



**TAVUK DIŞKISINDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ
EKZOPOLİSAKKARİTLERİNİN ANTİOKSİDAN VE ANTİBİYOFİLM
AKTİVİTELERİ**

Kübra ÇELİK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KASIM 2018

Kübra ÇELİK tarafından hazırlanan “TAVUK DIŞKISINDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ EKZOPOLİSAKKARİTLERİNİN ANTİOKSİDAN VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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



Başkan: Prof. Dr. Belma ASLİM

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

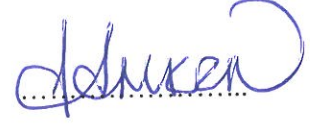
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Doç. Dr. Fadime KIRAN

Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

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



Tez Savunma Tarihi: 26/11/2018

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.

Kübra ÇELİK

26/11/2018

TAVUK DIŞKISINDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ EKZOPOLİSAKKARİTLERİNİN ANTİOKSİDAN VE ANTİBİYOFİLM

AKTİVİTELERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Kübra ÇELİK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kasım 2018

ÖZET

Bu çalışmada, Ankara ili ilçelerinden toplanan tavuk dışkılarından 44 laktik asit bakterisi izole edilmiş ve isolatların ekzopolisakkarit (EPS) üretim yetenekleri belirlenmiştir. Bakterilerin ürettikleri ekzopolisakkaritlerin prebiyotik olarak kullanılabilirliklerinin belirlenmesi amacıyla yüksek ve düşük EPS üretim kapasitesine sahip isolatlar seçilerek liyofilize EPS (l-EPS)'ler elde edilmiştir. Yüksek EPS üretimine sahip iki izolat (KC27L/KC66L) ile düşük EPS üretimine sahip iki izolatin (KC21L/KC76L) moleküler tanımlamaları yapılmıştır. En yüksek EPS üreticisi *Lactobacillus salivarius* KC27L suşundan elde edilen l-EPS'nin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Seçilen suşlara ait bakteri süspansiyonları, kültür filtratları, 0,5 ve 1 mg/mL l-EPS'leri ve bakteri+0,5 ve 1 mg/mL l-EPS'leri ve ticari bir prebiyotik olarak kullanılan inülinin (0,5 ve 1 mg/mL) (kontrol) antimikrobiyal, antibiyofilm ve antioksidan aktiviteleri tespit edilmiştir. Bakteri süspansiyonları, l-EPS'ler ve bakteri+l-EPS'lerde test edilen patojen bakterilere karşı herhangi bir antimikrobiyal aktiviteye rastlanmazken, en yüksek antimikrobiyal etkinin *L. salivarius* KC27L suşunun kültür filtratında *Staphylococcus aureus* EB1 patojenine (10 mm) karşı olduğu görülmüştür. En yüksek antibiyofilm etki, *L. salivarius* KC27L suşuna ait 1 mg/mL l-EPS'de *E. coli* ATCC 11229 üzerinde (%87 inhibisyon) gözlenmiştir. Üç farklı metot ile antioksidan aktivitenin belirlendiği çalışmada, en yüksek 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini giderme etkisinin *L. reuteri* KC21L suşunun 1 mg/mL l-EPS'sinde (%84,9), Fe⁺² iyonu şelatlama aktivitesinin *L. reuteri* KC21L suşunun bakteri süspansiyonu+1 mg/mL l-EPS'sinde (%76,3), süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitenin ise *L. salivarius* KC27L suşuna ait bakteri süspansiyonunda (%73,2) olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar neticesinde tavuk dışkısı kaynaklı laktobasillerin ürettikleri EPS'lerin tavuk yeminde prebiyotik olarak önerilmesi amaçlanmıştır.

Bilim Kodu : 20309

Anahtar Kelimeler : *Lactobacillus* spp., l-EPS, antimikrobiyal, antibiyofilm, antioksidan, prebiyotik

Sayfa Adedi : 87

Danışman : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

THE ANTIOXIDANT AND ANTIBIOFILM ACTIVITIES OF LACTIC ACID
BACTERIA EXOPOLISACCAHARIDES WHICH ARE ISOLATED FROM CHICKEN
FECES

(M. Sc. Thesis)

Kübra ÇELİK

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

November 2018

ABSTRACT

In this study, 44 lactic acid bacteria isolated from chicken feces collected from districts of Ankara and exopolysaccharide (EPS) production capabilities of isolates were determined. In order to determine the prebiotic availability of exopolysaccharides produced by bacteria, isolates with high and low EPSs production capacity were selected and lyophilized EPSs (1-EPSs) were obtained. Two isolates with high EPS production (KC27L/KC66L) and two isolates with low EPS production (KC21L/KC76L) were molecularly identified. Molecular characterization of 1-EPS obtained from the highest EPS producer *Lactobacillus salivarius* KC27L strain was performed. Antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant activities of the bacterial suspensions, culture filtrates, 1-EPSs (0.5-1 mg/mL), bacteria+1-EPSs (0.5-1 mg/mL) of the selected strains and inulin (0.5-1 mg/mL) were determined. The bacterial suspensions, culture filtrates, 1-EPSs and bacteria+1-EPSs of the strains did not inhibit the growth of all test bacteria while the highest antimicrobial activity of the culture filtrate of *L. salivarius* was 10 mm *S. aureus* EB1. The highest antibiofilm effect of 1 mg/mL 1-EPS of *L. salivarius* KC27L strain was 87% inhibition on *E. coli* ATCC 11229. Antioxidant activity was determined by three different methods and the highest 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical removal effect was obtained in 1 mg/mL 1-EPS (84.9%) of *L. reuteri* KC21L strain, Fe⁺² ion chelating activity was found to be the bacterial suspension of *L. reuteri* KC21L strain+1 mg/mL in 1-EPS (76.3%) and superoxide anion radical scavenging activity was determined in the bacterial suspension of *L. salivarius* KC27L (73.2%). As a result of the results obtained in this study, it was aimed to suggest the EPSs produced by lactobacilli isolated from chicken feces as prebiotic in chicken feed.

Science Code : 20309

Keywords : *Lactobacillus* spp., 1-EPS, antimicrobial, antibiofilm, antioxidant, prebiotic

Page Number : 87

Supervisor : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her türlü araştırma olanağını ve desteğini sağlayan, bana gösterdiği sabır ve anlayışla güzel bir çalışma ortamı sağlayan değerli danışman hocam Sayın Zehranur YÜKSEKDAĞ'a, en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Her zaman yanımda olan, hayattaki en büyük desteğim başta sevgili annem Firdes Çelik ve kuzenim Perihan Çelik'e, tez çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim. Bu tez çalışması, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 05/2017-08 kodlu proje ile desteklenmiştir. Maddi katkılarından ötürü Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Probiyotik.....	3
2.1.1. Probiyotiklerin tavuk sağlığındaki önemi.....	4
2.2. Prebiyotik.....	5
2.2.1. Tavuklarda prebiyotik kullanımı	6
2.3. Ekzopolisakkaritler	8
2.4. Antimikrobiyal aktivite.....	10
2.5. Antibiyofilm.....	12
2.6. Antioksidan aktivite	16
2.6.1. Serbest radikaller ve oksidatif stres	16
2.6.2. Antioksidanlar.....	17
2.6.3. Probiyotiklerin ve prebiyotiklerin antioksidan aktiviteleri.....	18
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteriler:	21

	Sayfa
3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyeri ve çözeltiler	21
3.2. Metot	23
3.2.1. İzolasyon	23
3.2.2. Bakterilerin EPS üretimlerinin belirlenmesi	24
3.2.3. Moleküler tanımlama	25
3.2.4. Laktik asit bakterileri EPS liyofilizasyonu	26
3.2.5. l-EPS'lerin karakterizasyonu	27
3.2.6. Antimikrobiyal aktivite	28
3.2.7. Bazı patojen bakteri suşlarının biyofilm yapma oranlarının belirlenmesi	29
3.2.8. Antibiyofilm aktivite	30
3.2.9. Antioksidan aktivite	32
3.2.10. İstatiksel analizler	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	35
4.1. İzolasyon	35
4.2. İzolatların Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimleri	35
4.3. Moleküler Tanımlama	38
4.4. l-EPS'lerin Karakterizasyonu	39
4.5. Antimikrobiyal Aktivite	41
4.6. Bazı Patojen Bakteri Suşlarının Biyofilm Yapma Oranlarının Belirlenmesi	43
4.6.1. Kongo red yöntemi	43
4.6.2. Mikro plak yöntemi	45
4.7. Antibiyofilm Etkinin Belirlenmesi	46
4.8. Antioksidan Aktivite	49
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67

Sayfa

KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	87



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan MRS besiyerinin içeriği	21
Çizelge 3.2. Elliker sıvı besiortamı içeriği.....	22
Çizelge 3.3. Fosfat Tamponu (PBS) içeriği	22
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan izolatlar ve temin edildikleri ilçe	35
Çizelge 4.2. Dışkılarda toplam bakteri sayımı (kob/g)	35
Çizelge 4.3. İzolatların EPS üretim miktarları (mg/L)	37
Çizelge 4.4. Liyofilizasyon öncesi ve sonrasında suşların EPS miktarları.....	37
Çizelge 4.5. Bakterilerin 16S rRNA sekanslarının NCBI gen bankası sonuçlarına göre homolojileri ve saflığı OD _{260/280 nm}	38
Çizelge 4.6. Liyofilize edilmiş EPS'lerin monosakkarit kompozisyonları ve yüzde oranları.....	40
Çizelge 4.7. Bazı patojen bakterilerin kongo red yöntemi ile bulunan biyofilm yapma oranları.....	44
Çizelge 4.8. Bakteri süspansiyonlarının ve kültür filtratlarının % biyofilm inhibisyonu	46
Çizelge 4.9. 0,5 ve 1 mg/mL l-EPS'lerin % biyofilm inhibisyonu.....	47
Çizelge 4.10. Bakteri+l-EPS (0,5- 1 mg/mL) % biyofilm inhibisyonu	48
Çizelge 4.11. 0,5 ve 1 mg/mL inülinin % biyofilm inhibisyonu	48
Çizelge 4.12. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini giderme etkisi %.....	49
Çizelge 4.13. Suşların % Fe ⁺² iyonu şelatlama yeteneği %.....	50
Çizelge 4.14. Süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesi %.....	52

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Probiyotiklerin etki mekanizması	4
Şekil 2.2. Prebiyotik kaynakları	6
Şekil 2.3. Prebiyotiklerin yararları	7
Şekil 2.4. EPS oluşumunda rol alan enzimler	10
Şekil 2.5. <i>In vivo</i> biyofilm geliştirme aşamaları	14
Şekil 2.6. Doğal antioksidanların sınıflandırılması	18
Şekil 3.1. Glikoz standart eğrisi	25
Şekil 4.1. <i>Lactobacillus salivarius</i> KC27L (a) ve <i>Lactobacillus reuteri</i> KC21L (b) suşlarının ışık mikroskop görüntüleri	39
Şekil 4.2. <i>L. salivarius</i> KC27L suşuna ait l-EPS'nin kromatogramı: Mavi kromatogram 1/10 dilue örnek sırasıyla tespit edilen şekerler sukroz, glikoz, mannoz ve arabinoz	40
Şekil 4.3. <i>L. salivarius</i> KC27L suşuna ait l-EPS'nin kromatogramı: Kırmızı kromatogram 1/20 dilue örnekte, galaktoz yokluğu	40
Şekil 4.4. <i>L. salivarius</i> KC27L suşundan izole edilen l-EPS'lerin ¹ H-NMR spekturumu	41

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. 5-100 mg/L arasında değişen standart glikoz çözeltileri	24
Resim 3.2. Liyofilizatör cihazı (CHRIST alpha 2-4 LD plus).....	27
Resim 3.3. Mikroplak okuyucu (Epoch, Biotek)	30
Resim 4.1. Agaroz jel elektroforez görüntüsü	38
Resim 4.2. (a) <i>Lactobacillus salivarius</i> KC66L suşuna ait kültür filtratının <i>E. coli</i> ATCC 11229 üzerine inhibisyon etkisi (b) <i>Lactobacillus</i> <i>salivarius</i> KC27L suşuna ait kültür filtratın <i>Staphylococcus aureus</i> EB1 üzerine inhibisyon etkisi	42
Resim 4.3. Kongo red deneyinde <i>S. enteritidis</i> ATCC 13076 suşunda gözlenen kırmızı koloniler (zayıf biyofilm oluşumu: +).....	44
Resim 4.4. Mikroplak okuyucuda okunmaya hazır bir mikroplak	45
Resim 4.5. DPPH radikali giderim etkisi (Örnek: KC21L bakteri süspansiyonu, Kontrol: DPPH çözeltisi ve PBS)	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

%	Yüzde
g	Gram
kDA	Kilodalton
mL	Mililitre
°C	Santigrad
pH	Asitlik bazlık birimi
μL	Mikrolitre

Kısaltmalar

Açıklamalar

BHA	Butile hidroksianisol
BHT	Butile hidroksitoluen (BHT)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EPS	Ekzopolisakkarit
FOS	Fruktooligosakkaritler
GIS	Gastrointestinal sistem
GOS	Galaktooligosakkaritler
LAB	Laktik asit bakterisi
MRS	Man Ragosa Sharp
OD	Optical Density (Optik Yoğunluk)
PBS	Phosphate buffered saline (Tampon çözeltisi)
QS	Quarum Sensing
RNS	Reaktif azot türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Devir sayısı
RSS	Reaktif kükürt türleri

Kısaltmalar**Açıklamalar****SOD**

Süperoksit dismutaz

sp

Tür

SSCAs

Kısa zincirli yağ asitleri

TCA

Trikloroasetikasit

UNAM

Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi



1. GİRİŞ

Tavuk gastrointestinal sistemi (GIS), başta bakteriler olmak üzere çok sayıda türden oluşan dinamik bir mikrobiyal topluluk barındırmaktadır. Bu bakteriler, kümes hayvancılığının genel sağlık performansında önemli bir rol oynamaktadır. GIS bakterileri, kabaca patojenik veya komensal organizmalar olarak sınıflandırılabilirler. Patojen bakteriler lokalize veya sistemik enfeksiyonlara ve bağırsak lezyonlarına neden olarak konakçıya zarar verebilirler ancak komensal bakteriler, besleyiciler, metabolik kolaylaştırma ve rekabet dışı dışlama sağlayarak konakçıya fayda da sağlayabilirler (Wei, Lilburn ve Yu, 2016).

Refahı artırmak ve ekonomik faydalar sağlamak amacıyla antibiyotikler ve kemoterapikler kanatlılarda uzun yıllar kullanılmıştır. Bu durum, hem insan hem de hayvanlarda patojenik bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirme riskinden dolayı kullanımı yasaklanmıştır. Bu nedenle, insan ve hayvanların sindirim sistemindeki sınırlı sayıdaki faydalı mikroorganizmaların büyümelerini hızlandıran, patojen mikroorganizmaları baskılayan, sindirilmeyen yem ve gıda maddeleri olarak tanımlanan alternatif büyüme faktörleri (verim artırıcı) prebiyotikler, probiyotikler, sinbiyotikler, postbiyotikler gibi çeşitli yem katkı maddeleri, antibiyotiklerin yerini alması için büyüme promotörleri olarak kullanılmaya başlanmıştır (Wang, Tang, Zheng, Xing ve Wang, 2016).

Tavuk performansı üzerinde yapılan araştırmalar, probiyotik desteğin olumlu etkileri olabileceğini göstermiştir. Probiyotikler konak sindirim sistemini kolonize ederler, doğal mikrobiyotayı artırırlar ve patojen organizmaların kolonizasyonunu engellerler. Araştırmacılar, probiyotiklerin, yumurta tavuğunun yem verimliliğini, üretkenliğini artırabileceğini ve yumurta kalitesinde (kolesterol düzeyinde azalma, kabuk kalınlığında artış, yumurta ağırlığı) gelişime neden olduğunu bildirmişlerdir (Sugiharto, 2016; Angelakis, 2017). Bazı çalışmalarda, probiyotik bakterilerin büyümeyi destekleyici etkilerinin, tavuklarda antibiyotik tedavisine eşit veya daha iyi olduğu bulunmuştur (Mountzouris ve diğerleri, 2007; Drissi ve diğerleri, 2014).

Prebiyotikler, kolonda zaten bulunan bir veya birkaç sınırlı sayıdaki bakteriyel türün büyümesini veya aktivitesini seçici olarak uyararak ve konakçı sağlığını iyileştirmeye çalışarak konakçıyı faydalı bir şekilde etkileyen canlı olmayan, sindirilemez, lifli yem katkılarıdır. Prebiyotikler, patojenlerin (Örneğin, *Escherichia coli* ve *Salmonella*)

büyümesini kontrol ederek ve probiyotik olan bifidobakterilerin ve laktobasillerin büyümesini uyararak hayvanların sağlık performansını arttırmaktadırlar (Kareem, Loh, Foo, Akit ve Samsudin, 2016; Angelakis, 2017).

Laktik asit bakterilerinin (LAB), bağırsak mikrobiyotasını düzenlemek, serum kolesterolü seviyesini düşürmek, bağışıklık sistemini uyarmak, kanser riskini azaltmak ve engellemek gibi probiyotik fonksiyonları bulunmaktadır. Ayrıca son yıllarda LAB'nin antioksidan aktiviteye sahip olduğu da bulunmuştur (Li ve diğerleri, 2014; Tang ve diğerleri, 2017; Trabelsi ve diğerleri, 2017). Gıdalar yoluyla alınan LAB sahip oldukları antioksidan aktivitelerinden dolayı reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimini azalttığı da bildirilmektedir (Chen, Zhang, Sun, Meng ve Zhang, 2015). Tez çalışmasında, Ankara ili ilçelerinden toplanan tavuk dışkılarından izole edilen LAB'nin ürettikleri EPS'lerin prebiyotik olarak kullanılabilirliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda,

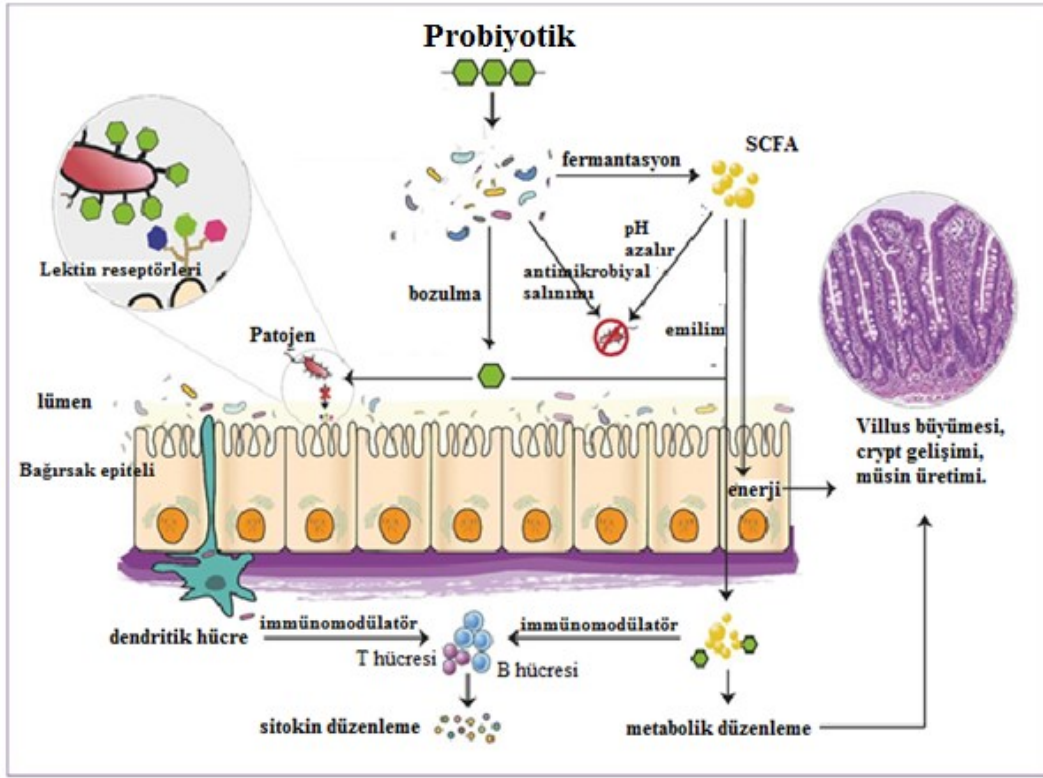
1. Serbest dolaşan tavukların gaytasından laktik asit bakterilerinin izolasyonunun yapılması,
2. Probiyotik bakterilerin ürettikleri ekzopolisakkaritlerin (EPS) prebiyotik olarak kullanılabilirliklerinin belirlenmesi amacıyla yüksek ve düşük EPS üretim kapasitesine sahip izolatların seçilerek liyofilize EPS (I-EPS)'lerin elde edilmesi,
3. Yüksek EPS üretimine sahip iki bakteri ile düşük EPS üretimine sahip iki bakterinin moleküler tanımlanması,
4. Yüksek EPS üreticisi bakteriden elde edilen I-EPS'nin moleküler karakterizasyonu için monomer yapısının, bağ yapısının ve moleküler ağırlığının belirlenmesi,
5. Moleküler olarak tanımlanan suşlara ait, bakteri süspansiyonları, kültür filtratları, bakterilerden elde edilen I-EPS'leri (0,5/1 mg/mL) ve bakteri+(0,5/1 mg/mL) I-EPS'leri ve ticari bir prebiyotik olarak kullanılan inülinin (0,5/1 mg/mL) antimikrobiyal, antibiyofilm ve antioksidan aktivitelerinin tespiti hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Probiyotik

Yeterli miktarda verildiğinde konakçı üzerinde sağlığa yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak (FAO ve WHO, 2006) tanımlanan probiyotikler, doğrudan veya dolaylı mekanizmalar yoluyla bağırsak mikrobiyotasının kolonizasyonuna katkıda bulunurlar. Bunlar, komensallerin büyümesini teşvik eden substratlar üretirler ve antimikrobiyal aktivite ile patojenlerin bağırsak kolonizasyonunu inhibe ederler. Ayrıca, bağırsağın geçirgenliğini azaltırlar ve müsin sekresyonunu arttıırırlar, böylece bağırsak içeriğinin sisteme sızmasını engelleyerek kronik inflamasyona neden olurlar (Schrezenmeir ve Vrese 2001; Slawinska, Plowiec, Siwek, Jaroszewski ve Bednarczyk, 2016).

Probiyotiklerin etki mekanizması tam olarak açıklanmamış olmakla birlikte, yapılan araştırmalarda elde edilen sonuçlara göre konakçı hayvana sağladığı yararlar üzerine yaklaşımlar mevcuttur. İlk olarak probiyotiklerin bağırsak içerisinde pH'yı düşürerek, bazik ya da nötr pH'da yaşayan patojen mikroorganizmaların miktarını azalttığı bildirilmektedir. Aynı zamanda bağırsak epitel hücresinde çoğalarak epitel hücrelere yapışarak yaşayan patojen mikroorganizmaların çoğalmalarını da engellemektedirler (Bahadıroğlu, 1999; Pourabedin ve Zhao, 2015; Angelakis, 2017) (Şekil 2.1). Bağırsak epitel dokusundaki bu etkisinin yanında diğer önemli etkisi immün sistem üzerinedir. Probiyotikler; immün sistemde antikor salınımını artırma, fagositoz, mikroorganizmaların makrofaj aktivitesini çoğaltma ve bağırsak epitelindeki lokal antikor miktarını çoğaltma yollarıyla olumlu etkilerde bulunmaktadır (Ahmad, 2006). Diğer taraftan sindirim sistemi içerisinde çeşitli enzimlerin üretilmelerini sağlayarak, sindirim sistemi tam gelişmemiş genç hayvanlarda sindirimi arttırmaktadırlar (Vanbelle, Teller ve Focant, 1990). B grubu ve K vitaminlerinin salgılanmasını sağlayarak da yararda bulunurlar. Tüm bu özelliklerin yanında probiyotiklerin bağırsakta kolesterol emilimini etkileyerek, serum kolestrol düzeyini azalttığı da bildirilmektedir (Özşehitoğlu ve Yılmaz, 2009; Martinez, Bedani, Marta ve Saad, 2015).



Şekil 2.1. Probiyotiklerin etki mekanizması (Pourabedin ve Zhao, 2015)

2.1.1. Probiyotiklerin tavuk sağlığındaki önemi

Hayvan beslenmesinde, son zamanlarda antibiyotiklerin büyüme teşviki olarak yasaklanması hayvan beslenmesi için bir zorunluluk haline gelmiştir. Bazı hayvan hastalıklarının oluşumunu kontrol etmek ve önlemek için alternatif yöntemler araştırılmaktadır. Özellikle, enterik hastalıklar, verimlilik kaybı ve mortalitenin artması kanatlı endüstrisinde önemli bir endişe kaynağıdır (Patterson ve Burkholder, 2003; Maioranove diğerleri, 2017).

Tavukçuluk endüstrisinde antibiyotikler, et ve yumurta üretimini iyileştirmek, kanatlı patojenleri ve hastalıklarını önlemek için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, diyet antibiyotiklerinin kullanılması, ilaca dirençli bakterilerin gelişimi, normal mikrobiyotanın dengesizliği gibi ortak problemlerle sonuçlanmaktadır (Burgat, 1991; Jamshidparvar ve diğerleri, 2017). Bu sorunların bir sonucu olarak, faydalı mikroorganizmalar kullanılarak alternatifler geliştirilmesi gerekmektedir (Samanya ve Yamauch, 2002).

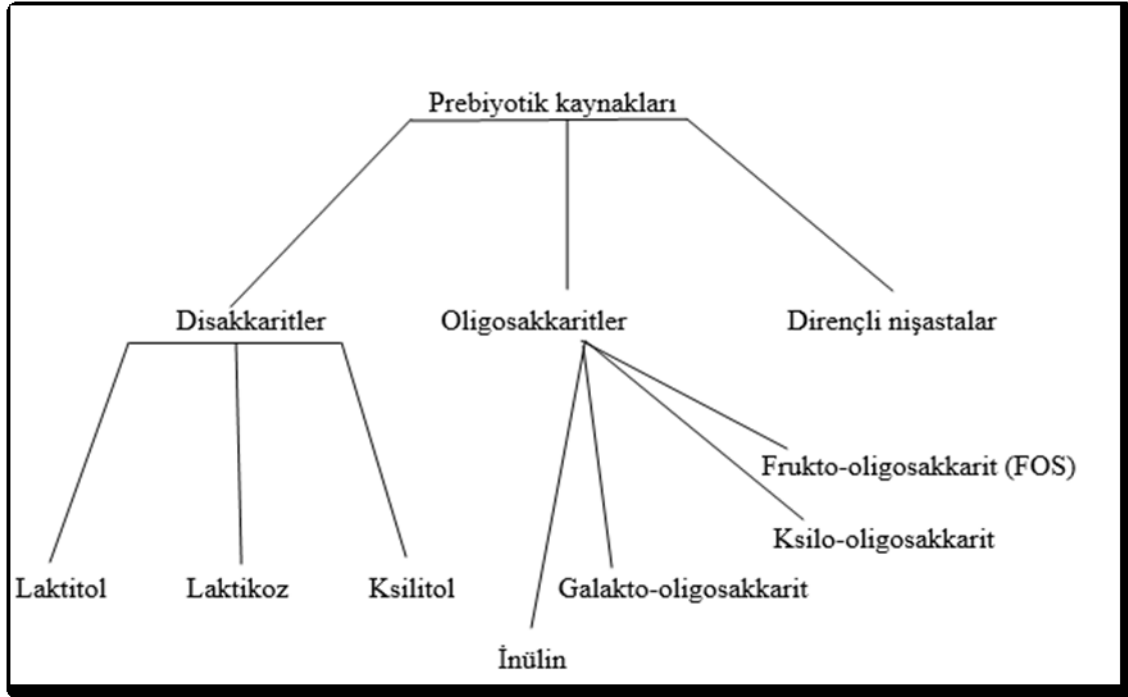
Hayvan yemlerinde probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar esas olarak *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Enterococcus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *Pediococcus* türlerine ve cinslerine ait bakteri suşlarıdır. İyi bir probiyotik ajan, patojenik ve toksik olmamalı, gastrik asidi tolere etmeli, bağırsak epitel dokusuna yapışmalıdır ve antibakteriyal maddeler üretmelidir (Angelakis, 2017).

2.2. Prebiyotik

1995'te Gibson ve Roberfroid prebiyotikleri konukçunun alt gastrointestinal sisteminde hâlihazırda bulunmakta olan *Bifidobacteria* ve *Lactobacillus* gibi faydalı bakterileri seçici olarak uyaran, fermente edilebilir sindirilmeyen gıda maddeleri olarak tanımlamış ve bağırsaktaki mikrobik popülasyonları değiştirerek sonuç olarak canlı sağlığını geliştirdiğini gözlemlemişlerdir (Gibson ve Roberfroid, 1995).

Prebiyotikler, başka bir ifade ile rafinoz ailesi oligosakaritleri (RFO), galaktooligosakkaritler (GOS) ve istenen bağırsak mikrobiyotasının hem büyümesini hem de aktivitesini seçici olarak uyaran β -glukanları içeren şekerlerden türetilmiş yem bileşenleri olarak da tanımlanmaktadır (Şekil 2.2). β -glukanlar doğal olarak birçok prokaryotik ve ökaryotik organizmalar tarafından sentezlenebilen polisakkaritlerdir. Bu bileşikler, bitkiler, mantarlar ve çeşitli mikroorganizmalardaki hücre duvarlarının bir unsuru olabilir. Tarımsal üretimde antibiyotiklerin yaygın şekilde kullanılması antibiyotik dirençli bakterilerin artmasına neden olduğundan hayvansal üretimde alternatif besin takviyeleri olarak prebiyotikler daha cazip hale gelmektedir (Akramiene, Anatolijus, Didziapetriene ve Kevelaitis, 2007; Sobolewska ve diğerleri, 2017).

