



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU

***Cyprinus carpio* (Sazan balığı)'da Sindirim Sistemi Bakterileri İzolasyonu ve Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi**

Proje Yürütücü: Prof. Dr. Mustafa KOYUN

Proje Araştırmacısı: Doç. Dr. Fadime ÖZDEMİR

Proje Yardımcı Araştırmacısı: Öznur BİLGİN

Proje No: 2023-01.BŞEÜ.35-01

Proje Başlangıç: 05.06.2023

Proje Bitiş: 04.06.2024

İÇİNDEKİLER

Teşekkür Sayfası	4
Tablolar Listesi	5
Şekiller Listesi	6
ÖZET	8
ABSTRACT	9
GİRİŞ	10
2. YÖNTEM	12
2.1. <i>Cyprinus carpio</i> (Sazan balığı)'nın Temini	12
2.2. <i>Cyprinus carpio</i> (Sazan balığı)'nın Bağırsak Örneklerinin Eldesi	12
2.3. <i>Cyprinus carpio</i> (Sazan balığı)'dan Probiyotik Bakteri Gruplarının İzolasyonu	12
2.4. İzole Edilen Bakterilerin Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi	13
2.4.1. Düşük pH Toleransı	13
2.4.2. Safra Toleransı	13
2.4.3. Lizozim Toleransı	14
2.4.4. Fenol Toleransı	14
2.4.5. Oto-agresyon Testi	14
2.4.5. Hücre Yüzeyi Hidrofobikliği	15
2.4.6. Antimikrobiyal Etkinlik	15
2.4.7. Antioksidan Aktivite	15
2.5. Güvenlik Değerlendirme Testleri (Safety Evaluation)	16
2.5.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi	16
2.5.2. Hemolitik Aktivite	16
3.BULGULAR	20

3.1. <i>Cyprinus carpio</i> (Sazan balığı)'nın Temini	20
3.2. <i>Cyprinus carpio</i> (Sazan balığı)'nın Bağırsak Örneklerinin Eldesi	21
3.3. <i>Cyprinus carpio</i> (Sazan balığı)'dan Probiyotik Bakteri Gruplarının İzolasyonu	22
3.3. İzole Edilen Bakterilerin Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi	27
3.3.1. Düşük pH Toleransı	27
3.3.2. Safra Toleransı	29
3.3.3. Lizozim Toleransı	32
3.3.4. Fenol Toleransı	34
3.3.5. Oto-agresyon Testi	34
3.3.6. Hücre Yüzeyi Hidrofobikliği	36
3.3.7. Antimikrobiyal Etkinlik	38
3.3.8. Antioksidan Aktivite	40
3.4. Güvenlik Değerlendirme Testleri (Safety Evaluation)	42
3.4.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi	42
3.4.2. Hemolitik Aktivite	44
TARTIŞMA ve SONUÇ	47
KAYNAKLAR	51

TEŞEKKÜR

2023-01.BŞEÜ.35-01

Bu alıŐma BAP tarafından desteklenen 2023-01.BŞEÜ.35-01 no'lu projenin katkılarıyla yapılmıştır. Projenin yürütülmesinde finansal katkı sağladığı için Bilecik Şeyh Edebalı Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederiz.

Tablolar Listesi

Tablo 1. <i>Cyprinus carpio</i> (Sazan balığı) bilgileri	20
Tablo 2. Düşük pH toleransı koloni sayımları	27
Tablo 3. Safra toleransı koloni sayımları	29
Tablo 4. Lizozim toleransı koloni sayımı	32
Tablo 5. Fenol toleransı spektrofotometre sonuçları	34
Tablo 6. Oto-agresyon testi formül sonuçları	35
Tablo 7. Hücre yüzeyi hidrofobiklik yüzdeleri	37
Tablo 8. Antimikrobiyal etki zon açıklıkları	39
Tablo 9. Antioksidan % sonuçları	41
Tablo 10. Antimikrobiyal duyarlılık testi zon açıklıkları	43
Tablo 11. Hemolitik aktivite sonuçları	45
Tablo 12. İzolatların İsimleri	49

Şekiller Listesi

- Şekil 1.** *Cyprinus carpio* 1 (C1), *Cyprinus carpio* 2 (C2), *Cyprinus carpio* 3 (C3) ve *Cyprinus carpio* 4 (C4) fotoğrafları **20**
- Şekil 2.** Solungaçlarından tutularak %70' lik etil alkol ile yüzeyi steril edilen *Cyprinus carpio*
- Şekil 3.** Anal boşluktan girilerek bağırsakların çıkarılması **21**
- Şekil 4.** Yaş tayini için sırt bölgesinden pul alınması **22**
- Şekil 5.** Örneklerin 500µl' e 1 oranında 10⁴, 10⁵ ve 10⁶'e kadar ringer içeren tüplerde seyreltilmesi **22**
- Şekil 6.** *Cyprinus carpio* 1. Balığın (C1) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinde 10³ dilüsyon ilk ekimi **23**
- Şekil 7.** *Cyprinus carpio* 1. Balığın (C1) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinde seyreltilmiş 10⁵ dilüsyon ekimi **23**
- Şekil 8.** *Cyprinus carpio* 1. Balığın (C1) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinden nutrient agara çizgi ekim ile aktarımı 10⁵ dilüsyonu **24**
- Şekil 9.** *Cyprinus carpio* 1. Balığın Tekrarı (C1₁) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinden nutrient agara kültür ekim yöntemi ile 10⁵ dilüsyonu **25**
- Şekil 10.** *Cyprinus carpio* 1. Balığın (C1) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinden nutrient agara tek petri10⁵ dilüsyon kültür ekimi **26**
- Şekil 11.** %25'lik Gliserole stoklanan izolasyonlar **27**
- Şekil 12.** Ph:2.5 ve pH:6.5 'de üreme gösteren ve göstermeyen izolat örnekler i **28**
- Şekil 13.** Yoğun üreme ve sınırlı direnç gösteren izolatların koloni üreme örnekleri **30**
- Şekil 14.** Lizozim örnek görselleri **33**
- Şekil 15.** C2-2 ve C4-2 izolatlarının vortekslendikten ve yarım saatlik inkübasyonundan sonraki görüntü örnekleri **38**
- Şekil 16.** İzolatların santrifüj sonrası mikro filtreden süzülmesi **40**
- Şekil 17.** C1 serisinin görsel örnekleri **40**

Şekil 18. İzolatların antioksidan deneyinde spektrofotometre ölçümü öncesi görüntüleri	41
Şekil 19. C3-1 ve C4-4 izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal duyarlılık testi örnekleri	44
Şekil 20. Hemolitik aktivite görselleri	46

ÖZET

Cyprinus carpio (Sazan balığı) bütün dünyada yaygınlık gösteren, besin değeri açısından tercih edilen gerek doğal gerekse kültürü yapılabilen bir balık türüdür. Bilinen bu özelliğinden dolayı büyüme kondisyonunun artırılması ve immün sistemlerinin dayanıklı hale getirilmesi oldukça önemlidir. Probiyotikler ise yeterli miktarda alındıklarında canlının sindirim ve bağışıklık sistemini destekleyen ve böylece canlının sağlıklı kalmasına olumlu katkılar sağlayan canlı mikroorganizmalardır. +Hayvanların sindirim sisteminde bulunan bazı bakteri türleri, yemden yararlanma, balık sağlığı, çevre kalitesinin iyileştirilmesi ve mikroorganizmaların iyileştirilmesinde önemli bir role sahiptir. Ayrıca bazı bakteriler ise gastrointestinal kanalda önemli rol oynar ve sindirim sisteminde birkaç farklı enzim üreterek konakçının metabolizmasına katkıda bulunabilir. Bu çalışmada, Sazan balığı (*C. carpio*)'nın sindirim sistemindeki probiyotik özellikli bakterilerin izolasyonu ve probiyotik özelliklerinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. C1-1, C1-4, C4-1, C4-3 ve C4-4 izolatlarının, probiyotik özelliklerinin belirlenmesi için yapılan testlerde etkin sonuçlar verdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Cyprinus carpio*, Bakteri, Probiyotik

The Isolation and Identification of Probiotic Bacteria From the Digestive System of *Cyprinus Carpio*

ABSTRACT

Cyprinus carpio (common carp) is a fish species that is widespread all over the world, preferred in terms of nutritional value, and can be grown both naturally and cultivated. Due to this known feature, it will be a study to isolate some bacteria in the digestive tract of this species, such as increasing the growth condition and making the immune systems resistant. Probiotics, on the other hand, are live microorganisms that, when taken in sufficient quantities, support the digestive and immune system of the living thing and thus contribute positively to the health of the organisms. Some bacterial species in the digestive system of animals have an important role in feed efficiency, fish health, improvement of environmental quality and improvement of microorganisms. In addition, some bacterial flora play an important role in the gastrointestinal tract and can contribute to the host's metabolism by producing several types of enzymes in the digestive tract. In this study, the isolation of probiotic bacteria in the digestive system of carp (*C. carpio*) and the determination of their probiotic properties were carried out. It was determined that C1-1, C1-4, C4-1, C4-3 and C4-4 isolates gave effective results in the tests performed to determine their probiotic properties.

Keywords: *Cyprinus carpio*, Bacteria, Probiotic

GİRİŞ

Cyprinus carpio (Sazan balığı) bütün dünyada kozmopolit olarak yaygınlık gösteren ve besin değeri açısından tercih edilen gerek tatlı su kaynaklarından doğal avlanma ile gerekse kültürü yapılabilen bir balık türüdür.

İnsan sağlığı için en önemli besin kaynaklarından olan balık ve su ürünlerinde günümüz yaşam koşullarından etkilenen canlılardan olmuştur. Balık sağlığını etkileyen faktörlerin başında bakteriyel hastalıklar gelmektedir (Yaman, vd., 2004). Balık yetiştiriciliğinde bakteri kaynaklı hastalıkların sebep olduğu ölüm oranları %50 civarındadır. Bakteriyel enfeksiyona bağlı balık hastalıklarından toplu balık ölümleri gerçekleşmekte ve bunun önüne geçebilmek amacıyla antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadır (Okocha vd., 2018). Buna karşın, antibiyotik kullanımı, antimikrobiyal ilaçlara karşı gelişen direnç, günümüzde giderek artan bir tehdit oluşturmakta ve bu direnç, mikroorganizmalarda farklı şekilde olabilmektedir. Bir mikroorganizma aynı antimikrobiyal ilaca birden fazla direnç mekanizması geliştirebilir. Bu yüzden son zamanlarda yeni antimikrobiyal ilaç geliştirilmesi sınırlandırılmış ve az sayıda antimikrobiyal ilacın enfeksiyon tedavisi için kullanımına izin verilmiştir (Kayış, 2019). Antibiyotik direncine, çevresel kirliliğe ve bu antibiyotiklerin çevrede birikmesi ile çeşitli tehlikelerin ortaya çıkmasına da neden olmaktadır (Alexander vd., 2010; Harikrishnan vd., 2011; Sants ve Ramos, 2018; Xiang vd., 2015).

Bundan dolayı, son yıllarda araştırmalar sucul sistemlerde büyümeyi teşvik eden ve patojenlerin kontrolünü sağlayan alternatif yollar üzerine yönelmiştir. Son yıllarda probiyotikler insanlarda ve birçok çiftlik hayvanında bağırsak mikrobiyotası ve immünolojik sistemleri düzenleme yetenekleri nedeniyle tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Günümüz yaşam koşullarında değişimler, yanlış beslenme ve bunun getirisi olarak bağırsak mikrobiyotasında patojen mikroorganizmaların büyümesi, antibiyotik kullanımı ve patojenlerin antibiyotiklere karşı bağışıklık kazanması probiyotik kullanımını öne çıkarmıştır (Borum, 2021)

Probiyotiklerin antibiyotiklere alternatif olarak kullanılması antibiyotik direncinin yayılmasının azaltılmasına yardımcı olabileceği belirtilmiştir (Tilwani vd., 2022). Probiyotikler, gereken miktarlarda kullanıldığı zaman sağlık için olumlu etkileri bulunan canlı

mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (WHO,2001). Probiyotikler aynı zamanda mikroflora dengesinin korunmasında da etkili olmaktadır. Bunun yanı sıra bazı hastalıkların sağaltımında, antibiyotiklerin etkisizleşmeye başlamasıyla patojenlerle mücadelede, antikarsinojenik, antioksidatif, antienflamatuvar, antimikrobiyal, antiobezite ve antidiyabetik olarak kullanımda etkili oldukları bildirilmektedir (Kandyliş vd., 2016). Probiyotiklerin aynı zamanda metabolizma, solunum sistemi ve beyin fonksiyonları üzerinde pozitif etkileri olduğu da bilinmektedir (Gibson vd.,2017). Ek olarak, güçlü kanıtlar, bazı probiyotik suşların enterik patojenlerle enfeksiyona karşı direnç sağlayabildiğini göstermektedir. Bu olguyu desteklemek için probiyotikler tarafından salgılanan antimikrobiyal bileşikler, rekabetçi dışlama veya bağışıklık sisteminin uyarılması dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Son araştırmalar, antimikrobiyal bileşiklerin bağırsak patojenlerine karşı koruyucu mekanizma olma rolünü giderek daha fazla göstermiştir (Argues vd. ,2015).

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak değerlendirilebilmesi için Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından; güvenilirlik, işlevsellik, teknolojik uyumluluk ve performans ve işlevsellik başlıkları altında tüm özelliklerin belirlenmesi gerektiğini belirtmektedirler. Bu özelliklerden bazıları;

- Konakçı için zararlı olmamalıdır.
- Düşük ph'a karşı dirençli olmalıdır.
- Organizmadaki olumsuz şartlarda dengeli olmalıdır.
- Bağırsakta bulunan diğer mikroorganizmaları olumsuz etkilememelidir (Salminen, 1998; Gismondo vd., 1999; Gülbandılar vd., 2017).

Bağırsak florasının bozulmasından kaynaklı durumlar immün sisteminin tam olarak gelişmemesine sebep olduğu için hastalıklara daha hassas balık popülasyonlarının oluşmasına neden olmaktadır. Metabolik, fizyolojik ve immünolojik süreçleri etkileyen, mikroorganizmalar tarafından temsil edilen bağırsak mikrobiyotasının bileşiminde uzun vadeli beslenme alışkanlıkları büyük önem taşımaktadır (Nakilcioğlu ve Nurko , 2023). Bağırsak florasının düzenlenmesinde başlıca kullanılan etmenler probiyotiklerdir. Probiyotikler yeterli miktarda uygulandıklarında konakçıya sağlık yararları sağlayan canlı mikroorganizmalardır (Borum, 2021).

Besinlerle veya ayrı olarak alınabilen probiyotikler, bağırsaklarda mikrobiyal dengeyi sağlamakta ve bağırsak mikroflorasını stabilize etmekte oldukça fayda sağlamaktadırlar. Ayrıca probiyotikler organizmada kolesterolün düşürülmesine, diyabetin önlenmesine ve immünolojik modülasyona yardımcı olabildiği belirtilmiştir (Chugh & Kamal-Eldin 2020; Varsha vd., 2021).

Balık bağırsağı, aerobik, fakültatif ve zorunlu anaerobik şekilde değişik bakteri popülasyonları barındıran karmaşık bir ekosistemdir. Hayvanların sindirim sisteminde bulunan çeşitli bakteri türleri, yemden yararlanma, balık sağlığı, çevre kalitesinin iyileştirilmesi ve mikroorganizmaların iyileştirilmesinde önemli bir role sahiptir. Balıklarda da beslenme, büyüme ve hastalıklara karşı dayanıklılığın artmasında sindirim sistemi bakteri florasının etkili olduğu anlaşılmıştır (Schrijver & Ollevier 2000).

2. YÖNTEM

2.1. *Cyprinus carpio* (Sazan balığı)'nın Temini

4 adet *C. carpio* (Sazan balığı), proje yürütücüsü Prof. Dr. Mustafa Koyun tarafından Kütahya Tavşanlı Barajından temin edilmiştir. Laboratuvara getirilen balıklar kilolarının öğrenilmesi için hassas terazi ile tartılmıştır. Daha sonra düz zemine alınarak boy (standart, çatal, total) ölçümleri yapılmıştır.

2.2. *Cyprinus carpio* (Sazan balığı)'nın Bağırsak Örneklerinin Eldesi

Taze balıkların solungaçlarından tutularak %70'lik alkol ile yüzeyleri steril edilmiştir. Prof. Dr. Mustafa Koyun tarafından balık anal boşluktan makas ile kesilerek bağırsaklar çıkarılmıştır. Çıkarılan bağırsaklar, etiketlenen beherglaslara koyulmuştur. Balıkların yaş tayini için fazla darbe almayan bir bölge olduğu için balıkların sırt bölgesinden pul örneği alınarak zarfa koyulmuştur.

