



## Tavuk Kökenli *Enterococcus faecium* ve *Lactobacillus* Türlerinin Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması [\*]

Yağmur KOÇAK Alper ÇİFTÇİ\*

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi ABD, Samsun

Geliş/Received: 04.07.2020

Kabul/Accepted: 28.08.2020

Atf yapmak için: Çiftçi, A. & Koçak, Y. (2020). Tavuk Kökenli *Enterococcus faecium* ve *Lactobacillus* Türlerinin Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(3), 356-365.

How to cite: Çiftçi, A. & Koçak, Y. (2020). Investigation of Probiotic Properties of Chicken Originated *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus* Species. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(3), 356-365.

\*id: <https://orcid.org/0000-0001-8370-8677>  
id: <https://orcid.org/0000-0002-5784-4197>

**Öz:** Bu çalışmada potansiyel probiyotik bakterilerden *Lactobacillus* spp. ve *Enterococcus faecium*'un sağlıklı tavuklardan izolasyonu ve probiyotik olarak kullanılma potansiyellerinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada Samsun'da bulunan ticari bir kanatlı hayvan mezbasından 50 adet tavuğa ait bağırsak incelendi. Bağırsak mukozalarından alınan örneklerden *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* bakterilerinin izolasyonu amacıyla selektif besi yerlerine ekim yapıldı. Şüpheli kolonilerin identifikasyonu PCR ile yapıldı. İzole edilen bakterilerin % 0,5-1,0 safra konsantrasyonlarına direnci için Safra Tolerans Testi gerçekleştirildi. İzolatların pH 3 ve pH 5'e direnç durumları pH Tolerans Testi ile belirlendi. İzolatların hidrofobisite %0,03 Kongo Kırmızılı agar kullanılarak incelendi. İzolatların antibiyotik dirençlilikleri dokuz farklı antibiyotik diski kullanılarak Disk Difüzyon Testi ile belirlendi. İzolatların patojen *Escherichia coli* izolatına karşı antagonistik etkilerinin araştırılmasında Radyal Difüzyon yöntemi kullanıldı. Örneklerden 20 adet *E. faecium* ve 9'u *L. acidophilus* olmak üzere 21 adet *Lactobacillus* spp. izole edildi. İzolatların tümünün % 0,5-1,0 safra konsantrasyonlarına, pH 3-5'e dirençli oldukları saptandı. İzolatların tümünün hidrofobik karakterde olduğu, ancak hiçbirinin *E. coli*'ye karşı antagonistik etki göstermediği belirlendi. *E. faecium* izolatlarının 8 tanesi 8 antibiyotiğe karşı dirençli olarak değerlendirildi. *Lactobacillus* spp. izolatlarının 1 tanesinin 5 antibiyotiğe ve *L. acidophilus* izolatlarından da 1 tanesinin 7 antibiyotiğe dirençli olduğu belirlendi ve çoklu dirence sahip suşlar olarak değerlendirildi. Çalışma sonucunda tüm izolatların hidrofobik özellikte olduğu, safra ve düşük pH'ya dirençli olduğu fakat hiçbirinin *E. coli*'ye karşı test edilen koşullarda etkili olmadığı belirlendi. Elde edilen sonuçlar, *E. faecium*, *L. acidophilus* ve *Lactobacillus* spp. izolatlarından çoklu antibiyotik direnci gösterenlerin probiyotik olarak kullanılabilir özellikte olduğunu ve *in vivo* koşullarda etkinlik denemeleri yapılması gerekliliğini göstermektedir.

**\*Sorumlu yazarın:**

Alper ÇİFTÇİ  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner  
Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi ABD,  
Samsun; Türkiye  
✉: [aciftci@omu.edu.tr](mailto:aciftci@omu.edu.tr)  
Cep telefonu : +90 (505) 615 00 75  
Telefon : +90 (362) 312 19 19  
Faks : +90 (362) 457 69 22

**Anahtar kelimeler:** *Enterococcus faecium*; *Lactobacillus*; probiyotik; tavuk.

## Investigation of Probiotic Properties of Chicken Originated *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus* Species

**Abstract:** In this study, the isolation of *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus faecium* and the investigation of the potential use as probiotic were aimed. In a study, 50 chicken intestines taken from a commercial chicken slaughter house in Samsun were investigated. The samples from intestinal mucosae were inoculated to the selective mediums. Suspected colonies were identified by PCR. The isolated bacteria were investigated for bile (0.5-1%) and pH (3-5) resistances. The hydrophobicity's were tested by using 0.03% Congo Red Agar. The antibiotic resistances of the isolates were determined by Disc Diffusion Test for 9 antibiotics. The Radial Diffusion Method was used for determining the antagonistic effects against *Escherichia coli*. Twenty *E. faecium*, 21 *Lactobacillus* spp. (9 *L. acidophilus*) were isolated. All the isolets were resistant to tested bile and pH conditions. All the isolates were hydrophobic, but none of them had an antagonistic effect against *E. coli*. Eight of *E. faecium* isolates were found as resistant to 8 antibiotics. One *Lactobacillus* spp. and 1 *L. acidophilus* isolates were resistant to 5 and 7 antibiotics, respectively. These isolates were evaluated as multi-antibiotic resistant. In conclusion, we detected that all the isolates were hydrophobic, resistant to bile and low pH conditions; but none of them had an antagonistic effect against *Escherichia coli* in tested conditions. These results indicated that the

