

T.C.
BİLECİK ŐEH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOĞI VE GENETİK ANABİLİM DALI

***CYPRINUS CARPIO* (SAZAN BALIĞI)'DA SİNDİRİM SİSTEMİNDEN
PROBİYOTİK ÖZELLİKLİ BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE TANIMLANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZNUR BİLGİN

TEZ DANIŐMANI

PROF.DR. MUSTAFA KOYUN

İKİNCİ TEZ DANIŐMANI

DOÇ.DR. FADİME ÖZDEMİR

BİLECİK, 2024

10650161

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOĞİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

***CYPRINUS CARPIO* (SAZAN BALIĞI)'DA SİNDİRİM SİSTEMİNDEN
PROBİYOTİK ÖZELLİKLİ BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE TANIMLANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZNUR BİLGİN

TEZ DANIŐMANI

PROF.DR. MUSTAFA KOYUN

İKİNCİ TEZ DANIŐMANI

DOÇ.DR. FADİME ÖZDEMİR

BİLECİK, 2024

10650161

BEYAN

“*Cyprinus Carpio* (Sazan Balığı)’da Sindirim Sisteminden Probiyotik Özellikli Bakterilerin İzolasyonu Ve Tanımlanması” adlı yüksek lisans tez projesinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel ahlak kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.			
DESTEK ALINMIŞTIR	X	DESTEK ALINMAMIŞTIR	
Destek alındı ise;			
Destekleyen kurum; Bilimsel Araştırma Projesi (BAP)			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1-BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)	X	2023-01.BŞEÜ.35-01	
2-TÜBİTAK			
Etik Kurul Onayı Var ise;			
ETİK KURUL karar tarih/sayı:		25.07.2024 / 2024/07-18	

Öznur BİLGİN

Tarih

.....

İmza

.....

ÖN SÖZ

Yüksek lisans eğitimimde öncelikle danışmanlığımı üstlenerek bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, değerli fikirleri ile bana her konuda yardımcı olan ve yol gösteren tez danışmanlarım Sayın Prof. Dr. Mustafa KOYUN ve Sayın Doç. Dr. Fadime ÖZDEMİR'e,

Araştırmamı maddi olarak destekleyen Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (2023-01.BŞEÜ.35-01),

Laboratuvar çalışmalarım boyunca beni yalnız bırakmayan, benimle gece boyu laboratuvarında çalışan canım ekip arkadaşım Sevinç DADASHOVA'ya,

Ve tüm hayatım boyunca yanımda destekçim olan bana her türlü maddi ve manevi imkânı sağlayan babam Sinan BİLGİN ve annem Hafize BİLGİN'e, en güzel ve en zor anlarımda olduğu gibi bu süreçte de büyük desteğini gördüğüm ablam Edanur BİLGİN DEMİR'e, bana eniştelikten öte abilik yapan abim Muhammed Enes DEMİR'e ve bir tanecik kardeşim Ayşegül BİLGİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Öznur BİLGİN

2024

ÖZET

CYPRINUS CARPIO (SAZAN BALIĞI)'DA SİNDİRİM SİSTEMİNDEN PROBİYOTİK ÖZELLİKLİ BAKTERİLERİN İZOLASYONU VE TANIMLANMASI

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. Bu tez, *C. carpio* (sazan balığı) türünün sindirim kanalındaki bazı probiyotik bakterilerin eldesine yönelik bir çalışmadır. Hayvanların sindirim sisteminde bulunan bazı bakteri türleri, yemden yararlanma, balık sağlığı, çevre kalitesinin 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 tez çalışmanın amacı sazan balığının bağırsaklarından izole edilen bakterilerin probiyotik özelliklerinin belirlenmesidir.

Anahtar Kelimeler: *Cyprinus carpio*, Bakteri, Probiyotik.

ABSTRACT
ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PROBIOTIC BACTERIA FROM THE
DIGESTIVE SYSTEM OF *CYPRINUS CARPIO* (CARP)

Cyprinus carpio (common carp) is a globally widespread fish species that is highly valued for its nutritional benefits and is cultivated both naturally and in aquaculture. Due to these well-known characteristics, enhancing the growth condition and fortifying the immune systems of common carp is crucial. Probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, support the digestive and immune systems of the host, thereby contributing positively to overall health. This thesis will focus on the isolation of certain probiotic bacteria from the digestive tract of *C. carpio* (common carp). Some bacterial species present in the digestive systems of animals play significant roles in feed utilization, fish health, environmental quality improvement, and enhancement of microorganisms. Additionally, some bacteria in the gastrointestinal tract play important roles and contribute to the host's metabolism by producing several different enzymes in the digestive system. The aim of this thesis is to determine the probiotic characteristics of bacteria isolated from the intestines of common carp (*C. carpio*).

Keywords: *Cyprinus carpio*, Bacteria, Probiotic.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖN SÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Su Ürünleri Yetiştiriciliği.....	3
2.2. Sazan Balığı (<i>Cyprinus carpio</i>) Genel Bilgi.....	4
2.3. Sazan Balığının (<i>Cyprinus carpio</i>) Dünya ve Türkiye'deki Yetiştiriciliği.....	5
2.4. Probiyotik ve Probiyotiğin Önemi.....	6
2.5. Probiyotiğin Su Ürünleri Yetiştiriciliğindeki Yeri.....	7
2.6. Probiyotiklerin Belirlenmesinde Dikkat Edilmesi Gerekenler.....	9
2.7. Probiyotik Suşların Belirlenmesinde Kullanılan In Vitro Testler.....	9
2.7.1. Mide Ortamına Direnç.....	9
2.7.2. Safra Tuzu Toleransı.....	10
2.7.3. Antibiyotik Direnci.....	10
2.7.4. Bağırsak Yüzeyine Tutunma.....	11
2.7.5. Hemolitik Aktivite.....	12
2.7.6. Antioksidan Aktivite.....	12
2.7.7. Fenol Toleransı.....	13
2.7.8. Lizozim Toleransı.....	13
2.8. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Etkili Olan Başlıca Probiyotik Türler.....	14

3. MATERYAL ve METOD	17
3.1. <i>Cyprinus carpio</i> (Sazan Balığı)'nın Temini	17
3.2. <i>Cyprinus carpio</i> (Sazan Balığı)'nın Bağırsak Örneklerinin Eldesi.....	17
3.3. <i>Cyprinus carpio</i> (Sazan Balığı)'dan Probiyotik Bakteri Gruplarının İzolasyonu..	17
3.4. İzole Edilen Bakterilerin Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	17
3.4.1. Düşük pH Tolerans Testi	17
3.4.2. Safra Toleransı Testi	18
3.4.3. Lizozim Tolerans Testi	18
3.4.4. Fenol Tolerans Testi	19
3.4.5. Oto-agresyon Testi.....	19
3.4.6. Hücre Yüzeyi Hidrofobiklik Testi.....	19
3.4.7. Antimikrobiyal Etkinlik Testi	20
3.4.8. Antioksidan Aktivite	20
3.5. Güvenlik Değerlendirme Testleri	20
3.5.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi.....	20
3.5.2. Hemolitik Aktivite	21
4. BULGULAR	25
4.1. <i>Cyprinus carpio</i> (Sazan Balığı)'nın Temini	25
4.2. <i>Cyprinus carpio</i> (Sazan Balığı)'nın Bağırsak Örneklerinin Eldesi.....	25
4.4. İzole Edilen Bakterilerin Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	30
4.4.1. Düşük pH Tolerans Testi	30
4.4.2. Safra Tolerans Testi.....	32
4.4.3. Lizozim Tolerans Testi	35
4.4.4. Fenol Tolerans Testi	37
4.4.5. Oto-agresyon Testi.....	38
4.4.9. Hücre Yüzeyi Hidrofobiklik Testi.....	41
4.4.10. Antimikrobiyal Etkinlik Testi	42

4.4.11. Antioksidan Aktivite.....	44
4.5. Güvenlik Değerlendirme Testleri	46
4.5.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi.....	46
4.5.2. Hemolitik Aktivite	488
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	51
KAYNAKÇA.....	59

TABLULAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. FAO'nun son raporunda en çok su ürünleri yetiştiriciliği yapılan 10 ülke ve yıllık üretim miktarları (FAO, 2024)	4
Tablo 2.2. Aynalı sazan yetiştiricilik miktarı (ton)	6
Tablo 2.3. Balık bağırsak florasına uygun bazı probiyotikler, etkili oldukları balık türü ve etki parametreleri.....	16
Tablo 4.1. <i>C. carpio</i> (sazan balığı) bilgileri.....	25
Tablo 4.2. Düşük pH toleransında canlı koloni sayımları.....	31
Tablo 4.3. Safra toleransı koloni sayımları	33
Tablo 4.4. Lizozim toleransı koloni sayımı	36
Tablo 4.5. Fenol toleransı spektrofotometre sonuçları	37
Tablo 4.6. Oto-agresyon testi formül sonuçları	39
Tablo 4.7. Hücre yüzeyi hidrofobiklik yüzdeleri.....	41
Tablo 4.8. Antimikrobiyal etki zon açıklıkları.....	43
Tablo 4.9. İzolatların antioksidan % sonuçları	45
Tablo 4.10. İzolatların antimikrobiyal duyarlılık testi zon çapları	47
Tablo 4.11. Hemolitik aktivite sonuçları.....	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 4.1. <i>C. carpio</i> 1 (C1), <i>C. carpio</i> 2 (C2), <i>C. carpio</i> 3 (C3) ve <i>C. carpio</i> 4 (C4) fotoğrafları	25
Şekil 4.2. Operkulum açıklıktan tutularak %70' lik etil alkol ile yüzeyi steril edilen <i>C. carpio</i> .	26
Şekil 4.3. Anal boşluktan girilerek bağırsakların çıkarılması	26
Şekil 4.4. Örneklerin 500 µl'e 1 oranında 10 ⁴ , 10 ⁵ ve 10 ⁶ 'e kadar ringer içeren tüplerde seyreltilmesi	27
Şekil 4.5. <i>C. carpio</i> 1. balığın (C1) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinde 10 ³ dilüsyon yayma plaka ekimleri	27
Şekil 4.6. <i>C. carpio</i> 1. balığın (C1) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinde seyreltilmiş 10 ⁵ dilüsyon yayma plaka ekimleri	27
Şekil 4.7. <i>C. carpio</i> 1. balığın (C1) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinden nutrient agara çizgi ekim	28
Şekil 4.8. <i>C. carpio</i> 1. balığın tekrarı (C1 ₁) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinden nutrient agara tek koloni kültür ekimi	29
Şekil 4.9. <i>C. carpio</i> 1. balığın (C1) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinden nutrient agara yoğun ekimi.....	30
Şekil 4.10. %25'lik gliserole stoklanan izolatlar	30
Şekil 4.11. Ph:2.5 ve pH:6.5'te üreme gösteren ve göstermeyen izolat örnekleri	32
Şekil 4.12. Yoğun üreme ve sınırlı direnç gösteren izolatların koloni üreme örnekleri.....	35
Şekil 4.13. Lizozim toleransı örnek görseller	37
Şekil 4.14. C2-2 ve C4-2 izolatlarının vortekslendikten ve yarım saatlik inkübasyonundan sonrasındaki görüntüleri.....	42
Şekil 4.15. İzolatların santrifüj sonrası mikro filtreden süzülmesi	44
Şekil 4.16. C1 serisinin görsel örnekleri	44
Şekil 4.17. İzolatların antioksidan deneyinde spektrofotometre ölçümü öncesi görüntüleri...	46
Şekil 4.18. C3-1 ve C4-4 izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları	48
Şekil 4.19. Hemolitik aktivite sonuçları.....	50

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AC: Control Absorbance (Kontrol Absorbansı)

AS: Sample Absorbance (Örnek Absorbansı)

CFU: Colony Forming Unit (Koloni Oluşturma)

DDH₂O: Double distile su

DH₂O: Saf Su

DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

EDTA: Etilendiamintetra Asetat

FAO: Food and Agriculture Organization

g: Gram

ml: Mililitre

MMT: Milyon Metrik Ton

MRS: De Man Rogosa Sharpe

NA: Nutrient Agar

OD: Optical Density (Optik Yoğunluk)

RBC: Red Blood Cells

SDB: Sabouraud Dextrose Broth

TBE: Tris Borik Asit Edta

TE: Tris Edta

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

TYG: Tryptone Yeast Extract

W/V: Weight/Volume

WHO: World Health Organization

%: Yüzde

°C: Santigrat

μl: Mikrolitre

1. GİRİŞ

Beslenme bilincinin yaygınlaşması ile insanlar yüksek besin değerlerine sahip yiyeceklerin arayışına girmiştir. İnsan nüfusunun sürekli artması, kara hayvanlarının yetiştiriciliğinin ve besin olarak tüketim aşamasına geliş aşamalarının uzun süreçler gerektirmesi nedeniyle insanlar, besin değeri yüksek, zengin protein içerikli, yapısında çoklu doymamış yağ asitleri bulunan ve insan vücudunun temel besin ihtiyaçlarını da karşılaması gibi özelliklerinden dolayı su ürünleri tüketimine yönelmiştir (Kaya vd., 2004: 365). Su ürünleri sektörü protein açığının kapatılmasında oldukça önemli bir konuma gelmiştir. Bu konum itibariyle 1984'den beri her yıl %11'in üzerindeki büyümeyle, gıda sektörleri arasında en hızlı büyüyen ve gelişen sektör unvanını almıştır (FAO, 2002). Dünyada avcılık yoluyla su ürünleri üretimi kayda değer artış göstermezken, yetiştiricilik yoluyla elde edilen su ürünleri üretiminde önemli oranlarda artış olduğu görülmektedir. Dünya genelinde deniz avcılığında, 2010 yılında elde edilen su ürünleri miktarı yaklaşık olarak 78 milyon ton iken bu tarihten 6 yıl sonra yapılan araştırmalarda ise bu sayının sadece 80 milyon ton olduğu tespit edilmiştir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde ise Dünya geneline bakıldığında 2010 yılında 59,1 milyon ton olan yetiştiricilik üretim miktarı, 2016 yılında 80 milyon tona ulaşarak, %33 oranında bir artış göstermiştir (FAO, 2017). Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise denizlerden ve iç sulardan elde edilen balık ve diğer su ürünlerinin toplam avcılık miktarları 2022 yılında 335.002,9 ton iken, 2023 yılında bu miktar 454.058,6 tona ulaşmıştır. Yetiştiricilikte ise, 2022 yılında toplam miktar 514.805,0 ton, 2023 yılında ise bu miktar 553.862,0 tona yükselmiştir (TÜİK, 2024).

Su ürünleri, dünyanın en büyük hayvansal protein kaynaklarından olduğu için su ürünlerinin yetiştiriciliği önem kazanmış ve yeni metotlar geliştirilerek, su ürünleri üretimi daha verimli hale getirilmek istenmiştir. Balık yetiştiriciliği için, hızlı büyüme yeteneğine sahip ve ortam şartlarına iyi uyum sağlayabilen balıklar tercih edilmektedir (Aksungur ve Çakmak, 2008:1). Hayvanlarda büyüme hızı ve verim gücü yemden yararlanma düzeyi ile doğru orantılıdır (Karademir ve Karademir, 2003:62). Balık üretiminin artırılmasının en verimli şekilde gerçekleştirilmesi, yetiştirilmek istenen balık türünün nasıl beslenmesi gerektiğini bilmek ile sağlanır. Ortamda balıkların tükettikleri besinleri artırarak, daha kısa sürede hem besin değeri açısından daha verimli, hem de ekonomik açıdan önemi olan balıkların kısa sürede daha fazla yetiştirilmesi sağlanabilir (Yılmaz vd., 2002:243). İyi bir beslemede amaç, ucuz ve kaliteli yemlerle en iyi gelişimi sağlamaktır. Olmazsa olmaz besin maddelerinin yanı sıra zorunlu olmayan fakat yeme ilave edildiğinde, yemlerdeki besin maddelerinin hayvanlara bozulmadan ulaşmasını, yemin daha kolay sindirilmesini ve bağırsaklardan emilip vücut

hücrelerine taşınmasını sağlayan, ürün miktarını ve kalitesini arttırarak yemden yararlanma oranını arttıran, bu şekilde ekonomik yarar da sağlayan maddeler, son yıllarda en tartışılan ve üzerinde en çok araştırma yapılan konuların başında gelmektedir (Kutlu vd., 2014: 209). Günümüzde hem insan hem de hayvan beslenmesine dair birçok çalışmada kullanılan probiyotikler de bu katkı maddelerinden biri olarak önem kazanmıştır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde, probiyotikler özellikle üretimi arttırmak ve sudaki patojenleri engelleyerek su kalitesinin iyileştirilmesi için kullanılmaktadır. Ayrıca probiyotikler, kültürü yapılan türün patojenik mikroorganizmalara karşı bağışıklığını geliştirmek, sudaki besin organizmalarının popülasyonunu arttırmak, kimyasalların kullanımını azaltmak, hastalıkların sık sık ortaya çıkmasını engellemek ve sudaki toksik maddeleri ayrıştırarak su kalitesini geliştirmek için de kullanılmaktadır. Probiyotikler ile ilgili yapılan çalışmalarda, bu mikroorganizmaların su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanımlarının, yetiştiriciliği yapılan balıklarda, tür ve yaş ayrımı olmadan yemden yararlanarak; canlı ağırlık kazancı, yaşama oranı ve büyüme performansında artış ve immün sistem üzerindeki olumlu etkileri tespit edilmiştir (Panigrahi vd., 2004: 380; Salinas vd., 2005: 68; El-Haroun vd., 2006: 1480; Kumar vd. ,2006: 1215; Bagheri vd., 2008: 44).

Potansiyel probiyotiklerin gastrointestinal sistemde koloni oluşturabilmesi için pH ve safra toleransları yüksek olmalı ve aynı zamanda bağırsak yüzeylerine yapışma yeteneğine de sahip olmalıdır (Nikoskelainen vd., 2001: 2430). Hidrofobiklik ve oto-agregasyon özellikleri (probiyotik hücreler arasındaki etkileşimi), probiyotiklerin yapışma kapasitesinde ve patojenlerin bağırsakta dışlanması rol oynar (Del Re vd., 2000: 441). Hücre yüzeyi hidrofobikliği, oto-agregasyon kabiliyetini, dolayısıyla probiyotiklerin epitel hücrelerine ve mukozal yüzeylere yapışma ve kolonizasyon kapasitelerini etkileyebilir (Kos vd., 2003: 984).

Bu tez çalışmasında sazan balığının (*C. carpio*) bağırsağından izole edilen bakterilerin, probiyotik özelliklerinin tespit edilmesi için in vitro testler yapılarak, toleranslarına bakılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Su Ürünleri Yetiştiriciliği

Su ürünlerinin gıda olarak kullanımları ilk uygarlıkların öncesine dayanmaktadır. Bu ürünler başlarda yalnızca avcılık ile elde edilirken, ürün miktarının ve tür çeşitliliğinin gün geçtikçe azalması hatta bazı türlerin yok olması ile birlikte ekolojik dengenin bozulması yerini yetiştiricilik kültürüne bırakmıştır.

Akuakültür olarak bilinen su ürünleri yetiştiriciliği, balıklar, yumuşakçalar, kabuklular gibi sucul organizmaların kontrollü veya yarı kontrollü şartlar altında en azından hayatlarının belirli bir kısımlarında üreme, besleme, büyüme, stoklama, ıslah ve muhafaza için yetiştirilmesi olarak tanımlanmaktadır (Akbulut, 2004: 9; Aslan & Gül, 2018: 850). Yani yaşamlarını suda geçiren sucul organizmaların kültür yetiştiriciliği ile dışarıdan bir müdahale yapılarak, kontrollü bir şekilde üretilmesi ve yetiştirilmesidir (Alpbaz, 2005: 107).

Su ürünleri yetiştiriciliği, protein kullanımı için hayvansal gıdaların temel kaynağıdır ve dünya çapında en hızlı gelişen hayvansal gıda üretim sektörüdür (Ottinger vd., 2016: 245; Aslan & Gül, 2018: 850). FAO'nun yayımladığı son rapora göre, 2022 yılında su ürünleri yetiştiriciliği, toplam su ürünleri üretiminin yüzde 51'ini oluşturarak ilk kez avcılık faaliyetlerini geride bırakmıştır. Bu, toplam 94,4 milyon ton su ürünleri yetiştiriciliği üretimi anlamına gelmektedir. 2022 yılında, su ürünleri yetiştiriciliği toplam 130.9 milyon ton üretim yapmıştır. Bu miktarın 94.4 milyon tonu su hayvanlarından oluşmaktadır ve bu da toplam su hayvanı üretiminin %51'ini oluşturmaktadır. Su hayvanı üretiminin %70'i Asya'da, %9'u Avrupa'da, %9'u Latin Amerika ve Karayipler'de, %7'si Afrika'da, %3'ü Kuzey Amerika'da ve %1'i Okyanusya'da gerçekleşmiştir. Çin, toplam su hayvanı üretiminin %36'sını gerçekleştirerek en büyük üretici konumundadır. Çin'i %8 ile Hindistan, %7 ile Endonezya, %5 ile Vietnam ve %3 ile Peru takip etmektedir. Tablo 2.1'de en çok su ürünleri yetiştiriciliği yapılan 10 ülke ve yıllık üretim miktarları verilmiştir. FAO tarafından izlenen deniz stoklarının %62.3'ü biyolojik olarak sürdürülebilir seviyelerde avlanmaktadır. Bu oran, üretim seviyesine göre değerlendirildiğinde %76.9'dur. FAO, su hayvanı üretiminin 2032 yılına kadar %10 artarak 205 milyon tona ulaşmasını ve kişi başına düşen yıllık tüketimin %12 artarak 21.3 kg olmasını öngörmektedir (FAO, 2023).