2.3. *Cyprinus carpio* (Sazan balığı)'dan Probiyotik Bakteri Gruplarının İzolasyonu

Çıkarılan bağırsakların sıvılarından hassas terazi ile 0,5 gram tartılarak içerisinde parçalanmasına yardımcı olması için cam boncuk bulunan ringer sıvısına koyularak 30 dakika boyunca ritmik hareketlerle sallanmıştır. Daha sonra 60 °C 'e ayarlanmış su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Su banyosundan alınan örnekler 500µl' e 1 oranında 10⁴, 10⁵ ve 10⁶'e kadar ringer içeren tüplerde seyreltilmiştir.

Seyreltilen örnekler mikro pipet ile hazırlanan besiyerlere aktarıldıktan sonra eküvyon çubuk ile yayılma işlemi yapılmıştır. Bu ekim için nutrient agar (NA), de Man Rogosa Sharpe Agar

(MRS) ve Tryptone Yeast Extract Agar (TYG) besiyerleri hazırlanmıştır. TYG Agar besiyerlerine nalidixic acid ve cycloheximide antibiyotikleri eklenmiştir. Ekim yapılan NA ve TYG(C) ve TYG (N) besiyerleri 30 °C'ye MRS besiyeri ise 24 °C' e inkübatöre kaldırılmıştır.

2.4. İzole Edilen Bakterilerin Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.4.1. Düşük pH Toleransı

Düşük pH tolerans testi izolatların düşük pH'a karşı direnç özelliği ve mide koşullarında hayatta kalma potansiyellerini belirlemek için yapılmıştır. İzolatların aktifleşme durumları MRS Broth ve Nutrient Broth besiyerlerinde test edilmiş ve aktifleşme için Nutrient Broth besiyerinin daha uygun olduğu görülmüştür. İzolatlar Nutrient Broth besiyerine aktarılarak 37 °C' de 24 saat aktifleşmesi için çalkalamalı etüve bırakılmıştır. 24 saat sonra aktifleşen izolatların 500 U1 10⁸ CFU/mL hücre olacak şekilde, hidroklorik asit kullanılarak pH'ı 2.5 ve 6.5 'e ayarlanan MRS Broth besiyerine, her izolat 10 ml MRS Broth olan ortama aktarılmıştır. İnoküle edilen broth 37 °C 'de 24 saat çalkalayıcı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyon sonrası numuneler 2 (26.saat), 12 (36.saat) ve 24 (48.saat) saat sonra toplanarak her numuneden mikropipet ile 100 µL alınarak uygun agar besiyerini bulmak için 20 ml besiyeri içeren petrilerdeki hem MRS Agar yüzeyine hem de Nutrient Agar yüzeyine inoküle edilerek, eküvyon çubuk ile yayma işlemi yapılmıştır. İnokülasyonu yapılan petriyerler 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. MRS Agar Besiyerinde üreme görülmemiştir bu yüzden besiyeri olarak Nutrient Agar ile devam edilmiştir. İnkübasyon süresi dolan numunelerin bakteri popülasyon miktarı, koloni sayım yöntemiyle yapılmıştır. Çalışma üç tekrarlı yapılmıştır.

2.4.2. Safra Toleransı

İzolatların safra tuzu varlığında hayatta kalma yeteneklerinin belirlenmesi için yapılmıştır. Safra tuzu olarak sodyum-taurokolot ve safra tuzu karışımı (%50 kolik asit sodyum tuzu ve %50 deoksikolik asit sodyum tuzu bileşimi) kullanılmıştır. 0, %0.1 ve %0.3 (w/v) oranlarında sodyum taurokolot ve safra tuzu karışımı hazırlanmıştır. 37 °C' de 24 saat çalkalamalı etüvde inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. 10 ml'lik MRS broth besiyeriler erlenlere konularak hazırlanan %0.1 ve %0.3 (w/v) oranlarındaki safra tuzu karışımlarından 1ml alınarak eklenmiştir. Daha sonra aktifleştirilen izolatlardan 10⁸ CFU/ mL hücre ile inoküle edilerek 37 °C' ye çalkalamalı etüv cihazında inkübasyona bırakılmıştır. 6 saatlik inkübasyon sürecinin 2. ve 6. saatlerinde numunelerden 100 µL alınarak Nutrient Agar besiyerine aktarılmış, eküvyon

ubuk ile yayma işlemi yapılarak, gruplar şeklinde 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Koloni sayım yöntemi ile canlı koloni sayısı belirlenmiştir. Çalışma iki tekrarlı yapılmıştır.

2.4.3. Lizozim Toleransı

İzolatların lizozim duyarlılığını belirlemek için belirli oranlarda (0, 100, 200, 300 µg/mL) ile hazırlanmış MRS broth besiyeri kullanılmıştır. Hazırlanmış lizozim, 10 mL MRS ortamına 1 mL olacak şekilde aktarılmıştır. 37 °C’ de 24 saat çalkalamalı etüvde inkübe edilerek aktiveştirilmiş izolatlar ile 10⁸ CFU/ mL hücre şeklinde inoküle edilmiştir. 24 saat boyunca 37 °C’ de çalkalamalı etüve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücre canlılığının hesaplanması için numunelerden 100 µL alınarak Nutrient Agar besiyerine aktarılmış, eküvyon çubuk ile yayma işlemi yapılmıştır. 37 °C’ de 24 saat inkübasyondan sonra koloni sayımı yapılmıştır. Çalışma iki tekrarlı yapılmıştır.

2.4.4. Fenol Toleransı

Fenol direncinin testi için, fenol (0, %0.25 ve %0.5 w/v) içeren MRS broth besiyeri kullanılmıştır. 10 ml’lik MRS broth besiyerlerinin içerisine hazırlanmış oranlardaki fenolden 1 ml eklenmiştir. 37 °C’ de 24 saat çalkalamalı etüvde inkübe edilerek aktiveştirilmiş izolatlar ile 10⁸ CFU/ mL hücre şeklinde inoküle edilerek 24 saat çalkalamalı etüvde 37 °C inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin sonunda bakteriyel hücrelerin büyümesi, 600 nm’de ölçülmüştür. Çalışma üç tekrarlı yapılmıştır.

2.4.5. Oto-agresyon Testi

İzolatlar 37 °C’ de 24 saat çalkalamalı etüvde inkübe edilerek aktiveştirilmiştir. Her bir izolatın kültürü 15 saniye vortekslenmiştir. Vortekslenen izolatların OD’ leri fosfat tamponlu salin (PBS, pH: 7.2) ile 0.5’e ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında (25 °C) inkübe edilmiştir. 6 saat inkübe edildikten sonra üst katmandaki süspansiyon 1 (7.saat), 2 (8.saat), 4 (10.saat) ve 6. (12.saat) saatlerde alınarak, 600 nm’de ölçümleri yapılarak, kayıt edilmiştir. Çalışma iki tekrarlı yapılmıştır.

Oto-agresyon yüzdesi, formül $1 - (A_{dt}/A_0) \times 100$ kullanılarak hesaplanmıştır. Burada; A_{dt} , tanımlanmış zaman aralıklarındaki (1,2,4 ve 6 saat) absorbansı ve A_0 ise 0 saat zamanındaki okumaya karşılık gelmektedir.

2.4.6. Hücre Yüzeyi Hidrofobikliği

Bu test ile bir izolatın hidrokarbonlara bağlanma kabiliyeti ölçülmüştür. 37 °C' de 24 saat çalkalamalı etüvde inkübe edilerek aktiveleştirilen izolatlar, PBS (pH: 7.2) kullanılarak 600 nm'de OD' si 0.5 'e ayarlanmıştır. 1.5 ml hücre süspansiyonuna eşit miktarda toluen ve hekzadekan ayrı ayrı ilave edilerek vortekslenmiştir. Süspansiyon 25 °C' de 30 dakika inkübe edilmiştir. 30 dakika sonunda sulu faz toplanmıştır ve 600 nm'de ölçümleri yapılmıştır. Çalışmalar üç tekrarlı yapılmıştır.

Hidrofobiklik yüzdesi, hidrofobiklik (%) = $[A_0 - A/A_0] \times 100$ olarak hesaplanmıştır. Burada A_0 ve A , sırasıyla karıştırmadan önce ve sonra sulu fazın OD' si olarak belirlenmiştir.

2.4.7. Antimikrobiyal Etkinlik

Antimikrobiyal etkinlik, kuyu difüzyon deneyi kullanılarak belirlenecektir. *Escherichia coli* ATCC 11229, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Bacillus subtilis* RSKK 244, *Micrococcus luteus* NRRL B-4375, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 patojen bakterileri kullanılmıştır. Patojen bakteriler, nutrient brotha aktarıldı, *Micrococcus luteus* NRRL B-4375, patojeni 30 °C' ye diğer patojen bakterileri ise 37 °C' ye 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aktifleşen patojenlerin OD'leri 0.5' e ayarlanmıştır. Aynı şekilde test izolatları da brotha aktarılarak 24 saat boyunca 37 °C'ye etüv cihazına bırakılmıştır. Aktifleşen izolatların OD'leri 0.1'e ayarlanmıştır.

Patojenik test mikroorganizmalarından 100 µL alınmıştır ve Nutrient agar ortamlarına inoküle edilerek steril eküvyon ile yayma işlemi yapılmıştır. Kuyucuklar metalik silindirik bir jel delici kullanılarak (çapı 5-7 mm) katı agar üzerinde üç kopya halinde açılmıştır. İzolatların steril hücre içermeyen süpernatantı 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek, 0,2 um mikro filtrelerle süzölmüştür. İzolatlar kuyucuklara yerleştirilmiştir ve plakalar 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, kuyucukların etrafındaki inhibisyon bölgesi değerleri kumpas ile ölçülmüştür. Çalışma üç tekrarlı yapılmıştır.

2.4.8. Antioksidan Aktivite

10⁹ CFU/mL hücre içeren 0,5 mL izolatın hücresi, PBS (pH; 7,0) içinde süspansiyon edilmiştir. 0,1 mM DPPH'nin 2 mL taze yapılmış metanolik çözeltisi ilave edilmiştir ve 30 dakika karanlıkta bırakılmıştır. Çözelti inkübasyondan sonra santrifüjlenmiştir ve absorbans 517 nm'de ölçüm yapılarak değerleri kaydedilmiştir. Çalışma iki tekrarlı yapılmıştır.

DPPH aktivitesi (%) = [(1 -AS/AC) x 100] formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Burada AC ve AS, sırasıyla kontrol ve numunenin absorbansıdır. Deneyde kontrol olarak deiyonize su kullanılmıştır.

2.5. Güvenlik Değerlendirme Testleri (Safety Evaluation)

2.5.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Gece boyunca inkübe edilen bakteri solüsyonları 10⁶ CFU/mL'ye seyreltilmiştir ve 100 µL alınarak Nutrient agar plakasının yüzeyine yayılmıştır. Antibiyotik diskler plak üzerine uygun şekilde yerleştirilmiştir ve 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Plakalar inkübasyondan sonra, izolatların antibiyotiğe duyarlılığını gösteren bir inhibisyon bölgesinin görünümü açısından incelenmiştir ve inhibisyon bölgesinin çapı kumpas ile ölçülmüştür.

2.5.2. Hemolitik Aktivite

İzolatlar, RBC hücreleri üzerinde hemoliz testine tabi tutulmuştur. İzolatlar, %5 (a/h) koyun kanı içeren defibrine edilmiş kanlı agar plakasına sürme yöntemiyle ekim yapılmıştır. Plakalar, 37 °C'de 72 saatlik inkübasyonun ardından kolonileri çevreleyen belirgin bir hidroliz bölgesinin gelişimi açısından incelenmiştir. Kolonileri çevreleyen net bölgeler β-hemolitik aktiviteyi, yeşil renkli bölgeler α-hemolizi ve kolonilerin çevresinde hiçbir oluşum yoksa γ-hemoliz aktiviteyi gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır. Çalışma iki tekrarlı yapılmıştır.

Besiyerleri

Nutrient Agar

Nutrient Agar	23,04 gram
Distile Saf Su	1000 ml

Ortamın Hazırlanışı: 1000 ml saf su içine x gram nutrient agar hassas terazide tartılarak eklenir ve berraklaşınca kadar manyetik karıştırıcı üzerine bırakılır. Daha sonra 1 Atm 121 °C’de 15-20 dakika otoklavlanır. Otoklavdan çıkan besiyeri 55-60 °C’ ye kadar su banyosunda soğutularak petrilere dökülür.

MRS Agar

MRS Agar	66,7 gram
Distile Saf Su	1000 ml

Ortamın Hazırlanışı: 1000 ml saf su içine x gram MRS Agar hassas terazide tartılarak eklenir ve berraklaşınca kadar manyetik karıştırıcı üzerine bırakılır. Daha sonra 1 Atm 121 °C’de 15-20 dakika otoklavlanır. Otoklavdan çıkan besiyeri 55-60 °C’ ye kadar su banyosunda soğutularak petrilere dökülür.

TYG Agar

Tryptone	3 gram
Glukoz	5 gram
Yeast Extract	5 gram
Agar	15 gram
Distile Saf Su	1000 ml

Ortamın Hazırlanışı: 1000 ml saf su içine gerekli olan kimyasallar hassas terazide tartılarak eklenir ve berraklaşınca kadar manyetik karıştırıcı üzerine bırakılır. Daha sonra 1 Atm 121 °C’de 15-20 dakika otoklavlanır. Otoklavdan çıkan besiyeri 55-60 °C’ ye kadar su banyosunda soğutulur, besiyerinin yarısına -20 °C’den önceden çıkarılıp buz aküsünde bekletilen nalidixic acid, diğer yarısına ise cycloheximide antibiyotikleri eklenir. Petrilere dökülür.

30.07.2023 tarihinde inkübasyona bırakılan örnekler çok yoğun ürediği için 01.08.2023 tarihinde tekrar seyreltilerek ekilmiş ve inkübatöre bırakılmıştır.

5.gün örnekler çıkarılarak üremelere bakıldı. Nutrient ve TYG (C/N) besiyerlerindeki üremelerde morfolojik olarak farklı olduğu gözükten 4 koloni seçilerek, 4'e böldüğümüz nutrient agar besiyerine steril tahta çubuklar kullanılarak çizgi ekim yöntemi ile aktarılmış ve 30 °C de inkübatöre bırakılmıştır.

Tek çizgi ekimlerinde üreyen bakterilerin saf olup olmadığından emin olmak için nutrient agar besiyerleri ikiye bölünerek tek düşen, morfolojik olarak farklı gözükten, seçilen koloniler ile steril tahta çubuklar kullanılarak kültür ekimi yapılmıştır.

Yapılan kültür ekiminden tek düşen koloni steril tahta çubuk ile alınarak nutrient agara bütün petri şeklinde kültür ekimi yapılmıştır.

İzolasyonu yapılan bakteriler %25'lik gliserole aktararak -20°C' ye stoklanmak için kaldırılmıştır.

%25'lik Gliserol

Gliserol	25 ml
Distile Saf Su	75 ml

Ortamın Hazırlanışı: 75 ml'lik saf suya mezür ile ölçülerek 25 ml'lik gliserol koyulur. Mikropipet ile 1 ml alınarak cryo tüplere koyularak otoklavlanır.

Safra Tuzu Karışımı

%3'lük

Sodyum Taurokolat	2 gram
Safra Tuzu	1 gram
Distile Saf Su	100 ml

%1'lik

Sodyum Taurokolat	0.5 gram
Safra Tuzu	0.5 gram
DDH ₂ O	100 ml

Ortamın Hazırlanışı: Sodyum taurokolat ve safra tuzu gerekli ölçülerde hassas terazi ile tartılarak, DDH₂O'ya aktarıldı. Manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırıldı.

Lizozim (50 mg/ml)

Lizozim (Sigma)	500 mg
TE tamponu (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8)	10 ml

Ortamın Hazırlanışı: 500 mg lizozim 10 ml TE tampon içerisinde çözülerek hazırlandı.

Fenol (%0.25)

Fenol	0.625 ml
DDH ₂ O	250 ml

Fenol (%0.50)

Fenol	1.250 ml
DDH ₂ O	250 ml

Ortamın Hazırlanışı: +4 °C 'de kristal formda bulunan fenol oda sıcaklığında (25 °C) sıvı forma getirilerek 250 ml DDH₂O içerisine aktarılır.

DPPH (0.1 mM)

DPPH	1,9716 mg
Metanol	50 ml

Ortamın Hazırlanışı: Gerekli ölçekteki DPPH, hassas terazi ile ölçülerek çözücü olarak kullanılan metanole aktarıldı. Çözünene kadar karıştırıldı.