**\*Corresponding author's:**

Alper ÇİFTÇİ  
Ondokuz Mayıs University, Faculty of  
Veterinary Medicine, Department of  
Veterinary Microbiology, Samsun; Türkiye.  
✉: [aciftci@omu.edu.tr](mailto:aciftci@omu.edu.tr)  
Mobile telephone : +90 (505) 615 00 75  
Telephone : +90 (362) 312 19 19  
Fax : +90 (362) 457 69 22

multi-antibiotic resistant isolates of *E. faecium*, *L. acidophilus* and *Lactobacillus* spp. had a potential of using as a probiotic and further *in vivo* efficiency studies had to be essential for these strains.

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

## GİRİŞ

Probiyotik terimi “canlı için” (Latince “pro” ve “bios”) anlamına gelmektedir. Güncel araştırmalar ve kullanım alanlarına bağlı olarak probiyotikler, “kalitatif ya da kantitatif olarak bağırsak mikroflorasını etkileyen veya immün sistemin durumunu değiştirerek yararlı etkilerini tetikleyen, insan ve hayvanlar tarafından tüketilen canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlanmaktadır (Fuller, 2004).

Laktik asit bakterileri probiyotik olarak en çok kullanılan mikroorganizmalar olup 6 gruba ayrılırlar (Tannock, 1997). Bunlar; *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Bifidobacterium*’dur. *Bacillus*, *Saccharomyces* ve *Aspergillus* türleri de laktik asit bakterileri dışında probiyotik olarak kullanılan diğer mikroorganizmalar arasında sayılabilir. Laktobasiller fakültatif anaerobik bakteriler olup, pH 3.0’e kadar tolerans göstermektedir. Böylece bu bakteriler düşük mide pH’sında canlılıklarını koruyarak, bağırsak kanalına geçip etkilerini burada gerçekleştirirler. Duodenumda safra tuzlarından etkilenmezler. Ayrıca, pek çok *Lactobacillus* suşu 45-48°C gibi yüksek ısı ve basınca nispeten dayanıklı olduğundan yem yapım işlemleri sırasında ısı ve basınçtan etkilenmeyerek canlılıklarını koruyabilir. Enterokoklar, fakültatif anaerobik, 10°C ve 45°C’de, pH 9,6’da, % 6,5 NaCl’ de % 40 safra tuzunda gelişebilen bakterilerdir. *E. faecium* ve *E. faecalis*, bağırsak hastalıklarındaki etkileri nedeniyle geçmişte probiyotik olarak kullanılmıştır. Bakteriyosin üretimi gibi özelliklere sahip olsalar da, patojenlere antimikrobiyel direnç aktarımına neden olabileceklerinden endişe duyulmaktadır. Bu bakterilerin ticari formları ilaç preparasyonları haline getirilmiştir (Mombelli & Gismondo, 2000).

Kanatlı hayvanların büyümesi ve sağlıklı olarak yetiştirilmesi özellikle ince bağırsaklarda besinlerin emilim ve yararlanım kapasiteleri ile ilişkilidir. Söz konusu emilim ve sindirimin oluşumu da bağırsak kanalındaki yararlı mikroorganizmaların varlığı ve oranı ile direkt olarak bağlantılıdır. Bağırsak mikroflorası hayvanların büyüme ve gelişme oranını etkilemektedir. Sabit ve dengeli bir bağırsak florası sindirimin iyi olmasını, yemden yararlanmanın artmasını ve enfeksiyonlara karşı direnci sağlamaktadır (Suzuki vd., 1989). Normal koşullar altında, yumurtadan steril halde çıkan civcivler, 2-5 saat içerisinde çevrede var olan çeşitli mikroorganizmalara maruz kalmaktadır. Bu mikroorganizmaların alınması ile gastrointestinal sistemde mikroflora şekillenmeye

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

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

## MATERYAL VE METOT

### *Hayvan Materyali ve Bakteriyolojik İzolasyon:*

Çalışmada *E. coli*’ye karşı antagonistik etki gösteren *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* bakterilerinin izolasyonu amacıyla Kavak/Samsun’da bulunan kanatlı hayvan mezbahasında kesim aşamasında olan 50 adet tavuğa ait bağırsak alındı.

Bağırsaklar steril şartlar altında kesilip, duodenum mukozasından lam ile kazıntı alındı. Alınan örnekler steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile 1/10 (v/v) oranında homojenize edildi. Süspansiyonlardan  $10^{-8}$ ’e kadar steril fizyolojik tuzlu su ile dilüsyonlar hazırlandı. Hazırlanan dilüsyonlar *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* izolasyonu için kullanıldı.

