



6. ULUSLARARASI BEYAZ ET KONGRESİ

1-5 Mart 2023 Titanic Deluxe Golf Belek - ANTALYA - TÜRKİYE

6th INTERNATIONAL POULTRY MEAT CONGRESS

1-5 March 2023 Titanic Deluxe Golf Belek - ANTALYA - TURKEY

KONGRE KİTABI PROCEEDINGS



beyazetkongresi.com

poultrymeatcongress.com

PP⁴⁰ Broilerlerde Probiyotik Kullanımının Bağırsak Mikrobiyotası ve Canlı Ağırlığa Etkisi

Akın Ünal¹, Serdar Özlü², Okan Elibol², Mehmet Akan³

¹Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Mikrobiyolojisi, Ankara, Türkiye

²Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, Ankara, Türkiye

³Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Özet

Probiyotikler, bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesi ve performansın artırılması için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada, broilerlerde içme suyu ile probiyotik kullanımının bağırsak mikrobiyotasına ve canlı ağırlığa etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma, toplam 128 adet Ross 308 broilerlerde gerçekleştirildi. Probiyotik tüm üretim periyodu boyunca kullanıldı. Üretim periyodunun 7, 14, 21, 28, 35 ve 42. günlerinde broilerler bireysel olarak tartılarak canlı ağırlık hesaplamaları yapıldı. Mikrobiyom analizi için deneme ve kontrol gruplarında her grubu temsilen 8 adet olmak üzere toplam 16 adet taze dışkı numunesi toplandı. Sindirim sistemi mikrobiyotası, yeni nesil sekans ve metagenomik analiz ile belirlendi. Canlı ağırlık bulguları değerlendirildiğinde, probiyotik verilen deneme grubunun canlı ağırlıkları, tartım yapılan tüm haftalarda kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Kesim aşamasında probiyotik verilen grupta canlı ağırlık 52 g daha yüksek olduğu görüldü. Mikrobiyom analizi sonucunda deneme grubunda *Firmicutes*, *Actinobacteriota* ve *Gastranaerophilales* bakteri filumları kontrol grubuna göre daha yüksek iken *Bacteroidales* bakteri filumu daha düşük olarak bulundu. Sonuç olarak probiyotik kullanımının bağırsak mikrobiyotasını oluşturan yararlı bakteri filumlarını artırdığı ve üniform bir dağılım gösterdiği ve buna bağlı olarak deneme grubunda canlı ağırlığın kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: Bağırsak mikrobiyotası, broiler, canlı ağırlık, probiyotik

Giriş

Broilerlerin sindirim sistemi, besinlerin sindirimi ve emiliminde, bağışıklık sistemi gelişiminde ve patojen dışlanması hayati bir rol oynayan çeşitli ve karmaşık bir mikrobiyota barındırmaktadır [1,2]. Farklı broiler bağırsak mikrobiyotasının broiler metabolizmasında, besin sindiriminde, büyüme performansında ve konağın sağlığında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bağırsak mikrobiyotasının dengeli ve sağlıklı olması için probiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır [3]. Canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanan probiyotikler, uygun miktarda uygulandıklarında konakçıya sağladıkları yararlar nedeniyle broiler üretiminde uzun süredir kullanılan başlıca yem katkı maddelerinden biridir [4]. Broilerler için probiyotikler, sindirim enzimlerinin aktivitesini artırarak yem tüketimini ve sindirim verimliliğini artırabilmekte, gastrointestinal (GI) kanaldaki bakterilerin dengesini koruyabilmekte, bağırsak bütünlüğünü destekleyebilmektedir. Böylece probiyotikler broilerlerin büyüme performansını ve sağlığını iyileştirebilmektedir [5,6]. Ayrıca probiyotiklerin, patojenik türlerin çoğalmasını azaltarak bağırsakta mikrobiyota dengesini koruduğu ve enfeksiyona karşı direnci artırarak hastalık riskini azalttığı da gösterilmiştir [7,8].

Bu çalışmada broilerlerde içme suyu ile probiyotik kullanımının bağırsak mikrobiyotasına ve canlı ağırlığa etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Etlik civciv: Denemede toplam 128 adet bir günlük etlik civciv, (Ross 308, %50 dişi-erkek ayrılmış olarak) kullanıldı. Çalışma, her bölmede (1x2 m; 2 m²) 32 adet civciv (16 broiler/m²) bulunan iki deneme ve iki kontrol gruplarında gerçekleştirildi.

Yem: Üretim dönemi boyunca kullanılan yemlerin tamamı (4 farklı dönem, 0-12, 12-22, 23-37, 38-42 günlerde olmak üzere kodlanarak) genotip kitapçığında bildirilen şekilde ticari olarak sağlandı.