TE Tamponu

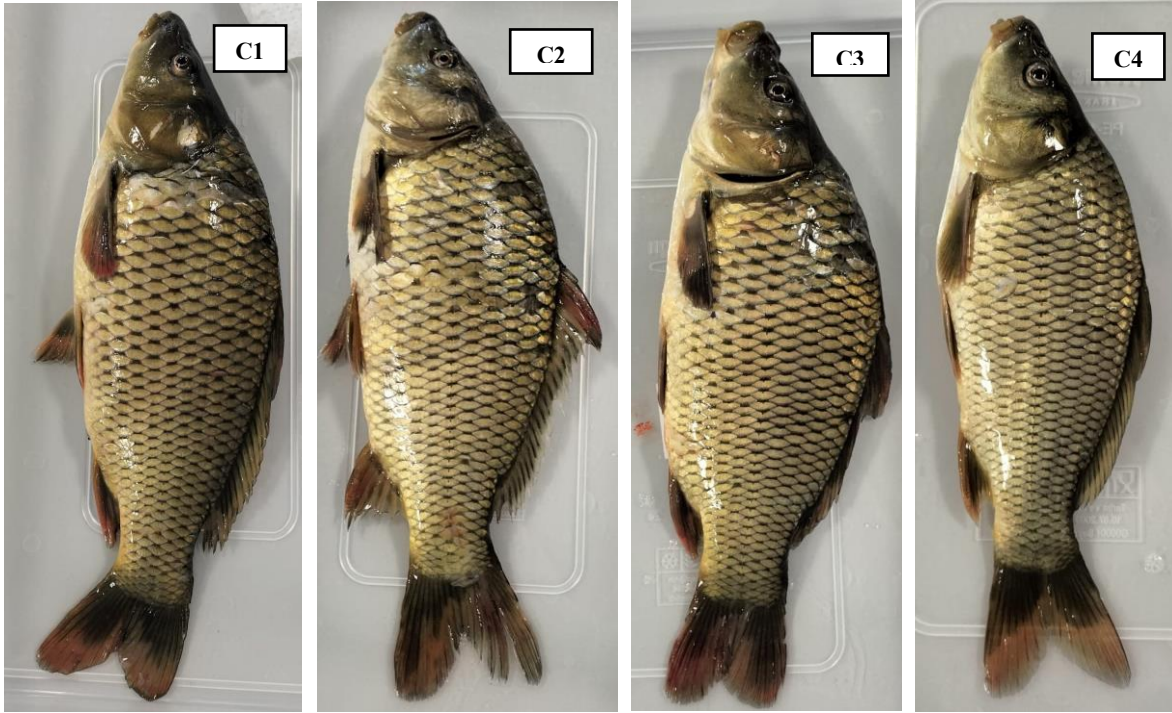
0,5M EDTA, pH 8 (Merck)	2 ml
1M Tris, pH 8	10 ml
DDH ₂ O	1000 ml

Ortamın Hazırlanışı: Tampon 1000 ml'ye tamamlanmadan önce pH kontrolü yapıldı. 100 ml'lik ağzı kapaklı cam şişelere bölünerek 121°C'de 15 dk otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

3. BULGULAR

3.1. *Cyprinus carpio* (Sazan balığı)'nın Temini

4 adet *Cyprinus carpio* (Sazan Balığı), proje yürütücüsü Prof. Dr. Mustafa Koyun tarafından Van Karasu deresinden temin edilmiştir. Laboratuvara getirilen balıkların kiloları ve boy ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 1. *C. carpio* 1 (C1), *C. carpio* 2 (C2), *C. carpio* 3 (C3) ve *C. carpio* 4 (C4) fotoğrafları

Tablo 1. *C. carpio* (Sazan Balığı) bilgileri

Balık	Cinsiyet	Ağırlık (g)	Boy Ölçümleri (cm)		
			Standart Boy	Çatal Boy	Total Boy
C1	Erkek	528	27,0	29,0	31,1
C2	Erkek	452	25,1	27,8	30,2
C3	Erkek	440	24,1	26,7	29,0
C4	Juvenil Boy	164	18,1	20,3	22,5

3.2. *Cyprinus carpio* (Sazan balığı)'nın Bağırsak Örneklerinin Eldesi

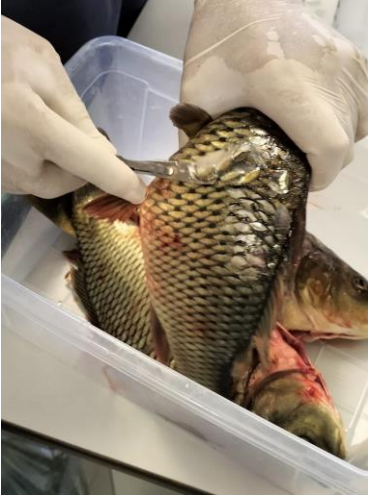
Taze balıkların solungaçlarından tutularak %70'lik alkol ile yüzeyleri steril edilmiştir. Prof. Dr. Mustafa Koyun tarafından balık anal boşluktan makas ile kesilerek bağırsaklar çıkarılarak, beherglaslara koyulmuştur. Yaş tayini için sırt bölgesinden pul örneği alınmıştır.



Şekil 2. Solungaçlarından tutularak %70' lik etil alkol ile yüzeyi steril edilen *Cyprinus carpio*



Şekil 3. Anal boşluktan girilerek bağırsakların çıkarılması



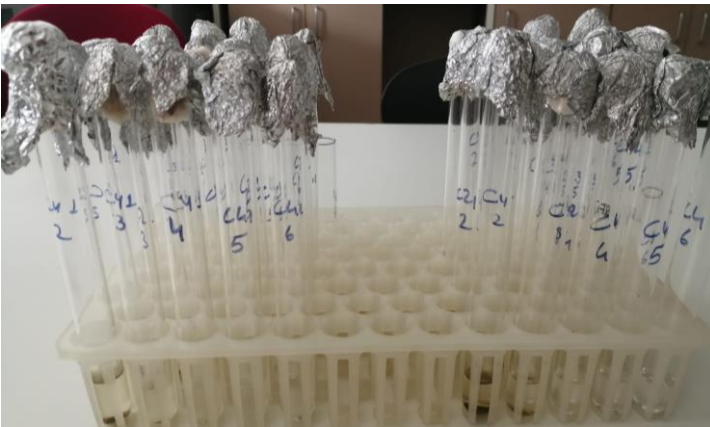
Şekil 4. Yaş tayini için sırt bölgesinden pul alınması

3.3. *Cyprinus carpio* (Sazan balığı)'dan Probiyotik Bakteri Gruplarının İzolasyonu

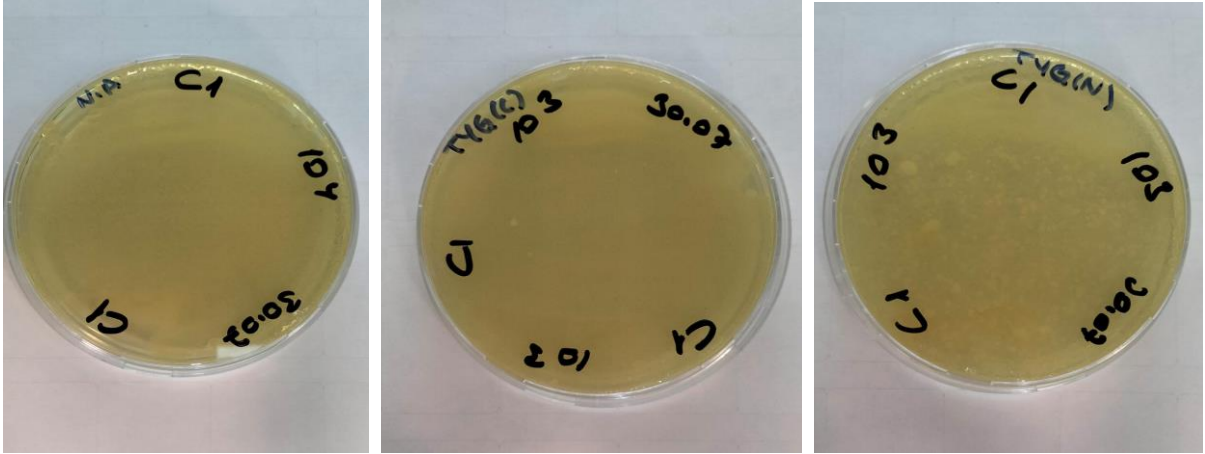
Çıkarılan bağırsakların sıvılarından hassas terazi ile 0,5 gram tartılıp ringer sıvısına koyularak 30 dakika boyunca ritmik hareketlerle sallanmıştır. Daha sonra 60 °C 'e ayarlanmış su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Su banyosundan alınan örnekler 500µl' e 1 oranında 10⁴, 10⁵ ve 10⁶'e kadar ringer içeren tüplerde seyreltilmiştir.

Seyreltilen örnekler mikro pipet ile hazırlanan besiyerlere aktarıldıktan sonra eküvyon çubuk ile yayılma işlemi yapılmıştır. Ekim yapılan nutrient agar ve TYG(C) ve TYG (N) besiyerleri 30 °C'ye MRS besiyeri ise 24 °C' e inkübatöre kaldırılmıştır.

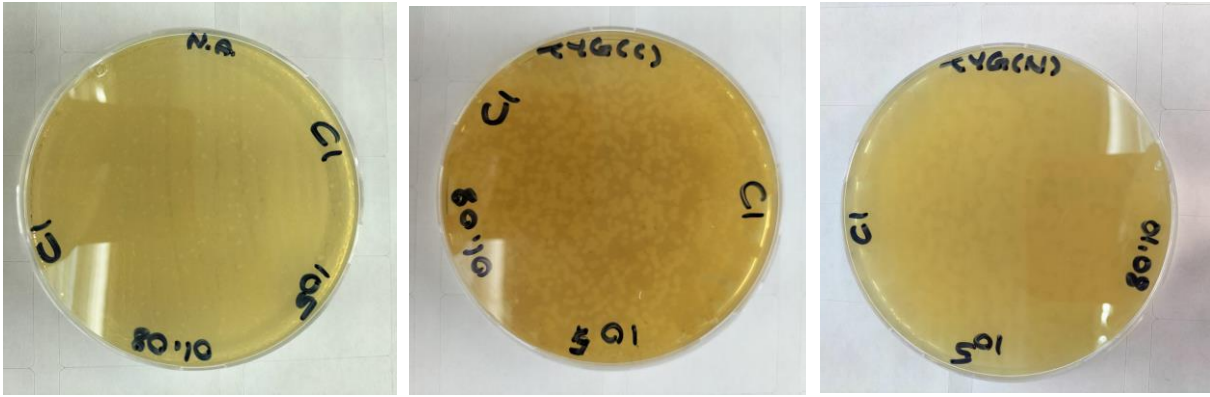
30.07.2023 tarihinde inkübasyona bırakılan örnekler çok yoğun ürediği için 01.08.2023 tarihinde tekrar seyreltilerek ekilmiş ve inkübatöre bırakılmıştır.



Şekil 5. Örneklerin 500µl' e 1 oranında 10⁴, 10⁵ ve 10⁶'e kadar ringer içeren tüplerde seyreltilmesi

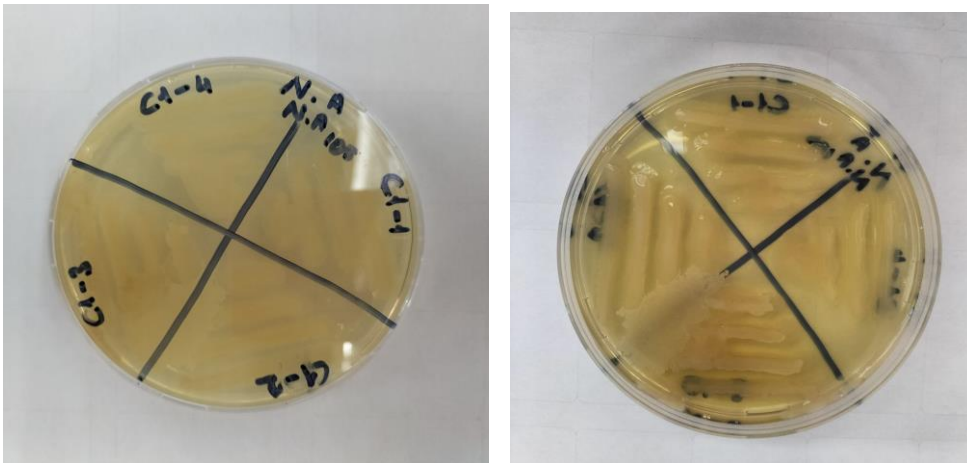


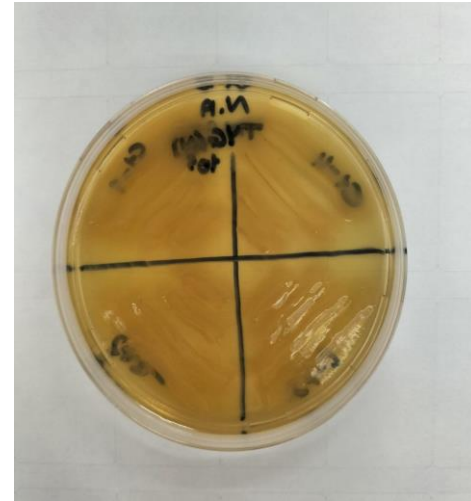
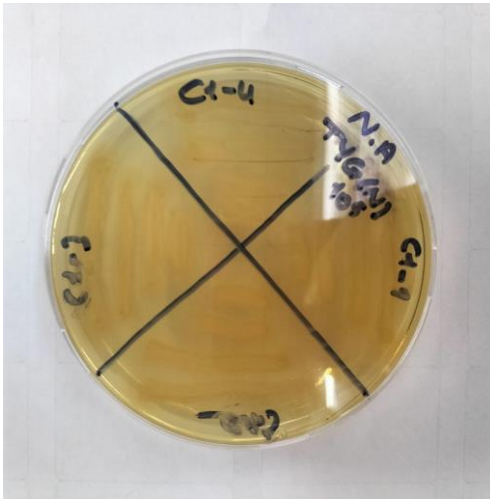
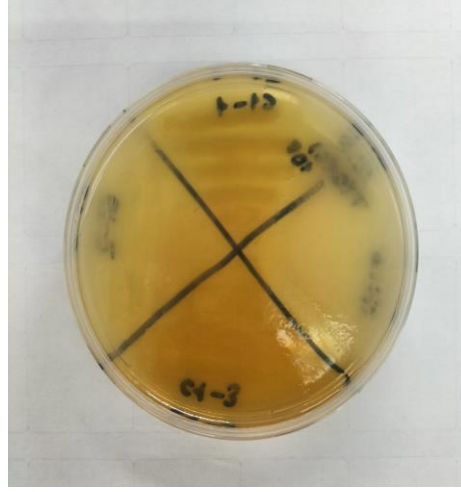
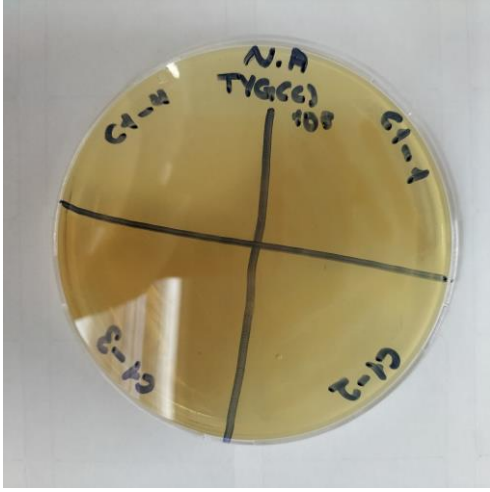
Şekil 6. *C. carpio* 1. Balığın (C1) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinde 10^3 dilüsyon ilk ekimi



Şekil 7. *C. carpio* 1. Balığın (C1) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinde seyreltilmiş 10^5 dilüsyon ekimi

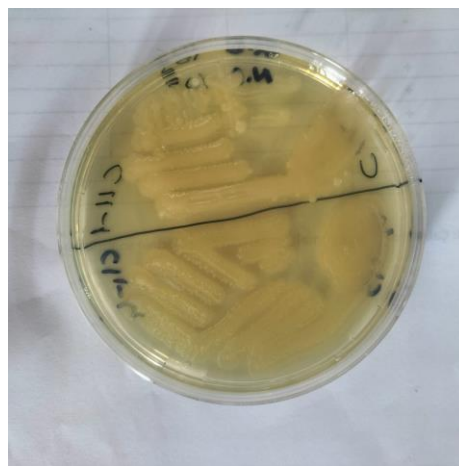
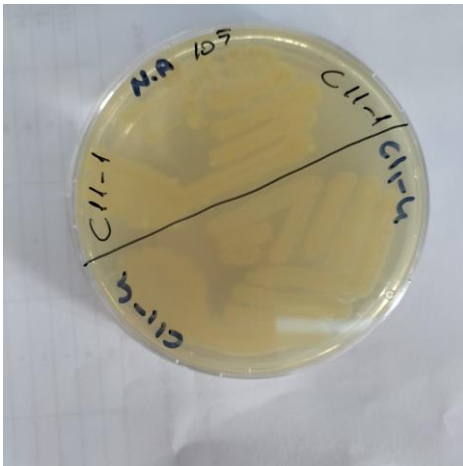
5.gün örnekler çıkarılarak üremelere bakıldı. Morfolojik olarak farklı olduğu gözükten 4 koloni seçilerek, 4'e böldüğümüz nutrient agar besiyerine steril tahta çubuklar kullanılarak çizgi ekim yöntemi ile aktarılmış ve 30 °C de inkübatöre bırakılmıştır.

