

# Deney hayvanlarında probiyotikli yem kullanımının bağırsak mikrobiyotasına etkisi

Naim Deniz Ayaz<sup>1</sup>, Tayfun İde<sup>2</sup>, Aşkın Nur Derinöz Erdoğan<sup>3</sup>, Muammer Göncüoğlu<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Yahşihan, Kırıkkale, Türkiye

<sup>2</sup> ARDEN Araştırma ve Deney, Sincan, Ankara, Türkiye

<sup>3</sup> Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dışkapı, Ankara, Türkiye

<sup>4</sup> Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Dışkapı, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 15.08.2023, Kabul Tarihi / Accepted: 08.10.2023

**Özet:** Bilimsel çalışmalarda laboratuvar hayvanı kullanımı büyük önem taşımakta ve önemli bir yer tutmaktadır. In-vivo çalışmalarda araştırılanın kesin olarak etkinliğini ortaya konulabilmesi için deneyde kullanılan hayvanların türü, soyu ve yaşının yanı sıra çevre koşulları gibi pek çok koşul kontrol ve test gruplarında bir örnek hale getirilmektedir. Çalışmalarda gastrointestinal sistemin işlevi ve bütünlüğünde, bağışıklık homeostazının korunmasında ve konak enerji metabolizmasında önemli rol oynayan bağırsak mikrobiyotasının kullanılan deney hayvanlarında farklılıklar gösterebileceği dikkate alınmalıdır. Ancak, bu farklılıkların çalışma sonuçlarını olumsuz etkileyebileceği çoğu zaman gözden kaçmaktadır. Bu çalışmada, bilimsel araştırmaların öncesinde adaptasyon periyodunda kullanılmak üzere laboratuvar hayvanlarının (rat ve fare) bağırsak mikrobiyotalarının senkronizasyonunda kullanım potansiyeli olan probiyotik içerikli yemlerin üretimi ve bağırsak mikrobiyotası üzerine etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Analizler neticesinde üretilen sıvı yemlerin muhafaza süresi sonunda toplam aerob genel canlı sayısı ve laktik asit bakteri sayısının (*L. acidophilus* ve *L. plantarum*)  $10^9$  kob/ml ulaştığı buna karşın koliform bakteri, maya-küf ile diğer patojen mikroorganizmalara rastlanmamıştır. Mikrobiyota analizleri neticesinde ise hem fare hem de ratlarda 10 günlük probiyotikli yem uygulamasının kontrol grupları ile 0. gündeki test gruplarına göre bağırsak mikrobiyotası kompozisyonu üzerine etkili olduğu ortaya konmuştur. Günümüze kadar yapılan literatür incelemelerinde Türkiye'de bu kapsamda bir çalışma olmadığı belirlenmiştir. Bu bağlamda in-vivo çalışmalar öncesinde deney hayvanlarının bu çalışma kapsamında üretilen probiyotik içerikli yemler ile beslenmesinin hayvanların bağırsak mikrobiyotasının geliştirilmesine katkı sunacağı sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Laboratuvar hayvanları; *L. acidophilus*; *L. plantarum*; mikrobiyota; senkronizasyon

## The effect of probiotic feed use on intestinal microbiota in experimental animals

**Abstract:** Laboratory animals are frequently used in scientific studies and are of great importance. To clearly demonstrate the effectiveness of the researched in *in-vivo* studies, many conditions such as the species, lineage and age of the animals used in the experiment, as well as environmental conditions, should be uniform in the control and test groups. It should be considered that the intestinal microbiota, which plays an important role in the function and integrity of the gastrointestinal tract, maintenance of immune homeostasis and host energy metabolism, may differ in the experimental animals used in studies. However, it is often overlooked that these differences may negatively affect study results. In this study, it was aimed to produce probiotic-containing feeds which have the potential to synchronize intestinal microbiota of laboratory animals (rat and mouse) to be used in the adaptation period before scientific studies and to investigate the effectiveness of feeds on the intestinal microbiota. According to the analysis, at the end of the storage period of the produced liquid feeds, the total number of general aerobic organisms and the number of lactic acid bacteria (*L. acidophilus* and *L. plantarum*) reached to  $10^9$  cfu/ml, however, coliform bacteria, yeast-mold and other pathogenic microorganisms were not detected. As a result of microbiota analysis, it was revealed that 10-day probiotic feed application was effective on intestinal microbiota composition in both mice and rats compared to control groups and 0. day test groups. In the literature reviews carried out to date, it has been determined that there is no study in this scope in Turkey. In this context, it was concluded that feeding experimental animals with probiotic-containing feeds that produced within the scope of this study before *in-vivo* studies will contribute to the improvement of the intestinal microbiota of the laboratory animals.

**Key words:** Laboratory animals; *L. acidophilus*; *L. plantarum*; microbiota; synchronization

## Giriş

Bilimsel çalışmalarda laboratuvar hayvanı kullanımı büyük önem taşımakta ve önemli bir yer tutmakta-

dır. Avrupa Birliği istatistiklerine göre 2017 yılı itibari ile yaklaşık 10 milyon laboratuvar hayvanının bilimsel çalışmalarda tercih edildiği, fare ve ratların

**Yazışma adresi / Correspondence:** Muammer Göncüoğlu, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Dışkapı, Ankara, Türkiye e-posta: Muammer.Goncuoglu@veterinary.ankara.edu.tr

**ORCID IDs of the authors:** <sup>1</sup>0000-0003-2219-2368 • <sup>2</sup>0000-0001-6798-2908 • <sup>3</sup>0000-0002-8504-0794 • <sup>4</sup>0000-0001-7245-1941

ise toplam sayının %73'ünü oluşturduğu rapor edilmiştir. Laboratuvar hayvanlarının refahı da dikkate alındığında hayvanların sağlıklı olmaları yapılan çalışmaların güvenilirliği açısından büyük önem taşımaktadır (Anonim 2010; Anonim 2019). Bu kapsamda laboratuvar hayvanlarının tüm fizyolojik sistemlerinin sağlıklı olması gerekmektedir. Sindirim sistemi de bu durumun en önemli parçalarından birini oluşturmaktadır.

Sindirim sistemi mikrobiyotası bu sistem içerisinde toplam mikroorganizma sayısı ve çeşidini ifade eden, hayvanın sağlıklı olup olmadığını gösteren, aynı zamanda hem insanlar hem de hayvanlar için hastalık oluşturan mikroorganizmaları taşıyıp taşımadığını anlamamızı sağlayan en önemli göstergedir. Bu mikrobiyota canlılığının tüm metabolizmasını, fizyolojisini, immünolojik yapısını, hatta davranışlarını dahi direkt olarak etkilemektedir (Barko ve ark. 2018).

Sindirim sistemi mikrobiyotası; en çok yemlerden, çevresel faktörlerden (ısı, ışık vb.), bakım, besleme ve yetiştiricilik uygulamalarından (havalandırma, altlık su vb.) etkilenmektedir. Bunların sonucu olarak farklı laboratuvar hayvanı yetiştirme ve araştırma birimlerinde hatta aynı birimlerdeki her bir bireyde büyük farklılıklar gözlenebilmektedir. Bu hayvanların kullanım alanı dikkate alındığında sindirim sisteminin sağlıklı ve bir örnek (veya benzer) olmaması yapılan bilimsel çalışma verilerini olumsuz bir şekilde etkiler, bilimsel çalışmaların tekrarlanabilir olmasına imkân tanımaz. En basit bir çalışmada dahi hayvanların mikrobiyota farklılıkları kontrol ve deney grupları arasındaki verilerin doğruluğunu etkileyebilir. (McCoy ve ark. 2017).

Laboratuvar hayvanlarının sağlıklı olmaları deneysel kullanımları için en önemli ön koşuldur. Subklinik enfeksiyonlar aynı zamanda zoonoz hastalıklar açısından endişe yaratmaktadır. Bu durum deney modellerinin fenotipik varyasyonunu arttırmakta olup istatistiksel hatalara yol açmakta ve bu nedenle daha fazla sayıda hayvanın gereksiz yere kullanımı ile; yerine koyma, arıtma ve indirgeme (3R kuralı) temel kurallarına aykırıdır (Nicklas 2008).

Bu bilgiler ışığında, bir bilimsel çalışma öncesi kullanılacak hayvanların tüm dış faktörlerin bir örnek olmasına dikkat edilmesi zorunludur. Bu kapsamda çalışmalarda aynı tür, soy, cinsiyet ve yaşta hayvanlar seçilir, hayvanlar aynı yemle bir ortamda bakılır. Böylelikle pek çok dış çevresel değişken faktör elimine edilmiş olur. Ancak hayvanların iç faktörleri olan bağırsak mikrobiyotaları senkronize edilmediği sürece mevcut şartlarda deneylere, başlama kriterlerinin

sağlanması yeterli olmayabilir. Genel olarak mikrobiyolojik standardizasyon; hayvanlarda bulunan mikroorganizma türlerine ve buna bağlı olarak yetiştirilme ortamlarına göre sınıflandırılması mikrobiyolojik durumlarının belgelendirilmesi esaslarına dayanır. Bu sınıflama, bariyerli spesifik patojen free; (SPF) ve bariyersiz konvansiyonel (CV) hayvanlar şeklindedir. Mikrobiyolojik standardizasyonun izlenmesi iki şekilde yapılmakta olup bunlar bariyer sistemlerinin kontrolü (süreç kontrolü) ve deney hayvanlarının kontrolüdür. Bariyer Sistemlerinin Kontrolü (Süreç Kontrolü); hayvanın mevcut mikrobiyolojik kalitesinin korunmasının yanı sıra çalışanın korunması ve laboratuvar kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi için önemlidir. Bununla beraber bu çalışmanın konusu olan mikrobiyota senkronizasyonu ile ilgili kapsamlı ve tanımlı protokollerin eksikliği göze çarpmaktadır (Nicklas 2008).