*Enterococcus faecium* selektif izolasyonu için  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  ve  $10^{-4}$ ’lük dilüsyonlardan 0,1 ml alınarak 3 adet Bile Esculin Agar (BEA)’a yayma tarzında ekim yapıldı (Gülhan vd., 2015; Stropfova vd., 2004;). Ekim yapılan besi yerleri 37°C’de 24 saat süreyle aerobik koşullarda

inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi siyah renkli-  
eskülin pozitif bakteri kolonisi içeren besi yerleri  
değerlendirmeye alındı.

*Lactobacillus* spp. selektif izolasyonu amacıyla  
10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> ve 10<sup>-4</sup> lük dilüsyonlardan 0,1 ml alınarak 3 adet  
De Man, Rogosa ve Sharpemrs (MRS) agar'a ekim yapıldı.  
Anaerobik koşullarda (Anaerobic gas pack ile jar  
içerisinde) 48 saat 35°C'de inkübe edildi. İnkübasyon  
süresi sonunda besi yerleri değerlendirmeye alındı  
(Sieladie vd., 2011).

**Genotipik İdentifikasyon:** Genotipik  
identifikasyon amacıyla *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium*

şüpheli izolatların prensibi spin kolon ile filtrasyon  
sistemine dayanan ticari DNA ekstraksiyon kiti (Thermo  
Scientific, GeneJET Genomic DNA Purifikasyon Kiti)  
kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre DNA  
ekstraksiyonları gerçekleştirildi.

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

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan oligonükleotid primer dizileri.

**Table 1.** Oligonucleotide primer sequences used in the study.

Bakteri	Primer	Oligonükleotid dizisi (5'-3')	Boyut	Referans
<i>Enterococcus</i> spp.	ENT1 ENT2	TACTGACAAACCATTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	112	Ke vd. (1999)
<i>Enterococcus faecium</i>	FM1 FM2	GAAAAACAATAGAAGAATTAT TGCTTTTTGAATTCTTCTTIA	215	Jackson vd. (2004)
<i>Lactobacillus</i> spp.	Lacto F Lacto R	TGGAAACAGGTGCTAATACCG CCATTGTGGAAGATTCCC	230	Markiewicz & Biedrzycka (2005)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LacidoF LacidoR	CACTTCGGTGATGACGTTGG CGATGCAGTTCCTCGGTTAAGC	575	Sul vd. (2007)

#### **İzolatların Safra Toleranslarının Belirlenmesi:**

İzolatların safra toleransının belirlenmesi amacıyla steril  
FTS içerisinde 10<sup>7</sup> kob/ml olacak şekilde süspansiyonları  
hazırlandı. Safra tolerans testi % 0,5 ve %1,0 safra  
konsantrasyonları için test edildi. Bu amaçla; her bir  
*Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* izolatu için ayrı ayrı  
olmak üzere steril mikroplyet kuyucuklarına % 0,5 ve %1,0  
oranında safra içeren 200 µl steril PBS konuldu.  
Kuyucuklara 10<sup>7</sup> kob/ml olacak şekilde hazırlanmış olan  
test edilecek izolatlardan 20 µl inokule edildi. Her izolat  
için bir kuyucuk da kontrol olarak tasarlandı ve bu  
kuyucuğa safra içermeyen 200 µl bakteri süspansiyonu  
eklendi. *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* içeren  
mikroplyetler sırasıyla 35°C ve 37°C'de 1,5 saat  
inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda her  
kuyucuktaki süspansiyon 10<sup>-5</sup>'e kadar seyreltilerek 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>  
ve 10<sup>-4</sup> lük dilüsyonlardan *Lactobacillus* spp. için 3'er  
adet MRS agara, *E. faecium* için de 3'er adet BEA'ya 50  
□l olmak üzere yayma tarzında ekim yapıldı. Besi yerleri  
*Lactobacillus* spp. için 35°C'de 48 saat (anaerobik  
koşullarda) ve *E. faecium* için 37°C'de 24 saat süreyle  
inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda canlı  
bakteri sayımı yapılarak, izolatların safra toleransları  
belirlendi (Hassanzadazar vd., 2012; Sahadeva vd., 2011;  
Strompfova vd., 2004).