Bahsi geçen bu büyüme oranları;

- 1- Birçok balıkçılık türünün maksimum sürdürülebilir noktaya ulaşması,
- 2- Gıdaların güvenliği ile ilgili tüketicilerde oluşan endişeler,

- 3- Yüksek protein kaynağı sağlayan, sağlıklı ve düşük kalorili ürün sağlayan gıda sektörüne duyulan ihtiyaç,
- 4- Sucul üremenin, karbondioksit emisyonuna düşük değerlerde etki etmesi gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır (FAO, 2012).

Tablo 2.1. FAO'nun son raporunda en çok su ürünleri yetiştiriciliği yapılan 10 ülke ve yıllık üretim miktarları (FAO, 2024)

Ülke	Üretim Miktarı (Ton)
Çin	63.7 mmt
Endonezya	16.6 mmt
Hindistan	5.7 mmt
Vietnam:	3.6 mmt
Bangladeş	2.2 mmt
Filipinler	2.2 mmt
Güney Kore:	1.9 mmt
Mısır	1.4 mmt
Norveç	1.3 mmt
Japonya	1.1 mmt

* **mmt:** milyon metrik ton

2.2. Sazan Balığı (*Cyprinus carpio*) Genel Bilgi

Gerçek dağılım alanları Güneydoğu Asya ve Çin olan sazan balıkları (*C. carpio*), yapay balık üretiminde büyük bir alanda buldukları için dünyada da önemli bir yere sahiptirler. Sıcağı sevmeleriyle birlikte, soğuğa da dayanıklıdırlar. Böylece değişik çevre koşullarında rahatlıkla çoğalabilirler. 4-30 °C arasındaki su sıcaklığı değişimlerine kısa sürede uyum sağlayabilirler. Optimum büyümelerini ise 20 °C'nin üzerinde gösterirler (Aydın F., 1984: 104). %5'lik tuzlulukta rutin üreme gösterirler (Wood & Ghannudi, 1985; Korkmaz, 2004: 26) ama tuzluluk deneysel olarak %12'ye çıkarıldığında da büyümesini sürdürmektedirler. 5-9 arasındaki pH'larda büyümeleri etkilenmez. Sazan balıklarının oksijen ihtiyacı yüksektir; suyun oksijen seviyesi 5 mg/L'nin altına düştüğünde stres belirtileri gösterebilirler (Pullin, 1986: 264).

Sazanların üremelerini etkileyen en önemli faktör su sıcaklığıdır. Üreme dönemleri ilkbahar, yaz aylarında su sıcaklığının 18-20 °C olduğu dönemlerde maksimum verime ulaşırlar.

Dişi sazan balıkları genellikle sığ alanlarda bitki örtüsünün yoğun olduğu bölgeleri daha korunaklı olduğu için tercih eder ve yumurtalarını bırakırlar. Yapışkan yapıdaki yumurtaların su altı yapılarına yapışmaları onları akıntıdan ve avcılıktan korur. Yumurtaların kuluçka süreleri sıcaklığa bağlı olarak 3 ile 7 gün arasında değişmektedir. Sıcaklığın artması kuluçka süresini kısaltır. Larvalar, yumurtadan çıktıkları ilk birkaç gün yumurta kesesindeki besinleri tüketerek hayatta kalırlar. Yumurta kesesindeki bu besinler tükendiğinde, larvalar planktonlardan beslenmeye başlarlar (Atay D., 1987: 1035).

Sazan balıkları omnivor (hepçil) beslenme alışkanlıklarına sahip oldukları için hem bitkisel hem de hayvansal besinleri tüketebilirler. Günlük besinlerinin büyük bir kısmını su bitkileri olan, algler ve detritus (çürüyen organik maddeler) gibi bitki kaynaklarından sağlarlar. Özellikle protein ihtiyaçları için, böcek larvaları, küçük kabuklular, solucanlar ve küçük balıklar gibi hayvansal besinleri de tüketebilirler. Büyük sazanların bazı küçük balıkları yedikleri de gözlemlenmiştir (Atay D., 1987: 1035). Tükettikleri besin türleri çevresel koşullara ve besin kaynaklarının bulunabilirliğine bağlı olarak değişebilir. Besin kaynakları ve çevresel faktörlere göre büyüme hızları değişse de sazan balıkları hızlı büyümeleri ile bilinirler. Uygun beslenme ve ideal çevresel koşullar altında sazanlar, ilk yıllarında hızlı bir büyüme gösterirler. Birinci yıl sonunda, 15-20 cm uzunluğa ve 200-300 gram ağırlığa ulaşabilirler. Su sıcaklığı ve yem durumuna bağlı olarak hızlı büyüyen bir balıktır. 20-25 yıl hatta 35-40 yıl yaşadıkları ve boylarının 1 m'nin üzerine çıktığı, ağırlıklarının ise 25-30 kg'a ulaşabildiği bildirilmektedir. (Atay & Çelikkale., 1983: 185; Çelikkale., 1988: 460)

2.3. Sazan Balığının (*Cyprinus carpio*) Dünya ve Türkiye'deki Yetiştiriciliği

Sazan üretiminde akarsu, kaynak suyu, göl suyu, yeraltı suyu veya kısaca soğuk olmayan bütün sular kullanılabilir (Atay & Çelikkale., 1983:185). Sazan balıkları hem besin olarak tüketilmesi hem de çeşitli su ürünleri yetiştiriciliği sistemlerinde kullanılması nedeniyle önemli bir tatlı su balığıdır. Yapay ve denetimli koşullara uyum sağlayabilmeleri, besin yelpazelerinin geniş olmasından kaynaklı olarak diğer türlere göre daha rahat beslenmeleri ve uzun yıllardan beri yetiştiriciliğinin yapılması ile dünyada en çok yetiştiriciliği yapılan kültür balıklarının içerisinde yer alır (Sarıhan, 1976: 19). İlk olarak yetiştiriciliğe alınan alabalıktan (*Salmonidae* türleri) sonra yetiştiriciliğe alınan türlerin başında sazan balığı gelmektedir. Ülkemizde 1970 yıllarından itibaren sazan ve alabalık ile başlayan kültür balıkçılığı günümüzde çipura (*Sparus aurata*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve diğer alternatif türlerin üretimi ile hızla gelişmektedir (Alpbaz, 2005: 107).

Dünya genelinde sazan balığı yetiştiriciliği, özellikle Asya'da önemli bir yere sahiptir. 2023 yılı itibarıyla toplam sazan üretimi 25 milyon metrik tonu (mmt) aşmıştır. Çin, bu üretimin en büyük kısmını gerçekleştirerek 16.7 mmt'nin üzerinde bir üretim yapmıştır. Hindistan ise 6.2 mmt ile Çin'i takip etmektedir. Diğer ülkeler ise toplam yaklaşık 3 mmt üretim gerçekleştirmiştir (GSA, 2024). Türkiye’de ise sazan üretiminin büyük kısmı Ege, İç Anadolu ve Güney Anadolu bölgesinden sağlanır. Doğal göller olan Eğirdir, Beyşehir, Ulubat, Manyas, Akşehir, İznik ve Gölarmara gölleri ile daha sonra yapılan çalışmalarla balıklandırma işlemi yapılan yüzlerce baraj ve göletlerimizde sazan balığı varlığını sürdürmektedir (Çelikkale, 1988: 460; Emre, 2004: 18). Türkiye’de TUİK tarafından yayınlanan son raporda 2014-2023 yılları arasındaki aynalı sazanların (*C. carpio specularis*) üretim miktarları (ton) Tablo 2.2’de verilmiştir. (TUİK, 2024)

Tablo 2.2. Aynalı sazan yetiştiricilik miktarı (ton)

Yıl	Ürün Miktarı (ton)
2014	157
2015	206
2016	196
2017	233
2018	212
2019	203
2020	173
2021	171
2022	293
2023	216

2.4. Probiyotik ve Probiyotiğin Önemi

Latince “pro” ve “bios” kelimelerinden türetilmiştir ve “yaşam için” anlamına gelmektedir. Probiyotikler, konukçusunun doğal mikroflora özelliklerini iyileştirerek, onun sağlığı üzerinde olumlu etkiler yapmak için bağırsak sisteminin mikrobiyal florasını değiştiren

mikroorganizmalardır (FAO, 2001). Probiyotikler canlı sağlığına yaptıkları olumlu etkiler dışında ayrıca son ürüne kazandırdıkları ‘raf ömrünü uzatma’ gibi özelliklerle hem üreticiye hem tüketiciye kolaylık sağlamaktadır. Sahip oldukları lipolitik, proteolitik ve β -galaktozidik aktiviteleri ile de sindirime yardımcı olmaktadır (Prado, vd., 2008: 113). İnsan ve hayvan sindirim sistemi mikroflorasının büyük bir kısmını oluşturan probiyotikler, Gram pozitif (+), basil şeklinde bulunan bakterilerdir. Spor oluşturmeyen bu bakteriler katalaz negatif özellikte ve laktik asit üretme yeteneğindedirler (Huq, vd., 2013: 911).

Probiyotikler bağırsak ve vajen florasında patojen mikroorganizmaların çoğalmasının engelleyerek dengeyi sağlar. Böylece immün sistemin şekillendirmesiyle birlikte intestinal epitel homeostazında bazı mineral ve vitaminlerin biyoyararlanımını artırır, serum lipid düzeyini dengeler, bağırsak motilitesini ve geçirgenliği düzenler.

Probiyotikler bugün birçok hastalıkta ve patolojik durumda kullanılmaktadır. Gastrointestinal enfeksiyonların önlenmesi ve tedavi olarak insan normal florasının tekrar oluşturulması için her geçen gün daha fazla kabul görmektedir. Klinik uygulamada en fazla gastroenteritlerin oluşumunu engellediği ve bunun tedavisi için kullanıldığı görülmektedir (Yıldırım vd., 2021: 605).

Kullanım alanlarından biri olan akuakültürde uygulanmaya başlaması da özellikle son yıllarda oldukça önem kazanmıştır.

2.5. Probiyotiğin Su Ürünleri Yetiştiriciliğindeki Yeri

Sürekli artan dünya nüfusuna ek olarak olumsuz ekolojik koşullar nedeniyle de hayvansal gıdaya ihtiyaç artmaktadır. Yetiştiriciliğinin ve eldesinin kırmızı et kaynaklarına göre daha hızlı olması, besin değerinin yüksek ve kaliteli olması, maliyetinin de daha uygun olması nedeni ile de su ürünlerine talep artmıştır. Talep artışı karşısında, diğer hayvan cinslerinin yetiştiriciliğinde de sıklıkla kullanılan, gelişmeyi teşvik edici antibiyotikler kullanılmıştır. Bu antibiyotikler, buldukları ortamı zararlı mikroorganizmaların etkilerinden koruyan kimyasallardır. Yem içerisine katılarak verilen antibiyotik sıklığına bağlı olarak balıklarda önemli derecede kalıntılar kalmaya başlamıştır. Bu kalıntılara bağlı olarak mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı direnç kazanmaya başlamıştır. Bu durum mikroorganizmalar ve antibiyotikler arasında taşınarak, hastalıkların sağaltımında kullanılan antibiyotiklere karşı çapraz direnç oluşturmaktadır (Adıyaman, vd., 2010:57). Bu nedenle önce Avrupa Birliği ülkelerinde daha sonra da ülkemizde 1 Ocak 2006 tarihinden itibaren antibiyotik kökenli büyüme uyarıcılarının yem katkı maddesi olarak kullanımı yasaklanmıştır. Bunun üzerine su

canlılarının üretimine katkı sağlayarak daha hızlı gelişmeye teşvik etmek için bitkisel veya hayvansal bazı bileşiklerden yararlanılmaya başlanmıştır (Alak, vd., 2012:62).

Stres durumlarında bozulan bağırsak florasının düzenlenmesi ve büyüme teşvikinin devam edebilmesi için probiyotiklerin, hayvanların yemlerine katkı maddesi olarak entegre edilmesi yaygınlaşmaya başlamıştır. Yine probiyotiklerin ilk olarak 1970'li yıllarda hayvanların büyümesini desteklemek için "hayvanların bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek onlara yararlı olan canlı mikrobiyal yem katkıları" olarak tanımlanmıştır (Sullivan, vd., 2002: 313). Sindirim bölgesinden sürekli su geçişi olduğu için balık ve kabuklu deniz ürünlerinin sindirim sistemi mikrobiyotası dış çevre ile doğrudan bağlantılıdır (Turgut, vd., 2007: 13). Bakteriler sindirim kanalı boyunca hastalıklara neden olduğundan, bu bakterilere karşı koruma ve sindirim sisteminin iyi çalışması için gerekli normal mikrobiyotaya ve bunların yan ürünlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Gismondo vd.,1999: 287). Genel olarak probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar suda yaşayan canlıların vücudunda doğal olarak bulunan ve dışardan gelen mikrobiyotasından izole edilebilir (Balcazar vd., 2006: 175; Rollo vd., 2006: 167).

Probiyotikler konakçının normal mikrobiyotasının hem gelişimini hem de stabilitesini olumlu yönde etkiler ve patojenlerin kolonizasyonu engeller. Bağırsak epiteli üzerindeki destekleyiciliği ile mukozal bariyerini etkiler ve bağışıklık sisteminin hem spesifik hem de spesifik olmayan bileşenlerini uyararak daha yüksek büyüme sağlar ve yem verimine katkıda bulunur. Probiyotikler, bağırsak bozukluklarını ve bağırsaklarda bulunan anti-beslenme faktörlerinin ön sindirilmesini önleyerek besinlerin daha yüksek oranlarda kullanımını artırır. Probiyotiklerin çalışma mekanizmaları şu şekildedir;

- 1- Patojen bakterilerden önce bağırsak lümenindeki villuslara ulaşarak, patojenlerin sindirim sisteminde barınmalarını önlemek,
- 2- Laktik asit, asetik asit, propiyonik asit vb. çeşitli organik asitler üreterek ortam pH'ını düşürüp, bağırsak mikrobiyotasını dengede tutmak,
- 3- Laktaz, lipaz, proteaz vb. çeşitli enzimlerin yanı sıra, B ve K vitaminleri üreterek genel sağlığı dengeleyerek sindirim sürecini desteklemek,
- 4- Lizozim, hidrojen peroksit gibi antibakteriyel maddeler üretmek,
- 5- Sindirim sistemindeki antikor düzeylerini arttırmak,
- 6- Makrofaj aktivitesini arttırmak ve bağışıklık sistemini güçlendirmek (Kutlu, vd., 2014: 209).

Probiyotikler, bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek konakçı hayvanda yararlı etkiler oluşturan canlı mikrobiyal yem katkı maddeleridir (Kutlu, vd., 2014: 209).

2.6. Probiyotiklerin Belirlenmesinde Dikkat Edilmesi Gerekenler

Probiyotik seçimi yapılırken öncelikle seçilen probiyotiğin konakçı canlıya yarar sağlayabilecek olması göz önünde bulundurulur. Probiyotik bakterinin etki mekanizması bilinerek, diğer probiyotikler ya da patojenler ile etkileşim ve rekabetlerine hakim olunmalıdır. Probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmalarda bulunması gereken özellikler şunlardır;

- Probiyotikler, biyolojik etkilerini gösterebilmeleri için bağırsak mukozasına tutunabilme yeteneğine sahip olmalıdırlar (Sağdıç, vd., 2004: 224)
- Düşük pH, safra tuzları, lizozim aktivitesi gibi olumsuz koşullar altında bu stres ortamlarından etkilenmeden metabolize olabilmelidir.
- Kanserojenik ve patojenik bakterilerin etkilerini azaltmalı ya da engellemelidirler.
- Antimikrobiyal etkilere sahip maddeler üretmelidir.
- Antibiyotiklere dirençli olmalıdır, bağırsaktaki antibiyotiklerden etkilenmeden, antibiyotiğe bağlı olarak ortaya çıkan problemlerde tedavi amaçlı kullanılabilir.
- Son ürünlere entegre edildiğinde besin değerini ve ürünün kalitesini düşürmemelidir.

Bir mikroorganizmanın probiyotik özelliklere sahip olup olmadığı in vitro yapılan deneylerle belirlenebilmektedir. Bu deneyler mikroorganizmaların probiyotik olma potansiyelini ortaya koymaktadır fakat in vivo deneylerle de bu özellikleri desteklenmelidir.

2.7. Probiyotik Suşların Belirlenmesinde Kullanılan In Vitro Testler

Bir mikroorganizmanın probiyotik olup olmadığını anlamak için birçok in vitro test yapılabilmektedir. Bunlar; mide ortamına direnç, safra tuzuna tolerans, antibiyotik duyarlılık testi, bağırsak yüzeyine tutunma gibi testlerden oluşmaktadır (Tuomola vd., 2001: 394; FAO, 2002). Bu testler bakterilerin farklı karakterizasyonlarını ortaya koyarak mikrobiyotaya adapte olabilmelerini ve probiyotik olarak kullanım potansiyellerini ortaya koymaktadır.

2.7.1. Mide Ortamına Direnç

Probiyotik bakteriler, bağırsağa giden yolculuklarında önce mideden geçerler. Mide ortamı pH'ı ortalama 1,5 ve 3.0 arasında olduğu için mideden geçtikten sonra canlılıklarının devam edip etmediği test edilmelidir. Yapılan bazı çalışmalarda mide pH değerinin 2 olması çok seçici bir ortam oluştururken, pH değerinin 3 olduğu ortamlarda ise farklı bakterilerin üreyebildiği görülmüştür. Bu nedenle pH değeri 2.5 uygun ortam olarak belirlenerek tolerans

testlerinde kullanılmaktadır (Dunne vd., 2001: 388; Özden, 2004; Yavuzdurmaz, 2007; Akman, 2009: 19).

Bu testin yapılma aşamalarında, mide pH'sındaki solüsyonlar hazırlanmakta ve bu solüsyonlara mikroorganizmalar inkübe edilmektedir. Ardından belirli sürelerin sonunda agar besiyerine ekim yapılarak mikroorganizmaların farklı asidik koşullardaki sağ kalım miktarı ölçülmektedir. Farklı tip ve konsantrasyonda enzimler seçilip kullanılır ancak sindirim modellerinin hepsinde işlem sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmaktadır (Dunne, vd., 2001: 388; Argyri. vd., 2013; Elcioglu, & Kunduhoglu, 2014: 63; Çomak, vd., 2016: 159).

2.7.2. Safra Tuzu Toleransı

Safra tuzları sindirim esnasında karaciğerde kolesterolden sentezlenerek safra kesesinden bağırsağa salınır. Safra tuzları, yağların sindirimi ve emilimi konusunda önemli rol oynar. Bu asitler, mikroorganizmaların aktiviteleri üzerinde kimyasal bozulmalara neden olurlar. Asitlerin mikroorganizmaları etkileyen bu özelliğinden dolayı, muhtemel probiyotik suşların da bağırsaklarda fonksiyon gösterebilmeleri için safraya karşı dirençli olmaları ve gastrointestinal sistemde hayatta kalabilmeleri gerekmektedir. Laboratuvar ortamında probiyotik adayı mikroorganizmaların safra tuzlarına toleransı incelenirken genellikle ilgili besiyerindeki %0,3, %0,5 ve %1 konsantrasyonlu ortamlarda gelişimi belli saat aralıklarla (0., 2. ve 4. saat) takip edilmektedir (Prasad vd., 1998: 994; Dunne vd., 2001: 389; Akman 2009: 16; Önal, 2010: 33; Zago, 2011: 1034; Elcioglu ve Kunduhoglu, 2014: 33). Dunne, sığır ve domuz safrası üzerinde bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada kullandığı *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarının, sığır safrasına direnç gösterirken domuz safrasına direnç göstermediğini tespit etmiştir (Dunne, 2001: 387)

2.7.3. Antibiyotik Direnci

Laktik asit bakterileri farklı yapıdaki antibiyotiklere karşı direnç gösterebilirler (Gad vd., 2014: 26). Antibiyotik direnç geni, mikroorganizmalar arasında transfer edilebilir. Bu direnç geninin herhangi bir patojene aktarımı yapıldığında, antibiyotik ile tedavi edilecek bir hastalık sürecinin tedavisi zorlaşır.

Probiyotik olarak laktik asit bakterileri içeren ürünler oldukça yüksek sayılarda bulunmaktadır ve bunların kullanım alanları çok yaygındır. Bu sebeple kullanılan probiyotik suşlar, antibiyotik direnç genlerinin de aslında birer taşıyıcısı olarak görev almaktadırlar (Hummel 2007: 734; Meral & Korukoğlu, 2014: 76). Yani probiyotik suşlar, birer antibiyotik geni taşıyıcısı olduğu için antibiyotik direncine sahip olmaları istenen bir durum değildir. Bu

yüzden test aşamalarında antibiyotik direnci testleri de yapılmaktadır. Antibiyotik direnç testleri, klasik disk difüzyon testi (DD), minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) testi ve otomatik antimikrobiyal hassasiyet testi şeklinde ve moleküler temelli olarak da ilgili genin PCR metotları kullanılarak taraması ile gerçekleştirilmektedir (Hummel vd., 2007: 734; De Melo Pereira vd., 2018: 2065). Ampisilin, vankomisin, gentamisin, kanamisin, streptomisin, eritromisin, klindamisin, tetrasiklin, kloramfenikol antibiyotiklerinin kullanıldığı çalışmada, *Lactobacillus reuteri* suşu, en yüksek inhibisyon değerini 64 (mg/l) ile kanamisin ve streptomisinde gösterirken, vankomisinde inhibisyon değeri gözlemlenmemiştir. Tetrasiklin 16 (mg/l) ile ikinci yüksek inhibisyonu gösterirken, gentamisin 8 (mg/l), kloramfenikol 4 (mg/l), ampisilin 2, eritromisin ve klindamisinde 1 (mg/l) inhibisyon değeri görülmüştür (EFSA, 2012).