Avrupa ve Amerika'da laboratuvar hayvanları üretimi büyük çiftliklerde ve üretim merkezlerinde yapılmaktadır. Oldukça gelişmiş teknik alt yapı ve laboratuvar olanaklarına sahip bu kuruluşlar kendi standartlarını ve kalitelerini denetlemek amacıyla FELASA'nın (Avrupa Laboratuvar Hayvanları Bilimi Dernekleri Federasyonu-Federation of European Laboratory Animal Science Associations) önerileri doğrultusunda çeşitli mikrobiyolojik kalite kontrol programlarını izlemektedirler. Ülkemizde de laboratuvar hayvanı üretim ve yetiştiriciliği alanında FELASA'nın hazırlamış olduğu rehberler kabul edilmektedir. Ancak Türkiye'de konu ile ilgili sıkıntılar olduğu düşünülmektedir (Nicklas 2008; Anonim 2020a; 2020b). Tarım ve Orman Bakanlığı'nın şimdiki kadar verdiği çalışma izinleri konvansiyonel ünite iznidir. Bu nedenle laboratuvar hayvanlarının mikrobiyolojik standardizasyonu sağlanamamaktadır.

Son yıllarda ülkemizde kamu ve özel sektörde laboratuvar hayvanı üretim ve yetiştiriciliği yapan kuruluşların sayısı artmıştır. Türkiye'de 2020 yılı itibarıyla bilimsel çalışmalarda toplam 209.212 hayvan kullanılmış olup bunların %17,2 sini rat ve %11,9'unu fare oluşturmuştur (Anonim 2021). Ancak burada önemli olan rakamsal olarak artışlar değil refah düzeyi yüksek, mikrobiyolojik standartların uygulandığı ve sağlık kontrollerin yapıldığı ünitelerin bulunmasıdır. Tarım ve Orman Bakanlığı'nın "Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar için Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik" çerçevesinde çalışma izni verilen deney hayvanı kuruluşları sayısı 192 olup bunların büyük bölümünün üretim, tedarik ve deney için rat ve fare kullandığı ve konvansiyonel özellikte olduğu görülmektedir (Anonim 2023). Hayvanların patojen mikroorganizmalara karşı korunmalarında

bağırsak mikrobiyotası önemli bir rol oynar. Normal bağırsak florasını oluşturan bakteri türlerinin sayısı kolon içeriklerinde yaklaşık olarak  $1 \times 10^{11}$ - $10^{12}$  kob/gram bakteri bulunmaktadır (Lee ve ark. 2013). Konvansiyonel hayvanlar genellikle hastalık belirtisi göstermezken enfeksiyon ve paraziter etkenleri taşımaktadırlar.

Probiyotikler canlı mikroorganizmalar olup yeterli miktarda ve sürede uygulandıkları takdirde verildikleri canlıda bağırsaklarda kolonize olarak olumlu sağlık etkileri oluşturdukları ifade edilmektedir (Anonim 2006; Hill ve ark. 2014). Probiyotiklerin, enfeksiyonları önleyerek, mide-bağırsak koşullarını iyileştirerek ve bağışıklık bozukluklarını gidererek sağlığı geliştirme özelliklerinin olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir (Wilkins ve Sequoia 2017; Wang ve ark. 2019). Probiyotiklerin bağırsak bütünlüğünün korunması (Khailova ve ark. 2010) ve bağırsak mikrobiyal taksonomik yapısının modülasyonunu sağladığı belirtilmiştir (Ferrario ve ark. 2014; Gargari ve ark. 2016). Probiyotiklerin ana hedefi olan bağırsak mikrobiyotasının bağırsak kanalı boyunca değişiklik gösterebildiği ve bağırsaklardaki karmaşık etkileşimler nedeniyle probiyotiklerin etki mekanizmasının mutlaka in-vivo çalışmalarla desteklenmesi gerektiği ifade edilmektedir (Farzi ve ark. 2018; Taverniti ve ark. 2021).

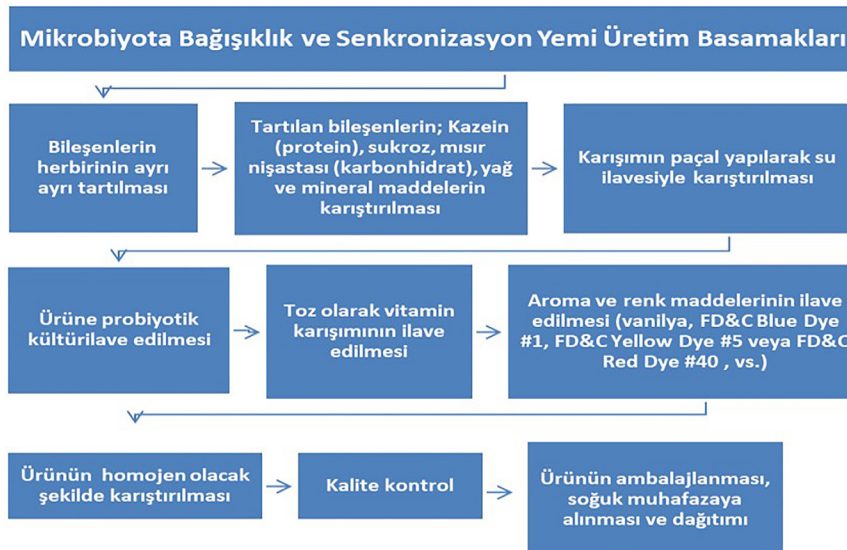
Tüm bu bilgiler ışığında, bu çalışmada dünyada genel ve kabul edilmiş bir standardizasyonu olmayan laboratuvar hayvanlarının (rat ve fare) bağırsak mikrobiyotalarının senkronizasyonunun sağlanması için bilimsel çalışmalar öncesi adaptasyon periyodunda kullanılmak üzere probiyotik içerikli yemlerin üretimi ve etkinliği in-vivo olarak araştırılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Probiyotik içerikli yemlerin üretimi

Mikrobiyota senkronizasyon yemi olarak probiyotik yem üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen yemler, kullanım kolaylığı, tüketici talepleri, verimliliği ve etkinliği göz önünde bulundurularak sıvı formda üretilmiştir. Çalışmada yemlerin formülasyonunun oluşturulması, üretim yönteminin geliştirilmesi ve optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Yemlere probiyotik kültür olarak *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917 ve *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) katılarak test grubu (T) yemleri hazırlanmıştır. Yemlere karıştırılmak üzere  $-18^{\circ}\text{C}$ 'de tutulan suşlar buz içerisinde çözdürüldükten sonra Tryptone Soy Broth'a (TSB, LAB004 Acumedia) geçilerek 24 saat  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Daha sonra suşun kontrol ve deneyde kullanılacak konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla De Man, Rogosa & Sharpe agar (MRS, Merck 64271) kullanılmıştır. Bu kapsamda bir gece TSB'de inkübe edilen suşlar MRS Agar'a çizme plak metodu ile ekilerek 24-48 saat  $37^{\circ}\text{C}$ 'de anaerob ve aerob ortamda inkübe edilmiştir. Anaerob koşullarda, inci beyazı koloniler değerlendirilmiştir. Yemlere aktif katılmak üzere ilgili kolonilerden tekrar TSB'lere ekimler yapılarak  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilmiştir. Miktarın belirlenmesi amacıyla da deney günü tekrar MRS Agar'lara ekimleri gerçekleştirilmiştir. Miktarı belirlendikten sonra yemlere aynı miktarda probiyotik verilmesi amacıyla *L. plantarum* ve *L. acidophilus* bakterilerinden  $10^8$  kob/ml olacak şekilde steril tüplerde hazırlıklar tamamlanmıştır. Probiyotik kültür ilavesi yapılmamış yemler ise kontrol grubunu (K) oluşturmuştur. Sıvı yem üretim basamakları sırasıyla Şekil 1'de belirtilmiştir.



**Şekil 1.** Sıvı yem üretim basamakları.

### Yemlerin mikrobiyolojik analizleri

Paketlenmiş yemlerin muhafaza süresi başında ve sonunda mikrobiyolojik analizleri gerçekleştirilmiştir. Hazırlanmış yemler probiyotik mikroorganizma içerdiğinden raf ömrü +4°C'de 1 hafta olarak belirlenmiştir. Yemlerde gerçekleştirilen mikrobiyolojik analizler şu şekildedir; Aerob genel canlı tayini (ISO 4833-2), koliform bakteri sayısı (ISO 4832), *Salmonella* spp. (ISO 6579), *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-1), *Staphylococcus aureus* (ISO 6888-1), küf-maya sayımı (ISO 21527-2) ve probiyotik mikroorganizma sayımı (ISO 15214).

### Mikrobiyota senkronizasyon yemlerinin deney hayvanlarına uygulanması

Mikrobiyota senkronizasyon yemlerinin etkinlikleri ve optimal uygulama sürelerinin belirlenmesi amacıyla deney hayvanı çalışmaları ve laboratuvar analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada deney hayvanları çalışmaları Kırıkkale Üniversitesi Hüseyin Aytemiz Deney Hayvanları Biriminde etik kurul izni alınarak gerçekleştirilmiştir (Etik kurul karar no: 2021-02-08). Çalışmada Kontrol (K grup) ve Test (T grupları, üretilen her bir yem için) olarak gruplar oluşturulduktan sonra, erkek ve dişi olarak ayrı ayrı her bir grup için 9'ar adet 200-250 g ağırlığında, 8-10 haftalık uluslararası standartlara uygun sayıda Wistar albino rat ve 20-25 g ağırlığında 8-10 haftalık BALB/c fare rastgele seçilmiştir. Grupların gerekli adaptasyon işlemleri ve süresi (7 gün) tamamlandıktan sonra başlangıç ağırlıkları kaydedilmiş, mikrobiyota analizleri için dışkı örnekleri alınmış ve DNA ekstraksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Sonrasında hayvanlar belirlenen gruplara göre (Kontrol ve Test) ad-libitum olarak 10 günlük periyodlarda 30 gün süreyle standart kontrol yemi veya mikrobiyota senkronizasyon yemi ile beslenmiştir. Deney periyodu sonunda dışkı örnekleri alınarak mikrobiyota analizleri tekrarlanmıştır. Çalışma süresi sonunda başlangıç-bitiş mikrobiyota sonuçları kontrol grubu verileriyle karşılaştırılmıştır.