#### **İzolatların pH Toleranslarının Belirlenmesi:**

İzolatların pH toleransının belirlenmesi amacıyla steril  
FTS içerisinde 10<sup>7</sup> kob/ml olacak şekilde süspansiyonları  
hazırlandı. pH tolerans testi pH 3 ve pH 5 için test edildi.  
Bu amaçla; her bir *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* izolatu  
için ayrı ayrı olmak üzere steril mikroplyet kuyucuklarına

5N'lık HCl ile pH 3 ve pH 5'e ayarlanan 200 µl steril PBS  
konuldu. Kuyucuklara 10<sup>7</sup> kob/ml olarak hazırlanmış olan  
test edilecek izolatlardan 20 µl inokule edildi. Her izolat  
için bir kuyucuk da kontrol olarak tasarlandı ve bu  
kuyucuklara pH 7'ye ayarlanmış olan 200 µl bakteri  
süspansiyonu eklendi. *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium*  
içeren mikroplyetler sırasıyla 35°C ve 37°C'de 1.5 saat  
inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda her  
kuyucuktaki süspansiyon 10<sup>-5</sup>'e kadar seyreltilerek 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>  
ve 10<sup>-4</sup> lük dilüsyonlardan *Lactobacillus* spp. için 3'er  
adet MRS agara, *E. faecium* için de 3'er adet BEA'ya 50  
µl olmak üzere yayma tarzında ekim yapıldı. Besi yerleri  
*Lactobacillus* spp. için 35°C'de 48 saat (anaerobik  
koşullarda) ve *E. faecium* için 37°C'de 24 saat süreyle  
inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda canlı  
bakteri sayımı yapılarak, izolatların pH toleransları  
belirlendi (Hassanzadazar vd., 2012; Sahadeva vd., 2011;  
Strompfova vd., 2004).

#### **İzolatların Hidrofobisitesinin Belirlenmesi:**

İzolatların hidrofobisitesinin belirlenmesi için % 0,03  
Kongo Kırmızısı karıştırılmış TSA ve MRS agar  
hazırlandı. İzolatlar *Lactobacillus* spp. için Kongo  
kırmızısı içeren MRS agara, *E. faecium* için de kongo  
kırmızısı içeren TSA'ya ekildi ve sırasıyla 35°C'de 48 saat  
(anaerobik koşullarda) ve 37°C'de 24 saat inkübasyona  
bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda koloniler renklerine  
göre değerlendirildi. Kırmızı koloniler pozitif (hidrofobik),  
beyaz veya renksiz koloniler ise negatif (non-hidrofobik)  
olarak kabul edildi (Sharma vd., 2006).

**İzolatların Antimikrobiyal Duyarlıklarının  
Belirlenmesi:** İzolatların antibiyotik dirençlilik/duyarlılık

profilleri amoksisilin (25 µg), amoksisilin/klavulanik asit (20/10 µg), ampisilin (10 µg), enrofloksasin (5 µg), eritromisin (15 µg), linkomisin (2 µg), neomisin (30 µg), oksitetrasiklin (30 µg) ve trimetoprim/sulfametaksazol (1.25/23.75 µg) antibiyotik diskleri kullanılarak Kirby Bauer Disk Difüzyon testi ile belirlendi (CLSI, 2013). Antibiyotik disklerinin yerleştirilmesi sonrasında *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* için sırasıyla 35°C'de 48 saat (anaerobik koşullarda) ve 37°C'de 48 ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda inhibisyon çapları ölçüldü ve direnç profilleri antibiyotik diski üreticisi firmanın bildirmiş olduğu zon çaplarına göre değerlendirildi.

İzolatların *E. coli*'ye Karşı *in vitro* Antagonistik Etkilerinin Belirlenmesi: İshalli tavuklardan izole edilmiş olan ve kültür koleksiyonumuzda bulunan patojen *E. coli* izolatına karşı, tavukların bağırsak mikroflorasından izole edilen bakterilerin antagonistik etkilerinin araştırılmasında Radyal Difüzyon yöntemi kullanıldı (Abdel-Daim vd., 2013; Hassanzadazar vd., 2012; Hjelm vd., 2004). Bu amaçla *E. coli* izolatının 0,5 Mc Farland konsantrasyonundaki sıvı kültüründen 100 µl alınarak, döküm sıcaklığına kadar soğutulmuş 500 ml TSA'ya 50 µl olmak üzere ilave edildi. Bakterinin besi yerinde homojen bir şekilde dağılımı için döküm öncesinde iyice karıştırıldı. Patojen *E. coli* izolatının ilave edildiği besi yerlerinin petrilere dökümü yapıldı ve 15 dk beklendikten sonra her bir besi yeri üzerine steril durhaym tüpleri kullanılarak yaklaşık 5 mm çapında 4 adet çukur açıldı. Besi yeri üzerinde açılan çukurlara, test edilecek izolatların 0,5 Mc Farland konsantrasyonundaki taze sıvı kültürlerinden 150 µl ilave edildi. Besi yerleri 37°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyucukların etrafında oluşan şeffaf inhibisyon zonlarının ölçümü yapıldı.

## BULGULAR

**Bakteriyolojik İzolasyon:** *Enterococcus faecium* selektif izolasyonu için Bile Esculin Agar'a yapılan inokulasyon sonucunda 115 adet eskulin pozitif bakteri kolonisi şüpheli olarak değerlendirildi. Gram boyama sonucunda tüm şüpheli izolatların Gram pozitif-kok morfolojisinde ve katalaz negatif olduğu belirlendi.