2.7.4. Bağırsak Yüzeyine Tutunma

Tutunma, probiyotik bakterilerde bulunması gereken en önemli özelliklerinden biridir. Probiyotikler, mide asidi ve safra tuzlarına karşı direnç gösterip bağırsağa geldiklerinde ilk olarak bağırsak mukus tabakasına temas ederler. Probiyotiklerin buradan kayıp gitmemeleri için bu tabakaya tutunmaları gerekir. Bu tutunma ile patojenlerin bağırsak yüzeyine tutunmaları engellenir, probiyotiklerin sindirim sisteminde kalma süreleri nispeten uzayarak immün sistemin aktive edilmesi ve zarar görmüş bağırsak epitelinin daha kolay iyileşmesi sağlanabilir (Önal vd., 2005: 3; Çomak vd., 2016: 159).

Probiyotiklerin bağırsak yüzeyine tutunmaları hücre yüzeyinin agregasyon (kümeleşme) ve hidrofobik özellikleri ile de ilişkilidir. Bakteriler, agregasyon yetenekleri sayesinde hücreye tutunarak kolonize olabilirler. Agregasyon testleri, aynı türe ait mikroorganizmaların birbirlerine tutunarak oluşturdukları hücre kolonilerinin tespiti için oto-agregasyon, farklı türe ait mikroorganizmaların birbirine tutunarak oluşturdukları hücre kolonilerinin tespiti için ise koagregasyon olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Probiyotikler oto-agregasyon yetenekleri ile bağırsak epitel hücrelerine tutunabilmekte, koagregasyon yetenekleriyle, patojenlerin kolonizasyonunu önlemektedirler (Önal, 2010: 2; Bilginer, vd., 2019: 320). Hücre yüzeyi hidrofobikliği, probiyotiklerin mukozal yüzeylere yapışma yeteneklerini artırarak, konakçı üzerinde daha uzun süre kalabilmelerini ve daha etkili olmalarını sağlar. Bu nedenle, probiyotiklerin hücre yüzeyi hidrofobikliği, onların patojenlere karşı rekabet yetenekleri, bağışıklık sistemini modüle edebilmeleri ve bağırsak bariyer fonksiyonunu iyileştirebilmeleri gibi faydalarıyla doğrudan ilişkilidir. Monteagudo-Mera ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada, *Lactobacillus rhamnosus* GG ve *Lactobacillus acidophilus* NCFM suşlarının Caco-2 bağırsak epitel hücrelerine tutunma yetenekleri

değerlendirilmiştir. Sonuçlar, her iki suşun da Caco-2 hücrelerine başarılı bir şekilde tutunduğunu, ancak *L. rhamnosus* GG suşunun, *L. acidophilus* NCFM'ye kıyasla daha yüksek bir tutunma oranı gösterdiğini ortaya koymuştur.

2.7.5. Hemolitik Aktivite

Hemolitik aktivite testleri, izole edilen probiyotik suşlarının, kan hücrelerine zarar verme potansiyelini belirlemek amacıyla yapılır. 37°C' de 24 saat aktiveleştirilen izolatlar, %5 koyun kanı içeren agar a inoküle edilir. İnoküle edilen petri ler 24 saat etüv cihazında inkübasyona bırakılır. 24 saat sonunda etrafında yeşil zon oluşumu görülen koloniler α -hemolitik, berrak zon oluşumu β -hemolitik, zon oluşumu olmaması ise γ hemolitik aktiviteye sahip olarak değerlendirilmiştir (Maragkoudakis vd., 2006: 191).

Hemoliz, patojenler arasında hastalık yapıcı olarak görülen yaygın bir faktördür. Alfa (α) hemolitik patojenler hemoglobini tam olarak parçalayamaz, Met-Hemoglobine kadar parçaladığı için besiyerinde yeşil renkli bir zon oluşumu gözlemlenir ve bu gerçek bir hemoliz olarak kabul edilmez. Beta hemoliz (β -hemoliz), kırmızı kan hücrelerinin parçalanmasına neden olur. Bu yüzden, inoküle edildiği kanlı agarda koloni etrafı şeffaf bir görünümde olur. Dolayısıyla hemoliz, patojenik mikroorganizmalar arasında bilinen bir hastalık faktörü olduğu için probiyotik bakterilerin hemolitik aktiviteye sahip olmaması istenir. Bu yüzden hemolitik aktivite testi probiyotik belirleme aşamalarında bir ön koşul olarak kabul edilmektedir (FAO/WHO, 2002).

Lactobacillus plantarum suşları üzerinde yapılan çalışmada, *L. plantarum* MJM60319, MJM60298 ve MJM60399 suşlarının hemolitik aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir (Palaniyandi vd., 2017: 203).

2.7.6. Antioksidan Aktivite

Antioksidanlar, vücutta bulunan veya dışarıdan alınabilen maddelerdir. Bu maddeler oksidatif stres sürecini azaltma veya önlemede rol oynayan bileşiklerdir. Oksidatif stres, vücuttaki serbest radikallerin hücrelere zarar vermesine neden olan bir süreçtir (Pham vd., 2008: 90). Antioksidan testleri, bir maddenin veya organizmanın antioksidan aktivitesini ölçmek için yapılır. Antioksidanlar, özellikle doğal antioksidanlar, antioksidan aktivite yoluyla oksidatif stresi azaltma yetenekleri sayesinde insan sağlığına faydalı olabilirler (Hung vd., 2004: 1583). Antioksidanlar ve fenolik bileşikler açısından zengin gıdalar; oksidatif hasarı önleyici ve tedavi edici özellikleri sayesinde gıda üretiminde artan bir kullanım alanı bulmaktadırlar (Öğüt, 2014: 26). Brand-Williams ve arkadaşları tarafından, 1995 yılında farklı bileşiklerin antioksidan

aktivitesini değerlendirmek için kullanılan bir yöntem olan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) süpürme aktivitesi bulunmuştur. Bulunan bu aktivite, Sanchez ve arkadaşları tarafından 1998 yılında revize edilerek kullanılmaya başlanmıştır (Okan vd., 2013: 52).

Antioksidan aktivite testi ile antioksidan tarafından DPPH serbest radikaline, proton transferi sonucunda oluşan reaksiyon, 517 nm'de absorbansın azalması nedeniyle renk değiştirir. Oluşan renk değişimi, spektrofotometre ile yapılan ölçümde tespit edilebilir (Okan vd., 2013: 52).

2020 yılında süt ürünlerinden elde edilen *Lactobacillus* probiyotik suşlarının antioksidan özellikleri değerlendirilmiş ve bu değerlendirme sonucunda, probiyotiklerin güçlü antioksidan özelliği sergilediği tespit edilmiştir (Ural & Yüksekdağ, 2020: 16)

2.7.7. Fenol Toleransı

Birçok bitki kaynaklı gıdada doğal olarak bulunan fenol bileşikleri, ayrıca insan bağırsaklarında proteinlerin sindirimi sonucunda oluşan aminoasitlerin deaminasyonu sonucunda da oluşabilmektedir. Ortamda fenol konsantrasyonunun yüksek olması probiyotik bakteriler üzerinde toksik etkiye sahip olabilir. Bu durum da probiyotik bakterilerinin hayatta kalarak bağırsakta kolonize olma yeteneklerini olumsuz yönde etkileyebilir. Fenol direncine sahip probiyotik suşları, fenol içeren gıdalar tüketildiğinde veya bağırsakta fenol oluşumu sırasında hayatta kalabilir. Bu nedenle, probiyotiklerin etkinliğini arttırarak, gastrointestinal sistemde hayatta kalma şanslarını yükseltmek için fenol direnci, önemli bir özellik olarak değerlendirilmiştir. Fenol dirençli probiyotikler, bu tür ortamlarda bile etkili bir şekilde çalışabilir, böylece probiyotiklerin yararları artabilir (Xanthopoulos vd., 2000: 211; Salminen vd., 2004:362)

Probiyotik bakteri izolasyonu için verimli bir kaynak olan melestandan Todorov ve Dicks (2005) tarafından izole edilen *L. plantarum* suşunun fenole karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir.

2.7.8. Lizozim Toleransı

Lizozim, çeşitli vücut sıvılarında (tükürük, gözyaşı vb.) ve bağırsak epitel hücrelerinde doğal olarak bulunan bir enzimdir. Vücudun doğal savunma mekanizmasının bir parçasıdır, bakterilerin hücre duvarını parçalayarak, bakterileri yok eder (Selsted & Ouellette, 2005: 551).

Probiyotik bakteriler vücuda alındığında mide asidi ve safra tuzları gibi lizozime de maruz kalırlar. Lizozim gibi antibakteriyel maddelere karşı direnç geliştirmelidir. Bu yüzden probiyotik suşun, bağırsakta etkili bir şekilde kolonize olup çoğalabilmesi için lizozime karşı

dirençli olması beklenir. Probiyotik suşların lizozime direnç göstermesi, bağırsak florasında bulunan patojenler ile rekabetlerini ve bu patojenleri inhibe etmelerini kolaylaştırır. Bu durum, patojenlerin büyümesini engeller ve bağırsak sağlığını destekler.

Yıldırım ve Tuncer'in 2022 yılında yaptıkları çalışmada, starter kullanılmadan üretilen sucuklardan izole edilen *Pediococcus acidilactici* ve *P. pentosaceus* *Pediococcus* suşlarının 100 ppm lizozim içeren MRS broth besiyerinde 24 saat inkübe edildikten sonra, canlılık oranlarının %90.90 ile %107.40 arasında olduğunu rapor etmişlerdir.

2.8. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Etkili Olan Başlıca Probiyotik Türler

Suda bulunan kimyasal ve biyolojik en ufak değişiklikler, su ürünleri yetiştiriciliğini etkiler. Bundan dolayı son zamanlarda su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik kullanımına dair istek artmıştır. Probiyotikler zararlı besinlerdeki bileşimlerin potansiyel detoksifikasyonunu sağlayarak beslenmeyi düzenler, amilazlar ve proteazlar ile hazmedilemeyen diyetle potansiyel unsurları parçalar, vitaminlerin üretimi ve konağın bağışık sistemini uyararak canlıya yardımcı olur (Kesercodi vd., 2008: 5). Heterotrofik bir bakteri olan probiyotik bakterilerin, nitrifikasyon, denitrifikasyon ve oksidasyon gibi kimyasal faaliyetlerde bulunarak balık ve karides atıkları, yem artıkları, plankton ve diğer organik kalıntıları karbondioksit, nitrat ve fosfata ayırdığı bilinmektedir (Xiang-Hong, vd., 1998).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotiğin kullanılmaya başlamasındaki ana amaç; balığın deri, mukus veya bağırsak florasını oluşturan faydalı ve patojenik mikroorganizmalar arasında istenilen ilişkinin düzenlemesi veya yeniden oluşturmasıdır. Probiyotikler, patojenlere karşı antimikrobiyal maddeler üretir. Balıkların büyümesine veya patojenlere karşı korumasına yardımcı bir etkiye sahip olmak amacıyla adhezyon ile balıkta yerleşme özelliğine sahiptirler. Laktik asit üreten mikroorganizmalar, inhibitör maddeler ve hidrojen peroksit üreterek zararlı birçok mikroorganizmanın gelişimini inhibe etmektedir (Karademir & Karademir, 2003: 65; Yaman & Esendal, 2004: 8; Turgut, vd.,2007: 16).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan *Lactobacillus rhamnosus* ve *Carnobacterium*' dur. Gram pozitif ve anaerob olan bu mikroorganizmalar patojen özellik taşımamaktadır. *Lactobacillus* bakterilerin mide asidik ortamına daha dayanıklı olduğu ve bağırsağa geçiş esnasında canlılıklarını koruyabildikleri bildirilmiştir (Yalçın, 1996).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan *Flavobacterium* sp. ve *Bacillus* spp. probiyotiklerinin algler üzerinde *Chaetoceros gracilis* kültürüne karşı gelişmeye, yetiştiricilik ortamındaki patojen sayısında azalmalara ve sudaki mikrobiyallerin popülasyonunu

etkileyerek su kalitesinin iyi yönde etkilenmesine neden olduğu belirlenmiştir (Suminto, vd., 1997; Xiang-Hong, vd., 1998). *Pseudoalteromonas undina* ise karidesler üzerinde etkilidir. Karides (*Panaeus monodon*) türlerinde patojenik virüslere karşı koruma geliştirerek ölüm oranlarında düşüğe neden olur (Vine vd., 2006: 411). Bu türler dışında balık bağırsak florasına uygun bazı probiyotikler, etkili oldukları balık türü ve etki parametreleri Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3. Balık bağırsak florasına uygun bazı probiyotikler, etkili oldukları balık türü ve etki parametreleri

Balık Türü	Probiyotik	Etki Parametresi
Gökkuşluğu alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Carnobacterium inhibens</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> patojenine karşı koruyucu etki (Burr, vd., 2005: 429)
Gökkuşluğu alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ve <i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> patojenine karşı koruyucu etki ve bağışıklık sistemine destek (Burr, vd., 2005: 429)
Avrupa çipurası (<i>Sparus aurata</i>)	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Yaşam oranlarında artış ve büyümeleri üzerine olumlu etki (Burr, vd., 2005: 429)
Çipura balığı (<i>Sparus aurata</i>)	<i>Lactobacillus fructivorans</i> ve <i>Lactobacillus plantarum</i>	Larvalarında görülen ölümlerde azalma (Carnevali vd., 2004: 382)
Kalkan balığı (<i>Scophthalmus maximus</i>)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Yaşama oranında artış (Gatesoupe, 1994: 280)
Kalkan balığı (<i>Scophthalmus maximus</i>)	<i>Vibrio poteolyticus</i>	Kalkan juvenillerine yemle verildiğinde protein sindirimini gelişme (De Schrijver & Ollivier, 2000: 111).
Kalkan balığı (<i>Scophthalmus maximus</i>)	<i>Lactobacillus plantarum</i> ve <i>Lactobacillus helveticus</i>	Büyüme performansında artış (Gatesoupe, 1991: 239).
Avrupa yılan balığı (<i>Anguilla anguilla</i>)	<i>Bacillus toyoi</i> ve <i>Enterococcus faecium</i> SF68	Edwardsiellosis hastalığından kaynaklanan ölümlerde azalma (Chang ve Lui, 2002: 313).
Nil tilapiyası (<i>Oreochromis niloticus</i>)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Yemden yararlanma ve ağırlık artışı sağlama (Burr, vd., 2005: 429)
Salmonidler (<i>Salmonidae</i>)	<i>Carnobacterium spp</i>	<i>A.salmonicida</i> , <i>Vibrio ordalii</i> , <i>Yersinia ruckeri</i> enfeksiyonundan etkilenen salmonidlerde ölüm oranlarında azalma, iştahta artış, yüzgeç ve kuyruk çürümesinde azalma (Robertson vd., 2000: 242).

3. MATERYAL ve METOD

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

Habitatından elde edilen 4 adet *C. carpio* (Sazan Balığı), laboratuvara getirilerek, hassas terazi ile tartılmış, boy (standart, çatal, total) ölçümleri alınmıştır.

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

Taze balıkların %70'lik alkol ile yüzeyleri steril edilmiştir. Balıklar anal boşluktan makas ile kesilerek bağırsaklar çıkarılmıştır. Çıkarılan bağırsaklar, etiketlenen beherglaslara koyulmuştur.

3.3. *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 'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Su banyosundan alınan örnekler 500 µl' 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 yayma işlemi yapılmıştır. Ekimler 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.

5.gün örnekler çıkarılarak üremelere bakılmış ve nutrient ve TYG (C/N) besiyerlerindeki üremelerde morfolojik olarak farklı olduğu belirlenen koloniler seçilerek, 4'e böldüğümüz nutrient agar besiyerine steril tahta çubuklar kullanılarak çizgi ekim yöntemi ile aktarılmış ve 30 °C de inkübatöre bırakılmıştır. Morfolojik olarak farklı olan koloniler seçilerek tek çizgi ekimleri yapılmış ve saf olarak elde edilen bakterilerin yoğun ekimleri gerçekleştirilmiştir. Saf elde edilen izolatlar %25'lik gliserole aktarılarak -20 °C'de stoklanmak için kaldırılmıştır.

3.4. İzole Edilen Bakterilerin Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.4.1. Düşük pH Tolerans Testi

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 10^8 CFU/ml hücre olacak şekilde, hidroklorik asit (HCl) kullanılarak pH’ı 2.5 ve 6.5’e ayarlanan MRS broth besiyerine, her bir izolat 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 petriplerdeki hem MRS agar yüzeyine hem de nutrient agar yüzeyine inoküle edilerek, eküvyon çubuk ile yayma işlemi yapılmıştır. İnokülasyonu yapılan petripler 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Lakra vd., 2020: 3). MRS agar besiyerinde üreme görülmemiştir bu yüzden besiyeri olarak nutrient agar ile devam edilmiştir. İnkübyasyon süresi dolan numunelerin bakteri popülasyon miktarı, koloni sayım yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışma üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.4.2. Safra Toleransı Testi

Safra Toleransı testi izolatlarının safra tuzu varlığında hayatta kalma yeteneklerinin belirlenmesi için yapılmıştır. Safra tuzu olarak sodyum taurokolot ($C_{26}H_{44}NNaO_7S$) ve safra tuzu karışımı (%50 kolik asit sodyum tuzu ($C_{24}H_{39}NaO_5$) ve %50 deoksikolik asit sodyum tuzu ($C_{24}H_{39}NaO_4$) 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 besiyerileri erlenlere konularak üzerine %0.1 ve %0.3 (w/v) oranlarındaki safra tuzu karışımlarından 1ml alınarak eklenmiştir. Daha sonra aktifleştirilen izolatlardan 10^8 CFU/ ml hücre ile inoküle edilerek 37 °C’ye çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 6 saatlik inkübasyon sürecinin 2. ve 6. saatlerinde numunelerden 100 µl alınarak nutrient agar besiyerine aktarılmış, eküvyon çubuk ile yayma işlemi yapılarak, gruplar şeklinde 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Koloni sayım yöntemi ile canlı koloni sayısı belirlenmiştir (Lakra vd., 2020: 3). Çalışma iki tekrarlı yapılmıştır.

3.4.3. Lizozim Tolerans Testi

İzolatların lizozim duyarlılığını belirlemek için belirli oranlarda (0, 100, 200, 300 µg/ml) ile hazırlanmış ve hazırlanan çözelti MRS broth besiyerine aktarılmıştır. Hazırlanmış lizozim, 10 ml MRS ortamına 1 ml olacak şekilde aktarılmıştır. İzolatlar 37 °C’de 24 saat çalkalamalı etüvde inkübe edilerek aktifleştirilmiş ve aktifleştirilen izolatlar, 10^8 CFU/ ml hücre şeklinde MRS brotha inoküle edilmiştir. 24 saat boyunca 37 °C’de çalkalamalı etüve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübyasyon 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 (Tilwani vd., 2022: 2). Çalışma iki tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

3.4.4. Fenol Tolerans Testi

Fenol direncinin testi için, fenol (C₆H₅OH) (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. İzolatlar, 37°C’de 24 saat çalkalamalı etüvde inkübe edilerek aktifleştirilmiş ve bu izolatlar 10⁸ CFU/ ml hücre şeklinde MRS brotha inoküle edilerek 24 saat çalkalamalı etüvde 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin sonunda bakteriyel hücrelerin büyümesi, 600 nm’de spektrofotometrede ölçülmüştür (Padmavathi vd., 2018: 358). Çalışma üç tekrarlı olarak yapılmıştır. (Padmavathi vd., 2018: 358)

3.4.5. Oto-agresyon Testi

İzolatlar 37 °C’de 24 saat çalkalamalı etüvde inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. 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 spektrofotometrede ölçümleri yapılarak, kayıt edilmiştir. Çalışma iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Oto-agresyon yüzdesi, formül 1- $(Adt/A0) \times 100$ kullanılarak hesaplanmıştır. Burada; Adt, tanımlanmış zaman aralıklarındaki (1, 2, 4 ve 6 saat) absorbansı ve A0 ise 0 saat zamanındaki okumaya karşılık gelmektedir (Angmo vd., 2016: 429).

3.4.6. Hücre Yüzeyi Hidrofobiklik Testi

Bu test ile bir izolatın hidrokarbonlara bağlanma kabiliyeti ölçülmüştür. 37 °C’de 24 saat çalkalamalı etüvde inkübe edilerek aktifleştirilen izolatlar, PBS (pH: 7.2) kullanılarak 600 nm’de OD’si 0.5’e ayarlanmıştır. 1.5 ml hücre süspansiyonuna eşit miktarda toluen (C₆H₅CH₃) ve hegzadekan (C₁₆H₃₄) ayrı ayrı ilave edilerek vortekslenmiştir. Süspansiyon 25 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. 30 dakika sonunda sulu faz toplanmıştır ve 600 nm’de spektrofotometrede ölçümleri yapılmıştır. Çalışmalar üç tekrarlı olarak 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 (Tilwani vd., 2020: 2).

3.4.7. Antimikrobiyal Etkinlik Testi

Antimikrobiyal etkinlik, kuyu difüzyon deneyi kullanılarak belirlenecektir. *Escherichia coli* ATCC 11229, *Bacillus cereus* RSKK 863, *B. subtilis* RSKK 244, *Micrococcus luteus* NRRL B-4375, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 patojen bakterileri kullanılmıştır. Patojen bakteriler, nutrient brotha aktarılmış, *M. 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 süzülmüştür. İzolatlar kuyucuklara yerleştirilmiş ve plakalar 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, kuyucukların etrafındaki inhibisyon bölgesi değerleri kumpas ile ölçülmüştür (Gunyakti & Asan-Ozusaglam, 2019: 262). Çalışma üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.8. Antioksidan Aktivite

10⁹ CFU/ml hücre içeren 0,5 ml izolatin hücresi, PBS (pH; 7,0) içinde süspansiyon edilmiştir. 0,1 mM DPPH'nin (C₁₈H₁₂N₅O₆) (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) 2 ml taze yapılmış metanolik çözeltisi ilave edilmiştir ve 30 dakika karanlıkta bırakılmıştır. Çözelti inkübasyondan sonra santrifüjlenmiş ve absorbans 517 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapılarak değerleri kaydedilmiştir. Çalışma iki tekrarlı olarak 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 (Devi vd., 2008: 2).