Prebiyotikler, kısa zincirli yağ asitleri (SCFAs) üretimi, pH ayarlaması ve patojenlere karşı bağlanma sahalarında rekabet gibi çeşitli mekanizmaları konakçı sağlığını iyileştirmek için kullanırlar. Artan kısa zincirli yağ asitlerinin üretimi patojenlerin kolonizasyonunu ve büyümesini engellediği için, *Bifidobacteria* ve *Lactobacillus* tarafından fermentasyonda substrat olarak kullanılırlar (Marschall ve Levy, 2011; Park, Lee, Kim, Christensen ve Ricke, 2017).

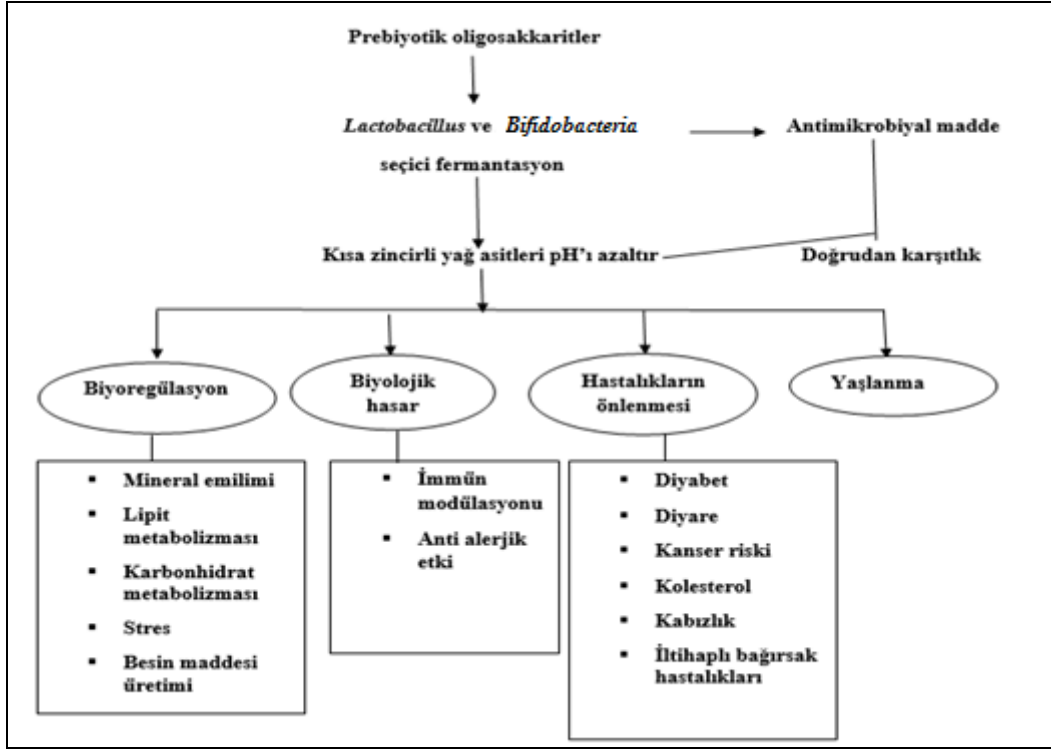


Şekil 2.2. Prebiyotik kaynakları (Ferreira ve diğerleri, 2011)

Fruktooligosakkaritler (FOS) ve galaktooligosakkaritler (GOS), hem gıda maddeleri hem de insan tüketimi için prebiyotik olarak kullanılmışlardır (Patterson ve Burkholder, 2003; Ricke, 2015). Bu oligosakkaritler, endojen enzimler tarafından hidrolize dirençli glikozidik bağlara sahip fruktoz veya galaktoz zincirlerinden oluşurlar ve bağırsaktaki bakteriler tarafından fermentasyon için kullanılabilirler (Şekil 2.3) (Hidaka ve Mirayama 1991; Park ve Oh, 2010).

2.2.1. Tavuklarda prebiyotik kullanımı

Tavukçulukta son birkaç yıldır hâlihazırda kullanılan çeşitli yem katkıları arasında, prebiyotikler de dâhil olmak üzere biyoaktif maddeler önemli rol oynamaktadır. Hayvancılığın verimliliğini etkileyen en önemli faktör, dengeli beslenmeyi sağlayan uygun üründür. Beslenme, kanatlıların büyümesini ve gelişimini etkilemekle kalmayarak, çeşitli biyoaktif maddeler gibi uygun yem katkı maddelerinin kullanılması yoluyla bağışıklık sisteminin işleyişini de etkilemektedir. Prebiyotiklerin, tavukların gastrointestinal sisteminde yararlı etkiler gösterdiği ve yem verimliliğini arttırdığı, dolayısıyla canlılığını olumlu yönde etkilediği ile ilgili bilgiler çalışmalarda bildirilmiştir (An ve diğerleri, 2008; Shokryazdan ve diğerleri, 2017; Dec ve diğerleri, 2016).



Şekil 2.3. Prebiyotiklerin yararları (Kothari, Patel ve Goyal, 2014)

Prebiyotiklerin gastrointestinal sistemdeki aktivitesi, pH ayarlamasıyla ilişkili olup bağırsak mikrobiyotasının bileşimi üzerinde olumlu bir etki yapmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, prebiyotiklerin yem veya suya katılarak tavuklarda verim artışlarının tespitine yönelik olmuştur. Tavuklara biyoaktif maddelerin katılması için yenilikçi bir yöntem, kuluçka için tasarlanan yumurta içine *in ovo* enjeksiyonudur. Bu yöntem yumurtanın hava odasına veya doğrudan gelişmekte olan embriyoya biyolojik olarak aktif maddelerin embriyonik gelişimin uygun olduğu günlerde girmesine dayanmaktadır (Ciesiolka ve diğerleri, 2005). Tavuklara prebiyotik ve probiyotik uygulamak için *in ovo* tekniklerinin kullanılması, immün sistemi erken embriyonik evrelerde modüle etmenin bir yolunu sağlamaktadır. Tavukların embriyonik gelişimi sırasında ovada uygulanan maddeler, kuluçka öncesi bağırsaklara ulaşarak gastrointestinal yolun gelişimini etkilemektedir (Sobolewska ve diğerleri, 2017). Villaluenga ve diğerleri (2014), prebiyotik enjeksiyon için en uygun zamanın embriyonik gelişimin 12. günü olduğunu, 1., 8. ve 17. gündeki enjeksiyonlarla karşılaştırıldığında, bağırsakta daha fazla sayıda bifidobakteri gözlendiğini bildirmişlerdir. Cheled-Shoval ve diğerleri (2011), kuluçkadan 3 gün önce mannan-oligosakkarit (MOS) preparasyonunu uygulayarak, kuluçkadan sonra tavukların bağırsağının morfolojisini incelemişlerdir. Prebiyotiklerin intestinal villus yüksekliği ve

genişliği ile bağırsak kriptlerinin derinliği üzerinde olumlu etkileri olduğunu raporlamışlardır.

2.3. Ekzopolisakkaritler

Ekzopolisakkaritler (EPS), hayvanlar, bitkiler, mantarlar ve laktik asit bakterilerinin (LAB) de dâhil olduğu bakteriler gibi farklı organizmalar tarafından üretilen, yaygın, doğal olarak dağılmış olan hücre dışı biyopolimerlerdir. Endüstriyel olarak faydalı fiziko-kimyasal özelliklerinden dolayı, LAB tarafından üretilen EPS'ler, GRAS (genelde güvenli) olarak tanımlanırlar. LAB'den elde edilen EPS'ler, fermente gıdaların spesifik özelliklerine, dokusuna, duyarlılığına katkıda bulunmalarının yanı sıra kozmetik, eczacılık gibi gıda dışı sanayide de uygulanmaktadırlar. İnsan bağırsağı başta olmak üzere kanatlı hayvan bağırsağında, laktobasil ve bifidobakteriler tarafından üretilen EPS'ler konakçı sağlığına katkıda bulunmaktadırlar (Salazar, Gueimonde, De Los Reyes-Gavilan ve Ruas-Madiedo, 2015; Vastano, Perrone, Marasco, Sacco ve Muscariello, 2016).

Ekzopolisakkaritler (EPS), temel olarak monosakkaritlerin glikozidik bağ ile bağlanmasıyla oluşan düz veya dallanmış yapıda, suda çözünebilen iyonik veya iyonik olmayan biyopolimerlerdir. EPS'leri oluşturan monosakkaritler çoğunlukla heksozlardır ancak bazı EPS'lerin yapısında pentozlar da bulunabilmektedir. Polisakkaritlerin dışında EPS'ler proteinler, nükleik asitler, fosfolipitler gibi bileşikleri de içerebilmektedirler (Freitas, Alves ve Reis, 2011; Soyuçok, Ekiz ve Kılıç, 2016).

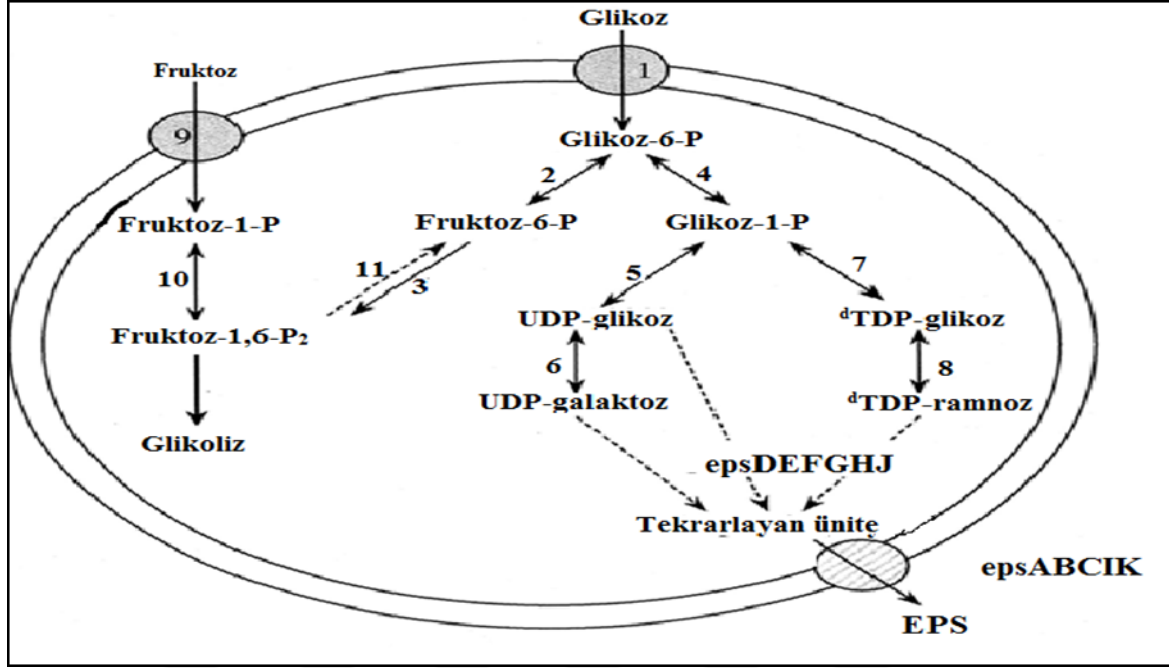
EPS'ler, izolasyon kaynağına ve elde edildiği organizmaya göre değişmekle birlikte, genel olarak D-glikoz, D-galaktoz, L-ramnoz veya nadir olarak N-asetilglikozamin, N-asetilgalaktozamin ve glukoronik asit içeren birimlerin tekrarlanması sonucu açığa çıkan yapılarıdır. Mikrobiyal EPS'ler doğada iyonik veya iyonik olmayan formda bulunabilir ve suda çözünebilirler. Molekül büyüklükleri genel olarak 10 kDa ile 200 kDa arasında değişmekte bazen de 1000 kDa'ya çıkabilmektedir (Duboc ve Mollet, 2001; Ergene ve Avcı, 2016).

Ekstrasellüler polisakkaritler, bol miktarda ve çeşitli doğal biyopolimer sınıfı olup, özel koyulaştırma, jelleştirme, stabilize etme veya emülsiyon haline getirme özellikleri sergilerler. Bu özellikler, onları yeni ürünlerin geliştirilmesinde kritik katılımcılar olarak

konumlandırmaktadır (Miao ve diğerleri, 2014). Birçok mikroorganizma çok çeşitli biyolojik fonksiyonları yerine getiren hücre dışı polisakkaritleri sentezleyebilir. Bu polimerler, hücre yüzeyi ile sıkı sıkıya birleştirilen kapsüller polisakkaritler veya büyüme ortamına serbest bırakılabilen sümüksü polisakkaritlerdir (Freitas ve diğerleri, 2011; Mende ve diğerleri, 2016).

Bakteriyel ekzopolisakkaritler (EPS), hücre yüzeyiyle kovalent olarak ilişkilendirilebilen, kapsül oluşturan, hücrenin çevresine gevşek veya tamamen salgılanan karbohidrat polimer grubunu temsil eder. EPS'ler sırasıyla bir veya birden fazla şekerden oluşup oluşmamasına bağlı olarak homopolisakkarit veya heteropolisakkaritler olarak sınıflandırılırlar (Nikolic ve diğerleri, 2012). Bakteriyel EPS'nin yapısı, tekrar eden birimlerinde bulunan farklı şeker monomerleri ve glikozidik bağlar nedeniyle farklı türler arasında geniş bir çeşitliliğe sahiptir (Miao ve diğerleri, 2014). Homopolisakkaritler, monomer kalıntılarının lineer yapılar (levan, curdolan, pullulan veya bakteriyel selüloz) veya dağılıma uğramış yapılar (dekstran) oluşturmak üzere bağlandığı tek tip monosakkaritin tekrarlayan birimi ile oluşturulur. Bununla birlikte, heteropolisakkaritler iki veya daha fazla monosakkaritten ve genellikle üç ila sekiz kalıntı içeren oligosakkaritlerin çoklu kopyaları olarak bulunurlar (De Vuyst ve Degeest, 1999; Casillo ve diğerleri, 2018). Bakteriler arasında yaygın olarak bulunan EPS'ler, doğal ortamda fagositoz ve protozoa, faj saldırısı, antibiyotikler veya toksik bileşikler ve ozmotik strese karşı koruyucu bir işlev görebilirler. Dahası, EPS'lerin hücre tanımada, yüzeylere yapışmada ve biyofilm oluşumunda da rolü vardır. EPS'ler, patojenler ve probiyotiklerin bağırsak mukusuna yapışmasına müdahale edebilir veya immün modülatör etki gösterebilirler. Bu nedenle, EPS üretiminde yer alan genlerin ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmesi de büyük önem taşımaktadır (Bleau ve diğerleri, 2010; Zivković ve diğerleri, 2015).

Polisakkaritler, bakteri suşlarının çoğalmaları sırasında suşa ve çoğalma evresinin farklı kademelerine göre değişen koşullarda sentezlenirler. Sentez olayı hücre dışında olduğu kadar membranda da meydana gelebilir. EPS sentezinin Sutherland tarafından önerilen genel modele göre gerçekleştiği düşüncesi ağırlık kazanmıştır (Ale ve diğerleri, 2016). EPS'lerin oluşumunda; UDP-glikoz-dehidrogenaz, glikozil-transferaz, galaktozil-transferaz 1 ve 2, polimeraz gibi polisakkarit sentezine özgü olmayan birçok enzim görev almaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. EPS oluşumunda rol alan enzimler: 1, Mannoza PEP PTS; 2, fosfoglikoz izomeraz; 3, 6-fosfofruktokinaz; 4, α-fosfoglikomutaz; 5, UDP-glukoz pirofosforilaz; 6, UDP-galaktoz-4-epimeraz; 7, deoksi-TDP (dTDP)-glukoz pirofosforilaz; 8, dTDP-ramnoz ; 9, fruktoza PEP PTS; 10, 1- fosfofruktokinaz; 11, FBPaz (Looijesteijn ve diğerleri, 1999)

Heteropolisakkaritler hücre içinde sentezlenirler ve daha sonra hücre dışına çıkarılarak hücrenin etrafını sararlar. Bu işlemler için birçok enzimin varlığına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu enzimlerden bazıları lipopolisakkaridlerin sentezinde de kullanılmaktadır (Ale ve diğerleri, 2016).

2.4. Antimikrobiyal aktivite

Kümes hayvanları, hayvan proteinlerinin tüketimi için en büyük paya sahip hayvanlardır. Kanatlı üretiminin arttırılmasını kolaylaştırmak ve kanatlı hayvanları enterik patojenlerden korumak için, bazı antimikrobiyal büyüme promotörleri, son on yıllar boyunca kanatlı yemlerinde sağlık koruyucu faktörler olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte antibiyotiklerin sürekli kullanılması antibiyotik dirençli bakterilerin oluşmasına neden olmaktadır. Antibiyotiklerin kullanılması sadece hayvanlarda değil, insanlarda da olumsuz etkilere neden olmaktadır (Reid ve Friendship, 2006; Latha, Vinothini, Calvin ve Dhanasekaran, 2016).

Son yıllarda hayvansal üretimde profilaktik, terapötik ve büyüme teşvik eden ajanlar antibiyotiklere umut verici bir alternatif olarak canlı mikroorganizmaların (probiyotiklerin) kullanılması tavsiye edilmektedir. Kümes hayvanları diyetinde probiyotik uygulamasının, bağırsak mikrobiyal dengesini, immünostimülasyonu, patojen mikrobiyotik toksinlere karşı korumayı, vitamin sentezini, sindirim enzimlerini artırdığı ve performans üzerinde iyi etkiye sahip olmalarından dolayı kanatlı hayvan beslenmesinde kullanımlarının uygun olabileceği bildirilmektedir (Mountzouris ve diğerleri, 2010; Latha ve diğerleri, 2016).

Patojenik suşlara karşı LAB türevi antimikrobiyal ürünlerin varlığı, probiyotikler için en önemli seçim kriterlerinden biridir. Organik asitler (laktik, asetik ve propiyonik asit), bakteriyosin ve LAB kaynaklı diğer maddeler (H_2O_2) antimikrobiyal özelliklere katkıda bulunmaktadır. Buna ek olarak, LAB'nin fiziko-kimyasal özellikleri, patojenlerin bağırsak yoluna tutunmasını engelleyebilmektedir (Tareb, Bernardeau, Gueguen ve Vernoux, 2013). Son yıllardaki araştırmalar, probiyotik suşların (*Lactobacillus salivarius* ve *Lactobacillus plantarum*), *Listeria monocytogenes* ve enteropatojenik *Escherichia coli*'nin bağırsak hücrelerine ve buna bağlı istilaya karşı yapışmasını engellediğini göstermiştir (Taheur ve diğerleri, 2016; Seddik, Bendali, Cudennec ve Drider, 2017).

Probiyotik suşlar, hayvanların bağırsak patojenlerinden birkaç mekanizma ile koruma sağlayabilir ve bu mekanizmalar arasında rekabet dışlama en yaygın olanıdır. Bu anlayışa göre, bakteri, alan ve besinler için birbirleriyle rekabet eder. Probiyotikler bağırsak duvarına yapışırlar, kolonileşirler ve çoğalırlar, böylece patojenlere bağlanma ve büyüme önlenir. Ayrıca, *Lactobacillus* cinsine ait suşlar organik asitler, hidrojen peroksit, diasetil, düşük molekül ağırlıklı antimikrobiyal maddeler, bakteriyosinler ve yapışma inhibitörleri gibi çeşitli antimikrobiyal bileşenlerin yanı sıra bağırsak bağışıklık tepkilerini uyarak istenmeyen mikroorganizmaları ortadan kaldırırlar (Servin, 2004). Antimikrobiyal aktivite, probiyotik suşların seçimi sırasında önemli bir kriterdir ve bağırsak ekosisteminde baskın bakterileri belirleyen önemli bir faktör olarak düşünülmektedir (Busarcevic ve diğerleri, 2008; Dec, Puchalski, Urban-Chmiel ve Wernicki, 2014).

Prebiyotikler, kümes hayvanları dâhil olmak üzere çeşitli hayvansal üretim sistemlerinde bağırsak sağlığını iyileştirmek, patojen kolonizasyonunu azaltmak için alternatif yem katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır. Prebiyotikler, sindirilemeyen karbonhidratlı diyet katkı maddelerini ve gastrointestinal sistemde bir veya daha fazla bakterinin büyümesini uyaran

ve diğerkonakçılara yararlı olan biyolojik bileşenleri içerirler (Ricke, Dunkley ve Durant, 2013). Prebiyotikler, lümen pH'sını düşürerek potansiyel olarak yetersiz olan yararlı bakteriyel popülasyonları destekleyerek, antimikrobiyal maddelerin konsantrasyonlarının artmasına ve zoonotik patojenlerin azalmasına sebep olurlar. Bağırsak bakterileri tarafından prebiyotiklerin fermentasyonu sonucunda SCFA, laktat, CO₂, hidrojen üretilir ve kalsiyum emilimi desteklenerek pH'nın azalması ile yararlı bakterilerin gelişimi hızlanır (Ricke, 2015; Park ve diğerkleri, 2017). Prebiyotiklerin varlığı normal bir mikrobiyal popülasyonun korunmasına yol açabilir ve bu da potansiyel inhibisyon yoluyla patojenik bakterilerin kolonizasyonunu inhibe edebilir (Park, Gibson, Almeida ve Ricke, 2014).

2.5. Antibiyofilm

Biyofilm “canlı veya cansız bir yüzeye yapışık olarak kendi ürettikleri polimerik matriks içinde yaşayan bakteri hücrelerinin oluşturduğu topluluk”, “yoğun bir ekzopolimer matriks içinde, mikroorganizmalar tarafından organize olmuş fonksiyonel ortaklık” ya da “bir yüzeye tutunmuş, organik polimer matrikse gömülü mikrobiyal birlik” olarak değişik tarzlarda tanımlanmaktadır (Dunne, 2002). Biyofilmler, mikroorganizmaların birleştirilmesi, toplanması ve bunu takiben polisakkarit açısından zengin ekstraselüler matriks ile kaplanarak oluşturulmuş çok hücreli yapılardır (Costerton, Lewandowski, Caldwell, Korber ve Lappin-Socott, 1995). Biyofilmler, planktonik hücrelere kıyasla olumsuz çevre koşullarına daha dayanıklıdırlar (Simoës, Simoës ve Vieira 2010; Fernandes ve diğerkleri, 2017).

Mikroorganizmalar sıklıkla yüksek hücresel yoğunluğa sahip bir biyofilm ile ilişkilidir. EPS'den oluşan glikokaliks, biyofilm oluşumu için gereklidir. EPS, polisakkarit zincirleri arasındaki etkileşimler yoluyla biyofilm stabilitesini etkileyebilir ve mikrobiyotada mikroorganizma büyümesi için substrat oluşturabilen biyolojik bir desteğe yapışmasına izin verir. Yapışmada rol oynamanın yanı sıra, biyofilm oluşumu bakterilerin çevrenin fiziko-kimyasal koşullarına adaptasyonunda da önemli bir yer tutar (Zivković ve diğerkleri, 2015).

Bir biyofilm oluşurken, bakteriler, hücre-hücre ve hücre-yüzey bağlantılarına aracılık eden çeşitli biyopolimerleri üretirler. Bununla birlikte, farklı polimerler, aynı türdeki farklı türler veya suşlar tarafından kullanılır. Bu ekstraselüler polimerik maddeler (EPS), biyofilmlerin

mekanik stabilitesini ve yüzeylere yapışmasını sağlar. Diğer taraftan birbiriyle bağlantılı üç boyutlu mimari için bir iskelet oluşturan polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler ve lipidlerdir (Flemming ve Wingender, 2010). Fonksiyonel bir biyofilm matriksi sıklıkla tekli protein veya birkaç protein bileşeni gerektirir. *Staphylococcus aureus* biyofilmlerinin, polisakkarit hücrelerarası yapışma (PIA) olarak da adlandırılan ve *ica* -operon'da kodlanmış enzimler tarafından sentezlenen poli-N-asetil glikozamin (PNAG) polimerini içerdiği bildirilmiştir (Abee, Kovacs ve van der Veen, 2011).

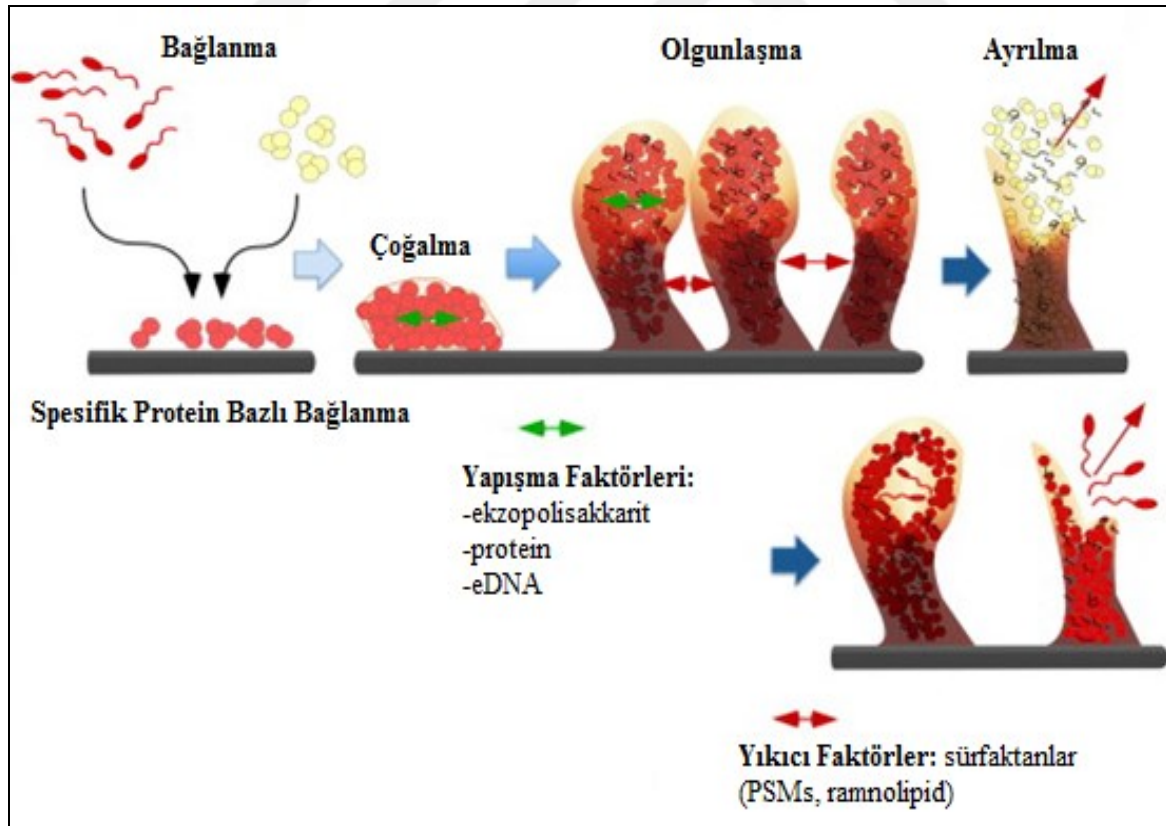
Biyofilmler öncelikle mikrobik hücreler ve EPS'den oluşur. EPS, biyofilmlerin toplam organik karbonunun %50 ile %90'ını oluşturmakta ve biyofilmin ana matriks malzemesi olarak düşünülmektedir. EPS, kimyasal ve fiziksel özelliklerinde değişiklik gösterebilir, ancak esas olarak polisakkaritlerden oluşur. Bu polisakkaritlerin bazıları, Gram-negatif bakterilerin EPS'lerinde olduğu gibi, nötr veya polianyoniktir. Üronik asitlerin (D-glukuronik, D-galakturonik ve mannuronik asitler gibi) veya pirüvatların varlığı, anyonik özelliği verir. Bu özellik kalsiyum ve magnezyum gibi iki değerlikli katyonların polimer telleri ile çapraz bağlandığı ve gelişmiş bir biyofilmde daha büyük bağlanma kuvveti sağladığı için önemlidir (Donlan, 2012).

EPS, hidrojen bağıyla yapısına büyük miktarda su katabildiği için oldukça hidrattır. Çoğu EPS türü hem hidrofilik hem hidrofobiktir. EPS, aynı zamanda çözünürlük açısından farklılık gösterebilir. Sutherland, EPS'nin biyofilm üzerinde belirgin bir etkisi olabilecek iki önemli özelliğine dikkat çekmiştir. Birincisi, polisakkaritlerin bileşiminin yapısının birincil konformasyonlarının belirlenmesidir. Birçok bakteriyel EPS, 1,3- veya 1,4-p-'ye bağlı hekzoz kalıntıları içeren ve daha katı, daha az deforme olabilen ve bazı durumlarda zayıf şekilde çözünür veya çözünmez olma eğilimi gösteren omurga yapılarına sahiptir. Diğer bazı EPS molekülleri suda kolaylıkla çözünür olabilir. İkincisi, biyofilmlerin EPS'si genel olarak tek tip değildir, ancak mekânsal ve zamansal olarak değişebilir (Sutherland, 2001).