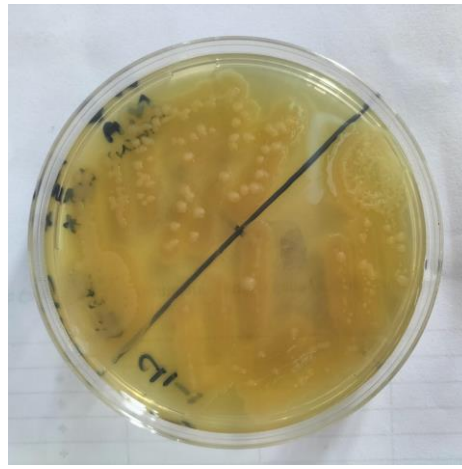
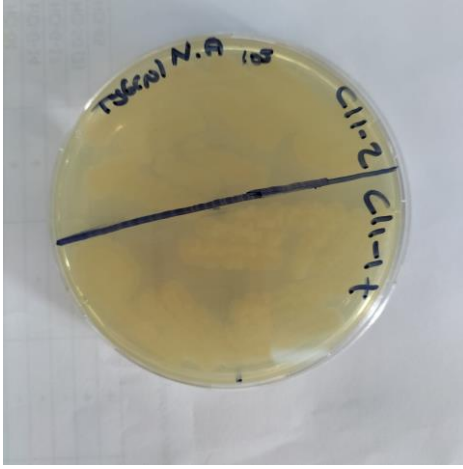
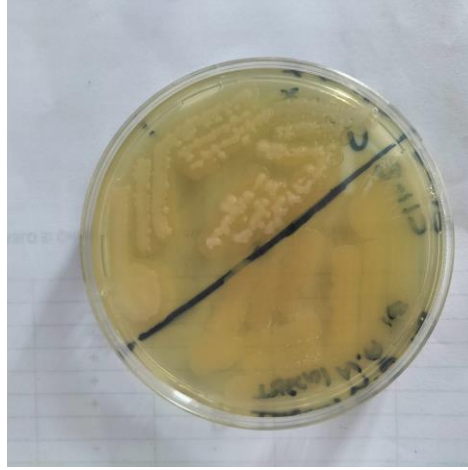
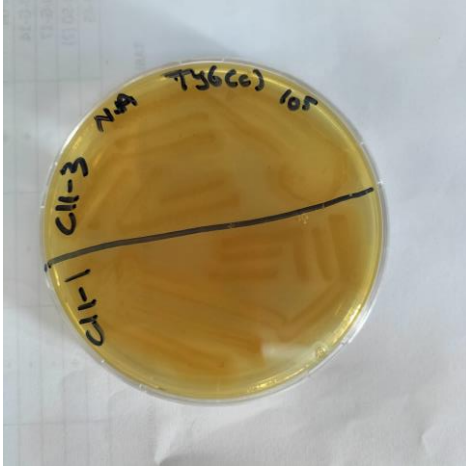




Şekil 8. *C. carpio* 1. Balığın (C1) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinden nutrient agara çizgi ekim ile aktarımı 10^5 dilüsyonu

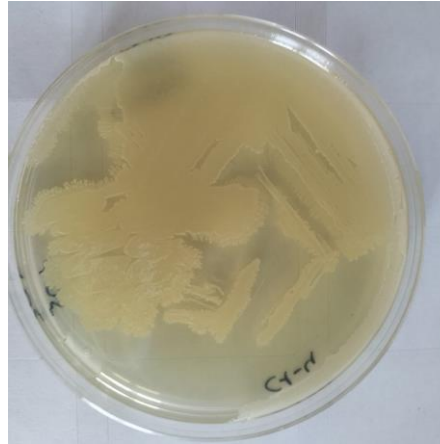
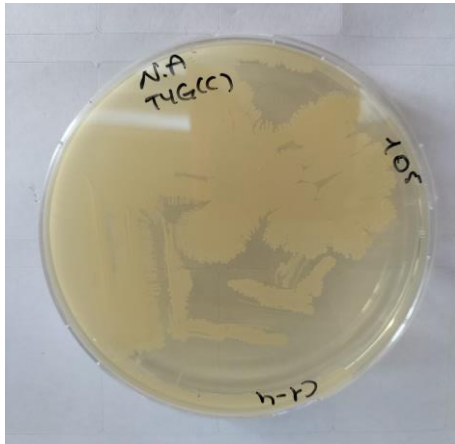
Tek çizgi ekimlerinde üreyen bakterilerin saf olup olmadığından emin olmak için nutrient agar besiyerleri ikiye bölünerek tek düşen, morfolojik olarak farklı gözükten, seçilen koloniler ile steril tahta çubuklar kullanılarak tek koloni kültür ekimi yapılmıştır.

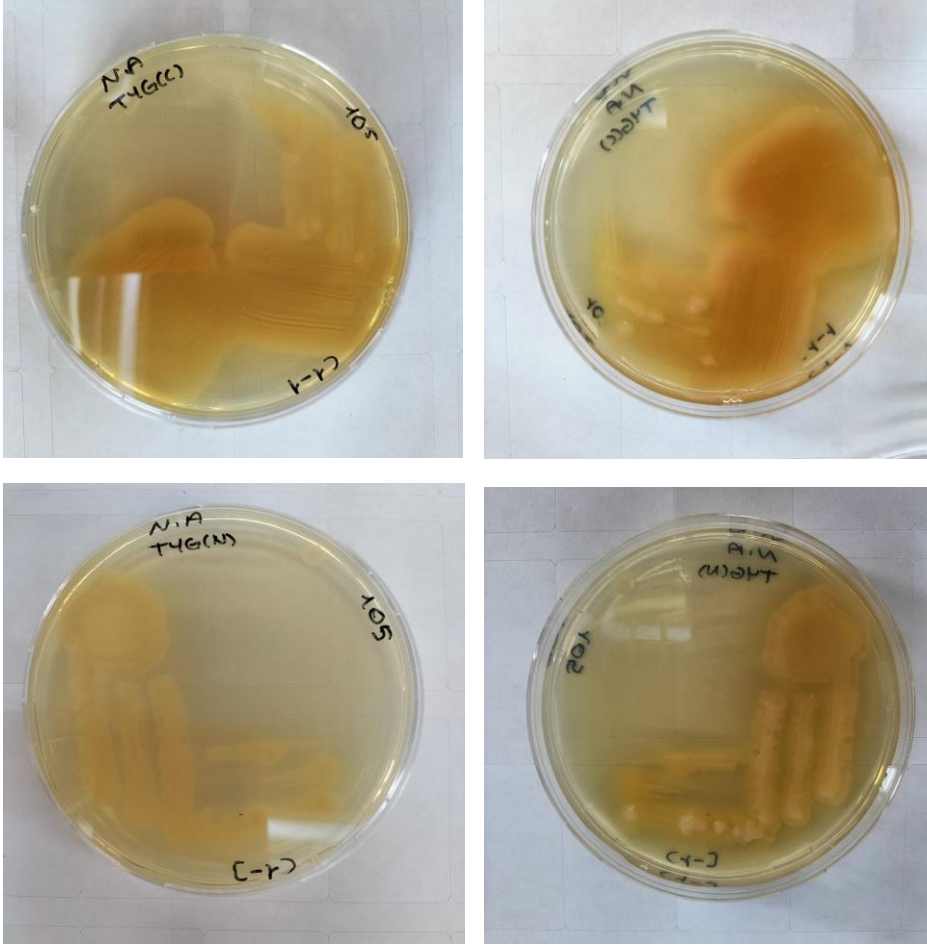




Şekil 9. *C. carpio* 1. Balığın tekrar (C1₁) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinden nutrient agara tek koloni kültür ekimi

Yapılan kültür ekiminden tek düşen koloni steril tahta çubuk ile alınarak nutrient agara yoğun ekim kültür ekimi yapılmıştır.





Şekil 10. *C. carpio* 1. Balığın (C1) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinden nutrient agara yoğun ekimi

İzolasyonu yapılan bakteriler %25'lik Gliserole aktarılarak -20°C 'ye stoklanmak için kaldırılmıştır.



Şekil 11. %25'lik gliserole stoklanan izolatlar

3.3. İzole Edilen Bakterilerin Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

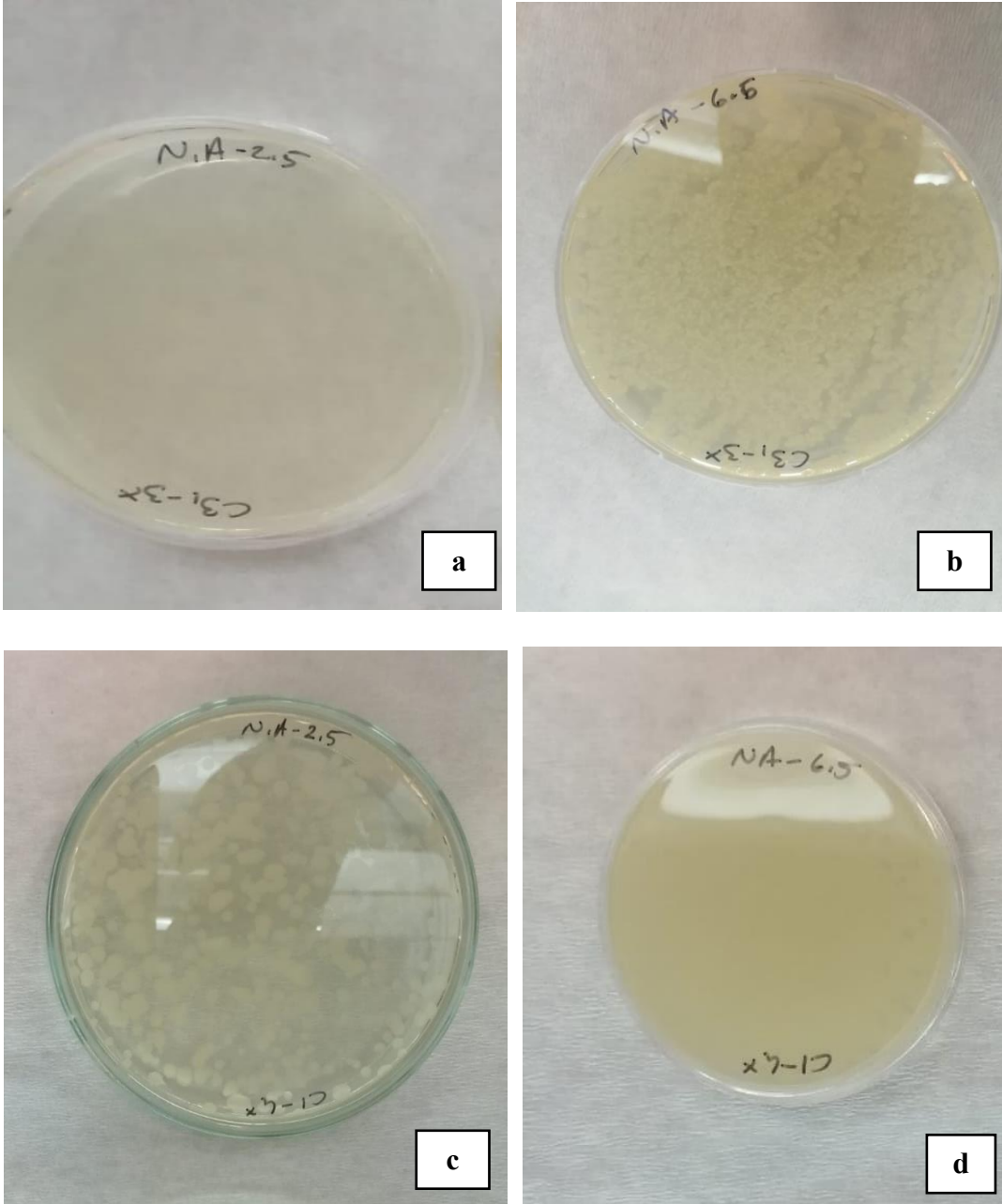
3.3.1. Düşük pH Toleransı

pH dereceleri 2.5 ve 6.5'a ayarlanan brothlara aktifleştirilen izolatlar aktarılmıştır ve 24 saatlik inkübasyon sonunda nutrient agar besiyerine inoküle edilerek 24 saat tekrar inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrası 2, 12 ve 24.saatlerde koloni sayımları yapılmıştır. Koloni sayım sonuçları Tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 2: Düşük pH toleransında canlı koloni sayımları

	Düşük pH Toleransı					
	pH: 2.5			pH:6.5		
	2 Saat	12 Saat	24 Saat	2 Saat	12 Saat	24 Saat
C1-1	83	54	22	-	-	-
C1-2	-	-	-	-	-	-
C1-3	-	-	-	-	-	-
C1-4	Yoğun Ü.	Yoğun Ü.	Yoğun Ü.	Yoğun Ü.	Yoğun Ü.	Yoğun Ü.
C2-1	-	-	-	-	-	-
C2-2	-	-	-	-	-	-
C2-3	17	-	-	789	482	38
C2-4	-	-	-	-	-	-
C3-1	-	-	-	-	-	-
C3-2	-	-	-	-	-	-
C3-3	-	-	-	Yoğun Ü.	Yoğun Ü.	Yoğun Ü.
C3-4	-	-	-	668	11	-
C4-1	-	-	-	-	-	-
C4-2	-	-	-	140	57	-
C4-3	-	-	-	23	11	-
C4-4	-	31	40	71	108	345

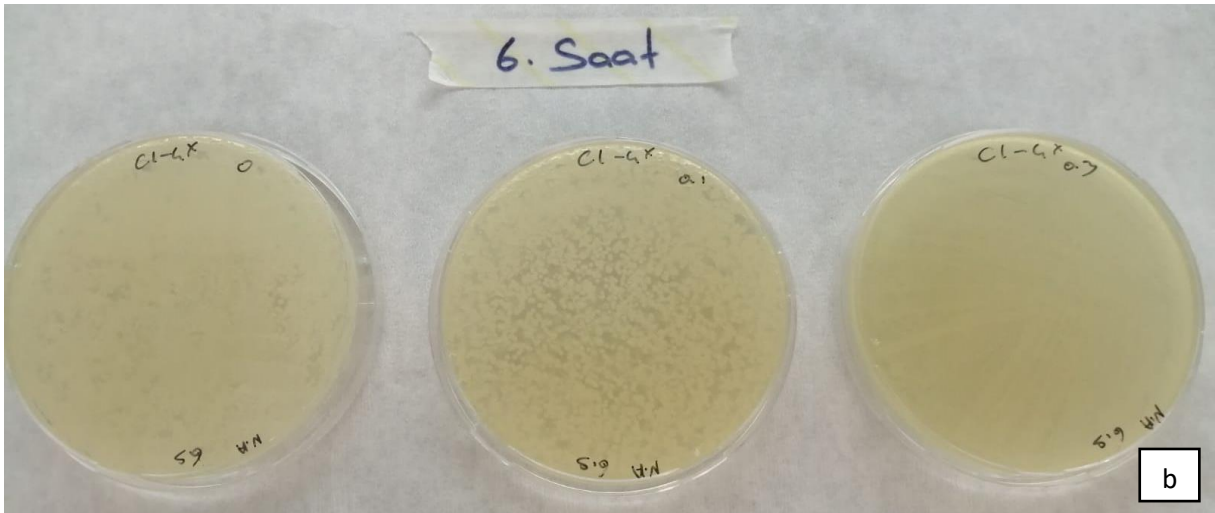
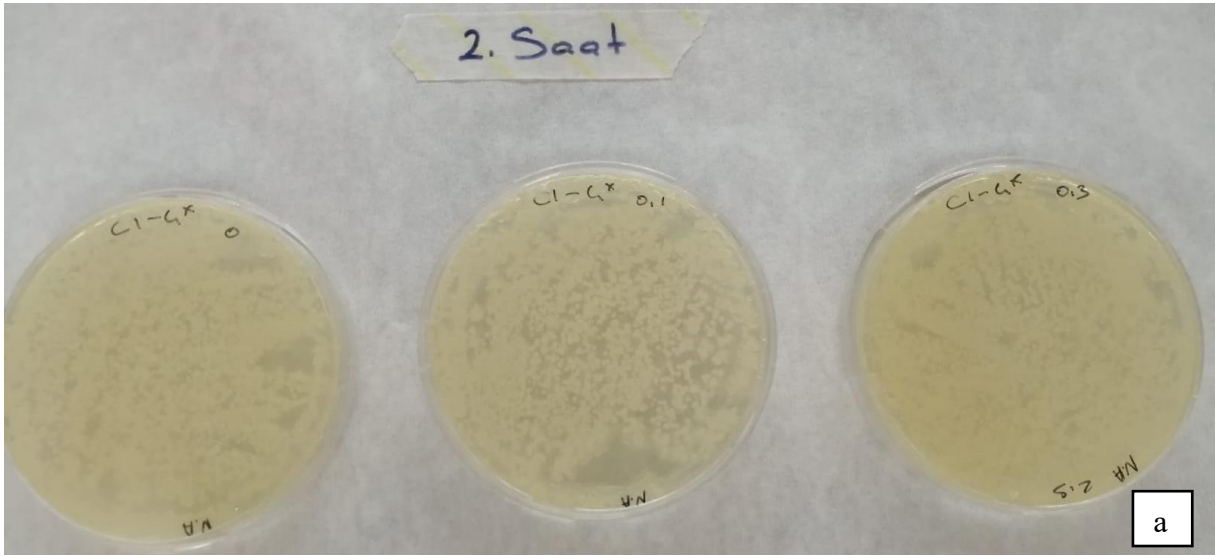
Tablo 2'de de görüldüğü üzere pH 2.5 da üreme genellikle görülmezken, C1-4'te sayılamayacak yoğunlukta üreme görülmüştür. C1-1' de ısının ve zamanın da etkisiyle koloni sayıları azalırken, C4-4'te ise ısı ve zaman olumlu yönde etkileyerek gittikçe koloni sayılarında artış gözlemlenmiştir. pH 6.5'te koloni yoğunluğu daha fazladır, fakat C1-12 de daha düşük toleransta üreme gösterirken 6.5'te üreme göstermemiştir. C3-3 izolatının pH 2.5'in de üreme görülmemişken 6.5'te yoğun üreme görülmüştür. Hem pH 2.5'te hem de pH 6.5'te en yoğun üreme C4-4 izolatında görülmüştür.