3.5. Güvenlik Değerlendirme Testleri

3.5.1. 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 (Mani vd., 2021: 4707).

3.5.2. Hemolitik Aktivite

İzolatlar, RBC hücreleri üzerinde hemoliz testine tabi tutulmuştur. İzolatlar, %5 (a/h) koyun kanı içeren defibrine edilmiş kanlı agar plakasına sürme yöntemiyle ekimleri 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 olarak gerçekleştirilmiştir (Kuebutornye vd., 2020: 415).

Tez Çalışmasında Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

Nutrient Agar

Nutrient Agar	23,04 g
Distile Saf Su	1000 ml

Ortamın Hazırlanışı: 1000 ml saf su içine 23,04 g nutrient agar hassas terazide tartılarak eklenir ve berraklaşincaya 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 g
Distile Saf Su	1000 ml

Ortamın Hazırlanışı: 1000 ml saf su içine 66,7 g MRS agar hassas terazide tartılarak eklenir ve berraklaşincaya 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 g
Glukoz	5 g
Yeast Extract	5 g
Agar	15 g
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.

Nutrient Broth

Nutrient Broth	8 g
Saf Su (dH ₂ O)	1000 ml

Ortamın Hazırlanışı: 1000 ml saf su içine 8 gram nutrient broth hassas terazide tartılarak eklenir. Manyetik karıştırıcı üzerine bırakılır. Daha sonra 1 Atm 121 °C’de 15-20 dakika otoklavlanır. Otoklavdan çıkan besiyeri oda sıcaklığında bekletildikten sonra +4 °C’ye kaldırılır.

MRS Broth

MRS Broth	55 g
Saf Su (dH ₂ O)	1000 ml

Ortamın Hazırlanışı: 1000 ml saf su içine 55 gram MRS broth hassas terazide tartılarak eklenir. Manyetik karıştırıcı üzerine bırakılır. Daha sonra 1 Atm 121 °C’de 15-20 dakika otoklavlanır. Otoklavdan çıkan besiyeri oda sıcaklığında bekletildikten sonra +4 °C’ye kaldırılır.

%25'lik Gliserol

Gliserol	25 ml
Distile Saf Su	75 ml

Ortamin Hazırlanışı: 75 ml'lik saf suya mezür ile ölçülerek 25 ml'lik gliserol ilave edilir. Mikropipet ile 1.5 ml alınarak cryo tüplere aktarılan gliserol çözeltisi otoklavlanarak hazır hale getirilir.

Safra Tuzu Karışımı

%3'lük

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

%1'lik

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

Ortamin Hazırlanışı: Sodyum taurokolat ve safra tuzu gerekli ölçülerde hassas terazi ile tartılarak, DDH₂O'ya aktarıldı. Manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılarak kullanıma hazır hale getirildi.

Lizozim (50 mg/ml)

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

Ortamin 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 ve kullanıma hazır hale getirilir.

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 karıştırılarak hazır hale getirildi.

TE Tamponu

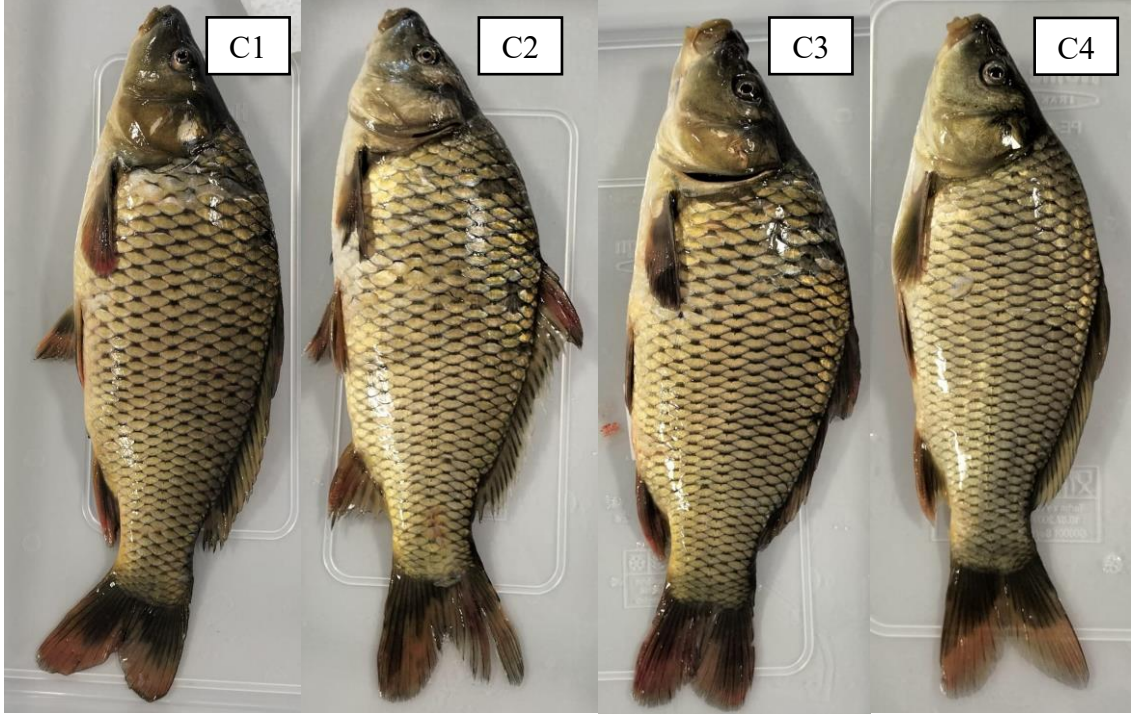
0,5M EDTA, pH 8 (Merck)	2 ml
1M Tris, pH 8	10 ml
DDH ₂ O	1000 ml

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 kullanıma kadar saklandı.

4. BULGULAR

4.1. *Cyprinus carpio* (Sazan Balığı)'nın Temini

Habitatından elde edilen 4 adet *C. carpio* (Sazan Balığı), laboratuvara getirilerek, hassas terazi ile tartılmış, boy (standart, çatal, total) ölçümleri alınmıştır.



Şekil 4.1. *C. carpio* 1 (C1), *C. carpio* 2 (C2), *C. carpio* 3 (C3) ve *C. carpio* 4 (C4) fotoğrafları

Tablo 4.1. *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	Fertil olmayan (Ergin olmayan)	164	18,1	20,3	22,5

4.2. *Cyprinus carpio* (Sazan Balığı)'nın Bağırsak Örneklerinin Eldesi

Taze balıkların solungaçlarından tutularak %70'lik alkol ile yüzeyleri steril edilmiştir. Balık anal boşluktan makas ile kesilmiş ve bağırsaklar çıkarılarak, beherglaslara koyulmuştur.



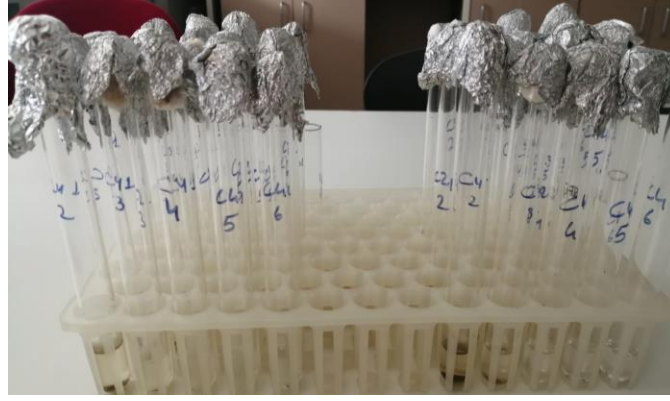
Şekil 4.2. Operkulum açıklıktan tutularak %70' lik etil alkol ile yüzeyi steril edilen *C. carpio*



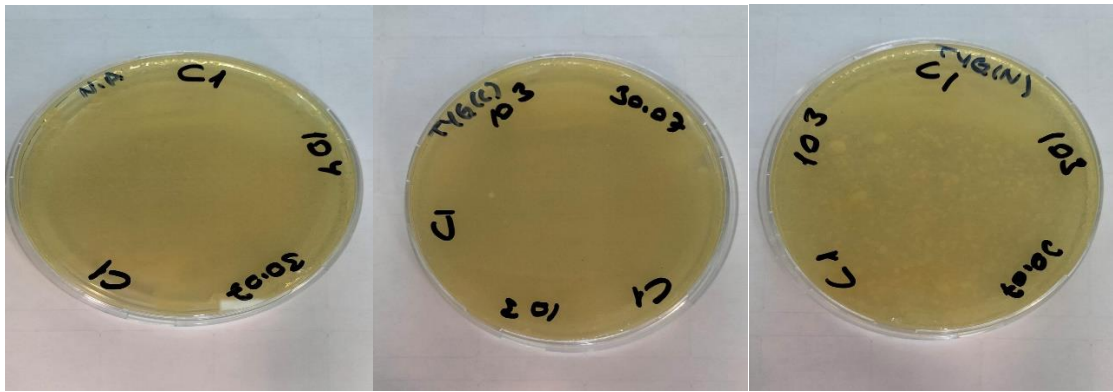
Şekil 4.3. Anal boşluktan girilerek bağırsakların çıkarılması

4.3. *Cyprinus carpio* (Sazan Balığı)'dan Probiyotik Bakteri Gruplarının İzolasyonu

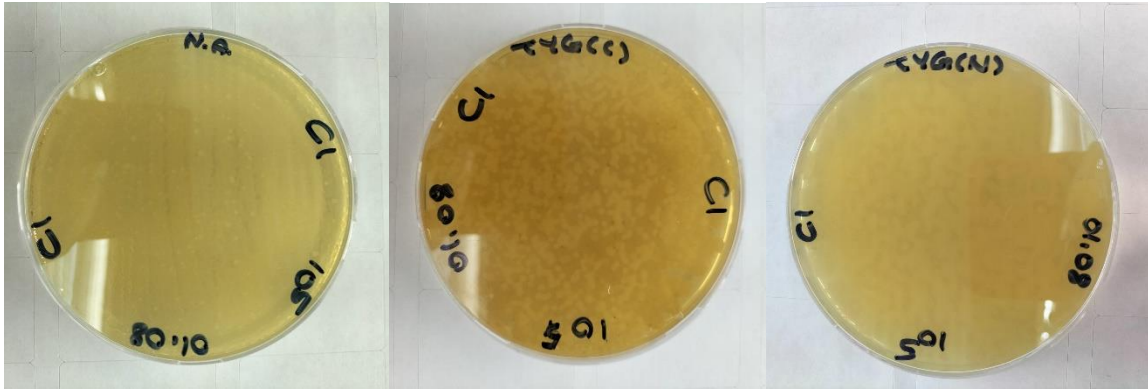
Çıkarılan bağırsakların sıvılarından hassas terazi ile 0,5 gram tartılıp ringer sıvısına koyularak 30 dakika boyunca ritmik hareketlerle sallanmıştır. Daha sonra 60 °C'e ayarlanan su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Su banyosundan alınan örnekler 500 µl'e 1 oranında 10⁴, 10⁵ ve 10⁶'e kadar ringer 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 4.4. Örneklerin 500 µl'e 1 oranında 10^4 , 10^5 ve 10^6 'e kadar ringer içeren tüplerde seyreltilmesi

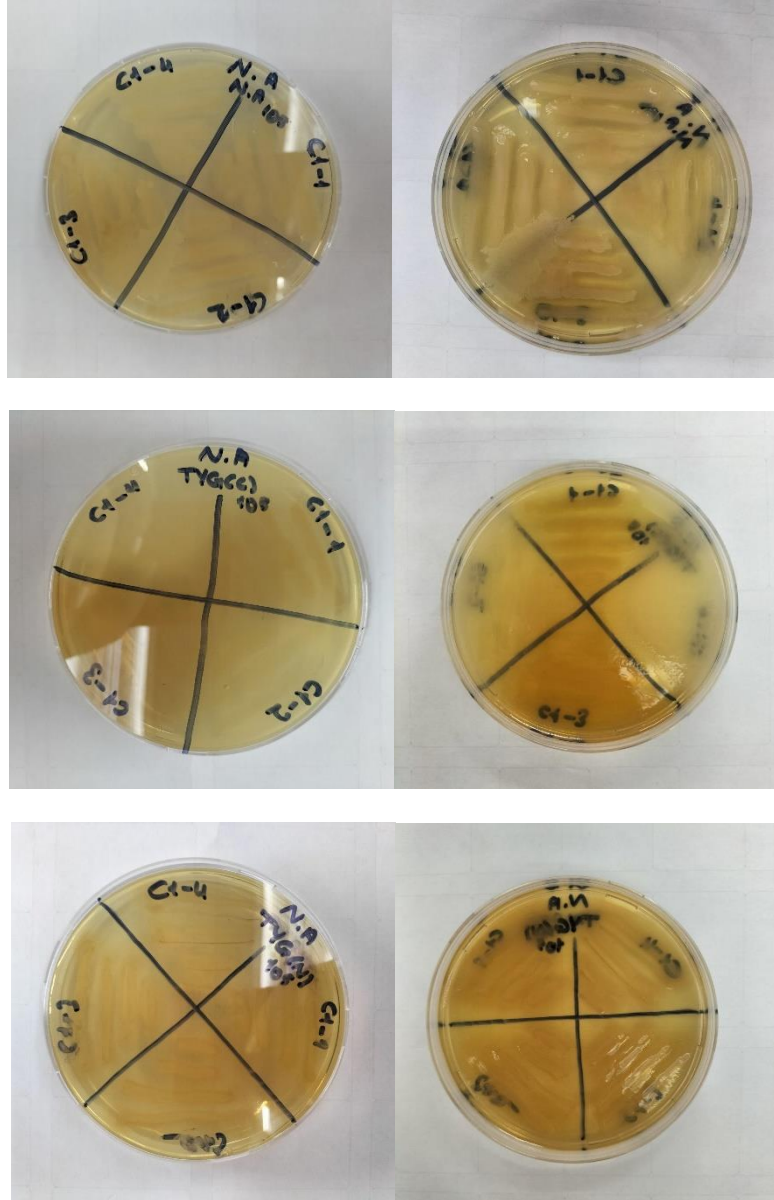


Şekil 4.5. *C. carpio* 1. balığın (C1) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinde 10^3 dilüsyon yayma plaka ekimleri



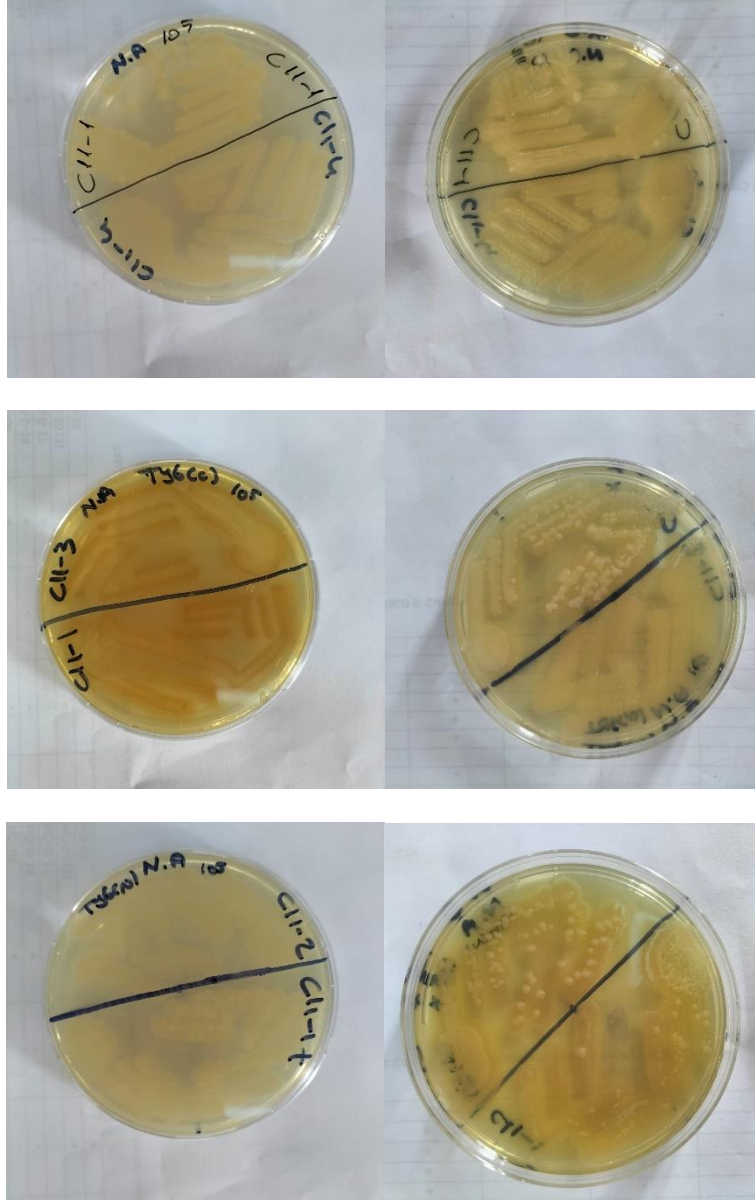
Şekil 4.6. *C. carpio* 1. balığın (C1) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinde seyreltilmiş 10^5 dilüsyon yayma plaka ekimleri

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



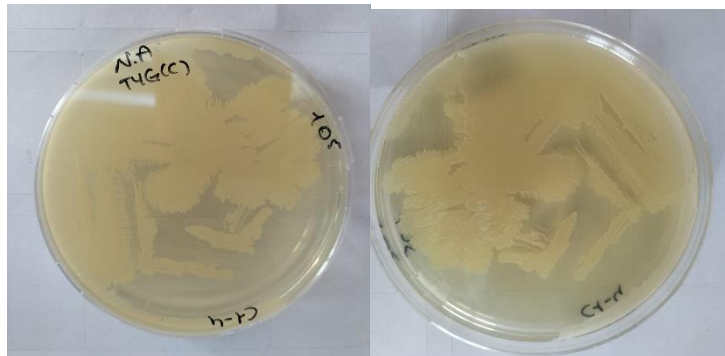
Şekil 4.7. *C. carpio* 1. balığın (C1) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinden nutrient agara çizgi ekim

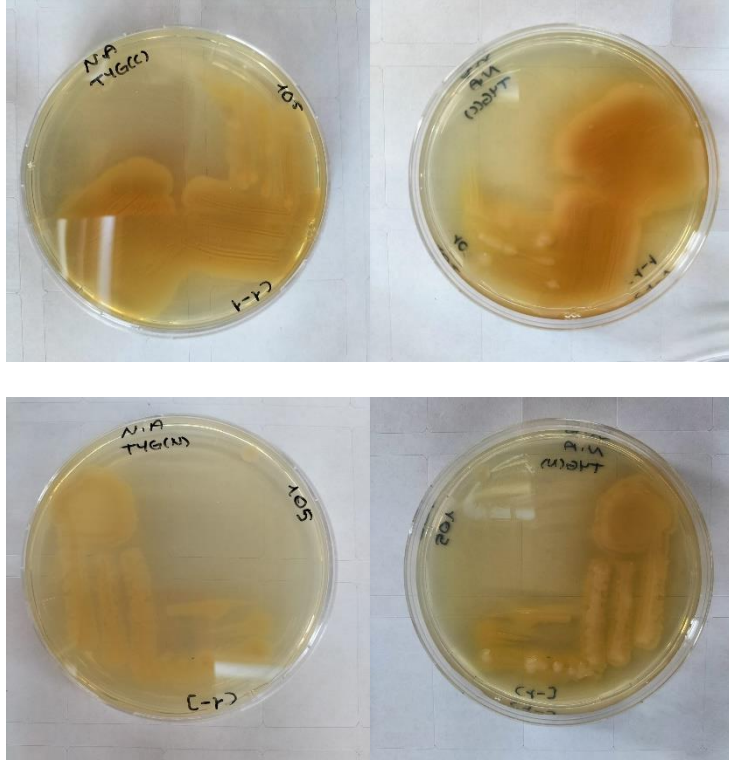
Çizgi ekimlerinde üreyen bakterilerin saf olup olmadığından emin olmak için nutrient agar besiyerleri ikiye bölünerek , morfolojik olarak farklı olan, koloniler seçilmiş ve steril tahta çubuklar kullanılarak tek koloni kültür ekimi yapılmıştır.



Şekil 4.8. *C. carpio* 1. balığın tekrarı (C1₁) nutrient ve TYG agar (C/N) besiyerlerinden nutrient agara tek koloni kültür ekimi

Yapılan kültür ekiminden tek düşen koloniler steril tahta çubuk ile alınarak nutrient agara yoğun ekimleri yapılmıştır.





Şekil 4.9. *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 stoklanarak kaldırılmıştır.