Leriche ve diğerleri, bakteriyel biyofilm gelişimini farklı organizmalar tarafından değerlendirilmek üzere lektinlerin bağlayıcı özgünlüğünü basit şekerlerle kullanmışlardır. Farklı organizmaların farklı EPS miktarları ürettikleri ve EPS miktarının biyofilm yaşı ile birlikte arttığı bildirilmiştir (Leriche, Sibille ve Carpentier, 2000).

EPS, metal iyonları, iki değerlikli katyonlar, diğer makromoleküller (proteinler, DNA, lipidler) ile bağlantı kurabilir. EPS üretiminin, büyüme ortamının besin durumundan etkilendiği bilinmektedir; fazla karbon ve azot, potasyum veya fosfat sınırlaması EPS sentezini teşvik eder. Yavaş bakteri gelişimi de EPS üretimini arttırmaktadır. EPS, oldukça hidrat olduğundan, bazı doğal biyofilmlerde kurumayı önler. EPS, muhtemelen doğrudan bu ajanlara bağlanarak, biyofilm yoluyla antibiyotiklerin toplu taşınmasını engelleyerek biyofilmlerin antimikrobiyal direnç özelliklerine katkıda bulunabilir (Donlan, 2000; Donlan, 2002).

Biyofilm oluşumunun üç ana aşama ile gerçekleştiği düşünülmektedir: (1) bir yüzeye tutunma; (2) karakteristik, olgun biyofilm yapısının çoğalması ve oluşumu ve (3) genellikle dağılma olarak da adlandırılan ayrılma aşamasıdır (Şekil 2.5). Son zamanlardaki araştırmalar, üç aşamada da moleküler bakış açısı sağlamıştır (O'Toole, Kaplan ve Kolter, 2000; Joo ve Otto, 2012).



Şekil 2.5. *In vivo* biyofilm geliştirme aşamaları (Joo ve Otto, 2012)

Şekil 2.5.'de *in vivo* biyofilm geliştirme aşamaları şu şekilde açıklanmaktadır: Biyofilmler, bakterilerin, *Staphylococcus* (sarı) gibi hareketsiz bakterilerle *P. aeruginosa* gibi hareketli bakterilerin (kırmızı) aktif bir yüzeye taşınmasıyla, başlangıçtaki bağlanma bölgesinde gelişirler. Bağlantının kendisi, bakteri yüzeyinin insan matriks proteinleriyle spesifik protein-protein etkileşimleri tarafından yönetilir. Kateter gibi abiyotik bir yüzeye yapışma, bakteri yüzeyinin hidrofobikliğine bağlıdır, ancak bu mekanizmanın *in vivo* için önemsiz olduğuna inanılmaktadır. Hareketli ve hareketsiz bakteriler arasında prensip olarak farklılık göstermeyen sonraki adımlar, çoğalmayı, ekstrasellüler bir matrikste gömülmeyi ve olgunlaşmayı içerirler. Yakın zamanda yüzey aktif maddeler olarak tanımlanan hücre-hücre bozucu faktörlere bağlı Quorum Sensing (QS) tarafından kontrol edilen sürfaktanların güçlü üretimi, biyofilm ayrışmasına (dağılım) yol açar. Hareketli bakterilerde biyofilm, mantar kapaklarından başlayarak hareketliliğin yukarı doğru düzenlenmesine ve dağılmaya yardımcı olur (Joo ve Otto, 2012).

Biyofilm enfeksiyonları için bir tedavi bulmak, antibakteriyel ilaç geliştirmek oldukça zorludur. Antibiyofilm tedavilerinin geliştirmesi için üstlenilen veya tasarlanan yaklaşımlarla ilgili önemli sorunlar bulunmaktadır. Teorik olarak, biyofilm oluşumu, bakteri bağlanmasını önlemek için yüzeyi değiştirerek veya biyofilm oluşumunun erken safhalarını önlemek için antibakteriyel terapötiklerin dâhil edilmesiyle önlenabilmektedir (Rodrigues, 2011).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, EPS'lerin iyi birer antibiyofilm ajan olduklarını göstermektedir. Kanmani ve diğerleri (2011), *Streptococcus phocae* PI80 suşuna ait ekzopolisakkaritlerin, *L. monocytogenes*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* ve *S. aureus* patojenlerine karşı antibiyofilm etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. EPS'nin *L. monocytogenes* biyofilmini %67'nin üzerinde inhibe ettiği bildirilmiştir. Wang ve diğerleri (2015), *L. plantarum* YW32 suşu EPS'lerinin, *E. coli* O157, *Shigella flexneri* CMCC (B), *S. aureus* AC1 ve *S. Typhimurium* S50333 patojenlerine karşı biyofilm oluşumunu inhibe edici aktivitelerinin konsantrasyona (0,2-5 mg/mL) bağlı olarak değiştiğini raporlamışlardır. EPS konsantrasyonunun artmasıyla biyofilm inhibisyonunda artış gözlenerek, 5,0 mg/mL'lik konsantrasyonda antibiyofilm etkinin, *S. aureus* AC1 için %45,13, *Shigella flexneri* CMCC için %44,67 ve *S. Typhimurium* S50333 için %44,04 ve *E. coli* O157 için %12,71 oranında olduğu bildirilmiştir.

2.6. Antioksidan Aktivite

2.6.1. Serbest radikaller ve oksidatif stres

Serbest radikaller, diğer moleküllerle olan kimyasal reaksiyonlara karşı oldukça kararsız ve aktif eşlenmemiş elektronlara sahip atomlar, moleküller veya iyonlardır. Oksijen, azot ve sülfür olmak üzere üç elementten türemektedirler. Böylece reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri (RNS) ve reaktif kükürt türleri (RSS) oluştururlar. ROS, süperoksit anyonu (O_2^-), hidroperoksil radikali (HO_2), hidroksil radikali (OH), nitrik oksit (NO) ve hidrojen peroksit (H_2O_2), serbest oksijen (O_2) gibi serbest radikalleri içerir (Lü, Lin, Yao ve Chen, 2010; Carocho ve Ferreira, 2013).

Reaktif oksijen türleri, doku hasarında ve organlarda fonksiyon kaybında önemli rol oynarlar. Normal koşullar altında ROS, antioksidan savunma sistemleri ile etkili bir şekilde ortadan kaldırılmıştır. Ancak, patolojik koşullar altında, ROS üretimi ve ortadan kaldırılması arasındaki denge bozulmuştur. Sonuç olarak biyomakromoleküller hasar görerek; retrolental fibroplazias, akciğer hasarı, ateroskleroz, kanser, yaşlanma, inflamatuvar hastalıklar gibi bazı sağlık bozukluklarına neden olurlar. Bu nedenle, oksidasyonun serbest radikal zincirine müdahale ederek serbest radikal zincir reaksiyonlarını önleyebilen antioksidanları kullanmak gereklidir. Bununla birlikte, sentetik antioksidanların sağlık üzerindeki güvenliliği ve uzun vadeli etkileri hakkında şüpheler bulunmaktadır. Butile hidroksianisol (BHA) ve Butile hidroksitoluen (BHT) gibi yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanların bazı toksik ve muhtemelen kanserojen etkileri olduğundan şüphelenilmekte, dolayısıyla, gıda ve ilaç endüstrilerinde sentetik olanlara alternatif olarak toksik olmayan doğal antioksidanlar aranmaktadır (Li ve diğerleri, 2014).

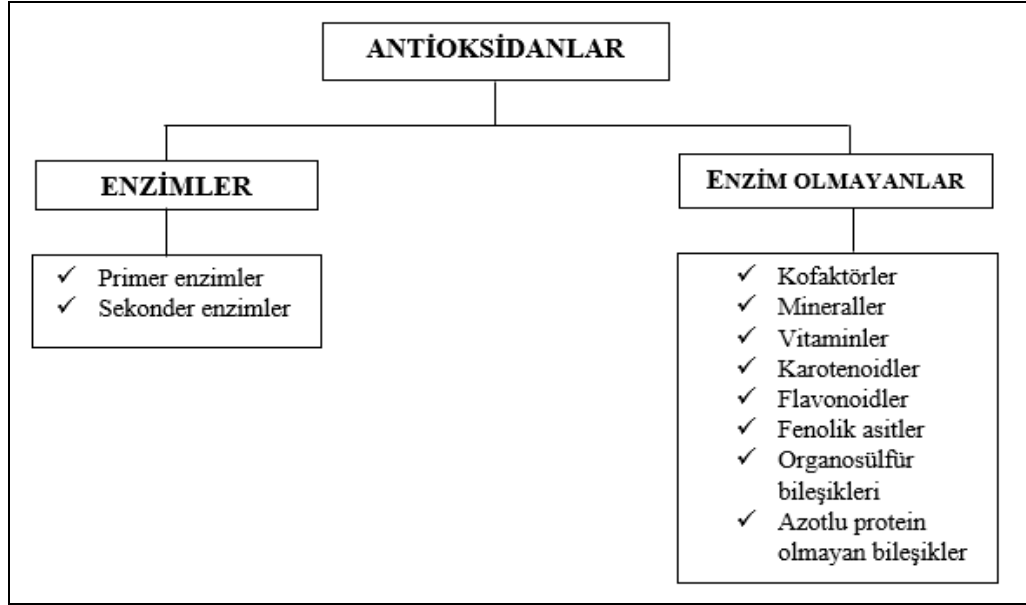
Reaktif oksijen türleri, hücredeki hemen hemen tüm substratları hedef alan biyomoleküllerin tüm sınıflarının işlevini modüle eder. Reaktif oksijen türleri hem omurgayı hem de protein yan zincirini oksitleyebilir, bu protein daha sonra karbonil işlevleri üretmek için amino asit yan zincirleri ile etkileşime girer. ROS, DNA mutasyonlarına, DNA-protein çapraz bağlanmasına, iplik kopuşuna ve pürin ve piridin baz yapılarındaki değişikliğe neden olabilecekleri için nükleik asitlere zarar verir (Gandhi ve Abramov, 2012; Pisoschi ve Pop, 2015).

Oksidatif stres, hedef biyomoleküllere yönelik oksidatif saldırıya karşı endojen sistemlerin kapasitesinin azalmasıyla karakterize edilen, gelişmiş bir ROS/RNS nesilinden veya antioksidan koruyucu kabiliyetinin bozulmasından ortaya çıkar (Lopez-Alarcon ve Denicola, 2013; Pisoschi ve Pop, 2015).

2.6.2. Antioksidanlar

Hücrelerin içindeki antioksidan enzimler serbest radikallere karşı önemli bir savunmadır. Doğal antioksidan sistemi, enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan oksidanlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır (Şekil 2.6). Enzimatik antioksidanlar, birincil ve ikincil enzimatik savunmalara ayrılırlar. Birincil savunma, ROS oluşumunun ve oksidasyonun önlenmesinden sorumlu ana enzimatik temizleyiciler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyondur. SOD₂ oksijen esaslı organizmalarda bulunur ve başlıca işlevi, süperoksidin hidrojen peroksit ile bozunmasını katalizlemektir. Bu reaksiyon serbest radikallerin daha fazla üretilmesini önlediği için genellikle vücudun birincil antioksidan savunması olarak düşünülmektedir (Halliwell, 1996; Scheibmeir ve diğerleri, 2005). Katalaz, glutatyon peroksidazı, süperoksitten türetilen H₂O₂ oluşumunu katalize ederek oksijen reaktif radikallerinin detoksifiye edilmesini sağlar. Karaciğer, böbrek ve kırmızı kan hücreleri, vücuttaki kimyasal maddelerin detoksifikasyonuna yardımcı olan yüksek düzeyde katalaz içermektedir. Glutatyon da, çeşitli detoksifikasyon süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Glutatyon, bir hidrojen atomu vererek serbest radikaller, özellikle hidroksil radikali ile kolayca etkileşime girmektedir. Bu reaksiyon, kanser de dâhil olmak üzere, serbest radikal patolojisinin önemli bir kaynağı olduğu düşünülen reaktif hidroksil köklerini nötralize ederek koruma sağlamaktadır (Clark, 2002; Scheibmeir, 2005).

İkincil enzimatik savunma glutatyon redüktaz ve glikoz-6-fosfat dehidrojenaz içerir. Glutatyon redüktaz, glutatyonu (oksitlenmeden önce) indirgeyerek serbest radikalleri nötralize etmeye devam ettirir. Glikoz-6-fosfat, indirgeyici bir ortam yaratan NADPH'yi (anabolik reaksiyonlarda kullanılan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat- koenzim) yeniden üretmektedir. Bu iki enzim serbest radikalleri doğrudan nötralize etmez, ancak diğer endojen antioksidanlara destekleyici rolleri bulunmaktadır (Ratnam, Ankola, Bhardwaj, Sahana ve Kumar, 2006; Carocho ve Ferreira, 2013).



Şekil 2.6. Doğal antioksidanların sınıflandırılması (Carocho ve Ferreira, 2013)

Sentetik antioksidanlar, doğal antioksidanlar ile karşılaştırmak ve gıdaya dâhil etmek için geliştirilmiştir. Bu saf bileşikler gıdaya eklenerek çeşitli muamele ve koşullara dayanabildiği gibi raf ömrünü de uzatabilmektedirler. Sentetik antioksidanların ana odağı, gıda oksidasyonu, özellikle yağ asitlerinin önlenmesine yöneliktir. Bugün, işlenmiş gıdaların neredeyse tamamı sentetik antioksidanlar içermekte ve bazı çalışmalarda aksini belirtmekle birlikte güvenli olduğu bildirilmektedir (EFSA, 2011; Carocho ve Ferreira, 2013).

2.6.3. Probiyotiklerin ve prebiyotiklerin antioksidan aktiviteleri

Antioksidanlar, hücrelerde oluşan serbest radikallerle etkileşime giren ve temel moleküllere hasar vermeden önce zincir reaksiyonunu sonlandıran moleküllerdir. Tüm bu moleküller, oksidasyon sürecinin bir inhibitörü olarak hareket ederek vücutta çeşitli fizyolojik rolleri yerine getirirler. Antioksidanlar serbest radikal ara maddelerini kaldırarak zincir reaksiyonlarını sonlandırır ve serbest radikalleri nötralize ederek diğer oksidasyon reaksiyonlarını inhibe ederler. Bununla birlikte, işlem sırasında, antioksidanlar kendileri oksitlenir. Dolayısıyla, tek bir serbest radikal ile reaksiyona girebilen bir antioksidan molekülün yenilenmesi için, sürekli olarak antioksidan kaynaklarına ihtiyaç vardır (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Mishra ve diğerleri, 2015).

Hücrel oksidatif hasar; yaşlanma, inflamasyon (örneğin artrit), karsinogenez, amfizem, siroz ve ateroskleroz gibi patolojik ve biyolojik süreçlerle ilişkilidir (Lin ve Yen, 1999). Probiyotik suşlar, oksidatif strese karşı koruma sağlayabilir, ROS birikimi riskini azaltabilir ve vücudun toplam antioksidan durumunu iyileştirebilirler (Songisepp ve diğerleri, 2005; Su ve diğerleri, 2015). Çalışmalarda, LAB'nin antioksidan aktivitesinin probiyotik özellik açısından önemli olduğu vurgulanmaktadır (Songisepp ve diğerleri, 2005; Kuda, Kawahara, Nemoto, Takahashi ve Kimura, 2014; Han, Kong, Chen, Sun ve Zhang, 2017).

Prebiyotikler bağışıklık hücresi reseptörleri ile etkileşerek, endositoz ile fagositozun yanı sıra çok sayıda sitokin ve kemokinlerin üretimine karışarak bağışıklığı doğrudan etkileyebilirler (Di Bartolomeo, Startek ve Van Den Ende, 2013). Bazı çalışmalar, inülin ve oligofruktozun, kolondaki bakteriler ve anormal hücrelere karşı sistemik bağışıklığı da arttırabileceğini ve aynı zamanda dalak hücrelerinin doğal öldürücü hücre aktivitesini ve makrofajların fagositik aktivitesini arttırabileceğini ileri sürmüşlerdir (Buddington, Donahoo ve Buddington, 2002; Kelly-Quagliana, Nelson ve Buddington, 2003). Ayrıca inülinin, çok çeşitli antijenlere karşı humoral ve hücrel immün tepkilerini arttırdığı, Th1 ve Th2 lenfositlerini uyarak kuvvetli bir tamamlayıcı aktivatör olarak hareket ettiği bildirilmiştir (Silva, Cooper ve Petrovsky, 2004).

Hayvan hücreleri normal fizyolojik koşullar altında reaktif oksijen türleri (ROS) üretirler, bunlara karşın vücutta birkaç antioksidan savunma mekanizması tasarlanmıştır. Glutasyon peroksidaz (GPX) ve katalaz (CAT) antioksidan savunma sisteminin iki ana antioksidan enzimidir. Malondialdehid (MDA) konsantrasyonu GPX aktivitesi ile ilişkilidir ve genellikle vücudun oksidatif durumda olup olmadığını değerlendirmek için belirlenir (Sabzi, Mohammadiarzam ve Salati, 2017). Bitkisel protein düzeylerinin yengeçler üzerindeki etkisini saptamak için, farklı bitki protein düzeyleri ile uygulanan yengeçlerin antioksidan durumu incelenmiştir. %0,2 FOS ile takviye edilen tüm gruplarda, en yüksek CAT aktivitesi ve en düşük MDA konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu çalışmayla diyet FOS'un antioksidan sistemi uyurabildiğini ve dolayısıyla bağışıklık yanıtlarını içerdiği gösterilmiştir (Jia ve diğerleri, 2017). Ines ve diğerleri (2015), FOS ile takviye edilmiş bitki besin maddelerinin, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini azaltabildiğini, ancak FOS'un Avrupa levreği (*Dicentrarchus labrax*) üzerinde oksidatif durumunun çok az etkiye sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Ancak, bugüne kadar, FOS ile beslenen

yenidoğarlardaki büyüme, bağışıklık ve hastalıklara karşı desteklenmiş bitki besin maddeleri ile ilgili bir rapor bulunmadığı ve bu nedenle daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir.

Tavuk diyetlerine mannan oligosakkaritlerin dâhil edilmesi, bağışıklık fonksiyonunu ve bağırsak mukoza tabakasının ve bağırsak mikrobiyota çeşitliliğinin gelişimini artırabildiği rapor edilmiştir (Pourabedin ve diğerleri, 2015). Bir başka ticari prebiyotik aktif bileşen olan beta-glukanın da, doğal bağışıklığı ve vücut büyümesini geliştirerek piliçlerde fayda sağladığı ifade edilmiştir (Chae ve diğerleri, 2016).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteriler

Çalışmada izolasyon materyali olarak Ankara ili ilçelerinin 7 farklı bölgesinden temin edilen serbest dolaşan tavukların dışkıları kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyeri ve çözeltiler

Lactobacillus cinsine ait bakterilerin geliştirilmesinde, ekzopolisakkarit (EPS) üretiminde MRS sıvı besi ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.1). *Streptococcus* cinsine ait bakterilerin geliştirilmesinde, ekzopolisakkarit (EPS) üretiminde ise Elliker sıvı besi ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Uygun sıvı besiyerinde, 37°C’de 48 saat geliştirilen kültürler, en az iki kez aktifleştirildikten sonra çalışmaya alınmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan MRS besiyerinin içeriği

Maddeler	Miktar (g/L)
Pepton	10,0
Yeast ekstrat	5,0
Beef ekstrat	10,0
Glikoz	20,0
Di potasyum fosfat	2,0
Sodyum asetat	5,0
Manganez sülfat	0,05
Magnezyum sülfat	0,2
Amonyum sitrat	2,0
Tween 80	1,08 mL

Çalışmada kullanılan MRS besiyeri için, maddeler distile su ile 1000 mL’ye tamamlanıp, 1 M HCl ve/veya 1 M NaOH ile pH’sı $6,2 \pm 0,02$ ’ye ayarlanmıştır. Besiyerinin katı formunun hazırlanılması durumunda %1,5 oranında Agar (Merck) ilave edilmiştir. Besiyerleri otoklavda 121°C’ de 15 dakika sterilizasyonu yapılmıştır.

Çizelge 3.2. Elliker sıvı besiortamı içeriği

Maddeler	Miktar (g/L)
Trypton	20,0
Yeast ekstrast	5,0
Dekstroz	5,0
Laktoz	5,0
Sakkaroz	5,0
Sodyum klorit	4,0
Sodyum asetat	1,5
Askorbik asit	0,5

Çalışmada kullanılan Elliker besiyeri için, maddeler distile su ile 1000 mL'ye tamamlanıp, 1 M HCl ve/veya 1 M NaOH ile pH' sı $6,8 \pm 0,02$ 'ye ayarlanmıştır. Besiyerinin katı formunun hazırlanılması durumunda %1,5 oranında Agar (Merck) ilave edilmiştir. Besiyerinin otoklavda 121°C' de 15 dakika sterilizasyonu yapılmıştır.

Araştırmada biyofilm çalışmalarında test bakterisi olarak Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Staphylococcus aureus* EB1, *S. aureus* EB18, *S. aureus* ATCC 25923, *S. enteridis* ATCC 13076, *Streptococcus mutans* CNCT 8177, *Salmonella* Typhimurium CCM 5445, *S. Typhimurium* MU80 kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan test bakterilerinin geliştirilmesi için Nutrient sıvı besiyeri (Merck) kullanılmıştır. Biyofilm ve antibiyofilm çalışmalarında kullanılan bu patojen mikroorganizmalar, Nutrient sıvı besiyeri (Merck) içerisinde 37°C'de 48 saat geliştirilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan fosfat tamponu için Çizelge 3.3' de verilen maddeler tartılarak distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmış ve pH'sı 1 M HCl ve 1 M NaOH ile 6,2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'e 15 dakika sterilizasyonu yapılmıştır.

Çizelge 3.3. Fosfat Tamponu (PBS) içeriği

Maddeler	Miktar (g/L)
NaCl	8,00
K ₂ HPO ₄	1,21
KH ₂ PO ₄	0,34

3.2. Metot

3.2.1. İzolasyon

Araştırmada Ankara ili ilçelerinden temin edilen farklı tavuk dışkılarından 5 gram olarak alınan örnekler 45 mL’lik Serum Fizyolojik (%0,9) içerisinde vortex yardımı ile karıştırılmıştır. Daha sonra 900 µL’lik hazırlanan fizyolojik su içerisine örnekten 100 µL ilave edilerek örneğin farklı dilüsyonları hazırlanmıştır. Örneğin hazırlanan 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7} dilüsyonlardan 100’er µL drigalski ile MRS Agar ve Elliker Agar bulunan plaklara ekim yapılmıştır. Ekimden sonra petriler etüvde 37°C’ de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonunda *Lactobacillus* cinsine ait olduğu düşünülen bakterileri kolonileri MRS Broth’a, *Streptococcus* cinsine ait olduğu düşünülen koloniler Elliker Broth’a alınarak 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda tüm örneklerden Gram boyama ve katalaz testi yapılarak uygun katı besi ortamına ekim yapılmıştır. İnkübasyondan sonra *Lactobacillus* ve *Streptococcus* kolonilerine benzeyen koloniler tekrar seçilerek Gram boyama ile doğrulandıktan sonra bu kolonilerden uygun (MRS veya Elliker) sıvı besi ortamına alınmıştır (Gomez ve diğerleri, 2002).

Bakteriler uygun (MRS veya Elliker) sıvı besi ortamında art arda iki kez aktifleştirilmiştir. 0,9 mL gliserol (Merck) kapaklı cryo tüpler içerisinde 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilizasyonu yapılmıştır. Aktifleştirilen kültürlerden 0,9 mL alınarak steril gliserol içeren tüplere ilave edilip, -80°C ve -30°C’ de paralelli olarak saklanmıştır. Muhafazaya alınan stoklar altı ayda bir yenilenmiştir (Hernandez ve diğerleri, 2016).

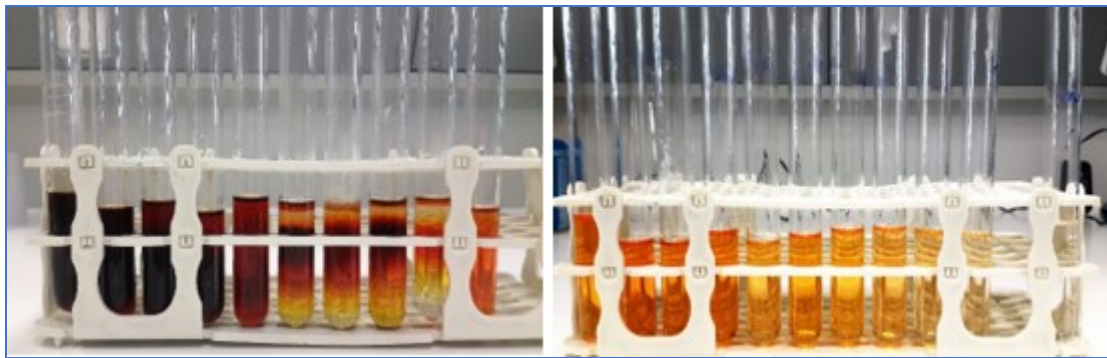
Bakterilerin sayımı

Dışkıların dilüsyon ekimleri sonucu *Lactobacillus*’lar için seçici besiyeri olan MRS besiyeri üzerinde gelişen beyaz ve solgun renkli koloniler ve *Streptococcus*’lar için seçici besiyeri olan Elliker besiyeri üzerinde gelişen beyaz ve solgun renkli koloniler belirlenerek sayımları yapılmış, bakteri sayıları (kob/g) ‘‘Eş 3.1’’ kullanılarak hesaplanmıştır (Fajardo ve diğerleri, 2012).

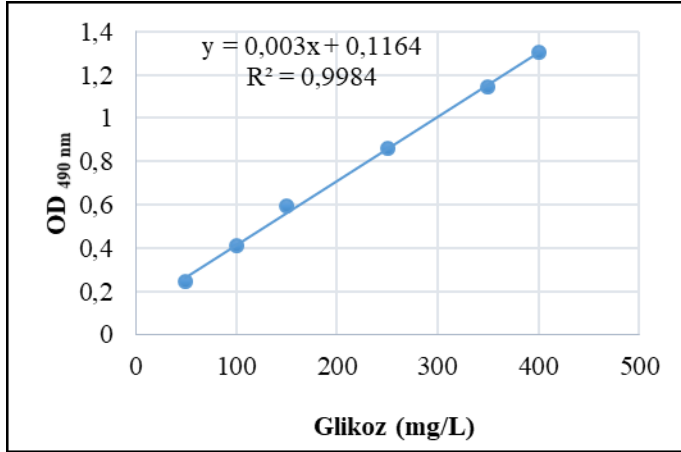
$$(\text{kob/g}) = (\text{Ortalama Koloni sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü}) / \text{Petri kutularına aktarılan inokulum miktarı (0,1 mL)} \quad (3.1)$$

3.2.2. Bakterilerin EPS üretimlerinin belirlenmesi

Aktif kültürlerin optik yoğunlukları McFarland cihazında (Biosan Den-1) 7'ye ayarlanarak, mikrofüj tüpü içerisine 1 mL alınmış ve 95°C' de 10 dakika ısıtılmıştır. Örnekler soğuduktan sonra 1,7 µL TCA (trikloroasetik asit) eklenerek yarım saat bekletilerek, 4°C'de 13000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni mikrofüj tüpüne alınarak üzerine 1(örnek):3(alkol) oranında %96'lık etanol eklenmiştir. Bu aşamada iki paralel olacak şekilde örnekten mikrofüj tüplerine 500 µL alınmış, üzerine 1,5 mL etanol eklenmiştir. 4°C'de 13000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında dipte kalan pelletin üzerine 500 µL etanol eklenerek aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası mikrofüj tüpleri 24 saat etüv içerisinde bekletilmiştir. Alkolün uçurulup kuruması sağlandıktan sonra 500 µL olarak ayrılan örnekler 500 µL deiyonize suda çözülerek 1 mL olacak şekilde tek bir mikrofüj tüpünde toplanmıştır (Tsuda ve diğerleri, 2008). Örneklerin üzerine 0,5 mL fenol (Sigma) ve 5 mL sülfirik asit (Merck) eklenerek, oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra, iyice vortekslenerek 37°C'de 20 dakika bekletilmiştir. Örneklerin optik yoğunlukları, 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Dubois ve diğerleri, 1956). Kültürlerin ürettiği EPS miktarlarını hesaplamak için 5-100 mg/L arasında değişen oranlarda (Resim 3.1) glikoz çözeltisi kullanılarak bir standart çıkarılmış ve bu standarta göre üretilen EPS miktarı mg/L cinsinden belirlenmiştir (Şekil 3.1).



Resim 3.1. 5-100 mg/L arasında değişen standart glikoz çözeltileri



Şekil 3.1. Glikoz standart eğrisi

3.2.3. Moleküler tanımlama

Tavuk dışkısından izole edilen 44 izolatın 3.2.2’de anlatılan spektrofotometre yöntemiyle EPS miktar tayinleri yapılmıştır. Yüksek EPS üretimine sahip 2 *Lactobacillus* spp. (KC27L/KC66L) ile düşük EPS üretimine sahip 2 *Lactobacillus* spp. (KC21L/KC76L) seçilmiş ve 16S rRNA ile moleküler olarak tanımlanmıştır. Seçilen 4 izolatın DNA izolasyonu, Thermo Scientific DNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları Andrabi ve diğerlerinin (2016) metodu modifiye edilerek aşağıda verildiği gibi yapılmıştır:

5 µL kalıp DNA, 5 µL 10x PCR Buffer Mg free, 5 µL MgCl₂ Buffer, 4 µL Taq DNA Polimeraz, 1,5 µL 10 pmol ileri primeri (Uni 27 F), 1,5 µL 10 pmol geri primeri (Uni1492 R), 1 µL dNTP Mix karışımı steril dH₂O ile 50 µL’ye tamamlanmıştır.