*Lactobacillus* spp. izolasyonu amacıyla MRS agara yapılmış olan ekimler sonucunda 67 adet şüpheli koloni belirlendi. Yapılmış olan Gram boyama sonucunda tüm şüpheli izolatların Gram pozitif-çomak morfolojisinde ve katalaz negatif olduğu saptandı.

**Genotipik İdentifikasyon:** *Enterococcus* spp.'nin cins düzeyinde identifikasyonu için yapılan PCR sonucunda test edilen 115 şüpheli izolatın tamamının *Enterococcus* spp. olduğu belirlendi. *Enterococcus* spp.

pozitif olarak bulunan izolatlar *E. faecium* spesifik PCR ile tanımlanmıştır. İncelenen 115 *Enterococcus* spp. izolatının 20 adetinin pozitif bant verdiği saptandı ve *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Belirlenen 20 izolat diğer testlerde kullanılmak üzere seçildi.

*Lactobacillus* spp.'nin cins düzeyinde identifikasyonu için yapılan PCR sonucunda test edilen 67 şüpheli izolatın 21 adetinin *Lactobacillus* spp. olduğu belirlendi. *Lactobacillus* spp. pozitif olarak bulunan izolatlar *L. acidophilus* spesifik PCR ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. İncelenen 21 *Lactobacillus* spp. izolatının 9 adetinin pozitif bant verdiği saptandı ve *L. acidophilus* olarak tanımlanmıştır. *Lactobacillus* spp. olarak tanımlanmıştır. 21 izolat diğer testlerde kullanılmak üzere seçildi.

### İzolatların Safra Toleranslarının Belirlenmesi:

İzolatların safra toleransları, %0,5 ve %1,0 safra konsantrasyonlarında canlılıklarını muhafaza etmelerinin tespiti ile belirlendi. Çalışmada incelenen izolatların safra tolerans testi sonrasında canlı kalma oranları hesaplandı. Test sonucunda canlı kalma oranları Tablo 2 ve Tablo 3'te sunuldu.

**Tablo 2.** *E. faecium* izolatlarının safra tolerans testi sonucunda canlı kalma oranları (%).

**Table 2.** Survival rates of *E. faecium* isolates as a result of bile tolerance test (%).

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

**Tablo 3.** *Lactobacillus* spp. izolatlarının safra tolerans testi sonucunda canlı kalma oranları (%)

**Table 3.** Survival rates of *Lactobacillus* spp. isolates as a result of bile tolerance test (%)

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

**İzolatların pH Toleranslarının Belirlenmesi:**

İzolatların pH toleransının belirlenmesi pH 3 ve pH 5'te canlılıklarını muhafaza etme oranlarının belirlenmesi suretiyle incelendi. Test sonucunda canlı bakteri sayımı yapılarak, izolatların pH toleransları belirlendi. Test sonuçları Tablo 4 ve Tablo 5'te sunuldu.

**Tablo 4.** *E. faecium* izolatlarının pH tolerans testi sonucunda canlı kalma oranları (%).

**Table 4.** Survival rates (%) of *E. faecium* isolates as a result of pH tolerance test.

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

**Tablo 5.** *Lactobacillus* spp. izolatlarının pH tolerans testi sonucunda canlı kalma oranları (%).

**Table 5.** Survival rates (%) of *Lactobacillus* spp. isolates as a result of pH tolerance test.

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

**İzolatların Hidrofobisiterinin Belirlenmesi:**

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

**İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılıklarının**

**Belirlenmesi:** *Lactobacillus* spp. ve *E. faecium* izolatlarının incelenen antibiyotiklere karşı direnç profilleri Tablo 6'da gösterildi.

İzolatlar çoklu antibiyotik dirençliliklerine göre de değerlendirildi. İzolatların çoklu antibiyotik direnç profilleri Tablo 7'de sunuldu.

**Tablo 6.** Çalışma kapsamında izole edilen bakterilerin antibiyotik direnç profilleri.

**Table 6.** Antibiotic resistance profiles of the bacteria isolated in the study.

		AMP	N	AMC	OT	E	AX	EX	L	SXT
<i>E. faecium</i> (n=20)	S	1	0	2	2	0	6	0	0	9
	I	0	1	0	0	2	12	9	0	2
	R	19	19	18	18	18	2	11	20	9
<i>Lactobacillus</i> spp. (n=12)	S	11	2	12	9	11	12	6	2	2
	I	0	0	0	0	0	0	3	0	3
	R	1	10	0	3	1	0	3	10	7
<i>L. acidophilus</i> (n=9)	S	5	0	9	5	5	9	5	2	1
	I	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	R	4	9	0	4	4	0	4	7	7

