	69 ± 3

^a: KF: Kültür filtratı

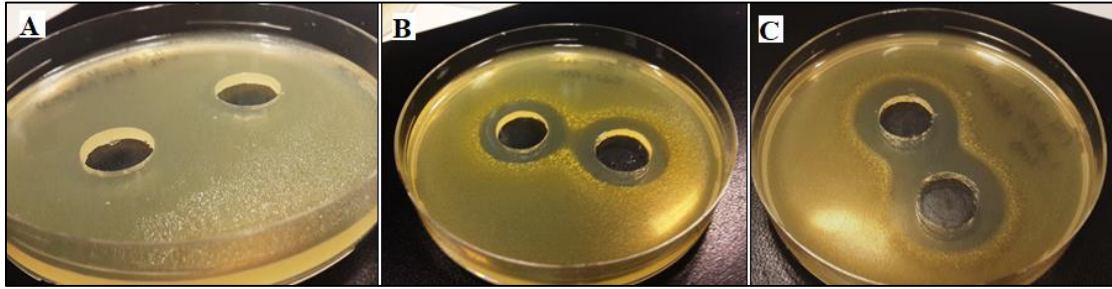
^b: 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan L-EPS çözeltileri

^c: 20 µL kültür filtratı içinde 0,5 ve 1 mg/mL oranlarında L-EPS olacak şekilde hazırlanan çözeltiler

^d: 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan inülin çözeltileri

4.7. *L. salivarius* Suşlarından Elde Edilen Kültür Filtratlarının, L-EPS'lerin ve L-EPS'lerin Kültür Filtratları ile Kombinasyonlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri

Bu çalışmada Bölüm 3.2.11'de anlatıldığı üzere kuyu difüzyon metodu esas alınmıştır. Antibiyofilm çalışmasında kullanılan 3 suş (*S. aureus* EB-1, *E. fecalis* ATCC-29212 ve *E. coli* ATCC-11229) test bakterisi olarak kullanılmıştır. Antimikrobiyal madde olarak, EPS üretim kapasitesi yüksek olan 2 suştan (*L. salivarius* BIS312 ve BIS722) elde edilen kültür filtratları, bu kültürlerden izole edilen L-EPS'lerin 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonları ve L-EPS'lerin (0,5 ve 1 mg/ml konsantrasyonları) kültür filtratları ile kombinasyonları kullanılmıştır. Tüm uygulamalar ticari prebiyotik olan inülin (0,5 ve 1 mg/ml konsantrasyonları) ile mukayeseli olarak çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda agar kuyu difüzyon metodu ile oluşan zon çaplarına ait bazı fotoğraflar Resim 4.3'te gösterilmiştir.



Resim 4.3. *L. salivarius* BIS312 suşunun L-EPS'sinin *E. coli* ATCC 11229 suşuna (A), BIS312 suşunun kültür filtratı ve L-EPS (0,5 mg/mL) kombinasyonunun *S. aureus* EB-1 suşuna (B) ve BIS312 suşunun kültür filtratının *E. faecalis* ATCC 29212 suşuna (C) uygulanması ve zon oluşumları.

Çalışma sonucunda, tek başına inülin ve L-EPS'nin kullanıldığı deney grupları zon oluşturmamış ve dolayısıyla antimikrobiyal etki gözlenmediğinden sonuçlar verilmemiştir. Test edilen kültür filtratlarının ise belirgin bir şekilde zon oluşumu gösterdiği belirlenmiştir. L-EPS'nin tek başına antimikrobiyal etki oluşturmadağı gözlemlenmesine rağmen, kültür filtratları ile birlikte kullanıldığında zon çapını artırdığı ve L-EPS'lerin 1 mg/mL konsantrasyonda, 0,5 mg/mL konsantrasyonuna göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Tüm kültür filtratları ve L-EPS'lerin kültür filtratları ile kombinasyon uygulamaları değerlendirildiğinde, *L. salivarius* BIS312 suşunun öne çıktığı görülmektedir. Kültür filtratlarında en yüksek inhibisyon etkisini 14 mm zon çapı oluşturan *L. salivarius* BIS312 suşunun kültür filtratının, *E. faecalis* ATCC 29212 patojenine karşı gösterdiği belirlenmiştir.

L-EPS'lerin kültür filtratları ile kombinasyonlarında ise en yüksek inhibisyon etkisini, 16 mm zon çapı oluşturan *L. salivarius* BIS312 suşuna ait 1 mg/mL L-EPS içeren kombinasyonun *E. faecalis* ATCC 29212 patojenine karşı gösterdiği tespit edilmiştir. Deney gruplarına ait sonuçlar, n: 3 ortalamasının hesaplanmasıyla $\pm$ SD olarak Çizelge 4.11'de sunulmuştur. *S. aureus* EB-1 ve *E. faecalis* ATCC-29212 suşlarında yapılan denemelerde kültür filtratları ile L-EPS içeren kültür filtratı uygulamalarındaki farkın anlamlı olduğu ($p<0,05$), *E. coli* ATCC-11229 suşunun denemelerinde ise kültür filtratları ile L-EPS içeren kültür filtratı uygulamalarında anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir. Ayrıca *E. faecalis* ATCC-29212 suşunda tüm parametrelerin antimikrobiyal etkileri, diğer patojen suşlar ile kıyaslandığında $p<0,05$ düzeyinde farklılığın olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.11. *L. salivarius*'un BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen kültür filtratları ve kültür filtratları ile birlikte L-EPS'lerin (0,5 ve 1 mg/mL) kombinasyonlarının patojen bakteriler üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun çap değerleri (mm)

Test Edilen Suşlar	KF ^a		KF + L-EPS ^b			
	BIS312	BIS722	BIS312		BIS722	
			0,5	1	0,5	1
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	14 $\pm$ 0	13 $\pm$ 0	14 $\pm$ 0	16 $\pm$ 0	13 $\pm$ 0	14 $\pm$ 0
<i>E. coli</i> ATCC 11229	11 $\pm$ 0	10 $\pm$ 0	11 $\pm$ 0	12 $\pm$ 0	10 $\pm$ 0	11 $\pm$ 0
<i>S. aureus</i> EB-1	10 $\pm$ 0	9 $\pm$ 0	12 $\pm$ 0	14 $\pm$ 0	10 $\pm$ 0	12 $\pm$ 0

^a: KF: Kültür filtratı

^b: 200 μ L kültür filtratı içinde 0,5 ve 1 mg/mL oranlarında L-EPS olacak şekilde hazırlanan çözeltiler

4.8. *L. salivarius* Suşlarından Elde Edilen Kültür Filtratlarının ve L-EPS'lerinin Anti-Quorum Sensing Etkileri

Bu çalışmada Bölüm 3.2.12'de anlatıldığı üzere, *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen L-EPS'ler (1, 2 ve 3 mg/mL konsantrasyonlarda) ve kültür filtratları (direkt, 1/2 ve 1/4 oranında seyreltilmiş kültür) kullanılmıştır. L-EPS'lerin ve kültür filtratlarının anti-quorum sensing etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla, test bakterisi olarak *C. violaceum* ATCC 12472 suşu kullanılmış ve bu suş üzerinde viyolasin üretimine etkileri kuyucuk difüzyon metodu ve spektrofotometrik yöntem ile incelenmiştir. İlk olarak kuyucuk difüzyon metodunda, örneklerin viyolasin üretimine etkisi fenotipik olarak değerlendirilmiştir. Metotta açıklandığı gibi mor pigment içermeyen beyaz zon oluşumu viyolasin üretiminin inhibisyonu olarak, şeffaf zon oluşumu ise antibakteriyel etki olarak değerlendirilmiştir. Kuyucuk difüzyon metoduna göre yapılan çalışma sonucunda, *L. salivarius* BIS312 ve

BIS722 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin ve kültür filtratlarının test edilen derişimler için viyolasin üretiminde inhibitör etkisi gözlenmemiştir. Ancak, *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarının sadece kültür filtratlarının *C. violaceum* ATCC 12472 suşu için antibakteriyel etkisi olduğu belirlenmiş ve inhibisyon zon çapı direkt uygulanan her iki kültür filtratı için de 12 mm olarak ölçülmüştür. $\frac{1}{2}$ ve $\frac{1}{4}$ oranında seyreltilmiş kültür filtratlarının antibakteriyel etkileri değerlendirildiğinde, *L. salivarius* BIS722 suşunun öne çıktığı söylenebilir. L-EPS'lerin kullanıldığı deney gruplarında antibakteriyel zon oluşumu da gözlenmediğinden sonuçlar verilmemiştir. Kültür filtratlarının antibakteriyel zon çaplarına ilişkin sonuçları, n: 3 ortalamasının hesaplanmasıyla $\pm$ SD olarak, Çizelge 4.12'de sunulmuş, zon çaplarına ilişkin bazı fotoğraflar ise Resim 4.4'te verilmiştir. Kültür filtratlarının belirtilen derişimlerde (direkt, $\frac{1}{2}$ ve $\frac{1}{4}$ seyreltme) uygulanması sonucunda oluşan zon çapları kıyaslandığında anlamlı bir farklılığın olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca, *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen kültür filtratlarının uygulamaları kendi içlerinde kıyaslandığında da $p<0,05$ düzeyinde farklılığın olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.12. *L. salivarius*'un BIS312 ve BIS722 suşlarının kültür filtratlarının *C. violaceum* ATCC 12472 bakterisi üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonunun çap değerleri

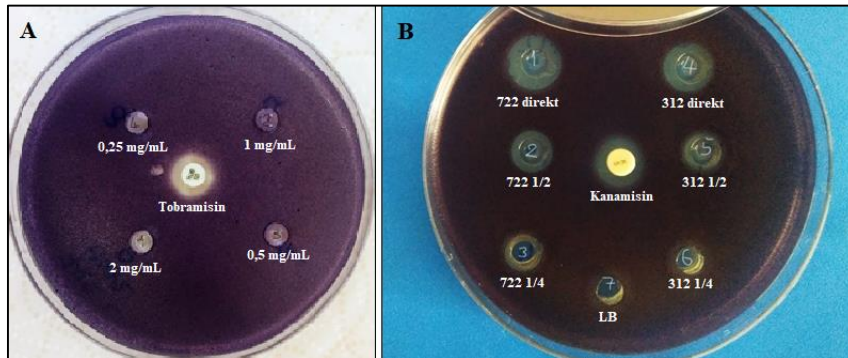
Kültür Filtratları Test Edilen Suşlar	Kültür Filtratı Oranlarına Göre Zon Çapları (mm)		
	Direkt Kültür ^a	$\frac{1}{2}$ Seyreltik Kültür ^b	$\frac{1}{4}$ Seyreltik Kültür ^c
<i>L. salivarius</i> BIS312	12 $\pm$ 1	6,7 $\pm$ 0	-
<i>L. salivarius</i> BIS722	12 $\pm$ 0	7,3 $\pm$ 0	6,3 $\pm$ 0

Açıklama: Pozitif kontrol olarak kullanılan Kanamisin (5 μ g)'in oluşturduğu zon çapı 11 $\pm$ 0'dır.

^a: Hazırlanan kültür filtratı seyreltilmeden 70 μ L olarak direkt kuyucuğa yüklenmiştir.

^b: Hazırlanan kültür filtratı steril saf su ile $\frac{1}{2}$ oranında seyreltilerek 70 μ L olarak kuyucuğa yüklenmiştir.

^c: Hazırlanan kültür filtratı steril saf su ile $\frac{1}{4}$ oranında seyreltilerek 70 μ L olarak kuyucuğa yüklenmiştir.



Resim 4.4. *L. salivarius* BIS722 suşunun L-EPS'sinin (A) ve *L. salivarius* BIS722 ve BIS312 suşlarının kültür filtratlarının (B) *C. violaceum* ATCC 12472 bakterisi üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonları

Fenotipik olarak değerlendirme sonrasında, aynı oranlarda hazırlanan L-EPS çözeltilerinin ve kültür filtratlarının *C. violaceum* ATCC 12472 suşunda viyolasin üretimine etkisi spektrofotometrik yöntem ile değerlendirilmiştir. Viyolasin inhibisyonu, Bölüm 3.2.12’de verilen metotta anlatıldığı gibi yüzde olarak hesaplanmıştır. *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen kültür filtratlarının test edilen derişimler için viyolasin üretiminde inhibitör etkisi gözlenmemiş ve dolayısıyla sonuçlar verilmemiştir. L-EPS çözeltilerinde ise, konsantrasyonun 1 mg/mL’den 2 mg/mL’ye çıkarılmasıyla viyolasin inhibisyonunun belirgin bir şekilde arttığı dikkat çekmiş, 2 mg/mL konsantrasyondan 3 mg/mL’ye çıkarıldığında ise çok düşük oranda bir artış meydana geldiği belirlenmiştir. *L. salivarius* BIS722 suşundan elde edilen L-EPS’nin 1 mg/mL olarak hazırlanan konsantrasyonunun viyolasin üretimine inhibitör etki göstermediği belirlenirken, diğer konsantrasyonlarının viyolasin üretimini azaltma konusunda diğer suştan daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar, n: 3 ortalamasının hesaplanmasıyla $\pm$ SD olarak, Çizelge 4.13’te verilmiştir. Sonuçlara ilişkin oluşturulan grafik ise Şekil 4.5’te sunulmuştur. L-EPS’lerin belirtilen konsantrasyonlarda (1, 2 ve 3 mg/mL) uygulanması sonucunda oluşan viyolasin inhibisyonları kıyaslandığında farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca, *L. salivarius* BIS 312 ve BIS722 suşlarının L-EPS’lerinin uygulamaları sonucunda elde edilen inhibisyon yüzdeleri kıyaslandığında da $p<0,05$ düzeyinde farklılığın olduğu tespit edilmiştir.

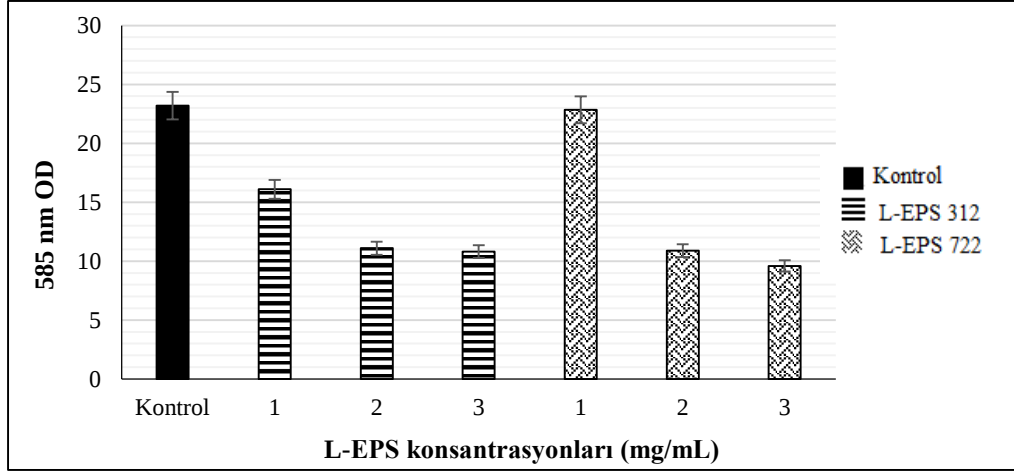
Çizelge 4.13. *L. salivarius*’un BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen L-EPS örneklerinin *C. violaceum* ATCC 12472 suşunun viyolasin üretimine etkisi

L-EPS’ler	Uygulama Oranları (mg/mL)					
	1		2		3	
	OD (585 nm)	% İnhibisyon	OD (585 nm)	% İnhibisyon	OD (585 nm)	% İnhibisyon
L-EPS ₃₁₂ ^a	16,1 $\pm$ 0,3	27,5	11,1 $\pm$ 0,4	52,3	10,8 $\pm$ 0,6	53,3
L-EPS ₇₂₂ ^b	22,85	-	10,9 $\pm$ 0,4	52,9	9,6 $\pm$ 0,3	58,4

Açıklama: Kontrol grubunun OD değeri 23,2 olarak bulunmuştur.

^a *L. salivarius* BIS312 suşundan elde edilen L-EPS

^b *L. salivarius* BIS722 suşundan elde edilen L-EPS



Şekil 4.5. 1, 2 ve 3 mg/ml’lik derişimlerde hazırlanan *L. salivarius*’un BIS312 ve BIS722 suşlarının L-EPS örneklerinin *C. violaceum* ATCC 12472 suşunun viyolasin üretimine etkisi

4.9. *L. salivarius* BIS312 Suşunun Kültür Filtratı ve L-EPS’lerinin Adezyondaki Rolü

Çalışmada kullanılan ve yüksek EPS üreticisi olan *L. salivarius* BIS312 suşunun (probiyotik uygulama) ve bu suşun, L-EPS ve kültür filtratı ile kombinasyonlarının (sinbiyotik uygulamalar) HT-29 hücre hattına adezyon yetenekleri, adezyon yüzdesi (%) ve adezyon indeksi (ADI) olarak belirlenmiştir. Bölüm 3.2.13’te verildiği gibi, adezyon yüzdesi (%), bakterilerin tutunduğu hücre sayısının yüzdesi olarak, ADI ise 100 hücreye tutunan bakteri sayısı olarak hesaplanmıştır.