### Deney hayvanlarının mikrobiyota analizleri

Bu kapsamda steril pens ve kaşık yardımıyla taze dışkı örnekleri kontrol ve test gruplarına ait fare ve ratlardan alınarak steril kaplara konulmuş ve analiz için soğuk zincir altında laboratuvara taşınmıştır.

### Örneklerden DNA izolasyonu

Dışkı örneklerinden genomik DNA izolasyonu Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, Cat. No: D6005) kullanılarak yapılmıştır. İzole

edilmiş DNA'nın miktar ve saflığı florometrik olarak QUBIT3™ ile tayin edilmiştir (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

### 16s rRNA V3-V4 bölgesinin amplifikasyonu

Tür tayininde kullanılacak olan 16s rRNA genine ait V3-V4 bölgeleri universal 341F-805R primer dizileri ile SimpliAmp™ Thermal Cycler kullanılarak amplifiye edilmiştir. Kullanılan primer dizileri ve PCR koşulları aşağıda verilmiştir (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

### Primer dizileri

341F: CCTACGGGNGGCWGCAG

805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC

### PCR koşulları

95°C 10 dakika – ilk denaturasyon (HS enzim kullanılmıştır), 35 döngü:

- 95°C for 30 saniye - denaturasyon

- 53-48°C for 30 saniye – annealing (touchdown PCR)

- 72°C for 15 saniye – extension, sıcaklık 4°C'ye düşürülüp PCR tamamlanmıştır.

### Kütüphane hazırlama ve dizileme işlemi

16s rRNA V3-V4 ampikon ürünleri için kütüphane hazırlama Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, Cat. No.: FC-131-1096) ile index işlemi ise TG Nextera XT Index Kit v2 Set A (96 Indices, 384 Samples), (Illumina, San Diego, CA, Cat. No.: TG-131-2001) ile gerçekleştirilmiştir. PCR pürifikasyonu-AMPure XP beads ile yapılmıştır (Beckman Coulter, High Wycombe, UK). Dizileme işlemi Illumina'nın Miseq platformu ile paired-end (PE) 2x150 bazlık okumalar olarak yapılmıştır. Örnek başına minimum  $\geq 50.000$  okuma yapılmıştır.

### Ham verinin biyoinformatik analizi

Ham veri okumaları (FASTQ) QC kontrol yapılmış, trim edilmiş ve Kraken Metagenomik sistemi ile OTU sınıflarına ayrılmıştır. Kraken uygulaması, yüksek hassasiyet ve hızda kısa DNA sekanslarına taksonomik etiketler atarak gerçekleştirilmiştir (Wood ve Salzberg 2014).

### Bulgular

Yemlerin muhafaza süresince raf ömrünün belirlenmesi ve mikrobiyolojik kalitesinin takibi amacıyla mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Buna göre yemlerin yedinci gün sonunda toplam aerob genel canlı sayısı ve laktik asit bakteri sayısı (*L. aci-*

*dophilus* ve *L. plantarum*)  $10^9$  kob/ml olarak belirlenmiştir. Analizlerde koliform bakteri, maya-küf ile diğer patojen mikroorganizmalara (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes* ve *S. aureus*) rastlanmamıştır.

### Mikrobiyota analiz sonuçları

Mikrobiyota analizlerinde örnekler deney gruplarına göre analiz sonuçları aşağıda belirtilmiştir. Deney grupları numaralandırılmış olup buna göre; KF10- Kontrol fare grubu 10. gün analiz sonuçlarını; TF10- Test fare grubu 10. gün analiz sonuçlarını; KF0- Kontrol fare grubu 0. gün analiz sonuçlarını; TF0- Test fare grubu 0. Gün analiz sonuçlarını; KR10- Kontrol rat grubu 10. gün analiz sonuçlarını; TR10- Test rat grubu 10. gün analiz sonuçlarını; KR0- Kontrol rat grubu 0. gün analiz sonuçlarını; TR0- Test rat grubu 0. gün analiz sonuçlarını temsil etmektedir.

Simpsons indeksi 0-1 arasında bir değer alır. 1 çeşitliliği, 0 ise çeşitlilik yok anlamına gelmektedir ve shannon indeksi genellikle 1,5-3,5 arasında bir değer alır ve bu indeks arttıkça çeşitlilik de artmaktadır.

**Tablo 1.** Deney gruplarının dizileme istatistiği

| Grup no | Okuma sayısı | Ortalama okuma uzunluğu | Sınıflanmış okuma |
|---------|--------------|-------------------------|-------------------|
| KF10    | 34088        | 149.7                   | 33931 / 99.54%    |
| TF10    | 21935        | 149.7                   | 21839 / 99.56%    |
| KF0     | 26444        | 149.7                   | 26319 / 99.53%    |
| TF0     | 42432        | 145.7                   | 40345 / 95.08%    |
| KR10    | 25087        | 133.9                   | 20737 / 82.66%    |
| TR10    | 15458        | 149.6                   | 15356 / 99.34%    |
| KR0     | 24530        | 149.9                   | 24465 / 99.74%    |
| TR0     | 23282        | 149.9                   | 23233 / 99.79%    |

**Tablo 2.** Deney gruplarının taksonomi istatistiği

| Tür Seviyesinde Çeşitlilik |                                  |                      |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------|
| Grup no                    | Shannon Index (H) / (H / LN (N)) | Simpson İndeks (1-D) |
| KF10                       | 4.154 / 0.717                    | 0.9721               |
| TF10                       | 3.68 / 0.6129                    | 0.9425               |
| KF0                        | 4.296 / 0.7226                   | 0.9756               |
| TF0                        | 3.779 / 0.631                    | 0.9386               |
| KR10                       | 4.145 / 0.6959                   | 0.9616               |
| TR10                       | 3.741 / 0.6578                   | 0.9441               |
| KR0                        | 4.316 / 0.7156                   | 0.9756               |
| TR0                        | 4.206 / 0.7245                   | 0.9745               |

**Tablo 3.** Fare ve Rat test gruplarına göre taksonomik dağılımlar

| Krallık   | Test gruplarına göre oran (%) |       |       |       |       |       |      |       |
|-----------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
|           | KF0                           | TF0   | KF10  | TF10  | KR0   | TR0   | KR10 | TR10  |
| Bacteria  | 100.0                         | 99.98 | 100.0 | 100.0 | 99.97 | 99.99 | 99.9 | 99.91 |
| Archaea   | 0.0                           | 0.01  | 0.0   | 0.0   | 0.02  | 0.01  | 0.06 | 0.08  |
| Eukaryota | 0.0                           | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 0.01  | 0.0   | 0.04 | 0.01  |

**Tablo 4.** Fare test gruplarına göre filum seviyesinde taksonomik dağılımlar\*

| KF0                         |       | TF0                         |       | KF10                        |       | TF10            |       |
|-----------------------------|-------|-----------------------------|-------|-----------------------------|-------|-----------------|-------|
| Filum                       | %     | Filum                       | %     | Filum                       | %     | Filum           | %     |
| Firmicutes                  | 52.04 | Firmicutes                  | 50.5  | Firmicutes                  | 64.36 | Bacteroidetes   | 64.01 |
| Bacteroidetes               | 31.33 | Bacteroidetes               | 41.52 | Bacteroidetes               | 28.14 | Firmicutes      | 30.63 |
| Proteobacteria              | 12.61 | Proteobacteria              | 5.58  | Proteobacteria              | 6.02  | Proteobacteria  | 3.65  |
| Tenericutes                 | 1.78  | Actinobacteria              | 1.02  | Actinobacteria              | 0.87  | Actinobacteria  | 0.73  |
| Actinobacteria              | 1.67  | Tenericutes                 | 1.02  | Spirochaetes                | 0.17  | Tenericutes     | 0.45  |
| Chloroflexi                 | 0.25  | Chloroflexi                 | 0.12  | Tenericutes                 | 0.15  | Chloroflexi     | 0.22  |
| Cyanobacteria               | 0.08  | Cyanobacteria               | 0.05  | Chloroflexi                 | 0.06  | Cyanobacteria   | 0.12  |
| Candidatus saccharibacteria | 0.05  | Candidatus saccharibacteria | 0.04  | Coprothermobacterota        | 0.04  | Spirochaetes    | 0.07  |
| Thermotogae                 | 0.05  | Spirochaetes                | 0.03  | Gemmatimonadetes            | 0.04  | Planctomycetes  | 0.05  |
| Deferribacteres             | 0.04  | Gemmatimonadetes            | 0.02  | Candidatus saccharibacteria | 0.03  | Verrucomicrobia | 0.01  |

\* Örneklerdeki en yüksek okuma dizisi bulunan ilk 10'a ait tablo verilmiştir.