Probiyotik: Tavuklarda probiyotik olarak **Smart Prolive Broiler Likit** (Bakın Tarım, Ankara), içme suyu ile önerildiği şekilde (1/1000) kullanıldı.

Deneme: Çalışma, deneme (probiyotik verilen) grubu ve kontrol grubu halinde yürütüldü. Cıvcıvler, bireysel numaralama ve tartım işlemi sonrasında, kümeşte bulunan her bir bölmede 32 adet cıvciv (16 adet dişi, 16 adet erkek; 16 cıvciv/m²) olacak şekilde yerleştirildi ve 42 gün süreyle büyütüldü. Çalışmada, bakım idare uygulamaları (sıcaklık, havalandırma, yem/su, aydınlatma vb) broiler bakım-idare ile ilgili standart uygulamaları içerecek şekilde gerçekleştirildi. Değerlendirmeye esas olan canlı ağırlık bulguları, 7, 14, 21, 28, 35 ve 42. günlerde bireysel olarak tartılarak hesaplandı. Deneme ve kontrol grubunda elde edilen performans verileri, SPSS istatistik paket programı kullanılarak analiz edildi.

Kesim aşamasında (42.günde) deneme ve kontrol gruplarında her grubu temsilen 8 adet olmak üzere toplam 16 adet taze dışkı numunesi ayrı kaplara alındı ve kodlandı. Kodlanan numuneler laboratuvara soğuk zincir (2-8 °C) şartlarında ulaştırıldı. Numunelerdeki mikrobiyom yeni nesil sekans ve metagenomik analiz ile belirlendi.

Mikrobiyom analizinin detayları aşağıda sunulmuştur.

Kodlanan numuneler membran gözenek boyutu 0,22 mm olan Sterivex-GP (Millipore, MA) kullanılarak filtrelendi. Filtrasyondan sonra, çevresel DNA'yı tutan membran doğrudan DNA ekstraksiyonu için kullanıldı. Elde edilen filtrat kuru buzlu homojenizatör kullanılarak boncuk içeren tüplerde homojenize edildikten sonra Qiagen Blood & Tissue DNA Purification Kit kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapıldı. Tüm ekstraksiyonlar 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilerek izolatlar aynı havuzda birleştirildi.

Elde edilen DNA'nın bakteri için 16SV3 gen bölgesi çoğaltıldı. Illumina evrensel adaptörleri içeren 16SV3F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3') ve 16SV3R (5'-ACCGCGGCTGCTGGCAC-3') primerleri ile 16S rRNA'nın yaklaşık 200 bp uzunluğunda V3 fragmanı amplifiye edildi. Tüm amplifikasyonlar 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilerek ve havuzlanarak kütüphane aşamasında kullanıldı. PCR amplifikasyonları, GoTaq® Flexi DNA Polimerase (Promega) ile toplam 25 µl hacimde T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) üzerinde üretici protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Amplifiye edilmiş DNA fragmanları, 1x TAE içinde %2 agaroz jeli ile değerlendirilmiş ve ThermoFisher Qubit 4 Fluorometer ile nicel ölçümü gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünleri birleştirilip AMPure XP beads (Beckman Coulter) kullanılarak saflaştırıldı. Illumina Nextera XT Index Kit v2 kullanılarak ve "16S Metagenomic Sequencing Library Preparation" protokolü izlenerek kütüphane hazırlıkları gerçekleştirildi. ThermoFisher Qubit 4 Fluorometer ile nicel ölçümü gerçekleştirildikten sonra BioAnalyzer 2100 sisteminde kütüphane boyutları kontrol edilip 2x150 PE kimyası kullanılarak Illumina iSeq 100 platformunda dizilendi.

Biyoinformatik analiz, Linux/Unix terminali üzerinden tamamlandı. FASTQC programı kullanılarak ".fastq" formatlı ileri ve geri okuma dizilerinin kalite kontrolleri yapıldı. Analizlerin devamı "ObiTools" paketi kullanılarak yapıldı. "illumina-paired-end" ile Phred puanı 20'nin üzerinde olan diziler hizalanarak birleştirildi. Bundan sonra, birleştirilmemiş okumalar temizlendi (obigrep), hem ileri hem de ters primerler kaldırıldı (perl), çoğaltılan veriler temizlenerek (obiuniq) ve her bir örnek başlığından gereksiz veriler sırasıyla kaldırıldı (obiannotate). Daha sonra 2'den fazla tekrarlı ve 100 baz çiftinden uzun diziler kaydedildi (obigrep) ve bunlar için "c10.i100" kısaltması kullanıldı. ObiTools paketinden elde edilen ".fasta" dosyaları, SILVA ve Geneious Prime arayüzü aracılığıyla blastlandı. SILVA ve Blast sonuçlarının değerlendirilmesi için sadece eşleşme oranı %97'nin üzerinde olan sonuçlar dikkate alındı.