Hücrelere probiyotiğin uygulanması ile adezyon yüzdesi %93 olarak hesaplanırken, ADI değeri 1883 olarak, L-EPS içeren sinbiyotiğin uygulamasında adezyon yüzdesi %96 olarak hesaplanırken, ADI değeri 2100 olarak, kültür filtratı içeren sinbiyotiğin uygulanmasında ise adezyon yüzdesi %97 olarak hesaplanırken, ADI değeri 2250 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar neticesinde *L. salivarius* BIS312 suşunun L-EPS ve kültür filtratı ile kombinasyonlarının, tek başına *L. salivarius* BIS312 suşuna göre daha yüksek adezyon yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum, adezyonun EPS ve kültür filtratı ile ilişkili olduğunu desteklemektedir. İncelenen suşun hücrelere yüksek oranda adezyon yeteneğine sahip olduğu, L-EPS ve kültür filtratının da bakterinin adezyon yeteneğini önemli ölçüde artırdığı görülmüştür. Bu sonuçları Resim 4.5’te sunulan ışık mikroskobu (Leica) görüntüleri de destekler niteliktedir. *L. salivarius* BIS312 suşu, tek başına HT-29 hücrelerine uygulandığında da yüksek adezyon yeteneği göstermiş ve bu durumun bakterinin yüksek EPS üreticisi olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Bu sonuç EPS’nin prebiyotik

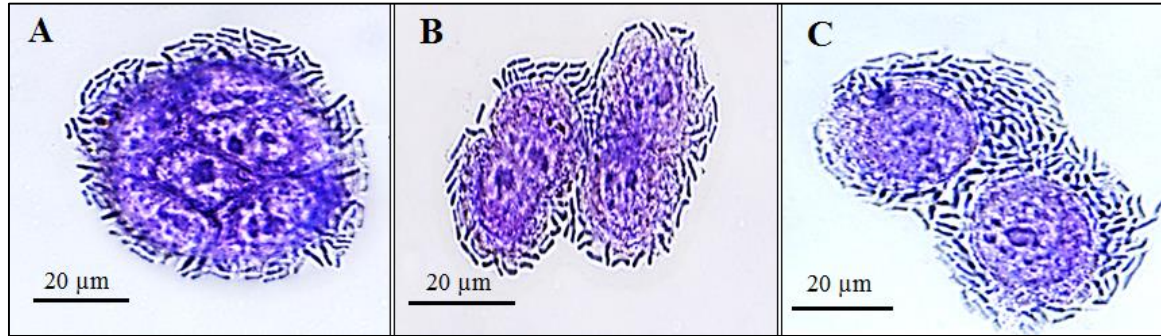
etkinliği açısından önemlidir. Bakteri tutunan hücre sayısının yüzdesi ve ADI değerleri 100 hücrenin incelenmesi sonucunda elde edilen veriler ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.14'te verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda probiyotik ile sinbiyotik uygulamaları arasındaki farklılığın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.14. *L. salivarius* BIS312 suşunun ve sinbiyotik uygulamasının (suşun, L-EPS/kültür filtratı ile kombinasyon uygulaması) HT-29 hücrelerine adezyon yeteneği

Uygulamalar	Adezyon (%) ^a	ADI ^b
Probiyotik: <i>L. salivarius</i> BIS312	93±5	1883
1. Sinbiyotik Uygulama: <i>L. salivarius</i> BIS312 + L-EPS	96±3	2100
2. Sinbiyotik Uygulama: <i>L. salivarius</i> BIS312 + Kültür filtratı	97±2	2250

^a: Bakteri tutunan hücre sayısının yüzdesi

^b: 100 hücreye tutunan bakteri sayısı



Resim 4.5. *L. salivarius* BIS312 suşunun (A), bu suşun L-EPS (B) ve kültür filtratı (C) ile kombinasyonlarının, HT-29 hücrelerine adezyon yeteneklerinin ışık mikroskobu görüntüleri (100X).

5. TARTIŞMA

GİS, karmaşık bir mikrobiyotadan oluşmakta ve sağlık performansı açısından çok önemli rol oynamaktadır. Bağırsak mikrobiyotasının yapısı beslenme, hastalık, çevresel faktörler, antibiyotik tedavisi gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Pourabedin ve Zhao, 2015; Wei, Lilburn ve Yu, 2016). Sağlıklı bir mikrobiyota, bağırsak epitel hücrelerinde oluşturdukları bariyer sayesinde organizmayı, tüketilen besinler aracılığı ile alınan patojen bakterilerden ve antijenlerinden korumaktadır. Bunların yanında vitamin sentezlemek, kolesterolü düşürmek ve gaz distansiyonunu düşürmek gibi yararlı etkiler de göstermektedir. GİS mikrobiyotasının dengesi patojenler, antijenler, oksidatif stres, radyasyon vb. faktörlerle bozulduğu zaman, normal mikrobiyotanın oluşturduğu bariyer ortadan kalkmakta ve mikrobiyota dengesi patojen mikroorganizmalar lehine kaymaktadır. Bunun sonucu olarak, bağırsak faaliyetlerinde bozulma, toksin oluşumu ve bağırsak enfeksiyonları gibi sorunlar ortaya çıkabilmektedir. Patojen biyofilmlerin neden olduğu bağırsak hastalıklarının oluşmasında da vücuda alınan besinlere bağlı olarak bağırsak biyota dengesinin bozulmasının önemli rolü olduğu düşünülmektedir (Sheil, Shanahan ve O'Mahony, 2007; Yegani ve Korver, 2008).

Hayvancılık sektöründe patojenlerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırarak hayvan sağlığını korumak, büyüme ve yemden yararlanmayı artırmak, toksinleri engellemek, olası hastalıklara karşı koruyucu etki oluşturmak gibi amaçlarla uzun yıllardan beri yem katkı maddesi olarak kullanılan antibiyotiklerin, birçok ülkede büyüme artırıcı olarak kullanılmasının yasaklanmasıyla, alternatif yem katkı maddelerine ihtiyaç hızla artmış ve subklinik enfeksiyonları önlemeleri, büyümeyi teşvik etmeleri ve sağlık açısından zararlı olmamaları gibi özellikleriyle probiyotikler, prebiyotikler, organik asitler, bitkisel ekstraktlar ve esans yağlar antibiyotiklere alternatif yem katkı maddeleri olarak yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Jazi ve diğerleri, 2018; Peebles, 2018; Kutlu ve Şahin, 2017; Karademir ve Karademir, 2003). Kanatlılarda patojen mikroorganizmalar ve bunların etkilerinin azaltılmasında probiyotik kullanımının etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar sonucunda, kanatlı rasyonlarına probiyotik olarak *Lactobacillus* suşlarının ilave edilmesiyle *Salmonella*, *C. perfringens*, *E. coli*, *Campylobacter* sp. gibi intestinal patojenlerin bağırsak epiteline tutunmasının önlendiği ve bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların azaldığı belirlenmiştir (Dec ve diğerleri, 2016; Abudabos ve diğerleri, 2015). Bunların dışında probiyotiklerin, kanatlı yemlerinde büyümenin teşvik edilmesi, bağırsak mikrobiyotasının

modülasyonu ve patojen inhibisyonu, immünomodülasyon ve kanatlı hayvan etinin kalitesinin artırılması gibi etkileriyle beslenme aracı olarak başarıyla kullanılabileceği rapor edilmiştir (Hassanein ve Soliman, 2010). Ancak tüm bu yararlı etkilerine rağmen probiyotiklerin yem katkı maddesi olarak kullanılabilmesi oldukça dikkat gerektiren ve zor bir işlemdir. Yem endüstrisinde kullanılan yüksek sıcaklık, kurutma, dondurma, asidik veya alkali ortam, yüksek basınç, gibi uygulamalar probiyotiklerin canlılıklarını sürdürebilmelerinde engel teşkil etmekte ve bu nedenle yeme probiyotik katılmasındaki aşamanın iyi değerlendirilmesi gerekmektedir. Aynı zamanda konakçının probiyotiği tüketmesiyle, probiyotiğin maruz kalacağı sindirim enzimleri, yüksek asidik ortam ve safra tuzları gibi engeller ile probiyotiğin zengin besi ortamı gereksinimi, oksijen, sıcaklık, pH, rekabetçi mikroorganizmalardan kaynaklanan stres koşulları gibi durumlar probiyotiklerin canlılıklarını korumaları açısından ciddi risk oluşturmaktadır (Ünal ve Erginkaya, 2010). Bunların dışında starter ve probiyotik özellikleri ile gıda sanayinde büyük öneme sahip olan laktik asit bakterilerinin, antibiyotik direnç genlerini barındırmaları söz konusudur ve bu genlerin patojenlere aktarılabildiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Courvalin, 2006; Gevers ve diğerleri, 2003; Meral ve Korukluoğlu, 2014). Tüm bu bahsedilen durumlar değerlendirildiğinde yem katkı maddesi olarak probiyotiklerin yerine, canlı olmayan, ekstrem çevre koşullarına dayanıklı ve probiyotiklerin gelişimini teşvik edecek alternatif ürünler geliştirmek önemli bir çalışma konusu haline gelmiştir.

Üst gastrointestinal sistemde hidrolize ve absorbe olmayan, konakçıda luminal/sistemik etkiler yaratarak mikrobiyotayı daha sağlıklı bir kompozisyona doğru değiştirebilen gıda bileşenleri olan prebiyotikler, canlı olmadıklarından, canlılıklarını sürdürme gibi bir zorunlulukları da yoktur ve gastrointestinal sisteme adapte olmuş yararlı bakterilerin gelişimini teşvik etmektedir. Bu gibi faktörler prebiyotikleri, probiyotiklerden daha avantajlı bir duruma getirmektedir (Kim ve diğerleri, 2018; Üstündağ ve Özdoğan, 2017; Sugiharto, 2016; Jozefiak, Kaczmarek ve Rutkowski, 2008; Rastall ve diğerleri, 2005). Prebiyotik bileşenlerin, kanatlı üretkenliği üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu ve sağlıklı bir bağırsak sistemine katkıda bulunarak antibiyotiklere iyi bir alternatif olabilecekleri bildirilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2005). Biyoteknolojide geniş uygulama alanına sahip LAB EPS'lerinin gastrointestinal sistemde, probiyotik mikroorganizmaların gelişimini ve aktivitesini artırmak konusunda doğrudan ya da dolaylı olarak prebiyotik rolünün olduğu rapor edilmiştir (Welman ve Maddox, 2003). Yapılan bazı *in vitro* çalışmalarda, EPS'nin laktik asit bakterilerinin gastrointestinal epitel tabakaya adezyon etkinliğini artırabileceği bildirilmiştir

(de Palencia ve diğerleri, 2009). Yapılan literatür taramaları sonucunda, EPS'lerin prebiyotik özellikleri ile ilgili çalışmaların varlığı belirlenmiş ancak, LAB'lerinden elde edilen EPS'lerin tavuklarda yem katkısı olarak kullanılmasına ilişkin çalışmaların mevcut olmadığı görülmüştür. Bu hususta yem katkısı olarak kullanılan ticari prebiyotiklerin kullanımından doğabilecek problemlerin, EPS'lerin prebiyotik olarak kullanılması ile elemine edilebileceği düşünülmektedir.

Yukarıda verilen bilgiler doğrultusunda, bu tez kapsamında laktik asit bakterilerinin ve laktik asit bakterilerinden elde edilen ekzopolisakkaritlerin (EPS) prebiyotik özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla, serbest gezen köy tavuğu bağırsağı kaynaklı *Lactobacillus* cinsine ait 50 izolatın kültür ortamında EPS üretim kapasiteleri 121-532 mg/L aralığında tespit edilmiştir. Bu izolatların içinden yüksek EPS üretimi yeteneğine göre seçilen 11 izolatın, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. saerimneri* ve *L. agilis* olmak üzere dört türü içerdiği belirlenmiş ve bunların içinde de *L. salivarius* türüne ait suşların daha yüksek EPS ürettikleri tespit edilmiştir. Buna göre, 48 saat inkübasyon sonunda en yüksek EPS üretiminin, *L. salivarius* BIS312 (532 mg/L), BIS722 (507 mg/L) ve ZDM2132 (502 mg/L) suşları tarafından gerçekleştirildiği ve tavuk bağırsağında EPS üreticisi dominant türün de *L. salivarius* olduğu dikkat çekmiştir (Çizelge 4.1). Yapılan literatür taramalarına göre, gıda kaynaklı *Lactobacillus* cinsine ait farklı türlerin fenol-sülfürik asit metoduna göre, kültür ortamında genel olarak 31-350 mg/L aralığında EPS ürettiği belirlenmiştir (Zotta, Piraino, Parente, Salzano ve Ricciardi, 2008; Durlu-Özkaya, Aslim ve Özkaya, 2007; de Vuyst ve Degeest, 1999). Yüksekdağ ve diğerleri (2014), tavuk bağırsaklarından izole ettikleri farklı *Lactobacillus* türlerine ait EPS miktarlarının fenol-sülfürik asit metoduna göre, 11-180 mg/L aralığında olduğunu bildirmişler ve bunlar içinde *L. salivarius* türüne ait 3 suşun ise 53-151 mg/L aralığında EPS ürettiklerini ortaya koymuşlardır. Mercan ve diğerleri (2015), tavuk dışkılarından izole ettikleri *L. salivarius* türüne ait 4 suşun EPS üretim miktarlarının 130-430 mg/L aralığında olduğunu tespit etmişler ve suşlar arasındaki bu farklılığı dekstransükraz geni ile ilişkilendirmişlerdir. Dolayısıyla bu tez kapsamında kullanılan izolatların EPS üretim miktarları genel olarak literatürlerde belirtilen aralıkta bulunmuş olup, *L. salivarius* BIS312, BIS722 ve ZDM2132 suşlarının EPS üretimlerinin çoğu literatürde verilen farklı *Lactobacillus* türlerine ve *L. salivarius* suşlarına göre daha yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. İyi karakterize edilmiş bir bakteriyosin üreticisi olan *L. salivarius*, tavuk bağırsak epitel hücrelerinde baskın bir tür olmakla birlikte, kuluçkadan hemen sonra bağırsak epitel hücrelerine yerleşerek mikrobiyotada yerini almaktadır ve yapılan

çalışmalarda bağırsak mikrobiyotasını modüle etme, sindirim ve absorbsiyonu kolaylaştırarak laktobasil ve bifidobakteriler gibi yararlı bakterilerin sayılarını artırma, antimikrobiyal maddeler üretme, bağışıklık sistemini uyarma, yemden yararlanmayı artırarak canlı ağırlığında artış sağlama gibi yetenekleriyle kanatlılarda umut verici probiyotik olarak öne çıkan bir tür olduğu bildirilmiştir (Chaves, Brashears ve Nightingale, 2017; Shokryazdan ve diğerleri, 2017; Chen, Zhu ve Qiu, 2017; Messaoudi ve diğerleri, 2013; Neville ve O'Toole, 2010). Literatür verilerine (Mercan ve diğerleri, 2015; Durlu-Özkaya ve diğerleri, 2007) ve bu tez kapsamında yapılan çalışmalara göre, aynı türe ait farklı suşların EPS üretimlerinin farklılık gösterebildiği belirlenmiştir. Dolayısıyla bu durum, EPS üretimi yüksek olan bakterilere karar verebilmek için türlerin yanı sıra suşların da değerlendirilmesinin önemli olduğunu kanıtlamaktadır.

Laktik asit bakterileri tarafından üretilen toplam EPS verimi, ortamın bileşimine ve organizmaların büyüdüğü koşullara bağlıdır (Czaczyk ve Myszka, 2007). Karbon ve azot kaynakları, mikroorganizmaların en iyi şekilde büyümesini ve en yüksek EPS veriminin oluşmasını sağlayan besin ortamının ana bileşenleridir ve bu kaynakların çeşitlerinin ve farklı konsantrasyonlarının EPS'nin kompozisyonunu, aktivitesini ve sentezini etkilediği yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Elisashvili, Kachlishvili ve Wasser, 2009; Kanmani ve diğerleri, 2011; İsmail ve Nampoothiri, 2010; Bounaix ve diğerleri, 2009; Yuksekdağ ve Aslim, 2008). EPS'nin kanatlı sektöründe prebiyotik yem katkı maddesi olarak kullanılma potansiyeli bulunduğundan, bu tez kapsamında en yüksek EPS üretiminin sağlanabilmesi amacıyla farklı karbon kaynaklarının ve azot kaynağı olarak triptonun EPS üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol bileşimi (glukoz içeren MRS) ile mukayese edildiğinde, tekli şeker gruplarında en iyi EPS üretimini, glukozun çıkarılarak %2 laktozun ilave edildiği MRS besi ortamında, *L. salivarius* BIS312 suşu göstermiştir (685 mg/L). Bazı literatür çalışmalarında da denenen tekli şeker gruplarında en yüksek EPS üretiminin laktoz ihtiva eden besi ortamında gerçekleştiği bildirilmiştir (Khanh, Bich Thuy ve Thanh Thao, 2016; Kanmani ve diğerleri, 2011; İsmail ve Nampoothiri, 2010; Liu, Hsu, Chou, Lo ve Yu, 2009). Birden fazla karbon kaynağının farklı oranlarda kombinasyonları ile denenen parametrelerde en iyi EPS üretimini, %2 süktroz ile zenginleştirilen MRS besi ortamında yine *L. salivarius* BIS312 suşu gerçekleştirmiştir (696 mg/L). Azot kaynağı olarak triptonun eklendiği deney gruplarında ise en iyi sonuç, MRS besiyerine %1 tripton ve %2 laktoz ilavesiyle zenginleştirilen besi ortamında *L. salivarius* BIS312 suşunda bulunmuştur ve aynı zamanda tüm karbon ve azot kaynağı denemelerinde öne çıkan sonuç da bu olmuştur (702

mg/L). Bu tez kapsamında denenen karbon kaynağı kombinasyonlarına ilişkin literatür çalışmalarına rastlanmamış olmakla birlikte, %2 sükroz ve %1 tripton + %2 laktozla zenginleştirilen besi ortamlarındaki EPS üretiminde meydana gelen artışın, kullanılan bileşenlerin sinerjik bir etki yaratması sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. Dolayısıyla en iyi sonucun alındığı karbon ve azot kombinasyonunun kullanılması sonucunda, bakteri faaliyetinin artarak daha yüksek oranda EPS üretiminin sağlanması, üretim maliyetini azaltacağından endüstriyel ölçekli üretimde EPS'lerin kullanılabilirliğini artırabilecektir. Yapılan bu çalışmalarda *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşları daha öne çıktığından bundan sonraki çalışmalara, bu 2 suş ile devam edilmiş ve bu suşların EPS'leri saflaştırılıp liyofilizasyon cihazında kurutma işlemi ile toz haline getirilmiştir. Hazırlanan liyofilize EPS'lerin miktarları fenol-sülfürik asit metoduna göre değerlendirildiğinde, en iyi L-EPS miktarı yine *L. salivarius* BIS312 suşunda elde edilmiştir ve L-EPS miktarlarının kültür ortamındaki EPS miktarlarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4). L-EPS, yüksek hacimde üretildiğinden ve kurutularak yoğunlaştırıldığından dolayı, L-EPS miktarlarının kültür ortamında tespit edilen EPS miktarlarından daha yüksek olması beklenen bir sonuç olmuştur.

Farklı LAB suşları tarafından üretilen EPS'lerin kompozisyonları, üç boyutlu yapıları, sertlik, biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleri, şeker bağları, polimer uzunluğu, şeker içerikleri, polimer dallanmaları ve proteinlerle ilişkileri birbirinden farklıdır ve bu özelliklerine göre kategorize edilmektedir (Schurr, 2013; Kleerebezem ve Hugenholtz, 2003; Welman ve Maddox, 2003; Ruas-Madiedo, Hugenholtz ve Zoon, 2002). EPS'lerin yararlı etkilerinin, yapısında bulunan monosakkarit kompozisyonuna, bağların türüne, dallanma derecelerine ve molekül ağırlığına bağlı olarak değişiklik gösterebildiği rapor edilmiştir (Iliev ve diğerleri, 2006). EPS moleküllerinin yapısal özellikleri, EPS'nin biyolojik aktivitelerini ve teknolojik uygulamalarını belirlemekte en önemli unsurlardan biri olduğundan, yeni bir EPS'nin kimyasal bileşiminin ve yapısının aydınlatılması, potansiyel uygulamaların öngörülmesi açısından büyük önem arz etmektedir (Li ve diğerleri, 2015). Bu sebeplerle çalışmada kullanılan L-EPS'lerin yapısal özelliklerini ortaya koyabilmek için L-EPS'lerin monomer kompozisyonları (HPLC analiziyle) ve molekül ağırlıkları (SEC analiziyle) belirlenmiştir. Bunların dışında en yüksek EPS üretimine sahip *L. salivarius* BIS312 suşundan elde edilen L-EPS'nin bağ yapısı da NMR analizi ile ortaya konulmuştur.