**Tablo 5.** Rat test gruplarına göre filum seviyesinde taksonomik dağılımlar\*

| KRO                                |       | TRO                    |       | KR10                             |       | TR10                   |       |
|------------------------------------|-------|------------------------|-------|----------------------------------|-------|------------------------|-------|
| Filum                              | %     | Filum                  | %     | Filum                            | %     | Filum                  | %     |
| <i>Firmicutes</i>                  | 69.03 | <i>Firmicutes</i>      | 67.88 | <i>Firmicutes</i>                | 59.54 | <i>Bacteroidetes</i>   | 44.09 |
| <i>Bacteroidetes</i>               | 14.66 | <i>Bacteroidetes</i>   | 24.42 | <i>Bacteroidetes</i>             | 31.83 | <i>Firmicutes</i>      | 44.06 |
| <i>Proteobacteria</i>              | 12.97 | <i>Proteobacteria</i>  | 4.26  | <i>Proteobacteria</i>            | 5.79  | <i>Proteobacteria</i>  | 6.74  |
| <i>Actinobacteria</i>              | 1.96  | <i>Tenericutes</i>     | 1.65  | <i>Actinobacteria</i>            | 1.03  | <i>Verrucomicrobia</i> | 2.28  |
| <i>Tenericutes</i>                 | 0.83  | <i>Actinobacteria</i>  | 1.14  | <i>Spirochaetes</i>              | 0.96  | <i>Actinobacteria</i>  | 2.21  |
| <i>Spirochaetes</i>                | 0.19  | <i>Chloroflexi</i>     | 0.21  | <i>Tenericutes</i>               | 0.33  | <i>Tenericutes</i>     | 0.41  |
| <i>Chloroflexi</i>                 | 0.12  | <i>Spirochaetes</i>    | 0.15  | <i>Chloroflexi</i>               | 0.09  | <i>Basidiomycota</i>   | 0.07  |
| <i>Candidatus saccharibacteria</i> | 0.08  | <i>Planctomycetes</i>  | 0.13  | <i>Elusimicrobia</i>             | 0.07  | <i>Cyanobacteria</i>   | 0.04  |
| <i>Gemmatimonadetes</i>            | 0.03  | <i>Cyanobacteria</i>   | 0.04  | <i>Verrucomicrobia</i>           | 0.05  | <i>Armatimonadetes</i> | 0.03  |
| <i>Verrucomicrobia</i>             | 0.02  | <i>Armatimonadetes</i> | 0.03  | <i>Candidatus thermoplasmata</i> | 0.04  | <i>Deferribacteres</i> | 0.02  |

\* Örneklerdeki en yüksek okuma dizisi bulunan ilk 10'a ait tablo verilmiştir.

**Tablo 6.** Fare test gruplarına göre sınıf seviyesinde taksonomik dağılımlar\*

| KFO                          |       | TFO                          |       | KF10                         |       | TF10                       |       |
|------------------------------|-------|------------------------------|-------|------------------------------|-------|----------------------------|-------|
| Sınıf                        | %     | Sınıf                        | %     | Sınıf                        | %     | Sınıf                      | %     |
| <i>Clostridia</i>            | 43.86 | <i>Clostridia</i>            | 41.96 | <i>Clostridia</i>            | 55.41 | <i>Bacteroidia</i>         | 63.61 |
| <i>Bacteroidia</i>           | 31.11 | <i>Bacteroidia</i>           | 40.48 | <i>Bacteroidia</i>           | 27.65 | <i>Clostridia</i>          | 22.26 |
| <i>Epsilonproteobacteria</i> | 7.22  | <i>Bacilli</i>               | 7.6   | <i>Bacilli</i>               | 7.55  | <i>Erysipelotrichia</i>    | 4.21  |
| <i>Bacilli</i>               | 5.17  | <i>Epsilonproteobacteria</i> | 2.97  | <i>Gammaproteobacteria</i>   | 3.08  | <i>Bacilli</i>             | 3.35  |
| <i>Erysipelotrichia</i>      | 2.89  | <i>Gammaproteobacteria</i>   | 1.6   | <i>Epsilonproteobacteria</i> | 1.88  | <i>Gammaproteobacteria</i> | 1.61  |
| <i>Mollicutes</i>            | 1.66  | <i>Flavobacteriia</i>        | 1.18  | <i>Erysipelotrichia</i>      | 1.06  | <i>Flavobacteriia</i>      | 1.28  |
| <i>Gammaproteobacteria</i>   | 1.4   | <i>Mollicutes</i>            | 0.76  | <i>Actinomycetia</i>         | 0.62  | <i>Deltaproteobacteria</i> | 0.5   |
| <i>Coriobacteriia</i>        | 1.27  | <i>Alphaproteobacteria</i>   | 0.7   | <i>Flavobacteriia</i>        | 0.47  | <i>Betaproteobacteria</i>  | 0.43  |
| <i>Alphaproteobacteria</i>   | 1.27  | <i>Coriobacteriia</i>        | 0.57  | <i>Deltaproteobacteria</i>   | 0.4   | <i>Mollicutes</i>          | 0.43  |
| <i>Flavobacteriia</i>        | 1.25  | <i>Erysipelotrichia</i>      | 0.51  | <i>Betaproteobacteria</i>    | 0.38  | <i>Coriobacteriia</i>      | 0.35  |

\* Örneklerdeki en yüksek okuma dizisi bulunan ilk 10'a ait tablo verilmiştir.

**Tablo 7.** Rat test gruplarına göre sınıf seviyesinde taksonomik dağılımlar\*

| KRO                        |       | TRO                        |       | KR10                       |       | TR10                       |       |
|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|
| Sınıf                      | %     | Sınıf                      | %     | Sınıf                      | %     | Sınıf                      | %     |
| <i>Clostridia</i>          | 57.4  | <i>Clostridia</i>          | 53.12 | <i>Clostridia</i>          | 49.88 | <i>Bacteroidia</i>         | 41.56 |
| <i>Bacteroidia</i>         | 14.02 | <i>Bacteroidia</i>         | 24.68 | <i>Bacteroidia</i>         | 30.11 | <i>Clostridia</i>          | 36.01 |
| <i>Gammaproteobacteria</i> | 7.72  | <i>Bacilli</i>             | 10.39 | <i>Bacilli</i>             | 8.01  | <i>Bacilli</i>             | 5.33  |
| <i>Erysipelotrichia</i>    | 5.69  | <i>Gammaproteobacteria</i> | 3.0   | <i>Gammaproteobacteria</i> | 2.09  | <i>Erysipelotrichia</i>    | 4.31  |
| <i>Bacilli</i>             | 5.53  | <i>Erysipelotrichia</i>    | 2.91  | <i>Flavobacteriia</i>      | 2.06  | <i>Gammaproteobacteria</i> | 3.66  |
| <i>Deltaproteobacteria</i> | 2.59  | <i>Negativicutes</i>       | 1.58  | <i>Alphaproteobacteria</i> | 1.84  | <i>Verrucomicrobiae</i>    | 2.45  |
| <i>Negativicutes</i>       | 1.81  | <i>Mollicutes</i>          | 1.46  | <i>Deltaproteobacteria</i> | 1.24  | <i>Coriobacteriia</i>      | 2.16  |
| <i>Coriobacteriia</i>      | 1.46  | <i>Coriobacteriia</i>      | 0.45  | <i>Spirochaetia</i>        | 0.99  | <i>Negativicutes</i>       | 1.12  |
| <i>Alphaproteobacteria</i> | 0.98  | <i>Deltaproteobacteria</i> | 0.32  | <i>Negativicutes</i>       | 0.94  | <i>Betaproteobacteria</i>  | 0.69  |
| <i>Flavobacteriia</i>      | 0.83  | <i>Alphaproteobacteria</i> | 0.27  | <i>Erysipelotrichia</i>    | 0.85  | <i>Alphaproteobacteria</i> | 0.57  |

\* Örneklerdeki en yüksek okuma dizisi bulunan ilk 10'a ait tablo verilmiştir.

**Tablo 8.** Fare test gruplarına göre sıra seviyesinde taksonomik dağılımlar\*

| KFO                       |       | TFO                       |       | KF10                      |       | TF10                      |       |
|---------------------------|-------|---------------------------|-------|---------------------------|-------|---------------------------|-------|
| Sıra                      | %     | Sıra                      | %     | Sıra                      | %     | Sıra                      | %     |
| <i>Eubacteriales</i>      | 43.82 | <i>Eubacteriales</i>      | 42.02 | <i>Eubacteriales</i>      | 55.52 | <i>Bacteroidales</i>      | 61.51 |
| <i>Bacteroidales</i>      | 30.65 | <i>Bacteroidales</i>      | 40.01 | <i>Bacteroidales</i>      | 27.18 | <i>Eubacteriales</i>      | 22.29 |
| <i>Campylobacteriales</i> | 7.25  | <i>Lactobacillales</i>    | 7.31  | <i>Lactobacillales</i>    | 6.51  | <i>Erysipelotrichales</i> | 4.23  |
| <i>Lactobacillales</i>    | 4.51  | <i>Campylobacteriales</i> | 2.97  | <i>Campylobacteriales</i> | 1.89  | <i>Lactobacillales</i>    | 3.04  |
| <i>Erysipelotrichales</i> | 2.9   | <i>Flavobacteriales</i>   | 1.19  | <i>Pseudomonadales</i>    | 1.61  | <i>Marinilabiales</i>     | 2.4   |
| <i>Acholeplasmatales</i>  | 1.48  | <i>Cellvibrionales</i>    | 0.69  | <i>Erysipelotrichales</i> | 1.07  | <i>Flavobacteriales</i>   | 1.29  |
| <i>Eggerthellales</i>     | 1.26  | <i>Eggerthellales</i>     | 0.56  | <i>Bacillales</i>         | 1.04  | <i>Enterobacteriales</i>  | 0.6   |
| <i>Flavobacteriales</i>   | 1.26  | <i>Marinilabiales</i>     | 0.56  | <i>Enterobacteriales</i>  | 0.77  | <i>Cellvibrionales</i>    | 0.49  |
| <i>Hyphomicrobiales</i>   | 0.92  | <i>Rhodospirillales</i>   | 0.54  | <i>Marinilabiales</i>     | 0.52  | <i>Burkholderiales</i>    | 0.4   |
| <i>Desulfovibrionales</i> | 0.72  | <i>Acholeplasmatales</i>  | 0.52  | <i>Flavobacteriales</i>   | 0.47  | <i>Eggerthellales</i>     | 0.33  |

\* Örneklerdeki en yüksek okuma dizisi bulunan ilk 10'a ait tablo verilmiştir.