Şekil 4.10. %25'lik gliserole stoklanan izolatlar

4.4. İzole Edilen Bakterilerin Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

4.4.1. Düşük pH Tolerans Testi

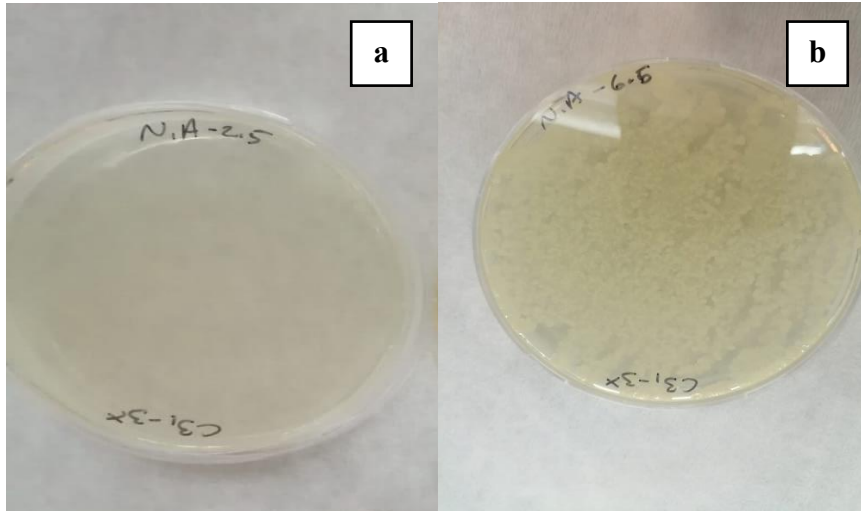
İzolatların pH toleranslarını belirlemek amacıyla, pH 2.5 ve 6.5'a ayarlanan brothlara, aktifleştirilen izolatlar aktarılmıştır ve 24 saatlik inkübasyon sonunda nutrient agar besiyerine inoküle edilerek 24 saat tekrar inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrası 2, 12 ve 24. saatlerde koloni sayımları yapılmıştır. Koloni sayım sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir.

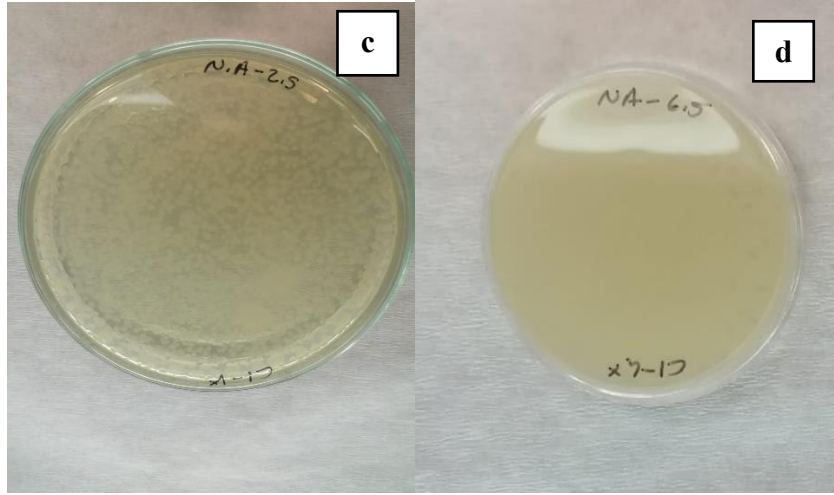
Tablo 4.2. Düşük pH toleransında canlı koloni sayımları

Düşük pH Toleransı

İzolat No:	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 4.2’de de görüldüğü üzere pH 2.5’da üreme genellikle görülmezken, C1-4’te sayılamayacak yoğunlukta üreme görülmüştür. C1-1’de ısımin ve zamanın da etkisiyle koloni sayıları azalırken (pH 2.5’da 2. Saatte 83 koloni, 12. Saatte 54 koloni, 24. Saatte 22 koloni), C4-4’te ise ısı ve zaman olumlu yönde etkileyerek gittikçe koloni sayılarında artış gözlemlenmiştir. pH 6.5’te koloni yoğunluğu daha fazladır, fakat C1-1’ 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 C1-4 izolatında görülmüştür.





Şekil 4.11. Ph:2.5 ve pH:6.5'te 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.

4.4.2. Safra Tolerans Testi

Aktifleştirilen izolatlar, kontrol için stres ortamı oluşturulmayan MRS brotha ve 0.1 ve 0.3 oranında safra tuzu karışımına aktarılmıştır. 2. ve 6. saatin sonunda petriler toplanarak koloni sayımları yapılmıştır (Tablo 4.3; Şekil 4.12.).

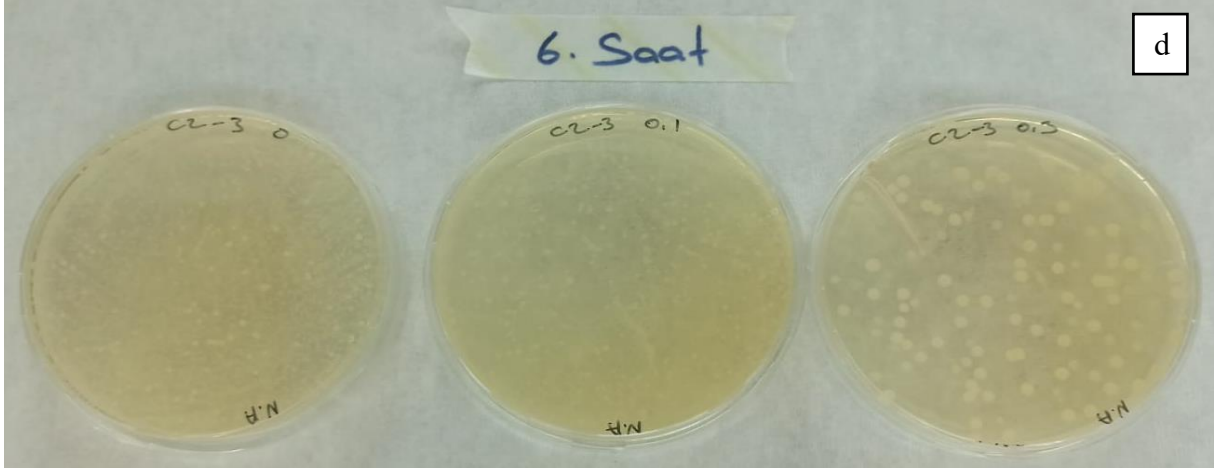
Tablo 4.3. Safra toleransı koloni sayımları**Safra Toleransı**

İzolat No:	2.SAAT			6.SAAT		
	0	0.1	0.3	0	0.1	0.3
C1-1	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme
C1-2	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme
C1-3	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme
C1-4	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme
C2-1	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme
C2-2	Yoğun Üreme	-	-	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme
C2-3	295	185	180	127	105	103
C2-4	354	296	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	441
C3-1	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme
C3-2	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme
C3-3	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme
C3-4	1234	1200	854	514	480	347
C4-1	Yoğun üreme	-	-	Yoğun üreme	-	-
C4-2	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme
C4-3	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme
C4-4	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme	Yoğun üreme

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 belirlenmiştir. C2-3'ün 2.saatteki, 0 safra tuzu konsantrasyonundaki büyüme oranı 295 iken 6. saatteki 0.3 safra tuzu

konsantrasyonunda bu oran 103'e düşmüştür. Bu, C2-3'ün safra tuzuna karşı direncinin sınırlı olduğunu göstermektedir.





Şekil 4.12. 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 sonraki 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.

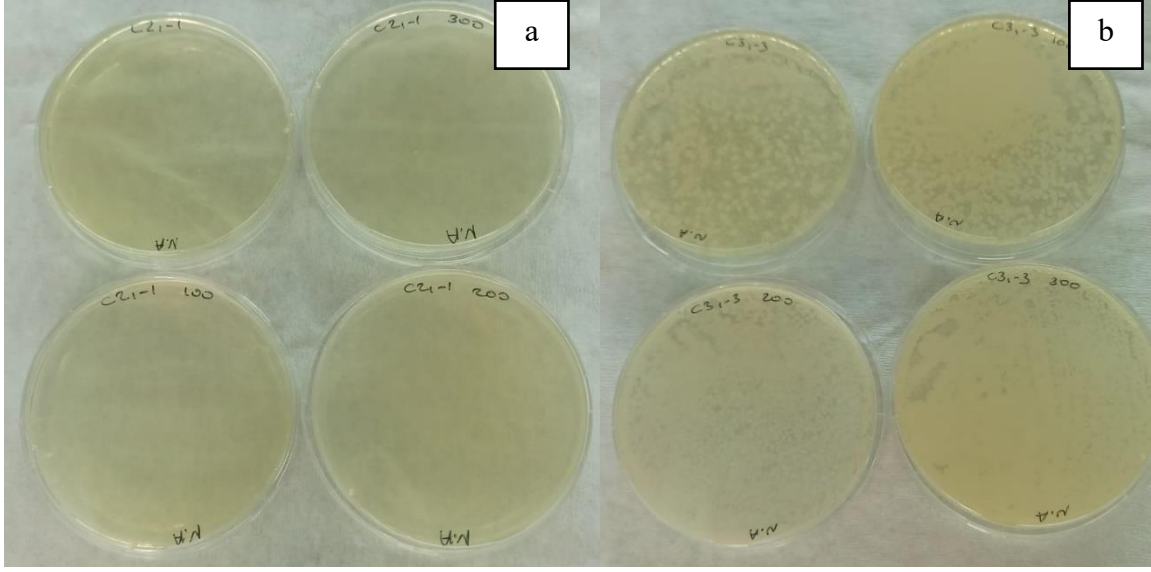
4.4.3. Lizozim Tolerans Testi

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 4.4). Lizozim, bakteri hücre duvarlarını parçalayarak antibakteriyel etki gösteren bir enzimdir.

Tablo 4.4. Lizozim toleransı koloni sayımı

İzolat No:	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 görülmemiştir. 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, C3-4 ve C4-1 izolatlarında lizozim konsantrasyonu arttığında üreme yoğunluğunun arttığı görülmüştür, bu izolatlar lizozime karşı tolerans gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. Lizozim toleransı örnek görseller

- C2-1 izolat, sırasıyla 0, 100, 200, 300 µg/ml konsantrasyonundaki lizozim örneklerinde üreme görülmemiştir.
- C3-3 izolat, sırasıyla 0, 100, 200, 300 µg/ml konsantrasyonundaki lizozim örneklerinde yoğun üreme görülmüştür.

4.4.4. Fenol Tolerans Testi

Aktifleştirilen izolatlar, kontrol için MRS brotha ve konsantrasyon oranı %0.25 ve %0.50'ye ayarlanmış fenol karıştırılmış MRS brotha aktarılarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda bakteriyel hücrelerin büyümesi, spektrofotometrede 600 nm'de ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5. Fenol toleransı spektrofotometre sonuçları

İzolat No:	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 izolatlarda fenol oranları arttıkça büyüme oranları artmıştır. Bu örneklerin fenole dirençli olduğu belirlenmiştir. C1-1 izolatinin spektro ölçümleri sırayla kontrol grubunda 0,265, %0.25 konsantrasyonda 0,294, %0.50 konsantrasyonda 0,342 ve C1-4 izolatu ise sırayla kontrol grubunda 0,366, %0.25 konsantrasyonda 0,375, %0.50 konsantrasyonda 0,387 değerlerini göstermiştir, fenol konsantrasyonu arttıkça ölçüm oranlarının arttığı belirlenmiş ve bu durum izolatin fenole karşı dirençli olduğunu göstermiştir. C1-2 izolatu, fenol konsantrasyonuna karşı nispeten sabit kalarak (kontrol: 0.156, %0.25: 0.146, %0.50: 0.155) kararlılık gösterirken, C1-3 izolatu (kontrol: 0.054, %0.25: 0.044, %0.50: 0.041) ise fenole karşı konsantrasyon artışı ile üremesi azalarak duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir. C2-2 (kontrol: 0.267, %0.25: 0.287, %0.50: 0.320) ve C2-3 (kontrol: 0.303, %0.25: 0.335, %0.50: 0.370), örnekleri fenol konsantrasyonu arttıkça spektrofotometre değerleri artmış ve bu durum suşların fenole karşı dirençli olduğunu göstermiştir. C2-4 (kontrol: 0.058, %0.25: 0.052, %0.50: 0.048), izolatu ise fenol konsantrasyonu arttıkça spektrofotometre ölçüm değeri azalmış ve bu da fenole karşı duyarlı olduğunu göstermiştir. C3-4(kontrol: 0.135, %0.25: 0.103, %0.50: 0.140), izolatu kararsız bir üreme göstermiştir. Bu, C3-4 örneğinin fenol konsantrasyonlarına karşı düzensiz bir tepki verdiğini ifade etmektedir. C4-1 (kontrol: 0.248, %0.25: 0.224, %0.50: 0.221) ve C4-4 (kontrol: 0.313, %0.25: 0.285, %0.50: 0.274) izolatlarında konsantrasyon arttıkça üreme azalmıştır, bu durum izolatlarda fenole karşı duyarlı olduğunu göstermiştir. C4-3 izolatinin değerleri hafif artarak fenole orta düzeyde direnç gösterdiği belirlenmiştir.

4.4.5. Oto-agresyon Testi

Aktifleştirilen izolatlarda OD'leri fosfat tamponlu salin (PBS, pH: 7.2) ile 0.5'e ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında (25 °C) 6 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında üst katmandaki süspansiyon 1 (7. saat), 2 (8. saat), 4 (10. saat) ve 6. (12. saat) saatlerde alınarak, spektrofotometrede 600 nm'de ölçümleri yapılmıştır.

Oto-agresyon yüzdesi, formül 1- $(Adt/A0) \times 100$ kullanılarak hesaplanmıştır. Burada; Adt, tanımlanmış zaman aralıklarındaki (1, 2, 4 ve 6 saat) absorbansı ve A0 ise 0 saat zamanındaki okumaya karşılık gelmektedir. Ölçüm sonuçlarına göre yapılan hesaplamalar Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Oto-agresyon testi formül sonuçları

OTO-AGRESYON TESTİ					
İzolat No:	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 4.6' da oto-agresyon test sonuçlarına göre, pozitif yüzdellik değerler, probiyotik suşlarının belirli bir zaman diliminde oto-agresyon yeteneğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Negatif yüzdellik değerler, örneklerin oto-agresyon yeteneğinin düşük olduğunu veya olumsuz etkilediğini ifade etmektedir. Zamanla değişen değerler ise izolatların oto-agresyon yeteneklerinin zamanla değiştiğini göstermektedir.

C1-1 izolatu 0, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde zamanla bağlanma yeteneğinde sırasıyla 0.048, 50.00, 50.00, 40.62 ve 39.58 olarak azalma gösterdiği belirlenmiştir. C1-2 izolatu 0, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde zamanla bağlanma yeteneğinde sırasıyla 0.328, 115.85, 104.88, 102.44, 105.79 olarak güçlü ve kararlı bir oto-agresyon yeteneğine sahiptir. C1-3 izolatu 0, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde zamanla bağlanma yeteneğinde sırasıyla 0.158, 13.92, -0.63, -5.70, -1.17 olarak, başta da zayıf

bir yapışma yeteneğine sahiptir ve zamanla bu yeteneğin daha da azalmalar görülmüştür. C1-4 izolatu 0, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde zamanla bağlanma yeteneğinde sırasıyla 0.135, 100.74, 101.48, 98.52, 108.89 olarak sürekli yüksek oto-agresyon değerleri göstermiştir. C2-1, 0, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde zamanla bağlanma yeteneğinde sırasıyla, 0.423, -80.09, 105.92, 105.67, 105.43 olarak negatiften pozitif giden değerler ile oto-agresyon yeteneğinde zamanla artış olduğu belirlenmiştir. C2-2, 0, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde zamanla bağlanma yeteneğinde sırasıyla 0.626, -4.1, -19.1, -28.3, -41.7 olarak sürekli negatif değerler göstermiştir, bu durum C2-2 izolatının zayıf oto-agresyon yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. C2-3, 0, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde zamanla bağlanma yeteneğinde sırasıyla 0.064, 107.81, 161.25, 167.19, 159.38'dir, sürekli yüksek değerler göstererek güçlü ve artan bir oto-agresyon yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. C2-4, başlangıçta yüksek değerler verse de sonra negatif değerlere düşmüştür. Bu, C2-4 izolatının 0, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde zamanla bağlanma yeteneğinde sırasıyla 0.141, 133.69, -70.92, -22.70, -22.70 olarak hesaplanmıştır, başlangıçta iyi bir yapışma yeteneği olduğunu ancak zamanla bu yeteneğin kaybolduğunu göstermektedir. C3-1, 0, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde zamanla bağlanma yeteneğinde sırasıyla 0.243, -11.93, -46.91, -76.13, -78.40 olarak hesaplanmıştır, izolatının zayıf oto-agresyon yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. C3-2 örneği 0, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde zamanla bağlanma yeteneğinde sırasıyla -0.008, -61.5, 18.5, -49, -149'dır. Genellikle negatif değerler göstermiştir. C3-3, 0, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde zamanla bağlanma yeteneğinde sırasıyla 0.223, 137.67, -62.78, -55.15, -45.74 olarak hesaplanmıştır. Başlangıçta yüksek, ancak sonra negatif değerler göstermiştir. Bu, C3-3 suşunun başlangıçta güçlü bir yapışma yeteneği olduğunu ancak zamanla bu yeteneğin kaybolduğunu ifade etmektedir. C3-4, 0, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde zamanla bağlanma yeteneğinde sırasıyla 0.133, -68.03, -57.80, -56.60, -42.06 olarak, sürekli negatif değerler vermiştir ve bu durum, C3-4 suşunun zayıf oto-agresyon yeteneğine sahip olduğunu gösterir. C4-1 izolatu 0, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde zamanla bağlanma yeteneğinde sırasıyla -0.153, 158.17, 155.88, 159.48, 162.75'dir. Zamansal artışın her basamağında yüksek ve artan oto-agresyon değerleri göstermiş ve bu özelliği ile güçlü ve artan bir oto-agresyon yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. C4-2 örneği, 0, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde zamanla bağlanma yeteneğinde sırasıyla 0.100, 106.0, 67.00, 15.00, 65.00 şeklindedir. Bu veriler başlangıçta yüksek, ancak sonra dalgalanan değerler göstermiştir. C4-3, 0, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde zamanla bağlanma yeteneğinde sırasıyla 0.425, -71.76, -70.59, -70.59, -71.76 şeklinde, negatif değerler vererek zayıf oto-agresyon yeteneğine sahip olduğunu tespit edilmiştir. C4-4 değeri 0, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde zamanla bağlanma yeteneğinde sırasıyla 0.152, 7.24, 0.00, 4.61, 5.92 olarak genellikle pozitifdir. Bu orta düzeyde bir oto-agresyon yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir.

4.4.9. Hücre Yüzeyi Hidrofobiklik Testi

Bu test ile mikroorganizmaların hidrokarbonlara bağlanma kabiliyeti ölçülmüştür. 37 °C’de 24 saat çalkalamalı etüvde inkübe edilerek aktifleştirilen izolatlar, PBS (pH: 7.2) kullanılarak spektrofotometrede 600 nm’de OD’si 0.5’e ayarlanmıştır. 1.5 ml hücre süspansiyonuna eşit miktarda toluen ve hegzadekan 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 4.7 ’de verilmiştir.