Çalışmada kullanılan *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin monomer kompozisyonları değerlendirildiğinde, tespit edilen monomerlerin her iki suşta da aynı olduğu, ancak oranlarının suşlara göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.5). L-EPS'lerin yapısında bulunan monomerler, glukoz, mannoz, ramnoz ve galaktoz olarak belirlenirken, glukozun ana monomer olduğu ve L-EPS'lerin glukoz oranlarının birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir (%34,5-35,3). Her iki suşta belirlenen monomer oranlarında farklılık olmakla birlikte bu farklılığın önemli olmadığı, sadece EPS üretimi yüksek olan *L. salivarius* BIS312 suşunun L-EPS monomer kompozisyonu incelendiğinde ramnoz monomerinin, *L. salivarius* BIS722 suşunun L-EPS'sine göre biraz daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ksiloz, ramnoz, arabinoz ve galaktoz monosakkaritleri çoğunlukla gıda endüstrisinde, mannoz ve yine galaktoz monosakkaritleri ise yaygın şekilde farmasötik endüstride kullanılmaktadır (Saari, Heikkilä ve Hurme, 2010). Yapılan çalışmalarda, *Lactobacillus* cinsine ait suşlardan elde edilen EPS'lerin farklı şekerleri farklı oranlarda içerebildiği görülmüş, nadir şekerler içeren EPS'lerin ise (ramnoz ve fukoz gibi), ortak şekerler içeren EPS'lere kıyasla daha gelişmiş biyolojik özelliklere sahip olabileceği bildirilmiştir (Rani ve diğerleri, 2018; Roca, Alves, Freitas ve Reis, 2015). *L. salivarius* suşlarından elde edilen EPS'lerin monosakkarit kompozisyonlarının ortaya konulduğu literatür çalışmalarına rastlanmamış olmakla birlikte, *Lactobacillus* cinsine ait diğer bazı türlere ilişkin yapılan çalışmalar özetlenmiştir. Torino ve diğerleri (2000), *L. helveticus* ATCC 15807 suşuna ait EPS'deki toplam karbonhidratların %63,2'sinin glukoz, %34,5'inin galaktoz ve %6,95'inin ramnoz olduğunu tespit etmişlerdir. *L. plantarum* EP56 suşuna ait EPS'nin majör komponentinin glukoz ve galaktoz olduğu (Tallon, Bressollier ve Urdaci, 2003), *Lactobacillus plantarum* KF5 suşunun ürettiği ekzopolisakkaritin mannoz, glukoz ve galaktoz içerdiği (Wang ve diğerleri, 2010), *L. plantarum* YW32 tarafından üretilen EPS'nin yapısında, mannoz, fruktoz, galaktoz ve glukoz şekerlerinin bulunduğu, *L. plantarum* MTCC 9510'deki EPS'nin ise glukoz ve mannoz rezidülerinden oluşan heteropolisakkarit yapıda olduğu rapor edilmiştir (Ismail ve Nampoothiri, 2010). Başka bir çalışmada tavuktan izole edilen *L. gasseri* FR4 suşundan elde edilen EPS'nin yapısında glukoz (%65,31), mannoz (%16,51), galaktoz (%8,45), fukoz (%6,55) ve ramnoz (%3,18) bulunduğu rapor edilmiştir (Rani ve diğerleri, 2018). EPS'nin yapısında bulunan şeker içerikleri bakımından bizim çalışmamıza benzerlik gösteren, Zivkovic ve diğerlerinin (2015) yapmış oldukları çalışmada beyaz peynirden izole edilen *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 suşunun hem bağışıklığın düzenlenmesinde etkili olan hem de viskoz yapının oluşumundan sorumlu olan yüksek molekül ağırlıklı HePS ürettiği ve bu HePS'in yapısında %86,6 glukoz, %6,2

mannoz, %4,1 galaktoz ve %3,1 ramnoz bulunduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda *L. paraplantarum* BGCG11 suşundan elde edilen bu EPS'lerin *in vitro* anti-enflamatuar veya immünosüpresif etkilerden sorumlu olduğu rapor edilmiştir (Nikolic ve diğerleri, 2012; Zivkovic ve diğerleri, 2015). Çalışmada kullandığımız *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından izole edilen L-EPS'lerin glukoz ve galaktoz monomerlerini içermeleriyle çoğu araştırmacıların çalışmalarına benzerlik gösterdiği belirlenmiş, mannoz ve özellikle ramnoz monomerlerinin ise yapılan her çalışmada gözlenmediği tespit edilmiştir. Dolayısıyla çalışılan EPS'lerin, yapısında bu 4 monosakkariti birlikte barındırmasının biyolojik aktivitesinde olumlu etki sağlayacağı ve ileride de bahsedilecek olan tez kapsamında yapılan *in vitro* çalışmalarda öne çıkan sonuçlar alınmasının bununla ilişkili olabileceği düşünölmüştür.

Polisakkaritlerin molekül ağırlığı da biyoaktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Düşük molekül ağırlıklı polisakkaritler, çoklu hücre zarı bariyerlerinden kolayca geçebildiklerinden bu polisakkaritlerin daha iyi biyolojik aktivite sergileyebildikleri belirtilmiştir (Li ve diğerleri, 2016). Bu tez çalışması kapsamında *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin $0,9 \times 10^4$ ve $6,9 \times 10^6$ aralığında molekül ağırlığına sahip, dört anlamlı fraksiyondan oluştuğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). *L. salivarius* BIS722 suşunun L-EPS'sinin molekül ağırlığı fraksiyonlarının, diğer suşun L-EPS'sinin fraksiyonlarına göre daha büyük olduğu dikkat çekmiştir. Literatür taramaları sonucunda *L. salivarius* türünden elde edilen EPS'lerin molekül ağırlıklarının belirlenmesine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle diğer *Lactobacillus* cinsine ait türlere ilişkin benzer çalışmalar özetlenmiştir. Literatür çalışmaları incelendiğinde farklı *L. plantarum* suşları tarafından üretilen EPS'lerin farklı molekül ağırlığıya sahip olduğu bildirilmiş olsada, genellikle laktobasillerin EPS'lerinin molekül ağırlığının 10^5 ila 10^6 Da aralığının içinde olduğu rapor edilmiştir. EPS'lerin molekül ağırlıklarının, EPS üreten suşların farklılığına ve büyüme koşullarına bağlı olarak değiştiği bildirilmektedir (Salazar ve diğerleri, 2009; Wang, Zhao, Tian, Yang ve Yang, 2015a). Tez çalışmasında, *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen L-EPS'lerin de iki büyük fraksiyonuna ait molekül ağırlıklarının literatürlerde belirtilen aralık içinde yer aldığı (10^5 - 10^6 Da) tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, *L. rhamnosus* E/N, glukoz veya maltoz içeren ortamda ayrı ayrı geliştirildiklerinde sırasıyla 200 ve 500 kDa'luk tek molekül ağırlıklı fraksiyon oluştuğu gösterilmiştir. Ayrıca, galaktoz, laktoz ve süktroz varlığında, 45 kDa'lık ilave bir düşük molekül ağırlıklı fraksiyonda gözlenmiştir. Farklı molekül ağırlık fraksiyonlarının

heteropolisakkarit kompozisyonunun aynı olduğu ancak, farklı fizikokimyasal ve reolojik özellikler gösterdiği belirtilmiştir (Polak-Berecka ve diğerleri, 2015). Bazı literatürlerde, düşük molekül ağırlıklı EPS'lerin yüksek moleküler ağırlıklı EPS'lere göre daha iyi immün-modülatör etkilere sahip olabileceği rapor edilmiştir (Tükenmez ve Aslım, 2018; Sun, Wang ve Zhou, 2012). Çalışmada kullanılan *L. salivarius* BIS312 suşundan elde edilen L-EPS'nin molekül ağırlığı fraksiyonlarının diğer suşa göre düşük olmasının hücre zarından geçişte bir avantaj sağladığı ve ileride de detaylı bahsedilecek bazı *in vitro* çalışmalarımızda bu nedenle daha öne çıktığı düşünülmüştür.

L-EPS'lerin monomer profilinin belirlenmesi çalışmalarında yukarıda bahsedilen analizlere ek olarak, en yüksek ekzopolisakkarit üreticisi olan *L. salivarius* BIS312 suşunun L-EPS'nin bağ yapısının belirlenmesi amacıyla bir ve iki boyutlu NMR yöntemleri kullanılmıştır. ¹H-NMR, COSY, NOESY, HMQC ve ¹³C-APT analizleri yapılmıştır. L-EPS_{BIS312}'nin ¹H-NMR spektrumunda, β-D-Glukopiranoz, α-D-Mannopiranoz, α-D-Glukopiranoz, α-D-Galaktopiranoz ve α-L-Ramnopiranoz monosakkaritlerinin anomerik H₁ protonlarına ait pikler sırasıyla, 4,47; 4,92; 4,98; 5,17 ve 5,32 ppm civarında görülmektedir (Çizelge 4.7). Bu durum çalışılan L-EPS'lerin HPLC analizleri ile ¹H-NMR spektrumlarına ait piklerin uyumlu olduğunu göstermektedir. Bağ yapısının belirlenmesine ilişkin yapılan analizler neticesinde L-EPS_{BIS312}'nin yapısında α-1,4; α-1,2; β-4,3; β-1,3 ve α-3,4 bağlarının bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3 ve 4.4). Literatür taramaları sonucunda *L. salivarius* türünden elde edilen EPS'lerin moleküler bağ yapılarının belirlenmesine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Genellikle β-(1,3), β-(1,4) veya β-(1,6) bağları ile dallanmış zincirler içeren polisakkaritlerin biyoaktivite için gerekli olduğu bildirilmiştir. Anyonik yapılar ve daha yüksek molekül ağırlıklı kompleks dallanmış zincirli polisakkaritlerin daha iyi immün-stimüle edici aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Tükenmez ve Aslım, 2018; Cleary, Kelly ve Husband, 1999). Dolayısıyla çalışmamızda da L-EPS_{BIS312}'nin kompleks dallanmış zincirler içermesi ve yapısında β-(1,3) bağlarını barındırmasının, biyoaktivitesini olumlu yönde etkilediği düşünülmüştür. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre, L-EPS'lerin biyoaktivitelerinde, monomer kompozisyonlarının, bağ yapılarının ve molekül ağırlıklarının etkili olabileceği düşünülmektedir ve literatürlerde nasıl etkili olabildiğine dair mekanizmalar tam olarak ortaya konmamış olsada, yapılan çalışmalar biyolojik aktiviteyi etkilediğini destekler niteliktedir.

Patojen mikroorganizmaların meydana getirdiği biyofilmler kronik ve tekrarlayan enfeksiyonlara neden olduğundan, canlının sağlığı üzerinde oldukça önemli etkileri vardır. Vücuda alınan besinler, patojen biyofilmlerin oluşmasına, sindirim ve besin emiliminin etkilenmesiyle yem tüketiminin zayıf olmasına ve hastalığa yatkınlığa neden olabilmektedir (Baldwin ve diğerleri, 2018; Kim ve diğerleri, 2009; Sheil ve diğerleri, 2007). Biyofilmin engellenmesi konusunda yapılan çok sayıda çalışma vardır. Bu konuda yapılan araştırmalarda, quorum sensing molekül blokörleri, antimikrobiyal ajanlar ve biyositler kullanılmış, ancak bu yöntemlerde istenilen başarı tam olarak elde edilememiştir. Özellikle biyofilm yapısının antibiyotik, biyosit ve mekanik strese karşı artan toleransı sebebiyle, olgun biyofilmi yok etmek tamamen zorlaşmıştır (Onbaşlı, Çelik ve Ökçesiz, 2017; Schachter, 2003). Bu nedenle, alternatif uygulamalara ve doğal yöntemlere olan ihtiyaç hızla artmıştır. Bu amaçlarla tez çalışmasında, biyofilm oluşumunu engelleyici etken madde olarak, *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen kültür filtratları, L-EPS'leri ve bunların kombinasyonları kullanılmıştır. Bu parametrelerin antibiyofilm ve antimikrobiyal aktivitesi ile tavukların GIS mikrobiyotasındaki faydalı probiyotik kompozisyonunu artıracak ve mikrobiyotanın dengede kalmasına yardımcı olacak probiyotik kaynaklı prebiyotik ajan elde edilmesi amaçlanmıştır. Ön çalışma ile biyofilm konusunda en yetenekli patojen bakteriler (*E. coli* ATCC 11229, *E. fecalis* 29212 ve *S. aureus* EB1), test bakterisi olarak seçilmiş ve *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen kültür filtratları, L-EPS'leri (son konsantrasyon 0,5 ve 1 mg/mL olacak şekilde) ve bunların kombinasyonlarının, bu patojen test bakterileri üzerine antibiyofilm etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bunların dışında ticari bir prebiyotik olan inülin de son konsantrasyon 0,5 ve 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanarak bu çalışmada kullanılmış ve sonuçlar EPS ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, kültür filtratları %77-89, L-EPS'ler %55-75, inülin %52-72 oranları arasında, L-EPS ve kültür filtratı kombinasyonları ise %78-91 oranları aralığında biyofilm oluşumunu engellemiştir (Çizelge 4.10). İlave edilen L-EPS'ler, biyofilm inhibisyonunda 1 mg/mL konsantrasyonunda, 0,5 mg/mL konsantrasyonuna göre daha etkili olmuştur. Her iki suşun tüm uygulamalarında da antibiyofilm etkisi gözlenirken, *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarının antibiyofilm etkileri mukayese edildiğinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bakteri suşlarının kültür filtratları ve L-EPS'leri, inülin ile mukayese edildiğinde, hem kültür filtratlarının hem de L-EPS'lerin antibiyofilm etkilerinin inülininden daha yüksek olduğu görülmüş ve biyofilm oluşturan bakterilerin büyümesinin önüne geçilebilmesi açısından, L-EPS'lerin ve kültür filtratlarının antibiyofilm etkisi ile de prebiyotik olarak kullanılabileceği

düşünülmüştür. Suşların kültür filtratı ve L-EPS karışımlarının (%78-%91), kültür filtratlarına (%77-89) ve L-EPS'lere (%55-75) göre daha yüksek antibiyofilm etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Literatür taramaları sonucunda EPS'nin antibiyofilm etkisinin ortaya konulduğu bir çalışmada, *L. acidophilus* A4 suşundan elde edilen EPS'nin, 0,1, 1 ve 10 mg/mL konsantrasyonları hazırlanarak, Enterohemorajik *E. coli* O157:H7 bakterisi üzerinde biyofilm inhibisyon etkisi araştırılmıştır. En iyi biyofilm inhibisyon etkisinin 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan EPS'de meydana geldiği ve bu konsantrasyondaki EPS'nin biyofilm oluşumunu %87 oranında düşürdüğü belirlenmiş ve biyofilm oluşumundaki bu düşüşün, bakteriyel yüzey özelliklerinin kısmen etkilenmesi sonucunda (hücre yüzeyi modifikasyonlarının veya hücre-hücre yüzey etkileşimlerinin azaltılmasıyla) hücrelerin ilk bağlanma ve otoagregasyonunun inhibe edilmesiyle ortaya çıkabileceği öne sürülmüştür (Kim ve diğerleri, 2009). Rani ve diğerleri (2018) yapmış oldukları çalışmada, *L. gasseri* FR4 suşundan elde edilen saflaştırılmış EPS'nin antibiyofilme olan etkisini belirleyebilmek amacıyla, gıda kaynaklı *E. coli* MTCC 2622, *L. monocytogenes* MTCC 657, *S. aureus* MTCC 3160 ve *E. faecalis* MTCC 439 patojenlerini kullanmışlardır. Bu çalışma sonrasında elde edilen veriler sonucunda, antibiyofilm aktivitesinin EPS konsantrasyonuna bağlı olarak değişebildiği belirlenmiş ve maksimum inhibitör etki (%56), 4 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan EPS'nin, *L. monocytogenes* MTCC 657'de patojenine uygulanması sonucunda elde edilmiştir. Kültür filtratlarının antibiyofilm etkilerinin ortaya konulduğu literatür çalışmalarının araştırılması sonucunda, yapılan bir çalışmada *Bacillus licheniformis* SP1 ve SP3 suşlarından elde edilen kültür filtratlarının, *Escherichia coli* PHL-628 üzerinde biyofilm oluşumunu %50-65 oranlarında engellediği belirlenmiştir (Sayem ve diğerleri, 2011). Koohestani ve diğerleri (2018) tarafından, *L. acidophilus* LA-5 ve *L. casei* 431 suşlarından elde edilen kültür süpernatantlarının mikropalak yöntemine göre, *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde biyofilm inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Kültür süpernatantlarının artan konsantrasyona bağlı olarak biyofilm inhibisyon oranını artırdığı ve *L. acidophilus* LA-5 ve *L. casei* 431 suşlarının %100 konsantrasyondaki süpernatantlarının, sırasıyla %70,6 ve %65,3 oranlarında biyofilm oluşumunu engellediği tespit edilmiştir. Kaur ve diğerleri (2018) tarafından yapılan çalışmada, hücre içermeyen 7 LAB izolatının kültür süpernatantlarının antimikrobiyal ve antibiyofilm etkileri, güçlü biyofilm oluşturan *Vibrio cholerae* ve *Vibrio parahaemolyticus* türleri üzerinde incelenmiş ve tüm LAB izolatlarının geniş spektrumlu antimikrobiyal ve biyofilm inhibe edici aktivitelere sahip olduğu ve enfeksiyöz hastalıkları inhibe etmek için iyi profilaktik özelliklere sahip olabileceği rapor edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda bu laktobasil izolatlarının kültür filtratlarının V.