- Başlangıç denatürasyonu 94°C’de 4 dakika
- 35 döngü 94°C’de 45 saniye (denatürasyon için)
- Bağlanma sıcaklığı 59°C’de 45 sn,
- Uzatma sıcaklığı 72°C’de 1 dakika boyunca,
- Nihai uzatma 72° C’de 5 dak.

DNA dizi analizleri REFGEN’de genetik analizör cihazında hizmet alımı olarak yaptırılmıştır. Analiz sonuçları BLAST fonksiyonu ile NCBI (National Center for

Biotechnology Information) Gen Bankasında taranarak moleküler tanımlamaları yapılmıştır.

3.2.4. EPS liyofilizasyonu

Yüksek EPS üretimine sahip *Lactobacillus salivarius* KC27L, *L. salivarius* KC66L ve düşük EPS üretimine sahip *L. salivarius* KC76L ve *L. reuteri* KC21L suşlarının ürettikleri EPS'lerinin liyofilizasyonu Tsuda ve diğerleri'nin (2008), metoduna göre yapılmıştır.

- Aktif kültürlerin optik yoğunlukları McFarland cihazında 7'ye ayarlanarak, 800 mL MRS sıvı besiyerlerine %2 oranında aşılanmış, 37°C'lik etüvde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyondan sonra, endojen enzimleri inaktive etmek için sıcak su banyosunda 80°C'de 10 dk boyunca ısıtılmıştır.
- Soğuyan örnekler %4 oranında %80'lik Trikloroasetik asit (TCA) eklenerek, 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmış, proteinler çöktürülmüştür.
- 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım toplanarak üzerine 1(örnek):3(alkol) oranında %96'lık alkol eklenerek +4°C'de 1 gece bekletilmiştir.
- Bu karışım 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek EPS'ler toplanmıştır. Toplanan EPS'ler 1 mL ultra distile saf suda çözündükten sonra, penisilin şişelerine alınıp en az 1 gece -80°C'de bekletilmiştir.
- Saflaştırılmış EPS'ler liyofilizatör cihazında (CHRIST alpha 2-4 LD plus, Resim 3.2), dondurulup kurutularak toz haline getirilmiştir.
- Liyofilizasyondan sonra penisilin şişeleri içinde bulunan EPS'ler (I-EPS) çalışmaya alınmıştır.

Liyofilize edilmiş EPS'lerde miktar tayini

L. salivarius KC27L, *L. salivarius* KC66L, *L. salivarius* KC76L ve *L. reuteri* KC21L suşlarına ait EPS'ler 3.2.2'de anlatıldığı gibi izole edilip, liyofilizasyon işlemi ile toz haline getirilmiştir. I-EPS'lerin miktarlarını belirlemek için, her bir penisilin şişesinde bulunan I-EPS'ler 1 mL distile suda çözülmüştür. I-EPS'lerin miktarları, 3.2.2'de verilen metoda göre fenol-sülfirik asit metodu ile yapılmıştır.



Resim 3.2. Liyofilizatör cihazı (CHRIST alpha 2-4 LD plus)

3.2.5. l-EPS'lerin karakterizasyonu

EPS'lerin monomer kompozisyonunun araştırılması (HPLC)

En yüksek EPS üretimine sahip *Lactobacillus salivarius* KC27L 3.2.2'deki gibi izole edilen l-EPS'lerin monomer kompozisyonu HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografi) ile ODTÜ Merkez Laboratuvarında (analiz edilen şekerler: glikoz, galaktoz, mannoz, sükroz ve arabinoz); hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir.

EPS'lerin bağ yapılarının araştırılması (NMR)

En yüksek EPS üretimine sahip *L. salivarius* KC27L suşundan izole edilen l-EPS'lerin molekül bağ yapısının belirlenmesi, ¹H-NMR (nükleer manyetik rezonans) ile Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir.

EPS'lerin molekül ağırlıklarının araştırılması (SEC)

En yüksek EPS üretimine sahip *L. salivarius* KC27L suşundan izole edilen l-EPS'lerin molekül ağırlığının belirlenmesi, SEC analizi (büyüklükçe ayırma kromatografisi) ile Bilkent UNAM'da hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Antimikrobiyal aktivite

Antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi Reinheimer ve diğ erleri'nin (1990) metoduna göre yapılmıştır (Reinheimer ve diğ erleri, 1990).

Antimikrobiyal aktivite çalışmasında materyal olarak, EPS  etimi yüksek *L. salivarius* KC27L, *L. salivarius* KC66L ve EPS  etimi düşük *L. salivarius* KC76L, *L. reuteri* KC21L suşlarının bakteri süspansiyonları, kültür filtratları, bu bakterilerden elde edilen l-EPS'leri (0,5 ve 1 mg/mL), bakteri+0,5 ve 1 mg/mL l-EPS'leri ile kontrol grubu olarak ticari bir prebiyotik olan inülin (0,5 ve 1 mg/mL) kullanılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Enterococcus faecalis* 29212 ve *Staphylococcus aureus* EB1 test bakterileri olarak kullanılmıştır.

- Test bakterileri Nutrient sıvı besi ortamında aktifleştirilmiştir. Aktif kültürler McFarland 0,5'e ayarlanarak, steril petri kabı üzerine 100  L aktarılmıştır.
- Bu işlemden sonra, daha önceden hazırlanıp 121 C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiş ve yaklaşık olarak 50 C'ye kadar soğutulmuş olan Nutrient katı besiyerinden her petri kabına 20 mL ilave edilip, besi ortamı ve petri kabı zeminine inoküle edilen test bakterilerinin homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır.
- Homojenlik sağlandıktan sonra petri kabı içerisindeki Nutrient katı besiyerinin donması için 2 saat buzdolabında bekletilmiştir.
- Donan katı besiyeri üzerinde 7 mm çapındaki steril çubukla kuyular açılmıştır. Kuyuların tabanları steril agarla tekrar sıvanmıştır.
- Daha sonra ayrı plaklarda açılan kuyulara; KC27L KC66L, KC76L ve KC21L suşlarına ait, bakteri süspansiyonlarından 200  L, kültür filtratından 200  L, 0,5-1 mg/mL l-EPS'lerden 200  L, bakteri+0,5 mg/mL l-EPS (1:1), bakteri+1 mg/mL l-EPS (1:1), 0,5 ve 1 mg/mL in linden 200  L ayrı ayrı ilave edilmiş ve 37 C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda kuyu çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile ölçülmüş, sonuçlar milimetre olarak verilmiştir.

3.2.7. Bazı patojen bakteri suşlarının biyofilm yapma oranlarının belirlenmesi

Kongo red yöntemi

Kongo red yöntemiyle, Biyoteknoloji laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan 12 patojen bakterinin (*Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 11229, *E. coli* ATCC 35218, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Staphylococcus aureus* EB1, *S. aureus* EB18, *S. aureus* ATCC 25923, *Salmonella enteridis* ATCC 13076, *Streptococcus mutans* CNCT 8177, *Salmonella* Typhimurium CCM 5445, *S. Typhimurium* MU80) biyofilm yapma yeteneklerinin fenotip olarak değerlendirilmesinde, Arciola ve diğerleri'nin (2002), kullandıkları metot uygulanmıştır. Bu yöntemde, Brain Heart Infusion sıvı besiyerine 10 g agar ve 50 g süktroz ilave edilerek, 121°C'de 15 dakika steril edilmiş ve sıcaklığı 55°C'ye düştüğünde, 8 g/L olarak çözünmüş Kongo red solüsyonu (Merck) besiyerine ilave edilmiştir. Aktif hale getirilmiş 12 patojenin, kırmızı renkli katı besiyerine çizgi ekimleri yapılmıştır. 37°C'de 24 saat aerobik ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, kırmızı renkli katı besiyeri üzerinde siyah renkli koloni oluşturan bakteriler güçlü (++), kırmızı renkli koloni oluşturanlar zayıf (+) olarak değerlendirilmiştir.

Mikro plak yöntemi

12 patojen bakterinin biyofilm yapma oranlarının mikro plak yöntemi ile belirlenebilmesi için Sayem ve diğerleri'nin (2011) kullandığı metotta bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır.

- Patojen kültürlerin optik yoğunlukları McFarland 0,5'e ayarlanıp, 96 kuyulu plağa 200 µL eklenmiştir. Kontrol grubu olarak steril Nutrient sıvı besiyeri kullanılmıştır. Plaklar statik bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır.
- Biyofilm oluşumunu tespit edebilmek için, inkübasyon sonrasında kuyucuklardaki sıvı faz uzaklaştırılmış ve kuyular steril distile su ile 5 kez yıkanarak zayıf bağlanmış bakteriler uzaklaştırılmıştır.

- Plak 45 dk havada kurumaya bırakıldıktan sonra, her bir kuyuya 200 μ L %1'lik kristal viyole solüsyonu eklenmiş ve 45 dakika boyunca boyanması sağlanmıştır. Daha sonra boya kuyulardan atılmış ve kuyular 5 kez steril distile su ile yıkanmıştır.
- Kuyuların boyayı bırakması için, kuyulara 200 μ L etanol-aseton solüsyonu (4:1) eklenmiş ve 15 dk bekletilmiştir. Bu süre sonunda, plaklar mikropalak okuyucuda (Epoch, Biotek Resim 3.3) 570 nm'de okutulmuştur. Bakterilere ait OD değerlerinden kontrol grubunun OD değeri çıkartılarak biyofilm oluşumu belirlenmiştir. Bakterilerin biyofilm yetenekleri kendi aralarında kuvvetli ve zayıf biyofilm oluşturanlar olarak gruplandırılmıştır.



Resim 3.3. Mikropalak okuyucu (Epoch, Biotek)

3.2.8. Antibiyofilm aktivite

Antibiyofilm madde olarak en yüksek EPS üretimine sahip olan *L. salivarius* KC27L ve *L. salivarius* KC66L ile en düşük EPS üretimine sahip *L. salivarius* KC76L ve *L. reuteri* KC21L suşlarına ait, bakteri süspansiyonları, kültür filtratları, bakterilerden elde edilen 0,5 ve 1 mg/mL I-EPS'leri ve bakteri+0,5-1 mg/mL I-EPS'leri ve ticari bir prebiyotik olan 0,5 ve 1 mg/mL inülin kullanılmıştır. Mikropalak yöntemine göre biyofilm yapma oranları belirlenen patojen bakterileri içinde en yüksek biyofilm yapma yeteneğine sahip *Escherichia coli* ATCC 11229, *Enterococcus faecalis* 29212 ve *Staphylococcus aureus* EB1 test bakterileri, antibiyofilm deneyinde kullanılmıştır.

L. salivarius KC27L, *L. salivarius* KC66L, *L. salivarius* KC76L ve *L. reuteri* KC21L bakteri süspansiyonları McFarland 7'ye ayarlanarak 96 kuyulu plaklara 20 μ L aktarılmıştır. Bunların üzerlerine, optik yoğunlukları McFarland 0,5'e ayarlanan patojen bakteri kültürlerinden 180 μ L ilave edilmiştir. Kontrol gruplarında 20 μ L serum fizyolojik kullanılmıştır.

L. salivarius KC27L, *L. salivarius* KC66L, *L. salivarius* KC76L ve *L. reuteri* KC21L suşlarına ait kültür filtratları 96 kuyulu plaklara 20 µL aktarılmıştır. Bunların üzerlerine, optik yoğunlukları McFarland 0,5'e ayarlanan patojen bakteri kültürlerinden 180 µL ilave edilmiştir. Kontrol gruplarında 20 µL MRS besiyeri kullanılmıştır.

L. salivarius KC27L, *L. salivarius* KC66L, *L. salivarius* KC76L ve *L. reuteri* KC21L suşlarından izole edilen liyofilize EPS'ler (l-EPS) suda çözülmüştür. 96 kuyulu plaklara l-EPS'lerden 20 µL aktarılmıştır ve bunların üzerlerine aktif kültürlerinin optik yoğunlukları McFarland 0,5'e ayarlanan patojen bakteri kültürleri 180'er µL ilave edilmiştir (son hacim 0,5 veya 1 mg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır). Kontrol gruplarında 20 µL steril distile su kullanılmıştır.

L. salivarius KC27L, *L. salivarius* KC66L, *L. salivarius* KC76L ve *L. reuteri* KC21L bakteri süspansiyonları McFarland 7'ye ayarlanarak 96 kuyulu plaklara 10 µL konulmuş, suda çözülmüş liyofilize EPS'ler (l-EPS) 96 kuyulu plaklara 10 µL aktararak (son hacim 0,5 veya 1 mg/mL olacak şekilde) toplam hacim 20 µL'ye ayarlanmıştır. Aktif kültürlerinin optik yoğunlukları McFarland 0,5'e ayarlanan patojen bakteri kültürleri 180'er µL ilave edilmiştir. Kontrol gruplarında 10 µL steril distile su, 10 µL serum fizyolojik kullanılmıştır.

Liyofilize EPS'lerde olduğu gibi inülinin antibiyofilm aktivitesinde de, inülin steril distile su içerisinde çözülmüştür. 96 kuyulu plaklara 20 µL aktarılmıştır ve bunların üzerlerine aktif kültürlerinin optik yoğunlukları McFarland 0,5'e ayarlanan patojen bakteri kültürlerinden 180'er µL ilave edilmiştir (son hacim 0,5 veya 1 mg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır). Kontrol grubu olarak 20 µL steril distile su kullanılmıştır.

Yukarıdaki gibi hazırlanan deney ve kontrol grupları 24 saat statik bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Biyofilm oluşumunu hesaplayabilmek için, kuyulardaki planktonik hücre fraksiyonu yeni bir plak içerisine aktarılıp, mikropalak okuyucuda 570 nm'de ölçüm yapılmıştır. Antibiyofilm inhibisyonunun yüzde oranını hesaplamak için "Eş. 3.2" kullanılmıştır (Chaieb ve diğerleri, 2011).

$$\% \text{Biyofilm İnhibisyonu} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.9. Antioksidan aktivite

DPPH radikalini giderme etkisinin belirlenmesi

En yüksek EPS üretimine sahip olan *L. salivarius* KC27L ve *L. salivarius* KC66L ile en düşük EPS üretimine sahip *L. salivarius* KC76L ve *L. reuteri* KC21L suşlarına ait, bakteri süspansiyonları, kültür filtratları, bakterilerden elde edilen 0,5 ve 1 mg/mL l-EPS'leri, bakteri+0,5-1 mg/mL l-EPS'leri ve ticari bir prebiyotik olan 0,5 ve 1 mg/mL inülin kullanılarak aşağıda verilen yönteme göre DPPH radikalini giderme etkisi tespit edilmiştir.

- Bakteriler, iki defa aktifleştirilmiştir.
- İnkübasyon sonunda örnekler fosfat tamponu (PBS pH=6,2) ile 4000 rpm'de 30 dakika iki defa yıkama işlemi uygulanmıştır.
- Yıkanmış pellet 10 mL PBS içerisinde McFarland 7'ye ayarlanmıştır.
- 4000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası süpernatant dökülüp pellet 1 mL PBS ile süspanse edilip örneklerin üzerine 1 mL DPPH eklenerek, karanlık ortamda 1 saat bekletilmiştir.
- Bekleme sonunda örnekler 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilip süpernatantlar 517 nm'de spektrofometrik olarak ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Li ve diğerleri, 2012).

Suşların % DPPH radikalini gideriminin hesaplanması, “Eş. 3.3” kullanılarak yapılmıştır.

$$\% \text{ Süpürücü Aktivite} = [1 - (A_{\text{örnek}} - A_{\text{körve}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (3.3)$$

Körve= PBS çözeltisi; Kontrol= PBS çözeltisi ve DPPH çözeltisi

Demir (Fe²⁺) iyonu şelatlama aktivitesinin belirlenmesi

En yüksek EPS üretimine sahip olan *L. salivarius* KC27L ve *L. salivarius* KC66L ile en düşük EPS üretimine sahip *L. salivarius* KC76L ve *L. reuteri* KC21L suşlarına ait, bakteri süspansiyonları, kültür filtratları, bakterilerden elde edilen 0,5 ve 1 mg/mL l-EPS'leri, bakteri+0,5-1 mg/mL l-EPS'leri ve ticari bir prebiyotik olan inülin (0,5 ve 1 mg/mL) kullanılarak Demir (Fe²⁺) iyonu şelatlama aktivitesi aşağıda verilen yönteme göre belirlenmiştir.

Bakteriler MRS sıvı besi ortamında 24 saat inkübe edilerek iki kez ard arda aktifleştirilmiştir. Daha sonra örnekler PBS ile 4000 rpm’de 30 dakika 2 defa yıkama işlemi uygulanmıştır. Yıkanmış pellet 10 mL PBS içerisinde McFarland 7’ye ayarlanmıştır. 4000 rpm’de 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant dökülüp pellet 1 mL PBS ile süspanse edilip örneklerin üzerine 2 mM 0,05 mL FeCl₂ ilave edilmiştir. 5 mM 0,2 mL ferrozin eklenerek reaksiyon başlatılıp, örnekler karanlık ortamda 10 dakika bekletilmiştir. Bekleme sonunda örnekler 4000 rpm’de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Şelatlama aktivitesi 562 nm dalga boyunda yapılan ölçüm sonucu optikal yoğunluktaki azalma belirlenerek hesaplama yapılmıştır (Decker ve Welch, 1990).

Şelatlama aktivitesinin hesaplanması, “Eş. 3.4” kullanılarak yapılmıştır.

$$\% \text{ Demir iyonu şelatlama yeteneği} = [1 - (OD_2 / OD_1)] \times 100 \quad (3.4)$$

Formülde verilen OD₂ değeri ortamda sadece kompleks oluşturan maddeler olan ferrozin ve Fe⁺² iyonlarının varlığındaki kontrol numunesinin absorbens değeridir. OD₁ ise çalışmada kullanılan standart antioksidanların absorbens değeridir.

Süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesi

En yüksek EPS üretimine sahip olan *L. salivarius* KC27L ve *L. salivarius* KC66L ile en düşük EPS üretimine sahip *L. salivarius* KC76L ve *L. reuteri* KC21L suşlarına ait, bakteri süspansiyonları, kültür filtratları, bakterilerden elde edilen 0,5 ve 1 mg/mL l-EPS’leri, bakteri+0,5-1 mg/mL l-EPS’leri ve ticari bir prebiyotik olan 0,5 ve 1 mg/mL inülinin süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesi Wang ve diğerleri’nin (2015) metodu kullanılarak tespit edilmiştir.

MRS sıvı besiyerinde iki kez aktifleştirilen kültürlerin yoğunluğu PBS içerisinde McFarland 7’ye ayarlanmıştır. Yoğunluğu ayarlanan örnekler 13000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant dökülüp pellet 1 mL PBS ile süspanse edilmiştir. Süspanse edilen örneklerin üzerine 25°C de ısıtılmış 0,2 mL pyrogallol (3 mM) ilave edilmiştir. Karışımın absorbens değeri 325 nm’de ölçülmüş ve yüzde süperoksit anyonu radikalini süpürücü aktivitesi “Eş. 3.5” kullanılarak belirlenmiştir.

$$\% \text{ Süperoksit anyonu radikalinin süpürücü aktivitesi} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (3.5)$$

A_1 : Örneklerin absorbens değeri

A_0 : Örnek içermeyen çözeltinin absorbens değeri

3.2.10. İstatiksel analizler

Tüm çalışmalar 2 paralelli ve 3 tekerrürlü olarak yapılmış ve bulunan değerlerin ortalama sonuçları verilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (16.0 versiyonu, SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Denenen farklı parametrelerde antioksidan aktivitenin belirlenmesinde kullanılan farklı yöntemler arasında farklılığın olup olmadığını belirlemek için tek yönlü-ANNOVA kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. İzolasyon

Çalışma, Ankara iline bağlı 7 ilçeden temin edilen 7 farklı tavuk dışkısından izole edilen 26 *Lactobacillus* ve 18 *Streptococcus* cinsi bakterilerin temin edildiği ilçeler Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan izolatlar ve temin edildikleri ilçe

İzolat	Temin Edildiği İlçe	İzolat	Temin Edildiği İlçe	İzolat	Temin Edildiği İlçe
KC11S	Keçiören	KC57S	Yuva	KC36L	Polatlı
KC21S	Keçiören	KC67S	Yuva	KC46L	Polatlı
KC12S	Memlik	KC77S	Yuva	KC56L	Polatlı
KC13S	Yakacık	KC11L	Keçiören	KC66L	Polatlı
KC23S	Yakacık	KC21L	Keçiören	KC76L	Polatlı
KC14S	İvedik	KC12L	Memlik	KC86L	Polatlı
KC15S	Gölbaşı	KC23L	Yakacık	KC96L	Polatlı
KC25S	Gölbaşı	KC33L	Yakacık	KC116L	Polatlı
KC35S	Gölbaşı	KC43L	Yakacık	KC126L	Polatlı
KC45S	Gölbaşı	KC15L	Gölbaşı	KC136L	Polatlı
KC55S	Gölbaşı	KC25L	Gölbaşı	KC17L	Yuva
KC16S	Polatlı	KC35L	Gölbaşı	KC27L	Yuva
KC17S	Yuva	KC45L	Gölbaşı	KC37L	Yuva
KC27S	Yuva	KC65L	Gölbaşı	KC47L	Yuva
KC47S	Yuva	KC16L	Polatlı		

Bakterilerin sayımı

Çalışmada kullanılan 7 farklı bölgeden toplanan dışkı örneklerinden elde edilen *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinsi izolatların toplam bakteri sayımı kob/g (koloni oluşturan birim/g) ve Log₁₀ (kob/g) olarak hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çalışmada en fazla *Lactobacillus* sayısına Gölbaşı ($8,6 \times 10^7 \pm 0,2$ kob/g) ve Polatlı bölgesinden toplanan ($10,8 \times 10^7 \pm 0,4$ kob/g), en az *Lactobacillus* sayısına ise İvedik bölgesinden toplanan ($5,0 \times 10^6 \pm 0,5$ kob/g) dışkılarda rastlanılmıştır. Toplam bakteri sayımı en fazla olan dışkının, en fazla *Lactobacillus* izolasyonu yapılan Polatlı bölgesinden olduğu belirlenmiştir. Çalışmada en fazla *Streptococcus* sayısına Keçiören bölgesinden toplanan dışkılarda ($8,4 \times 10^7 \pm 0,1$ kob/g) görülmüştür. En fazla *Streptococcus* izolasyonu yapılan dışkının ise Yuva bölgesinden temin edildiği ve toplam bakteri sayımının $13,0 \times 10^6 \pm 0,6$ kob/g olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Dışkılarda toplam bakteri sayımı (kob/g)

Dışkı Örnekleri	Toplam <i>Lactobacillus</i> Sayısı (kob/g)	<i>Lactobacillus</i> Log ₁₀ (kob/g)	Toplam <i>Streptococcus</i> Sayısı (kob/g)	<i>Streptococcus</i> Log ₁₀ (kob/g)
Keçiören	$8,4 \times 10^7 \pm 0,3$	$7,92 \pm 0,1$	$8,4 \times 10^7 \pm 0,1$	$7,92 \pm 0,1$
Memlik	$6,0 \times 10^6 \pm 0,5$	$6,77 \pm 0,4$	$7,5 \times 10^6 \pm 0,6$	$6,87 \pm 0,3$
Yakacık	$20,0 \times 10^6 \pm 0,1$	$7,30 \pm 0,1$	$21,5 \times 10^6 \pm 0,4$	$7,33 \pm 0,4$
Gölbaşı	$8,6 \times 10^7 \pm 0,2$	$8,93 \pm 0,4$	$9,6 \times 10^6 \pm 0,3$	$6,98 \pm 0,1$
Yuva	$9,0 \times 10^6 \pm 0,3$	$7,95 \pm 0,3$	$13,0 \times 10^6 \pm 0,6$	$7,11 \pm 0,2$
Polatlı	$10,8 \times 10^7 \pm 0,4$	$9,03 \pm 0,3$	$7,0 \times 10^6 \pm 0,1$	$6,84 \pm 0,1$
İvedik	$5,0 \times 10^6 \pm 0,5$	$6,69 \pm 0,1$	$10,5 \times 10^6 \pm 0,6$	$7,02 \pm 0,4$

4.2. İzolatların Ekzopolisakkarit (EPS) Üretimleri

Çalışmada kullanılan izolatların kültür ortamındaki EPS üretimleri 3.2.2’de anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Buna göre tüm suşların ürettiği EPS miktarları Çizelge 4.3’de gösterilmiştir. EPS üretim kapasitesi yüksek olan izolatlar *Lactobacillus* spp. KC66L (350 ± 1 mg/L), *Lactobacillus* spp. KC27L (353 ± 6 mg/L), *Streptococcus* spp. KC13S (327 ± 0 mg/L), *Streptococcus* spp. KC25S (292 ± 0 mg/L) iken, düşük EPS üreten izolatlar; *Lactobacillus* spp. KC21L (8 ± 0 mg/L), *Lactobacillus* spp. KC76L (15 ± 3 mg/L), *Streptococcus* spp. KC55S (52 ± 0 mg/L) ve *Streptococcus* spp. KC21S (57 ± 7 mg/L) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. İzolatların EPS üretim miktarları (mg/L)

İZOLAT	EPS (mg/L)	İZOLAT	EPS (mg/L)	İZOLAT	EPS (mg/L)
KC11S	203±5	KC57S	152±4	KC36L	161±0
KC21S	283±8	KC67S	57±7	KC46L	38±7
KC12S	160±0	KC77S	79±3	KC56L	338±0
KC13S	327±0	KC11L	78±7	KC66L	350±0
KC23S	106±3	KC21L	8±0	KC76L	15±3
KC14S	259±0	KC12L	19±0	KC86L	237±4
KC15S	75±8	KC23L	32±0	KC96L	280±0
KC25S	292±0	KC33L	58±0	KC116L	256±0
KC35S	103±2	KC43L	117±0	KC126L	52±0
KC45S	196±9	KC15L	213±0	KC136L	296±9
KC55S	52±0	KC25L	189±0	KC17L	64±2
KC16S	76±0	KC35L	119±0	KC27L	353±6
KC17S	216±0	KC45L	226±0	KC37L	77±2
KC27S	72±0	KC65L	277±6	KC47L	276±6
KC47S	239±9	KC16L	45±1		

Yüksek EPS üretimine sahip 2 *Lactobacillus* spp. (KC27L, KC66L) ile düşük EPS üretimine sahip 2 *Lactobacillus* spp. (KC21L, KC76L) seçilmiş ve izolatların ürettikleri EPS'ler liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonrası örneklerin EPS miktarları 130-376 mg/L arasında bulunmuştur (Çizelge 4.4). Çalışmanın sonuçlarına göre, suşların kültür ortamında belirlenen EPS miktarı ile liyofilizasyon sonrası belirlenen EPS miktarları *Lactobacillus salivarius* KC66L suşu hariç paralellik göstermiştir ve liyofilizasyon sonrası EPS miktarının daha fazla olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.4. Liyofilizasyon öncesi ve sonrasında suşların EPS miktarları

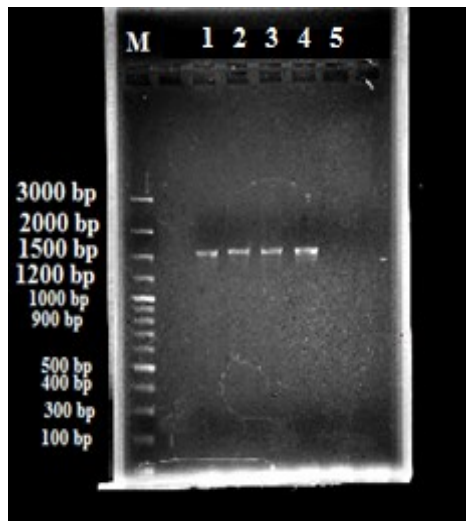
Suşlar	EPS (mg/L)	l-EPS (mg/L)
<i>Lactobacillus salivarius</i> KC66L	350±1	221±5
<i>Lactobacillus salivarius</i> KC76L	15±3	135±3
<i>Lactobacillus salivarius</i> KC27L	353±6	376±4
<i>Lactobacillus reuteri</i> KC21L	8±0	130±2

4.3. Moleküler Tanımlama

Ekzopolisakkarit (EPS) miktarı belirlenen izolatlardan yüksek EPS üretimine sahip 2 izolat (KC27L, KC66L) ile düşük EPS üretimine sahip 2 izolat (KC21L, KC76L) 16 S rRNA analizi ile moleküler düzeyde tanımlama için seçilmiş ve izole edilen DNA'lar PCR analizi yapılarak agaroz jel elektroforezde yürütülerek görüntülenmiştir (Resim 4.1). Bakterilerin moleküler tanımlamaları *RefGen*, *Gen Araştırmaları* ve *Biyoteknoloji Merkezinde* hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. Saflığı (OD_{260/280} nm) 1,62-1,83 arasında değişen DNA'larla yapılan dizi analizi sonuçları BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) fonksiyonu ile NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gen Bankası'nda 1540 baz çifti taranarak moleküler olarak tanımlanmıştır. 4 bakterinin moleküler tanımlaması sonucunda NBCI veri tabanındaki model suşlara %99 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