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

**Tablo 7.** İzolatların çoklu antibiyotik direnç profilleri.

**Table 7.** Multiple antibiotic resistance profiles of the isolates.

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

**İzolatların *E. coli*'ye Karşı *in vitro* Antagonistik**

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

**TARTIŞMA VE SONUÇ**

İnsan ve hayvanların bağırsaklarında patojen mikroorganizmalara karşı antagonistik etki gösteren, bağırsak mikroflorası üzerine yararlı etkiler oluşturan ve patojen olmayan, probiyotik bakterilerden en yaygın kullanılanları laktik asit bakterileridir. Oral yol ile vücuda alınan probiyotik bakteriler gastrointestinal sistemden geçişleri sırasında canlılıklarını korumalarını engelleyen bir takım faktörlere maruz kalırlar. Laktik asit bakterilerinin gastrointestinal sistemde canlılıklarını korumaları ince bağırsakta safra tuzuna ve düşük pH'ya dayanımlarına bağlıdır (Marteau vd., 1997). Bakteriler bağırsağa belli bir sayının üzerinde ve canlılıklarını korumuş olarak ulaşmalıdır. Probiyotiklerde aranan özelliklerden birisi de bu şekilde stabil olmaları, düşük pH ve safra tuzları gibi olumsuz çevre koşullarından etkilenmeden bağırsakta metabolize olmalarıdır. Probiyotik suş seçiminde dikkate alınması gereken safra konsantrasyonları konusunda araştırmacılar arasında farklı görüşler bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar % 10 gibi yüksek

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

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

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

Probiyotik olarak kullanılacak bakterilerde aranan özelliklerden birisi de antibiyotiklere dirençli olmalarıdır. Diyare gibi antibiyotik kullanımına bağlı olarak ortaya çıkabilen hastalıklarda bağırsak florasını düzenlemek amacı ile probiyotikler kullanılmaktadır. Dolayısı ile uygulanacak probiyotik bakterilerinin bağırsaktaki

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

Çalışmada izole edilen *Lactobacillus* spp. izolatlarının %83,3'ü linkomisin ve neomisine, %58,3'ü de trimetoprim/sulfametaksazola, %25'i oksitetrasikline ve %8,3'ü ampisilin, enrofloksasin ve eritromisine karşı dirençli bulunmuşlardır. İzolatların tamamının amoksisilin ve amoksisilin/klavulanik asite duyarlı olduğu belirlendi. *L. acidophilus* izolatlarının ise %44,4'ü ampisiline, %44,4'ü enrofloksasin, oksitetrasiklin ve eritromisine, %77,8'i linkomisine, %100'ü neomisine ve %77,8'i de trimetoprim/sulfametaksazola karşı dirençli bulundu.

İzolatların tümünün amoksisilin ve amoksisilin/klavulanik asite karşı ise duyarlı olduğu tespit edildi. Turhan & Erginkaya, (2016) tarafından ticari probiyotik örneklerinden *Lactobacillus* spp. ve *L. acidophilus* suşlarının antibiyotik direnç durumlarını belirlemek için yaptıkları çalışmada *Lactobacillus* spp. izolatlarında vankomisin (%20), tetrasiklin (%20), ampisilin (%20), gentamisin (%20) ve siprofloksasine (%80) karşı direnç saptamışlardır. Suşların eritromisin, kloramfenikol ve nitrofurantoin'e ise %100 oranında duyarlı oldukları belirlenmiştir. *L. acidophilus* izolatlarında ise gentamisin (%25) ve siprofloksasine (%75) karşı dirençli saptanırken, tüm *L. acidophilus* izolatlarının vankomisin, eritromisin, tetrasiklin, ampisilin, kloramfenikol, rifampisin ve nitrofurantoin'e duyarlı oldukları bildirilmiştir. Lonkar vd., (2005) tavuklardan izole ettikleri *Lactobacillus* suşlarında yaptıkları antibiyogram sonucunda ampisiline %96,49, amoksisiline % 98,24, kloramfenikole %94,74, siprofloksasine %3,5, seftriaksona %45,61, sefaleksine %75,44, kloksasilin'e %63,16, furazolidona %10,53, gentamisine % 38,59, metronidazola % 38,59, neomisine % 3,5, norfloksasine % 3,5, penisilin-G'ye % 98,24, pefloksasine % 3,5, streptomisine %17,54, sulphamethaksazola %1, tetrasikline %8,77, trimetoprim %14,04 oranında duyarlılık saptamışlardır. İzolatların tümünün nalidiksik asite dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Karahan & Çakmakçı, (1995), civciv kör bağırsaklarından izole edilen 40 *actobacillus* spp.'nin 20 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıklarını incelemişler ve suşların tamamının amoksisilin, ampisilin ve karbenisiline, büyük bir kısmı ise penisilin, kloramfenikol, eritromisin, novobiyosin, rifampisin ve tetrasikline duyarlı bulmuşlardır. Buna karşılık suşların tamamında polimiksin B'ye direnç saptamışlardır. Basitrasin, gentamisin, kanamisin, nistatin, spektinomisin'e karşı ise %75-92,5 arasında direnç bildirilmiştir. Bu çalışmada izolatlar çoklu antibiyotik dirençliliklerine göre de değerlendirildi. *Lactobacillus* spp. izolatlarının (n=12) 1 tanesinde incelenen antibiyotiklerden hiçbirisine direnç saptanmamışken, 2 tanesi 2 antibiyotiğe, 6 tanesi 3 antibiyotiğe, 2 tanesi 4 antibiyotiğe ve 1 tanesi 5 antibiyotiğe dirençli olarak değerlendirildi. *L. acidophilus* izolatlarının (n=9) 2 tanesi 2 antibiyotiğe, 1 tanesi 3 antibiyotiğe, 1 tanesi 4 antibiyotiğe, 3 tanesi 5 antibiyotiğe, 1 tanesi 6 antibiyotiğe ve 1 tanesi 7 antibiyotiğe karşı dirençli bulunmuşlardır. Probiyotik olarak kullanım potansiyeli açısından değerlendirildiği zaman bu sonuçlar çalışmamızda izole edilen *Lactobacillus* spp. izolatlarından çoklu antibiyotik direnci belirlenmiştir. Çoklu antibiyotik direnci gösteren izolatların probiyotik olarak kullanılabilme potansiyeli olduğu kanısına varılmıştır.