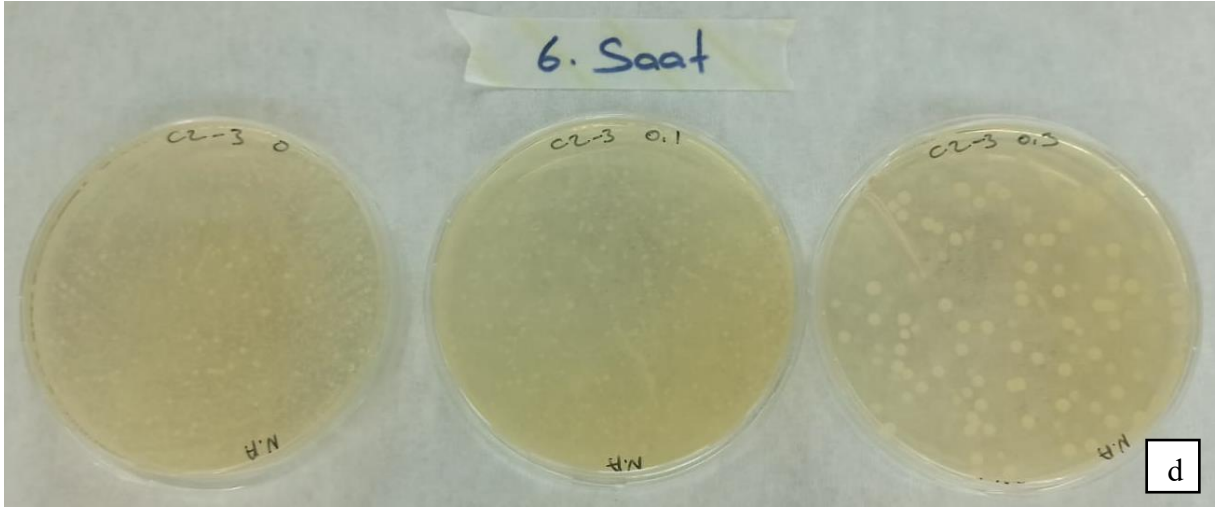
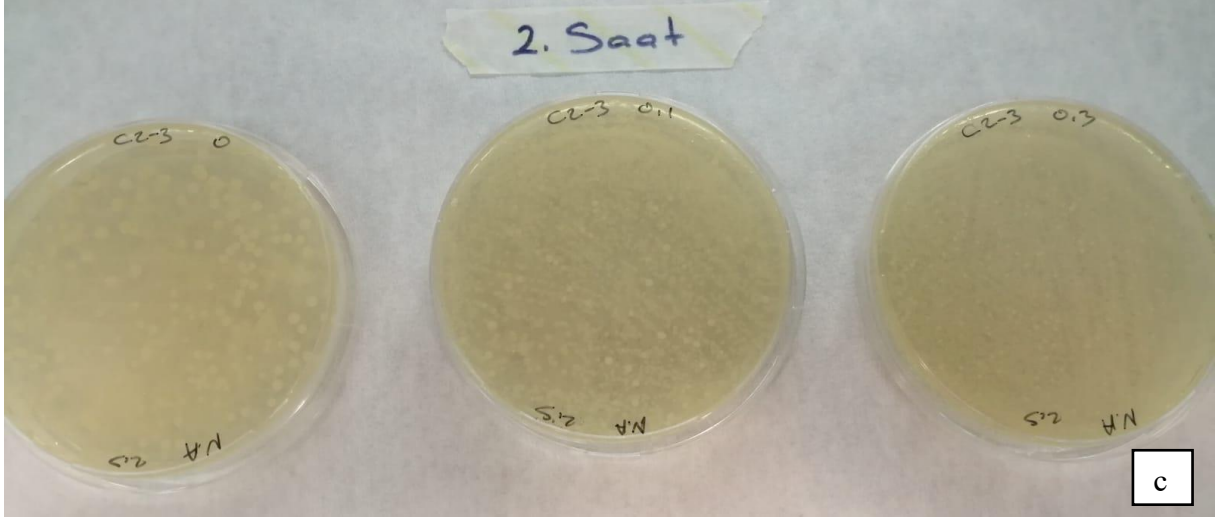


Şekil 12. Ph:2.5 ve pH:6.5' de üreme gösteren ve göstermeyen izolat örnekleri

- C3-1 izolat örneği pH:2.5 'lik ortamda üreme göstermemiştir
- C3-1 izolat örneği pH:6.5'lik ortamda üreme göstermiştir
- C1-4 izolat örneği pH:2.5' da üreme göstermiştir
- C1-4 izolat örneği pH:6.5' da yoğun üreme göstermiştir

Yoğun üreme gösteren izolatlar, safra tuzlarına karşı oldukça dirençli olduğunu ve bu koşullar altında etkili bir şekilde çoğalabildiklerini göstermektedir. C1 ve C3 izolatlarının bütün serileri tüm koşullarda ve saatlerde yoğun üreme göstererek safra tuzuna karşı oldukça dirençli olduğunu ve büyümelerinin bu koşullardan etkilenmediğini gösterir. C2-3'ün 2. saat 0 safra tuzu konsantrasyonundaki büyüme oranı 295, ancak 6. saat 0.3 safra tuzu konsantrasyonunda bu oran 103'e düşmüştür. Bu, C2-3'ün safra tuzuna karşı direncinin sınırlı olduğunu göstermektedir.





Şekil 13. Yoğun üreme ve sınırlı direnç gösteren izolatların koloni üreme örnekleri

- C1-4 izolat örneğinin, safra tuzu sırası ile 0, 0.1 ve 0.3 oranındaki ortamlarda inoküle edildikten 2 saat sonraki üreme görüntüleri, yoğun üreme görülmüştür
- C1-4 izolat örneğinin, safra tuzu sırası ile 0, 0.1 ve 0.3 oranındaki ortamlarda inoküle edildikten 6 saat sonra ki üreme görüntüleri, yoğun üreme görülmüştür
- C2-3 izolat örneğinin, safra tuzu sırası ile 0, 0.1 ve 0.3 oranındaki ortamlarda inoküle edildikten 2 saat sonraki üreme görüntüleri, safra tuzu oranı arttıkça canlı koloni sayısı azalmıştır
- C2-3 izolat örneğinin, safra tuzu sırası ile 0, 0.1 ve 0.3 oranındaki ortamlarda inoküle edildikten 6 saat sonraki üreme görüntüleri, inkübasyon süresi arttıkça canlı koloni sayısı azalmıştır

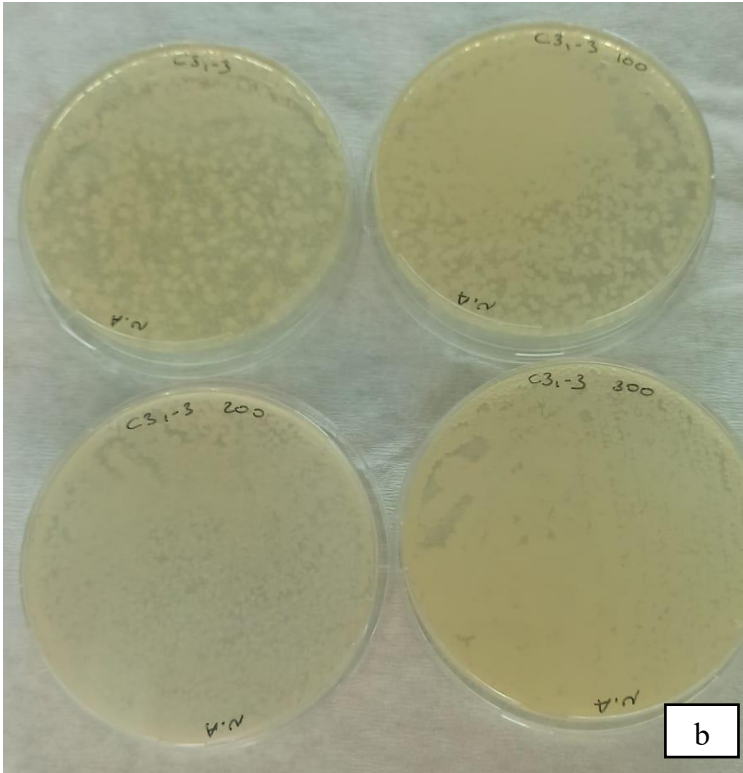
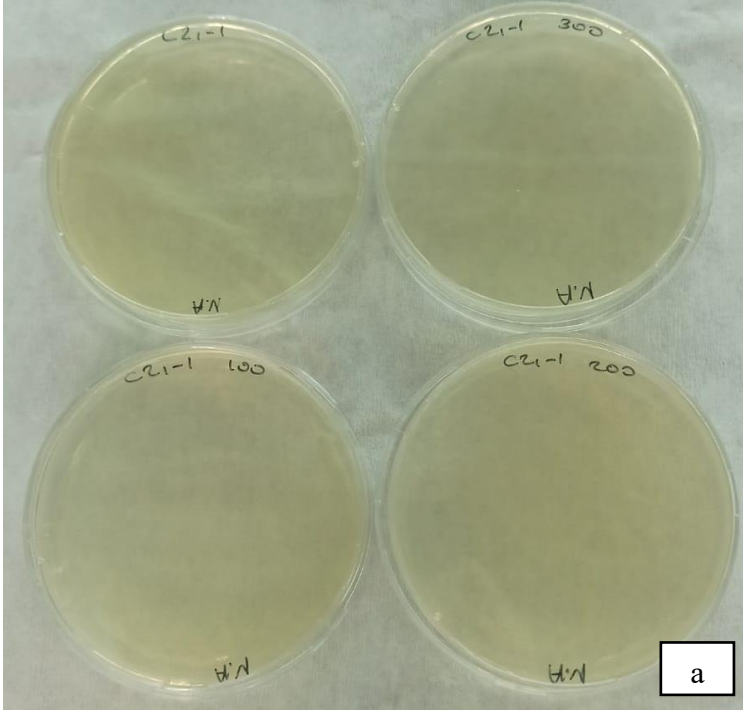
3.3.3. Lizozim Toleransı

Aktifleştirilen izolatlar, kontrol için stres ortamı oluşturulmayan MRS brotha ve 100, 200, 300 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan lizozim ortamına aktarılarak 24 saat inkübasyon sonrası nutrient agara inoküle edilmiş ve 24 saatlik inkübasyon sonrası koloni sayımları yapılmıştır (Tablo 4). Lizozim, bakteri hücre duvarlarını parçalayarak antibakteriyel etki gösteren bir enzimdir.

Tablo 4. Lizozim toleransı koloni sayımı

	Lizozim Toleransı			
	0	100	200	300
C1-1	276	-	-	-
C1-2	-	-	-	-
C1-3	-	-	-	-
C1-4	-	-	-	-
C2-1	-	-	-	-
C2-2	-	-	-	-
C2-3	-	-	-	-
C2-4	108	19	12	3
C3-1	-	-	-	-
C3-2	-	-	-	-
C3-3	312	Yoğun Üreme	Yoğun Üreme	Yoğun Üreme
C3-4	Yoğun Üreme	Yoğun Üreme	Yoğun Üreme	Yoğun Üreme
C4-1	533	Yoğun Üreme	Yoğun Üreme	Yoğun Üreme
C4-2	-	-	-	-
C4-3	Yoğun Üreme	Yoğun Üreme	Yoğun Üreme	Yoğun Üreme
C4-4	-	-	-	-

C1-1, 0 lizozim konsantrasyonunda büyüme oranı 276 olarak belirlenmiş, ancak lizozim konsantrasyonu arttığında büyüme gözlemlenmemiştir. Bu, C1-1 suşunun lizozime karşı duyarlı olduğunu göstermiştir. C1-1 dışındaki C1 serileri hiçbir konsantrasyonda üreme göstermemiştir. C2-4, 0 lizozim konsantrasyonunda büyüme oranı 108 iken, lizozim konsantrasyonu arttıkça büyüme oranı azalmış ve 300 konsantrasyonunda 3 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, C2-4 suşunun lizozime karşı orta düzeyde dirençli olduğunu göstermektedir. C2 serisinin diğer örnekleri üreme göstermemiştir. C3-3 ve C3-4 izolatlarında lizozim konsantrasyonu arttığında üreme yoğunluğunun arttığı görülmüştür, bu izolatlar lizozime karşı tolerans gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. Lizozim toleransı örnek görseller

- C2-1 izolat, sırasıyla 0, 100, 200, 300 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonundaki lizozim örneklerinde üreme görülmemiştir
- C3-3 izolat, sırasıyla 0, 100, 200, 300 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonundaki lizozim örneklerinde yoğun üreme görülmüştür

3.3.4. Fenol Toleransı

Aktifleştirilen izolatlar, kontrol için MRS brotha ve konsantrasyon oranı %0.25 ve %0.50 ayarlanmış fenol karıştırılmış MRS brotha aktarılarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda bakteriyel hücrelerin büyümesi, 600 nm’de ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları Tablo 5’ de verilmiştir.

Tablo 5. Fenol toleransı spektrofotometre sonuçları

	FENOL TOLERANSI		
	0	%0.25	%0.50
C1-1	0,265	0,294	0,342
C1-2	0,156	0,146	0,155
C1-3	0,054	0,044	0,041
C1-4	0,366	0,375	0,387
C2-1	0,103	0,107	0,129
C2-2	0,267	0,287	0,320
C2-3	0,303	0,335	0,370
C2-4	0,058	0,052	0,048
C3-1	0,313	0,320	0,326
C3-2	0,112	0,120	0,132
C3-3	0,328	0,314	0,310
C3-4	0,135	0,103	0,140
C4-1	0,248	0,224	0,221
C4-2	0,107	0,114	0,133
C4-3	0,205	0,212	0,216
C4-4	0,313	0,285	0,274

Bazı izolatların fenol oranları arttıkça büyüme oranları artmıştır. Bu örnekler fenole dirençlidir. C1-1 ve C1-4 izolatları fenol konsantrasyonu arttıkça artmıştır, fenole karşı dirençli örnekler olduğu belirlenmiştir. C1-2 fenol konsantrasyonuna karşı nispeten sabit kalarak kararlılık gösterirken, C1-3 izolatu ise fenole karşı konsantrasyon artışı ile üremesi azalarak duyarlı olduğu tespit edilmiştir. C2-2 ve C2-3, örnekleri fenol konsantrasyonu arttıkça spektro değerleri artmış ve, bu durum suşların fenole karşı dirençli olduğunu göstermiştir. C2-4, izolatu ise fenol konsantrasyonu arttıkça spektro değeri azalmıştır ve bu da fenole karşı duyarlı olduğunu göstermiştir. C3-4, izolatu kararsız bir üreme göstermiştir. Bu, C3-4 örneğinin fenol konsantrasyonlarına karşı düzensiz bir tepki verdiğini ifade etmektedir. C4-1 ve C4-4 izolatlarında konsantrasyon arttıkça üreme azalmıştır, bu izolatlar fenole karşı duyarlıdır. C4-3 izolatının değerleri hafif artarak orta düzeyde direnç gösterdiği gözlemlenmiştir.