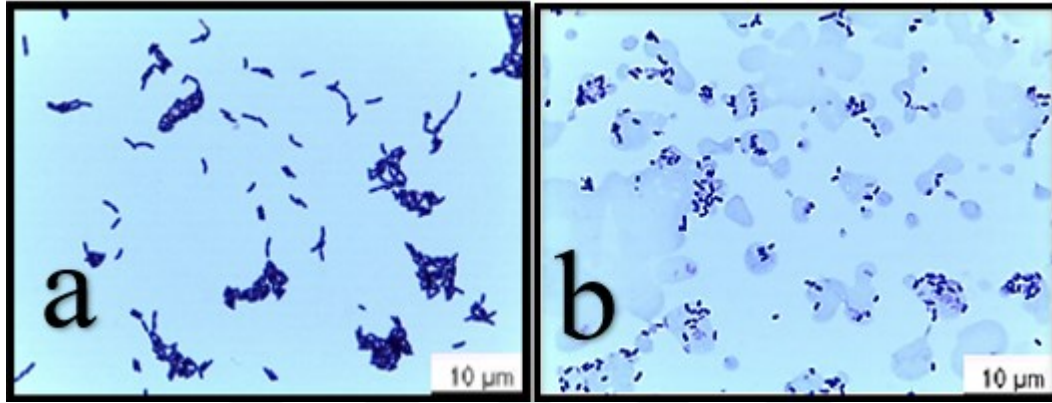
Çizelge 4.5. Bakterilerin 16S rRNA sekanslarının NCBI gen bankası sonuçlarına göre homolojileri

Suş Kodu	Tür adı	EMBL/ Gen Bank No	Homoloji
KC66L	<i>Lactobacillus salivarius</i>	LT852760.1	% 99
KC27L	<i>Lactobacillus salivarius</i>	CP017107.1	% 99
KC21L	<i>Lactobacillus reuteri</i>	MF686473.1	% 99
KC76L	<i>Lactobacillus salivarius</i>	KM361623.1	% 99



Resim 4.1. Agaroz jel elektroforez görüntüsü: M: Moleküler büyüklük belirteci 1. KC66L, 2. KC76L, 3. KC21L, 4. KC27L, 5. Negatif kontrol

Çalışmada kullanılan KC66L, KC27L, KC21L ve KC76L izolatları moleküler yöntemlerle (16S rRNA) tanımlanmıştır. Bu çalışma kapsamında kullanılan tüm bakteriler mikroskopik inceleme yapıldıktan sonra, çalışmaya alınmıştır. Çalışmada kullanılan, *Lactobacillus salivarius* KC27L ve *Lactobacillus reuteri* KC21L suşlarının Gram boyama sonucunda ışık mikroskopundaki görüntüleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *Lactobacillus salivarius* KC27L (a) ve *Lactobacillus reuteri* KC21L (b) suşlarının ışık mikroskop görüntüleri

4.4. I-EPS’lerin Karakterizasyonu

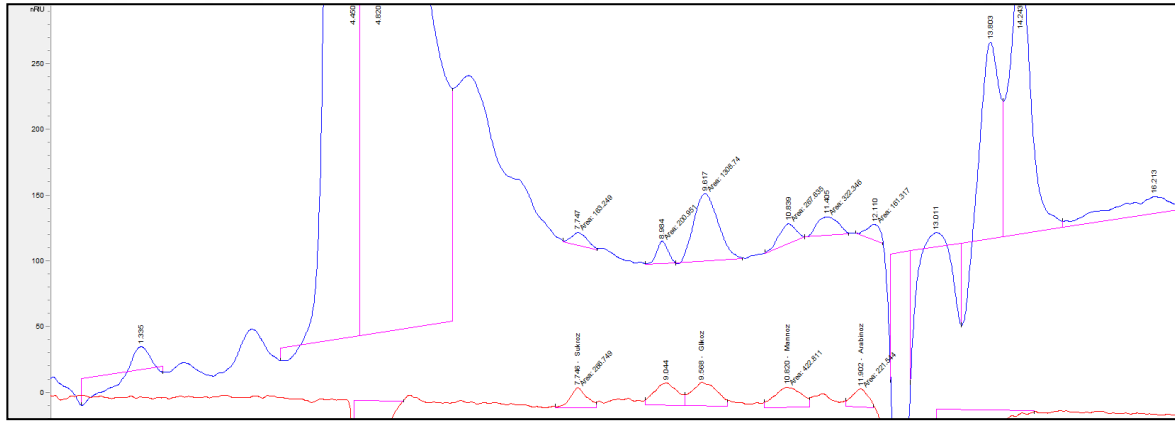
I-EPS’lerin sahip oldukları monomer profilinin prebiyotik özelliklerine etkisini ortaya koyabilmek amacıyla, seçilen KC27L suşuna ait liyofilize EPS’lerin monomer kompozisyonu HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografi), molekülün bağ yapısının belirlenmesi ^1H -NMR (nükleer manyetik rezonans) ve molekül ağırlığının belirlenmesi ise SEC (büyüklükçe ayırma kromatografisi) ile gerçekleştirilmiştir.

L. salivarius KC27L suşundan izole edilen I-EPS’nin monosakkarit kompozisyonu ve oranları Çizelge 4.6, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’de gösterilmiştir. Bu suşun I-EPS’sinin glikoz, mannoz, sukroz ve arabinoz monomerlerinden oluştuğu ve glikoz monomeri oranının diğer şekerlerden daha fazla olduğu belirlenmiştir. I-EPS örneklerinde galaktoz monomerine rastlanılmamıştır. KC27L suşuna ait I-EPS’nin şeker kompozisyonunda %52,99 oranında glikoz, %18,51 oranında sukroz, %13,81 oranında mannoz, %14,67 oranında arabinoz bulunduğu belirlenmiştir.

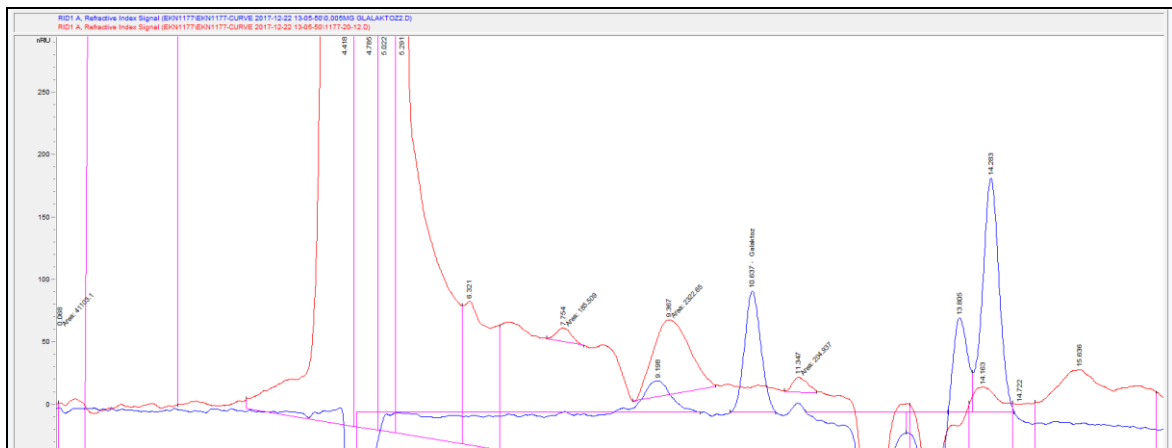
Çizelge 4.6. *L. salivarius* KC27L suşuna ait l-EPS'lerinin monosakkarit kompozisyonları ve yüzde oranları

Şeker Kompozisyonları	l-EPS (KC27L) (%)
Glikoz	52,99
Galaktoz	t.e.
Arabinoz	14,67
Mannoz	13,81
Sükroz	18,51

t.e: tespit edilmedi.

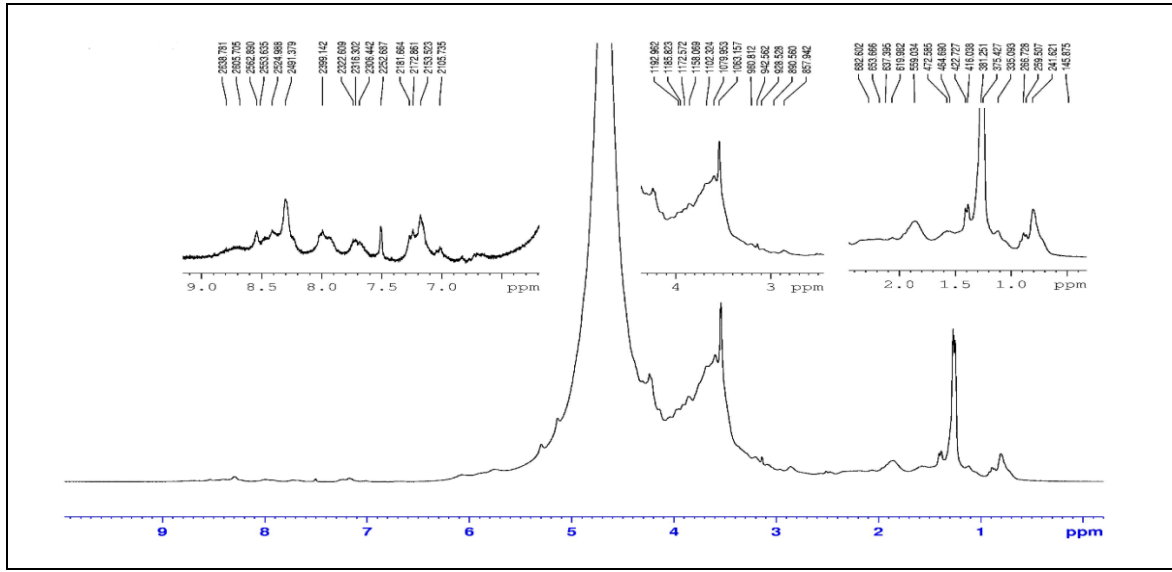


Şekil 4.2. *L. salivarius* KC27L suşuna ait l-EPS'nin kromatogramı: Mavi kromatogram 1/10 dilue örnek sırasıyla tespit edilen şekerler sukroz, glikoz, mannoz ve arabinoz



Şekil 4.3. *L. salivarius* KC27L suşuna ait l-EPS'nin kromatogramı: Kırmızı kromatogram 1/20 dilue örnekte, galaktoz yokluğu

Çalışmada kullanılan KC27L suşu l-EPS'lerinin bağ yapısını belirlemek amacıyla ^1H -NMR analizi yapılmıştır. Çalışılan l-EPS'nin yapısında bulunan glikoz ve arabinoz miktarları ^1H -NMR'da anlamlı pikler verecek oranlarda bulunmuştur (Şekil 4.4). Aynı d. H_2O 'da çözülüp proton NMR'ı alındığında l-EPS'de 5,25-5,30 ppm civarında gözlenen sinyal arabinoza ait anomerik H'e ait iken, 5,12 ppm civarında gözükten pik α - (1 $\rightarrow$ 3)-glikozun 2 nolu protonuna ait olduğu belirlenmiştir. 3,15 ile 3,25 ppm arasındaki sinyaller β -D-glikozun 2 nolu protonuna aitken, diğer sinyaller su pikinin altında kaldığı için gözlenememiştir.



Şekil 4.4. *L. salivarius* KC27L suşundan izole edilen l-EPS'lerin ^1H -NMR spekturumu

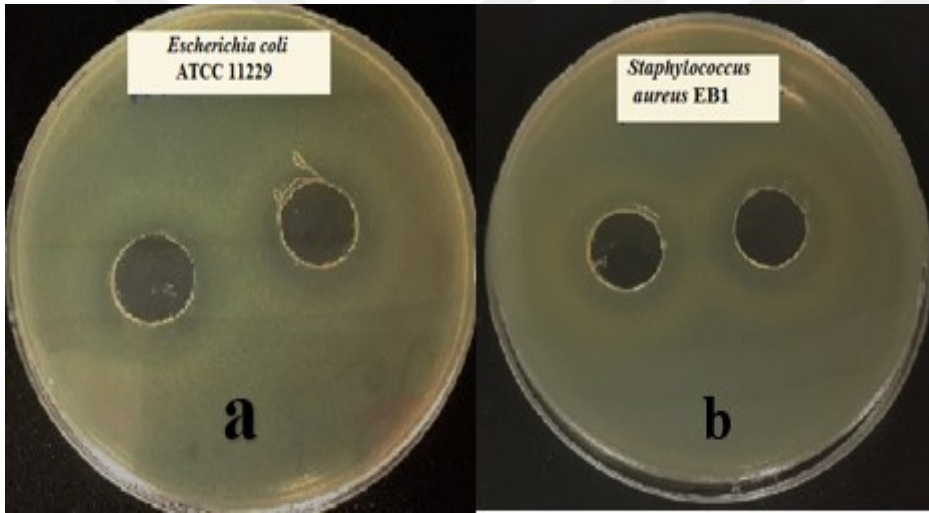
Büyükölçek ayırma kromatografisi (SEC) analizi ile *Lactobacillus salivarius* KC27L suşundan elde edilen l-EPS'lerin ortalama mol kütlesi (M_w) belirlenmiştir. l-EPS'nin iki fraksiyon oluşturduğu tespit edilmiştir. *L. salivarius* KC27L suşuna ait l-EPS'nin fraksiyonlarının moleküler ağırlığı $1,6 \times 10^3$ ile $6,4 \times 10^4$ Da arasında değiştiği belirlenmiştir.

4.5. Antimikrobiyal Aktivite

KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L suşlarına ait bakteri süspansiyonları, kültür filtratları, 0,5-1 mg/mL l-EPS'leri, bakteri+0,5-1 mg/mL l-EPS'lerinin *Escherichia coli* ATCC 11229, *Enterococcus faecalis* 29212 ve *Staphylococcus aureus* EB1 test bakterileri üzerine inhibisyon etkileri agar difüzyon yöntemine göre belirlenmiştir.

Yapılan alışmalar sonucunda KC27L, KC66L, KC76L, KC21L'ye ait bakteri süspansiyonlarında, 0,5-1 mg/mL'lik l-EPS, bakteri +l-EPS (0,5-1 mg/mL) ve kontrol olarak kullanılan 0,5-1 mg/mL inülinin *Escherichia coli* ATCC 11229, *Enterococcus faecalis* 29212 ve *Staphylococcus aureus* EB1 patojen bakterilerine karşı herhangi bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı görülmüştür.

KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L suşlarına ait kültür filtratları, denenen her üç patojen bakteriye karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. *Staphylococcus aureus* EB1 patojeni üzerine en yüksek antimikrobiyal etki 10 mm zon çapı ile *Lactobacillus salivarius* KC27L suşunun kültür filtratında belirlenmiştir (Resim 4.2).



Resim 4.2. (a) *Lactobacillus salivarius* KC66L suşuna ait kültür filtratının *E. coli* ATCC 11229 zerine inhibisyon etkisi (b) *Lactobacillus salivarius* KC27L suşuna ait kültür filtratın *Staphylococcus aureus* EB1 zerine inhibisyon etkisi

Lactobacillus salivarius KC76L (4,5 mm) ve *Lactobacillus reuteri* KC21L (5,5 mm) suşlarının kültür filtratlarında, *Escherichia coli* ATCC 11229 üzerinde antimikrobiyal aktivitenin en düşük olduğu görülmüştür. *Lactobacillus salivarius* KC66L suşuna ait kültür filtratının *E. coli* ATCC 11229 zerine inhibisyon etkisi 10 mm (Resim 4.2a) zon çapında gözlenmiştir. KC27L suşu kültür filtratında ise *Escherichia coli* ATCC 11229 zerine antimikrobiyal aktivite gözlenmemiştir.

Enterococcus faecalis 29212 üzerinde antimikrobiyal aktivite; *Lactobacillus salivarius* KC27L kültür filtratında 9 mm, *Lactobacillus salivarius* KC66L kültür filtratında 6 mm

olarak gözlenirken, *Lactobacillus reuteri* KC21L ve *Lactobacillus salivarius* KC76L suşlarına ait kültür filtratlarında *Enterococcus faecalis* 29212 patojenine karşı herhangi bir zon oluşumu gözlenmemiştir.

Staphylococcus aureus EB1 üzerinde; *Lactobacillus salivarius* KC27L suşuna ait kültür filtratlarının 10 mm zon çapında antimikrobiyal aktivite belirlenirken, *Lactobacillus salivarius* KC66L ve *Lactobacillus salivarius* KC76L suşlarına ait kültür filtratlarında 8 mm zon çapında antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir.

Lactobacillus reuteri KC21L suşuna ait kültür filtratlarının sadece *Escherichia coli* ATCC 11229 üzerinde inhibisyon zonu oluşturduğu (5,5 mm), *Staphylococcus aureus* EB1 ve *Enterococcus faecalis* 29212 test bakterileri üzerinde inhibisyon zonu oluşturmadığı gözlenmiştir.

4.6. Bazı Patojen Bakteri Suşlarının Biyofilm Yapma Oranlarının Belirlenmesi

Çizelge 3.2’de verilen Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan 12 farklı patojen bakterinin biyofilm yapma kapasitelerinin belirlenmesi için, kongo red ve mikro plak yöntemi olmak üzere iki farklı yöntem esas alınmıştır.

4.6.1. Kongo red yöntemi

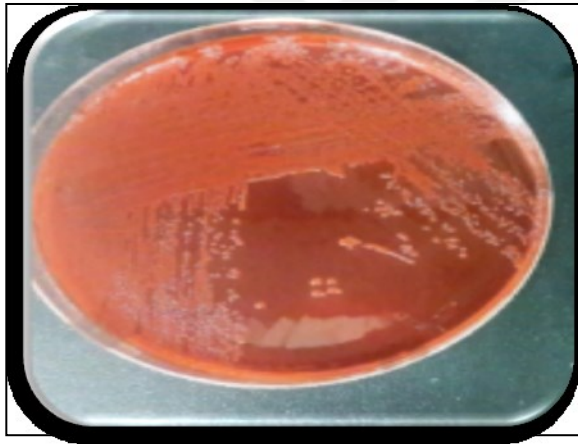
Kongo red yöntemi ile biyofilm oluşumunu belirlemek için 3.2.6’daki yöntem kullanılmıştır. Biyofilm oluşumunda, bakteriler jelsi bir tabaka meydana getirmek için ekzopolisakkaritler üretirler. Bu yöntemle göre, kullanılan kongo red boyası polisakkaritler ile doğrudan etkileşime girerek, renkli kompleksler oluştururlar. Buna göre, siyah renk oluşturan bakteriler güçlü biyofilm üreticisi (++), kırmızı renk oluşturanlar ise zayıf biyofilm üreticisi (+) olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7’de verilmiştir. Resim 4.3’de kongo red ilave edilmiş, Brain Heart Infusion besi ortamında *S. enteritidis* ATCC 13076 bakterisine ait koloni morfolojisi gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Bazı patojen bakterilerin kongo red yöntemi ile bulunan biyofilm yapma oranları

Suşlar	Biyofilm
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	+
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	++
<i>B. cereus</i> RSKK 863	+
<i>S. aureus</i> EB1	++
<i>S. aureus</i> EB18	+
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	++
<i>S. mutans</i> CNCT 8177	+
<i>S. Typhimurium</i> CCM 5445	+
<i>S. Typhimurium</i> MU80	+
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	+
<i>E. coli</i> ATCC 11229	++
<i>E. coli</i> ATCC 35218	+

++ : Güçlü biyofilm oluşumu.

+ : Zayıf biyofilm oluşumu.



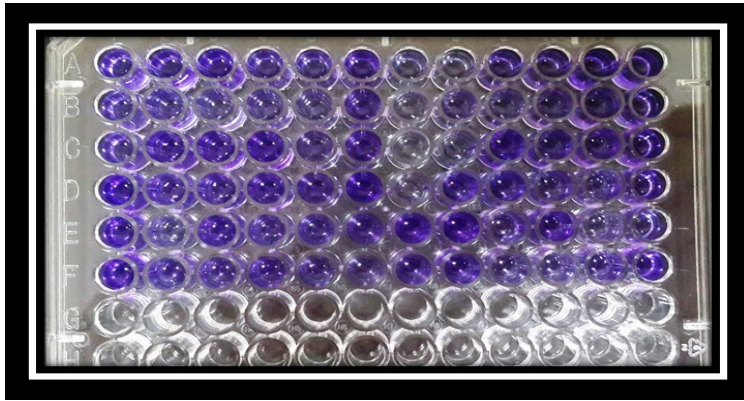
Resim 4.3. Kongo red deneyinde *S. enteritidis* ATCC 13076 suşunda gözlenen kırmızı koloniler (zayıf biyofilm oluşumu: +)

Sonuçlara göre, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* EB1, *E. coli* ATCC 11229, *S. aureus* ATCC 25923 suşlarında güçlü biyofilm oluşumu (++) , *L. monocytogenes* ATCC 7644, *B. cereus* RSKK 863, *S. mutans* CNCT 8177, *S. Typhimurium* CCM 5445, *S. enteritidis* ATCC 13076, *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* EB18 ve *S. Typhimurium* MU80 suşlarında ise zayıf biyofilm oluşumu (+) belirlenmiştir.

4.6.2. Mikro plak yöntemi

Biyofilm oluşumunun belirlendiği mikro plak yönteminin prensibi, spektrofotometrik olarak yoğunluğun ölçülmesine dayanmaktadır. 96 kuyucuklu plaklarda geliştirilen bakteriler, kuyucuk içerisinde biyofilm oluşturarak tutunur. Planktonik kısmı kuyucuklardan çıkarıp yıkama işlemi yapıldığında kuyucuklarda sadece biyofilm yapan bakteri hücreleri kalır. Kristal viyole ile boyama işlemi sırasında biyofilmde yaşayan bakteri hücreleri boyayı alır. Boyama sonrasında yıkama yapıldığında, boya plaktan atılır ve sadece bakteri hücrelerindeki boya kalır. Etanol-aseton solüsyonu hücrelerin içindeki boyanın dışarı salınmasını sağlar. Böylece biyofilmdeki hücre yoğunluğuna göre mavi tonlarında renkler oluşur.

Bu renkler mikropalak okuyucuda 570 nm’de okutulup, OD değerleri 1,99-1,00 arasında olanlar kuvvetli, 0,99-0 arasında olanlar zayıf biyofilm oluşturma kapasitesi olarak değerlendirilmiştir. Resim 4.4’de mikropalak okuyucuda okunmaya hazır bir mikro plak gösterilmiştir. Bu plakta, biyofilm oluşumuna bağlı olarak gözlenen renk değişimleri görülmektedir. Sağ üstte kuyucuklarda koyu mavi tonları yüksek, sol bölümdeki açık mavi-şeffaf renkler ise zayıf biyofilm oluşumundan kaynaklanmaktadır.



Resim 4.4. Mikropalak okuyucuda okunmaya hazır bir mikropalak

Bu yöntemle göre *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* EB1 ve *E. coli* ATCC 11229 suşlarında güçlü biyofilm kapasitelerinin olduğu tespit edilmiştir. Mikropalak yönteminden elde edilen sonuçlara göre, seçilen suşların biyofilm yapma kapasitesi Kongo red yöntemi ile birbirini doğrulamıştır.

4.7. Antibiyofilm Etkinin Belirlenmesi

KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L bakteri süspansiyonları, kültür filtratları, 0,5-1 mg/mL l-EPS'leri, bakteri+0,5-1 mg/mL l-EPS'leri ve ticari prebiyotik olan inülinin (0,5-1 mg/mL) güçlü biyofilm yapma kapasitesine sahip olan *Escherichia coli* ATCC 11229, *Enterococcus faecalis* 29212 ve *Staphylococcus aureus* EB1 üzerine antibiyofilm etkileri mikropalak yöntemine göre belirlenmiştir.

Antibiyofilm çalışmasında mikropalak yöntemine göre güçlü biyofilm kapasitesi gösteren 3 bakteri (*E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* EB1, *E. coli* ATCC 11229) test bakterisi olarak kullanılmıştır. Antibiyofilm madde olarak, EPS üretim kapasitesi yüksek olan 2 suştan (*L. salivarius* KC66L ve *L. salivarius* KC27L) elde edilen kültür filtratları %20 oranlarında ve bu kültürlerden izole edilen liyofilize EPS'lerin 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonları 3.2.6'da anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Biyofilm inhibisyonu, mikropalak okuyucuda okunan OD değerlerinin Eş 3.1'de verilen formüle uygulanmasıyla hesaplanmıştır.

Bakteri süspansiyonlarında, *L. salivarius* KC66L'nin %70 ile *S. aureus* EB1 bakterisinin oluşturduğu biyofilmi en yüksek oranda engellediği, en düşük ise %28 oranında *L. salivarius* KC27L'nin engellediği gözlenmiştir. Kültür filtratlarının antibiyofilm etkileri değerlendirildiğinde; *L. salivarius* KC76L suşuna ait kültür filtratının *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun biyofilm oluşumunu en yüksek oranda (%82) engellediği, *L. reuteri* KC21L suşuna ait kültür filtratının ise *E. coli* ATCC 11229 suşunun biyofilm oluşumunu en düşük oranda (%41) engellediği görülmüştür (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Bakteri süspansiyonlarının ve kültür filtratlarının % biyofilm inhibisyonu

Test Bakterisi	% Biyofilm inhibisyonu							
	Kültür filtratı				Bakteri süspansiyonu			
	KC66L	KC27L	KC21L	KC76L	KC66L	KC27L	KC21L	KC76L
<i>S. aureus</i> EB1	74±3	72±4	70±3	78±1	70±1	28±4	36±4	28±1
<i>E. coli</i> ATCC 11229	73±2	75±2	41±2	76±4	69±3	47±2	62±3	54±4
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	71±4	74±1	42±3	82±3	56±1	46±1	48±5	42±2

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* EB1 ve *E. coli* ATCC 11229 bakterilerinin oluşturduğu biyofilmi, denenen 4 bakteriye ait bakteri süspansiyonun %28-70, kültür filtratlarının ise %41-82 arasında değişen oranlarda engellemiştir.

0,5 mg/mL l-EPS'ler %22-79, 1 mg/mL l-EPS'ler ise %54-87 oranında denenen test bakterilerinin biyofilm oluşumunu engellemiştir. 4 bakteriye ait liyofilize EPS'lerde, biyofilm inhibisyonunda 1 mg/mL konsantrasyonu 0,5 mg/mL'ye göre daha etkili olmuştur. Her iki konsantrasyonda da en yüksek antibiyofilm etkiyi *L. salivarius* KC27L'nin *E. coli* ATCC 11229 üzerine yaptığı (sırasıyla %79 ve %87 inhibisyon), en düşük etkiyi ise *L. reuteri* KC21L'nin *E. coli* ATCC 11229 üzerine yaptığı (sırasıyla, %22 ve %54 inhibisyon) görülmüştür (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. 0,5 ve 1 mg/mL l-EPS'lerin % biyofilm inhibisyonu

Test Bakterisi	% Biyofilm inhibisyonu							
	l-EPS (0,5 mg/mL)				l-EPS (1 mg/mL)			
	KC66L	KC27L	KC21L	KC76L	KC66L	KC27L	KC21L	KC76L
<i>S. aureus</i> EB1	56±3	67±5	52±3	71±3	69±1	76±5	55±1	82±1
<i>E. coli</i> ATCC 11229	61±4	79±4	22±1	73±5	72±2	87±2	54±3	79±4
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	49±3	66±2	39±4	67±4	57±5	82±1	67±3	81±1

Bakteri+0,5 ve 1 mg/mL l-EPS çalışmasında da en yüksek antibiyofilm etkiyi *L. salivarius* KC27L'nin *E. coli* ATCC 11229 üzerine yaptığı (%80-83) belirlenmiştir. En düşük antibiyofilm etkiyi ise bakteri+0,5 mg/mL l-EPS'de *L. reuteri* KC21L'nin, *E. faecalis* ATCC 29212 üzerine %14 oranında, bakteri+1 mg/mL l-EPS'de ise *L. reuteri* KC21L'nin *E. coli* ATCC 11229 üzerine %27 oranında yaptığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Bakteri+l-EPS (0,5- 1 mg/mL) % biyofilm inhibisyonu

	% Biyofilm inhibisyonu							
Test Bakterisi	Bakteri+l-EPS (0,5 mg/mL)				Bakteri+l-EPS (1 mg/mL)			
	KC66L	KC27L	KC21L	KC76L	KC66L	KC27L	KC21L	KC76L
<i>S. aureus</i> EB1	62±1	68±4	54±5	53±5	77±5	71±5	57±5	67±3
<i>E. coli</i> ATCC 11229	54±2	80±1	21±3	78±1	56±2	83±0	27±3	84±4
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	43±4	57±5	14±4	78±2	52±4	66±5	28±4	68±2

Ticari bir prebiyotik olarak kullanılan inülin, 0,5 mg/mL konsantrasyonlarında %51-68 arasında değişen oranlarda, 1 mg/mL konsantrasyonlarında ise %59-72 arasında değişen oranlarda test edilen bakterilerin biyofilm oluşumunu engellemiştir. Her iki konsantrasyonda en düşük etkinin *E. faecalis* ATCC 29212 üzerine olduğu görülmüştür (Çizelge 4.11). İnülin ve l-EPS'lerin her iki konsantrasyonu karşılaştırıldığında, *L. salivarius* KC27L suşunun 0,5-1 mg/mL l-EPS'lerinin kullanılan test bakterileri üzerinde inülinde daha yüksek antibiyofilm etki gösterdiği belirlenmiştir. *L. salivarius* KC66L, *L. salivarius* KC76L ve *L. reuteri* KC21L suşlarında ise antibiyofilm etkinin birbirine yakın değerler olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.11. 0,5 ve 1 mg/L inülinin % biyofilm inhibisyonu

	% Biyofilm İnhibisyonu	
Test Bakterisi	İnülin (0,5 mg/mL)	İnülin (1 mg/mL)
<i>S. aureus</i> EB1	53±1	67±4
<i>E. coli</i> ATCC 11229	68±4	72±3
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	51±5	59±6

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, liyofilize EPS'lerin; bakteri süspansiyonları, kültür filtratları, bakteri+l-EPS'lerden daha yüksek bir antibiyofilm aktivitesi olduğu belirlenmiştir.