**Tablo 9.** Rat test gruplarına göre sıra seviyesinde taksonomik dağılımlar\*

| KR0                       |       | TR0                       |       | KR10                      |       | TR10  |       |
|---------------------------|-------|---------------------------|-------|---------------------------|-------|---|-------|
| Sıra                      | %     | Sıra                      | %     | Sıra                      | %     | Sıra  | %     |
| <i>Eubacteriales</i>      | 59.78 | <i>Eubacteriales</i>      | 53.01 | <i>Eubacteriales</i>      | 49.68 | <i>Bacteroidales</i>                          | 40.29 |
| <i>Bacteroidales</i>      | 14.7  | <i>Bacteroidales</i>      | 24.67 | <i>Bacteroidales</i>      | 30.16 | <i>Eubacteriales</i>                          | 34.53 |
| <i>Erysipelotrichales</i> | 5.97  | <i>Lactobacillales</i>    | 8.01  | <i>Lactobacillales</i>    | 5.94  | <i>Erysipelotrichales</i>                     | 4.18  |
| <i>Lactobacillales</i>    | 4.16  | <i>Erysipelotrichales</i> | 2.92  | <i>Flavobacteriales</i>   | 2.07  | <i>Lactobacillales</i>                        | 4.11  |
| <i>Myxococcales</i>       | 2.06  | <i>Bacillales</i>         | 2.38  | <i>Bacillales</i>         | 2.06  | <i>Bacteroidetes Order II. Incertae sedis</i> | 3.52  |
| <i>Enterobacteriales</i>  | 1.83  | <i>Cellvibrionales</i>    | 2.02  | <i>Rhodospirillales</i>   | 1.71  | <i>Verrucomicrobiales</i>                     | 2.38  |
| <i>Bacillales</i>         | 1.63  | <i>Acidaminococcales</i>  | 1.34  | <i>Desulfovibrionales</i> | 1.13  | <i>Pseudomonadales</i>                        | 2.09  |
| <i>Flavobacteriales</i>   | 0.87  | <i>Acholeplasmatales</i>  | 1.12  | <i>Spirochaetales</i>     | 0.99  | <i>Coriobacteriales</i>                       | 1.98  |
| <i>Selenomonadales</i>    | 0.85  | <i>Eggerthellales</i>     | 0.36  | <i>Erysipelotrichales</i> | 0.85  | <i>Bacillales</i>                             | 1.01  |
| <i>Pasteurellales</i>     | 0.83  | <i>Pasteurellales</i>     | 0.35  | <i>Selenomonadales</i>    | 0.65  | <i>Acidaminococcales</i>                      | 0.87  |

\* Örneklerdeki en yüksek okuma dizisi bulunan ilk 10'a ait tablo verilmiştir.

**Tablo 10.** Fare test gruplarına göre aile seviyesinde taksonomik dağılımlar\*

| KFO                        |       | TFO                      |       | KF10                     |       | TF10                       |       |
|----------------------------|-------|--------------------------|-------|--------------------------|-------|----------------------------|-------|
| Aile                       | %     | Aile                     | %     | Aile                     | %     | Aile                       | %     |
| <i>Lachnospiraceae</i>     | 28.52 | <i>Lachnospiraceae</i>   | 29.6  | <i>Lachnospiraceae</i>   | 39.57 | <i>Prevotellaceae</i>      | 26.82 |
| <i>Muribaculaceae</i>      | 10.83 | <i>Prevotellaceae</i>    | 20.14 | <i>Muribaculaceae</i>    | 11.76 | <i>Lachnospiraceae</i>     | 15.83 |
| <i>Oscillospiraceae</i>    | 10.57 | <i>Muribaculaceae</i>    | 10.89 | <i>Oscillospiraceae</i>  | 8.94  | <i>Bacteroidaceae</i>      | 13.13 |
| <i>Helicobacteraceae</i>   | 7.95  | <i>Oscillospiraceae</i>  | 6.59  | <i>Prevotellaceae</i>    | 6.95  | <i>Muribaculaceae</i>      | 12.37 |
| <i>Prevotellaceae</i>      | 7.7   | <i>Lactobacillaceae</i>  | 6.56  | <i>Lactobacillaceae</i>  | 5.57  | <i>Oscillospiraceae</i>    | 5.41  |
| <i>Bacteroidaceae</i>      | 6.11  | <i>Bacteroidaceae</i>    | 4.14  | <i>Bacteroidaceae</i>    | 5.35  | <i>Erysipelotrichaceae</i> | 4.86  |
| <i>Lactobacillaceae</i>    | 3.56  | <i>Helicobacteraceae</i> | 3.13  | <i>Eubacteriaceae</i>    | 2.82  | <i>Marinilabiaceae</i>     | 2.77  |
| <i>Erysipelotrichaceae</i> | 3.19  | <i>Eubacteriaceae</i>    | 2.12  | <i>Helicobacteraceae</i> | 2.05  | <i>Rikenellaceae</i>       | 2.66  |
| <i>Clostridiaceae</i>      | 2.13  | <i>Rikenellaceae</i>     | 2.08  | <i>Rikenellaceae</i>     | 1.46  | <i>Lactobacillaceae</i>    | 2.63  |
| <i>Rikenellaceae</i>       | 1.82  | <i>Clostridiaceae</i>    | 1.82  | <i>Clostridiaceae</i>    | 1.41  | <i>Tannerellaceae</i>      | 1.84  |

\* Örneklerdeki en yüksek okuma dizisi bulunan ilk 10'a ait tablo verilmiştir.

**Tablo 11.** Rat test gruplarına göre aile seviyesinde taksonomik dağılımlar\*

| KRO                          |       | TRO                        |       | KR10                       |       | TR10                       |       |
|------------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|
| Aile                         | %     | Aile                       | %     | Aile                       | %     | Aile                       | %     |
| <i>Lachnospiraceae</i>       | 31.64 | <i>Lachnospiraceae</i>     | 26.62 | <i>Lachnospiraceae</i>     | 24.05 | <i>Lachnospiraceae</i>     | 21.31 |
| <i>Oscillospiraceae</i>      | 18.73 | <i>Oscillospiraceae</i>    | 16.33 | <i>Prevotellaceae</i>      | 20.71 | <i>Prevotellaceae</i>      | 19.53 |
| <i>Prevotellaceae</i>        | 11.55 | <i>Prevotellaceae</i>      | 15.32 | <i>Oscillospiraceae</i>    | 19.58 | <i>Muribaculaceae</i>      | 16.82 |
| <i>Erysipelotrichaceae</i>   | 6.58  | <i>Muribaculaceae</i>      | 7.76  | <i>Muribaculaceae</i>      | 7.71  | <i>Oscillospiraceae</i>    | 9.38  |
| <i>Clostridiaceae</i>        | 5.0   | <i>Lactobacillaceae</i>    | 6.42  | <i>Lactobacillaceae</i>    | 5.08  | <i>Erysipelotrichaceae</i> | 4.37  |
| <i>Muribaculaceae</i>        | 2.53  | <i>Clostridiaceae</i>      | 3.38  | <i>Clostridiaceae</i>      | 2.54  | <i>Rhodothermaceae</i>     | 3.68  |
| <i>Lactobacillaceae</i>      | 2.46  | <i>Erysipelotrichaceae</i> | 2.93  | <i>Acetobacteraceae</i>    | 1.84  | <i>Akkermansiaceae</i>     | 2.48  |
| <i>Enterobacteriaceae</i>    | 1.86  | <i>Bacillaceae</i>         | 2.29  | <i>Bacillaceae</i>         | 1.71  | <i>Lactobacillaceae</i>    | 2.41  |
| <i>Bacillaceae</i>           | 1.67  | <i>Spongibacteraceae</i>   | 2.2   | <i>Bacteroidaceae</i>      | 1.67  | <i>Coriobacteriaceae</i>   | 1.98  |
| <i>Peptostreptococcaceae</i> | 1.6   | <i>Eubacteriaceae</i>      | 1.75  | <i>Desulfovibrionaceae</i> | 1.23  | <i>Bacteroidaceae</i>      | 1.82  |

\* Örneklerdeki en yüksek okuma dizisi bulunan ilk 10'a ait tablo verilmiştir.

**Tablo 12.** Fare test gruplarına göre cins seviyesinde taksonomik dağılımlar\*

| KFO                      |      | TFO                       |       | KF10                     |      | TF10                      |       |
|--------------------------|------|---------------------------|-------|--------------------------|------|---------------------------|-------|
| Cins                     | %    | Cins                      | %     | Cins                     | %    | Cins                      | %     |
| <i>Helicobacter</i>      | 8.88 | <i>Prevotella</i>         | 20.63 | <i>Duncaniella</i>       | 8.71 | <i>Prevotella</i>         | 24.85 |
| <i>Prevotella</i>        | 7.43 | <i>Lachnoclostridium</i>  | 8.09  | <i>Lachnoclostridium</i> | 8.69 | <i>Bacteroides</i>        | 13.24 |
| <i>Bacteroides</i>       | 6.83 | <i>Duncaniella</i>        | 7.89  | <i>Anaerocolumna</i>     | 7.45 | <i>Phocaeicola</i>        | 11.47 |
| <i>Lachnoclostridium</i> | 6.23 | <i>Bacteroides</i>        | 4.36  | <i>Prevotella</i>        | 7.24 | <i>Duncaniella</i>        | 7.93  |
| <i>Duncaniella</i>       | 5.95 | <i>Anaerotignum</i>       | 4.26  | <i>Bacteroides</i>       | 5.8  | <i>Lachnoclostridium</i>  | 3.3   |
| <i>Muribaculum</i>       | 3.82 | <i>Lactobacillus</i>      | 3.92  | <i>Butyrivibrio</i>      | 4.0  | <i>Alkalitalea</i>        | 2.79  |
| <i>Phocaeicola</i>       | 3.78 | <i>Helicobacter</i>       | 3.3   | <i>Fastidiosipila</i>    | 3.7  | <i>Alistipes</i>          | 2.68  |
| <i>Ruminococcus</i>      | 3.78 | <i>Coprococcus</i>        | 2.65  | <i>Eubacterium</i>       | 2.93 | <i>Muribaculum</i>        | 2.26  |
| <i>Fastidiosipila</i>    | 3.27 | <i>Mediterraneibacter</i> | 2.52  | <i>Lactobacillus</i>     | 2.83 | <i>Ruminococcus</i>       | 2.16  |
| <i>Anaerotignum</i>      | 2.98 | <i>Fastidiosipila</i>     | 2.27  | <i>Muribaculum</i>       | 2.62 | <i>Mediterraneibacter</i> | 2.12  |

\* Örneklerdeki en yüksek okuma dizisi bulunan ilk 10'a ait tablo verilmiştir.