cholerae suşunda %90'ının üzerinde, *V. parahaemolyticus* %47-82 aralığında biyofilm inhibisyonu oluşturduğu bildirilmiştir. Yapılan literatür taramaları ve bu tez çalışmasından elde edilen veriler, *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin kültür filtratlarının ve L-EPS'lerinin patojen mikroorganizmalara karşı antibiyofilm etkilerinin olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Laktik asit bakterileri, laktik asitle pH'nın düşürülmesi, patojen bakterilerin bağırsak duvarına tutunmasının önlenmesi, besinlerin alımında bakteriler arasında rekabetin oluşması, antimikrobiyal madde üretimi gibi etkilerle çeşitli patojen bakterilere karşı antibakteriyel etki oluşturmaktadır (Aiba, Suzuki, Kabir, Takagi ve Koga, 1998; Yadav, Singh ve Tiwari, 2018). Bu tez çalışması kapsamında *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen kültür filtratları, L-EPS'leri (0,5 ve 1 mg/mL) ve bunların kombinasyonlarının *E. coli* ATCC 11229, *E. faecalis* 29212 ve *S. aureus* EB1 patojen test bakterileri üzerine inhibisyon etkileri belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda 0,5 ve 1 mg/mL'lik konsantrasyonlarda hazırlanan L-EPS ve inülin çözeltilerinin *E. coli* ATCC 11229, *E. faecalis* 29212 ve *S. aureus* EB1 test bakterilerine karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite oluşturmadığı, kültür filtratlarının ise 9-14 mm arasında değişen zon çapları ile antimikrobiyal etki gösterdikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Kültür filtratlarında en yüksek inhibisyon etkisini 14 mm zon çapı oluşturan *L. salivarius* BIS312 suşunun kültür filtratının *E. faecalis* ATCC 29212 patojenine karşı gösterdiği tespit edilmiştir. L-EPS ve kültür filtratı kombinasyonlarının kullanıldığı deney gruplarında, L-EPS'nin eklenmesiyle antimikrobiyal zon çapında artış olduğu belirlenmiş (10-16 mm), ancak bu artışın çok büyük olmadığı tespit edilmiştir. Kültür filtratı ve L-EPS kombinasyonlarında en yüksek inhibisyon etkisini, 16 mm zon çapı oluşturan *L. salivarius* BIS312 suşunun kültür filtratı ve L-EPS (1 mg/mL) kombinasyonunun *E. faecalis* ATCC 29212 patojenine karşı gösterdiği belirlenmiştir. Antibiyotiklere alternatif ürünlerin geliştirilmesi açısından bu konuda çok sayıda yapılmış çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, tavuk dışkısından izole edilen *L. salivarius* suşlarının, *S. Typhimurium*, *E. coli*, *Y. enterocolitica* ve *S. aureus* patojenlerine karşı antimikrobiyal etkilerinin olup olmadığı araştırılmış ve 5-15 mm arasında değişen zon çapları ile inhibisyon etkileri belirlenmiştir (Mercan ve diğerleri, 2015). Trabelsi ve diğerleri (2017) tarafından yapılan çalışmada, *Lactobacillus* sp. Ca6 bakterisinden elde edilen EPS'nin, *Micrococcus luteus* ve *S. enterica*'ya karşı antibakteriyel etki gösterdiği ve inhibisyon zonunun sırasıyla 14 ve 10 mm civarında olduğu bildirilmiştir. Chaveerach ve diğerleri (2004), yaptıkları çalışma ile tavuk bağırsağından izole edilen *L. fermentum*'un, *Campylobacter* gelişimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Dabés ve diğerleri (2001), et

ürünlerinden izole edilen 288 laktik asit bakterisini kullanarak yaptıkları çalışmada, sadece 59 suşun *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiklerini, diğer suşların ise inhibisyon etkisi oluşturmadıklarını belirtmişlerdir. Aslim ve diğerleri (2005) tarafından yapılan çalışmada, Türk süt ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin kültür filtratları kullanılmış ve tüm filtratların *S. aureus*, *E. coli* ve *Y. enterocolitica* bakterilerine karşı 8-30 mm arasında değişen zon çapları ile bu patojenlere karşı inhibisyon etkisi gösterdikleri rapor edilmiştir. Yapılan literatür taramalarından ve bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, *Lactobacillus* cinsine ait bakteri kültür filtratlarının patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkilerinin olduğunu kanıtlamaktadır. Çalışmamızda L-EPS'lerin ise tek başlarına antimikrobiyal etki göstermediği, ancak kültür filtratı ile birlikte uygulandığında, kültür filtratının antimikrobiyal etkisini artırdığı belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre, *L. salivarius* BIS312 suşundan elde edilerek hazırlanan kültür filtratı ve L-EPS kombinasyonlarının, *L. salivarius* BIS722 suşundan elde edilenlere göre daha yüksek antimikrobiyal etki göstermesinde, L-EPS_{BIS312}'nin daha düşük molekül ağırlığına sahip olmasının da etkisinin olabileceği düşünülmüştür.

L. salivarius BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen kültür filtratlarının (direkt, ½ ve ¼ oranında seyreltilmiş) ve L-EPS (1, 2 ve 3 mg/mL konsantrasyonlarda)'lerinin, *C. violaceum* ATCC 12472 suşunun viyolasin üretimine etkileri değerlendirilmiş ve bu şekilde kültür filtratlarının ve L-EPS'lerin anti-quorum sensing etkileri ortaya konulmuştur. Kuyucuk difüzyon yöntemine göre, L-EPS ve kültür filtratlarının test edilen derişimlerde viyolasin inhibisyonu oluşturmadağı, ancak kültür filtratlarının 6,3-12 mm aralığında şeffaf zon oluşturarak, antibakteriyel etki yarattığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). Spektrofotometrik yöntemle göre, test edilen derişimlerde kültür filtratlarının viyolasin üretimine karşı inhibitör etki oluşturmadağı tespit edilmiş, L-EPS'lerin ise %10-58 aralığında olmak üzere belirgin ölçüde viyolasin inhibisyonu oluşturduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.13). L-EPS'lerin bu etkisini en iyi 3 mg/mL konsantrasyonda uygulandıklarında gösterdiği belirlenmiş ancak, 2 mg/mL konsantrasyonda uygulanmasından elde edilen sonuçlarla aralarında ciddi bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Viyolasin inhibisyonunda en iyi etki 3 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan L-EPS_{BIS722}'de tespit edilmiştir (%58,4). LAB EPS'lerinin ve kültür filtratlarının, viyolasin inhibisyonunun değerlendirilerek anti-quorum sensing etkilerinin belirlenmesine ilişkin yapılan bir literatür çalışması olmamakla birlikte, bu çalışma bu konuda gerçekleştirilen ilk çalışmadır. Bu çalışmada *L. salivarius* BIS722 suşunun L-EPS'sinin

diğer suşa göre öne çıkmasında, yapısında bulunan glukoz ve mannoz şekerlerinin oranının diğer suşa göre yüksek olmasının etkili olabileceği düşünülmüştür.

LAB tarafından üretilen EPS, LAB'nin bağırsak mukozasına tutunma özelliklerini iyileştirmekte ve böylece konağın bağışıklığını güçlendirebilmektedir (Rani ve diğerleri, 2018; Górska ve diğerleri, 2010). Genel olarak probiyotiklerin sağlık üzerindeki etkilerinin, probiyotik suşların bağırsak yüzeyini örten mukozal epitel hücrelere tutunma kabiliyetleri ile ilgili olduğu ve bu nedenle organizmaların probiyotik olarak tanımlanabilmeleri için adezyon yeteneğinin temel kriterlerden biri olarak kabul edilmesi gerektiği rapor edilmiştir (Dunne ve diğerleri, 2001; Boonaert ve Rouxhet, 2000; Free ve diğerleri, 2001). Çünkü adezyon etkisi kuvvetli olan probiyotikler, bağırsak mukozasının kolonizasyonu, bağırsakta kalıcılık, patojenik mikroorganizmaların rekabetçi dışlanması ve immünomodülasyon gibi sağlığa yararlı etkileriyle bağırsakta daha etkin olabilmektedirler (Zivkovic ve diğerleri, 2016; Muñoz-Provencio ve diğerleri, 2009; Beganović ve diğerleri, 2011). Bu amaçla, yüksek EPS üreticisi olan *L. salivarius* BIS312 suşunun (probiyotik uygulama) HT-29 hücrelerine adezyon yetenekleri araştırılmıştır. Bunun haricinde ortama L-EPS ve kültür filtratı ilave edilmesinin *L. salivarius* BIS312 suşuna adezyon kabiliyeti konusunda bir avantaj sağlayıp sağlamayacağı da *in vitro* çalışmalarla test edilmiştir. Çalışma sonucunda, *L. salivarius* BIS312 suşunun adezyon yüzdesi %93 olarak hesaplanırken, ADI değeri 1883 olarak tespit edilmiştir. *L. salivarius* BIS312 suşu ile bu suştan elde edilen L-EPS'nin kombinasyonunun uygulandığı hücrede adezyon yüzdesi %96 olarak hesaplanırken, ADI değeri 2100 olarak; kültür filtratı içeren sinbiyotik uygulanmasında ise adezyon yüzdesi %97 olarak hesaplanırken, ADI değeri 2250 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.14). Bu durum, adezyonun EPS ve kültür filtratı ile ilişkili olduğunu ve adezyon yeteneğini önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. *L. salivarius* BIS312 suşu, tek başına HT-29 hücrelerine uygulandığında da yüksek adezyon yeteneği göstermiş ve bu durumun bakterinin yüksek EPS üreticisi olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Probiyotik suş ile kültür filtratı kombinasyonunun kullanılarak yapılan sinbiyotik uygulama sonuçlarının diğer uygulamalara göre daha yüksek sonuç vermesinin, kültür filtratının içinde yer alan bazı proteinlerinden kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Epitel hücrelere yapışmada rol oynayan bu büyük yüzey proteinleri ve mukus bağlayıcı proteinler, bağırsakta oligosakkaritlere tutunarak epitel hücrelerde adezyon etkisini gösterebilmekte ve bağırsakta bu şekilde etkili olabilmektedir (Van Tassell ve Miller, 2011). Bu sonuç EPS'nin ve kültür filtratının prebiyotik etkinliği açısından oldukça önemlidir. Literatür araştırmaları sonucunda bir

çalışmada, *Pediococcus pentosaceus* LB-CC ve LB-WC suşlarının EPS ürettikleri belirlenmiş ve mide musinine adezyonlarının sırasıyla %68,56 ve %49,62 olduğu ve bağırsak epitel hücrelerinin yüzeyine de kuvvetli bir şekilde yapışma yeteneği sergiledikleri belirtilmiştir (Gupta ve Sharma, 2015). Bu sonuçlar, adezyon kabiliyetinin EPS ile yakından ilişkili olduğunu desteklemektedir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalar genel anlamda değerlendirildiğinde, L-EPS'lerin patojen bakterilere karşı tek başlarına antimikrobiyal aktivite sergilemedikleri, ancak kültür filtratı ile birlikte uygulandıklarında kültür filtratının oluşturduğu zon çapını artırdığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar neticesinde, kültür filtratlarının antimikrobiyal etki yaratarak, genel olarak polisakkarit yapıda olan L-EPS'lerin ise anti-quorum sensing mekanizmasını kullanarak biyofilm inhibisyonunda etkin rol oynadıkları düşünülmektedir. Dolayısıyla *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen kültür filtratlarının ve L-EPS'lerinin, doğal yollarla hiçbir toksik etki yaratmadan antibiyofilm ajan olarak kullanılabilecekleri öngörülmüştür. Aynı zamanda bu tez kapsamında alınan verilerden ve literatür taramalarından, *Lactobacillus* cinsi bakterilerin bu polisakkarit yapıdaki EPS'yi fermente etme yeteneği ile daha uzun süre canlı kalabilmelerini sağladıkları ve adezyon kapasitesini de buna bağlı olarak artırdığı çıkarımı yapılabilmektedir. Kültür filtratları ise içinde bakteriyosin gibi antimikrobiyal etki sağlayan molekülleri barındırdığından antimikrobiyal etkisinin güçlü olduğu ve antibiyofilm etkisini de bu şekilde gerçekleştirdiği tahmin edilmektedir. Ayrıca antimikrobiyal etkide, kültür filtratlarında bulunan metabolitlerin yanı sıra EPS üreticisi bakterilerin ürettiği EPS'nin de az da olsa etkin olduğu ve EPS yapısına göre bu etkinin farklılık gösterdiği dikkat çekmiştir. Yüksek EPS üreticisi bakterilerin adezyonda daha etkili olduğu ve EPS ilavesiyle de bu etkinin arttığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla elde edilen bulgular, probiyotik olarak aktif olan *L. salivarius* suşlarından (BIS312 ve BIS722) elde edilen kültür filtratlarının ve heteropolisakkarit yapıda olan EPS'lerinin, potansiyel olarak yem endüstrisinde prebiyotik bir bileşen olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hayvancılık sektöründe, özellikle de kanatlı endüstrisinde antibiyotiklerin yaygın şekilde kullanılması antibiyotik dirençliliğine, patojenlerle birlikte yararlı mikroorganizmaların da ortamdaki elemine olmasına ve dokularda kalıntıya neden olduğundan sağlık açısından ve çevresel açıdan birçok problemi beraberinde getirmektedir. Bu nedenle doğal gıdaya olan ihtiyacın giderek artması ile hayvansal üretimde besin takviyeleri olarak probiyotik ve prebiyotiklerin kullanılması kapsamında yapılan çalışmalar giderek artmaktadır. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda tavukçulukta yem katkı maddesi olarak kullanılan probiyotik ve prebiyotiklerin bağışıklık sistemini olumlu etkilediği, yem kullanım etkinliğini ve yemden yararlanma oranını artırarak büyüme performansını, yumurta ağırlığını ve boyutunu artırdığı görülmektedir. Probiyotik olarak *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin kullanımı yaygındır ancak, LAB'lerinden elde edilen EPS'lerin tavuk prebiyotiği olarak etki mekanizmasının *in vitro* deneylerle ortaya konulduğu ve prebiyotik olarak kullanımının öngörüldüğü herhangi bir çalışma mevcut değildir. Ayrıca, insan gastrointestinal sistemine benzer bir modelin oluşturularak yapıldığı bazı *in vitro* çalışmalarda ve sıçanlar üzerinde yapılan bazı *in vivo* çalışmalarda, EPS'lerin GİS'e yüksek oranda dayanıklılık gösterdiği bildirilmiş ve aynı şekilde kanatlılarda da kullanımının mümkün olabileceği düşünülmüştür. Bunların yanı sıra inülin gibi ticari bitkisel prebiyotik kullanımı sonucunda ortaya çıkan çeşitli yan etkilerin, prebiyotik özelliğe sahip olabilecek EPS gibi karbonhidratların kullanımını öne çıkarabileceği öngörülmektedir.

Bu tez kapsamındaki çalışmaların sonuçlarından elde edilen veriler ışığında yapılan çıkarımlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Serbest gezen köy tavuklarının bağırsaklarında en yüksek EPS üreticisi olarak dominant *L. salivarius* türüne ait suşlar belirlenmiştir.
2. Aynı türe ait farklı suşların EPS üretimlerinin farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.
3. EPS'nin prebiyotik olarak kullanımı söz konusu olduğundan yüksek verimle üretimi için %2 süktroz veya %2 laktoz ve %1 tripton ile zenginleştirilen MRS besi ortamlarının kullanılabileceği sonucu elde edilmiştir.
4. Aynı türün suşlarından elde edilen L-EPS'lerin monomer kompozisyonları aynı bulunmuş, ancak oranları farklılık göstermiştir.

5. Aynı türe ait farklı suşların L-EPS'lerinin moleküler ağırlıkları 4 fraksiyon olarak belirlenmiştir. Aynı sayıda fraksiyonlara sahip olmalarına rağmen moleküler ağırlıkları farklılık göstermiştir. *L. salivarius* BIS312 suşundan elde edilen L-EPS'nin, *L. salivarius* BIS722 suşundan elde edilen L-EPS'ye göre fraksiyonlarının daha düşük olduğu tespit edilmiştir.
6. Prebiyotik etkinliğinin belirlenmesi konusunda yapılan çalışmalarda *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarının L-EPS'lerinden farklı sonuçlar alınmasında, L-EPS'lerin karakteristik yapılarındaki farklılıkların etkili olduğu düşünülmüştür.
7. Her iki suştan elde edilen kültür filtratları, L-EPS ve kültür filtratının L-EPS ile kombinasyonlarının patojen bakterilerde antibiyofilm etkisi gösterdiği belirlenmiş, probiyotiklerin kültür filtratlarının ve EPS'lerinin bu yönüyle patojenlere karşı antibiyofilm ajan olarak prebiyotik etkinlikleri olduğu tespit edilmiştir.
8. EPS'nin tek başına antimikrobiyal etkisinin olmadığı, kültür filtratlarının ise belirgin oranda antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. EPS'nin kültür filtratı ile kombinasyon uygulamasında ise düşük oranda da olsa antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir.
9. Anti-quorum sensing çalışmasında kültür filtratlarının antimikrobiyal etkisi ortaya çıkmış ve anti-quorum sensing etkisi tespit edilmemiştir. EPS'lerin ise belirgin oranda quorum sensing inhibisyonu oluşturduğu belirlenmiştir.
10. L-EPS'lerin anti-quorum sensing mekanizmasıyla, kültür filtratlarının ise antimikrobiyal etkiyle biyofilm inhibisyonu sağladığı sonucuna ulaşılmıştır.
11. Adezyon çalışmasında kullanılan HT-29 hücrelerinde en iyi EPS üreticisi *L. salivarius* BIS312 suşunun (probiyotik uygulama) yüksek adezyon yeteneği gösterdiği belirlenmiş ve bu suşun L-EPS'sinin ve kültür filtratının da ortama ilavesiyle (sinbiyotik uygulamalar) adezyon yeteneğinin arttığı, bu artışta da kültür filtratının, L-EPS'ye göre öne çıktığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla prebiyotik olarak kullanılma potansiyeline sahip L-EPS ve kültür filtratının hücreye adezyon oranını artırdığı çıkarımı yapılabilmektedir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde aşağıdaki öneriler elde edilmiştir.

1. EPS moleküllerinin yapısal özellikleri, biyolojik aktivitelerini etkilediği gibi teknolojik uygulama alanlarını da belirlemektedir. Bu nedenle, yeni bir EPS'nin kimyasal

bileşiminin ve yapısının aydınlatılması, potansiyel uygulamalarının belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Yapılan literatür taramalarında EPS'nin yapısında glukoz, galaktoz, mannoz ve ramnoz monomerlerinin birlikte bulunmasının, EPS'nin biyolojik aktivitesini olumlu yönde etkilediği belirlenmiş ve bu tez çalışmasında kullanılan suşlara ait EPS'lerin yapısında da bu 4 monomerin birlikte bulunması bir avantaj olarak görülerek yem sanayisinde kullanılabileceği düşünülmüştür.