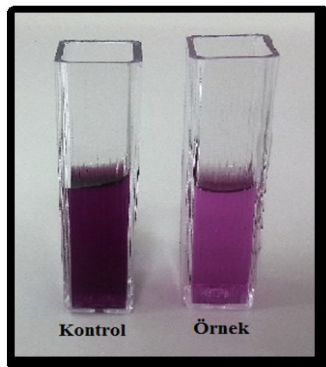
4.8. Antioksidan Aktivite

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini giderme etkisi

KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L suşlarının bakteri süspansiyonları, kültür filtratları, 0,5-1 mg/mL l-EPS'leri, bakteri+0,5-1 mg/mL l-EPS'lerinin spektrofotometrik metot kullanılarak radikal süpürücü aktivitesi tespit edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.12'de verilmiştir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, en yüksek radikal süpürücü aktivite *L. reuteri* KC21L suşunun 1 mg/mL l-EPS konsantrasyonunda (%84,9) (Resim 4.5), en düşük aktivite ise *L. salivarius* KC76L bakteri süspansiyonunda (%22,1) görülmüştür.

Çizelge 4.12. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini giderme etkisi (%)

Test edilen suş	Bakteri süspansiyonu	Kültür Filtratı	0,5 mg/mL l-EPS	1 mg/mL l-EPS	Bakteri+0,5 mg/mL l-EPS	Bakteri+ 1 mg/mL l-EPS
KC66L	67,0±2,6	74,3±0,5	73,8±1,1	83,3±3,1	80,4±1,4	83,7±0,6
KC27L	48,1±4,1	75,7±1,0	73,4±1,9	79,6±4,7	80,9±0,8	83,6±4,3
KC21L	41,6±0,7	75,6±1,4	75,3±1,2	84,9±0,6	81,7±0,5	82,7±0,7
KC76L	22,1±4,7	74,4±2,5	63,2±4,6	68,2±1,2	73,0±1,2	74,0±3,5



Resim 4.5. DPPH radikalini giderim etkisi (Örnek: KC21L bakteri süspansiyonu, Kontrol: DPPH çözeltisi ve PBS)

KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L suşlarında bakteri süspansiyonu ve kültür filtratı karşılaştırıldığında, bakteri süspansiyonlarının DPPH giderim aktivitesinin kültür filtratlarından daha zayıf olduğu görülmüştür. l-EPS'de en düşük DPPH giderim aktivitesinin, *L. salivarius* KC76L suşuna ait 0,5 mg/mL l-EPS'de (%63,2) olduğu belirlenmiştir. 0,5 mg/mL ile 1 mg/mL l-EPS'ler kıyaslandığında ise, tüm suşların 1

mg/mL l-EPS'lerinin DPPH giderim aktivitesinin 0,5 mg/mL l-EPS'lere göre daha yüksek olduğu ve l-EPS'lere bakteri süspansiyonu eklendiğinde DPPH radikali giderme etkisinin arttığı gözlenmiştir (Çizelge 4.10).

Ticari prebiyotik olan inülinin 0,5 mg/mL konsantrasyonunda DPPH radikalini giderme etkisi olmadığı tespit edilirken, 1 mg/mL inülinin 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini giderme etkisinin %73,2 olduğu belirlenmiş ve suşların 0,5-1 mg/mL l-EPS'lerinin giderim etkisiyle yakın olduğu görülmüştür.

Demir (Fe^{+2}) iyonu şelatlama aktivitesinin belirlenmesi

Metod, Fe^{+2} iyonlarını bağlamak üzere, güçlü bir demir şelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin yarışmasına dayanır. Ferrozin, ferröz iyonları gibi +2 değerlikli metal iyonları ile kompleks oluşturmaktadır. Oluşan renkli ferrozin-metal kompleksi ise 562 nanometrede maksimum absorbanans sergilemektedir. Metal şelatlayıcı ajanların (antioksidan madde) varlığında, şelatlama gücü yüksekse kırmızı renkli Fe^{+2} /ferrozin kompleksinin oluşumu engellenir ve meydana gelen mor renkte açılma gerçekleşir. Dolayısıyla 562 nanometre absorbansta meydana gelen azalma yani renkteki açılma metal şelasyonunun göstergesi olarak kabul edilmektedir.

KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L suşlarının bakteri süspansiyonları, kültür filtratları, l-EPS'leri, bakteri+l-EPS'lerinin farklı yüzdelerde gösterdiği Fe^{+2} iyonu şelatlama aktivitesi sonuçları Çizelge 4.13'de verilmiştir. Çalışmada bakterilerin metal (Fe^{+2}) şelatlama aktiviteleri %12,5 ile %76,3 arasında değişirken, en yüksek aktiviteyi *L. reuteri* KC21L suşuna ait bakteri süspansiyonu+1 mg/mL l-EPS (%76,3) göstermiştir.

Çizelge 4.13. Suşların % Fe^{+2} iyonu şelatlama yeteneği (%)

Test edilen suş	Bakteri süspansiyonu	Kültür Filtratı	0,5 mg/mL l-EPS	1 mg/mL l-EPS	Bakteri+0,5 mg/mL l-EPS	Bakteri+ 1 mg/mL l-EPS
KC66L	15,8±1,0	14,2±0,3	14,5±1,7	24,7±2,0	20,5±0,9	22,7±0,3
KC27L	28,0±0,3	19,3±0,0	18,6±3,0	24,9±1,2	23,3±0,4	32,3±2,0
KC21L	66,0±1,2	13,7±0,0	15,2±0,3	20,9±0,0	67,1±0,4	76,3±0,2
KC76L	37,0±0,4	12,5±1,8	21,8±0,4	24,6±2,0	19,9±1,4	30,9±4,3

KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L suşlarının bakteri süspansiyonları %15,8-66,0 arasında, kültür filtratları ise %12,5-19,3 arasında değişen değerlerde Fe^{+2} iyonu şelatlama aktivite göstermiştir. 0,5 mg/mL ile 1 mg/mL l-EPS'leri kıyaslandığında, tüm suşların 1 mg/mL l-EPS'lerinin Fe^{+2} iyonu şelatlama aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. En yüksek l-EPS Fe^{+2} iyonu şelatlama aktivitesinin *L. salivarius* KC66L'ye ait 1 mg/mL l-EPS'de olduğu belirlenmiştir. Suşlarda bakteri süspansiyonu ve l-EPS tek başlarına kullanıldığında Fe^{+2} iyonu şelatlama aktivitesinin zayıf olduğu, bakteri+l-EPS'lerin birlikte olduğunda daha yüksek Fe^{+2} iyonu şelatlama aktivitesinin sağladığı görülmüştür.

Ticari prebiyotik olan inülinin 0,5 mg/mL konsantrasyonunda Fe^{+2} iyonu şelatlama yeteneğinin olmadığı tespit edilirken, 1 mg/mL inülinin Fe^{+2} iyonu şelatlama yeteneğinin %23,2 olduğu belirlenmiştir. Genel değerlendirme yapıldığında, en yüksek şelatlama yeteneğinin KC21L suşuna ait bakteri süspansiyonuna ait olduğu, tüm bakterilere ait l-EPS'lerin ve inülinin birbirlerine yakın şelatlama yeteneğinde oldukları görülmüştür.

Süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesi

Süperoksit radikali (O_2^-) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L suşlarının bakteri süspansiyonları, kültür filtratları, farklı konsantrasyonlarda l-EPS'leri, bakteri+l-EPS'lerinin hepsi farklı oranlarda süperoksit radikal süpürücü aktivitesi göstermiştir (Çizelge 4.12).

Suşlar arasındaki süpürücü aktivite kıyaslandığında; en yüksek aktiviteyi *L. salivarius* KC27L bakteri süspansiyonu (%73,2), en düşük aktiviteyi *L. salivarius* KC76L kültür filtratı (%17,6) göstermiştir. KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L suşlarının 0,5 mg/mL ile 1 mg/mL l-EPS'leri kıyaslandığında, tüm suşların 1 mg/mL l-EPS'lerinin süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesinin *L. salivarius* KC27L suşuna ait 1 mg/mL l-EPS'de %61,6, bakteri+1 mg/mL l-EPS'de ise %65,4 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesi (%)

Test edilen suş	Bakteri süspansiyonu	Kültür Filtratı	0,5 mg/mL l-EPS	1 mg/mL l-EPS	Bakteri+0,5 mg/mL l-EPS	Bakteri+ 1 mg/mL l-EPS
KC66L	66,7±4,3	57,2±1,4	20,0±1,6	31,1±0,4	45,2±2,5	51,3±2,1
KC27L	73,2±0,4	61,3±1,9	44,8±2,5	61,6±3,3	54,1±2,6	65,4±2,3
KC21L	32,8±3,1	25,4±3,3	28,9±3,1	48,2±1,4	27,4±0,6	33,9±3,2
KC76L	22,2±4,2	17,6±2,2	23,2±4,4	34,2±0,6	21,1±2,5	24,8±3,0

Ticari prebiyotik olan inülinin 0,5 mg/mL konsantrasyonunda süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesinin olmadığı tespit edilirken, 1 mg/mL inülinin süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesinin %32,3 olduğu görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Hayvan yemlerinde, büyüme arttırıcı olarak kullanılan antibiyotikler yasaklanmış ve günümüzde antibiyotik yerine alternatif katkı maddeleri kullanma olasılığı araştırılmaktadır. Son yıllarda, dünya çapında, sağlığı geliştirme ve hastalıkların önlenmesi için probiyotik bakterilerin kullanımına olan ilgi, bilimsel topluluk, tüketici ve gıda üreticilerinde önemli ölçüde artmıştır. Bu ilgi, uygun özelliklere sahip mikroorganizmaların hedeflenen kullanımının hayvan ve insan sağlığı üzerinde yararlı bir etkiye sahip olabileceği bilgisine dayanmaktadır (Bujnakova, Strakova ve Kmet, 2014).

Laktik asit bakterileri (LAB), karbonhidrat fermantasyonunun başlıca metabolik son ürünü olan laktik asitle spor yapmayan, katalaz-negatif, Gram-pozitif, çubuk şeklinde, aerotolerant organizmalardır (Holzapfel, Haberer, Geisen, Björkroth ve Schillinger, 2001). Bu grup *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella* cinslerini içermektedir (Ahmed, 2003; Hernandez ve diğerleri, 2016). LAB arasında en yaygın olarak kullanılan probiyotik bakteri suşları *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Enterococcus* cinsine ait olanlardır (Bujnakova, Strakova ve Kmet, 2014).

Probiyotikler, bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek konakçıyı yararlı biçimde etkileyen canlı mikrobik yem takviyeleri olarak tanımlanmıştır (Fuller, 1989; Awad, Ghareeb ve Bo, 2010). Probiyotik yem takviyesi, büyüme, yem verimliliği ve bağırsak sağlığını iyileştirir. Bu iyileşme bağırsak pH'sı, bağırsak bakteri bileşimi ve sindirim aktivitesinin azaltılmasıyla elde edilir. Probiyotiklerin etki mekanizmaları, endojen enzimlerin uyarılmasını, toksik maddeler üreten metabolik reaksiyonların azaltılmasını, vitamin veya antimikrobiyal maddelerin üretimini içerir (Hassanein ve Soliman, 2010; Mehdi ve diğerleri, 2018). Probiyotiklerin kolesterol düşürücü etkileri açısından kolesterol sentezinde azalma veya kolesterolün degradasyon ve atılımında artışa dayanan çeşitli mekanizmalar önerilmiştir (Fukushima ve Nakano, 1995). Ayrıca, safra tuzu hidrolaz (BSH) aktivitesine sahip bazı probiyotik suşların safra tuzlarının dekonjugasyonu yoluyla serum kolesterolü azaltabildiği de bildirilmiştir (Shokryazdan ve diğerleri, 2017).

Probiyotik bakteriler, toksinlerin üretimini ve patojenlerin yapışmalarını engelleyen bakteriyosinler gibi antimikrobiyal aktiviteleri olan moleküller üretirler (Pan ve Yu, 2014). Diğer taraftan, probiyotikler bağışıklık tepkisini uyarır ve bakterilerin kolonizasyonuna karşı direncini artırmaktadırlar (Mehdi ve diğerleri, 2018).

Kanatlılar için yem katkı maddesi olarak seçilmiş *Lactobacillus* suşlarının kullanılması, *Salmonella*, *C. perfringens*, *E. coli*, *Campylobacter* sp. gibi intestinal patojenlerin neden olduğu enfeksiyonları azaltabilir. Probiyotiklerin uygulanması, patojenik bakterilerin bağırsak epiteli kolonize etmesini, iç organlara ve yumurtalara geçmesini önler (Dec ve diğerleri, 2016). Bu, bağırsak epitelyal duvarında besin ve bağlanma alanları veya probiyotik suşlar ile antimikrobiyal maddelerin üretimi veya her iki eylemin sinerjisi ile rekabet ederek rekabetten dışlanmaya bağlı olabilir (Fuller, 1989). Sonuç olarak, probiyotik suşlar GİS’de yararlı bir mikrobiyal denge sağlayarak bağırsak sağlığının korunmasına yardımcı olabilir ve azaltılmış sindirim bozukluklarına sahip sağlıklı ve iyi işleyen bir bağırsak, yemlerin daha iyi kullanımını ve dönüşümünü sağlar, bu da gelişmiş büyüme ve canlılık ile sonuçlanır (Shokryazdan ve diğerleri, 2017). Bağırsaktaki istenmeyen mikrobiyotanın ve diğer yararlı aktivitenin ortadan kaldırılmasıyla, seçilen *Lactobacillus* suşları tavuklarda kilo alımını ve yumurta üretimini artırabilir. Probiyotik laktobasiller, hayvanları bağırsak patojenlerinden; organik asitler, hidrojen peroksit, bakteriyosinler ve karbon peroksit gibi inhibe edici maddelerin üretimi, bağırsak epitelyal yüzeyleri üzerinde yapışma bölgelerinin bloke edilmesi, besinler için rekabet ve bağışıklığın uyarılması gibi çeşitli olası mekanizmalarla koruyabilir (Lebeer, Vanderleyden ve Keersmaecker, 2008; Dec ve diğerleri, 2016).

Prebiyotikler, bağırsakta bakteri büyümesini ve aktivitesini uyararak fermentasyon özellikleri nedeniyle sağlığa yararlı olabilecek potansiyel olarak sindirilemeyen yem bileşenleridir (Gibson ve Roberfroid, 1995). Genellikle kısa zincirli polisakkaritler ve oligosakkaritler içerirler. Maya hücre duvarlarından ve fermentasyon ürünlerinden çeşitli prebiyotikler üretilir. Prebiyotikler konukçu tarafından sindirilemezler fakat komensal bağırsak bakterileri onları propiyonat, asetat ve bütirat gibi kısa zincirli yağ asitleri üretmek için metabolize edebilirler (Jozefiak, Kaczmarek ve Rutkowski, 2008). Prebiyotiklerin, bağırsaktaki yararlı mikrobiyotalarının gelişmesini sağlayan, sindirimin düzenli ve sağlıklı bir şekilde gerçekleştirilmesi için olumlu etkide bulunan, vitamin sentezi ve mineral (Ca, P, Mg, Cu, Zn, K ve Mn gibi) emilimini arttıran, kolon kanserini

engelleyen, kan kolesterolünü azaltan ve bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde etkili olan katkı maddeleri olduğu ileri sürülmektedir. Prebiyotik olarak nitelendirilen katkılar; mannan-oligosakkaritler (MOS), frukto-oligosakkaritler (FOS), alfa-galakto-oligosakkaritler (α -GOS), galaktosil-laktoz, inülin, enzimatik olarak hidrolize edilmiş inülin (oligofruktoz) ve sentetik fruktoz gibi bileşiklerdir (Endo, Nakamura, Konishi, Nakagawa ve Tochio, 2016). Prebiyotik bileşenler kanatlı üretkenliği üzerinde olumlu etkilere sahip olup aynı zamanda sağlıklı bir bağırsak sistemine katkıda bulunarak antibiyotiklere iyi bir alternatif olabilirler (Zhang ve diğerleri, 2005).

Probiyotiklerin ve prebiyotiklerin tavuk gastrointestinal sistemindeki yararlarından yola çıkarak, laktik asit bakterilerinin ve laktik asit bakterilerinden elde edilen ekzopolisakkaritlerinin (I-EPS) prebiyotik özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla, bu tez çalışmasında, Ankara iline bağlı 7 ilçeden temin edilen 7 farklı tavuk dışkılarından 26 *Lactobacillus* ve 18 *Streptococcus* cinsi bakterileri izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin ekzopolisakkaritler (EPS) üretim yetenekleri belirlenmiş ve bunlar arasından yüksek ve düşük EPS üretim kapasitesine sahip izolatlar seçilerek liyofilize EPS (I-EPS)'leri elde edilmiştir. Moleküler olarak tanımlanan 4 suşa ait, bakteri süspansiyonları, kültür filtratları, bakterilerden elde edilen 0,5 ve 1 mg/mL I-EPS'ler, bakteri+0,5 ve 1 mg/mL I-EPS'lerinin ve ticari bir prebiyotik olan inülinin (0,5 ve 1 mg/mL) antimikrobiyal, antibiyofilm ve antioksidan aktiviteleri tespit edilmiştir.

Tez çalışmasında, EPS üretimi fenol-sülfirik asit deneyi ile yapılarak, EPS üretim kapasitesi *Streptococcus* izolatlarında 52-327 mg/L arasında tespit edilirken, *Lactobacillus* izolatlarında 8-353 mg/L arasında belirlenmiştir. Tez çalışmasının bundan sonraki aşamalarında EPS üretim kapasitesi en yüksek 2 izolat (KC66L ve KC27L) ve EPS üretim kapasitesi en düşük 2 izolat (KC21L ve KC76L) ve bu izolatlardan elde edilen liyofilize EPS'ler ile devam edilmiştir. Bu 4 izolatın tür düzeyinde tanımlamaları 16S rRNA analizi ile gerçekleştirilmiştir. Liyofilizasyon sonrasında EPS miktarlarında herhangi bir değişiklik olup olmadığını belirlemek amacıyla, fenol-sülfirik asit metodu ile I-EPS'ler de miktar tayini yapılmıştır. Sonuçlara göre, en yüksek EPS üretimine sahip *Lactobacillus salivarius* KC27L suşundan elde edilen I-EPS'nin miktarı 376 ± 4 mg/L; en düşük EPS üretim yeteneğine sahip *Lactobacillus reuteri* KC21L suşundan elde edilen I-EPS'nin miktarı ise 130 ± 2 mg/L olarak belirlenmiştir. Suşların liyofilizasyon sonrası EPS miktarları, KC66L suşu hariç, kültür ortamında belirlenen EPS miktarından daha fazla bulunmuştur. Bunun

nedeninin, liyofilizasyon işleminde yüksek hacimde geliştirilen kültürlerden yüksek hacimde EPS'nin kısmi olarak saflaştırılmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Wang ve diğerleri (2010), Tibet kefirinden izole edilen *L. plantarum* KF5 suşuna ait EPS miktarının 75,57 ile 95,58 mg/L arasında, Zotta ve diğerleri (2008) ise *L. plantarum* ve *L. paraplantarum* suşlarının ürettiği EPS miktarının 140-297 mg/L arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Sarıkaya ve diğerleri (2017), çocuk dışkılarından ve süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakteri suşlarında 255-320 mg/L ekzopolisakkarit üretimi olduğunu rapor etmişlerdir. Mercan ve diğerleri (2015), tavuk dışkısından izole ettikleri *Lactobacillus salivarius* suşlarında EPS üretimini araştırmışlar ve suşlar arasında EPS üretiminde önemli değişiklikler gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışmada E2 suşunda (430 mg/L) dekstransükraz geninin saptanmasıyla E4 suşundan (290 mg/L) yaklaşık %35 daha fazla EPS ürettiği bildirilmiş ve EPS üretimi kapasitesinin dekstransükraz geni ile ilişkilendirmişlerdir. EPS üretim miktarları, izolasyon kaynağı, ortamın bileşimi (karbon ve azot kaynakları) ve inkübasyon koşulları (sıcaklık, pH, süre, oksijen oranı vb.) gibi bakteri büyümesi için gerekli fiziko-kimyasal koşullara ilişkili olduğundan (Looijesteijn ve diğerleri, 1999; Tallon, Bressollier ve Urdacı, 2003; Badel, Bernardi ve Michaud, 2011) bakterilerdeki ekzopolisakkarit üretim sonuçlarının farklılığı bu faktörlerin değişimiyle bağlantılı olabilir.

Karbonhidratlar ekstraselüler EPS'nin ana bileşenleridir ve mikrobiyal ekzojen sekresyon, nötr karbonhidratlar (esas olarak heksoz, nadiren pentoz) ve üronik asitler (glukuronik, galakturonik ve mannuronik asit gibi) içermektedirler. Ürojen asitlerin veya asetat ester, pirüvat ketaller, formatlar, süksinatlar ve inorganiklerin (fosfat ve sülfat) varlığı, EPS makromoleküllerinin yapısına (nötr, anyonik veya katyonik) karar vermektedir. Ekzopolisakkaritler, homopolisakkarit ve heteropolisakkarit olarak ikiye ayrılırlar. Homopolisakkaritler genellikle nötr olup, tek bir monosakkarit tipinden oluşmaktadırlar (Pal ve Paul, 2008; Vu, Chen, Crawford ve Ivanova, 2009). Mikroorganizmalar tarafından üretilen homopolisakkaritlere örnek olarak dekstran ve selüloz verilebilir. Heteropolisakkaritler ise tekrarlanan monosakkarit birimleri (Örneğin, D-glukoz, D-galaktoz, L-fruktoz, L-ramnoz, D-glukuronik asit, L-guluronik asit ve D-mannuronik asit) tarafından oluşturulur (örneğin, aljinat, ksantan zımkı, gellan zımkı, K30-antijen ve hiyalüronik asit) (More, Yadav, Yan, Tyagi ve Surampalli, 2014) ve laktik asit

bakterilerinin tarafından üretilen ekzopolisakkaritler heteropolisakkarit yapıdadır (Miao ve diğerleri, 2014). Jolly ve diğerleri (2002), şeker bileşiminin, zincir uzunluğunun, şeker bağlantılarının ve tekrarlanan ünitelerin EPS'nin biyolojik ve teknolojik özelliklerini etkilediğini bildirmişlerdir. Ekzopolisakkaritlerin potansiyel uygulamalarını anlayabilmek açısından EPS'nin kimyasal karakterizasyonu önem kazanmaktadır.

Tez çalışmasında, en yüksek EPS üretim yeteğine sahip *L. salivarius* KC27L suşundan izole edilen l-EPS'nin molekül karakterizasyonu yapılmıştır. KC27L suşundan izole edilen l-EPS'nin HPLC analizi ile yapıdaki monosakkaritler belirlenmiştir. HPLC analizi sonucu l-EPS'nin glikoz (%52,99), mannoz (%13,81), sukroz (%18,51) ve arabinoz (%14,67) monomerlerinden oluştuğu tespit edilmiştir. Sasikumar ve diğerleri (2017), *L. plantarum* BR2 suşuna ait EPS'nin glikoz ve mannoz şeker kalıntılarından oluşan bir heteropolisakkarit olduğunu, Wang ve diğerleri (2014), *L. plantarum* 70810 suşuna ait EPS'nin galaktozdan oluştuğunu, Xu ve diğerleri (2010) ise, *L. plantarum* KF5 ait EPS'nin mannoz, glikoz ve galaktozdan oluştuğunu bildirmişlerdir. Dertli ve diğerleri (2018), *Lactobacillus brevis* E25 suşuna ait EPS'nin yapısının tek şeker monomeri olarak glikoz içerdiğini ortaya çıkarmışlardır. Rani ve diğerleri (2018), tavuktan izole edilen *Lactobacillus gasseri* FR4 suşuna ait hidrolize EPS'in GC analizi ile heteroekzopolisakkarit yapıda olduğunu doğrulamışlar ve glikoz (%65,31), mannoz (%16,51), galaktoz (%8,45), fukoz (%6,55) ve ramnoz (%3,18) varlığını ortaya çıkarmışlardır. Bu çalışmalar, bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

¹H-NMR analizi ile KC27L suşuna ait l-EPS'nin bağ yapıları belirlenmiş ve l-EPS'nin yapısında bulunan glikoz ve arabinoz miktarları ¹H-NMR'da anlamlı pikler verecek oranlarda bulunmuştur. KC27L'ye ait l-EPS'de ¹H-NMR'da arabinoza, α-glikoza ve β-D-glikoza ait pikler olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar HPLC analizinde belirlenen şekerleri desteklemektedir. Ancak, HPLC analizinde belirlenen mannoz ve sukroz şekerlerine ait sinyaller su pikinin altında kaldığı için gözlenememiştir. Dertli ve diğerleri (2018), *Lactobacillus brevis* E25 suşuna ait EPS'nin NMR ve metilasyon analizi ile yapısal karakterizasyonunda, EPS'nin α (1 → 3) ve α (1 → 6) glikozidik bağları olan yüksek ölçüde dallanmış α -glukan ürettiğini ve daha önce bildirilen *Lactobacillus reuteri* 180'den elde edilen EPS'ye benzer bir yapıya sahip olduğunu ortaya çıkarmışlardır. *Lactobacillus plantarum* BR2 suşuna ait EPS'nin ¹H-NMR spektrumunda, EPS'nin anomerik protonları, 5,3 ve 4,5 ppm arasında sinyal vererek kompleks karbonhidrat yapılarının ayırt edildiği bir

çalışmada, α -(1 $\rightarrow$ 3)'ün glikozidik bağlantısının anomerik protonu, 5,308 ppm'de bir kimyasal kayma ile gösterilmiştir. Spektrumda 4,5 ve 3,1 ppm arasında elde edilen sinyallerin C-2 ve C-6'ya bağlı protonlardan kaynaklandığı, 69,46 ve 73,22 ppm'deki spektrumdaki güçlü sinyalin ise α -D-mannozun C-4 ve C-5'ine karşılık geldiğini bildirmişlerdir. HPLC ile yapılan şeker bileşimi analizi, EPS'nin *L. plantarum* BR2'nin glikoz ve mannoz şeker kalıntılarından oluşan bir heteropolisakkarit olduğunu göstermiştir (Sasikumar, Kozhummal, Vaikkath, Devendra ve Nampoothiri, 2017). Tez çalışmasında elde ettiğimiz bulguların mevcut literatür bulguları ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Lactobacillus salivarius KC27L suşundan elde edilen l-EPS'nin ortalama mol kütlesini (*M_w*) belirlenmek amacıyla, büyüklükçe ayırma kromatografisi (SEC) analizi yapılmıştır. *L. salivarius* KC27L suşuna ait l-EPS'nin iki fraksiyon oluşturduğu ve bu fraksiyonların $1,6 \times 10^3$ ila $6,4 \times 10^4$ Da moleküler ağırlığında olduğu belirlenmiştir. Li ve diğerleri (2014), *L. helveticus* MB2-1 suşuna ait EPS-1, EPS-2 ve EPS-3'nin ortalama molekül ağırlıklarının sırasıyla, $2,08 \times 10^5$, $2,04 \times 10^5$ ve $2,01 \times 10^5$ Da olduğunu, Rani ve diğerleri (2018) ise *Lactobacillus gasseri* FR4 suşuna ait EPS'nin moleküler ağırlığının $1,86 \times 10^5$ Da olduğunu bildirmişlerdir. *L. rhamnosus* KL37B ile sentezlenen EPS'lerde farklı boyutlarda birden fazla kromatografik pikin eşzamanlı olarak ortaya çıktığı Gorska-Fraçzek ve diğerleri (2013) tarafından rapor edilmiştir. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'lerin molekül ağırlıklarının 10^4 ila 10^6 Da arasında değiştiği aynı zamanda, belirli bir suş tarafından sentezlenen polimerlerdeki farklı büyüklükte birden fazla kromatografik pikin eşzamanlı oluşabileceği ifade edilmektedir (Salazar ve diğerleri, 2009; Torino, Valdez ve Mozzi, 2015). Ismail ve Nampoothiri (2014), düşük molekül ağırlıklı fraksiyonların, esas olarak polisakaritte bulunan oligomerler olabileceğini bildirmektedirler. Literatür verilerinde, bizim çalışmamızda olduğu gibi EPS'lerin birden fazla molekül ağırlığına sahip fraksiyonlardan oluşabileceği vurgulanmış ve bu fraksiyonların varlığının EPS'nin moleküler yapısının heterojen oluşundan, uzun ve kısa polimerler sentezleyebilmelerinden kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir (Batchelor, Araguchi, Hull ve Hull, 1991).

Probiyotikler, patojenik bakterilerin kolonizasyonunu azaltarak hastalığa yakalanma riskini en aza indirmek için kullanılabilir. LAB'nin patojen mikroorganizmaların inhibisyonu için; bağışıklığın uyarılması, fekal mikrobiyotanın değiştirilmesi, organik asitler, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler veya bakteriyosin benzeri maddeler gibi spesifik inhibitör

proteinlerin üretimi ile çeşitli bakteriyel patojenlerin büyümesini engelledikleri rapor edilmiştir (De Vuyst ve Leroy, 2007; Neal-McKinney ve diğerleri, 2012; Yüksekdağ, Sahin ve Aslim, 2014).