3.7. Oto-agresyon Testi

Aktifleştirilen izolatların OD’leri fosfat tamponlu salin (PBS, pH: 7.2) ile 0.5’e ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında (25 °C) inkübe edilmiştir. 6 saat inkübe edildikten sonra üst katmandaki

süspansiyon 1 (7.saat), 2 (8.saat), 4 (10.saat) ve 6. (12.saat) saatlerde alınarak, 600 nm’de ölçümleri yapılmıştır. Oto-agresyon yüzdesi, formül 1- $(A_{dt}/A_0) \times 100$ kullanılarak hesaplanmıştır. Burada; A_{dt} , tanımlanmış zaman aralıklarındaki (1,2,4 ve 6 saat) absorbansı ve A_0 ise 0 saat zamanındaki okumaya karşılık gelmektedir. Ölçüm sonuçlarına göre yapılan hesaplamalar Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Oto-agresyon testi formül sonuçları

	OTO-AGRESYON TESTİ				
	A0 (Kontrol)	1.Saat	2.Saat	4.Saat	6.Saat
C1-1	0.048	50.00	50.00	40.62	39.58
C1-2	0.328	115.85	104.88	102.44	105.79
C1-3	0.158	13.92	-0.63	-5.70	-1.27
C1-4	0.135	100.74	101.48	98.52	108.89
C2-1	0.423	-80.09	105.92	105.67	105.43
C2-2	0.626	-4.1	-19.1	-28.3	-41.7
C2-3	0.064	107.81	161.25	167.19	159.38
C2-4	0.141	133.69	-70.92	-22.70	-22.70
C3-1	0.243	-11.93	-46.91	-76.13	-78.40
C3-2	-0.008	-61.5	18.5	-49	-149
C3-3	0.223	137.67	-62.78	-55.15	-45.74
C3-4	0.133	-68.03	-57.80	-56.60	-42.06
C4-1	-0.153	158.17	155.88	159.48	162.75
C4-2	0.100	106.0	67.00	15.00	65.00
C4-3	0.425	-71.76	-70.59	-70.59	-71.76
C4-4	0.152	7.24	0.00	4.61	5.92

Tablo 6’ da oto-agresyon test sonuçları, izolatların kendi kendine yapışma sonuçlarını belirli saatlere göre verilmiştir. Pozitif yüzdeler, probiyotik suşlarının belirli bir zaman diliminde oto-agresyon yeteneğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Negatif yüzdeler, örneklerin oto-agresyon yeteneğinin düşük olduğunu veya olumsuz etkilediğini ifade

etmektedir. Zamanla değişen değerler ise izolatlarnn oto-agresyon yeteneklerinin zamanla değiştiiğini göstermektedir.

C1-1 izolatu zamanla bağlanma yeteneğinde azalma göstermiştir. C1-2 izolatu, g¼çlü ve kararlı bir oto-agresyon yeteneğine sahiptir. C1-3 izolatu başta da zayıf bir yapışma yeteneğine sahiptir ve zamanla bu yeteneğin daha da azalmalar gör¼lm¼ştür. C1-4 izolatu sürekli yüksek oto-agresyon değerleri göstermiştir. C2-1, negatiften pozitif giden değerler ile oto-agresyon yeteneğinde zamanla artış olduğu belirlenmiştir. C2-2, sürekli negatif değerler göstermiştir, bu durum C2-2 izolatinın zayıf oto-agresyon yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. C2-3, sürekli yüksek değerler göstererek g¼çlü ve artan bir oto-agresyon yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. C2-4, başlangıçta yüksek değerler verse de sonra negatif değerlere d¼řm¼ştür. Bu, C2-4 suşunun başlangıçta iyi bir yapışma yeteneği olduğunu ancak zamanla bu yeteneğin kaybolduğunu göstermektedir. C3-1 izolatinın zayıf oto-agresyon yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. C3-2 genellikle negatif değerler göstermiştir. C3-3, başlangıçta yüksek, ancak sonra negatif değerler göstermiştir. Bu, C3-3 suşunun başlangıçta g¼çlü bir yapışma yeteneği olduğunu ancak zamanla bu yeteneğin kaybolduğunu ifade etmektedir. C3-4, sürekli negatif değerler vermiştir ve bu durum, C3-4 suşunun zayıf oto-agresyon yeteneğine sahip olduğunu gösterir. C4-1, zamansal artışın her basamağında yüksek ve artan oto-agresyon değerleri göstermiş ve bu özelliği ile g¼çlü ve artan bir oto-agresyon yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. C4-2 başlangıçta yüksek, ancak sonra dalgalanan değerler göstermiştir. C4-3, negatif değerler vererek zayıf oto-agresyon yeteneğine sahip olduğunu tespit edilmiştir. C4-4 değeri genellikle pozitifdir. Bu orta düzeyde bir oto-agresyon yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, C1-2, C1-4, C2-3, C4-1. izolatlarnı yüksek oto-agresyon yetenekleri nedeniyle bağırsak y¼zeyine daha iyi yapışabilme yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir. C1-3, C2-2, C3-1, C3-2, C3-4, C4-3 izolatlarnı ise d¼řük oto-agresyon yetenekleri nedeniyle bağırsak y¼zeyine daha az yapışabilme yeteneğine sahip oldukları tespit edilmiştir. C2-1, C2-4, C3-3, C4-2 suşları ise, oto-agresyon yeteneklerinde büyük dalgalanmalar yaşadığı için daha az öngörülebilir bir yapışma yeteneğine sahip olabilecekleri öngörülmektedirler.

3.8. Hücre Y¼zeyi Hidrofobiklik Testi

Bu test ile mikroorganizmaların hidrokarbonlara bağlanma kabiliyeti ölç¼lm¼ştür. 37 °C' de 24 saat çalkalamalı et¼vde ink¼be edilerek aktiveştirilen izolatlarn, PBS (pH: 7.2) kullanılarak 600 nm'de OD' si 0.5' e ayarlanmıştır. 1.5 mL hücre süspansiyonuna eşit miktarda toluen ve

hekzadekan ayrı ayrı ilave edilerek vortekslenmiştir. Süspansiyon 25 °C’ de 30 dakika inkübe edilmiştir. 30 dakika sonunda sulu faz toplanmıştır ve 600 nm’de ölçümleri yapılmıştır. Çalışmalar iki tekrarlı yapılmıştır.

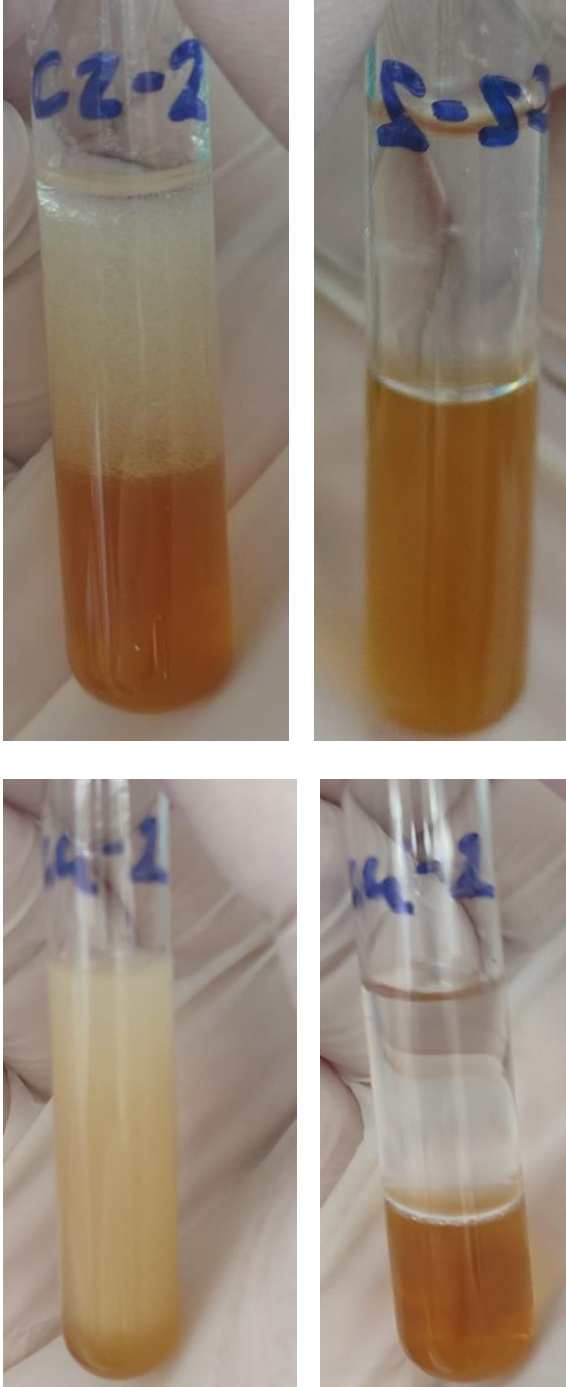
Hidrofobiklik yüzdesi, hidrofobiklik (%) = $[A0 - A/A0] \times 100$ olarak hesaplanmıştır. Burada A0 ve A, sırasıyla karıştırmadan önce ve sonra sulu fazın OD’ si olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 7’de verilmiştir.

Hücre hidrofobikliği, hücrelerin su itici özelliklerini ve yüzeylere yapışma kabiliyetlerini değerlendirmek için kullanılır. Hücrelerin hidrofobiklik oranının pozitif olması, hücrelerin su itici (hidrofobik) özelliklerinin yüksek olduğunu, negatif değerler ise hücrelerin suyu çekici (hidrofilik) özelliklerinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Tablo 7. Hücre yüzeyi hidrofobiklik yüzdeleri

	Hücre Hidrofobiklik Testi (%)		
	(%)	A0	A
C1-1	%10	1,181	1,267
C1-2	%83	1,365	0,730
C1-3	%175	0,948	-0,769
C1-4	%88	1,060	-0,924
C2-1	%90	1,144	-1,289
C2-2	%44	1,388	1,310
C2-3	%94	0,800	-0,746
C2-4	%91	1,363	-1,228
C3-1	%53	1,677	-0,870
C3-2	%-124	0,690	1,33
C3-3	%-255	1,554	-1,566
C3-4	%100	1,377	0,514
C4-1	%56	1,576	-0,864
C4-2	%212	0,806	1,806
C4-3	%36	1,514	1,739
C4-4	%213	1,147	-1,315

C1-3, C1-4, C2-1, C2-3, C2-4, C3-4, C4-2, C4-4, izolatları yüksek hidrofobiklik özelliği göstermektedirler. Bu izolatların yüzeylere yapışma özellikleri yüksektir. Düşük hidrofobiklik özelliği gösteren izolatlar ise C1-1, C2-2, C3-1, C4-1 izolatlarıdır. Bu izolatların yüzeylere yapışma kabiliyeti diğer izolatlara göre daha düşüktür. C3-2, C3-3, C4-3 izolatları hidrofilik özellik gösterirler, bu yüzden su çekici özellikleri yüksek, yüzeylere yapışma kabiliyetleri ise düşük olabileceğini ifade etmektedir (Şekil 15).



Şekil 15. C2-2 ve C4-2 izolatlarının vortekslendikten ve yarım saatlik inkübasyonundan sonraki görüntüleri

3.9. Antimikrobiyal Etkinlik

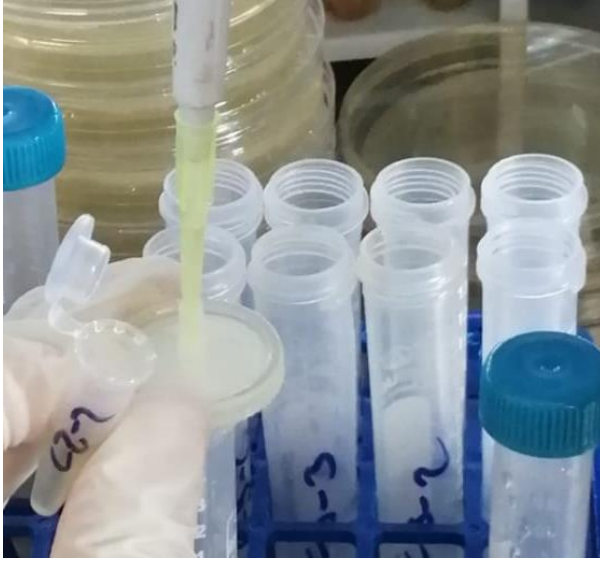
İzolatların antimikrobiyal etkinlikleri, kuyu difüzyon deneyi ile belirlenmiştir. *Escherichia coli* ATCC 11229, *Bacillus cereus* RSKK 863, *Bacillus subtilis* RSKK 244, *Micrococcus luteus* NRRL B-4375, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 patojen bakterileri kullanılmıştır. OD'leri 0.5' e ayarlanmıştır. Patojenik test mikroorganizmalarından nutrient agar ortamlarına inoküle

edilmiş ve katı agar üzerinde açılan kuyucuklara izolatların steril hücre içermeyen süpernatantı eklenmiştir. 24 saat inkübasyon süresinin sonunda, kuyucukların etrafındaki açıklıkların değerleri kumpas ile ölçülmüştür.

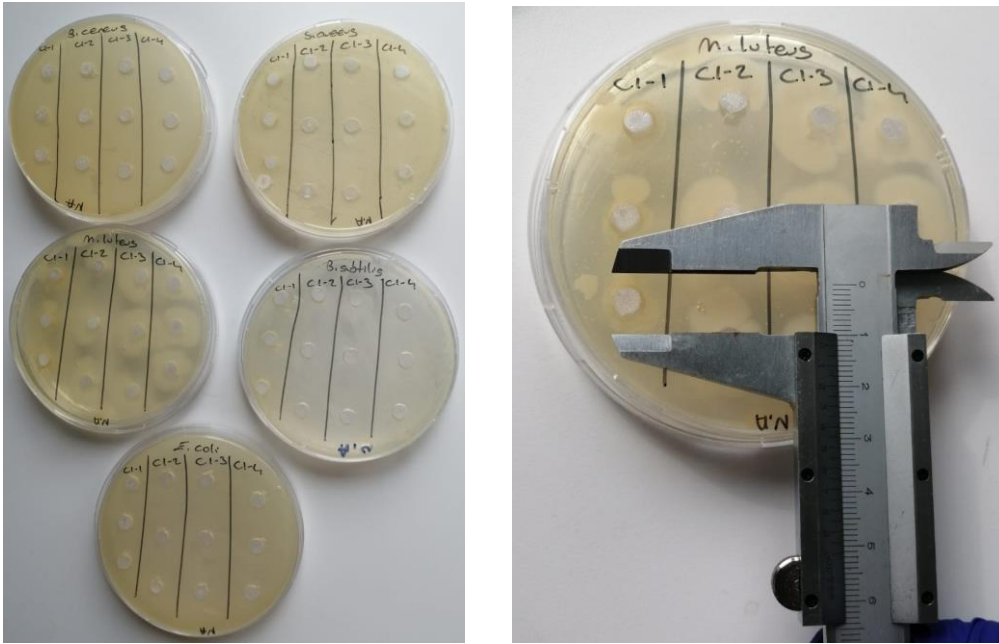
Tablo 8. Antimikrobiyal etki zon açıklıkları

	ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİK (mm)				
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Bacillus cereus</i> RSKK 863	<i>Bacillus subtilis</i> RSKK 244	<i>Micrococcus luteus</i> NRRL B-4375	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
C1-1	-	-	-	10,33	-
C1-2	-	-	-	13,3	-
C1-3	-	-	-	16,6	-
C1-4	-	-	-	14	-
C2-1	-	-	-	7	11
C2-2	-	-	11	6,3	-
C2-3	-	-	-	10	-
C2-4	-	-	-	6	-
C3-1	-	-	-	8	-
C3-2	-	-	-	9	-
C3-3	-	-	-	8,7	-
C3-4	-	-	-	10,7	-
C4-1	-	-	-	7	-
C4-2	-	-	-	8,3	-
C4-3	-	-	-	10,7	-
C4-4	-	-	19	11	-

Test izolatlarının hiçbirisi, *Escherichia coli* ATCC 11229, patojenine karşı antimikrobiyal etkinlik göstermemiştir. C2-2 ve C4-4 suşları *Bacillus cereus* RSKK 863 patojenine karşı etkinlik göstermiştir. C4-4 suşu, *Bacillus subtilis* RSKK 244 patojenine; C2-1 suşu, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 patojenine karşı antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. Birçok suş *Micrococcus luteus* NRRL B-4375 patojenine karşı antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. C4-4 izolatı, geniş spektrumlu bir antimikrobiyal aktivite sergilemiştir.