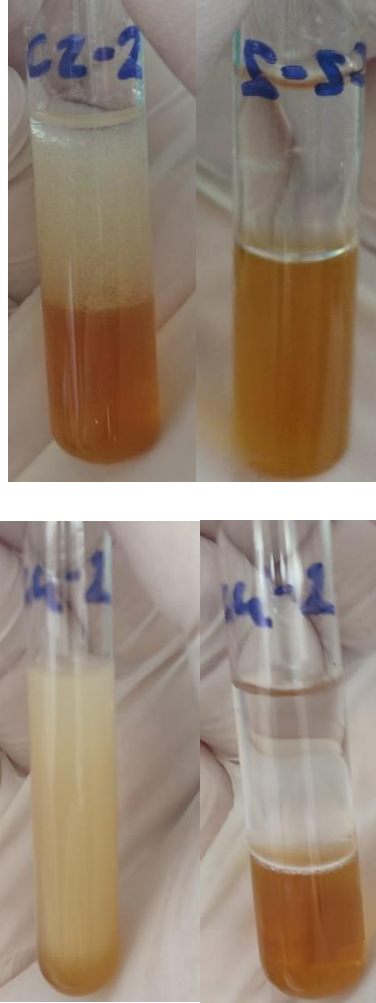
Hücre hidrofobikliği, hücrelerin su itici özelliklerini ve yüzeylere yapışma kabiliyetlerini değerlendirmek için kullanılır. Hücrelerin hidrofobiklik oranının pozitif olması, hücrelerin su itici (hidrofobik) özelliklerinin yüksek olduğunu, negatif değerler ise hücrelerin suyu çekici (hidrofilik) özelliklerinin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

Tablo 4.7. Hücre yüzeyi hidrofobiklik yüzdeleri

Hücre Hidrofobiklik Testi (%)			
İzolat No:	(%)	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 (%175), C1-4 (%88), C2-1 (%90), C2-3 (%94), C2-4 (%91), C3-4 (%100), C4-2 (%212), C4-4 (%213), izolatları yüksek hidrofobiklik özelliği göstermektedirler. Bu izolatların yüzeylere yapışma özellikleri yüksektir. Düşük hidrofobiklik özelliği gösteren izolatlar ise C1-1 (%10), C2-2 (%44), C3-1 (%53), C4-1 (%56) izolatlarıdır. Bu izolatların yüzeylere yapışma kabiliyeti diğer izolatlara göre daha düşüktür. C3-2 (%-124), C3-3 (%-55), C4-3 (%36)

izolatları hidrofilik özellik gösterirler, bu yüzden su çekici özellikleri yüksek, yüzeylere yapışma kabiliyetleri ise düşük olabileceğini ifade etmektedir (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. C2-2 ve C4-2 izolatlarının vortekslendikten ve yarım saatlik inkübasyonundan sonrasındaki görüntüleri

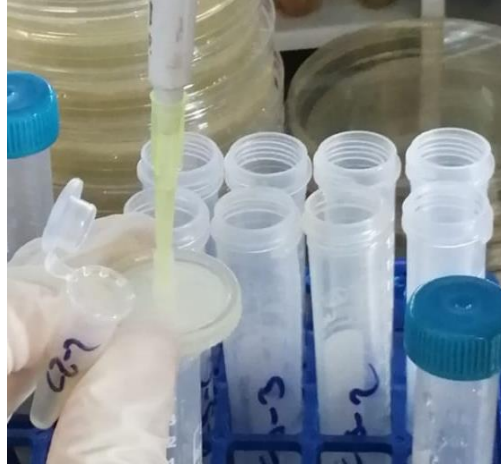
4.4.10. Antimikrobiyal Etkinlik Testi

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 4.8)

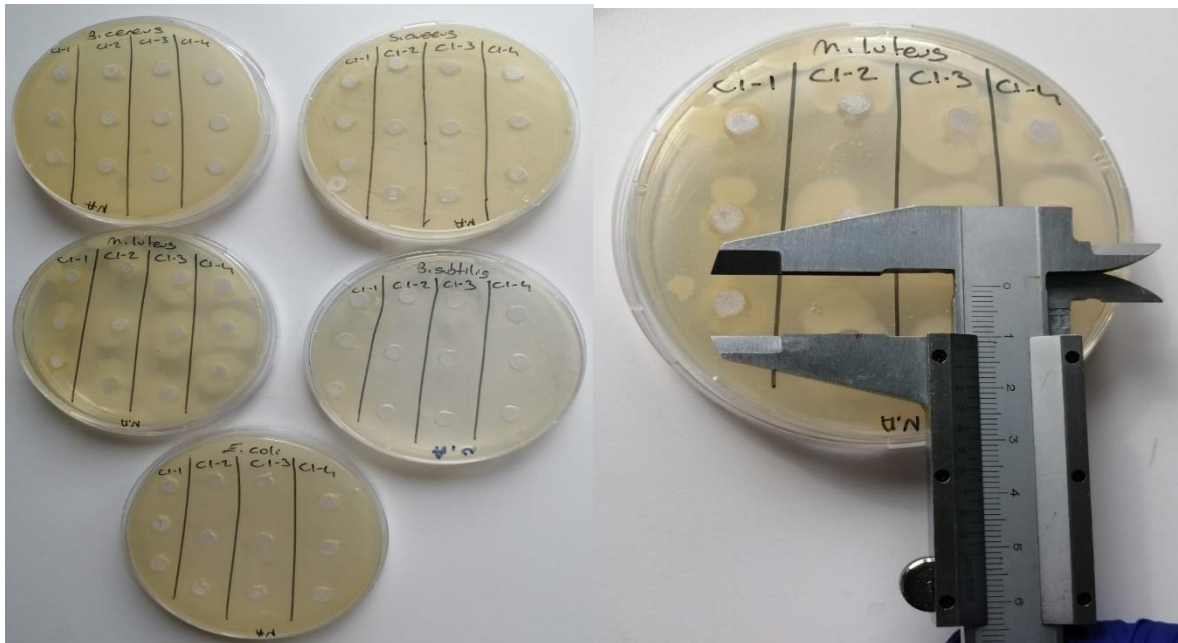
Tablo 4.8. Antimikrobiyal etki zon açıklıkları

ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİK (mm)					
İzolat No:	<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 hiçbirini, *Escherichia coli* ATCC 11229 ve *Bacillus cereus* RSKK 863, patojenlerine karşı antimikrobiyal etkinlik göstermemiştir. C2-2 (11 mm) ve C4-4 (14 mm) suşları *Bacillus subtilis* RSKK 244 patojenine karşı etkinlik göstermiştir. C2-1 suşu, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 patojenine karşı (11 mm) antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. İzolatlar, C1-1 (10,33 mm), C1-2 (13,3 mm), C1-3 (16,6 mm), C1-4 (14 mm), C2-1 (7 mm), C2-2 (6,3 mm), C2-3 (10 mm), C2-4 (6 mm), C3-1 (8 mm), C3-2 (9 mm), C3-3 (8,7 mm), C3-4 (10,7 mm), C4-1 (7 mm), C4-2 (8,3 mm), C4-3 (10,7 mm) ve C4-4 (11 mm) şeklinde *Micrococcus luteus* NRRL B-4375 patojenine karşı antimikrobiyal etkinlik göstermiştir. C4-4 izolatı, geniş spektrumlu bir antimikrobiyal aktivite sergilemiştir.



Şekil 4.15. İzolatların santrifüj sonrası mikro filtreden süzülmesi



Şekil 4.16. C1 serisinin görsel örnekleri

4.4.11. Antioksidan Aktivite

10^9 CFU/ml hücre içeren 0,5 ml izolatin hücresi, PBS (pH; 7,0) içinde süspanse 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.

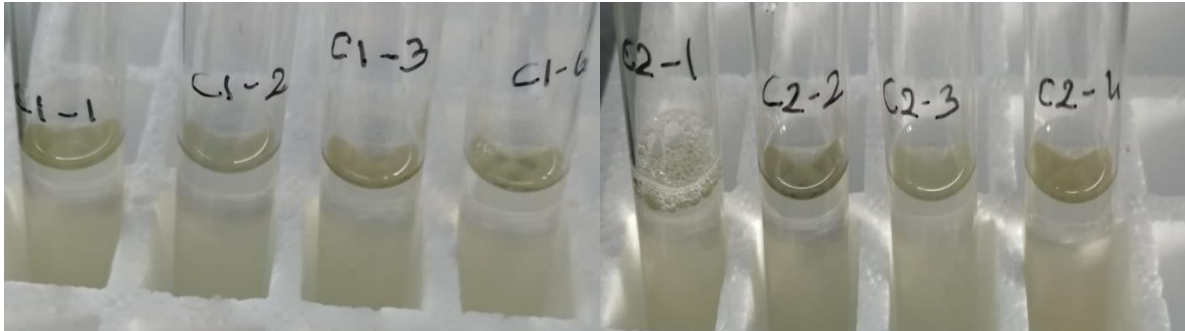
DPPH aktivitesi (%) = $[1 - (A_{\text{örnek}} - A_{\text{körve}}) / A_k] \times 100$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Burada $A_{\text{körve}}$: PBS ve A_k : PBS + DPPH' dir. Elde edilen değerler Tablo 4.9'de verilmiştir.

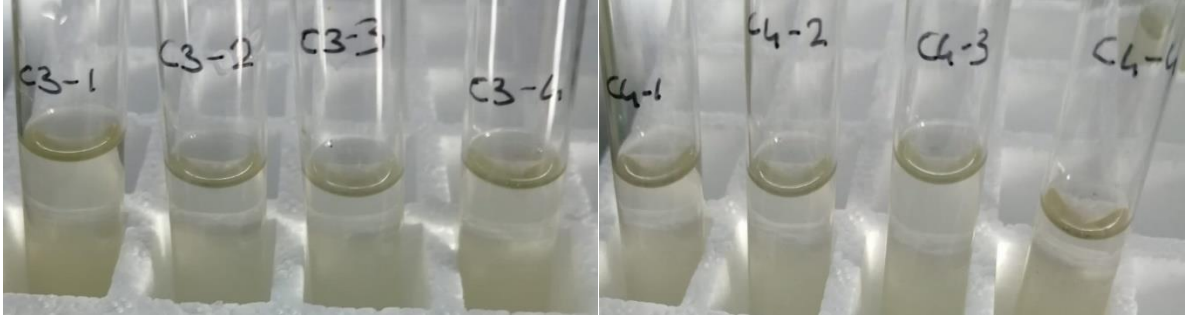
Antioksidan etkinlik, serbest radikalleri nötralize etme kapasitesini ifade eder ve daha yüksek yüzdeler, daha yüksek antioksidan kapasiteyi gösterir.

Tablo 4.9. İzolatların antioksidan % sonuçları

İzolat No:	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 4.17. İzolatların antioksidan deneyinde spektrofotometre ölçümü öncesi görüntüleri

4.5. Güvenlik Değerlendirme Testleri

4.5.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

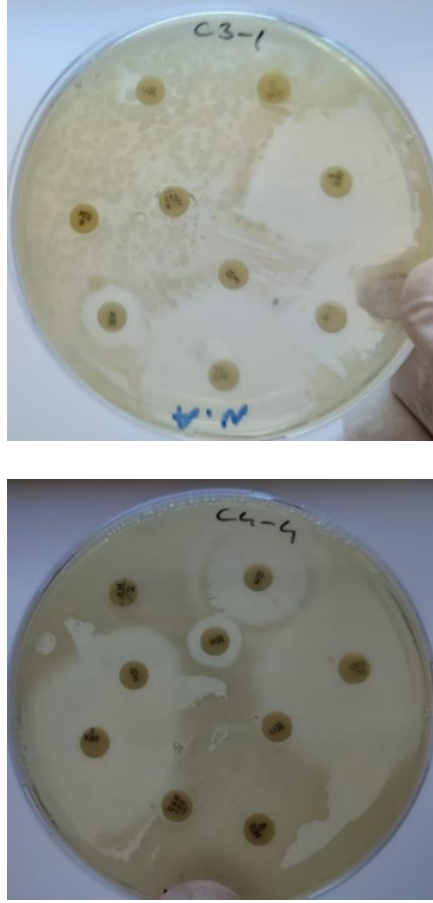
Gece boyunca inkübe edilen bakteri solüsyonları 10^6 CFU/ml'ye seyreltilmiş ve 100 μ l alınarak nutrient agar plakasının yüzeyine yayılmıştır. Antibiyotik diskler plak üzerine uygun şekilde yerleştirilmiş ve 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Plakalar inkübasyondan sonra, izolatların antibiyotiğe duyarlılığını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

Tablo 4.10. İzolatların antimikrobiyal duyarlılık testi zon çapları**ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTİ (mm)**

İzolat No:	Ampicillin (AM2)	Bacitracin (B94)	Carbenicillin (CAR100)	Chloramphenicol (C30)	Eritromycin (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 gelmektedir. 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. Eritromycin (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 kullanılmış ve tüm izolatlar her iki

konsantrasyonda da inhibe olarak geniş inhibisyon zonları elde edilmiştir (20 mm ile 30 mm arasında). Bu sonuç, test edilen bakteriyel suşların bu antibiyotiğe karşı genel olarak hassas olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.18. C3-1 ve C4-4 izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları

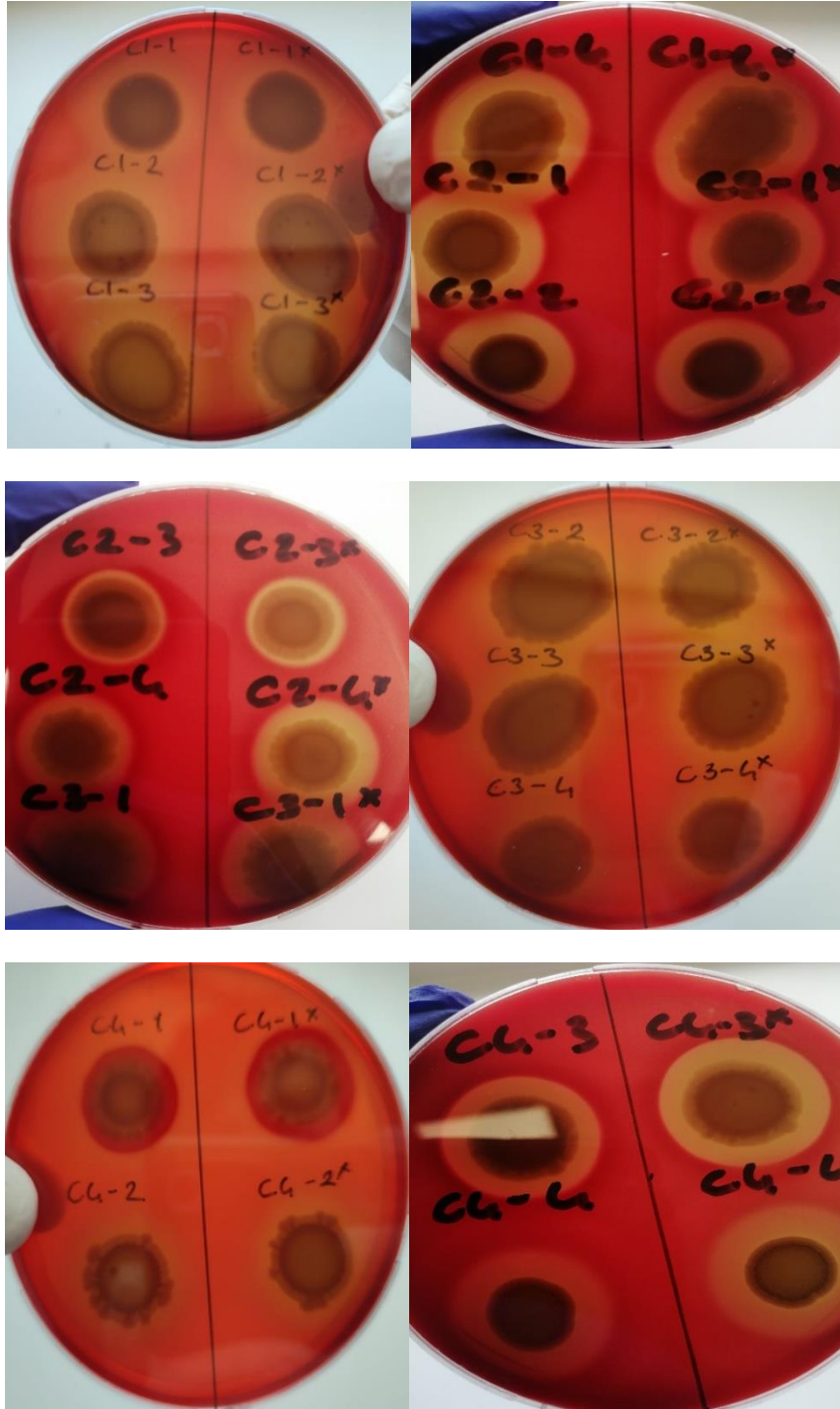
4.5.2. Hemolitik Aktivite

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 48 saatlik inkübasyonun ardından kolonileri çevreleyen belirgin bir hidroliz bölgesinin gelişimi açısından incelenmiştir (Tablo 4.11). 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 etmektedir. β -hemoliz, kırmızı kan hücrelerinin tamamen yıkılması anlamına gelirken, α -hemolizde kısmi yıkımı ifade etmektedir.

Tablo 4.11. Hemolitik aktivite sonuçları

İzolat No:	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 izolatlarn 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 4.19. Hemolitik aktivite sonuçları

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde, dünyadaki hızlı nüfus artışına paralel olarak artan besin ihtiyacına en önemli alternatiflerden biri su ürünleridir. Doğal balık stoklarına yönelim ile balık stokları üzerinde oluşan avcılık baskının azaltılması, ucuz ve bol protein ihtiyacının karşılanmasında, su ürünleri yetiştiriciliğinin önemi artmaktadır. Son yıllarda balık yetiştiriciliği sayesinde su ürünleri üretiminde önemli oranda artış görülmüştür. 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, insan ve hayvan beslenmesi konusunda birçok çalışmada kullanılan probiyotiklerdir. Probiyotikler, yetiştiricilik alanında sudaki patojenleri engelleyerek su kalitesini iyileştirir. Böylece özellikle canlı üretimini arttırmak için yetiştiricilikte kullanılmaktadırlar (Korkut vd., 2003: 555).

Balık yetiştiriciliğinde kullanılabilecek probiyotiklerin belirlenmesine yönelik literatürde çok fazla çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında, Van/ Karasu deresinden yakalanan sazan balıklarının bağırsağından izole edilen bakteri örneklerinin probiyotik olma potansiyelleri incelenmiştir. Dört adet sazan balığından dilüsyon plaka yöntemiyle yapılan izolasyon sonucunda elde edilen izolatların, probiyotik özelliklerini belirlemek amacıyla pH, safra tuzu, lizozim, fenol, oto-agresyon, hidrofobiklik, antimikrobiyal etkinlik, antioksidan etkinlik ve antibiyotik direnci gibi çeşitli parametreler çalışılmıştır.

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 göstermiştir. Literatür çalışmalarına bakıldığında, Guluarte ve arkadaşlarının 2019 yılında, deniz sediment örnekleri ile yaptıkları çalışmada, izole edilen *Kluyveromyces lactis* M3 maya suşunun hücre yüzeyi hidrofobisitesinin yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Oto-agresyon testlerinde, C1-2, C1-4, C2-3, C4-1. izolatları yüksek oto-agresyon yetenekleri nedeniyle bağırsak yüzeyine daha iyi yapışabilme yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir. C1-3, C2-2, C3-1, C3-2, C3-4, C4-3 izolatları ise düşük oto-agresyon yetenekleri nedeniyle bağırsak yüzeyine 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. Pérez-Sánchez ve arkadaşları tarafından 2011'de yapılan bir çalışmada gökkuşağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*), bağırsaklarından izole edilen *Lactobacillus*

plantarum ve *L. fermentum* suşlarının oto-agregasyon yetenekleri incelenmiştir. İnceleme sonucunda, bu suşların yüksek oto-agregasyon kapasitelerine sahip olduğu ve bağırsaklarda kolonizasyon potansiyelinin yüksek olduğu belirtilmiştir. Ramos ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada ise levrek (*Dicentrarchus labrax*) bağırsaklarından izole edilen *Enterococcus faecium* ve *Lactobacillus rhamnosus* suşlarının oto-agregasyon yetenekleri değerlendirilmiştir. Bu suşların yüksek oto-agregasyon yeteneklerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Probiyotikler için açıklanan sağlığı geliştirici özellikler, çoğunlukla iyi bir yapışma ve ardından bağırsak yolunda kolonizasyon ile ilişkilidir (Mohanty vd., 2019: 212). Balık safirasına toleransı, karaciğerden gelen safranın salgılandığı balık bağırsağında gelişip, yaşayabilmesi bir probiyotik için önemli bir özelliktir (Balcázar vd., 2008: 190). Bu tez çalışmasında, izolatlar genel olarak safraya tolerans gösterdiği belirlenmiştir. C1 ve C3 izolatlarının bütün serileri tüm koşullarda ve saatlerde yoğun üreme göstererek safra tuzuna karşı oldukça dirençli olduğu ve büyümelerinin bu koşullardan etkilenmediğini belirlenmiştir. C2-3 izolatının 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 izolatı safra tuzuna karşı direncinin sınırlı olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, bir yüksek lisans tez çalışması olarak japon balıklarından (*Carassius auratus*) izole edilen *Cutaneotrichosporon jirovecii* jpn01 ve *Debaryomyces nepalensis* jpn02 maya suşlarının da safra tuzlarına karşı toleranslı oldukları tespit edilmiştir (Gülşen, 2022: 9). Ghosh ve arkadaşları tarafından 2017 yılında nil tilapyası (*Oreochromis niloticus*) üzerine yapılan çalışmada, *Pichia kudriavzevi* ONF7.1C maya suşunun, seyreltilmiş safra suyunda sırasıyla %12,5 ve %7,5'ini tolere ettiği tespit edilmiştir (Ghosh vd., 2017: 153). Çetin ve Çırpıcı tarafından 2023 yılında yapılan bir çalışmada, maya suşları farklı safra konsantrasyonlarında ve sıcaklıklarda test edilmiştir. %0.3, %0.5 ve %1 konsantrasyonundaki SDB besiyerinde 26 °C'de *Pichia fermentans* M6 ve *Saccharomyces cerevisiae* M20 izolatlarının gelişme göstermediği, *Kluyveromyces marxianus* M24 izolatının ise %0.3 ve %0.5 safra içeren SDB besiyerinde gelişme gösterirken, %1 safra konsantrasyonunda gelişme göstermediği rapor edilmiştir (Çetin & Çırpıcı, 2023: 1008). Yüzey deniz suyundan izole edilen, *Debaryomyces hansenii* BCS004 maya suşunun %10 safra konsantrasyonuna toleranslı olduğu saptanmıştır (Reyes- Becerril vd., 2021: 2719). Ghosh ve arkadaşları tarafından (2002) yapılan çalışmada, Hindistan'ın Batı Bengal eyaletinden kültür havuzlarında yetişen nil tilapya (*Oreochromis niloticus*) balıklarından, elde edilen bakteri ONF1P ve maya suşu ONF7.1C, izolatlarının her ikisinin de seyreltilmiş safra suyuna karşı toleranslı olduğu ve balık bağırsaklarında büyüebildikleri rapor edilmiştir.

Bifidobakteriler için en uygun, optimum büyümenin görüldüğü pH değeri aralığı 6.5-7.0'dır. Ortam pH'sının 4,5-5'ten düşük ve 8-8,5'dan yüksek olduğu koşullarda üremeleri azalmaktadır (Yaşar & Kurdaş;2009: 4).

Yapılan bir çalışmada kalkan balığı'nda *Enterococcus faecium* CV1, *E. faecium* LPP29, *Lactobacillus curvatus* subsp., *curvatus* BCS35, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMF110, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* SMM69, *Pediococcus pentosaceus* SMM73, *P. pentosaceus* TPP3 ve *Weissella cibaria* P71 suşları izole edilmiş ve laktik asit süspansiyonları, önceden pH 3.0 ve 6.8'e ayarlanmış ortama aktararak, 1.5 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrasında da canlı sayımlar yapılmıştır. Bu yapılan çalışmanın sonucunda tüm laktik asit bakterilerinin, 1.5 saat boyunca pH 3.0'a kadar hayatta kaldığı ve hayatta kalma seviyelerinin tüm örneklerde %50'den daha yüksek seviyede olduğu fakat *E. faecium* CV1, *E. faecium* LPP29 suşlarında daha düşük koloni sayılarının elde edildiği belirlenmiştir. (Muñoz-Atienza vd., 2014: 3). Bu çalışmada, genellikle izolatlar düşük pH şartlarında (pH: 2.5) üreme göstermezken, pH 6.5'da üreme göstermiştir. Benzer şekilde, gökkuşuğu alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen *Candida* türlerine ait suşlarının düşük pH şartlarına (pH: 2) yüksek tolerans gösterdikleri belirlenmiştir (Alves vd., 2020: 6).

Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiriciliği için izole edilen laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri araştırıldığında, *L. paracasei* F2, *W. Viridescens* F10, *L. pentosus* S14, S19 ve *E. mundtii* S21 suşlarının pH 2'de hayatta kaldıkları rapor edilmiştir (Sica vd., 2012: 875)

Antimikrobiyal etkinlik testinde, elde ettiğimiz tüm izolatlar *Micrococcus luteus* NRRL B-4375 bakterisinde zon açıklıkları (6-16,6 mm arası) gösterdiği görülmüştür. Diğer örneklerde ise C2-2 ve C4-4 izolatlarının sırasıyla 11 mm ve 19 mm zon açıklıklarını *Bacillus subtilis* RSKK 244 bakterisinde, C2-1 izolatının ise *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisinde (11 mm) gösterdiği belirlenmiştir. Zon oluşumu meydana gelen bu bakterilerin Gram pozitif bakteriler olduğu tespit edilmiştir. Probiyotik özellik taramasında kullanılan antimikrobiyal etkinlik testinde, izolatların Gram pozitif bakterilere daha yüksek etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

Atlantik somon balıklarından (*Salmo salar*) izole edilen *Carnobacterium* sp. suşunun *Aeromonas salmonicida*'ya karşı antimikrobiyal etkinliği test edilmiştir. *Carnobacterium* sp. suşları, *Aeromonas salmonicida*'ya karşı anlamlı inhibisyon zonları oluşturduğu belirtilmiştir (Robertson vd., 2000: 236).

Atlantik Somonu'nun (*Salmo salar*) gastrointestinal kanalından izole edilen laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal etkinliği kuyu difüzyon yöntemi ile çalışılmıştır. İzole edilen 20 laktik asit bakterisinin 3 tanesi en az 2 balık patojenine karşı antagonistik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Antagonistik özellik gösteren bu 3 izolatın Gram pozitif bakteriler olduğu rapor edilmiştir (Amin vd., 2017: 490)

Yapılan fenol tolerans testlerinde, izolatların %0.25 ve %0.50 konsantrasyonundaki fenol stresinde C1-1 ve C2-3 izolatları en yüksek direnci göstermiştir. C1-4, C2-1, C2-2, C3-1, C3-2, C4-2 ve C4-3 izolatlarının ise orta seviyeli bir direnç gösterdiği görülmüştür. C1-2, C1-3, C2-4, C3-3, C3-4, C4-1, C4-4 izolatlarının ise konsantrasyon arttıkça üremelerinin azaldığı yani fenole karşı direnç göstermedikleri görülmüştür.

Acharya ve Shah (2002) tarafından yapılan çalışmada 17 *Bifidobacterium* kültürünün %0,2-0,5 arasında 4 farklı fenol konsantrasyonunda canlılığı test edilmiştir. Test edilen kültürlerin tamamının %0,2 fenol varlığında gelişim gösterirken konsantrasyon %0,5'e doğru yükseldikçe canlılığının azaldığı rapor edilmiştir. Tabrizi tarafından yapılan tez çalışmasında (2021), bozadan izole edilen *Lb. plantarum* HP1 suşunun %0,4 fenol varlığında canlılığını koruduğu ve insan bağırsağında yaşayabileceği tespit edilmiştir.

Çalışmada C3-3, C3-4 ve C4-3 izolatları lizozime karşı direnç göstermiştir. C2-4 izolatı, 100, 200 ve 300 ($\mu\text{g/ml}$) konsantrasyonlarına karşı giderek direncini düşürmüştür.

Yayın balıklarına (*Clarias macrocephalus*), *Acinetobacter* KU011TH suşunun verilmesi ile lizozim aktivitelerinin arttığı ve ayrıca *A. hydrophila* enfeksiyonuna karşı mortalite oranını düşüştüğü tespit edilmiştir (Bunnoy vd., 2019: 613). Potansiyel probiyotik *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 suşunun tropikal tatlı su balığı *Labeo rohita'nın* üzerinde 60 gün boyunca denenmesi sonucunda, 30.günde tedavi gruplarında kontrol grubuna kıyasla serum lizozim aktivitesinde hafif bir artış gözlemlendiği, 60.günde ise 10^5 , 10^7 ve 10^9 cfu g^{-1} *P. aeruginosa* içeren yem ile beslenen balıkların serum lizozim aktiviteleri, kontrol diyetiyle beslenen balıkların aktivitelerinden önemli ölçüde yükseldiği tespit edilmiştir (Giri vd., 2012: 1137).

Bu çalışmada, sazan balığından elde ettiğimiz örneklerle uyguladığımız hemolitik aktivite testinde, sadece C4-1 izolatının koloni çevresi yeşil renkte bir zon oluşturarak, alfa hemoliz (α - hemoliz) özellik göstermiştir. Diğer tüm izolatlar, (C1-1, C1-2, C1-3, C1-4, C2-1, C2-2, C2-3, C2-4, C3-1, C3-2, C3-3, C3-4, C4-2, C4-3, C4-4) koloni etrafında şeffaf zon oluşum ile beta hemolitik (β - hemolitik) aktivite göstermiştir. Çiğ balık örneklerinden izole edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* suşları ile yapılan çalışmada, sardalye, barbun ve hamsi kaynaklı dört adet *Enterococcus faecalis* izolatının β -hemolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Karalioğlu vd., 2019: 346). Nil Tilapyası (*Oreochromis niloticus*) bağırsağından elde edilen *Bacillus* bakterilerinin probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Hemolitik aktivitelere bakıldığında, TPS3N, TPS17 suşlarının α - hemoliz, TPS4 suşunun γ - hemoliz olduğu tespit edilmiştir (Kuebutornye vd., 2020: 417).

Çalışmamızda, elde edilen izolatlar yüksek antioksidan özellik göstermişlerdir. En yüksek aktiviteyi %98,08 ile C2-4 izolatı gösterirken, en düşük antioksidan özellik ise %67,22 ile C1-4 izolatı göstermiştir. Çipura balığının (*Sparus aurata*) bağırsaklarından izole edilen *Lactobacillus rhamnosus* suşlarının %70'e kadar antioksidan özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Dimitroglou vd., 201: 3). *Lactobacillus* cinsi bakterilerin antioksidan aktiviteleri üzerine çalışıldığında, en yüksek aktivite %81,9 ile *L. brevis* KIR12 ve %78,5 ile *L. casei* EMP2 suşlarında görülmüştür. *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* 15L suşunun çalışması yapılan diğer suşlara kıyasla DPPH giderim aktivitesinin %56,3 ile en düşük olduğu tespit edilmiştir (Ural ve Yüksekdağ, 2020: 17).

Antimikrobiyal disk difüzyon yönteminde, Ampicillin, bacitracin ve carbenicillin antibiyotiklerine karşı hiçbir izolat zon oluşturmamıştır. Chloramphenicol antibiyotiğine karşı sadece C1-3, C3-2 ve C3-4 (13 mm, 8 mm, 26 mm) izolatları direnç göstermiştir. C1-2, C1-4, C2-4 ve C4-4 izolatları ise eritromycin antibiyotiğine karşı direnç (6 mm, 17 mm, 11 mm, 18 mm) göstermişlerdir. Neomycin, streptomycin ve ofloxaci (5,10) antibiyotiklerine karşı ise tüm izolatların direnç gösterdiği görülmüştür. Literatürde, test edilen çiğ balıklardan izole edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarında, streptomisin, eritromisin, gentamisin, tetrasiklin, vankomisin ve kloramfenikol antibiyotikleri test edilmiştir. Bu antibiyotiklere karşı orta ve/veya yüksek düzeyde direnç tespit edilmiştir. Ayrıca izolatlarda çoklu antibiyotik direnci de olduğunda rapor edilmiştir (Karalioğlu vd., 2019: 346). Ben Said ve arkadaşlarının 2017 de yaptığı çalışmada, Tunus bölgesinden elde edilen, balık ve kabuklu deniz ürünlerinden izole edilen *enterococların* bazı suşlarının streptomisin, tetrasiklin, eritromisin, siprofloksasin,

gentamisin ve kloramfenikol gibi antibiyotiklere direnç gösterdiği, ayrıca bazı suşların çoklu antibiyotik direnç özelliğine sahip olduğu rapor edilmiştir.

Yine sazan balıklarında yapılan bir çalışmada, sazan balıklarından izole edilen *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Lactobacillus paracasei* probiyotik bakterilerinin *L. Garvieae* patojeni üzerinde yapılan uygulamalarda, bu probiyotik suşlarının iyileştirici bir etkisinin olmadığı ancak yeme karıştırıldıkları zaman, balıkların *L. garvieae*'e karşı dirençlerini önemli düzeyde arttırdığı rapor edilmiştir (Tekebayeva vd., 2021: 3).

Literatürde, probiyotiklerin yemlere entegre edilerek beslenmede kullanımları sonucunda elde edilen veriler yer almaktadır. Gökkuşuğu alabalıklarında *L. rhamnosus* JCM 1136 suşunun yem katkı maddesi olarak kullanımının immün sistem ve bağırsak florası üzerindeki etkisine bakıldığı çalışmada, canlı formdaki *L. rhamnosus* JCM 1136 suşu 10^9 ve 10^{11} kob/g olacak şekilde ticari yemlere ilave edilmiş ve 30 gün boyunca balıkların beslenmesi bu yemlerle gerçekleştirilmiştir. Yemlenmenin gerçekleştirildiği 30 gün boyunca balık bağırsaklarında probiyotik bakteri oranının artış gösterdiği ve probiyotik uygulanan gruplarda serum lizozim, komplement aktivitesi ve lökositlerin fagositik aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir (Panigrahi, vd., 2004:385).

Bacillus subtilis'in *Cyprinidae* familyasından olan *Labeo rohita*'da potansiyel probiyotik olarak değerlendirildiği bir çalışmada, balıklar 2 hafta boyunca 3 farklı konsantrasyonda ($0,5 \times 10^7$ kob/g yem, $1,0 \times 10^7$ kob/g yem ve $1,5 \times 10^7$ kob/g yem) *B. subtilis* içeren yemlerle beslenmiştir. *B. subtilis* içeren yemle beslenen deneme gruplarındaki oransal ağırlık artışının daha yüksek (%35,55) olduğu bildirilmiştir. Yaşama oranlarına bakıldıklarında, kontrol grubuyla (%18,75) yapılan karşılaştırmalarda, probiyotik uygulanan deneme gruplarında (T2, %68,75; T3, %81,25 ve T4, %87,50) önemli oranda daha yüksek sonuçlar rapor edilmiştir (Kumar, vd., 2006: 1217).

Yayın balığı (*Siluris glanis*) ile yapılan bir çalışmada ise, balıklara 2×10^8 kob/g olacak şekilde *E. faecium* ilave edilen yemler ile 58 gün boyunca beslenme yapılmıştır, büyüme parametreleri açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında probiyotik ilave edilen yemlerin daha iyi sonuç verdiği rapor edilmiştir (Bogut, vd., 2000: 109).

Atlantik somonlarının (*Salmo salar*) bağırsaklarından izole edilen *Carnobacterium* sp. probiyotik suşunun 5×10^7 kob/g oranında yeme ilavesinin, *salmonid*'lerin yumurtadan yeni çıkmış yavrularında ve bu yavruların büyüme evrelerinde (*fingerlingler*) denenmesinde, *A.*

salmonicida, *Vibrio ordalli* ve *Yersinia ruckeri* patojenlerinin neden olduğu enfeksiyonların kontrolünde etkili olduğu tespit edilmiştir (Robertson vd., 2000: 238).

Sazan balıklarından elde edilip probiyotik özellikleri test edilen bu izolatların balık yetiştiriciliğinde kullanımı oldukça önemlidir. Probiyotikler, balıkların sindirim sisteminde yararlı mikroorganizmalar olarak görev alır. Patojenik mikroorganizmaların barınması ve büyümesini engelleyerek balıkların genel sağlığını iyileştirir ve enfeksiyonel hastalıklara karşı korur. Bağırsak sağlığını destekleyerek sindirim sistemini düzenlerler. Yemlerden elde edilen verimi artırarak besin maddelerini daha verimli şekilde kullanımlarına da yardımcı olur. Probiyotik bakteriler, balıkların yaşadığı su ortamında besin maddelerini parçalayarak ve atıkları sindirerek su kalitesini artırabilir.

Sazan balıklarından elde edilen probiyotik bakteriler, benzer faydaları sağlamak üzere diğer balık türlerinde de kullanılabilir. Ancak, her balık türünün farklı bir sindirim sistemi ve su koşulları olduğu için probiyotiklerin etkinliği türden türe değişiklik gösterebilir. Dolayısıyla, diğer balık türlerinde kullanılacak probiyotiklerin etkili olup olmadığını belirlemek için tür bazında özel araştırmalar ve testler yapılması gerekir.

Tez çalışma 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.

C1-1 izolatında pH:2.5'te üreme göstermesi ve fenol direncinin yüksek olması bu izolatın seçilmesinde etkili olmuştur. C1-4 izolatının pH:2.5 ve 6.5' te yoğun üreme göstermesi bu izolatın mide ortamından canlı olarak bağırsağa geçişini sağlayabildiğini göstermiştir. Oto-agresyon ve hücreyi yüzeyi hidrofobiklik yüzdeleri de yüksek çıkarak bağırsak yüzeyine tutunma konusunda da yetenekleri olduğu görülmüştür. C4-1 izolatı hemolitik aktivite testinde diğer test edilen izolatlardan farklı olarak yeşil zon açıklığı göstermiş ve alfa hemoliz sonucunu vermiştir ayrıca lizozime karşı dirençte göstermiştir. Bu sonuç bu izolatın seçilmesinde etkili olmuştur. C4-3 izolatının safra toleransına yüksek direnci, antioksidan yüzdesinin yüksekliği, C4-4 izolatının ise yüksek hücre yüzeyi hidrofobikliği, zamana bağlı olarak pH:'.5 ve 6.5'te üreme yoğunluğunun artması, safraya yüksek toleransı, seçilmesinde etkili olmuştur.

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 çalışma hazırlanarak bu izolatların karışımının balık beslenmesine etkilerinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

KAYNAKÇA

- Acharya, M.R. & Shah, R.K.** (2002). Selection of human isolates of bifidobacteria for their use as probiotics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 102, 81-97.
- Adıyaman, E. & Ayhan, V.,** (2010). Etlik Piliçlerin Beslenmesinde Aromatik Bitkilerin Kullanımı (Derleme). Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, *Hayvansal Üretim* 51(1): 57-63.
- Akbulut, B.** (2004). Su Ürünleri Yetiştiriciliği ve Stratejileri. *Aquaculture Studies*, 2004(1), 15-22.
- Akman, E.** (2009). Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Özelliklerinin İncelenmesi Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Aksungur, N., & Çakmak, E.** (2008). Pelajik Balık Yetiştiriciliği. *Aquaculture Studies*, 2008(3), 45-52.
- Alak, G., & Atamanalp, M.** (2012). Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Probiyotik ve Prebiyotik Kullanımı. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 22(1), 62-68.
- Alm, L.** (2009). Probiotics and Human Health. *Nutrition Research*, 29(1), 1-9.
- Alpbaz, A.** (2005). Sazan Yetiştiriciliği. *Su Ürünleri Yetiştiriciliği Kitabı* (pp. 107-125).
- Alpbaz, A.** (2005). Su Ürünleri Yetiştiriciliği: Genel Su Ürünleri Yetiştiriciliği, Yetiştirilen Su Canlıları ve Üretim Yöntemleri. *Alp Yayınları*. (pp. 50-75).
- Altun, S.** (2017). *Dünden Bugüne Balıkçılık, Balıkçılığın Tarihi*. [Erişim Tarihi: 05.06.2017, <http://www.dunyagida.com.tr/haber/dunden-bugune-balikcilik-balikciligin-tarihi/3944>] (pp. 45-60).
- Alves, R., Barata-Antunes, C., Casal, M., Brown, AJ, Van Dijck, P. & Paiva, S.** (2020). Adapting to Survive: How Candida Overcomes Host-Imposed Restrictions During Human Colonization. *PLoS patojenleri* , 16 (5), e1008478, 1-24.
- Amin, M., Adams, M., Bolch, C. J., & Burke, C. M.** (2017). In Vitro Screening of Lactic Acid Bacteria Isolated From Gastrointestinal Tract of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) as Probiotic Candidates. *Aquaculture International*, 25, 485-498.

Angmo, K., A. Kumari, Savitri & T.C. Bhalla. (2016) Probiotic Characterization of Lactic Acid Bacteria

Isolated from Fermented Foods and Beverages of Ladakh, *LWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft -Technol.)* 66:428–435.

Anonim. (2018). *Examples of Antibiotic Sensitivity Testing Methods. Antimicrobial Resistance Learning Site.* [Erişim Tarihi:14.02.2018, <https://amrls.cvm.msu.edu/microbiology/detecting-antimicrobial-resistance/testmethods/examples-of-antibiotic-sensitivity-testing-methods>]

Arends, S., Lebbink, H. R., Spoorenberg, A., Bungener, L. B., Roozendaal, C., van der Veer, E., & Brouwer, E. (2010). The Formation of Autoantibodies and Antibodies to TNF-alpha Blocking Agents in Relation to Clinical Response in Patients with Ankylosing Spondylitis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 28(5), 661-668.

Aslan, S., & Gül, E. (2018). Su Ürünleri Yetiştiriciliğinin Önemi ve Çevresel Etkileri-Elazığ İli Örneği. *Dicle Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Dergisi*, 9(2), 849-858.

Atay, D. (1987). İç Su Balıkları ve Üretim Tekniği. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, 1035 s.

Atay, D. (1990). Balık Üretimi. *T.C Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü*, yay. no. 2, pp. 45-67.

Atay, D. & Çelikkale, M.S. (1983)., Sazan Üretim Tekniği. *San Matbaası*, 185 s.

Aydın, F. (1984). Sazan Üretimi. İç Sularda Balık Yetiştiriciliği ve Sorunları Semineri, *Milli Produktivite Merkezi Yayınları*, (No. 303), 104-128.

Bagheri, T., Hedayati, S. A., Yavari, V., Alizade, M., & Farzanfar, A. (2008). Growth, Survival and Gut Microbial Load of Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) Fry Given Diet Supplemented with Probiotic During the Two Months of First Feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8(1), 43-48.

Balcazar, J. L., Blas, I., Zarzuela, I. R., Cunningham, D., Vendrell, D., & Muzquiz, J. L. (2006). The Role of Probiotics in Aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114, 173-186.

Balcázar, J. L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Calvo, A. C., Márquez, I., & Gironés, O. (2007). Enhancement of the Recovery of *Lactobacillus Plantarum* in Water Samples. *Journal of Applied Microbiology*, 102(3), 773-782.

- Balcázar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, 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.
- Balcı Akova, S.** (2015). Aquaculture and its Distribution in Turkey. *Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research*, 1(4), 160-190.
- Balon, E. K.** (1995). Origin and Domestication of the Wild Carp, *Cyprinus carpio*: From Roman Gourmets to the Swimming Flowers. *Aquaculture*, 129(1-4), 3-48.
- Ben Said L, Hamdaoui M, Klibi A, Ben Slama K, Torres C, & Klibi N.** (2017). Diversity of Species and Antibiotic Resistance in Enterococci Isolated from Seafood in Tunisia. *Ann Microbiol*, 67:135-41.
- Bilginer, H., & Çetin, B.** (2019). Probiyotikler ve Belirlenmelerinde Kullanılan in vitro Testler. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50(3), 312-325.
- Bunnoy, A., Na-Nakorn, U., & Srisapoome, P.** (2019). Probiotic Effects of a Novel Strain, *Acinetobacter* KU011TH, on the Growth Performance, Immune Responses, and Resistance Against *Aeromonas hydrophila* of Bighead Catfish (*Clarias macrocephalus* Günther, (1864)). *Microorganisms*, 7(12), 613.
- Burr, G., Gatlin III, D., & Ricke, S.** (2005). Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract of Fish and Potential Application of Prebiotics and Probiotics in Finned Fish Farming. *Journal of the World Aquaculture Association*, 36 (4), 425-436.
- Carnevali, O., Zamponi, M. C., Sulpizio, R., Rollo, A., Nardi, M., Orpianesi, C., Silvi, S., Caggiano, M., Polzonetti, A. M., & Cresci, A.** (2004). Administration of Probiotic Strain to Improve Sea Bream Wellness During Development. *Aquaculture International*, 12:377-386.
- Ceyhan, N., & Alç, H.** (2012). Bağırsak Mikroflorası ve Probiyotikler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (1), 107-113.
- Chang, C. I., & Liu, W. Y.** (2002). An Evaluation of Two Probiotic Bacterial Strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for Reducing Edwardsiellosis in Cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *Aquaculture*, 25(5), 311-315.
- Çelikkale, M. S.** (1988). İç Su Balıkları ve Yetiştiriciliği: Cilt II. *K.T.Ü., Sürmene Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Yüksek Okulu*, Genel Yayın No:128, Fakülte Yayın No:3, 460 s.

Çetin, B., & Çırpıcı, B. B. (2023). The Effect of Different Temperature and Media Usage on Determining Bile Salt Tolerance in Yeasts. *Journal of Yeast Research*, 1004-1020 s.