**Tablo 13.** Rat test gruplarına göre cins seviyesinde taksonomik dağılımlar\*

| KRO                       |       | TRO                      |       | KR10                     |       | TR10                    |       |
|---------------------------|-------|--------------------------|-------|--------------------------|-------|-------------------------|-------|
| Cins                      | %     | Cins                     | %     | Cins                     | %     | Cins                    | %     |
| <i>Prevotella</i>         | 11.14 | <i>Prevotella</i>        | 13.28 | <i>Prevotella</i>        | 20.39 | <i>Prevotella</i>       | 14.79 |
| <i>Lachnoclostridium</i>  | 9.96  | <i>Lachnoclostridium</i> | 6.12  | <i>Ruthenibacterium</i>  | 5.28  | <i>Duncaniella</i>      | 13.21 |
| <i>Ruminococcus</i>       | 6.04  | <i>Ruminococcus</i>      | 6.01  | <i>Ligilactobacillus</i> | 4.57  | <i>Anaerostipes</i>     | 9.3   |
| <i>Lacrimispora</i>       | 4.96  | <i>Duncaniella</i>       | 5.38  | <i>Muribaculum</i>       | 4.48  | <i>Rhodothermus</i>     | 4.22  |
| <i>Clostridium</i>        | 4.71  | <i>Blautia</i>           | 5.09  | <i>Oscillibacter</i>     | 3.59  | <i>Ruthenibacterium</i> | 3.71  |
| <i>Fastidiosipila</i>     | 3.85  | <i>Fastidiosipila</i>    | 3.87  | <i>Lachnoclostridium</i> | 3.01  | <i>Anaerocolumna</i>    | 3.55  |
| <i>Faecalitalea</i>       | 3.56  | <i>Ligilactobacillus</i> | 3.61  | <i>Duncaniella</i>       | 2.7   | <i>Akkermansia</i>      | 2.84  |
| <i>Mediterraneibacter</i> | 2.77  | <i>Ruthenibacterium</i>  | 2.94  | <i>Ruminococcus</i>      | 2.64  | <i>Faecalitalea</i>     | 2.73  |
| <i>Intestinimonas</i>     | 2.44  | <i>Oceanicoccus</i>      | 2.42  | <i>Intestinimonas</i>    | 2.61  | <i>Muribaculum</i>      | 2.65  |
| <i>Anaerostipes</i>       | 2.28  | <i>Clostridium</i>       | 2.36  | <i>Flavonifractor</i>    | 2.59  | <i>Lacrimispora</i>     | 2.57  |

\* Örneklerdeki en yüksek okuma dizisi bulunan ilk 10'a ait tablo verilmiştir.



**Tablo 14.** Fare test gruplarına göre tür seviyesinde taksonomik dağılımlar\*

| KFO                                 |      | TFO                                 |      | KF10                                |      | TF10                                |       |
|-------------------------------------|------|-------------------------------------|------|-------------------------------------|------|-------------------------------------|-------|
| Tür                                 | %    | Tür                                 | %    | Tür                                 | %    | Tür                                 | %     |
| <i>Helicobacter typhlonius</i>      | 7.53 | <i>Prevotella dentalis</i>          | 20.5 | <i>Prevotella dentalis</i>          | 7.05 | <i>Prevotella dentalis</i>          | 14.81 |
| <i>Duncaniella dubosii</i>          | 4.26 | <i>Clostridium scindens</i>         | 7.34 | <i>Duncaniella dubosii</i>          | 6.5  | <i>Prevotella sp. WR041</i>         | 12.14 |
| <i>Fastidiosipila sanguinis</i>     | 4.22 | <i>Anaerotignum propionicum</i>     | 5.35 | <i>Lachnoclostridium phocaeense</i> | 5.57 | <i>Phocaeicola dorei</i>            | 8.55  |
| <i>Prevotella sp. WR041</i>         | 3.89 | <i>Duncaniella dubosii</i>          | 5.19 | <i>Fastidiosipila sanguinis</i>     | 5.21 | <i>Duncaniella dubosii</i>          | 5.34  |
| <i>Prevotella dentalis</i>          | 3.88 | <i>Coprococcus comes</i>            | 3.15 | <i>Clostridium hylemonae</i>        | 4.17 | <i>Phocaeicola coprophilus</i>      | 5.32  |
| <i>Anaerotignum propionicum</i>     | 3.85 | <i>Fastidiosipila sanguinis</i>     | 2.86 | <i>Eubacterium cellulosolvens</i>   | 4.11 | <i>Bacteroides uniformis</i>        | 4.43  |
| <i>Ruminococcus champanellensis</i> | 3.69 | <i>Eubacterium cellulosolvens</i>   | 2.66 | <i>Anaerocolumna sp. CTTW</i>       | 3.34 | <i>Alkalitalea saponilacus</i>      | 3.64  |
| <i>Clostridium scindens</i>         | 3.45 | <i>Helicobacter apodemus</i>        | 2.62 | <i>Helicobacter apodemus</i>        | 3.08 | <i>Ruminococcus champanellensis</i> | 2.4   |
| <i>Bacteroides uniformis</i>        | 2.99 | <i>Prevotella sp. WR041</i>         | 2.56 | <i>Bacteroides uniformis</i>        | 2.71 | <i>[Ruminococcus] torques</i>       | 2.35  |
| <i>Clostridium hylemonae</i>        | 2.76 | <i>Lachnoanaerobaculum umeaense</i> | 2.46 | <i>Anaerocolumna sedimenticola</i>  | 2.7  | <i>Bacteroides caccae</i>           | 2.18  |

\* Örneklerdeki en yüksek okuma dizisi bulunan ilk 10'a ait tablo verilmiştir.

**Tablo 15.** Rat test gruplarına göre tür seviyesinde taksonomik dağılımlar\*

| KRO                                     |      | TRO                                     |      | KR10                                    |       | TR10                                   |       |
|---|------|---|------|---|-------|--|-------|
| Tür                                     | %    | Tür                                     | %    | Tür                                     | %     | Tür                                    | %     |
| <i>Ruminococcus champanellensis</i>     | 5.49 | <i>Prevotella copri</i>                 | 7.09 | <i>Prevotella copri</i>                 | 13.86 | <i>Prevotella copri</i>                | 15.8  |
| <i>Prevotella copri</i>                 | 5.42 | <i>Ruminococcus champanellensis</i>     | 5.36 | <i>Ruthenibacterium lactatiformans</i>  | 7.13  | <i>Anaerostipes hadrus</i>             | 12.12 |
| <i>Lacrimispora saccharolytica</i>      | 5.16 | <i>Fastidiosipila sanguinis</i>         | 5.22 | <i>Prevotella dentalis</i>              | 6.23  | <i>Rhodothermus marinus</i>            | 5.57  |
| <i>Fastidiosipila sanguinis</i>         | 4.64 | <i>Prevotella dentalis</i>              | 4.42 | <i>Intestinimonas butyriciproducens</i> | 3.52  | <i>Ruthenibacterium lactatiformans</i> | 4.9   |
| <i>Faecalitalea cylindroides</i>        | 4.28 | <i>Ruthenibacterium lactatiformans</i>  | 3.96 | <i>Flavonifractor plautii</i>           | 3.5   | <i>Anaerocolumna cellulosilytica</i>   | 4.47  |
| <i>Lachnoclostridium phocaeense</i>     | 4.28 | <i>Clostridium hylemonae</i>            | 3.56 | <i>Fastidiosipila sanguinis</i>         | 3.16  | <i>Akkermansia muciniphila</i>         | 3.76  |
| <i>Clostridium scindens</i>             | 4.24 | <i>Oceanicoccus sagamiensis</i>         | 3.26 | <i>Komagataeibacter rhaeticus</i>       | 2.84  | <i>Faecalitalea cylindroides</i>       | 3.6   |
| <i>Clostridium hylemonae</i>            | 3.37 | <i>Intestinimonas butyriciproducens</i> | 3.15 | <i>Flintibacter sp. KGMB00164</i>       | 2.61  | <i>Lacrimispora saccharolytica</i>     | 3.19  |
| <i>Intestinimonas butyriciproducens</i> | 2.95 | <i>Anaerobutyricum hallii</i>           | 2.59 | <i>Ruminococcus champanellensis</i>     | 2.49  | <i>Collinsella aerofaciens</i>         | 2.99  |
| <i>Clostridium sp. SY8519</i>           | 2.62 | <i>Paraprevotella xylaniphila</i>       | 2.48 | <i>Clostridium hylemonae</i>            | 2.19  | <i>Fastidiosipila sanguinis</i>        | 2.73  |

\* Örneklerdeki en yüksek okuma dizisi bulunan ilk 10'a ait tablo verilmiştir.