Şekil 16. İzolatların santrifüj sonrası mikro filtreden süzülmesi



Şekil 17. C1 serisinin görsel örnekleri

3.10. Antioksidan Aktivite

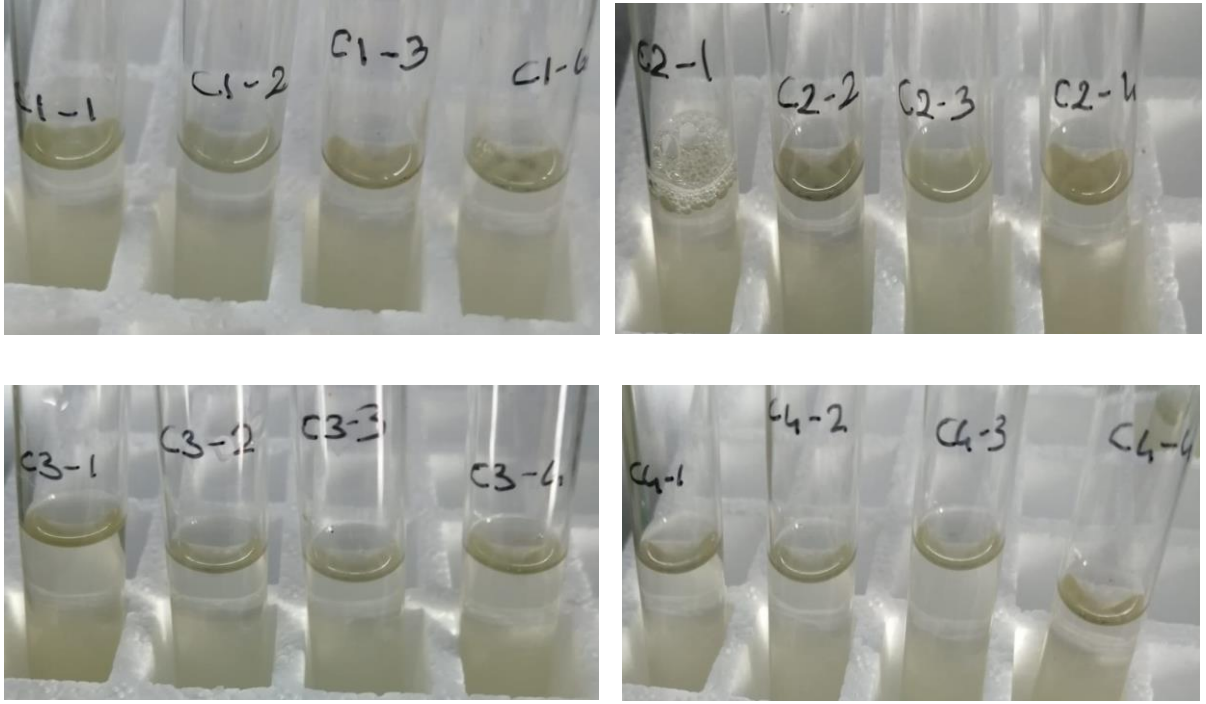
10^9 CFU/mL hücre içeren 0,5 mL izolatın hücresi, PBS (pH; 7,0) içinde süspansiyon edilmiştir. 0,1 mM DPPH'nin 2 mL taze yapılmış metanolik çözeltisi ilave edilmiştir ve 30 dakika karanlıkta bırakıldıktan sonra santrifüjlenmiştir ve absorbans 517 nm'de ölçüm yapılarak değerleri kaydedilmiştir. DPPH aktivitesi (%) = $[1 - (A_{\text{örnek}} - A_{\text{körve}}) / A_k] \times 100$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Burada $A_{\text{körve}}$: PBS ve A_k : PBS + DPPH' dir. Elde edilen değerler Tablo 9'da verilmiştir.

Antioksidan etkinlik, serbest radikalleri nötralize etme kapasitesini ifade eder ve daha yüksek yüzdeler, daha yüksek antioksidan kapasiteyi gösterir.

Tablo 9. Antioksidan % sonuçları

	Antioksidan Spektro Sonuçları	(%)
C1-1	0.134	70,33
C1-2	0.107	76,79
C1-3	0.088	81,33
C1-4	0.147	67,22
C2-1	0.127	72,00
C2-2	0.134	70,33
C2-3	0.107	76,79
C2-4	0.018	98,08
C3-1	0.111	75,83
C3-2	0.070	85,64
C3-3	0.064	87,08
C3-4	0.090	80,08
C4-1	0.047	91,14
C4-2	0.067	86,36
C4-3	0.041	92,58
C4-4	0,140	68,89

C1 serisi izolatların genel olarak iyi bir antioksidan etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. C1-3 izolatu %81.33 ile en yüksek antioksidan etkinliğe sahiptir. C2 serisinde, C2-4 izolatu %98.08 ile en yüksek antioksidan etkinliğe sahiptir, bu da diğer izolatlar arasında da belirgin derecede yüksek bir kapasiteyi göstermektedir. C3 serisi de iyi bir antioksidan etkinlik göstermektedir. C3-3 izolatu %87.08 ile en yüksek antioksidan etkinliğe sahiptir. C4 serisinde C4-3 izolatu %92.58 ile en yüksek antioksidan etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Her seride genel olarak iyi bir antioksidan etkinlik gösteren izolatların olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 18. İzolatların antioksidan deneyinde spektrofotometre ölçümü öncesi görüntüleri

3.11.Güvenlik Değerlendirme Testleri

3.11.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

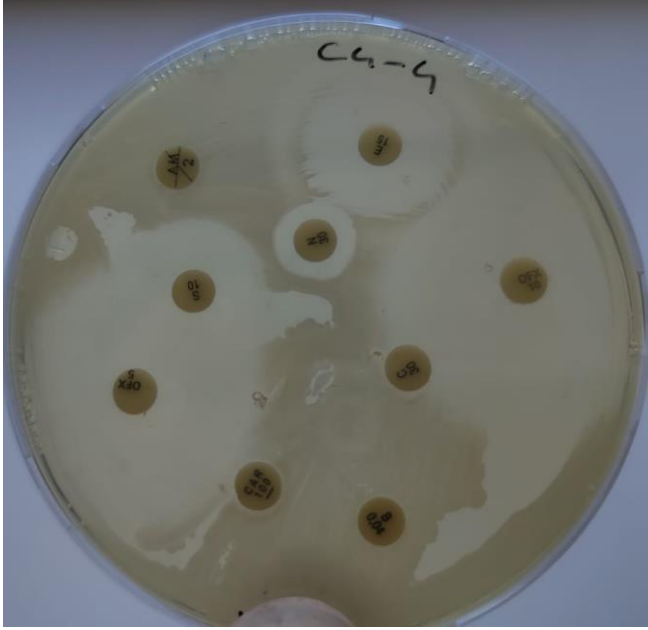
Gece boyunca inkübe edilen bakteri solüsyonları 10^6 CFU/mL'ye seyreltilmiştir ve 100 μ L alınarak Nutrient agar plakasının yüzeyine yayılmıştır. Antibiyotik diskler plak üzerine uygun şekilde yerleştirilmiştir ve 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Plakalar inkübasyondan sonra, izolatların antibiyotiğe duyarlılığını gösteren bir inhibisyon bölgesinin görünümü açısından incelenmiştir ve inhibisyon bölgesinin çapı kumpas ile ölçülmüştür. Antibiyotik olarak, Ampicillin (AM2), Bacitracin (B94), Carbenicillin (CAR100), Chloramphenicol (C30), Erytramycin (E15), Neomycin (N30), Streptomycin (S10), Ofloxaci (OFX5) ve Ofloxaci (OFX10) kullanılmıştır. Diskler üzerine konulan antibiyotiklerin etrafında oluşan bölge, mikroorganizmanın o antibiyotiğe karşı duyarlılığını gösterir.

Tablo 10. Antimikrobiyal duyarlılık testi zon açıklıkları

ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTİ (mm)									
	Ampicillin (AM2)	Bacitracin (B94)	Carbenicillin (CAR100)	Chloramphenicol (C30)	Erythramycin (E15)	Neomycin (N30)	Streptomycin (S10)	Ofloxacin (OFX5)	Ofloxacin (OFX10)
C1-1	-	-	-	-	-	8	10	26	23
C1-2	-	-	-	-	6	14	10	22	26
C1-3	-	-	-	13	-	12	12	21	21
C1-4	-	-	-	-	17	11	9	25	27
C2-1	-	-	-	-	-	5	12	25	23
C2-2	-	-	-	-	-	5	13	23	28
C2-3	-	-	-	-	-	12	14	22	23
C2-4	-	-	-	-	11	12	10	23	26
C3-1	-	-	-	-	-	11	15	27	26
C3-2	-	-	-	8	-	16	16	23	26
C3-3	-	-	-	-	-	12	17	27	26
C3-4	-	-	-	26	-	13	14	20	27
C4-1	-	-	-	-	-	11	16	25	30
C4-2	-	-	-	-	-	6	16	26	30
C4-3	-	-	-	-	-	10	13	25	30
C4-4	-	-	-	-	18	8	15	26	28

Ampisilin (AM2), Bacitracin (B94) ve Carbenicillin (CAR100), antibiyotikleri hiçbir izolata karşı aktivite göstermemiştir. Bu, test edilen bakteriyel suşların hepsinin bu antibiyotiklere karşı dirençli olduğu anlamına gelir. Chloramphenicol (C30), C1-3, C3-2 ve C3-4 izolatlarında inhibisyon zonları oluşturmuştur (sırasıyla 13 mm, 8 mm ve 26 mm). Bu durum, bazı izolatların bu antibiyotiğe karşı hassas olduğunu göstermektedir. Erythramycin (E15), C1-2, C1-4, C2-4 ve C4-4 izolatlarında (6 mm, 17 mm, 11mm ve 18 mm) etkinlik göstermiş ve diğer izolatlara karşı aktivite göstermediği belirlenmiştir. Bu, çoğu izolatın bu antibiyotiğe dirençli olduğunu, ancak bazı izolatların hassas olabileceğini göstermektedir. Neomycin (N30) antibiyotiği, izolatlar üzerinde değişen inhibisyon zonları oluşturduğu tespit edilmiştir (5 mm ile 16 mm arasında). Streptomycin (S10) antibiyotiği ise, çoğu izolat üzerinde etkinlik göstermiş ve 9 mm ile 17 mm arasında inhibisyon zonları ölçülmüştür. Ofloxacin (OFX5 ve OFX10), için iki farklı konsantrasyon kullanılmıştır ve çoğu izolat her iki konsantrasyonda da inhibe olarak geniş inhibisyon zonları elde edilmiştir (20 mm ile 30 mm

arasında). Bu, test edilen bakteriyel suşların bu antibiyotiğe karşı genel olarak hassas olduğunu göstermektedir.



Şekil 19. C3-1 ve C4-4 izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçları

3.11.2. Hemolitik Aktivite

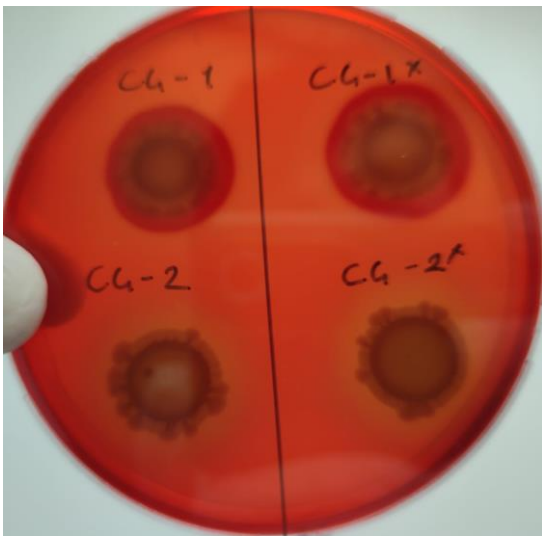
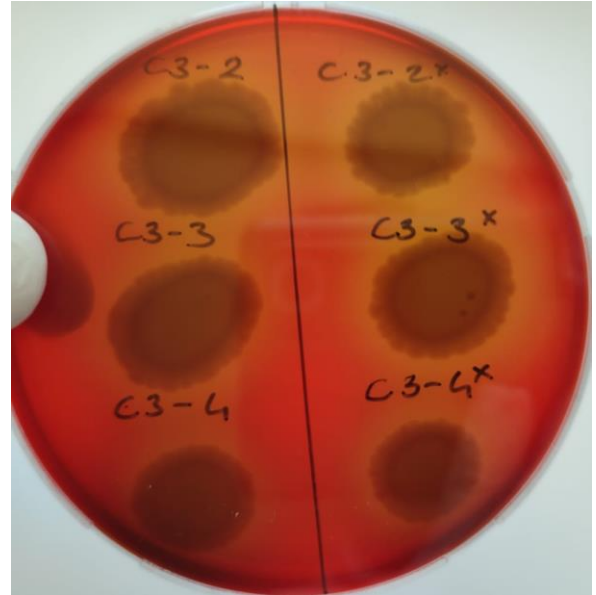
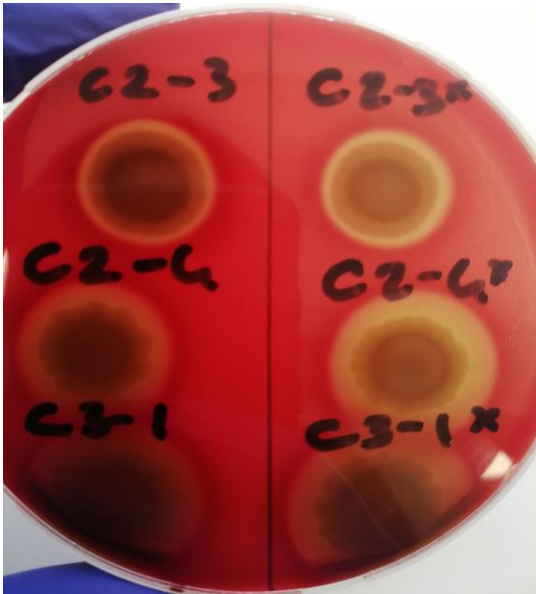
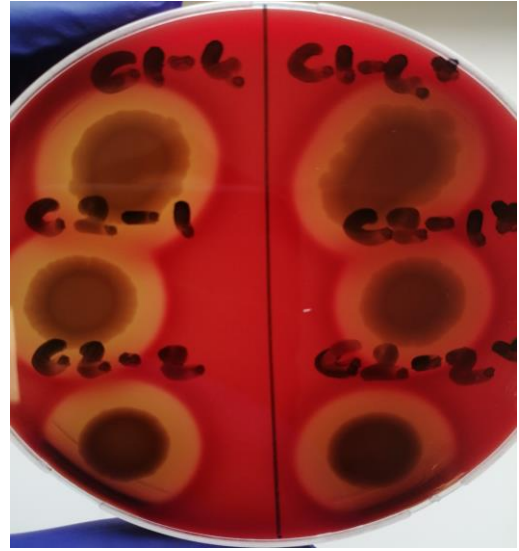
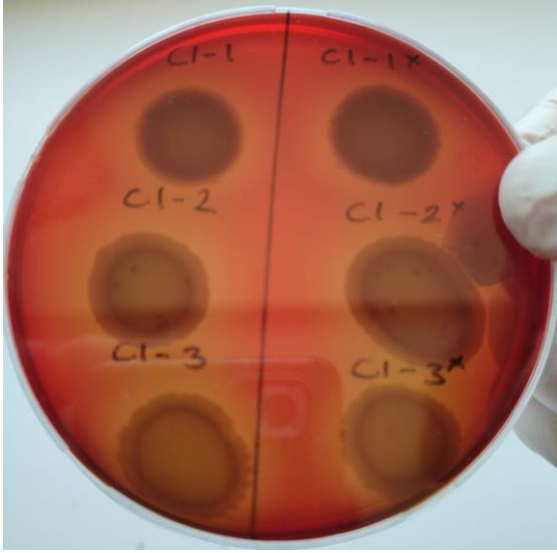
İzolatlar, RBC hücreleri üzerinde hemoliz testine tabi tutulmuştur. İzolatlar, %5 (a/h) koyun kanı içeren defibrine edilmiş kanlı agar plakasına sürme yöntemiyle ekim yapılmıştır. Plakalar, 37 °C'de 48 saatlik inkübasyonun ardından kolonileri çevreleyen belirgin bir hidroliz bölgesinin

gelişimi açısından incelenmiştir. Kolonileri çevreleyen net bölgeler β -hemolitik aktiviteyi, yeşil renkli bölgeler α -hemolizi ve kolonilerin çevresinde hiçbir oluşum yoksa γ -hemoliz aktiviteyi gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır. Hemolitik aktivite, bir organizmanın, kırmızı kan hücrelerini yıkma yeteneğini ifade eder. β -hemoliz, kırmızı kan hücrelerinin tamamen yıkılması anlamına gelirken, α -hemolizde kısmi yıkımı ifade eder.