2. Biyofilm enfeksiyonları oldukça tehlikeli sonuçlara neden olabildiğinden bir tedavi bulmak ve antibiyofilm ajan geliştirmek son yıllarda popüler araştırma konuları arasındadır. Tez çalışması kapsamında elde edilen verilere göre, *L. salivarius* suşlarından elde edilen kültür filtratlarının antimikrobiyal ajan olarak kullanılma potansiyelinin bulunduğu, EPS'lerin ise anti-quorum sensing ajan olarak kullanılabileceği görülmüş ve bu etkilerle biyofilm inhibisyonu oluşturabildikleri belirlenmiştir. Dolayısıyla *L. salivarius* suşlarından elde edilen kültür filtratlarının ve EPS'lerin bu etkilerle antibiyofilm ajan olarak kullanılabileceği öngörülmüştür.
3. Sonuç olarak *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından elde edilen kültür filtratlarının ve EPS'lerin yukarıda bahsedilen etkilerle, tavuk endüstrisinde ticari prebiyotik olarak kullanılan inüline kıyasla daha iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Bunun yanında EPS'lerin, hücrelere adezyon kapasitesini artırdığı tez çalışmasında belirlenmiş ve literatürlerle de desteklenmiştir. Bu sebeplerle tavuk endüstrisinde yem katkı maddesi olarak kullanılmasının avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Suşlardan elde edilen kültür filtratlarının ve EPS'lerin tavuk beslenmesinde prebiyotik katkı olarak önerilebilmesi konusunda kesin bir yargıya varabilmek için bu konuda daha fazla çalışma yapılması ve yapılan çalışmaların hayvan denemeleri ile desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Aarti, C., Khusro, A., Varghese, R., Arasu, M. V., Agastian, P., Al-Dhabi, N. A., Ilavenil, S., and Choi, K. C. (2018). *In vitro* investigation on probiotic, anti-Candida, and antibiofilm properties of *Lactobacillus pentosus* strain LAP1. *Archives of Oral Biology*, 89, 99-106.
- Abudabos, A. M., Al-Batshan, H. A., and Murshed, M. A. (2015). Effects of prebiotics and probiotics on the performance and bacterial colonization of broiler chickens. *South African Journal of Animal Science*, 45(4), 419-428.
- Agboola, A. F., Omidwura, B. R. O., Odu, O., Popoola, I. O., and Iyayi, E. A. (2015). Effects of organic acid and probiotic on performance and gut morphology in broiler chickens. *South African Journal of Animal Science*, 45(5), 494-501.
- Ahmed, Z., Vohra, M. S., Khan, M. N., Ahmed, A., and Khan, T. A. (2019). Antimicrobial role of *Lactobacillus* species as potential probiotics against enteropathogenic bacteria in chickens. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 13(2), 130-136.
- Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A. M., Takagi, A., and Koga, Y. (1998). Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *The American Journal of Gastroenterology*, 93(11), 2097-2101.
- Akan, E. ve Kınık, Ö., (2015). Gıda üretimi ve depolanması sırasında probiyotiklerin canlılıklarını etkileyen faktörler. *CBÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 11(2), 155-166.
- Alataş, M.S., Gürbüz, E. ve Balevi, T. (2010). Yumurta tavuklarında pik dönemde frukto-oligosakkaritin verim performansı üzerine etkisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 5(3), 121-127.
- Alloui, M. N., Szczurek, W., and Świątkiewicz, S. (2013). The usefulness of prebiotics and probiotics in modern poultry nutrition: A review. *Annals of Animal Science*, 13(1), 17-32.
- Anandharaj, M., Sivasankari, B., and Parveen Rani, R. (2014). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on hypercholesterolemia: a review. *Chinese Journal of Biology*, 2014, 1-7.
- Apajalahti, J., Kettunen, A., and Graham, H. (2004). Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poultry Science Journal*, 60(2), 223-232.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati, M., Donati, E., and Montanaro, L. (2002). Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. *Biomaterials*, 23(21), 4233-4239.
- Arnold, J. W., and Silvers, S. (2000). Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation. *Poultry Science*, 79(8), 1215-1221.

- Aslim, B., Yuksekdog, Z. N., Sarikaya, E., and Beyatli, Y. (2005). Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT - Food Science and Technology*, 38(6), 691-694.
- Aşan, M. ve Özcan, N. (2006). Kanatlı beslemede inulinin prebiyotik olarak önemi. *Hayvansal Üretim*, 47(2), 48-53.
- Awad, W. A., Ghareeb, K., Abdel-Raheem, S., and Böhm, J. (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*, 88(1), 49-56.
- Badel, S., Bernardi, T., and Michaud, P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29(1), 54-66.
- Bai, K., Huang, Q., Zhang, J., He, J., Zhang, L., and Wang, T. (2016). Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of broiler chickens. *Poultry Science*, 96(1), 74-82.
- Balaban, N., Giacometti, A., Cirioni, O., Gov, Y., Ghiselli, R., Mocchegiani, F., Viticchi, C., Del Prete, M., S., Saba, V., Scalise, G., and Dell'Acqua, G. (2003). Use of the quorum-sensing inhibitor RNAIII-inhibiting peptide to prevent biofilm formation *in vivo* by drug-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 187(4), 625-630.
- Baldwin, S., Hughes, R. J., Van, T. T. H., Moore, R. J., and Stanley, D. (2018). At-hatch administration of probiotic to chickens can introduce beneficial changes in gut microbiota. *Plos One*, 13(3), 1-14.
- Baruah, R., Das, D., and Goyal, A. (2016). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria: current trends and applications. *Journal of Probiotics and Health*, 4(141), 2-6.
- Beganović, J., Frece, J., Kos, B., Pavunc, A. L., Habjanič, K., and Šušković, J. (2011). Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100(1), 43-53.
- Bello, F. D., Walter, J., Hertel, C., and Hammes, W. P., (2001). *In vitro* study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from Lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(2), 232-237.
- Benkeblia, N., and Wiley, J. (Eds.). (2017). *Phytonutritional improvement of crops*. Wiley Blackwell. 90.
- Boonaert, C. J., and Rouxhet, P. G. (2000). Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2548-2554.
- Bounaix, M. S., Gabriel, V., Morel, S., Robert, H., Rabier, P., Remaud-Siméon, M., Gabriel, B., and Fontagné-Faucher, C. (2009). Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10890.

- Brackman, G., and Coenye, T. (2015). Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Current Pharmaceutical Design*, 21(1), 5-11.
- Bunkoed, O., and Thaniyavarn, S. (2014). *Isolation of exopolysaccharides producing-lactic acid bacteria for fermented milks products*. In the 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference-TSB2014, 360-366.
- Cámara, M. (2006, July). Quorum sensing: a cell-cell signalling mechanism used to coordinate behavioral changes in bacterial populations. *International Workshop on Membrane Computing*. Springer, Berlin, Heidelberg, 42-48.
- Camilli, A., and Bassler, B. L. (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 311(5764), 1113-1116.
- Chaieb, K., Kouidhi, B., Jrah, H., Mahdouani, K., and Bakhrouf, A. (2011). Antibacterial activity of Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(1), 29.
- Charalampopoulos, D., and Rastall, R. A. (Editors). (2009). *Prebiotics and Probiotics Science and Technology* (Vol. 1), New York: Springer.
- Chaveerach, P., Lipman, L. J. A., and Van Knapen, F. (2004). Antagonistic activities of several bacteria on *in vitro* growth of 10 strains of *Campylobacter jejuni/coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 90(1), 43-50.
- Chaves, B. D., Brashears, M. M., and Nightingale, K. K. (2017). Applications and safety considerations of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in animal and human health. *Journal of Applied Microbiology*, 123(1), 18-28.
- Chen, F., Zhu, L., and Qiu, H. (2017). Isolation and probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* and *Pediococcus pentosaceus* in specific pathogen free chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 19(2), 325-332.
- Chen, T. C. (2003a). Effect of adding chicory fructans in feed on fecal and intestinal microflora and excreta volatile ammonia. *International Journal of Poultry Science*, 2(3), 188-194.
- Chen, T. C. (2003b). Effect of adding chicory fructans in feed on broiler growth performance, serum cholesterol and intestinal length. *International Journal of Poultry Science*, 2(3), 214-219.
- Chen, Y. C., Nakthong, C., and Chen, T. C. (2005). Improvement of laying hen performance by dietary prebiotic chicory oligofructose and inulin. *International Journal of Poultry Science*, 4(2), 103-108.
- Choct, M. (2009). Managing gut health through nutrition. *British Poultry Science*, 50(1), 9-15.
- Choo, J. H., Rukayadi, Y., and Hwang, J. K. (2006). Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Letters in Applied Microbiology*, 42(6), 637-641.

- Cleary, J. A., Kelly, G. E., and Husband, A. J. (1999). The effect of molecular weight and β -1, 6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1, 3)- β -D-glucan. *Immunology and Cell Biology*, 77(5), 395-403.
- Cody, W. L., Wilson, J. W., Hendrixson, D. R., McIver, K. S., Hagman, K. E., Ott, C. M., Nickerson C. A., and Schurr, M. J. (2008). Skim milk enhances the preservation of thawed -80 °C bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods*, 75(1), 135-138.
- Coşkun, T. (2006). Pro-, pre- ve sinbiyotikler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 49(2), 128-148.
- Courvalin, P. (2006). Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics. *Digestive and Liver Disease*, 38(2), 261-265.
- Crittenden, R. A., and Playne, M. (1996). Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology*, 7(11), 353-361.
- Czaczyk, K., and Myszka, K. (2007). Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(6), 799-806.
- Çabuk, M., Bozkurt, M., Alçiçek, A., Çatlı, A. U., and Başer, K. H. C. (2006). The effect of a mixture of herbal essential oils, a mannan oligosaccharide or an antibiotic on performance of laying hens under hot climatic conditions. *South African Journal of Animal Science*, 36(2), 135-141.
- Dabés, A. C., Santos, W. L. M., and Pereira, E. M. (2001). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from meat products against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53(1), 136-140.
- de Kievit, T. R., and Iglewski, B. H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity*, 68(9), 4839-4849.
- de Palencia, P. F., Werning, M. L., Sierra-Filardi, E., Dueñas, M. T., Irastorza, A., Corbí, A. L., and López, P. (2009). Probiotic properties of the 2-substituted (1, 3)- β -D-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14), 4887-4891.
- de Roos, N. M., and Katan, M. B. (2000). Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(2), 405-411.
- de Valdez, G. F., de Giori, G. S., de Ruiz Holgado, A. P., and Oliver, G. (1985). Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(2), 413-415.
- de Vuyst, L., and Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2), 153-177.

- Dec, M., Puchalski, A., Nowaczek, A., and Wernicki, A. (2016). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* strains of chicken origin against bacterial pathogens. *International Microbiology*, 19, 57-67.
- Demir, C. (2014). Investigate nasal colonize *Staphylococcus* species biofilm produced. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 6(100), 414-418.
- Dhama, K., Verma, V., Sawant, P. M., Tiwari, R., Vaid, R. K., and Chauhan, R. S. (2011). Applications of probiotics in poultry: Enhancing immunity and beneficial effects on production performances and health: A review. *Journal of Immunology and Immunopathology*, 13(1), 1-19.
- Di Gioia, D., and Biavati, B. (2018). Probiotics and prebiotics in animal health and food safety: Conclusive remarks and future perspectives. *In Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety*, Springer, Cham, 269-273.
- Dibaji, S. M., Seidavi, A., Asadpour, L., and Moreira da Silva, F. (2014). Effect of a synbiotic on the intestinal microflora of chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 23(1), 1-6.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 8(9), 881-90.
- Duboc, P., and Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11(9), 759-768.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F., and Collins, J. K. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 386-392.
- Durlu-Özkaya, F., Aslim, B., and Ozkaya, M. T. (2007). Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 40(3), 564-568.
- Elisashvili, V. I., Kachlishvili, E. T., and Wasser, S. P. (2009). Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45(5), 531-535.
- Ergün, A., Yalcin, S., and Sacakli, P. (2000). The usage of probiotic and zinc bacitracin in broiler rations. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 47(3), 271-280.
- FAO/WHO (2001). *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. American Córdoba Park Hotel, Córdoba, Argentina, 1-34.

- Feng, Y., Gong, J., Yu, H., Jin, Y., Zhu, J., and Han, Y. (2010). Identification of changes in the composition of ileal bacterial microbiota of broiler chickens infected with *Clostridium perfringens*. *Veterinary Microbiology*, 140(1-2), 116-121.
- Ferreira, C. L., Salminen, S., Grzeskowiak, L., Brizuela, M. A., Sanchez, L., Carneiro, H., and Bonnet, M. (2011). Terminology concepts of probiotic and prebiotic and their role in human and animal health. *Revista de Salud Animal*, 33(3), 137-146.
- Flemming, H. C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A. and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575.
- Flickinger, E. A., and Fahey, G. C. (2002). Pet food and feed applications of inulin, oligofructose and other oligosaccharides. *British Journal of Nutrition*, 87(2), 297-300.
- Francolini, I., and Donelli, G. (2010). Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(3), 227-238.
- Free, R. H., Elving, G. J., Van Weissenbruch, R., Busscher, H. J., Van Der Mei, H. C., and Albers, F. W. (2001). Biofilm formation on voice prostheses: *in vitro* influence of probiotics. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*, 110(10), 946-951.
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., and Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(8), 872-874.
- Frizzo, L. S., Zbrun, M. V., Soto, L. P., and Signorini, M. L. (2011). Effects of probiotics on growth performance in young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Animal Feed Science and Technology*, 169(3-4), 147-156.
- Fuller, R. (1973). Ecological studies on the lactobacillus flora associated with the crop epithelium of the fowl. *Journal of Applied Bacteriology*, 36(1), 131-139.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Microbiology*, 66(5), 365-378.
- Fuller, R. (2004). What is a probiotic? *Biologist*, 51(4), 232.
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., and Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1), 34-40.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., and Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141(31), 15-28.
- Gallaher, D. D., and Khil, J. (1999). The effect of synbiotics on colon carcinogenesis in rats. *The Journal of Nutrition*, 129(7), 1483-1487.

- Garde, C., Welch, M., Ferkinghoff-Borg, J., and Sams, T. (2015). Microbial biofilm as a smart material. *Sensors*, 15(2), 4229-4241.
- Getachew, T. (2016). A review on effects of probiotic supplementation in poultry performance and cholesterol levels of egg and meat. *Journal of World's Poultry Research*, 6(1), 31-36.
- Gevers, D., Huys, G., and Swings, J. (2003). *In vitro* conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 225(1), 125-130.
- Gibson, G. R., and Fuller, R. (2000). Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *The Journal of Nutrition*, 130(2), 391-395.
- Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., and Reid, G., (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(8), 491.
- Gibson, G. R., Ottaway, P. B., and Rastall, R. (2000). *Prebiotics: New Developments in Functional Foods*. Chandos.
- Gong, J., Si, W., Forster, R. J., Huang, R., Yu, H., Yin, Y., Yang, C., and Han, Y. (2007). 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(1), 147-157.
- Górska, S., Jachymek, W., Rybka, J., Strus, M., Heczko, P. B., and Gamian, A. (2010). Structural and immunochemical studies of neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus johnsonii* 142. *Carbohydrate Research*, 345(1), 108-114.
- Guarner, F., and Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356), 512-519.
- Guglielmetti, S., Taverniti, V., Minuzzo, M., Arioli, S., Stuknyte, M., Karp, M., and Mora, D. (2010). Oral bacteria as potential probiotics for the pharyngeal mucosa. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 3948-3958.
- Gupta, A., and Sharma, N. (2015). Assessment of cell surface properties and adhesion potential of lactic acid bacteria isolated from Lasoda bari-A rare fermented food of Himachal Pradesh. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*. 3(8), 9-15.
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., and Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, 198(1), 1-15.

- Gusils, C., Oppezzo, O., Pizarro, R., and Gonzalez, S. (2003). Adhesion of probiotic lactobacilli to chick intestinal mucus. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(7), 472-478.
- Güçlü, B. K. ve Kara, K. (2009). Ruminant beslemede alternatif yem katkı maddelerinin kullanımı: 1. Probiyotik, prebiyotik ve enzim. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 65-75.
- Gün, İ., and Ekinci, F. Y. (2009). Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda/The Journal of Food*, 34(3) 165-173.
- Gürgün, H. ve Halkman, A. K. (1990). *Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri* (İkinci Baskı). Türkiye: Gıda Teknolojisi Derneği, 7-20.
- Gürsoy, O., Özel, S., Özbaş, H. ve Çon, A. H. (2011). Kolesterol seviyesinin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda düşürülmesinde probiyotik mikroorganizmaların etkisi. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 37-45.
- Hadiakhoondi, F., Ostad, S. N., Khanavi, M., Hadiakhoondi, A., Farahanikia, B., and Salarytabar, A. (2013). Cytotoxicity of Two Species of *Glaucium* from Iran. *Journal Medicinal Plant*, 12(45), 85-92.
- Hall-Stoodley, L., and Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*, 11(7), 1034-1043.
- Hamasalim, H. J. (2016). Synbiotic as feed additives relating to animal health and performance. *Advances in Microbiology*, 6(4), 288-302.
- Harrigan W. F., and McCance M., E. (1976). *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Academic Pres, London, 425.
- Haspolat, I. (2012). Genetiği değiştirilmiş organizmalar ve biyogüvenlik. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 59, 75-80.
- Hassanein, S. M., and Soliman, N. K. (2010). Effect of probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) adding to diets on intestinal microflora and performance of Hy-Line layers hens. *Journal of American Science*, 6(11), 159-169.
- Herasimenka, Y., Cescutti, P., Impallomeni, G., and Rizzo, R. (2007). Exopolysaccharides produced by *Inquilinus limosus*, a new pathogen of cystic fibrosis patients: novel structures with usual components. *Carbohydrate Research*, 342(16), 2404-2415.
- Herreros, M. A., Sandoval, H., González, L., Castro, J. M., Fresno, J. M., and Tornadijo, M. E. (2005). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology*, 22(5), 455-459.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., and Schillinger, U. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 85-101.