Geçmişte probiyotik organizmaların patojen organizmaları inhibe etmesi için tek yolun bağlanma

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

göstermese de, *in vivo* olarak ta etkisinin araştırılması gerekliliği kanısına varılmıştır.

Kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde kullanılmakta olan karma yemlerde probiyotik kullanımıyla çeşitli çalışmalar bulunmaktadır fakat yapılan çalışmalarda kullanılan bakteriler standart bakterilerdir. Tüm dünyada kullanılmakta olan bu bakteriler yerine, yerel ya da ulusal suşlarla çalışmalar yapılması ile etkinliğin artacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada elde edilen ulusal düzeydeki bakteriler ile etkinliğin *in vivo* ortamda da araştırılması gerekmektedir. Hedef hayvan üzerinde bu bakterilerin bağırsaktaki mukozal yüzeylere kolonizasyonu, çeşitli patojenlere karşı antagonistik aktivitenin ve immün sistemin aktivasyonundaki rolünün belirlenmesi üzerine yapılacak daha ileri çalışmalar, izolatların probiyotik olarak kullanım potansiyelini ortaya çıkaracaktır.

## TEŞEKKÜR

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

## KAYNAKLAR

- Aarestrup, F.M., Ageroso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M. & Jensen, L.B. (2000).** Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 37(2), 127-137.
- Abdel-Daim, A., Hassouna, N., Hafez, M., Ashor, M.S. & Aboulwafa, M.M. (2013).** Antagonistic activity of *Lactobacillus* isolates against *Salmonella typhi* *in vitro*. *Biomedical Research International*, 15, 680605-680617.
- Balcazar, J.L., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Mu'zquiz, J.L. & Girone's, O. (2008).** Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278, 188-191.
- CLSI. (2013).** M02-A11 and M100-S23 Package - Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eleventh Edition & Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement.
- Dicks, L.M.T. (1993).** Lactic acid bacteria: Understanding the microorganism. The keys to