## Tartışma ve Sonuç

In-vivo çalışmalarda araştırılanın kesin olarak etkinliğini ortaya koyabilmek için deneyde kullanılan hayvanların türü, soyu ve yaşının yanı sıra çevre koşulları gibi pek çok koşul kontrol ve test gruplarında bir örnek hale getirilmektedir. Böylelikle deney sonucunda test ve kontrol gruplarından elde edilen sonuçlar arasındaki farkın tek değişken olduğu düşünülen uygulamadan kaynaklandığı varsayılmaktadır. Ancak

bu deneylerde gastrointestinal sistemin işlevi ve bütünlüğünde, bağışıklık homeostazının korunmasında ve konak enerji metabolizmasında önemli bir rol oynayan bağırsak mikrobiyotasının (Pflughoeft ve Versalovic 2012) kullanılan deney hayvanlarında farklılıklar gösterebileceği bu durumun ise çalışma sonuçlarını olumsuz etkileyebileceği çoğu zaman gözden kaçmaktadır. Yapılan çalışmalar, bir dizi faktörün mikrobiyotada bazı değişikliklere neden olabileceğini göstermiştir. Bunlarla sınırlı olmamak üzere bağırsak

mikrobiyotasını modüle edebilen faktörler arasında, üretici/satıcı (tek bir üretici içindeki farklı tesisler dahil), beslenme, altlık tipi, barınak muhafazası, nakliye, terapötik müdahale, su, dekontaminasyon yöntemleri ve çoğaltma yer almaktadır (Ericsson ve ark. 2015; Rasmussen ve ark. 2019). Dolayısıyla özellikle farklı üreticilerden temin edilen deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalar öncesinde kullanılan hayvanların mikrobiyotalarının senkronize edilmesinin çalışmaların güvenilirliği açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Yapılan deneysel gözlemler probiyotiklerin bağırsak mikrobiyomunun yapısını ve genel metabolik işlevini etkileyebileceğini öne sürmektedir (Lavasani ve ark. 2010; McNulty ve ark. 2011). Günümüzde yeni nesil dizileme, kemirgen kolonilerinde var olan karmaşık mikrobiyal florayı daha iyi karakterize edilebilmesine ve bağırsak mikrobiyotasındaki farklılıkları dışarıdan müdahaleler ile ilişkilendirilmesine imkân tanımaktadır (Franklin ve Ericsson 2020). Bu bağlamda probiyotik uygulaması ile deney hayvanlarının mikrobiyotasının senkronize edilebileceği hipotezi üzerine bu çalışma kurgulanmıştır.

Yapılan analizler neticesinde çalışma öncesinde farelerde kontrol (KF0: %52) ve test (TF0: %50) gruplarında mikrobiyotanın dominant florasının filum düzeyinde *Firmicutes*'ten oluştuğu gözlenmiş olup çalışmanın 10. gününde kontrol grubunda (KF10) bu dengenin yine %64 ile yine *Firmicutes* yönünde olduğu buna karşın test grubunda ise (TF10) *Bacteroidetes*'in %64 oranına yükselirken *Firmicutes*'in %30,6'ya gerilediği gözlenmiştir. Bu değişim rat deney gruplarında da benzer şekilde tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarında görüleceği gibi sınıf, sıra, aile ve cins düzeyinde yapılan değerlendirmelerde hem fare hem de ratlarda probiyotik uygulamasının mikrobiyotanın kompozisyonu üzerine etkili olduğu ortaya konmuştur. Bununla beraber sonuçlar incelendiğinde oluşan farkların fare ve ratlar arasında farklılık gösterebildiği gibi aynı hayvanlarda sınıf, aile, cins ve tür düzeyinde de farklılıklar olabildiği görülmektedir. Bu açıdan daha kapsamlı araştırmaların faydalı olacağı düşünülmektedir.

Tür düzeyinde yapılan değerlendirmede, farede en yüksek oranda tespit edilen *Prevotella dentalis* ve ratta *Prevotella copri* dışında diğer türlerin sayılarında önemli değişikliklerin olduğu gözlenmiştir. Sayısında azalma görülen bakterilerin arasında *Clostridium* ve *Helicobacter* olması dikkat çekicidir. Kemirgenlerde helikobakterlerin, özellikle de *Helicobacter hepaticus* ve *Helicobacter bilis*'in, enflamatuar bağırsak hastalığı modellerinde yangıda provokatör olarak görev yaptıkları çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (Fox 2007; Jergens ve ark. 2007). Bu sonuçlara

istinaden bu durumun özellikle bazı deneysel çalışmalarda problem yaratabileceği düşünülmektedir.

Antibiyotik tedavisi ile eşzamanlı olarak veya farelerin antibiyotik tedavisini takiben iyileşme aşamasında probiyotiklerin etkisinin incelendiği bir çalışmada, probiyotiklerin bağırsağı kolonize etmediği veya bağırsak mikrobiyotasının genel çeşitliliğini değiştirmediği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, probiyotik takviyesinin, mevcut olan bakteri türlerini önemli ölçüde değiştirdiği belirtilmektedir. Özellikle iyileşme fazı sırasında probiyotiklerin, *Enterobacteriaceae*'nin (*Shigella* ve *Escherichia*) baskılanmasına neden olurken, özellikle *Anaerotruncus* cinsinden *Firmicutes*'in artışı teşvik ettiği bildirilmiştir (Grazul ve ark. 2016). Aynı çalışmada, kontrol gruplarında özellikle *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* baskın profilleri olarak belirlenmiştir. Ayrıca probiyotik ilavesi sonrasında bu sonuçlar bizim çalışma sonuçlarımız ile büyük oranda benzerlik göstermektedir. Bununla beraber çalışmamızda *Firmicutes* baskınlığının *Bacteroidetes*'e oranla çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada aynı hayvan türlerine ait gruplar kendi içinde bir uyum gösterse de fare ve rat mikrobiyotalarının tür düzeyinde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum diğer araştırmacılar tarafından da tespit edilmiş olup bağırsak mikrobiyotasının genetik ve cinsiyete göre değişiklik gösterebileceği belirtilmiştir (Benson ve ark. 2010). Franklin ve Ericsson (2020) her ne kadar deney amacıyla kullanılan rodentlerin sindirim sistemi mikrobiyotaları hakkında sınırlı bilgi sahibi olsak da hayvanların mikrobiyotalarının karmaşık ve kapsamlı varyasyonlar içerdiğini belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada ise deney hayvanlarının sadece kalıtsal olarak aldıkları bağırsak mikrobiyotasına bağlı olarak maruz bırakıldıkları hastalığın ciddiyetinin değiştiği belirlenmiştir. Bu durumun kemirgen kolonilerinde bulunan farklı mikrobiyotaların fenotipik farklılıklara da neden olabileceğini göstermesi açısından önemli bulunmuştur (Hart ve ark. 2017). Bir fenotipik etkinin konakçı genotipinden mi, mikrobiyotadan mı yoksa ikisinin kombinasyonundan mı kaynaklandığını belirlerken deneysel kurulum kritik öneme sahip olduğu belirtilmektedir. Deneysel değişkenliği azaltmak, tekrarlanabilirliği artırmak ve doğru biyolojik yorumlar yapmayı sağlayacak anlamlı bilimsel veriler elde etmek için, yalnızca mikrobiyota-bağırsıklık sistemi etkileşimlerini doğrudan araştıranlara değil, tüm deneysel fare modellerine titiz deneysel tasarım ve raporlama uygulanması gerektiği düşünülmektedir. Bu nedenle merkezlerde farklı protokollerin uygulanması istenmektedir (McCoy ve ark. 2017). Bu çalışmalar mikrobiyota senkronizasyonunun ne denli

önemli olduğunun ortaya konması açısından oldukça önemli bulunmuştur.

Mikrobiyotanın geliştirilmesinde çeşitli yöntemler kullanılabilir. Laboratuvar kemirgenlerinin üretildikleri kurumlarla iş birliği yapılabildiği hallerde altlık veya dışkı örnekleri toplanıp hayvanların gönderildiği yeni tesise nakledilebilmektedir. Bu yaklaşım esasen kaprofajiye dayanmaktadır. Önemli bazı bakteri türlerinin kolonizasyonu uygulanmak istenilen deney hayvanlarında şekillenmeyebildiğinden bağırsak mikrobiyotasının transferinin eksik şekillendiği ve dolayısıyla karışık sonuçlarla karşılaşıldığı belirtilmiştir (Franklin ve Ericsson 2020).

Karmaşık bağırsak mikrobiyotasını transfer etmek için en doğrudan yaklaşım fekal transplantasyon olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde alıcı kemirgenlerdeki mevcut mikrobiyotanın önemli ölçüde azaltılması amacıyla hayvanlar geniş spektrumlu antibiyotik kokteyllerine tabi tutulurlar. Sonrasında alıcı kemirgenler donör dışkılarından veya mikrobiyotayı içeren diğer bağırsak numunelerinden hazırlanan karışımla beslenmektedirler. Antibiyotik tedavisi birlikte barınma ve dışkı/kirli yataklara maruz kalma ile ilişkili kolonizasyonun neden olduğu direncin çoğunu ortadan kaldırırken, endojen mikrobiyotanın çoğu üyesi tam olarak ortadan kaldırılamamaktadır. Bu nedenle antibiyotik ortadan kalktıktan sonra bu mikroorganizmalarda yeniden kolonizasyon meydana geldiği belirtilmiştir. Bu, durum donör mikrobiyotasının eksik transferi ile birleştiğinde hibritleşmiş bir mikrobiyota ile sonuçlandığı ifade edilmiştir (Ericsson ve ark. 2017). Ayrıca uygulamanın zorluğu ve yoğun antibiyotik kullanımının neden olduğu olumsuzluklar bu tekniği sınırlandıran diğer faktörlerdir. Dolayısıyla mikrobiyota modifikasyonlarında henüz ideal bir yöntem ortaya konulamamış olup çevre dostu, pratik ve etkin uygulamalara ihtiyaç bulunmaktadır. Son yıllarda bu kapsamda artan oranda çalışmalar yapılmaya başlanmış olup konak-mikrobiyota etkileşimlerinin hem deney hayvanlarının tekrar üretilebilirliğini ve yapılan deneylerin sonuçlarının doğruluğunu etkilediği düşünülmektedir. Sindirim sistemindeki mikrobiyal ortamın doğuştan itibaren süre gelen ve adaptif bağışıklık sistemini etkileyen ve mikrobiyomun araştırılmadığı hastalık modellerinde bile bu tür araştırmaların sonuçlarını belirlediğini göstermektedir (Franklin ve Ericsson 2020).