- Hongpattarakere, T., Cherntong, N., Wichienchot, S., Kolida, S., and Rastall, R. A. (2012). *In vitro* prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 847.
- Hoseinifar, S. H., Mirvaghefi, A., Amoozegar, M. A., Merrifield, D. L., and Ringø, E. (2017). *In vitro* selection of a synbiotic and *in vivo* evaluation on intestinal microbiota, performance and physiological response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, 23(1), 111-118.
- Houshmand, M., Azhar, K., Zulkifli, I., Bejo, M. H., and Kamyab, A. (2012). Effects of prebiotic, protein level, and stocking density on performance, immunity, and stress indicators of broilers. *Poultry Science*, 91(2), 393-401.
- Idoui, T., and Karam, N. E. (2016). Effects of autochthonous probiotic feeding on performances, carcass traits, serum composition and faecal microflora of broiler chickens. *Sains Malaysiana*, 45(3), 347-353.
- Iji, P. A., and Tivey, D. R. (1999). *The use of oligosaccharides in broiler diets*. Proceedings of the 12th European Symposium on Poultry Nutrition. World's Poultry Science Association, Dutch Branch. August 15-19, Veldhoven, The Netherlands.
- Iliev, I., Ivanova, I., and Ignatova, C. (2006). Glucansucrases from lactic acid bacteria (LAB). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 20(3), 15-20.
- Irie, Y., and Parsek, M. R. (2008). Quorum sensing and microbial biofilms. *Bacterial Biofilms*, Springer, Berlin, Heidelberg, 67-84.
- Ismail, B., and Nampoothiri, K. M. (2010). Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Archives of Microbiology*, 192(12), 1049-1057.
- Jacobsen, C. N., Nielsen, V. R., Hayford, A. E., Møller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., B. Sandström, B., Tvede, M., and Jakobsen, M. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4949-4956.
- Jagani, S., Chelikani, R., and Kim, D. S. (2009). Effects of phenol and natural phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*, 25(4), 321-324.
- Jahromi, M. F., Altaher, Y. W., Shokryazdan, P., Ebrahimi, R., Ebrahimi, M., Idrus, Z., Tufarelli, V., and Liang, J. B. (2016). Dietary supplementation of a mixture of *Lactobacillus* strains enhances performance of broiler chickens raised under heat stress conditions. *International Journal of Biometeorology*, 60(7), 1099-1110.
- Jazi, V., Foroozandeh, A. D., Toghyani, M., Dastar, B., Rezaie Koochaksaraie, R., and Toghyani, M. (2018). Effects of *Pediococcus acidilactici*, mannan-oligosaccharide, butyric acid and their combination on growth performance and intestinal health in young broiler chickens challenged with *Salmonella* Typhimurium. *Poultry Science*, 97(6), 2034-2043.

- Jeurissen, S. H., Lewis, F., Mroz, Z., and Rebel, J. M. (2002). Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity, and functionality. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3(1), 1-14.
- Józefiak, D., Kaczmarek, S., and Rutkowski, A. (2008). A note on the effects of selected prebiotics on the performance and ileal microbiota of broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 17, 392-397.
- Kaiser, P., Rothwell, L., Galyov, E. E., Barrow, P. A., Burnside, J., and Wigley, P. (2000). Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. *Microbiology*, 146(12), 3217-3226.
- Kanmani, P., Suganya, K., Yuvaraj, N., Pattukumar, V., Paari, K. A., and Arul, V. (2013). Synthesis and functional characterization of antibiofilm exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecium* MC13 isolated from the gut of fish. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(3), 1001-1015.
- Kanmani, P., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., and Arul, V. (2011). Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity *in vitro*. *Bioresource Technology*, 102(7), 4828.
- Karademir, G. ve Karademir, B. (2003). Yem Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Biyoteknolojik Ürünler (Derleme). *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 43(1), 61-74.
- Kareem, K. Y., Loh, T. C., Foo, H. L., Akit, H., and Samsudin, A. A. (2016). Effects of dietary postbiotic and inulin on growth performance, IGF1 and GHR mRNA expression, faecal microbiota and volatile fatty acids in broilers. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 163.
- Karimi-Kivi, R., Dadashbeiki, M., and Seidavi, A. (2015). Growth, body characteristics and blood parameters of ostrich chickens receiving commercial probiotics. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 13(1), 0604.
- Kaur, S., Kaur, S., Sharma, P., Singh, J., and Kalia, N. (2018). Anti-biofilm properties of the faecal probiotic lactobacilli against *Vibrio* spp. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 120.
- Khalighi, A., Behdani, R., and Kouhestani, S. (2016). Probiotics: A comprehensive review of their classification, mode of action and role in human nutrition. *In Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. InTech.
- Khan, M., Anjum, A. A., Nawaz, M., Awan, A. R., and Ali, M. A. (2019). Effect of Newly Characterized Probiotic Lactobacilli on Weight Gain, Immunomodulation and Gut Microbiota of *Campylobacter jejuni* Challenged Broiler Chicken. *Pakistan Veterinary Journal*, 1-6.
- Khanh, T. B., Bich Thuy, D. B., and Thanh Thao, D. T. (2016). Optimal conditions for exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* T10. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 54(4A), 40.

- Kim, G. B., Seo, Y. M., Kim, C. H., and Paik, I. K. (2011). Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poultry Science*, 90(1), 75-82.
- Kim, Y. A., Keogh, J. B., and Clifton, P. M. (2018). Probiotics, prebiotics, synbiotics and insulin sensitivity. *Nutrition Research Reviews*, 31(1), 35-51.
- Kim, Y., Oh, S., and Kim, S. H. (2009). Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2), 324-329.
- Kizerwetter-Swida, M., and Binek, M. (2005). Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. *Polish journal of microbiology*, 54(4), 287-294.
- Kleerebezem, M., and Hugenholtz, J. (2003). Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(2), 232-237.
- Koohestani, M., Moradi, M., Tajik, H., and Badali, A. (2018). Effects of cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Lactobacillus casei* 431 against planktonic form and biofilm of *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Research Forum*, 9(4), 301-306.
- Korakli, M., Gänzle, M.G., and Vogel, R.F. (2002). Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 958-965.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., and Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3-13.
- Kutlu, H. R. ve Şahin, A. (2017). Kanatlı beslemede güncel çalışmalar ve gelecek için öneriler. *Hayvansal Üretim*, 58(2), 58-65.
- Kutlu, Ö. ve Özen, N. (2009). *Hayvan Beslemede Son Gelişmeler*, 6. Ulusal Zootečni Bilim Kongresi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, Erzurum, Tubitak, 15-50.
- Laws, A., Gu, Y., and Marshall, V. (2001). Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 19(8), 597-625.
- Ledezma, O. E. V., Méndez, H. I. P., Maldonado, L. Á., Manjarrez, E. T. Q. C., Alvarez, N. M., and López-Luna, A. (2016). Characterization of extracellular polymeric substances (EPS) produced by marine *Micromonospora* sp. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(7), 442-451.
- Lee, Y. J., Yu, W. K., and Heo, T. R. (2003). Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species isolated from healthy infant faeces. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21(4), 340-346.

- Li, S., Xiong, Q., Lai, X., Li, X., Wan, M., Zhang, J., Yan, Y., Cao, M., Lu, L., Guan, J., Zhang, D., and Lin, Y. (2016). Molecular modification of polysaccharides and resulting bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 237-250.
- Li, W., Xia, X., Tang, W., Ji, J., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., Zhou, J., Zhang, Q., and Dong, M. (2015). Structural characterization and anticancer activity of cell-bound exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(13), 3454-3463.
- Liu, C. T., Hsu, I. T., Chou, C. C., Lo, P. R., and Yu, R. C. (2009). Exopolysaccharide production of *Lactobacillus salivarius* BCRC 14759 and *Bifidobacterium bifidum* BCRC 14615. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(5), 883-890.
- Looijesteijn, P. J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T., and Hugenholtz, J. (2001). Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1-2), 71-80.
- López, D., Vlamakis, H., and Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(7), 1-11.
- Low, K. E., and Howell, P. L. (2018). Gram-negative synthase-dependent exopolysaccharide biosynthetic machines. *Current Opinion in Structural Biology*, 53, 32-44.
- Lynch, K. M., Zannini, E., Coffey, A., and Arendt, E. K. (2018). Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: Isolation, properties, characterization, and health benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 155-176.
- Lyon, G. J., and Muir, T. W. (2003). Chemical signaling among bacteria and its inhibition. *Chemistry and Biology*, 10(11), 1007-1021.
- Macfarlane, S. (2008). Microbial biofilm communities in the gastrointestinal tract. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 42, 142-143.
- Mahfuz, S. U., Nahar, M. J., Mo, C., Ganfu, Z., Zhongjun, L., and Hui, S. (2017). Inclusion of probiotic on chicken performance and immunity: A review. *International Journal of Poultry Science*, 16, 328-35.
- Manning, T. S., and Gibson, G. R. (2004). Prebiotics. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), 287-298.
- Marshall, V. M., and Rawson, H. L. (1999). Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 34(2), 138-139.
- McClean, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G. S., and Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143(12), 3703-3711.

- Meral, H. ve Korukluoğlu, M. (2014). Laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç mekanizmaları. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2), 71-82.
- Mercan, E., İspirli, H., Sert, D., Yılmaz, M. T., and Dertli, E. (2015). Impact of exopolysaccharide production on functional properties of some *Lactobacillus salivarius* strains. *Archives of Microbiology*, 197(9), 1041-1049.
- Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J. M., and Dousset, X. (2013). *Lactobacillus salivarius*: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology*, 36(2), 296-304.
- Miller, M. B., and Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 165-199.
- Mookiah, S., Sieo, C. C., Ramasamy, K., Abdullah, N., and Ho, Y. W. (2014). Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(2), 341-348.
- Moriello, V. S., Lama, L., Poli, A., Gugliandolo, C., Maugeri, T. L., Gambacorta, A., and Nicolaus, B. (2003). Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in flegrean areas. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(2), 95-101.
- Muñoz-Provencio, D., Llopis, M., Antolín, M., De Torres, I., Guarner, F., Pérez-Martínez, G., and Monedero, V. (2009). Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. *Archives of Microbiology*, 191(2), 153-161.
- Murshed, M. A., and Abudabos, A. M. (2015). Effects of the dietary inclusion of a probiotic, a prebiotic or their combinations on the growth performance of broiler chickens. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 17, 99-103.
- Nabizadeh, A. (2012). The effect of inulin on broiler chicken intestinal microflora, gut morphology, and performance. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 21(4), 725-734.
- Neal-McKinney, J. M., Lu, X., Duong, T., Larson, C. L., Call, D. R., Shah, D. H., and Konkel, M. E. (2012). Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. *Plos One*, 7(9), 1-11.
- Neville, B. A., and O'Toole, P. W. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* and closely related *Lactobacillus* species. *Future Microbiology*, 5(5), 759-774.
- Nikolic, M., López, P., Strahinic, I., Suárez, A., Kojic, M., Fernández-García, M., Topisirovic, L., Golic, N., and Ruas-Madiedo, P. (2012). Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 158(2), 155-162.
- Nousiainen, J. (1993). Lactic acid bacteria as animal probiotics. *Lactic Acid Bacteria*, 315-356.

- O'Toole, G., Kaplan, H. B., and Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54(1), 49-79.
- Onbaşlı, D., Çelik, G. Y. ve Ökçesiz, A. (2017). Mikrobiyal biyofilmlere karşı yeni antibiyofilm stratejileri ve nanoteknolojik yaklaşımlar. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 26(3), 262-266.
- Onbaşlı, D., Çelik, G. Y. ve Ökçesiz, A. (2017). Mikrobiyal biyofilmlere karşı yeni antibiyofilm stratejileri ve nanoteknolojik yaklaşımlar. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 26(3), 262-266.
- Ophir, T., and Gutnick, D. L. (1994). A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(2), 740-745.
- Otero, M. C., and Nader-Macías, M. E. (2007). *Lactobacillus* adhesion to epithelial cells from bovine vagina. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 20007, 749-757.
- Ouwehand, A. C., and Salminen, S. (2003). *In vitro* adhesion assays for probiotics and their *in vivo* relevance: a review. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 15(4), 175-184.
- Özener, H. Ö. ve Kuru, B. E. (2015). Probiyotiklerin periodontal tedavideki yeri. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 5(1), 53-64.
- Park, J. W., Jeong, J. S., Lee, S. I., and Kim, I. H. (2016). Effect of dietary supplementation with a probiotic (*Enterococcus faecium*) on production performance, excreta microflora, ammonia emission, and nutrient utilization in ISA brown laying hens. *Poultry Science*, 95(12), 2829-2835.
- Patterson, J. A., and Burkholder, K. M. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, 82(4), 627-631.
- Peebles, E. D. (2018). *In ovo* applications in poultry: A review. *Poultry Science*, 97(7), 2322-2338.
- Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M. J., Cerning, J., and Desmazeaud, M. (2000). Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3427-3431.
- Pfaller, M. A. (2006). Flavophospholipol use in animals: Positive implications for antimicrobial resistance based on its microbiologic properties. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56(2), 115-121.
- Polak-Berecka, M., Choma, A., Waśko, A., Górska, S., Gamian, A., and Cybulska, J. (2015). Physicochemical characterization of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* on various carbon sources. *Carbohydrate Polymers*, 117, 501-509.

- Poorghasemi, M., Chamani, M., Mirhosseini, S. Z., Sadeghi, A. A., and Seidavi, A. (2018). Effect of Probiotic and Different Sources of Fat on Performance, Carcass Characteristics, Intestinal Morphology and Ghrelin Gene Expression on Broiler Chickens. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(2), 169-178.
- Popescu, I., Pelin, I. M., Butnaru, M., Fundueanu, G., and Suflet, D. M. (2013). Phosphorylated curdlan microgels. Preparation, characterization, and *in vitro* drug release studies. *Carbohydrate Polymers*, 94(2), 889-898.
- Pourabedin, M., and Zhao, X. (2015). Prebiotics and gut microbiota in chickens. *FEMS Microbiology Letters*, 362(15), 1-14.
- Pourabedin, M., Guan, L., and Zhao, X. (2015). Xylo-oligosaccharides and virginiamycin differentially modulate gut microbial composition in chickens. *Microbiome*, 3(1), 15.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., and Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493-512.
- Rada, V., Dušková, D., Marounek, M., and Petr, J. (2001). Enrichment of Bifidobacteria in the hen caeca by dietary inulin. *Folia Microbiologica*, 46(1), 73-75.
- Ramage, G., Saville, S. P., Thomas, D. P., and Lopez-Ribot, J. L. (2005). Candida biofilms: an update. *Eukaryotic Cell*, 4(4), 633-638.
- Ramana, K., Xavier, J., and Sharma, R. (2017). Recent trends in pharmaceutical biotechnology. *Pharmaceutical Biotechnology: Current Research*, 1, 1-10.
- Rani, R. P., Anandharaj, M., and Ravindran, A. D. (2018). Characterization of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus gasseri* FR4 and demonstration of its *in vitro* biological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 772-783.
- Rastall, R. A., and Maitin, V. (2002). Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(5), 490-496.
- Rastall, R. A., Gibson, G. R., Gill, H. S., Guarner, F., Klaenhammer, T. R., Pot, B., Reid, G., Rowland, I. R., and Sanders, M. E. (2005). Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(2), 145-152.
- Reinheimer, J. A., Demkow, M. R., and Candioti, M. C. (1990). Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures. *Australian Journal of Dairy Technology*, 45(1), 5-9.
- Rendueles, O., Kaplan, J. B., and Ghigo, J. M. (2013). Antibiofilm polysaccharides. *Environmental Microbiology*, 15(2), 334-346.
- Rezzonico, F., and Duffy, B. (2008). Lack of genomic evidence of AI-2 receptors suggests a non-quorum sensing role for luxS in most bacteria. *BMC Microbiology*, 8(1), 154.

- Riaz Rajoka, M.S., Jin, M., Haobin, Z., Li, Q., Shao, D., Jiang, C., Huang, Q., Yang, H., Shi, J., and Hussain, N. (2018). Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 638-647.
- Roca, C., Alves, V. D., Freitas, F., and Reis, M. A. (2015). Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications. *Frontiers in microbiology*, 6, 288.
- Rodrigues, L., Van der Mei, H. C., Teixeira, J., and Oliveira, R. (2004). Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4408-4410.
- Roto, S. M., Rubinelli, P. M., and Ricke, S. C. (2015). An introduction to the avian gut microbiota and the effects of yeast-based prebiotic-type compounds as potential feed additives. *Frontiers in Veterinary Science*, 2, 28.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., and Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 163-171.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., and Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 1-16.
- Saari, P., Heikkilä, H., and Hurme, M. (2010). Adsorption equilibria of arabinose, fructose, galactose, glucose, mannose, rhamnose, sucrose, and xylose on ion-exchange resins. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 55(9), 3462-3467.
- Salazar, N., Prieto, A., Leal, J. A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J. C., and de los Reyes-Gavilan, C.G. (2009). Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. *Journal of Dairy Science*, 92, 4158-4168.
- Saminathan, M., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Abdullah, N., and Ho, Y. W. (2011). Effect of prebiotic oligosaccharides on growth of *Lactobacillus* strains used as a probiotic for chickens. *African Journal of Microbiology Research*, 5(1), 57-64.
- Sandasi, M., Leonard, C. M., and Viljoen, A. M. (2010). The *in vitro* antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 30-35.
- Santagati, M., Scillato, M., Patanè, F., Aiello, C., and Stefani, S. (2012). Bacteriocin-producing oral streptococci and inhibition of respiratory pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 65(1), 23-31.
- Santini, C., Baffoni, L., Gaggia, F., Granata, M., Gasbarri, R., Di Gioia, D., and Biavati, B. (2010). Characterization of probiotic strains: an application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 98-108.

- Sarıpınar, D., and Sulu, N. (2005). Ruminantlarda probiyotiklerin kullanımı ve rumene etkileri. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 11(1), 93-98.
- Sayem, S. A, Manzo, E., Ciavatta, L., Tramice, A., Cordone, A., Zanfardino A., De Felice M., and Varcamonti M. (2011). Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 74-80.
- Schachter, B. (2003). Slimy business—the biotechnology of biofilms. *Nature Biotechnology*, 21(4), 361.
- Schauder, S., and Bassler, B. L. (2001). The languages of bacteria. *Genes and Development*, 15(12), 1468-1480.
- Schmidt, B. M., Ilic, N., Poulev, A., and Raskin, I. (2007). Toxicological evaluation of a chicory root extract. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7), 1131-1139.
- Schrezenmeir, J., and de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 361-364.
- Schurr, M. J. (2013). Which bacterial biofilm exopolysaccharide is preferred, psl or alginate?. *Journal of Bacteriology*, 195(8), 1623-1626.
- Sekhon, B. S., and Jairath, S. (2010). Prebiotics, probiotics and synbiotics: an overview. *Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 1(2), 13.
- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), 405-440.
- Sezen, A. G. (2013). Prebiyotik, probiyotik ve sinbiyotiklerin insan ve hayvan sağlığı üzerine etkileri. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 8(3), 248-258.
- Sharma, R., Sharma, S., Shukla, P. C., Sharma, V., Baghel, R. P. S., Raikwar, A., Pradhan, S., and Yadav, V. (2018). Microbial and functional feed supplement to improve livestock and poultry productivity with special reference to synbiotics: A review. *The Pharma Innovation Journal*, 7(7), 62-68
- Shaufi, M. A. M., Sieo, C. C., Chong, C. W., Gan, H. M., and Ho, Y. W. (2015). Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut Pathogens*, 7(4), 1-12.
- Sheil, B., Shanahan, F., and O'mahony, L. (2007). Probiotic effects on inflammatory bowel disease. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 819-824.
- Shenderov, B. A. (2011). Probiotic (symbiotic) bacterial languages. *Anaerobe*, 17(6), 490-495.
- Shokryazdan, P, Jahromi, M. F., Liang, J. B., Ramasamy, K., Sieo, C. C., and Ho, Y. W. (2017). Effects of a *Lactobacillus salivarius* mixture on performance, intestinal health and serum lipids of broiler chickens. *Plos One*, 12(5), 1-20.