- successful use in maximising anti-coliform and anti-*Salmonella* activity. In: *Biotechnology in the Feed Industry. Proceeding of Alltech's Ninth Annual Symposium*, 151-168.
- Dilik, Z. & İstanbulluoğlu, E. (2010).** Studies on phenotyping and genotyping characterization of *Enterococcus* spp. isolated from extensive broiler farms and rural poultry establishments. *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 32(46), 37-46.
- Fuller, R. (1989).** A review. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378.
- Fuller, R. (2004).** Reasons for the apparent variation in the probiotic response. *Biologist*, 51(4), 232.
- Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J.M. & Hugas, M. (1998).** Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *Journal of Applied Microbiology*, 84(1), 125-132.
- Greene, J.D. & Klaenhammer, T.R. (1994).** Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4487-4494.
- Gülhan, T., Boynukara, B., Çiftci, A., Söğüt, M.Ü. & Fındık, A. (2015).** Characterization of *Enterococcus faecalis* isolates originating from different sources for their virulence factors and genes, antibiotic resistance patterns, genotypes and biofilm production. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 16(3), 261-266.
- Hassanzadazar, H., Ali, E., Karim, M. & Javad, H. (2012).** Investigation of antibacterial, acid and bile tolerance properties of lactobacilli isolated from Koozeh cheese. *Veterinary Research Forum*, 3(3), 181-185.
- Hjelm, M., Bergh, O., Riaza, A., Nielsen, J., Melcheiörsen, J., Jensen, S., Duncan, H., Ahrens, P., Birkbeck, H. & Gram, L. (2004).** Selection and identification of autochthonous candidate probiotic bacteria from Turbot Larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units system. *Applied Microbiology*, 27, 360-371.
- Jackson, C.R., Fedorka-Cray, P.J. & Barrett, J.B. (2004).** Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3558-3565.
- Jin, L.Z., Ho, Y.W., Abdullah, N. & Jalaludin, S. (1998).** Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Letters in Applied Microbiology*, 27, 183-185.
- Karahan, A.G. & Çakmakçı, M.L. (1995).** Civciv körbağırısından izole edilen bazı laktobasil suşlarının çeşitli antibiyotiklere dirençleri. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 1(1), 7-12.
- Ke, D., Picard, F.O.J., Martineau, F., Me'nard, C., Roy, P.H., Ouellette, M. & Bergeron, M.G. (1999).** Development of a PCR Assay for Rapid Detection of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3497-3503.
- Kim, C.J., Namkung, H., An, M.S. & Paik, I.K. (1988).** Supplementation of probiotics to the broiler diets containing moldy corn. *Korean Journal of Animal Science*, 30, 542-548.
- Kuleşan, H. (2002).** *Laktobasiller tarafından üretilen bakteriyosinlerin tanımlanması, sınıflandırılması ve bunların bazı gıda kaynaklı patojenler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 82s.
- Kung, L. (1990).** Microbes and enzymes. *Feed International*, 11(8), 10-16.
- Lonkar, P., Harne, S.D., Kalorey, D.R. & Kurkure, N.V. (2005).** Isolation, *in vitro* antibacterial activity, bacterial sensitivity and plasmid profile of Lactobacilli. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 18(9), 1336-1342.
- Markiewicz, L. & Biedrzycka, E. (2005).** Identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species with PCR applied to quality control of fermented dairy beverages. *Polish Journal of Food and Nutritional Science*, 55(4), 359-365.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenoer, R. & Veld, J.H.J. (1997).** Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: Validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science*, 80, 1031-1037.
- Mombelli, B. & Gismondo, M.R. (2000).** The use of probiotics in medical practise. *Antimicrobial Agents*, 16, 531-536.
- Mulder, R.A.W. (1991).** Probiotics as a tool against *Salmonella* contamination. *Misset-World Poultry*, 7(3), 36-37
- Ogawa, M., Shimizu, K. & Nomoto, K. (2001).** Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 135-140.
- Pan, W.H., Li, P.L. & Liu, Z. (2006).** The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians faeces. *Food Microbiology*, 12, 148-152.
- Rinkinen, M.L., Koort, J.M.K., Ouwehand, A.C., Westermarck, E. & Björkroth, K.J. (2004).** *Streptococcus alactolyticus* is the dominating

culturable lactic acid bacterium species in canine jejunum and feces of four fistulated dogs. *FEMS Microbiology Letters*, **230**, 35-39.

- Sabir, F., Beyatli, Y., Cokmus, C. & Onal-Darilmaz, D. (2010).** Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. strains isolated from kefir. *Journal of Food Science*, **75**, 568-573.
- Sahadeva, R.P.K., Leong, S.F., Chua, K.H., Tan, C.H., Chan, H.Y., Tong, E.V., Wong, S.Y.W. & Chan, H.K. (2011).** Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *International Food Research Journal*, **18**(4), 1515-1522.
- Sandine, W.E. (1979).** Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. *Journal of Food Protection*, **42**, 259-262.
- Sharma, K.K., Soni, S.S. & Meharchandani, S. (2006).** Congo red dye agar test as an indicator test for detection of invasive bovine *Escherichia coli*. *Veterinarski Arhiv*, **76**, 363-366.
- Shin, M.S., Han, S.K., Ji, A.R., Kim, K.S. & Lee, W.K. (2008).** Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use. *Journal of Applied Microbiology*, **105**(6), 2203-2212.
- Sieladie, D.J., Zambou, N.F., Kaktcham, P.M., Cresci, A. & Fonteh, F. (2011).** Probiotic properties of *Lactobacilli* strains isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon. *Innovation Romanian Food and Biotechnology*, **9**, 12-28.
- Strompfová, V., Lauková, A. & Ouwehand, A.C. (2004).** Selection of enterococci for potential canine probiotic additives. *Veterinary Microbiology*, **100**, 107-114.
- Sul, S.Y., Hyun-Joong, K., Tae-Woon, K. & Hae-Yeong, K. (2007).** Rapid identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in probiotic products using Multiplex PCR. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **17**(3), 490-495.
- Suzuki, K., Kodama, Y. & Mitsuoka, T. (1989).** Stress and intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora*, **8**, 23-38.
- Tannock, G.W. (1997).** Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental. *R&D Tibtechnology*, **15**, 270-274.
- Turhan, E.Ü. & Erginkaya, Z. (2016).** Determination of antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolates of probiotic foods. *Pamukkale Universitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **22**(7), 620-624.
- Vanbelle, N., Teller, E. & Focant, M. (1990).** Probiotics in animal nutrition: a review. *Archives of Animal Nutrition*, **40**, 543-567.