Çomak-Göçer, E. M. Ç., Ergin, F., & Küçükçetin, A. (2016). Sindirim Sistemi Modellerinde Probiyotikler. *Gastroenteroloji Günleri Dergisi*, 14(2), 45-58.

Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Júnior, A. I. M., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to Select a Probiotic a Review and Update of Methods and Criteria. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2060-2076.

De Schrijver, R., & Ollevier, F. (2000). Protein Digestion in Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus*) and Effects of Dietary Administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture*, 186(1-2), 107-116.

Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., & Palenzona, D. (2000). Adhesion, Autoaggregation and Hydrophobicity of 13 Strains of Bifidobacterium Longum. *Letters in Applied Microbiology*, 31(6), 438-442.

Devi KP, Suganthy N, Kesika P, & Pandian SK (2008). Bioprotective properties of seaweeds: in vitro evaluation of antioxidants activity and antimicrobial activity against food borne bacteria in relation to polyphenolic content. *BMC Complement Altern Med* 8:38, 1-11

Dunne, C. O., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F., & Collins, J. K. (2001). In vitro Selection Criteria for Probiotic Bacteria of Human Origin: Correlation with In Vivo Findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 386S-392

Elcioglu, O., & Kunduhoglu, B., (2014). Probiotic Characteristics of Natural Lactobacilli Isolated From Traditional Kargi Tulum Cheese. *Italian Journal of Food Science/Rivista Italiana di Scienza degli Alimenti*, 26(1), 45-52.

El-Haroun, E. R., Goda, A. S., & Kabir Chowdhury, A. M. (2006). Effect of Dietary Probiotic Biogen Supplementation as a Growth Promoter on Growth Performance and Feed Utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 37(7), 1473-1480.

Elli, M., Zink, R., Rytz, A., Reniero, R., & Morelli, L., (2000). Iron Requirement of *Lactobacillus* spp. in Completely Chemically Defined Growth Media, *Journal of Applied Microbiology* 88(4), 695-703.

Emre, Y. (2004). Yayın Balığı Yetiştiriciliği, T.C Başbakanlık Güneydoğu Anadolu Projesi, Bölge Kalkınma Dairesi Başkanlığı 18s.

European Food Safety Authority (EFSA). (2012). *Guidance on the Assessment of Bacterial Susceptibility to Antimicrobials of Human and Veterinary Importance*. Parma, Italy.

Fernandez, M. F., Boris, S., & Barbés, C. (2003). Resistance of Lactobacilli to Bacteriocins and Organic Acids. *International Journal of Food Microbiology*, 82(1), 77-84.

Food and Agriculture Organization (FAO). (2012). *Food and Agriculture Data*.

Food and Agriculture Organization (FAO). (2023). *FishStat Plus-Universal Software for Fishery Statistical Time Series*

Food and Agriculture Organization (FAO). (2001). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *World Health Organization/Food and Agriculture Organization of The United Nations, London, Ontario, Canada*, pp. 34-47.

Food and Agriculture Organization (FAO). (2002). Guidelines For the Evaluation of Probiotics in Food. *World Health Organization/Food and Agriculture Organization of The United Nations, London, Ontario, Canada*, pp. 56-78.

Food and Agriculture Organization (FAO). *Towards Sustainable Fish Farming*. Retrieved from [Erişim: 22 Nisan 2002, <http://www.fao.org/english/newsroom/news/2002/4140-en.html>]

Food and Agriculture Organization (FAO). (2020). *2020 Yılı Su Ürünleri Verileri*.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020*. FAO SOFIA 2020,

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2021). *Global Aquaculture Production Statistics Database Updated to 2019 Summary Information*. FAO Aquaculture.

Gad, G. F. M., Abdel-Hamid, A. M., & Farag, Z. S. H. (2014). Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria Isolated from Some Pharmaceutical and Dairy Products. *Brazilian journal of Microbiology*, 45: 25-33.

Gatesoupe, F. J. (1991). Siderophore Production and Probiotic Effect of *Vibrio* sp. Associated with *Turbot* larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resources*, 10:239-246.

Gatesoupe, F. J. (1994). Lactic Acid Bacteria Increase the Resistance of *Turbot* larvae, *Scophthalmus maximus*, Against Pathogenic *Vibrio*. *Aquatic living resources*, 7(4), 277-282.

Geldiy, R., & Balık, S. (2007). Türkiye Tatlısu Balıkları. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları*, 46:644 s.

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*, 143-158.

Ghosh, K., Roy, M., Kar, N., & Ringo, E. (2002). Characterization and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fish Intestines. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), 569-577.

Gir, S. S., Sen, S. S., & Sukumaran, V. (2012). Effects of Dietary Supplementation of Potential Probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the Innate Immunity and Disease Resistance of Tropical Freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(6), 1135-1140.

Gismondo, M. R., Drago, L., & Lombardi, A. (1999). Review of Probiotics Available to Modify Gastrointestinal Flora. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12(4), 287-292.

Global Seafood Alliance. (2024). World Aquaculture Production by Species and Country.

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.

Gunyakti, A., & Asan-Ozusaglam, M. (2019). *Lactobacillus gasseri* From Human Milk with Probiotic Potential and Some Technological Properties. *LWT*, 109:261-269.

Gülşen, O. (2022). Japon Balıklarından (*Carassius Auratus*) İzole Edilen Aday Probiyotik Maya Suşlarının İn Vitro Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.

Hadadji, M., Benama, R., Saidi, N., Henni, D. E., & Kihal, M. (2005). Identification of Cultivable *Bifidobacterium* species Isolated from Breast-fed Infants Feces in West-Algeria. *African Journal of Biotechnology*, 4(5), 422-430.

Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. (2007). Antibiotic Resistances of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 730-739.

Hung, H.-C., Joshipura, K. J., Jiang, R., Hu, F. B., Hunter, D., Smith-Warner, S. A., Colditz, G. A., Rosner, B., Spiegelman, D. & Willett, W. C., (2004), Fruit and Vegetable

Intake and Risk of Major Chronic Disease, *Journal of the National Cancer Institute*, 96 (21), 1577-1584.

Huq, T., Khan, A., Khan, R. A., Riedl, B., & Lacroix, M. (2013). Encapsulation of Probiotic Bacteria in Biopolymeric System. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(9), 909-916.

Irianto, A., & Austin, B. (2002). Probiotics in Aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 25(11), 633-642.

Joshiyura, K. J., Rimm, E., Douglass, C., Trichopoulos, D., Ascherio, A., & Willett, W. (1996). Poor Oral Health and Coronary Heart Disease. *Journal of Dental Research*, 75(9), 1631-1636.

Jöborn, A., Olsson, J. C., Westerdahl, A., Conway, P. L., & Kjelleberg, S. (1997). Colonization in the Fish Intestinal Tract and Production of Inhibitory Substances in Intestinal Mucus and Faecal Extracts by *Carnobacterium* sp. Strain K1. *Journal of Fish Diseases*, 20(5), 383-392.

Karaaliöglu, O., Togay, S. O., Ay, M., Soysal, G., Çardak, M., Bağcı, U., & Tınaztepe, Ö. E. (2019). Çiğ Balık Örneklerinden İzole Edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* Suşlarının Gıda Güvenliği Yönünden Bazı Özelliklerinin Değerlendirilmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 76(3), 341-352.

Karademir, G., & Karademir, B. (2003). Yem Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Biyoteknolojik Ürünler. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 43(1), 61-74.

Katırcioğlu, H. (2001). Gökkuşuğu Alabalığı ve Aynalı Sazandan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Metabolik ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.

Kaya, Y., Duyar, H. A., & Erdem, M. E. (2004). Balık Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı İçin Önemi. *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences* 21(3-4), 365– 370

Kesarcodi, Watson., A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2008). Probiotics in Aquaculture: The Need, Principles and Mechanisms of Action and Screening Processes. *Aquaculture*, 274(1), 1-14.

Kestemont, P. (1995). Different Systems of Carp Production and Their Impacts on the Environment. *Aquaculture*, 129(1-4), 347-372.

- Kıran, F., & Ozer, B.** (2020). Assessment of the Antioxidant Activity of Probiotic *Lactobacillus* Strains Isolated from Fermented Dairy Products. *Journal of Food Science and Technology*, 57(5).
- Kim, D. H., Brunt, J., & Austin, B.** (2007). Microbial Diversity of İntestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1654-1664.
- Korkmaz, Ş.** (2004). Sazan Yetiştiriciliği. *Ankara Üniversitesi. Ziraat Fakültesi. Su Ürünleri Bölümü. Ders kitabı*, 26-32 s.
- Korkut, AY, Hoşsu, B. & Ferhatoğlu, M.** (2003). Probiyotikler ve Su Ürünlerinde Kullanımı. *Ege Su Ürünleri ve Su Bilimleri Dergisi*, 20 (3), 551-556.
- Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J., & Matosic, S.** (2003). Adhesion and Aggregation Ability of Probiotic Strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 981–987.
- Koyner, J. L., Ali, R. S., & Murray, P. T.** (2008). Antioxidants. *Nephron Experimental Nephrology*, 109(4), 109-117.
- Kuebutornye, F.K., Y. Lu, E.D. Abarike, Z. Wang, Y. Li, & M.E. Sakyi,** (2020). In vitro Assessment of the Probiotic Characteristics of Three Bacillus Species From the Gut of *Nile tilapia, Oreochromis niloticus*, *Probiotics Antimicrob*, 12 (2), 412–424.
- Kumar, R., Mukherjee, S. C., Prasad, K. P., & Pal, A. K.** (2006). Evaluation of *Bacillus subtilis* as a Probiotic to Indian Major Carp *Labeo rohita* (Ham.). *Aquaculture Research*, 37(12), 1215-1221.
- Kutlu, H. R., & Çelik, L.** (2001). Yemler Bilgisi ve Yem Teknolojisi. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü (Hayvansal Üretim Lisans Programı), Ders Notu*.
- Kutlu, H. R., & Çelik, L.** (2014). Probiyotikler. *Yemler Bilgisi ve Yem Teknolojisi Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, 209 s.
- Lakra, A.K., L. Domdi, G. Hanjon, Y.M. Tilwani, & V. Arul,** (2020). Some Probiotic Potential of *Weissella confusa* MD1 and *Weissella cibaria* MD2 İsolated From Fermented Batter, *LWT (Lebensm.-Wiss. & Technol.)* 125: 1-9.
- Mani, S. R., Vijayan, K., Jacob, J. P., Vijayakumar, S., & Kandhasamy, S.** (2021). Evaluation of Probiotic Properties of *Lysinibacillus macroides* Under İn Vitro Conditions and

Culture of *Cyprinus carpio* on Growth Parameters. *Archives of Microbiology*, 203(7), 4705-4714.

Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic Potential of Lactobacillus Strains Isolated From Dairy Products. *International Dairy Journal*, 16 (3), 189-199.

Meral, H., & Korukluoğlu, M. (2014). Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2), 71-82.

Merrifield, D. L., Bradley, G., Baker, R. T. M., & Davies, S. J. (2010). Probiotic Potential and pH Tolerance of *Lactobacillus species* Isolated from the Gastrointestinal Tract of Fish. *Aquaculture Research*, 41(3), 295-305.

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.

Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion Mechanisms Mediated by Probiotics and Prebiotics and Their Potential Impact on Human Health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103: 6463-6472.

Muñoz-Atienza, E., Araújo, C., Magadán, S., Hernández, PE, Herranz, C., Santos, Y. & Cintas, LM (2014). Kalkan balığı (*Scophthalmus maximus L.*) Yetiştiriciliğinde Probiyotik Olarak Su Kökenli Laktik Asit Bakterilerinin İn Vitro ve İn Vivo Değerlendirilmesi. *Balık ve Kabuklu Deniz Ürünleri İmmünolojisi*, 41 (2), 1-32.

Naylor, R. L., & Burke, M. (2005). Aquaculture and Ocean Resources: Raising Tigers of the Sea. *Annual Review of Environment and Resources*, 30: 185-218.

Nikolsky, G. V. (1963). *The Ecology of Fishes* Academic Press London and NewYork. 351pp.

Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G., & Ouwehand, A. C. (2001). Characterization of the Properties of Human and Dairy-Derived Probiotics for Prevention of Infectious Diseases in Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2430-2435.

Okan, O. T., Varlıbaş, H., Öz, M., & Deniz, İ. (2013). Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun dışı Bazı Bitkisel Ürünler. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 13(1), 48-59.

- Ottinger, M., Clauss, K., & Kuenzer, C.** (2016). Aquaculture: Relevance, Distribution, Impacts and Spatial Assessments—A Review. *Ocean & Coastal Management*, 119: 244-266.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E.** (2002). Probiotics: an Overview of Beneficial Effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 279-289
- Öğüt, S.** (2014). Doğal Antioksidanların Önemi. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(1), 25-30.
- Önal, D., Beyatlı, Y., & Aslım, B.** (2005). Probiyotik Bakterilerin Epitel Yüzeylere Yapışması. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(9), 1-10.
- Önal-Darılmaz, D.** (2010). Geleneksel Türk Peynirlerinde Propiyonik Asit Bakteri Türlerinin Belirlenmesi ve Bazı Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, 1-176.
- Özden, A.** (2004). Mikrop ve Mide Hastalıkları. *Türk Gastroenteroloji Vakfı, Fersa Matbaacılık, Ankara.*
- Padmavathi, T., R. Bhargavi, P.R. Priyanka, N.R. Niranjana, & P.V. Pavitra,** (2018). Screening of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria and Production of Amylase and its Partial Purification, *J Genet Eng Biotechnol* 16 (2), 357–362.
- Palaniyandi, S. A., Damodharan, K., Suh, J. W., & Yang, S. H.** (2017). In vitro Characterization of *Lactobacillus plantarum* Strains with Inhibitory Activity on Enteropathogens for use as Potential Animal Probiotics. *Indian Journal of Microbiology*, 57: 201-210.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S., & Sugita, H.** (2004). Immune Responses in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Induced By a Potential Probiotic Bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102(4), 379-388.
- Penaz, M., Prokes, M., & Matejka, K.** (1983). Early Development and Growth of the Carp, *Cyprinus carpio*. *Folia Zoologica*, 32(2), 103-116.
- Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J. L., García, Y., Halaihel, N., Vendrell, D., de Blas, I., & Múzquiz, J. L.** (2011). Autoaggregation and Adhesion Properties of Potential Probiotic Bacteria Isolated from Fish Intestines. *Journal of Applied Microbiology*, 110(1), 194-204.

- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C.** (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89-96.
- Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., & Soccol, C. R.** (2008). Trends in Non-Dairy Probiotic Beverages. *Food Research International*, 41(2), 111-123.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., & Gopal, PK** (1998). Probiyotik Olarak Kullanılmak Üzere *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* Suşlarının Seçimi ve Karakterizasyonu. *Uluslararası Süt Dergisi*, 8 (12), 993-1002.
- Pullin, & R. S. V.** (1986). Worldwide Status of Carp Culture. In R. Buillard & J. Marcel (Eds.), *Aquaculture of Cyprinids*, 21-34 s.
- Rahman, M. M., Verdegem, M. C. J., & Nagelkerke, L. A. J.** (2006). Growth, Production and Food Preference of Two Strains of *Nile tilapia*, *Oreochromis niloticus*, and Their Hybrids in Aquaculture Ponds. *Aquaculture*, 261(3), 622-633.
- 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.
- Robertson, P. A. W., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P., & Austin, B.** (2000). Use of *Carnobacterium* sp. as a Probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*, 185(3-4), 235-243.
- Rollo, A., Sulpizio, R., Nardi, M., Silvi, S., Orpianesi, C., Caggiano, M., & Carnevali, O.** (2006). Live Microbial Feed Supplement in Aquaculture for Improvement of Stress Tolerance. *Fish Physiology and Biochemistry*, 32: 167-177.
- Sağdıç, O., Küçüköner, E., & Özçelik, S.** (2004). Probiyotik ve Prebiyotiklerin Fonksiyonel Özellikleri. *Research in Agricultural Sciences*, 35(3-4), 221-228
- Salinas, I., Cuesta, A., Esteban, M. Á., & Meseguer, J.** (2005). Dietary Administration of *Lactobacillus Delbrückii* and *Bacillus subtilis*, Single or Combined, on Gilthead Seabream Cellular Innate Immune Responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(1), 67-77.
- Salminen, S., Wright, A. V., & Ouwehand, A.** (2004). Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects. *CRC Press*.
- Sanders, M. E.** (2003). Probiotics: Considerations for Human Health. *Nutrition Reviews*, 61(3), 91-99.

Sarhan, E. (1976). Sazan ve Türkiye'de Yetiştirme Olanakları. *Hayvansal Üretim*, 5(1), 19-24.

Sica, M. G., Brugnoli, L. I., Marucci, P. L., & Cubitto, M. A. (2012). Characterization of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from an Estuarine Environment for Application in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Farming. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101: 869-879.

Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Sick, E. B., Pipper, C. B., Martinussen, T., & Gram, L. (2001). The Probiotic Potential Against Vibriosis of the Indigenous Microflora of Rainbow Trout. *Environmental Microbiology*, 3(12), 755-765.

Sullivan, Å., & Nord, C. E. (2002). The Place of Probiotics in Human Intestinal Infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20(5), 313-319.

Suminto, & Hirayama, K. (1997). Application of a Growth-Promoting Bacteria for Stable Mass Culture of Three Marine Microalgae. In *Live Food in Aquaculture: Proceedings of the Live Food and Marine Larviculture Symposium Held in Nagasaki*,. s 223-230

Tabrızı, & B. R. (2021). *Lactobacillus plantarum* HP1'in Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi Yüksek Lisans Tezi, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2013). Fish Matters: Importance of Aquatic Foods in Human Nutrition and Global Food Supply. *Reviews in Fisheries Science*, 21(1), 22-38.

Tekebayeva, Z., Zakarya, K., Abzhalelov, AB, Beisenova, RR & Tazitdinova, RM (2021). Bir In Vitro Deneyde Sazan Laktokokkozunda Bir Probiyotiğin Etkinliği. *Mikrobiyal Patogenez*, 161:105289.

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.

Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2005). *Lactobacillus plantarum* Isolated from Molasses Produces Bacteriocins Active Against Gram-Negative Bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2-3), 317-326.

Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., & Salminen, S. (2001). Probiyotik Bakteriler İçin Kalite Güvence Kriterleri. *Amerikan Klinik Beslenme Dergisi*, 73 (2), 393-398.

- Turgut, E.** (2007). Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde probiyotiklerin kullanımı. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University (JAFAG)*, 2:13-18.
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK).** (2018). *Su Ürünleri İstatistikleri*. Ankara
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK).** (2024). *Su ürünleri istatistikleri*. Ankara.
- Ural, S., & Yüksekdağ, Z.** (2020). Lactobacillus Cinsi Bakterilerinin Farklı Yöntemler ile Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 1(1-2), 13-21.
- Xiang-Hong, W., Jun, L., Wie-Shang, J., & Huai-Shu, X.** (1998). Application of Probiotic in Aquaculture. *Ocean University of Qingdao, China*, 266003.
- Vine, N. G., Leukes, W. D. & Kaiser, H.** (2006). Probiotics in Marine Larval Culture. *FEMS Microbiology Reviews*, 30 (3), 404-427.
- Walker, D. K., & Gilliland, S. E.** (1993). Relationships Among Bile Tolerance, Bile Salt Deconjugation, and Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 76(4), 956-961.
- Wood, C. S. & Ghannudi, S. A.,** (1985). Study Of A Shallow Carp (*Cyprinus carpius* L.) Pond And Its Relevance To Inland Fish Farming In Libyan. *Aquaculture*, 44:125-131.
- World Health Organization.** (2004). Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*, 2:17-299.
- Woyнарovich, E., & Horváth, L.** (1980). *The Artificial Propagation of Warm-water Finfishes: A Manual for Extension*. FAO Fisheries Technical Paper No. 201. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E. & Tzanetaki, N.,** (2000). Characterization of Lactobacillus Isolates From infant Faeces as Dietary Adjuncts. *Food Microbiology*, 17, 205-215
- Yalçın, S., Çiftçi, İ., Önel, A. G., & Yılmaz, A.,** (1996). Yem Katkı Maddelerinde Gelişmeler. 3. Uluslararası Yem Kongresi ve Yem Sergisi. Ankara s.23-47.
- Yaman, F., & Esendal, Ö.** (2004). Balıklarda Probiyotik Kullanımı. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2(06), 1-18.
- Yaşar, B. & Kurdaş, O.Ö.** (2009). Probiyotikler ve Gastrointestinal Sistem. Güncel Gastroenteroloji 13/1. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Gastroenterohepatoloji Kliniği, İstanbul, 23-28.

- Yavuz Durmaz, H.** (2007). Isolation, Characterization, Determination of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria from Human Milk, Yüksek Lisans Tezi, İzmir Teknoloji Üniversitesi
- Yıldırım, Ö., & Okumuş, İ.** (2004). Muğla İlinde Su Ürünleri Yetiştiriciliği ve Türkiye Su Ürünleri Yetiştiriciliğindeki Yeri. *Su Ürünleri Dergisi*, 21(3).
- Yıldırım, Y., & Diker, K. S.** (2021). Akuakültürde Probiyotikler. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 6(4), 604-613.
- Yılmaz, M., Yılmaz, S., Kandemir, Ş., & Polat, N.** (2002). Samsun-Bafra Balık Gölleri (Tatlı Göl ve Gıcı Gölü)'nde Yaşayan Sazan (*Cyprinus carpio*, L., 1758)'ın Sindirim Sistemi İçeriği. *Fırat Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* 14: 241-250.
- Yoon, JJ & Young, CJ** (1975). Experiment on Raising Carp in Brackish Water. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8 (3), 181-184.
- Zago, M., Fornasari, M.E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., & Giraffa, G.** (2011). Characterization and Probiotic Potential of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Cheeses. *Food Microbiology*, 28 (5), 1033-1040.