- Shori, A. B. (2017). Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(1), 1-5.
- Simões, M., Simões, L. C., and Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 573-583.
- Singh, R. S., Saini, G. K., and Kennedy, J. F. (2008). Pullulan: microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73(4), 515-531.
- Singla, V., and Chakkaravarthi, S. (2017). Applications of prebiotics in food industry: A review. *Food Science and Technology International*, 23(8), 649-667.
- Sornplang, P., Leelavatcharamas, V., and Soikum, C. (2015). Heterophil phagocytic activity stimulated by *Lactobacillus salivarius* L61 and L55 supplementation in broilers with *Salmonella* infection. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(11), 1657.
- Spring, P., Wenk, C., Dawson, K. A., and Newman, K. E. (2000). The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. *Poultry Science*, 79(2), 205-211.
- Stanley, D., Geier, M. S., Chen, H., Hughes, R. J., and Moore, R. J. (2015). Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences. *BMC Microbiology*, 15(1), 51.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., and Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-179.
- Strasser, S., Neureiter, M., Geppl, M., Braun, R., and Danner, H. (2009). Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 168.
- Sugiharto, S. (2016). Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(2), 99-111.
- Sun, L., Wang, L., and Zhou, Y. (2012). Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1206-1210.
- Suresh Kumar, A., Mody, K., and Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides—a perception. *Journal of Basic Microbiology*, 47(2), 103-117.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A. L., Habjanič, K., and Matošić, S. (2010). Antimicrobial activity--the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3).
- Tallon, R., Bressollier, P., and Urdaci, M. C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154(10), 705-712.

- Tang, S. G. H., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Saad, W. Z., Yong, S. T., Wong, H. K., and Ho, Y. W. (2015). Chemical compositions of egg yolks and egg quality of laying hens fed prebiotic, probiotic, and synbiotic diets. *Journal of Food Science*, 80(8), 1686-1695.
- Tang, W., Dong, M., Wang, W., Han, S., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., Zhang, Q., Wu, J., and Li, W. (2017). Structural characterization and antioxidant property of released exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SRFM-1. *Carbohydrate polymers*, 173, 654-664.
- Tokunaga, T. (2004). Novel physiological function of fructooligosaccharides. *Biofactors*, 21(1-4), 89-94.
- Torino, M. I., Mozzi, F., Sesma, F., and de Valdez, G. F. (2000). Effect of stirring on growth and phosphopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in milk. *Milchwissenschaft*, 55(4), 204-206.
- Trabelsi, I., Ktari, N., Slima, S. B., Triki, M., Bardaa, S., Mnif, H., and Salah, R. B. (2017). Evaluation of dermal wound healing activity and *in vitro* antibacterial and antioxidant activities of a new exopolysaccharide produced by *Lactobacillus* sp. Ca6. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 194-201.
- Tripathi, M. K., and Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225-241.
- Tsuda, H., Hara, K., and Miyamoto, T. (2008). Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* mutant strain 301102S. *Journal of Dairy Science*, 91, 2960-2966.
- Tuncer, İ. (2000). Kanatlı Rasyonlarında Probiyotik Kullanımı. *Çiftlik Dergisi*, 195, 39-42.
- Tunç, M. A. (2007). *Humatların koyunlarda rumen parametreleri ve bazı kan değerleri üzerine etkisi*. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniv Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Ana Bilim Dalı. 9.
- Tuohy, K. M., Probert, H. M., Smejkal, C. W., and Gibson, G. R. (2003). Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, 8(15), 692-700.
- Tükenmez, Ü. ve Aslım, B. (2018). Probiyotik kaynaklı, muhtemel prebiyotik özelliğe sahip ekzopolisakkarit (EPS)'lerin biyolojik ve fonksiyonel özellikleri. *Medical Journal of Suleyman Demirel University*, 25(4).
- Uymaz, B. (2010). Probiyotikler ve kullanım alanları. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 95-104.
- Ünal, E. ve Erginkaya, Z. (2010). Probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonu. *Gıda*, 35(4), 297-304.
- Üstündağ, A. Ö. ve Özdoğan, M. (2017). Kanatlı beslemede alterbiyotik kullanımı: probiyotikler, prebiyotikler, organik asitler ve bakteriyosinler. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences-Pharmacology and Toxicology-Special Topics*, 3(3), 225-240.

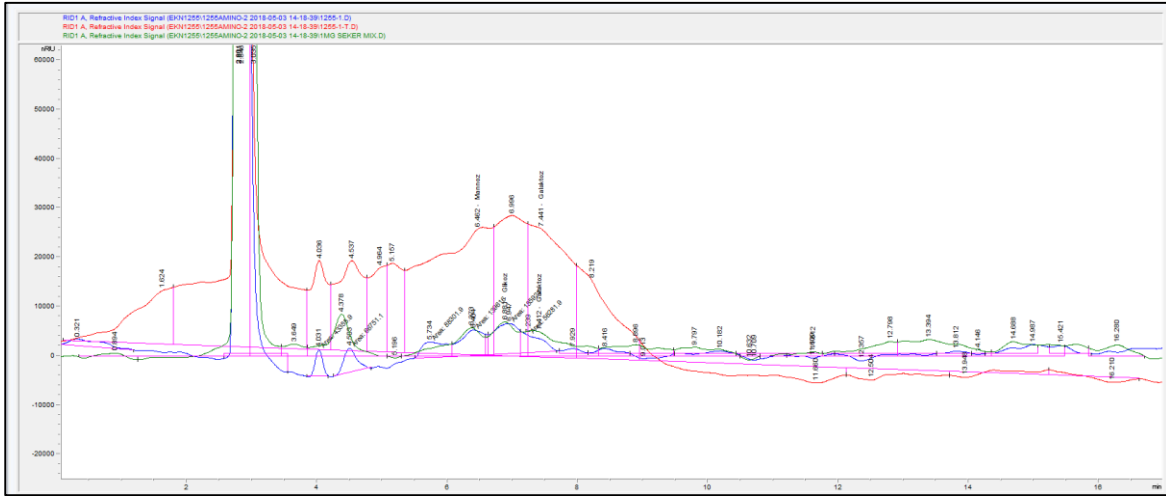
- van der Wielen, P. W., Biesterveld, S., Notermans, S., Hofstra, H., Urlings, B. A., and van Knapen, F. (2000). Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2536-2540.
- Van Loo, J. (2007). How chicory fructans contribute to zootechnical performance and well-being in livestock and companion animals. *The Journal of Nutrition*, 137(11), 2594-2597.
- Van Tassell, M. L., and Miller, M. J. (2011). *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients*, 3(5), 613-636.
- Vanbelle, M., Teller, E., and Focant, M. (1990). Probiotics in animal nutrition: a review. *Archives of Animal Nutrition*, 40(7), 543-567.
- Verdonk, J. M. A. J., Shim, S. B., Van Leeuwen, P., and Verstegen, M. W. A. (2005). Application of inulin-type fructans in animal feed and pet food. *British Journal of Nutrition*, 93(S1), 125-138.
- Videnska, P., Rahman, M. M., Faldynova, M., Babak, V., Matulova, M. E., Prukner-Radovicic, E., Krizek, I., Smole-Mozina, S., Kovac, J., Szmolka, A., Nagy, B., Sedlar, K., Cejkova, D., and Rychlik, I. (2014). Characterization of egg laying hen and broiler fecal microbiota in poultry farms in Croatia, Czech Republic, Hungary and Slovenia. *Plos One*, 9(10), 1-8.
- Wallace, W. H., Rice, J. F., White, D. C., and Sayler, G. S. (1994). Distribution of alginate genes in bacterial isolates from corroded metal surfaces. *Microbial Ecology*, 27(3), 213-223.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., and Yang, Z. (2015a). Characterization of an Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 Isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 125, 16-25.
- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., and Yang, Z. (2015b). Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 119-126.
- Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., and Bai, X. (2010). Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 895-903.
- Wei, S., Lilburn, M., and Yu, Z. (2016). The bacteriomes of ileal mucosa and cecal content of broiler chickens and turkeys as revealed by metagenomic analysis. *International Journal of Microbiology*, 2016, 1-11.
- Welman, A. D., and Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21(6), 269-274.
- Yadav, A. S., Kolluri, G., Gopi, M., Karthik, K., Malik, Y. S., and Dhama, K., (2016). Exploring alternatives to antibiotics as health promoting agents in poultry-A review. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 4(3S), 368-383.

- Yadav, M. K., Singh, B., and Tiwari, S. K. (2018). Comparative analysis of inhibition-based and indicator-independent colorimetric assay for screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-9.
- Yadav, S., and Jha, R. (2019). Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1), 2.
- Yalçınkaya, İ., Güngör, T., Başalan, M., and Erdem, E. (2008). Mannan oligosaccharides (MOS) from *Saccharomyces cerevisiae* in broilers: Effects on performance and blood biochemistry. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 32(1), 43-48.
- Yegani, M., and Korver, D. R. (2008). Factors affecting intestinal health in poultry. *Poultry Science*, 87(10), 2052-2063.
- Yeoman, C. J., Chia, N., Jeraldo, P., Sipos, M., Goldenfeld, N. D., and White, B. A. (2012). The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Animal Health Research Reviews*, 13(1), 89-99.
- Yılmaz-Yıldıran, H., Karahan, A. G., and Başığit-Kılıç, G. (2015). Laktik asit bakterilerinde çoğunluğu algılama mekanizması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72(1), 79-90.
- Yi, Y., Huang, W., and Ge, Y. (2008). Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 1061.
- Yoo, J., and Kim, S. (2016). Probiotics and prebiotics: present status and future perspectives on metabolic disorders. *Nutrients*, 8(3), 173.
- Yuksekdag, Z. N., Sahin, N., and Aslim, B. (2014). *In vitro* evaluation of the suitability potential probiotic of lactobacilli isolates from the gastrointestinal tract of chicken. *European Food Research and Technology*, 239(2), 313-320.
- Yuksekdag, Z.N., and Aslim, B. (2008). Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). *Brazilian archives of Biology and Technology*, 51(3), 581-585.
- Zhang, A. W., Lee, B. D., Lee, S. K., Lee, K. W., An, G. H., Song, K. B., and Lee, C. H. (2005). Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poultry Science*, 84(7), 1015-1021.
- Zivkovic, M., Miljkovic, M. S., Ruas-Madiedo, P., Markelic, M. B., Veljovic, K., Tolinacki, M., Sokovic, S., Korac, A., and Golic, N. (2016). EPS-SJ exopolisaccharide produced by the strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 is involved in adhesion to epithelial intestinal cells and decrease on E. coli association to Caco-2 cells. *Frontiers in microbiology*, 7, 286.

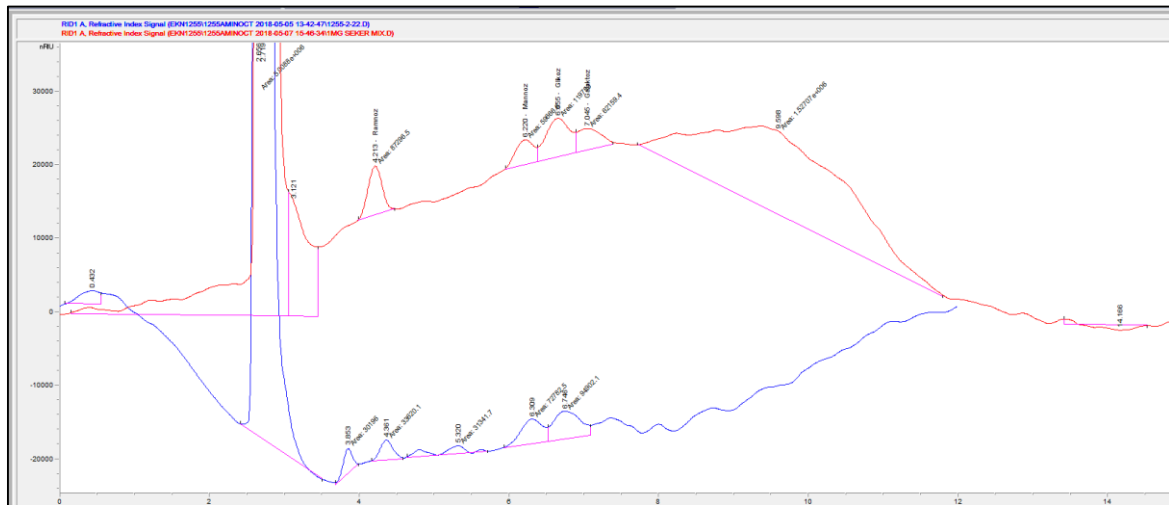
- Zivkovic, M., Miljkovic, M., Ruas-Madiedo, P., Strahinic, I., Tolinacki, M., Golic, N., and Kojic, M. (2015). Exopolysaccharide production and ropy phenotype are determined by two gene clusters in putative probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), 1387-1396.
- Zotta, T., Piraino, P., Parente, E., Salzano, G., and Ricciardi, A. (2008). Characterization of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs for *Cornetto*, a traditional bread produced in Basilicata (Southern Italy). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1785-1795.
- Zoumpopoulou, G., Pot, B., Tsakalidou, E., and Papadimitriou, K. (2017). Dairy probiotics: Beyond the role of promoting gut and immune health. *International Dairy Journal*, 67, 46-60.

EKLER

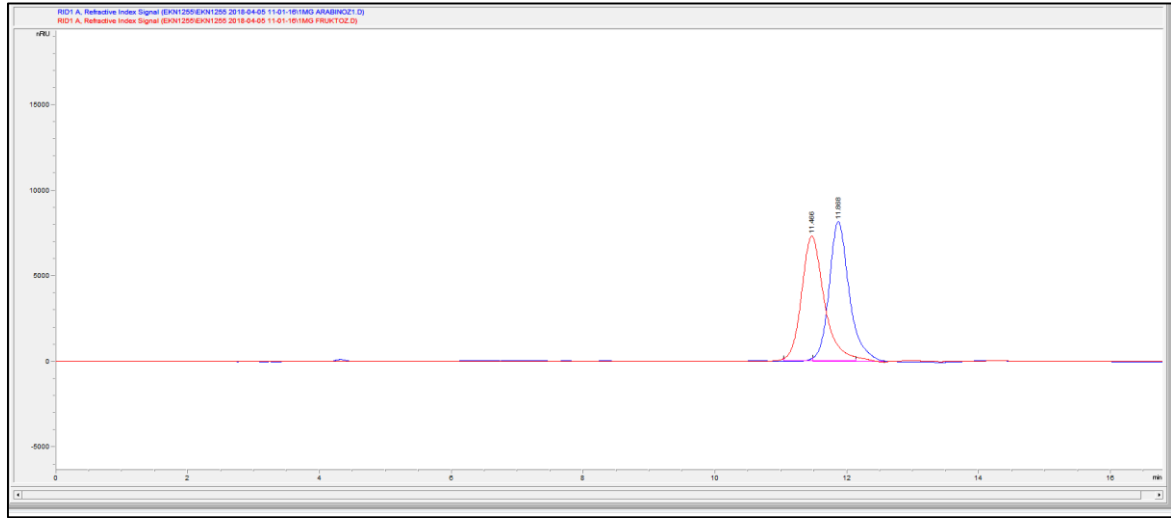
EK-1. (devam) L-EPS'lerin HPLC analiz sonuçları



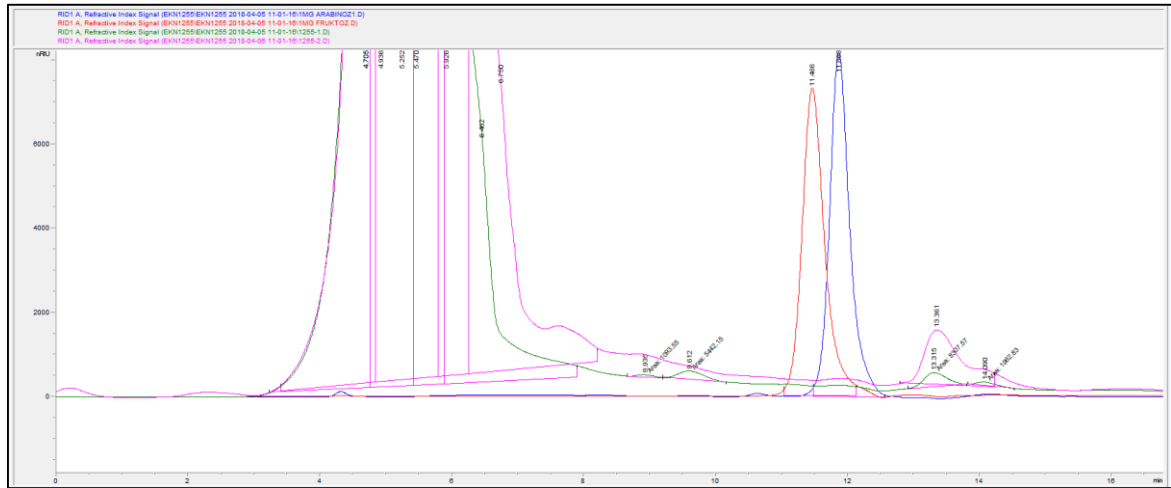
Şekil 1.4. *L. salivarius* BIS312 suşundan izole edilen L-EPS'lerin ve standart karışımın HPLC analizine ilişkin kromatogramlarının birlikte gösterimi (yeşil kromatogram: ramnoz, glukoz, mannoz ve galaktoz; mavi ve kırmızı kromatogramlar: BIS312 suşunun L-EPS'si)