Tez çalışmasında KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L bakterilerinden elde edilen bakteri süspansiyonları, kültür filtratları, 0,5-1 mg/mL l-EPS'leri, bakteri+0,5-1 mg/mL l-EPS'lerinin *Escherichia coli* ATCC 11229, *Enterococcus faecalis* 29212, *Staphylococcus aureus* EB1 test bakterileri üzerine inhibisyon etkileri agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L suşlarına ait bakteri süspansiyonlarında, 0,5-1 mg/mL'lik l-EPS, bakteri+0,5-1 mg/mL l-EPS ve kontrol olarak kullanılan (0,5-1 mg/mL) inülinin *Escherichia coli* ATCC 11229, *Enterococcus faecalis* 29212 ve *Staphylococcus aureus* EB1 test bakterilerine karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite tespit edilmezken kültür filtratlarında zon çapı 4,5 mm ile 10 mm arasında değişen antimikrobiyal etki belirlenmiştir. *Staphylococcus aureus* EB1 patojeni üzerine en yüksek antimikrobiyal etki 10 mm zon çapı ile KC27L suşunun kültür filtratında belirlenmiştir. KC21L suşunun kültür filtratının sadece *Escherichia coli* ATCC 11229 üzerinde inhibisyon zonu oluşturduğu (5,5 mm), *Staphylococcus aureus* EB1 ve *Enterococcus faecalis* 29212 üzerinde inhibisyon zonu oluşturmadığı gözlenmiştir. KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L bakterilerinden elde edilen l-EPS'lerin kullanıldığı antimikrobiyal denemelerinde herhangi bir sonuç elde edilememiştir. Bunun nedeninin l-EPS'lerin polisakkarit yapıda olmasından ve l-EPS'lerin patojenler tarafından karbon kaynağı olarak tercih edilebilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Aazami ve diğerleri (2014), İran (Isfahan) yerli tavuklarından izole ettikleri yüksek probiyotik potansiyeline sahip LAB suşlarının 7 farklı patojenik suşa karşı geniş yelpazede antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. İzolatların antimikrobiyal aktivitesinin *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. mutans*, *C. defficile*, *E. hirae*, *S. enterica* ve *S. aureus*'a karşı 0 ila 21 cm arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Tüm suşlar içinde maksimum büyüme inhibisyonunun *S. enterica*'ya karşı olduğunu gözlemlemişlerdir. Noohi ve diğerleri (2016), kümes hayvanı rektumundan ve dışkılarından izole edilen *Pediococcus* suşlarının *Shigella flexneri*, *P. aeruginosa*, *E. coli* serotipleri (EPEC, ETEC ve EAEC), *S. typhi*, *S. enteritidis*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'a karşı 1 ile 5 mm arasında değişen antimikrobiyal etkiye sahip olduklarını raporlamışlardır. Mercan ve diğerleri (2015), tavuk dışkısından izole

ettikleri *Lactobacillus salivarius* suşlarının tümünün *S. Typhimurium*, *E. coli*, *Y. Enterocolitica* ve *S. aureus* patojenlerine karşı 5-15 mm arasında değişen zon çaplarında inhibitör etki gösterdiğini ancak E3 suşunun *S. Typhimurium*'a karşı en az etkili suş olduğunu belirtmişlerdir. *L. salivarius* suşlarının hiçbirisi, *B. cereus*'a karşı antimikrobiyal etki göstermemiştir. Aslim ve diğerleri'nin (2005) yapmış oldukları çalışma bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Bu çalışmada, Türk süt ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus* spp.'nin tüm izolatlarından elde edilen kültür süpernatantlarının *S. aureus*, *E. coli* ve *Y. enterocolitica* bakterilerine karşı değişen derecede inhibitör aktivite sergilediği (8-30 mm arasında) bildirilmiştir. Yapılan literatür taramaları ve bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, *L. salivarius* türüne ait suşlarının kültür filtratlarının patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkilerinin olduğunu göstermektedir.

Prebiyotikler, yem katkı maddeleri olarak bağırsak sağlığını iyileştirmek ve performansı artırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Prebiyotiklerin sindirim enzimlerine karşı direnç, kolonik mikrobiyotaya bağlı fermentasyon ve pH düşürücü etkileri bulunmaktadır. Potansiyel olarak patojenik bakterilerin, özellikle de *Clostridium*'un belirli suşlarını inhibe edebilir ve ishali önleyebilirler (Vrese ve Marteau, 2007; Martinez, Bedani, Marta ve Saad, 2015). Xylo-oligosakkaritler (XOS), bağırsak mikrobiyotası tarafından fermente edilebilen arabinoksilanların hidrolitik bozunma ürünleridir. Maesschalck ve diğerleri (2015), tavuklara XOS verilmesi durumunda yem dönüşüm oranını önemli ölçüde geliştirdiğini, ileumda villüsün uzunluğunun ve kolonda *Lactobacillus* miktarında artış olduğunu bildirmişlerdir. Dal Bello ve diğerleri (2001), *Lactobacillus sanfranciscensis* tarafından üretilen levan EPS'nin prebiyotik özelliklerini çalışmışlar ve EPS'nin bifidobakterilerin sayısının artırdığını ancak laktobasil sayısının azalttığını bildirmişlerdir. Prebiyotiklerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olup olmadığına kesin olarak karar vermek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Patojenik bakterinin oluşturduğu biyofilmler, yüzeylerde oluşma ve kalıcılığı nedeniyle kronik ve tekrarlayan enfeksiyonlarda önemli bir etkindir. Biyopolimerlerin veya LAB'nin EPS'lerinin, patojenik bakteriyle biyofilm oluşumunu inhibe etme veya kontrol etme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, çalışmalarının çoğu, biyofilm oluşumunu kısıtlayan alternatif yolun veya patojenik bakterilerin tamamen yok edilmesinin belirlenmesine odaklanmıştır (Kim, Oh ve Kim, 2009; Kanmani ve diğerleri, 2011). Bu yaklaşımlardan yola çıkarak tez çalışmasında laktobasil EPS'lerinin antibiyofilm aktivitesi

araştırılmıştır. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre, bakteri süspansiyonları biyofilm oluşumunu %28-70 oranında, kültür filtratları ise biyofilm oluşumunu %41-82 oranında engellemiştir. Antibiyofilm etkinin 0,5 mg/mL'lık I-EPS'lerde %22-79, 1 mg/mL'lık I-EPS'lerde ise %54-87 oranında olduğu tespit edilmiştir. Bakteri+I-EPS ile hazırlanan 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonlarında ise %14-84 arasında antibiyofilm belirlenmiştir. Kontrol amacıyla kullanılan inülinin 0,5 mg/mL konsantrasyonunda %51-68, 1 mg/mL konsantrasyonunda ise %59-72 oranında biyofilm oluşumunu engellemiştir.

Sayem ve diğerleri (2011), *Bacillus licheniformis* SP1 ve SP3 suşlarından elde edilen filtratların *Escherichia coli* PHL-628 üzerinde biyofilm oluşumunu %50-65 oranında inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Rani ve diğerleri (2018), saflaştırılmış EPS'nin antibiyofilm aktivitesini, gıda kaynaklı *E. coli* MTCC 2622, *Listeria monocytogenes* MTCC 657, *Staphylococcus aureus* MTCC 3160 ve *Enterococcus faecalis* MTCC 439 patojenleri kullanılarak göstermişlerdir. Sonuçlar, antibiyofilm aktivitesinin konsantrasyona bağlı olduğunu ve 4 mg/mL konsantrasyonunda *L. monocytogenes* MTCC 657'de (%56) maksimum inhibitör etkinin olduğunu göstermiştir. Test edilen tüm patojenler arasında EPS, *E. faecalis* MTCC 439'a (%19,2) karşı en düşük inhibitör etki göstermiştir. Bu sonuç, *L. monocytogenes* MTCC 657'ye karşı maksimum ve *E. faecalis*'te en düşük inhibisyonun gözlemlendiği EPS'nin antibakteriyel etkisi ile korele bulunmuş ve EPS'nin antibakteriyel etkisinin biyofilm oluşumunun önlenmesinden sorumlu olduğu rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda bakterilerimizden elde ettiğimiz I-EPS'lerin antimikrobiyal aktivitesi tespit edilemediğinden antimikrobiyal aktivite ile antibiyofilm arasında herhangi bir korelasyon tespit edilememiştir.

Farklı EPS örneklerinin üç patojenik suşa karşı antibiyofilm aktivitesinin belirlendiği bir çalışmada, farklı dozların (1-2 mg/mL) patojenik suşların oluşturduğu biyofilmleri önlediği bildirmişlerdir. Antibiyofilm oluşumunun, test edilen tüm EPS örnekleri için 1 mg/mL'nin üzerinde sabit kaldığını, en yüksek aktivitenin ise *Leuconostoc citreum*-BMS suşuna ait, 2 mg/mL'lik EPS ile *E. coli* (%61,5), *E. faecalis* (%53,4) ve *S. aureus* (%76,95)'a karşı olduğu bildirilmiştir. *Leuconostoc pseudomesenteroides*-CM EPS'si, 1 mg/mL'de *E. coli* (%90) ve *E. faecalis*'e (%88) karşı maksimum adhezyon inhibisyonu göstermiştir. *Leuconostoc citreum*-BMS EPS'si ise, 1 mg/mL'de *S. aureus*'a karşı en yüksek antibiyofilm aktivitesi göstermiştir (%86,9) (Abid ve diğerleri, 2018). Jiang ve diğerleri (2011), bir deniz bakterisinin ürettiği EPS A101'in, Gram-pozitif ve Gram-negatif

bakterilerin oluşturduğu biyofilmi inhibe edebildiğini bildirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada, *Lactobacillus acidophilus* A4 tarafından üretilen 1 mg/mL EPS'nin *E. coli* biyofilm oluşumunu %87 oranında azaltabildiğini tespit etmişlerdir. Bu azalmanın nedeninin, bakteriyel yüzey özelliklerinin kısmen etkilenmesiyle (ya hücre yüzeyi modifikasyonlarının zayıflatılmasıyla ya da hücre-hücre yüzey etkileşimlerinin azaltılmasıyla) hücrelerin ilk bağlanma ve otoagregasyonunu inhibe edilmesi ile ortaya çıkabileceği öne sürülmüştür (Kim ve diğerleri, 2009). Bu sonuçlar bizim çalışmalarımızla paralellik göstermektedir.

Yapılan literatür taramalarında bakteri+l-EPS'lerinin antibiyofilm özelliklerinin araştırılmasına yönelik herhangi bir veriye rastlanmamıştır. KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L bakterilerinden elde edilen l-EPS'lerin test edilen patojenlere karşı farklı oranlarda antibiyofilm göstermesi biyofilm oluşturan bakterilerin büyümesini önlemek için liyofilize EPS'lerin inüline alternatif olarak kullanılabileceklerini düşündürmektedir.

Reaktif oksijen türleri (ROS), oksijen kaynaklı hidroksil ve süperoksit serbest radikalleri, yaşlanma, kanser, ateroskleroz, akciğer hasarı ve inflamasyon gibi birçok hastalıktan sorumlu olan yüksek derecede reaktif moleküllerdir. Antioksidan bileşikler kronik inflamasyon, ateroskleroz, kanser ve kardiyovasküler bozuklukların kısıtlanmasında ve tedavisinde önemli rol oynar (Liu ve diğerleri, 2009). Çoğu organizma antioksidan savunma ve onarım sistemlerine sahiptir, ancak DNA veya proteinlerin zarar görmesini önlemek için yetersizdir. Canlı hücreler, ROS'un daha az zehirli maddelere ya da antioksidan süreçlere enzimatik dönüşümü gibi çeşitli savunma mekanizmaları aracılığıyla kendilerini oksidatif hasara karşı korurlar. Bütıl hidroksil anizd (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve tersiyer butilhidrokinon (TBHQ) gibi birçok sentetik bileşik antioksidan olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Ananthi ve diğerleri, 2010). Kullanılan sentetik antioksidanların karaciğer hasarı ve karsinojenezden sorumlu olduklarından şüphelenilmektedir. Bu nedenle, birçok kronik hastalığın etkilerini önlemek için daha etkili doğal antioksidanların bulunmasına ilgi artmıştır (Kanmani ve diğerleri, 2011). Biyo-aktif doğal polimerlerin önemli bir sınıfı olarak, polisakkaritler umut verici antioksidanlar ve *in vitro* ve *in vivo* olarak etkili, toksik olmayan ilaçlar ve gıda katkı maddelerinin adayları olarak kabul edilmişlerdir (Zhang ve diğerleri, 2013). Birçok mikroorganizma tarafından üretilen EPS'ler, genellikle biyolojik olarak uyumlu, yenilebilir, insanlar ve çevre için toksik olmayan metabolitlerdir. Son zamanlarda, EPS'lerin antitümör, immünostimülatör,

kolesterol düşürücü aktivite ve antioksidan aktiviteleri de dâhil olmak üzere biyolojik aktivitelerinden yararlanma konusuna artan bir ilgi vardır (Yang ve diğerleri, 2015).

Probiyotik bakterilerin yüzey yapıları, proteolitik aktiviteleri, ürettikleri organik asitler (laktik asit, asetik asit) ve kısa zincirli yağ asitleri gibi farklı özelliklerinin antioksidan aktiviteyi etkilediği, serbest radikal oluşumunu azalttığı düşünülmektedir. Probiyotik bakteriler tarafından üretilen EPS'lerin ise sahip oldukları farklı karbon omurgalarının, dal yapısının ve monosakkarit bileşimlerinin, EPS'nin antioksidan aktivitelerini etkilediği bildirilmektedir (Lo, Kang, Wang ve Chang, 2007; Wang ve diğerleri, 2015). EPS'nin yapısında bulunan ramnoz ve galaktoz monosakkaritlerinin antioksidan aktivitesi ile ilişkili ve etkili olduğu da rapor edilmiştir (Lo ve diğerleri, 2011). Yüksek galaktoz içeriğinin EPS'lerin yüksek antioksidan aktivite göstermesine neden olduğu ifade edilmiştir (Tang ve diğerleri, 2017). Tez çalışmasında ise KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L suşlarına ait 1-EPS'lerin hiçbirinde ramnoz ve galaktoz monosakkaritlerine rastlanılmamıştır. Bu konunun net bir şekilde ifade edilebilmesi için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

DPPH serbest radikali, bir atom nitrojen köprüsünde eşlenmemiş bir değerlik elektronu ile stabil bir radikaldir. DPPH radikalının uzaklaştırılması, DPPH antioksidan testinin temelidir (Sharma ve Bhat, 2009). DPPH serbest radikalının, stabil bir molekül haline gelmek için elektron veya hidrojen radikalini kabul edebileceği bildirilmiştir (Qiao ve diğerleri, 2009). Tez çalışmasında DPPH giderim aktivitesi, en yüksek *L. reuteri* KC21L suşunun 1 mg/mL 1-EPS'sinde (%84,9), en düşük ise *L. salivarius* KC76L bakteri süspansiyonunda (%22,1) görülmüştür. 0,5 ve 1 mg/mL 1-EPS'ler kıyaslandığında, konsantrasyon artışının DPPH radikali giderme aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. Bakteri süspansiyonu ve kültür filtratları kıyaslandığında ise, kültür filtratlarında daha yüksek oranda DPPH radikali giderme etkisinin olduğu ve bunun kültür filtratlarında bakterinin ürettiği farklı metabolitlerin bulunmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ticari prebiyotik olarak kullanılan inülinin 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini giderme etkisinin %73,2 olduğu görülmüştür. *Lactobacillus plantarum* C88'in kültüründen izole edilen nötr bir ekzopolisakkarit olan LPC'nin 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalleri temizleme aktivitesi, standart numune olarak askorbik asit ile kolorimetrik deney kullanılarak 0,5-4,0 mg/mL konsantrasyon aralığında ölçülmüştür. DPPH radikal temizleme aktivitesi, 1,0 mg/mL'ye kadar artan konsantrasyonda arttığı, ancak 1,0 mg/mL

den sonraki konsantrasyonlardaki artışın, aktiviteyi önemli ölçüde etkilemediği bildirilmiştir. 4,0 mg/mL'lik bir konsantrasyonda, LPC-1 ve askorbik asit, DPPH radikal süpürücü aktivitesinin sırasıyla %52,23 ve %88,60 olduğu göstermiştir (Xhang ve diğerleri, 2013). Benzer şekilde, *Bifidobacterium animalis* RH'den izole edilen EPS'nin DPPH radikal süpürücü aktivitesinin, artan EPS konsantrasyonunda artabileceğini ve askorbik asitle benzer bir aktiviteye ulaşabileceği bildirilmiştir (Xu ve diğerleri, 2010). Tang ve diğerleri (2017), *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SRFM-1'in 4,0 mg/mL'de r-EPS1'in %59,94, r-EPS2'nin %53,31 oranında DPPH radikal süpürücü aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, elde ettikleri sonuçları *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SRFM-1 suşuna ait r-EPS'nin iyi bir hidrojen veya elektron donörü olabileceği şeklinde yorumlamışlardır. *Epimedium koreanum* Nakai EFPN ve EFPN-1'in polisakkaritlerinin DPPH radikal süpürme kapasitesi, 0,05 mg/mL ila 0,4 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda tespit edilmiş, DPPH süpürme aktiviteleri EFPN için %53,8, EFPN-1 için %71,83 olarak bildirilmiştir (Li ve diğerleri, 2018). Tez çalışmasında elde ettiğimiz bulguların mevcut literatür bulguları ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Demir iyonu (Fe^{+2}), metal iyonları arasında en güçlü pro-oksidandır (Trabelsi ve diğerleri, 2017). Çalışmada, bakterilerin metal (Fe^{+2}) şelatlama aktiviteleri %12,5 ile %76,3 arasında değişirken, en yüksek aktiviteyi *L. reuteri* KC21L bakteri süspansiyonu+1 mg/mL l-EPS (%76,3) göstermiş ve 1 mg/mL inülinin (%23,2) yaklaşık 3,3 katı fazla Fe^{+2} iyonu şelatlama yeteneğinin olduğu belirlenmiştir.

Paenibacillus polymyxa SQR-21 (SQR-21) bakterisine ait EPS'nin Fe^{+2} iyonu şelatlama yeteneğinin, EPS konsantrasyonlarındaki (0,05-1 mg/mL) artışla yükselerek, 1 mg/mL EPS seviyesinde %65'e ulaştığı bildirilmiştir (Raza, Makeen, Wang, Xu ve Qirong, 2011). Trabelsi ve diğerleri (2017), EPS-Ca6'nın Fe^{+2} şelatlama kapasitesi, demir-ferrozin kompleksinin ölçülmesiyle belirlendiği bir çalışmada EPS-Ca6'nın iyi bilinen bir metal iyonu şelatörü olan EDTA'ya kıyasla Fe^{+2} 'ya orta derecede bir şelatlama etkinliği sergilediği bildirilmiştir. Bununla birlikte, EPS-Ca6 güçlü bir şelatlama aktivitesi göstererek 7,5 mg/mL'de yaklaşık %79 demir içeren iyonları şelatlandırmış ve demirin bağlanması için etkin bir EPS-Ca6 kapasitesi olduğu ifade edilmiştir. EPS'lerin demir iyonu şelatlama yeteneği ile ilgili herhangi bir başka çalışmaya rastlanılmamıştır.

Çeşitli ROS'lar arasında, süperoksit anyonu, biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girme potansiyeline sahip olan ve böylece doku hasarını indükleyen aktif serbest radikallerin öncüsüdür (Mao, Yin, Ge, Jiang ve Gong, 2013). Süperoksit radikalleri, DNA, proteinler ve lipidlerde oksidatif hasara neden olan hidroksil radikali, hidrojen peroksit gibi diğer ROS'ların oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Liu ve diğerleri, 2011). Tez çalışmasında, denenen parametreler için, süpürücü aktivitenin %17,6-73,2 arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Probiyotik *Weissella cibaria* GA44 suşunun EPS'sinin süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesinin artan EPS konsantrasyonu (0,5-4 mg/mL) ile arttığı ve 4 mg/mL konsantrasyonda EPS'nin süpürme aktivitesinin %77,1 olduğu bildirilmiştir (Adesulu-Dahunsi Sanni ve Jeyaram, 2018). Li ve diğerleri (2014), 4 farklı EPS'nin 4 mg/mL'lik bir konsantrasyonda süperoksit anyonu üzerindeki süpürme aktivitelerini; EPS için %71,82, EPS-2 için %51,60, EPS-3 için %49,26, EPS-1 için %35,73 olarak bildirmişlerdir. Tıbbi mantar *Inonotus obliquus*'tan izole edilen beş polisakkaritin süperoksit anyonu üzerindeki temizleyici etkisi, IOP3a> IOP4> IOP2c> IOP2a> IOP1b sırasına göre sırasıyla %68,2, %62,6, %52,2, %50,7 ve %5,4 olarak bildirilmiştir (Huang, Ding ve Fan, 2011). Bizim çalışmamızda 0,5 ve 1 mg/mL konsantrasyonlarda l-EPS'lerin süpürücü aktivitelerinin %20,0-61,6 arasında değiştiği ve literatürlerde denenen yüksek konsantrasyonlarda elde edilen verilere yakın sonuçlar olduğu gözlenmiştir. Shi ve diğerleri (2018), Kuzeydoğu Çin'den geleneksel süt peynirinden izole ettikleri probiyotik bir suş olan *L. rhamnosus* GG'nin süperoksit anyon radikalini %76 oranında temizleme yeteneği gösterdiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda denenen 4 bakterinin süspansiyonunun süperoksit anyon radikali süpürücü yeteneğinin %22,2-73,2 arasında değiştiği belirlenmiştir. Tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar yapılan literatür taramaları ile paralel bulunmuştur.

Tez çalışmasında KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L suşlarının bakteri süspansiyonları, kültür filtratları, farklı konsantrasyonlarda l-EPS'leri, bakteri+l-EPS'lerinin denenen üç farklı metotta farklı oranlarda antioksidan yetenekte oldukları bulunmuştur. *L. reuteri* KC21L suşu 1 mg/mL l-EPS'si en yüksek DPPH aktivitesi gösterirken (%84,9), bakteri süspansiyonu+1 mg/mL l-EPS en yüksek metal şelatlama aktivitesi (%76,3) ve KC27L suşunun bakteri süspansiyonu en yüksek süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesi (%73,2) göstermiştir. *L. salivarius* KC76L suşunun bakteri süspansiyonu (%22,1) en düşük DPPH aktivitesi gösterirken, KC76L suşunun kültür filtratı en düşük metal şelatlama

aktivitesi (%12,5) ve en düşük süperoksit radikali süpürücü etkisi (%17,6) göstermiştir. Antioksidan çalışmalarında kullanılan DPPH radikali süpürücü aktivite, Fe^{+2} şelatlama ve süperoksit radikali süpürücü aktivite yöntemleri arasında bir farklılık olup olmadığını belirlemek amacıyla ANNOVA yapılmış ve incelenen yöntemler arasında $p<0,05$ düzeyinde anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir.

Antioksidan çalışmalarında denenen her üç yöntemde de, 0,5 mg/mL inülinin antioksidan aktivitesinin olmadığı görülmüştür. 0,5 mg/mL l-EPS'lerin ise antioksidan aktiviteye sahip olması avantaj olarak düşünülmektedir. Yapılan literatür taramaları sonucunda, bakteri süspansiyonu+l-EPS'nin antioksidan aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu tez çalışmasında ilk defa bakteri süspansiyonu+l-EPS'nin farklı yöntemler ile antioksidan aktiviteleri belirlenmiş ve genel olarak antioksidan yeteneklerinin l-EPS'lere ve bakterilere kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde aşağıdaki çıkarımlar ve önerilerde bulunulmuştur.

1. Hayvansal üretimde antibiyotiklerin yaygın şekilde kullanılması antibiyotik dirençli bakterilerin artmasına, mikrobiyotanın dengesinin bozulmasına ve tavuk gövdesinde ilaç kalıntıları gibi problemleri beraberinde getirmektedir. Bu yüzden, hayvansal üretimde alternatif besin takviyeleri olarak probiyotik ve prebiyotiklerin kullanılması cazip hale gelmektedir. Tavukçulukta yem katkı maddesi olarak kullanılan prebiyotiklerin bağışıklık sistemindeki olumlu etkisi, büyüme performansı, yumurta kütlesi, yumurta ağırlığı, yumurta boyutu ve yem kullanım etkinliğini olumlu yönde etkilemektedir. LAB elde edilen EPS'lerin prebiyotik olarak kullanılabilirliğine dair çalışmalar sınırlı sayıdadır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler ile ticari prebiyotiklere alternatif olarak l-EPS'lerin kullanılabileceği öngörülmüştür. Bu kapsamda yüksek EPS üretim yeteneğine sahip 2 laktobasil ve düşük EPS üretim yeteneğine sahip 2 laktobasil izolatu seçilerek prebiyotik olarak kullanılabilirliklerinin araştırılması amacıyla öncelikle, 16S rRNA ile moleküler olarak tanımlanmışlardır. Potansiyel probiyotik aday olan izolatların EPS'leri liyofilize edilmiş ve antimikrobiyal, antibiyofilim ve antioksidan yetenekleri belirlenmiştir.
2. l-EPS'lerin kimyasal karakterizasyonlarının biyolojik özelliklerini etkiledikleri bilindiğinden, sahip oldukları monosakkarit birimlerini, molekül ağırlıklarını, molekül bağ yapısını belirlemek amacıyla en yüksek EPS üretim yeteneğine sahip *Lactobacillus salivarius* KC27L suşundan izole edilen l-EPS'lerin HPLC, NMR ve SEC analizi yapılmıştır. Bu suşa ait l-EPS'nin şeker kompozisyonunda glikoz şekerinin diğer şekerlere göre yüksek olduğu görülmüştür. Yapılan literatür taramalarında l-EPS'nin yapısında glikoz ve mannoz şekeri oranının yüksek olmasının yem sanayisi ve eczacılıkta potansiyel olarak uygulanabilirliklerini arttırdığı dikkatimizi çekmiş ve bu nedenle KC27L suşuna ait l-EPS'de glikoz oranının yüksek çıkması bir avantaj olarak görülmüştür.
3. Kanatlı hayvan üretiminin arttırılmasını kolaylaştırmak ve onları patojen mikroorganizmalardan korumak için, uzun yıllar boyunca kanatlı yemlerinde antibiyotikler kullanılmıştır. LAB'nin bol miktarda üretilibilmeleri, patojen olmamaları ve antimikrobiyal aktivite özelliğine sahip olmaları nedeniyle tavuk

yemlerine ilave edilebilmektedir. Bu sayede, patojen mikroorganizmaların kolonizasyonu azaltılarak enterik hastalıklar ve antibiyotik tüketimi en aza indirgenebilmektedir. Tez çalışmasında *Lactobacillus salivarius* KC27L suşuna ait kültür filtratının *Staphylococcus aureus* EB1 patojeni üzerine 10 mm zon çapı ile en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu suşun tavuklarda antimikrobiyal ajan olarak kullanılma potansiyeli olduğu düşünülmüştür. KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L suşlarından elde edilen liyofilize EPS'lerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı gözlenmiş ve bu durum bakterilerin l-EPS'leri karbon kaynağı olarak kullanabilmelerinden kaynaklanmış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

4. Biyofilmler, mikroorganizmaların tabiatına bağlı olarak izole edilmiş hücreler, koloniler veya katmanlar olarak bir yüzeye yapışan bakteri popülasyonlarıdır. Biyofilm enfeksiyonu için bir tedavi bulmak, antibakteriyel ilaç geliştirmek zorlu ve şimdiye kadar çok başarılı olan bir yöntem değildir. Bu kapsamda biyofilm ile mücadelede etkili olabilecek antibiyofilm ajanların araştırılması son yıllarda artmıştır. Tez çalışmasında KC27L suşundan izole edilen l-EPS'nin *E. coli* ATCC patojeni üzerine %87 oranında antibiyofilm etkisi olduğu tespit edilmiştir. Diğer suşlardan elde edilen l-EPS'lerin de yüksek oranda antibiyofilm etkilerinin olduğu gözlenmiştir. Yüksek antibiyofilm özelliklerinden dolayı bakterilerden izole edilen l-EPS'lerin antibiyofilm ajan olarak kullanılabilme potansiyeli bulunmaktadır.
5. Reaktif oksijen türleri, sürekli üretilirler ve DNA, protein ve lipid hasarına neden olurlar. Antioksidanlar, vücut dokularında oksidasyonun zarar verici etkilerine karşı koyma yeteneğine sahip olan maddelerdir. Probiyotik suşların, oksidatif strese karşı koruma, ROS birikimi riskini azaltma ve vücudun toplam antioksidan durumunu iyileştirebildiği bilinmektedir. Tez çalışmasında KC27L, KC66L, KC76L ve KC21L suşlarının farklı oranlarda antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. l-EPS'lerin antioksidan özellikleri ile ilgili sınırlı sayıda çalışmalar mevcut iken bu konu ile ilgili ilk çalışma olması nedeniyle bundan sonra yapılacak çalışmalar için kaynak oluşturabilecektir. Bu tez çalışmasında, l-EPS'lerin ve bakteri+l-EPS'lerin 3 farklı metot ile antioksidan özellikleri belirlenmiştir. Bakteri+l-EPS'lerin antioksidan özelliklerini ortaya çıkartan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.
6. Sonuç olarak laktik asit bakterinden elde edilen l-EPS'lerin antibiyofilm ve antioksidan aktivitesi olduğu, tavuklarda ticari olarak kullanılan inülin prebiyotiğine kıyasla daha

iyi veya yakın sonuçlar verdiğinden, doğal olarak elde ettiğimiz l-EPS'lerin yem katkı maddesi olarak kullanılmasının daha avantajlı olabileceğini düşünmekteyiz.