Bulgular

Deneme ve kontrol grubunda kaydedilen canlı ağırlık bulguları Tablo 1 de sunulmuştur. Tüm günlerde probiyotik verilen grupların ortalaması deneme grubuna göre yüksek bulundu. Kesim aşamasında probiyotik verilen grupta canlı ağırlık 52 g daha yüksek olduğu görüldü. Tüm dönemlerde elde edilen bulgular arasında sayısal farklılık olmasına karşın, bulgular arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu.

Tablo 1. Canlı ağırlık bulguları

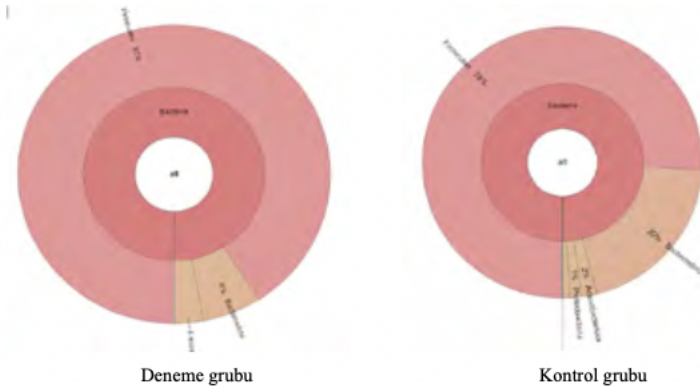
Grup	Canlı Ağırlık, g (Ortalama±St.Hata)					
	7.gün	14.gün	21.gün	28.gün	35.gün	42.gün
Deneme	180,0 ± 2,19	510,1 ± 6,66	1084 ± 14,40	1821 ± 22,9	2611 ± 31,5	3364 ± 38,1
Kontrol	176,0 ± 2,19	497,2 ± 6,66	1060 ± 14,28	1780 ± 22,5	2565 ± 30,9	3312 ± 37,4

Mikrobiyom analiz bulguları: Deneme ve kontrol gruplarından sağlanan taze dışkılarından elde edilen mikrobiyom analiz bulguları Tablo 2 de sunulmuştur. Deneme grubunda, Firmicutes, Bacteroidales, Actinobacteriota, Protobacteria, Gastranaerophilales ve Desulfovibrionaceae bakteri filumları mikrobiyomu oluştururken kontrol grubunda Firmicutes, Bacteroidales, Actinobacteriota, Protobacteria, Gastranaerophilales bakteri filumları mikrobiyomu oluşturdu (Şekil 1). Deneme grubunda ortalama Firmicutes, Actinobacteriota ve Gastranaerophilales bakteri filumları kontrol grubu ortalamalarına göre daha yüksek iken Bacteroidales ve Protobacteria bakteri filumları daha düşük olarak bulundu (Şekil 2). Ayrıca numuneler bireysel olarak değerlendirildiğinde kontrol grubundaki dağılımın daha yaygın olduğu dikkati çekti (Şekil 3).

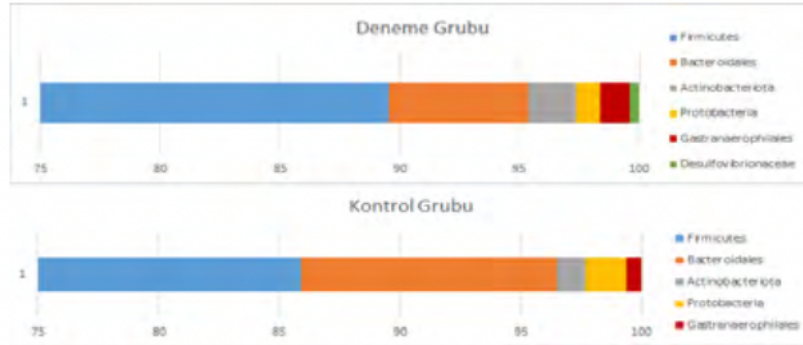
Tablo 2. Mikrobiyom analiz bulguları (grublara ait ortalamalar)

Bakteri filumları	Grup (%)	
	Deneme	Kontrol
Firmicutes	89,54	85,87
Bacteroidales	5,83	10,62
Actinobacteriota	2	1,19
Protobacteria	1	1,7
Gastranaerophilales	1,23	0,62
Desulfovibrionaceae	0,4	0