EK-1. (devam) L-EPS'lerin HPLC analiz sonuçları



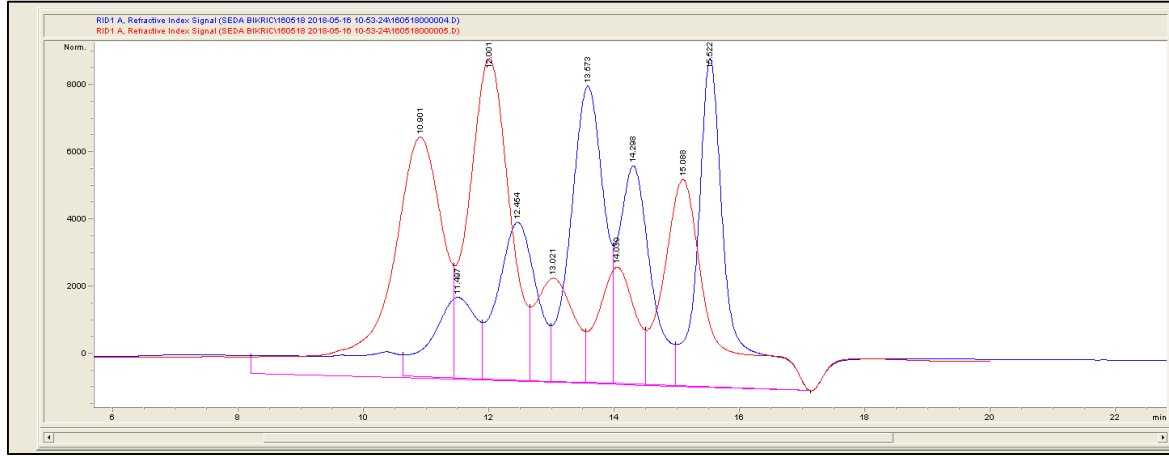
Şekil 1.6. 1 mg/mL oranlarında hazırlanmış arabinoz (mavi) ve fruktoz (kırmızı) şekerlerinin HPLC analizine ilişkin kromatogramları (Standart)



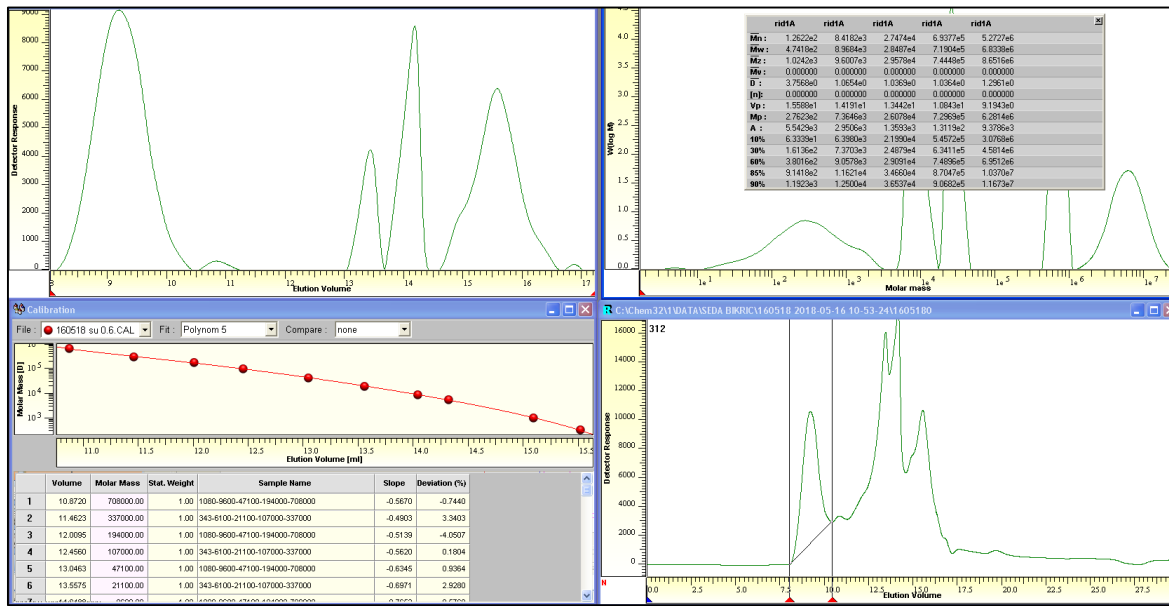
Şekil 1.7. *L. salivarius* BIS312 ve BIS722 suşlarından izole edilen L-EPS'lerin ve fruktoz ile arabinoz şekerlerinin HPLC analizine ilişkin kromatogramlarının birlikte gösterimi (mavi: arabinoz; kırmızı: fruktoz; yeşil: BIS312 suşunun L-EPS'si; pembe: BIS722 suşunun L-EPS'si)

Fruktoz ve arabinoz numunelerde tespit edilmemiştir.

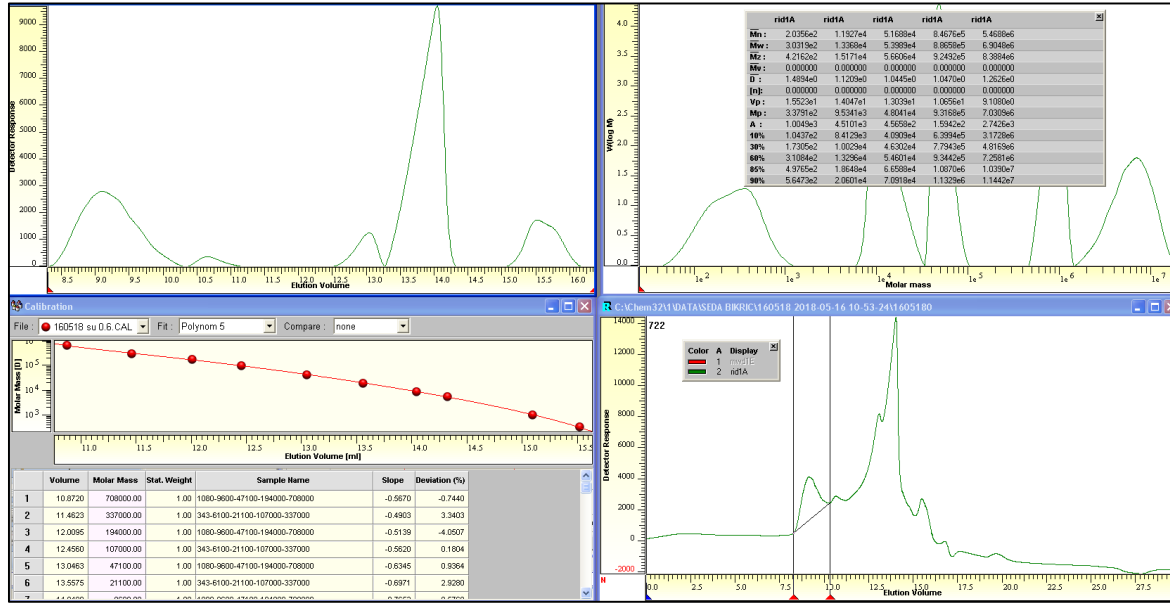
EK-2. L-EPS'lerin SEC analiz sonuçları



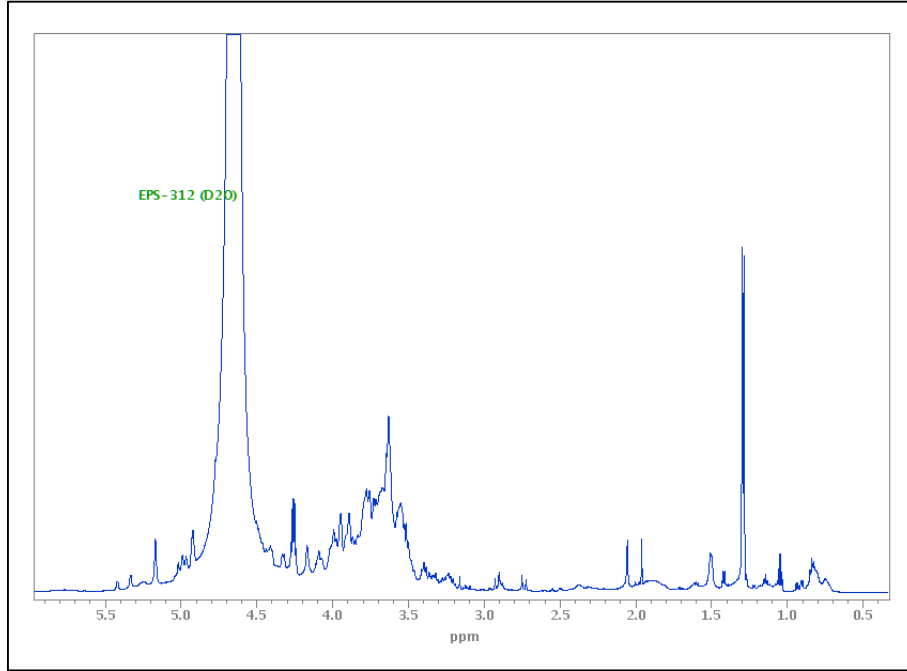
Şekil 2.1. SEC analizinde hazırlanan standarda ilişkin spektrumlar

Şekil 2.2. *L. salivarius* BIS312 suşundan izole edilen L-EPS'lerin SEC analizine ilişkin spektrumları

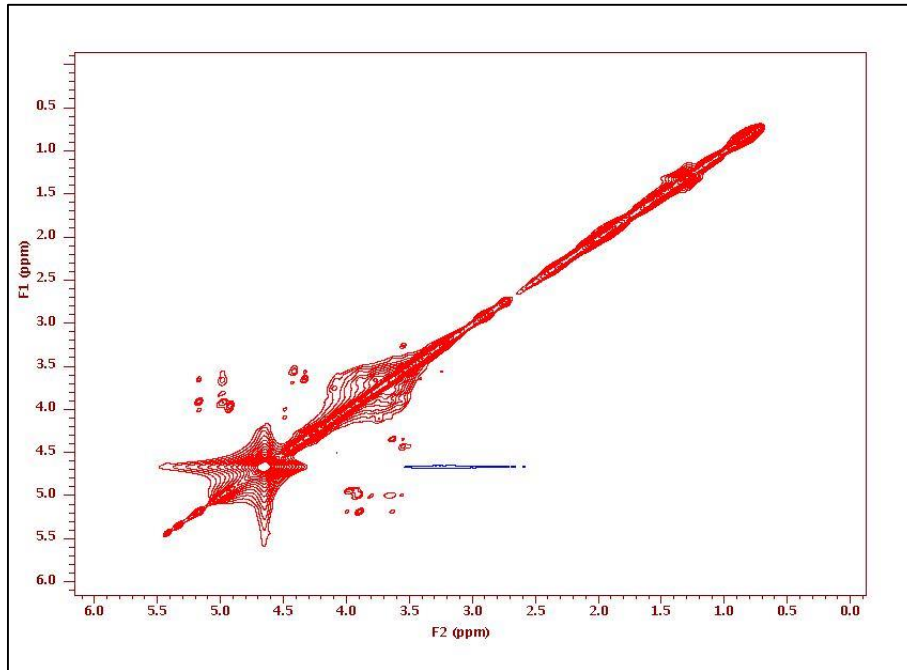
EK-2. (devam) L-EPS'lerin SEC analiz sonuçları

Şekil 2.3. *L. salivarius* BIS722 suşundan izole edilen L-EPS'lerin SEC analizine ilişkin spektrumları

EK-3. *L. salivarius* BIS312 suşundan izole edilen L-EPS'lerin NMR analiz sonuçları

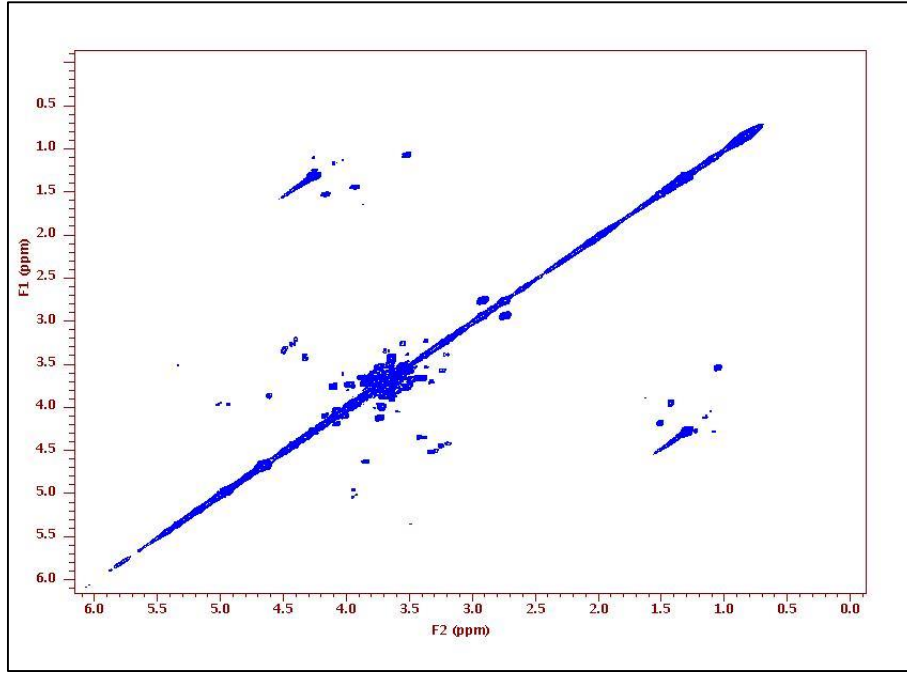


Şekil 3.1. *L. salivarius* BIS312 suşundan izole edilen L-EPS'lerin ^1H -NMR spektrumları

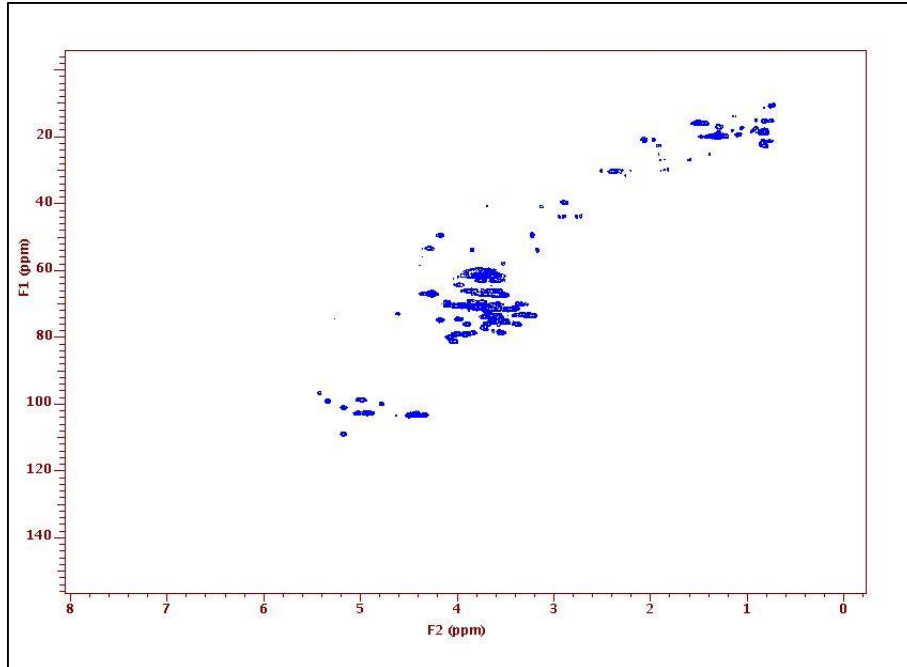


Şekil 3.2. *L. salivarius* BIS312 suşundan izole edilen L-EPS'lerin NOESY spektrumları

EK-3. (devam) *L. salivarius* BIS312 suşundan izole edilen L-EPS'lerin NMR analiz sonuçları

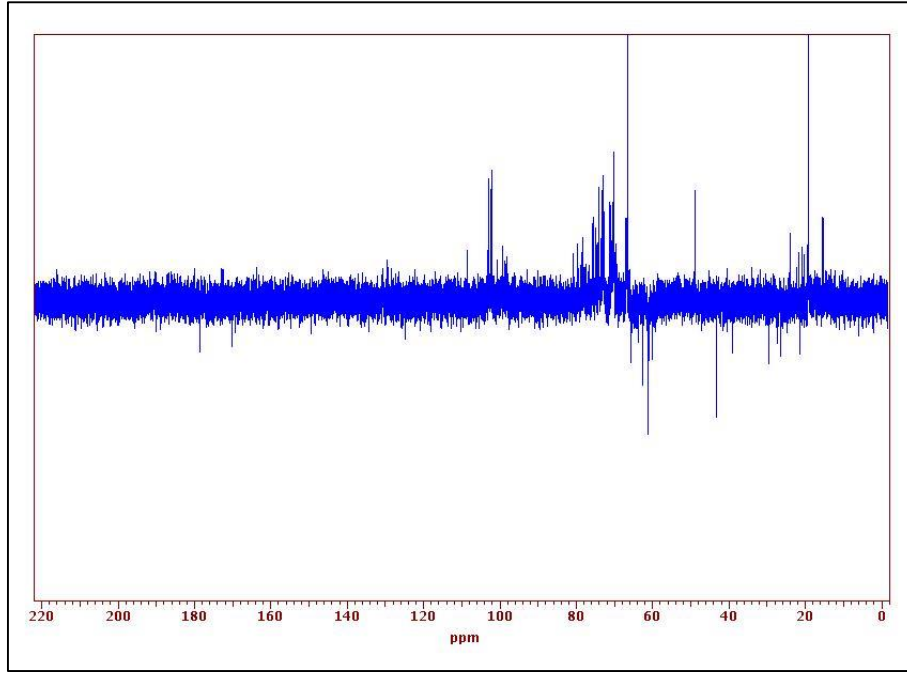


Şekil 3.3. *L. salivarius* BIS312 suşundan izole edilen L-EPS'lerin COSY spektrumları



Şekil 3.4. *L. salivarius* BIS312 suşundan izole edilen L-EPS'lerin HMQC spektrumları

EK-3. (devam) *L. salivarius* BIS312 suşundan izole edilen L-EPS'lerin NMR analiz sonuçları



Şekil 3.5. *L. salivarius* BIS312 suşundan izole edilen L-EPS'lerin ^{13}C -APT spektrumları

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : BİKRIÇ, Seda
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 30.08.1989, Ankara
 Medeni hali : Bekar
 e-posta : sedabikric@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	Devam Ediyor
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Bahçelievler Deneme Lisesi	2006

İş Deneyimleri

Yıl	Yer	Görev
2015- Halen	Eko-Zon Halk Sağlığı ve Çevre Danışmanlığı	Proje Müdürü
2013- 2015	Başkent Açı Dershanesi	Fen ve Teknoloji Öğretmeni

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Bikric, S., Aslim, B., Dincer, I., Yuksekdağ, Z. (2017, October 11-13). *Effect of carbon sources on exopolysaccharide production by Lactobacillus salivarius BIS312, BIS722, and ZDM2132 strains*, 2nd International Gazi Pharma Symposium, Faculty of Pharmacy, Gazi University, Ankara, 410.

Dincer, I., Aslim, B., Bikric, S., Yuksekdağ, Z., 2017. (2017, October 11-13). *Influence of different growth conditions due to nitrogen sources on exopolysaccharide production by 3 Lactobacillus salivarius strains*, 2nd International Gazi Pharma Symposium, Faculty of Pharmacy, Gazi University, Ankara, 409.

Hobiler

Amatör fotoğrafçılık, doğa yürüyüşleri, seyahat etmek.



GAZİ GELECEKTİR...