7. Suşlardan elde edilen l-EPS'lerin tavuk beslemesinde prebiyotik katkı olarak önerilebilmesi ve kesin bir yargıya varabilmek için daha fazla çalışma yapılması ve hayvan denemeleri ile desteklenmesi gerekmektedir.





KAYNAKLAR

- Aazami, N., Salehi, J. G., Khodaei, Z., Meimandipour, A., Safari M., and Goudarzvand, M. (2014). Characterization of some potentially probiotic *Lactobacillus* strains isolated from Iranian native chickens. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 60(6), 215-221.
- Abee, T., Kovacs, A. T., Kuipers, O. P., and van der Veen, S. (2011). Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 172-179.
- Abid ,Y., Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzetta, R., Corsaro, M. M., Attia, H., and Azabou, S. (2018). Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 719-728.
- Adesulu-Dahunsi, A.T., Sanni, A. I., and Jeyaram, K. (2018). Production, characterization and *in vitro* antioxidant activities of exopolysaccharide from *Weissella cibaria* GA44. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 432-442.
- Ahmad, I. (2006). Effect of probiotics on broilers performance. *International Journal of Poultry Science*, 5(6), 593-597.
- Akramiene D., Anatolijus K., Didziapetriene J., and Kevelaitis, E. (2007). Effects of β -glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)*, 43(8), 597–607.
- Ale, E. C., Perezlindo, M. J., Burns, P., Tabacman, E., Reinheimer, J. A., and Binetti, A. G. (2016). Exopolysaccharide from *Lactobacillus fermentum* Lf2 and its functional characterization as a yogurt additive. *Journal of Dairy Research*, 83, 487–492.
- An, B. K., Cho, B. L., You, S. J., Paik, H. D., Chang, H. I., Kim, S. W., Yun, C. W., and Kang, C. W. (2008). Growth performance and antibody response of broiler chicks fed yeast derived [beta]-glucan and single-strain probiotics. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21(7), 1027-1032.
- Ananthi, S., Raghavendran, H. R., Sunil, A. G., Gayathri, V., Ramakrishnan, G., and Vasanthi, H. R. (2010). *In vitro* antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). *Food and Chemical Toxicology*, 48, 187-192.
- Andrabi, S. T., Bhat, B., Gupta, M., and Baja, B. K. (2016). Phytase-producing potential and other functional attributes of lactic acid bacteria isolates for prospective probiotic applications. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8, 121-129.
- Angelakis, E. (2017). Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. *Microbial Pathogenesis*, 106, 162-170.

- Arciola, C. R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati, M., Donati, E., and Montanaro, E. (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, 4233-4239.
- Aslim, B., Yuksekdağ, Z. N., Sarıkaya, E., and Beyatlı, 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.
- Awad, W. A., Ghareeb, K., and Bo, J. (2010). Effect of addition of a probiotic micro-organism to broiler diet on intestinal mucosal architecture and electrophysiological parameters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94(4), 486-94.
- Badel, S., Bernardi, T., and Michaud, P. (2011). New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29(1), 54-66.
- Bahadıroğlu, E. (1997). Aviguard (Doğal Sindirim Sistemi Florası). *Hayvancılık Yan Sanayi ve Veteriner Hekimliği Dergisi*, 17(1), 5-8.
- Batchelor, R. A., Araguchi, G. E., Hull, R. A., and Hull, S. (1991). Regulation by a novel protein of the bimodal distribution of lipopolysaccharide in the outer membrane of *E. coli*. *Journal of Bacteriology*, 173, 5699-5704.
- Bleau, C., Monges, A., Rashidan, K., Laverdure, J. P., Lacroix, M., Van Calsteren, M. R., Millette, M., Savard, R., and Lamontagne, L. (2010). Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 666-675.
- Bounaix, M. S., Gabriel, V., Morel, S., Robert, H., Rabier, P., Remaud-Simeon, M., Gabriel, B., and Fontagne-Faucher, C. (2009). Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57(22), 10889-10897.
- Buddington, K. K., Donahoo, J. B., and Buddington, R. K. (2002). Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. *The Journal of Nutrition*, 132:472-477.
- Bujnakova, D., Strakova, E., and Kmet, V. (2014). *In vitro* evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from chicken and calves. *Anaerobe*, 29, 118-127.
- Burgat, V. (1991). Residues of drugs of veterinary use in food. *La Revue Du Praticien*, 41, 985-990.
- Busarcevic, M., Kojic, M., Dalgalarrrondo, M., Chobert, J. M., Haertle, T., and Topisirovic, L. (2008). Purification of bacteriocin LS1 produced by human oral isolate *Lactobacillus salivarius* BGHO1. *Oral Microbiology and Immunology*, 23, 254-258.

- Carocho, M. and Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzetta, R., Corsaro, M. M., Attia, H., and Azabou, S. (2018). Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 719-728.
- Chae B. J., Lohakare, J. D., Moon, W. K., Lee, S. L., Park, Y. H., and Hahn, T. W. (2006). Effects of supplementation of beta-glucan on the growth performance and immunity in broilers. *Research in Veterinary Science*, 80, 291-298.
- 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, 29.
- Cheled-Shoval, S. L., Amit-Romach, E., Barbakov, M., and Uni, Z. (2011). The effect of *in ovo* administration of mannan oligosaccharide on small intestine development during the pre-and posthatch periods in chickens. *Poultry Science*, 90, 2301-2310.
- Chen, Y., Zhang, W., Sun, Z., Meng, B., and Zhang, H. (2015). Complete genome sequence of *Lactobacillus helveticus* H9, a probiotic strain originated from kurut. *Journal of Biotechnology*, 194, 37-38.
- Ciesiolka, D., Gulewicz, P., Martinez-Villaluenga, C., Pilarski, R., Bednarczyk, M., and Gulewicz, K. (2005). Products and biopreparations from alkaloid-rich lupin in animal nutrition and ecological agriculture. *Folia Biologica (Krakow)*, 3, 59-66.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., and Lappin-Socott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review Microbiology*, 49, 711-745.
- Clark, S. F., (2002). The biochemistry of antioxidants revisited. *Nutrition in Clinical Practice*, 17(1), 5-17.
- Dal Bello, F., Walter, J., Hertel, C., and Hammes, W. P. (2001). *In vitro* study of prebiotics properties of levan type exopolysaccharides from lactobacilli and non digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 232-237.
- De Vuyst, L. and Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2), 153-77.
- De Vuyst, L. and Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194-199.

- 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.
- Dec, M., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R., and Wernicki, A. (2014). Screening of *Lactobacillus* strains of domestic goose origin against bacterial poultry pathogens for use as probiotics. *Poultry Science*, 93, 2464-2472.
- Decker, E. A. and Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 674-677.
- Dertli, E., Colquhoun, I. J., Cote, G. L., Le Gall, G., and Narbad, A. (2018). Structural analysis of the α -D-glucan produced by the sourdough isolate *Lactobacillus brevis* E25. *Food Chemistry*, 242, 45-52.
- Di Bartolomeo, F., Startek, J. B., and Van Den Ende, W. (2013). Prebiotics to fight diseases: Reality or fiction? *Phytotherapy Research*, 27, 1457-1473.
- Drissi, F., Merhej, V., Angelakis, E., Kaoutari, A., Carriere, F., Henrissat, B., and Raoult, D. (2014). Comparative genomics analysis of *Lactobacillus* species associated with weight gain or weight protection. *Nutrition & Diabetes*, 1-8.
- Donlan, R. M. (2000). Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO Journal*, 46, 47-52.
- 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, 759- 768.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Roberts, P. A., and Smith, F. (1956). Colorimetric determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350 -356.
- Dunne, W. M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 155-166.
- EFSA, (2011). Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS); Scientific opinion on the reevaluation of butylated hydroxyanisole-BHA (E 320) as a food additive. *European Food Safety Authority*, 9(10), 2392.
- Endo, A., Nakamura, S., Konishi, K., Nakagawa, J., and Tochio, T. (2016). Variations in prebiotic oligosaccharide fermentation by intestinal lactic acid bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(2), 125-132.
- Ergene, E. ve Avcı, A. (2016). Mikrobiyel ekzopolisakkaritler, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(2), 193-202.

- Fajardo, P., Pastrana, L., Mendez, J., Rodriguez, I., Fucinos, C., and Guerra, N. P. (2012). Effects of feeding of two potentially probiotic preparations from lactic acid bacteria on the performance and faecal microflora of broiler chickens. *The Scientific World Journal*, 2012(1), 1-9.
- Fernandes, S. M., Alvares, A. C. C., Manoel, J. G. M., Esper, L. M. R., Kabuki, D. Y., and Kuaye, A. Y. (2017). Formation of multi-species biofilms by *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, and *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing and effectiveness of chemical sanitation procedures. *International Dairy Journal*, 72, 23-28.
- 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.
- Food and Agriculture Organization, World Health Organization, (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk and live lactic acid bacteria. *Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report*, 50(1), 350.
- Freitas F., Alves V. D., and Reis M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to Biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29, 388-398.
- Fukushima, M. and Nakano, M. (1995). The effect of a probiotic on faecal and liver lipid classes in rats. *British Journal of Nutrition*, 73, 701-710.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378.
- Gandhi, S. and Abramov, A. Y. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-11.
- Gibson, G. R. and Roberfroid M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonie microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Gomez, R., Munoz, M., de Ancos B., and Cano, P. (2002). New procedure for the Detection of Lactic Acid Bacteria in Vegetables Producing Antibacterial Substances. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 35, 284-288.
- Gorska-Frańczek, S., Sandström, C., Kenne, L., Rybka, J., Strus, M., and Heczko, P. (2013). Structural studies of the exopolysaccharide consisting of a nonasaccharide repeating unit isolated from *Lactobacillus rhamnosus* KL37B. *Carbohydrate Research*, 346, 2926-2932.

- Hallemeersch, I., De Baet, S., and Vandamme, E. J. (2002). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria, *Biopolymers*, 5, 407-429.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33-50.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280(1), 1-8.
- Han, Q., Kong, B., Chen, O., Sun, F., and Zhang, H. (2017). *In vitro* comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. *Journal of Functional Foods*, 32, 391-402.
- 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. *The Journal of American Science*, 6(11), 159-169.
- Hernandez, Y. G., Sanchez, T. P., Boucourta, R., Balcazar, J. L., Nicoli, J. R., Silva, J. M., Rodriguez, Z., Fuertes, H., Nuneza, O., Albeloa, N., and Halaihelb, N. (2016). Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Research in Veterinary Science*, 108, 125-132.
- Hidaka, H. and Mirayama, M. (1991). Useful characteristics and commercial applications of fructo-oligosaccharides. *Biochemical Society Transactions*, 19, 561-565.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., and Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 365-373.
- Huang, S. Q., Ding, S., and Fan, L. (2012). Antioxidant activities of five polysaccharides from *Inonotus obliquus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(5), 1183-1187.
- Hume, M. E. (2011). Historic perspective: Prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. *Poultry Science*, 90, 2663-2669.
- Ines, G., Ana, C., Amalia, P. J., Aires, O. T., and Paula, E. (2015). Gut morphology and hepatic oxidative status of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles fed plant feedstuffs or fishmeal-based diets supplemented with short-chain fructo-oligosaccharides and xylo-oligosaccharides. *British Journal of Nutrition*, 114(12), 1975-1884.
- Ismail, B. and Nampoothiri, B. K. (2014). Molecular characterization of an exopolysaccharide from a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510 and its efficacy to improve the texture of starchy food. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 4012-4018.

- Jamshidparvar, A., Javandel, F., Seidavi, A., Pena Blanco, F., Martinez Marin, A. L., Aviles Ramirez, C., Agüera Buendia, E., and Nunez-Sanchez, N. (2017). Effects of golpar (*Heracleum persicum* Desf.) and probiotics in drinking water on performance, carcass characteristics, organ weights, blood plasma constituents, and immunity of broilers. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(30), 23571-23577.
- Jia, E. T., Li, Z. Q., Xue, Y. F., Jiang, G. Z., Li, X. F., Liu, W. B., and Zhang, D. D. (2017). Effects of dietary fructooligosaccharide on the growth, antioxidants, immunity and disease resistance of Chinese mitten crab. *Aquaculture*, 481, 154-161.
- Jiang, P., Li, J., Han, F., Duan, G., Lu, X., Gu, Y., and Yu, W. (2011). Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *Public Library of Science*, 6, 1-11.
- Jolly, L., Vincent, S. J., Duboc, P., and Neeser, J. R. (2002). Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 367-374.
- Joo, H. S. and Otto, M. (2012). Molecular basis of *in vivo* biofilm formation by bacterial pathogens. *Chemistry & Biology*, 19(12), 1503-1513.
- Jozefiak, 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.
- Kanmani, P., Kumar, R. S., 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, 4827-4833.
- 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(163), 1-10.
- Kelly-Quagliana K. A., Nelson P. D., and Buddington R. K. (2003). Dietary oligofructose and inulin modulate immune functions in mice. *Nutrition Research*, 23, 257-267.
- 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, 324-329.
- Kothari, D., Patel, S., and Goyal, A. (2014). Therapeutic spectrum of nondigestible oligosaccharides: overview of current state and prospect. *Journal of Food Science*, 79(8), 1491-1498.
- Kuda, T., Kawahara, M., Nemoto, M., Takahashi, H., and Kimura, B. (2014). *In vitro* antioxidant and anti-inflammation properties of lactic acid bacteria isolated from fish intestines and fermented fish from the Sanriku *Satoumi* region in Japan. *Food Research International*, 64, 248-255.

- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., and Kilk, A. (2002). Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 215-224.
- Latha, S., Vinothini, G., Calvin D. J. D., and Dhanasekaran, D. (2016). *In vitro* probiotic profile based selection of indigenous actinobacterial probiont *Streptomyces* sp. JD9 for enhanced broiler production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(1), 124-131.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and Keersmaecker, S. C. (2008). Genes and molecules of *Lactobacilli* supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72, 728-764.
- Leriche, V., Sibille, P., and Carpentier, B. (2000). Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1851-1856.
- Li, B., Zhang, N., Wang, D. X., Jiao, L., Tan, Y., Wang, J., Li, H., Wu, W., and Jiang, D.C. (2018). Structural analysis and antioxidant activities of neutral polysaccharide isolated from *Epimedium koreanum* Nakai. *Carbohydrate Polymers*, 196, 246-253.
- Li, S., Huang, R., Shah, N. P., Tao, X., Xiong, Y., and Wei, H. (2014). Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Dairy Science*, 97(12), 7334-7343.
- Li, W., Ji, J., Tang, W., Rui X., Chen, X., Jiang, M., and Dong, M. (2014). Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydrate Polymers*, 102, 351-359.
- Lin, M. Y. and Yen, C. L. (1999). Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1460-1466.
- Liu, C. F., Tseng, K. C., Chiang, S. S., Lee, B. H., Hsu, W. H., and Pan, T. M. (2011). Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12), 2284-2291.
- Lo, T. C. T., Kang, M. W., Wang, B. C., and Chang, C. A. (2007). Glycosyl linkage characteristics and classifications of exo-polysaccharides of some regionally different strains of *Lentinula edodes* by amplified fragment length polymorphism assay and cluster analysis. *Analytica Chimica Acta*, 592(2), 146-153.
- Lo, T. C. T., Chang, C. A., Chiu, K. H., Tsay, P. K., and Jen, J. F. (2011). Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide components and glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods. *Carbohydrate Polymers*, 86(1), 320-327.
- Looijesteijn, J. P., Boels, C. I., Kleerebezem, M., and Hugenholtz, J. (1999). Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source. *Applied And Environmental Microbiology*, 65(11), 5003-5008.

- Lopez-Alarcon, C. and Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10.
- Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., and Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 840-860.
- Maesschalck, C., Eeckhaut, V., Maertens, L., Lange, L., Marchal, L., Nezer, C., Baere, S., Croubels, S., Daube, G., Dewulf, J., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Taminiau, B., and Immerseela F. (2015). Effects of xylo-oligosaccharides on broiler chicken performance and microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(17), 5880-5888.
- Maiorano, G., Stadnicka, K., Tavaniello, S., Abiuso, C., Bogucka, J., and Bednarczy, M. (2017). *In ovo* validation model to assess the efficacy of commercial prebiotics on broiler performance and oxidative stability of meat. *Poultry Science*, 96, 511-518.
- Marshall, B. M. and Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24, 718-733.
- Martinez, R. C., Bedani, R., Marta, S., and Saad, I. (2015). Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: An update for current perspectives and future challenges. *British Journal of Nutrition*, 114, 1993-2015.
- Mao, J. W., Yin, J., Ge, Q., Jiang, Z. L., and Gong, J. Y. (2013). *In vitro* antioxidant activities of polysaccharides extracted from Moso Bamboo-Leaf. *International Journal of Biological Macromolecules*, 55, 1-5.
- Mehdi, Y., Letourneau -Montminy, M. P., Gaucherc, M., Chorfic, Y., Sureshd, G., Rouissid, T., Brard, S. K., Cote, C., Ramirez, A. A. and Godboutb, S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition*, 4 (2), 170-178.
- Mende, S., Rohm, H., and Jaros, D. (2016). Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability, and sensory properties of yoghurt and related products. *International Dairy Journal*, 52, 57-71.
- 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, 1041-1049.
- Miao, M., Ma, Y., Jiang, B., Huang, C., Li, X., Cui, S. W., and Zhang, T. (2014). Structural investigation of a neutral extracellular glucan from *Lactobacillus reuteri* SK24.003. *Carbohydrate Polymers*, 106(15), 384-392.
- Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H., and Prajapati, J. (2015). Probiotics as potential antioxidants: A systematic review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 3615-3626.

- More, T. T., Yadav, J. S., Yan, S., Tyagi, R. D., and Surampalli, R. Y. (2014). Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *Journal of Environmental Management*, 144, 1-25.
- Mountzouris, K. C., Tsitsrikos, P., Kalamara, E., Nitsch, S., Schatzmayr, G., and Fegeros, K. (2007). Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poultry Science*, 86(2), 309-317.
- Mountzouris, K. C., Tsitsrikos, P., Palamidi, I., Arvaniti, A., Mohnl, M., Schatzmayr G., and Fegeros, K. (2010). Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poultry Science*, 89(1), 58-67.
- 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. *Public Library of Science*, 7(9), 43928.
- Nikolic, M., Lopez, P., Strahinic, I., Suarez, A., Kojic, M., Fernandez-Garcia, 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.
- Noohi, N., Ebrahimipour, G., Rohani, M., Talebi, M., and Pourshafie, M. R. (2016). Evaluation of potential probiotic characteristics and antibacterial effects of strains of *Pediococcus* species isolated from broiler chickens. *British Poultry Science*, 57(3), 317-323.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., and Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49-79.
- Özşehitoğlu, Ö. ve Yılmaz, A. (2009). *Sütte konjuge linoleik asit içeriğini artırmaya dayalı besleme stratejileri*, 6. Ulusal Zootečni Kongresi, Tam Metinler Kitabı, 9-16.
- Pal, A. and Paul, A. K. (2008). Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, 48, 49-64.
- Pan, D. and Yu, Z. (2014). Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*, 5, 108-119.
- Park, A. R. and Oh, D. K. (2010). Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: Current state and perspectives. *Applied Microbiology Biotechnology*, 85, 1279-1286.
- Park, S. H., Gibson, K. E., Almeida, G., and Ricke, S. C. (2014). Assessment of gastrointestinal microflora in pasture raised chickens fed two commercial prebiotics. *Journal of Probiotics and Health*, 2(1), 1-6.

- Park, S. H., Lee, S. I., Kim, S. A., Christensen, K., and Ricke, S. C. (2017). Comparison of antibiotic supplementation versus a yeast-based prebiotic on the cecal microbiome of commercial broilers. *Public Library of Science*, 12(8), 1-16.
- Park, S. H., Perrotta, A., Hanning, I., Diaz-Sanchez, S., Pendleton, S., Alm, E., and Ricke, S. C. (2017). Pasture flock chicken cecal microbiome responses to prebiotics and plum fiber feed amendments. *Poultry Science*, 96, 1820-1830.
- Patterson, J. A. and Burkholder, K. M. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, 82, 627-631.
- Pisoschi, A. M. and Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- Pourabedin, M. and Zhao, X. (2015). Prebiotics and gut microbiota in chickens. *FEMS Microbiology Letters*, 362(15), 1-8.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219-236.
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., and Kumar, M. N. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113(3), 189-207.
- Rani, R. P., Anandharaj, M., and David R., A. (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.
- Raza, W., Makeen, K., Wang, Y., Xu, Y., and Qirong, S. (2011). Optimization, purification, characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21. *Bioresource Technology*, 102(10), 6095-6103.
- Reid, G. and Friendship, R. (2002). Alternatives to antibiotic use: Probiotics for the gut. *Journal Animal Biotechnology*, 13(1), 97-112.
- Reinheimer, J. A., Demkow, M. R., and Condioti M. C. (1990). Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures. *Australian Journal of Dairy Technology*, 45(1), 5-9.
- Ricke, S. C. (2015). Potential of fructooligosaccharide prebiotics in alternative and nonconventional poultry production systems. *Poultry Science*, 94, 1411-1418.
- Ricke, S. C., Dunkley, C. S., and Durant, J. A. (2013). A review on development of novel strategies for controlling *Salmonella enteritidis* colonization in laying hens: Fiber-based molt diets. *Poultry Science*, 92, 502-525.
- Rodrigues, L. R. (2011). Inhibition of bacterial adhesion on medical devices. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 715, 351-367.

- Sabzi, E., Mohammadiazarm, H., and Salati, A. P. (2017). Effect of dietary l -carnitine and lipid levels on growth performance, blood biochemical parameters and antioxidant status in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 480, 89-93.
- Salazar, N., Gueimonde, M., De Los Reyes-Gavilan, C. G., and Ruas-Madiedo, P. (2015) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria as fermentable substrates by the intestinal microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(9), 1440-53.
- 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.
- Samanya, M. and Yamauch, K. (2002). Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. *natto*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 133, 95-104.
- Sarikaya, H., Aslim, B., and Yuksekdog, Z. N. (2017). Assessment of anti-biofilm activity and bifidogenic growth stimulator (BGS) effect of lyophilized exopolysaccharides (l-EPSs) from *Lactobacilli* strains. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 362-371.
- Sasikumar, K., Vaikkath, D., Devendra, L., and Nampoothiri, K. M. (2017). An exopolysaccharide (EPS) from a *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods. *Bioresource Technology*, 241, 1152-1156.
- 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, 74-80.
- Scheibmeir, H. D., Christensen, K., Whitaker, S. H., Jegaethesan, J., Clancy., R., and Pierce, J. D. (2005). A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing*, 21(1), 24-8
- Schrezenmeir, J. and Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 361-364.
- Seddik, H., Bendali, F., Cudennec, B., and Drider, D. (2017). Anti-pathogenic and probiotic attributes of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum* strains isolated from feces of Algerian infants and adults. *Research in Microbiology*, 168(3), 244-254.
- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 405-440.
- Sharma, O. P. and Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113, 1202-1205

- Shi, Y., Cui, X., Gu S., Yan, X., Li, R., Xia, S., Chen, H., and Ge, J. (2018). Antioxidative and probiotic activities of lactic acid bacteria isolated from traditional artisanal milk cheese from Northeast China. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-14.
- 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. *Public Library of Science*, 12(5), 1-20.
- Silva D. G., Cooper P. D., and Petrovsky N. (2004). Inulin-derived adjuvants efficiently promote both Th1 and Th2 immune responses, *Immunology & Cell Biology*, 82, 611-616.
- Simoes, M., Simoes 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.
- Slawinska, A., Plowiec, A., Siwek, M., Jaroszewski, M., and Bednarczyk, M. (2016). Long-Term transcriptomic effects of prebiotics and synbiotics delivered *in ovo* in broiler chickens. *Public Library of Science*, 11(12), 1-21.
- Sobolewska, A. , Elminowska-Wenda, G, Bogucka, J., Dankowiakowska, A., Kulakowska, A., Szczerba, A., Stadnicka, K., Szpinda, M., and Bednarczyk, M. (2017). The influence of *in ovo* injection with the prebiotic DiNovo® on the development of histomorphological parameters of the duodenum, body mass and productivity in large-scale poultry production conditions. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(45), 1-8.
- Songisepp, E., Kals, J., Kullisaar, T., Mandar, R., Hütt, P., Zilmer, M., and Mikelsaar, M. (2005). Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers. *Nutrition Journal*, 4, 22.
- Soyuçok, A., Ekiz T. ve Başıyigit K. G. (2016). Ekzopolisakkaritlerin özellikleri ve gıda sanayindeki önemi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi TARGİD*, 332-344.
- Su, J., Wang, T., Li, Y., Li, J., Zhang, Y., Wang, Y., Wang, H., and Li, H. (2015). Antioxidant properties of wine lactic acid bacteria: *Oenococcus oeni*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 5189-5202.
- 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.
- Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3-9.
- Taheur, F. B., Kouidhi, B., Fdhila, K., Elabed, H., Slama, R. B., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., and Chaieb, K. (2016). Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 97, 213-220.
- Tallon, R., Bressollier, P., and Urdaci, M. C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, 154, 705-712.

- 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.
- Tareb, R., Bernardeau, M., Gueguen, M., and Vernoux, J. P. (2013). *In vitro* characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medical Microbiology*, 62(4), 637-49.
- Torino, M. I., Valdez, G. F., and Mozzi, F. (2015). Biopolymers from lactic acid bacteria: Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 6, 834-839.
- Trabelsi, I., Ktari, N., Ben Slima, S., Triki, M., Bardaa, S., Mnif, H., and Ben Salah, R. (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.
- 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.
- Vanbelle, N., Teller, E., and Focant, M. (1990). Probiotics in animal nutrition. *Archiv Animal Nutrition*, 40, 543-567.
- Vastano, V., Perrone, F., Marasco, R., Sacco, M., and Muscariello, L. (2016). Transcriptional analysis of exopolysaccharides biosynthesis gene clusters in *Lactobacillus plantarum*. *Archives of Microbiology*, 198, 295-300.
- Villaluenga, C. M., Wardenska, M., Pilarski, R., Bednarczyk, M., and Gulewicz, K. (2004). Utilization of the chicken embryo model for assessment of biological activity of different oligosaccharides. *Folia Biologica (Krakow)*, 52(3-4), 135-42.
- Vrese, M. and Marteau, P.R. (2007). Probiotics and prebiotics: Effects on diarrhea. *The Journal of Nutrition*, 137, 803-811.
- Vu, B., Chen, M., Crawford R. J., and Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7), 2535-2554.
- Yang, H., Deng, J., Yuan, Y., Fan, D., Zhang, Y., Zhang, R., and Han, B. (2015). Two novel exopolysaccharides from *Bacillus amyloliquefaciens* C-1: Antioxidation and effect on oxidative stress. *Current Microbiology*, 70, 298-306.
- 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*, 2(239), 313-320.

- 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, 1015-1021.
- Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., Yang, Z., and Li, S. (2013). Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 270-275.
- Wang, K., Li, W., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., and Dong, M. (2014). Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, 133-139.
- Wang, J., Tang, W., Zheng, Y., Xing, Z., and Wang, Y. (2016). Functional and bioinformatics analysis of an exopolysaccharide-related gene (epsN) from *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3. *Archives of Microbiology*, 198, 611-618.
- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., and Yang, Z. (2015). 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.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., and Yang, Z. (2015). Characterization of an Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 Isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 125, 16-25.
- Wang, X., Farnell, Y. Z., Peebles, E. D., Kiess, A. S., Wamsley, K. G. S., and Zhai, W. (2016). Effects of prebiotics, probiotics, and their combination on growth performance, small intestine morphology, and resident *Lactobacillus* of male broilers. *Poultry Science*, 95, 1332-1340.
- 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*, 1-12.
- Zivković, M., Miljkovic, M., Ruas-Madiedo, P., Strahinic, I., Tolinacki, M., Golic, N., and Kojic, M. (2015). Exopolysaccharide production and rosy 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.
- Xu, L., Wang, Q., Xiao, J., Liu, Q., Wang, X., Chen, T., and Zhang, T. (2010). Characterization of *Edwardsiella tarda* waal: roles in lipopolysaccharide

biosynthesis, stress adaptation, and virulence toward fish. *Archives of Microbiology*, 192, 1039-1047.

Xu, R., Ma, S., Wang, Y., Liu, L., and Li, P. (2010). Screening, identification and statistic optimization of a novel exopolysaccharide producing *Lactobacillus paracasei* HCT. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 783-795.

Qiao, D., Ke, C., Hu, B., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Yan, X., and Zeng, X. (2009). Antioxidant activities of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*. *Carbohydrate Polymers*, 78(2), 199-204.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇELİK, Kübra
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 01.01.1994, Ankara
 Medeni hali : Bekâr
 e-mail : biokubracelik@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birim	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	2018
Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	2015
Lise	Halide Edip Lisesi	2011

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2018	İntergen Genetik Tanı Merkezi	Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

-

Yayınlar

Celik, K. and Yuksekdağ, Z. N. (2017, October 23-25). *The anti-biofilm and antimicrobial activities lyophilized exopolysaccharides (l-EPs) from Lactobacilli isolates*, 19th International Conference on Journal of Food Processing & Technology, Paris.

Yuksekdag, Z. N. and Celik, K. (2018, July 17-21). *The Anti-oxidant activities of lyophilized exopolysaccharides (l-EPs) of 4 lactobacilli strains isolated from chicken's feces*, 3rd International Conference on Engineering Technology and Applied Sciences (ICETAS), Makedonia.



GAZİ GELECEKTİR..