Sonuç olarak bu çalışmada probiyotik mikroorganizmalar içeren sıvı bir yem hazırlanmış ve deney hayvanlarına 10 gün süreyle verilmiştir. Mikrobiyota analizleri neticesinde probiyotik uygulamasının hem fare hem de ratlarda önemli değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir. Günümüze kadar yapılan

literatür incelemelerinde Türkiye’de bu kapsamda bir çalışma olmadığı belirlenmiştir. Bu bağlamda deneylere başlamadan önce hayvanların çalışma kapsamında üretilen probiyotik içerikli yemler ile beslenmesi mikrobiyotanın geliştirilmesi açısından umut vaat etmektedir.

**Deney hayvanları etik kurul kararları ve izinler:** Çalışmada, deney hayvanları çalışmaları Kırıkkale Üniversitesi Hüseyin Aytemiz Deney Hayvanları Biriminde ve Hayvan deneyleri yerel Etik Kurulu onayı alınarak gerçekleştirilmiştir (Karar no: 2021-02-08).

**Maddi destek ve çıkar ilişkisi:** Bu çalışma KOSGEB tarafından desteklenen “Laboratuvar Hayvanlarına (Rat ve Fare) Yönelik Araştırma Hazırlık ve Senkronizasyon Yemlerinin Geliştirilmesi” başlıklı projenin verilerini içermektedir.

## Kaynaklar

- Anonim (2006) Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, and Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food (2006) Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. In Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Cordoba, Argentina, 1–4 October 2001 [and] Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, ON, Canada, 30 April –1 May 2002. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization.
- Anonim. (2010) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. 20.10.2010 EN L 276/33.
- Anonim. (2019) European Union Commission Report. 2019 report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union in 2015-2017 {SWD(2020) 10 final, Brussels, 5.2.2020 COM(2020) 16 final.
- Anonim. (2020a) American Association for Laboratory Animal Science. AALAS, Erişim adresi: <https://www.aalas.org/>
- Anonim. (2020b) International Council for Laboratory Animal Science. ICLAS, Erişim adresi: <https://iclas.org/>
- Anonim. (2021) HADMEK (Hayvan Deneyleri Merkez Etik Kurulu). 2018 – 2020 Yılları Hayvan Deneyleri Merkez Etik Kurulu Faaliyet Raporu, Ankara 2021.
- Anonim. (2023) Tarım ve Orman Bakanlığı. Çalışma izni verilen deney hayvanı üretici, kullanıcı ve tedarikçi kuruluşlar. Erişim adresi: <https://www.tarimorman.gov.tr/Konu/1007/Calisma-Izni-Verilen-Deney-Hayvani-Uretici-Kullanici-ve-Tedarikci-Kuruluslar>. Erişim tarihi: 26.07.2023.
- Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA. (2018) The gastrointestinal microbiome: a review. *J Vet Intern Med.* 32, 9-25.
- Benson AK, Kelly SA, Legge R, Pomp D. (2010) Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(44), 18933–18938.

- Ericsson AC, Davis JW, Spollen W, Bivens N, Givan S, Hagan CE, McIntosh M, Franklin CL. (2015) Effects of vendor and genetic background on the composition of the fecal microbiota of inbred mice. *PLoS One*. 10(2), e0116704. doi: 10.1371/journal.pone.0116704.
- Ericsson AC, Personett AR, Turner G, Dorfmeier RA, Franklin CL. (2017) Variable colonization after reciprocal fecal microbiota transfer between mice with low and high richness microbiota. *Front Microbiol.* 8, 196. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00196>.
- Farzi A, Frohlich EE, Holzer P. (2018) Gut microbiota and the neuroendocrine system. *Neurotherapeutics* 15, 5–22. doi: 10.1007/s13311-017-0600-5.
- Ferrario C, Taverniti V, Milani C, Fiore W, Laureati M, De Noni I, Stuknyte M, Chouaia B, Riso P, Guglielmetti S. (2014) Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults. *J Nutr.* 144, 1787–1796. doi: 10.3945/jn.114.197723
- Fox JG. (2007) *Helicobacter bilis*: bacterial provocateur orchestrates host immune responses to commensal flora in a model of inflammatory bowel disease. *Gut.* 56(7), 898–900.
- Franklin CL, Ericsson AC. (2020) Complex microbiota in laboratory rodents: management considerations. *ILAR J.* 60(2), 289–297. doi: 10.1093/ilar/ilaa011.
- Gargari G, Taverniti V, Balzaretti S, Ferrario C, Gardana C, Simonetti P, Guglielmetti S. (2016) Consumption of a Bifidobacterium bifidum strain for 4 weeks modulates dominant intestinal bacterial taxa and fecal butyrate in healthy adults. *Appl Environ Microbiol.* 82, 5850–5859. doi: 10.1128/aem.01753-16.
- Grazul H, Kanda LL, Gondek D. (2016) Impact of probiotic supplements on microbiome diversity following antibiotic treatment of mice. *Gut Microbes.* 7(2), 101–114.
- Hart ML, Ericsson AC, Franklin CL. (2017) Differing complex microbiota alter disease severity of the IL-10(–/–) mouse model of inflammatory bowel disease. *Front Microbiol.* 8, 792. doi: 10.3389/fmicb.2017.00792.
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. (2014) Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 11, 506–514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.
- ISO (International Organization for Standardization). (2013) Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 2: Colony count at 30° C by the surface plating technique. ISO 4833-2:2013. ICS: 07.100.30 Food microbiology.
- ISO (International Organization for Standardization). (1998) Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria — Colony-count technique at 30 degrees C. ISO 15214:1998. ICS: 07.100.30 Food microbiology.
- ISO (International Organization for Standardization). (2006) Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique. ISO 4832:2006. ICS: 07.100.30 Food microbiology.
- ISO (International Organization for Standardization). (2008) Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0.95. ISO 21527-2:2008. ICS: 07.100.30 Food microbiology.
- ISO (International Organization for Standardization). (2017a) Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of Salmonella spp. ISO 6579-1:2017. ICS: 07.100.30 Food microbiology.
- ISO (International Organization for Standardization). (2017b) Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp. — Part 1: Detection method. ISO 11290-1:2017. ICS: 07.100.30 Food microbiology.
- ISO (International Organization for Standardization). (2021) Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) — Part 1: Method using Baird-Parker agar medium. ISO 6888-1:2021. ICS: 07.100.30 Food microbiology.
- Jergens AE, Wilson-Welder JH, Dorn A, Henderson A, Liu Z, Evans RB, Hostetter J, Wannemuehler MJ. (2007) Helicobacter bilis triggers persistent immune reactivity to antigens derived from the commensal bacteria in gnotobiotic C3H/HeN mice. *Gut.* 56(7), 934–940.
- Khalilova L, Mount Patrick SK, Arganbright KM, Halpern MD, Kinouchi T, Dvorak B. (2010) Bifidobacterium bifidum reduces apoptosis in the intestinal epithelium in necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 299, G1118–G1127.
- Lavasani S, Dzhambazov B, Nouri M, Fak F, Buske S, Molin G, Thorlacius H, Alenfall J, Jeppsson B, Weström B. (2010) A novel probiotic mixture exerts a therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by IL-10 producing regulatory T cells. *PLoS One.* 5, e9009.
- Lee SM, Donaldson GP, Mikulski Z, Boyajian S, Ley K, Mazmanian SK. (2013) Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. *Nature.* 501, 426–429.
- McCoy KD, Geuking MB, Ronchi F. (2017) Gut microbiome standardization in control and experimental mice. *Curr Protoc Immunol.* 117, 23.1.1–23.1.13.
- McNulty N, Yatsunenkov T, Hsiao A, Faith J, Muegge B, Goodman A, Henrissat B, Oozeer R, Cools-Portier S, Gobert G, Chervaux C, Knights D, Lozupone CA, Knight R, Duncan AE, Bain JR, Muehlbauer MJ, Newgard CB, Heath AC, Gordon JL. (2011) The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. *Sci Transl Med.* 3, 106.
- Nicklas W. (2008) International harmonization of health monitoring. *ILAR J.* 49, 338–346.
- Pflughoeft KJ, Versalovic J. (2012) Human microbiome in health and disease. *Annu Rev Pathol.* 7, 99–122. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132421.
- Rasmussen TS, de Vries L, Kot W, Hansen LH, Castro-Mejia JL, Vogensen FK, Hansen AK, Nielsen DS. (2019) Mouse vendor influence on the bacterial and viral gut composition exceeds the effect of diet. *Viruses.* 11(5), 435. doi: 10.3390/v11050435.
- Taverniti V, Cesari V, Gargari G, Rossi U, Biddau C, Lecchi C, Fiore W, Arioli S, Toschi I, Guglielmetti G. (2021) Probiotics Modulate Mouse Gut Microbiota and Influence Intestinal Immune and Serotonergic Gene Expression in a Site-Specific Fashion. *Front Microbiol.* 12, 706135. doi: 10.3389/fmicb.2021.706135
- Wang HT, Anvari S, Anagnostou K. (2019) The role of probiotics in preventing allergic disease. *Children (Basel).* 6, 24. doi: 10.3390/children6020024
- Wilkins T, Sequoia J. (2017) Probiotics for gastrointestinal conditions: a summary of the evidence. *Am Fam Phys.* 96, 170–178.
- Wood DE, Salzberg SL. (2014) Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 15(3), R46.