Tablo 11. Hemolitik aktivite sonuçları

HEMOLİTİK AKTİVİTE	
C1-1	β -hemolitik
C1-2	β -hemolitik
C1-3	β -hemolitik
C1-4	β -hemolitik
C2-1	β -hemolitik
C2-2	β -hemolitik
C2-3	β -hemolitik
C2-4	β -hemolitik
C3-1	β -hemolitik
C3-2	β -hemolitik
C3-3	β -hemolitik
C3-4	β -hemolitik
C4-1	α -hemolizi
C4-2	β -hemolitik
C4-3	β -hemolitik
C4-4	β -hemolitik

C4-1 izolatu dışındaki tüm izolatların β -hemolitik aktivite gösterirken, C4-1 izolatının, α -hemolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu, C4-1 izolatının diğerlerinden farklı bir özellik gösterdiğini ve kırmızı kan hücrelerini kısmen yıkma yeteneğine sahip olduğunu ifade etmektedirler.



Şekil 20. Hemolitik aktivite görselleri

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde, dünyadaki hızlı nüfus artışına paralel olarak artan besin ihtiyacına en önemli alternatiflerden biri su ürünleridir. Doğal balık stokları üzerindeki baskının azaltılması, ucuz ve bol protein ihtiyacının karşılanmasında su ürünleri yetiştiriciliği önemini arttırmaktadır. Son yıllarda balık yetiştiriciliği sayesinde su ürünleri üretiminde önemli alanda artış görülmüştür. Bu alanda yetiştiriciliği yapılacak türlerin gelişimini hızlandırmak ve ürün kalitesini artırmak için, yemin kalitesinde etkin rol oynayan katkı maddelerinin kullanımı gündeme gelmeye başlamıştır. Bu önemli katkı maddelerinden biri de son yıllarda büyük önem kazanan ve insan ve hayvan beslenmesi konusunda birçok çalışmada kullanılan probiyotiklerdir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde ise probiyotikler özellikle üretimi arttırmak için sudaki patojenlerin engellenmesi ve su kalitesinin iyileştirilmesi için kullanılmaktadır.

Bu projede, Van/ Karasu deresinden yakalanan sazan balıklarının bağırsağından izole edilen bakteri örnekleri ile çalışılmıştır. Dört adet Sazan Balığından elde edilen bu probiyotik suşların belirlenmesi amacıyla pH, safra tuzu, lizozim, fenol, oto-agresyon, hidrofobiklik, antimikrobiyal etkinlik, antioksidan etkinlik ve antibiyotik direnci gibi çeşitli parametreler altında incelenmiştir.

Literatür çalışmalarına bakıldığında, hücre yüzeyi hidrofobikliği, probiyotik mikroorganizmalar arasında profilaktik ve terapötik faydalar sağlayabilecekleri bağırsak epitel hücrelerine tutunmada spesifik olmayan bir etkileşim olarak tanımlanır (Gut vd., 2019; Kanpiengjai vd., 2020). Bu çalışmada, C1-3, C1-4, C2-1, C2-3, C2-4, C3-4, C4-2, C4-4, izolatları yüksek hidrofobiklik özellik gösterirken, C1-1, C2-2, C3-1, C4-1 izolatları, düşük hidrofobiklik özelliği göstermişlerdir. Literatür çalışmalarına bakıldığında, benzer şekilde, deniz sediment örneğinden izole edilen *Kluyveromyces lactis* M3 maya suşunun hücre yüzeyi hidrofobisitesi yüksek olduğu bulunmuştur (Guluarte vd., 2019).

Probiyotikler için açıklanan sağlığı geliştirici özellikler, çoğunlukla iyi bir yapışma ve ardından bağırsak yolunda kolonizasyon ile ilişkilidir (Mohanty vd., 2019). Balık safrasına toleransı, karaciğerden gelen safranın salgılandığı balık bağırsağına gelişip, yaşayabilmesi bir probiyotik için çok önemli bir özelliktir (Balcázar vd., 2008). Bu projede, izolatlar genellikle safraya tolerans göstermiştir. C1 ve C3 izolatlarının bütün serileri tüm koşullarda ve saatlerde yoğun üreme göstererek safra tuzuna karşı oldukça dirençli olduğunu ve büyümelerinin bu koşullardan etkilenmediğini göstermiştir. C2-3'ün 2. saat 0 safra tuzu konsantrasyonundaki büyüme oranı 295, ancak 6. saat 0.3 safra tuzu konsantrasyonunda bu oran 103'e düşmüştür.

Bu, C2-3'ün safra tuzuna karşı direncinin sınırlı olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, *Sporidiobolus ruineniae* A45.2, *Debaryomyces hansenii* BCS004, *Kluyveromyces lactis* M3 ve *Pichia kudriavzevi* ONF7.1C maya suşlarının safra tuzlarına toleranslı oldukları bildirilmiştir (Ghosh vd., 2017; Guluarte vd., 2019; Kanpiengjai vd., 2020; Reyes- Becerril vd., 2021).

Probiyotik bakterilerin hayatta kalması ve çoğalması için belirli pH aralıkları gereklidir. Probiyotiklerin hayatta kalması ve çoğalması için, bağırsakların doğal pH seviyesi olan 6.5-7.0 aralığı da önemlidir. *Lactobacillus* türleri, pH 4.0-4.5 aralığında, *Bifidobacterium* türleri, pH 4.5-5.0 aralığında *Saccharomyces boulardii*, pH 2.0-8.5 aralığında ve *Lactococcus* ve *Streptococcus* türleri, Genellikle pH 5.5-6.5 aralığında büyümeyi tercih ederler. Bu çalışmada, genellikle izolatlar düşük pH şartlarında (pH:2.5) üreme göstermezken, pH: 6.5 da üreme göstermiştir. Benzer şekilde, gökkuşacağı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen *Candida tropicalis* ve *Kazaschtania exigua* maya suşlarının düşük pH şartlarına (pH : 2) yüksek tolerans gösterdikleri görülmüştür (Martinez vd., 2018).

Proje sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, C1-1, C1-4, C4-1, C4-3 ve C4-4 izolatlarının, probiyotik özelliklerinin belirlenmesi için yapılan testlerde etkin sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Seçilen izolatların genetik karakterizasyonunun yapılması ve metabolik aktivitelerinin belirlenmesi, probiyotik özelliklerinin anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Bu çalışmalar, C1-1, C1-4, C4-1, C4-3 ve C4-4 izolatlarının endüstriyel ve sağlık alanlarında kullanım potansiyelini daha iyi ortaya koyacaktır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda yeni bir proje hazırlanarak bu izolatların karışımının balık beslenmesine etkilerinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

Başarı ile tamamlanan proje çıktılarında biri de yüksek lisans tezine dönüşecek olmasıdır. Elde edilen sonuçlara moleküler analizlerde eklenerek uluslararası bir dergide yayına dönüştürülmesi hedeflenmektedir.

Tablo 12. İzolatların kodlamaları, dilüsyon oranları ve elde edildiği izolasyon ortamları

No	İzolat Adı	Dilüsyon Oranı	İzolasyon Ortamı
1	C2-4	10 ⁵	TYG (C)
2	C4-3	10 ⁶	N. A
3	C3-1	10 ⁵	N. A
4	C2-1	10 ⁵	TYG (C)
5	C1-1	10 ⁶	N. A
6	C3-4	10 ⁶	N. A
7	C3-4	10 ³	TYG (N)
8	C4-4	10 ³	TYG (N)
9	C3-1	10 ³	TYG (C)
10	C3-1	10 ³	TYG (C)
11	C2-3	10 ⁶	N. A
12	C3-2	10 ³	TYG (N)
13	C1-4	10 ⁵	TYG (N)
14	C1-3	10 ⁵	TYG (C)
15	C1-3	10 ⁵	TYG (N)
16	C4-4	10 ⁶	N. A
17	C2-4	10 ⁵	TYG (C)
18	C3-1	10 ⁶	N. A
19	C3-4	10 ⁶	N. A
20	C4-1	10 ³	TYG (N)
21	C3-4	10 ⁵	N. A
22	C2-1	10 ⁵	TYG (C)
23	C1-4	10 ⁵	TYG (C)
24	C1-4	10 ⁶	N. A
25	C3-1	10 ⁵	N. A
26	C3-4	10 ⁵	N. A
27	C2-2	10 ⁵	TYG (N)
28	C1-1	10 ⁵	TYG (C)
29	C4-2	10 ⁴	TYG (C)
30	C4-1	10 ³	TYG (N)

31	C3-1	10^5	N. A
32	C4-2	10^4	TYG (C)
33	C1-4	10^5	TYG (C)
34	C4-1	10^5	TYG (N)
35	C3-1	10^3	TYG (N)
36	C2-3	10^5	TYG (N)
37	C3-4	10^6	N. A
38	C2-2	10^6	N. A
39	C2-4	10^5	TYG (C)
40	C4-4	10^5	N. A
41	C4-1	10^3	TYG (N)
42	C2-1	10^6	N. A
43	C2-4	10^6	N. A
44	C3-1	10^5	N. A

KAYNAK

Lakra, A.K., L. Domdi, G. Hanjon, Y.M. Tilwani, V. Arul, Some probiotic potential of *Weissella confusa* MD1 and *Weissella cibaria* MD2 isolated from fermented batter, LWT (Lebensm.-Wiss. & Technol.) 125 (2020), 109261.

Padmavathi, T., R. Bhargavi, P.R. Priyanka, N.R. Niranjana, P.V. Pavitra, Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification, J Genet Eng Biotechnol 16 (2) (2018) 357–362.

Tilwani, Y. M., Lakra, A.K., Domdi, L., Jha, N., & Arul, V. (2022). Characterization of potential probiotic bacteria *Enterococcus faecium* MC-5 isolated from the gut content of *Cyprinus carpio* specularis. *Microbial Pathogenesis*, 172, 105783.

Angmo, K., A. Kumari, Savitri, T.C. Bhalla, Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverages of Ladakh, LWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft -Technol.) 66 (2016) 428–435.

Gunyakti, A., & Asan-Ozusaglam, M. (2019). Lactobacillus gasseri from human milk with probiotic potential and some technological properties. *LWT*, 109, 261-269.

Chugh, A. Kamal-Eldin, (2020) Bioactive compounds produced by probiotics in food products, Curr. Opin. Food Sci. (32) 76–82.

Varsha K.K., Maheshwari A.P., Nampoothiri K.M., (2021) Accomplishment of probiotics in human health pertaining to immunoregulation and disease control, Clin Nutr ESPEN (44) 26–37.

Bereded N.K., Curto M., Domig K.J., Abebe G.B., Fanta S.W., Waidbacher H., Meimberg H. (2020) Metabarcoding analyses of gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from lake Awassa and lake Chamo, Ethiopia, Microorganisms 8 (7) 1040.

Cui X., Zhang Q., Zhang Q., Zhang Y., Chen H., Liu G., Zhu L., (2022) Research progress of the gut microbiome in hybrid fish, Microorganisms 10 (5) 891.

Talwar C., Nagar S., Lal R., Negi R.K., (2018) Fish gut microbiome: current approaches and future perspectives, Indian J. Microbiol. 58 (4) 397–414.

Dhruv D., Pandya D., Prajapati C., Bhatt S., (2021) Assessing Probiotic Potential of Gut Microflora from Indian Major Carps. *Adv. Biores.*, 12 (5) 85-92.

Yerel Haber (2014) ÇELTİK TARLASINI SAZAN TARLASI YAPTI, *Samsun Haber* 2014.

Chapman G, Fernando CH (1994) The diets and related aspects of feeding of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.) in lowland rice fields in northeast Thailand. *Aquaculture* 123:281–307.

Fernando C.H. (1993) Rice field ecology and fish culture - an overview. *Hydrobiologia*, 259:91–113.

Haroon A.K.Y. (1998) Diet and feeding ecology of two sizes of *Barbodes gonionotus* (=Puntius gonionotus) and *Oreochromis* sp. in rice fields in Bangladesh. *NAGA*, 21(3):13–19.

Kuebutornye, F.K., Y. Lu, E.D. Abarike, Z. Wang, Y. Li, M.E. Sakyi, In vitro assessment of the probiotic characteristics of three bacillus species from the gut of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Probiotics Antimicrob* 12 (2) (2020) 412–424.

Mani, S. R., Vijayan, K., Jacob, J. P., Vijayakumar, S., & Kandhasamy, S. (2021). Evaluation of probiotic properties of *Lysinibacillus macroides* under in vitro conditions and culture of *Cyprinus carpio* on growth parameters. *Archives of microbiology*, 203(7), 4705-4714.

Saikia S.K. & Das D.N.(2009) Feeding ecology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in a rice–fish culture system of the Apatani plateau (Arunachal Pradesh, India) *Aquat Ecol*, 43:559–568.

Santos, K.M.O.D., A.D.S. Vieira, H.O. Salles, J.D.S. Oliveira, C.R.C. Rocha, M.D. F. Borges, S.D. Todorov, Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses, *Braz. J. Microbiol.* 46 (2015) 237–249.

Schrijver R.D., Ollevier, F. 2000. Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture*, 186; 107-116.

Yaman F., Esenal Ö. (2004) Balıklarda Probiyotik Kullanımı. *Mikrobiyoloji Dergisi*, 2 (6): 1-18.

Gomez B., Roque A., Turnbull J. (2000). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191; 259-270.

Tilwani Y. M., Lakra A. K., Domdi L., Jha N. , Aru V. (2022) Characterization of potential probiotic bacteria *Enterococcus faecium* MC-5 isolated from the gut content of *Cyprinus carpio specularis*. *Microbial Pathogenesis*, (172) 1-11.

Gut, A.M., Vasiljevic, T., Yeager, T. & Donkor, O.N. (2019). Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. *Journal of Functional Foods*, 58, 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.046>

Kanpiengjai, A., Khanongnuch, C., Lumyong, S., Kummasook, A. & Kittibunchakul, S. (2020). Characterization of *Sporidiobolus ruineniae* A45. 2 Cultivated in Tannin Substrate for Use as a Potential Multifunctional Probiotic Yeast in Aquaculture. *Journal of Fungi*, 6(4), 378. <https://doi.org/10.3390/jof6040378>

Mohanty, D., Panda, S., Kumar, S. & Ray, P. (2019). In vitro evaluation of adherence and anti-infective property of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM 69 against *Salmonella enterica*. *Microbial pathogenesis*, 126, 212-217. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.014>

Balcázar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Muzquiz, J.L. & Girones, O. (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278(1-4), 188-191. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.014>

Ghosh, K., Banerjee, S., Moon, U.M., Khan, H.A. & Dutta, D. (2017). Evaluation of gut associated extracellular enzyme-producing and pathogen inhibitory microbial community as potential probiotics in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Aquaculture*, 7. [10.5376/ija.2017.07.0023](https://doi.org/10.5376/ija.2017.07.0023)

Guluarte, C., Reyes-Becerril, M., Gonzalez-Silvera, D., Cuesta, A., Angulo, C. & Esteban, M.Á. (2019). Probiotic properties and fatty acid composition of the yeast *Kluyveromyces lactis* M3. In vivo immunomodulatory activities in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & shellfish immunology*, 94, 389- 397. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.024>

Kanpiengjai, A., Khanongnuch, C., Lumyong, S., Kummasook, A. & Kittibunchakul, S. (2020). Characterization of *Sporidiobolus ruineniae* A45. 2 Cultivated in Tannin Substrate for Use as a Potential Multifunctional Probiotic Yeast in Aquaculture. *Journal of Fungi*, 6(4), 378. <https://doi.org/10.3390/jof6040378>

Reyes- Becerril, M., Angulo, C., Angulo, M. & Esteban, M.Á. (2021). Probiotic properties of *Debaryomyces hansenii* BCS004 and their immunostimulatory effect in supplemented diets for

gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Research*, 52(6), 2715-2726.
<https://doi.org/10.1111/are.15123>

Martínez, M.P., González Pereyra, M.L., Fernandez Juri, M.G., Poloni, V. & Cavaglieri, L. (2018). Probiotic characteristics and aflatoxin B1 binding ability of *Debaryomyces hansenii* and *Kazaschtania exigua* from rainbow trout environment. *Aquaculture Research*, 49(4), 1588-1597. <https://doi.org/10.1111/are.13614>

Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: From biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(10), 605-616.

Hammes, W. P., & Hertel, C. (2009). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *Ecology of Lactic Acid Bacteria* (pp. 191-234). Springer, Boston, MA.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197-215.

Borriello, S. P., Hammes, W. P., Holzapfel, W., Marteau, P., Schrezenmeir, J., Vaara, M., & Valtonen, V. (2003). Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 36(6), 775-780.

Hickson, M. (2011). Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* infection. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 4(3), 185-197.