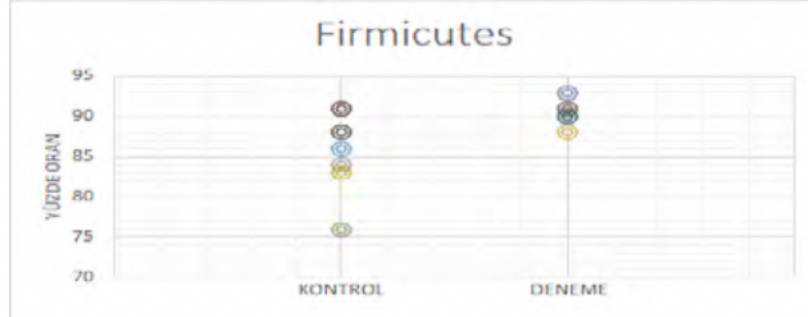
Şekil 1. Mikrobiyom analiz bulguları (bireysel)



Şekil 2. Deneme Kontrol grubundaki mikrobiyom çeşitliliği



Şekil 3. *Firmicutes* bakteri filumuna ait dağılım grafiği



Tartışma ve Sonuç

Elde edilen bulgulara göre probiyotik kullanılan grupta canlı ağırlık kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. Bu sonucun probiyotik kullanımının canlı ağırlığa etkisinin araştırıldığı Hıncar ve ark. [9] ve Fesseha ve ark. [10] sonuçları ile benzer olduğu görüldü.

Mikrobiyom analizi sonucunda probiyotik kullanılan grupta *Firmicutes*, *Actinobacteriota* ve *Gastranaerophilales* bakteri filumları kontrol grubu ortalamalarına göre daha yüksek iken *Bacteroidales* ve *Protobacteria* bakteri filumları daha düşük olarak bulundu. Wang ve ark. [11] probiyotikleri yem katkısı olarak kullandıkları çalışmada mikrobiyotanın *Firmicutes* bakteri filumu lehine değiştiğini bulurken, Memon ve ark. [12] probiyotik kullanımı sonrasında *Firmicutes*, *Bacteroidales* ve *Protobacteria* bakteri filumlarının en çok etkilenen bakteri filumları olduğunu ve yararlı bakteri gruplarının oransal olarak arttığını belirtmiştir.

Bu çalışmada probiyotik kullanılan grupta canlı ağırlığın ilk haftadan itibaren kesim aşamasına kadar tüm aşamalarda yüksek bulunması, sindirim sistemi mikrobiotasının üniform yararlı bakteriler olması ile açıklandı. Bu sonuç, sindirim sistemi mikrobiotasının düzenlenerek performansta iyileşme sağlanabileceğini gösterdi.

Kaynaklar

1. Broom LJ, Kogut MH. The role of the gut microbiome in shaping the immune system of chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* 2018; 204:44-51.
2. Shang Y, Kumar S, Oakley B, Kim WK. Chicken gut microbiota: importance and detection technology. *Front. Vet. Sci.* 2018; 5: 254.
3. Hack MEA, Saadony MT, Shafi ME, Qattan SYA, Batiha GE, Khafaga AF, Moneim AME, Alagawany M. Probiotics in poultry feed: a comprehensive review. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2020;104:1835-1850.
4. Markowiak P, Liewska K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog.* 2018;10:1-20.
5. Kabir SML. The Dynamics of probiotics in enhancing poultry meat production and quality. *Int. J. Poult. Sci.* 2009;3: 361-364
6. Soomro RN, Abd El-Hack ME, Shah SS, Taha AE, Alagawany M, Swelum A Tufarelli V. Impact of restricting feed and probiotic supplementation on growth performance, mortality and carcass traits of meat-type quails. *Anim Sci J.* 2019; 90:1388-1395.
7. Thacker PA. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *J Anim Sci Biotechnol.* 2013; 4: 35.
8. Yadav S, Jha R. Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. *J Anim Sci Biotechnol.* 2019; 10:2
9. Hrnčár C, Weis J, Mindek S, Bujko J. Effect of probiotic addition in drinking water on body weight and body measurements of broiler chickens. *Anim Sci Biotechnol.* 2014; 47: 249-253.
10. Fesseha H, Demlie T, Mathewos M, Eshetu E. Effect of Lactobacillus species probiotics on growth performance of dual-purpose chicken. *Vet Med Res Rep.* 2021;12; 75-83.
11. Wang Y, Sun J, Zhong H, Li N, Xu H, Zhu Q, Liu Y. Effect of probiotics on the meat flavour and gut microbiota of chicken. *Sci Rep.* 2017;7: 1-13.
12. Memon FU, Yang Y, Lv F, Soliman AM, Chen Y, Sun J, Si H. Effects of probiotic and *Bidens pilosa* on the performance and gut health of chicken during induced *Eimeria tenella* infection. *J. Appl. Microbiol.* 2021;131: 425-434.